

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM BIOCÊNCIAS E
SAÚDE – NÍVEL MESTRADO

JÉSSICA ALINE MALANOTTE

**EFEITO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA NA REGENERAÇÃO
NERVOSA PERIFÉRICA, EM RATOS *WISTAR* COM DOENÇA
PERIODONTAL INDUZIDA**

CASCADEL-PR

Março/2018

JÉSSICA ALINE MALANOTTE

**EFEITO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA NA REGENERAÇÃO
NERVOSA PERIFÉRICA, EM RATOS *WISTAR* COM DOENÇA
PERIODONTAL INDUZIDA**

Defesa de dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Biociências e Saúde – Nível Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociências e Saúde.

Área de concentração: Processo saúde-doença

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Nassar

Co-orientador: Prof. Dr. Gladson Ricardo Flor Bertolini

CASCAVEL-PR

Março/2018

FOLHA DE APROVAÇÃO

JÉSSICA ALINE MALANOTTE

EFEITO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA NA REGENERAÇÃO NERVOSA PERIFÉRICA, EM RATOS *WISTAR* COM DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Saúde e aprovada em sua forma final pelo orientador e pela Banca examinadora.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Nassar
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)

Profa. Dra. Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)

Prof. Dr. Dernival Bertoncetto
Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)

CASCAVEL – PR
Março/ 2018

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Dr. Carlos Augusto Nassar, por todos os ensinamentos, paciência e dedicação.

Ao meu co-orientador, professor Dr. Gladson Ricardo Flor Bertolini. Muito obrigada pela paciência e disponibilidade ao longo de tantos anos.

Às professoras Doutoras Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro e Rose Meire Costa Brancalhão, que tantas vezes se colocaram à disposição para me auxiliar durante o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos professores: Dra. Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro e Dr. Dornival Bertoncelo membros da banca, pela disponibilidade.

A todos os alunos de graduação, iniciação científica, mestrado e demais funcionários dos laboratórios, LELRF e LABEF que auxiliaram nas coletas e manejo com os animais.

A minha família pelo apoio incondicional, amor, paciência, cumplicidade e compreensão pelos momentos de ausência.

Ao programa de pós-graduação em Biociências e Saúde e à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, pela oportunidade do desenvolvimento deste estudo e à Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

RESUMO GERAL

A doença periodontal é uma condição inflamatória crônica das estruturas de fixação dos dentes. A proximidade do biofilme bacteriano à vascularização periodontal facilita a disseminação de bactérias, contribuindo para a inflamação sistêmica, o que pode ocasionar a exacerbação da degeneração neuronal nas lesões nervosas devido ao intenso processo inflamatório. Estudos científicos reportam que o laser de baixa potência pode melhorar a condição inflamatória em lesões nervosas. Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do laser de baixa potência na regeneração nervosa periférica sob a condição inflamatória sistêmica da doença periodontal. Foram utilizados 48 ratos machos, divididos em 6 grupos: controle (GC); doença periodontal (GDP); lesão nervosa (GL); doença periodontal com lesão nervosa (GDPL); lesão nervosa e tratamento (GLT); doença periodontal com lesão nervosa e tratamento (GDPLT). No primeiro dia de experimento, realizou-se a ligadura ao redor dos primeiros molares inferiores que atuou como irritante gengival por 30 dias. No 15º dia de experimento, o nervo foi lesionado por axonotmese, o tratamento com laser de baixa potência iniciou no 18º dia, realizado por 2 semanas. No processo, avaliou-se o índice funcional do isquiático (IFC), com posterior eutanásia de todos os animais no 30º dia de experimento. Foram coletados o nervo isquiático e as hemimandíbulas direitas e esquerdas para análise morfológica, histológica, radiográfica e do estresse oxidativo. Na análise radiográfica e histomorfométrica da mandíbula, foi possível comprovar a indução da doença periodontal, nos resultados do IFC; não houve diferença estatística entre os grupos na primeira avaliação pré-lesão. Não obstante, a partir da segunda avaliação, todos os grupos apresentaram diminuição desses valores, que se mantiveram após tratamento. Na histomorfometria do tecido nervoso não houve diferença entre os grupos no total de fibras nervosas (FN), em relação ao total de FN viáveis e maiores que 4 micrómetros, GC e GDP apresentaram maior quantidade que GL e GDPL, nas fibras menores de 4 µm, todos os grupos foram semelhantes. GC e GDP apresentaram menor quantidade de fibras inviáveis. Com relação aos diâmetros das FN e bainha de mielina e axônio, GC e GDP apresentaram maiores diâmetros para as FN maiores que 4µm, enquanto que, nas menores que 4µm, apenas para a BM houve diferença, GC apresentou diâmetro maior que GL e GDPL. Todos os grupos apresentaram quantidades semelhantes de vasos sanguíneos e porcentagem de tecido conjuntivo. Já na densidade dos núcleos celulares, GC e GDP apresentaram médias menores que os demais grupos. Na morfologia do tecido nervoso, GDPL apresentou fibras integras de maior diâmetro, enquanto GLT e GDPLT maior e menor diâmetros. No sistema antioxidante, houve aumento da concentração de proteínas, maior atividade da superóxido, e diminuição da atividade da glutatona transferase nos grupos tratados. Catalase e colinesterase não apresentaram diferença entre os grupos, e a lipoperoxidação estava aumentada nos grupos com DP. O que se concluiu foi que o laser de baixa potência nos parâmetros utilizados não foi eficaz em aumentar o limiar nociceptivo; contudo, auxiliou na regeneração das fibras nervosas. Apesar da inflamação no local ainda estar presente, o tratamento protegeu as células contra danos oxidativos devido ao aumento da superóxido e de proteínas; porém, a diminuição da glutatona S transferase demonstra a inibição dessa etapa do sistema antioxidante.

Palavras chaves: Compressão Nervosa; Periodonto; Inflamação; Estresse Oxidativo.

GENERAL ABSTRACT

Periodontal disease is a chronic inflammatory condition of the teeth fixation structures, the proximity of the bacterial biofilm with periodontal vascularization facilitates the dissemination of bacteria, contributing to systemic inflammation, and may cause exacerbation of neuronal degeneration in the nervous lesions due to the intense inflammatory process. Studies report that low-power laser can improve the inflammatory condition in nerve lesions. Thus the objective of this study was to evaluate the effect of low power laser on peripheral nerve regeneration under the systemic inflammatory condition of periodontal disease. A total of 48 male rats were divided into 6 groups: control (GC); periodontal disease (GDP); nerve injury (GL); periodontal disease with nerve damage (GDPL); nerve damage and treatment (GLT); periodontal disease with nerve injury and treatment (GDPLT). On the 1st day of the experiment, ligation was performed around the lower first molars, which acted as a gingival irritant for 30 days. On the 15th day of the experiment, the nerve injury was performed by axonotmosis and the low power laser treatment started on the 18th day, performed for 2 weeks. The sciatic functional index (IFC) was evaluated, with subsequent euthanasia of all animals on the 30th day of the experiment. The sciatic nerve and right and left hemimandibula were collected for morphological, histological, radiographic and oxidative stress analysis. In the radiographic and histomorphometric analysis of the mandible, it was possible to confirm the induction of periodontal disease, in the results of the IFC, there was no statistical difference between the groups in the first pre-lesion evaluation, since the second evaluation, all groups presented a decrease in these values, which were maintained after treatment. In the histomorphometry of the nervous tissue there was no difference between the groups in the total nerve fibers (FN), in relation to the total of viable NF and greater than 4 micrometers, GC and GDP presented greater amount than GL and GDPL, in the fibers smaller than 4 μm all groups were similar. GC and GDP showed lower amounts of non-viable fibers. In relation to the diameters of the FN and myelin and axon sheath, GC and GDP presented larger diameters for the FN greater than 4 μm , while in the smaller ones only 4 μm for the BM there was difference, GC presented a larger diameter than GL and GDPL. All groups showed similar amounts of blood vessels and percentage of connective tissue. In the density of the cell nuclei, GC and GDP presented lower mean values than the other groups. In the morphology of the GDPL nervous tissue presented integral fibers of larger diameter while GLT and GDPLT larger and smaller diameters. In the antioxidant system, there was an increase in protein concentration, higher superoxide activity, and decreased glutathione transferase activity in the treated groups. Catalase and cholinesterase did not differ between groups, and lipoperoxidation was increased in the PD groups. In conclusion, the low power laser in the parameters used was not effective in increasing the nociceptive threshold, but it helped in the regeneration of the nerve fibers, although the inflammation in the place was still present, yet the treatment protected the cells against oxidative damages due to the increase of the superoxide and protein, however the decrease of glutathione S transferase demonstrates the inhibition of this stage of the antioxidant system.

Keywords: Nerve Compression; Periodontal; Inflammation; Oxidative Stress

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	10
OBJETIVOS	13
REVISÃO GERAL DE LITERATURA	14
Anatomia do nervo periférico.....	14
Classificação das lesões nervosas periféricas.....	14
Degeneração e regeneração axonal.....	16
Doença periodontal.....	18
Associação entre doença periodontal e lesão nervosa.....	20
Laser de baixa potência e seu efeito na lesão nervosa periférica.....	21
Modelo animal.....	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
ARTIGO CIENTÍFICO 01	30
ARTIGO CIENTÍFICO 02	52
ANEXOS	77
Aprovação no Comitê de Ética.....	77
Normas da revista - Artigo 01.....	78
Normas da revista - Artigo 02.....	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -Classificação dos graus das lesões nervosas periféricas...**17**

Figura 2 -Degeneração e regeneração do nervo periférico.....**18**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
µm	Micrômetros
>	Maior
<	Menor
AX	Axônio
BB	Bandas de bungners
BM	Bainha de mielina
CAT	Catalase
ChE	Colinesterase
DP	Doença periodontal
DW	Degeneração walleriana
FN	Fibras nervosas
G	Gramma (s)
GaAlAs	Arseneto de gálio e alumínio
Ga-As	Arseneto de gálio
GC	Grupo controle
GDP	Grupo controle doença periodontal
GDPL	Grupo doença periodontal com lesão nervosa
GL	Grupo controle lesão
GDPLT	Grupo doença periodontal com lesão nervosa e tratamento
GLT	Grupo lesão nervosa e tratamento
GST	Glutathione S transferase
He-Ne	Hélio-neônio
IFC	Índice funcional do isquiático
IL	Interleucina
J	Joules
Kg	Quilograma (s)
LABEF	Laboratório de biologia estrutural e funcional
LBP	Laser de baixa potência
LELRF	Laboratório de estudo das lesões e recursos fisioterapêuticos
LNP	Lesão nervosa periférica
Mg	Miligrama (s)
ml	Mililitro (s)
MMP	Metaloproteinase (s)
NC	Núcleo celular
Nm	Nanômetro (s)
°C	Graus célsius
PEG2	Prostaglandina E 2
SNP	Sistema nervoso periférico
SOD	Superóxido dismutase
TNF-α	Fator de necrose tumoral – alfa
UNIOESTE	Universidade Estadual do Oeste do Paraná
VS	Vaso sanguíneo

INTRODUÇÃO

A doença periodontal (DP) refere-se a uma inflamação crônica das estruturas de fixação dos dentes (tecidos gengivais, ligamento periodontal e osso alveolar), que é iniciada predominantemente por bactérias gram-negativas, anaeróbias, que colonizam a área subgengival. Essas bactérias ocasionam a formação de bolsas periodontais e a indução de reabsorção do osso alveolar que culminam em perdas dentárias. Essa destruição é expressa por meio da perturbação da homeostase entre a resposta imune do hospedeiro e o agente causador (GARLET et al., 2012; HAJISHENGALLIS, 2015; MOOTHA et al., 2016; TOREGANI et al., 2014).

Outra condição inflamatória são as lesões nervosas periféricas (LNP), que são geralmente causadas por traumas com armas de fogo, arma branca, esmagamento e pinçamento dos nervos, resultando em comprometimentos motores e sensoriais. Tais comprometimentos acontecem porque a desnervação dos músculos causa hipotrofias, limitações na amplitude de movimento, dor e limitações funcionais, tornando-se um problema socioeconômico, haja vista que afeta significativamente a qualidade de vida dos pacientes (FARONI et al., 2015; GU; DING; WILLIAMS, 2014; MENORCA; FUSSELL; ELFAR, 2013).

Após uma lesão, uma série de eventos fisiopatológicos ocorrem no nervo, conduzindo a degeneração walleriana (DW). Macrófagos, neutrófilos e monócitos, por exemplo, juntamente com marcadores e fatores pró inflamatórios infiltram o local da lesão, incluindo fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina (IL) 1 β e IL6, gerando um processo inflamatório (GU; DING; WILLIAMS, 2014; STRATTON; [SHAH](#), 2016).

A proximidade anatômica do biofilme bacteriano com a vascularização periodontal facilita a disseminação sistêmica de bactérias, contribuindo para a carga inflamatória sistêmica do indivíduo, o que promove a doença sistêmica. Clinicamente, assim como as LNPs, a DP é caracterizada por um aumento dos níveis circulantes de mediadores pró-inflamatórios sistêmicos, como, por exemplo, a proteína C reativa, IL1, IL12, IL18, IL21 e IL6, que ampliam a destruição periodontal e a diminuição dos níveis de mediadores anti-inflamatórios como a IL-4 (LEISHMAN; SEYMOUR; FORD, 2013; MOOTHA et al., 2016; SCHENKEIN; LOOS, 2013).

Outro aspecto relevante da DP está relacionado à sua ocorrência: os indivíduos de baixa escolaridade e de classes sociais menos desenvolvidas são os mais afetados, mostrando que as desigualdades sociais influenciam essa doença. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a forma grave da DP afeta de 10 a 20% das pessoas e as formas leve e moderada de 20 a 50% da população mundial, correspondendo a 15% dos adultos entre 21 e 50 anos de idade. No Brasil, a prevalência da DP moderada em adultos foi de 15,3%, e a forma grave 5,8% (OLIVEIRA; WATT; HAMER, 2010; TOREGANI et al., 2014; VETTORE; MARQUES; PERES, 2013).

Uma possível associação entre DP e lesões nervosas foi proposta por Gurav (2014), em que a DP poderia atuar como uma inflamação sistêmica, sendo fundamental para a exacerbação da degeneração neuronal, servindo como uma fonte perene para os níveis de fatores pró-inflamatórios sistêmicos, pela presença de várias bactérias e vírus na bolsa periodontal. Esses agentes seriam capazes de exercer efeitos adversos, ao afetar a integridade vascular no cérebro, o que poderia perpetuar um processo inflamatório crônico constante operado pela ativação da resposta imune inata, resultando na degeneração neuronal.

Existem diversas formas de tratamento para lesões nervosas; porém, tem se dado atenção ao desenvolvimento de abordagens terapêuticas não cirúrgicas para acelerar a regeneração axonal e a melhora funcional, destacando-se o laser terapêutico ou laser de baixa potência (LBP). Trata-se de um dispositivo que produz um feixe de radiação, com comprimento de radiação único, que apresenta uma série de indicações, sendo amplamente utilizado no campo terapêutico (ANDRADE et al., 2014; ANTUNES et al., 2015).

Já se sabe que a absorção da energia luminosa pelo tecido nervoso é capaz de modular as células do sistema imune, aumentar a síntese de adenosina trifosfato, melhorar a microcirculação, aumentar a quantidade de fibroblastos e colágeno. Tais aspectos promovem o crescimento da fibra nervosa, acelerando a condução nervosa, desempenhando ação analgésica, anti-inflamatória e cicatrizante, o que aumenta a taxa de regeneração nervosa (ANTUNES et al., 2015; MARCOLINO et al., 2013; ROSA-JUNIOR et al., 2016; SENE et al., 2013).

Diversos estudos apontam para o efeito de regeneração do laser de baixa potência na LNP (ANTUNES et al., 2015; MARCOLINO et al., 2013; ROSA-JUNIOR et al., 2016); todavia, não existem estudos avaliando esse tratamento na condição inflamatória sistêmica, decorrente da DP; diante de tal ausência de pesquisas, este estudo se justifica.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Analisar o efeito do laser de baixa potência na regeneração nervosa isquiática sob a condição inflamatória da doença periodontal.

Objetivos específicos

Artigo científico 1

- Quantificar o número de fibras nervosas, diâmetro do axônio e da fibra nervosa, espessura da bainha de mielina, quantificação dos vasos sanguíneos, núcleos celulares e porcentagem do tecido conjuntivo do nervo isquiático direito;
- Avaliar a perda óssea alveolar.

Artigo científico 2

- Avaliar o índice funcional do isquiático no membro pélvico direito;
- Analisar a estrutura microscópica dos nervos periféricos, para identificar características histológicas normais ou alteradas, como: presença de células inflamatórias, fibras degeneradas, bem como a organização geral do tecido nervoso;
- Avaliar o estresse oxidativo no tecido nervoso periférico;
- Analisar a perda óssea alveolar.

REVISÃO GERAL DE LITERATURA

Anatomia do nervo isquiático

O sistema nervoso periférico (SNP) é composto por nervos que são feixes de fibras nervosas envolvidas por tecido conjuntivo, constituídos pelo axônio e por suas bainhas envoltórias, denominadas bainha de mielina. Essa é formada por células conhecidas como células de Schwann com função de suporte axonal regenerativo de crescimento para as fibras nervosas. O tecido de sustentação dos nervos é constituído por uma camada fibrosa mais externa de tecido conjuntivo, o epineuro, que reveste o nervo e preenche os espaços entre os feixes nervosos. Cada um desses feixes é revestido por uma bainha, o perineuro, e, dentro dela, encontram-se os axônios envolvidos ou não pela bainha de células de Schwann, chamados endoneuro. A função do SNP é proporcionar a ligação do sistema nervoso central aos órgãos e às estruturas periféricas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; SIQUEIRA, 2007).

Dos nervos periféricos presentes no corpo humano, o nervo isquiático é o maior; tem origem nas raízes nervosas ventrais do plexo lombossacral da medula espinal, com início na 4ª vértebra lombar até a 3ª vértebra sacral, emerge da pelve por meio do forame isquiático maior, passa, geralmente, inferiormente ao músculo piriforme, percorre toda a parte posterior dos membros inferiores, e, na região poplíteia, se bifurca em dois ramos, o nervo tibial e o nervo fibular comum, innervando a região posterior da coxa, toda a perna e o pé (DISTAD; WEISS, 2013; VICENTE et al., 2007).

Classificação das lesões nervosas periféricas

As estruturas nervosas podem sofrer alterações decorrentes de traumas, caracterizando as LNP, consideradas um problema clínico global que afeta significativamente a qualidade de vida dos pacientes, apresentando grande impacto sobre a capacidade do indivíduo de realizar atividades da vida diária. As dificuldades geradas por essas lesões vão desde um leve desconforto até a deficiência ao longo da vida, causando um problema socioeconômico (FARONI et al., 2015; GU; DING; WILLIAMS, 2014; MENORCA; FUSSELL; ELFAR, 2013).

As LNPs foram classificadas em três estágios básicos de acordo com Seddon em 1943 (Figura 1), dependendo das alterações estruturais e funcionais das fibras nervosas, com base na presença de desmielinização, na extensão do dano axonal e dos tecidos conjuntivos. Neuropraxia é o primeiro grau de LNP, quando ocorre um bloqueio de condução local, sem danos para os axônios ou o tecido conjuntivo, correspondendo às lesões por compressão ou tração do nervo, resultando na diminuição da velocidade ou bloqueio de condução, ocasionando fraqueza muscular. O segundo grau, conhecido como axonotmese, envolve a perda da continuidade axonal e a desmielinização focal, mantendo a continuidade conjuntiva, resultando em Degeneração Walleriana (DW), levando a paralisia motora e alterações sensitivas. Há manutenção das bandas de Bungners (BB), orientação para o crescimento axonal, bom prognóstico para reinervação e recuperação funcional. O terceiro grau, que representa a forma mais grave de lesões, é a neurotmese, na qual ocorre uma transecção completa dos axônios e tecido conjuntivo, resultando em descontinuidade completa do nervo, com repercussões severas (LIMA et al., 2013; MENORCA; FUSSEL; ELFAR, 2013; RON et al., 2013).

No entanto, uma distinção adicional de lesão em termos de envolvimento de várias camadas nervosas é importante para uma perspectiva cirúrgica e potencial de recuperação nervosa. Sunderland (1978) descreveu 5 graus de lesões do nervo periférico: o primeiro grau corresponde à neuropraxia; o segundo grau à axonotmese; e o terceiro, quarto e quinto graus envolvem lesão endoneurais, perineurais e epineurais, respectivamente. Nessas lesões, uma vez que as bainhas do tecido conjuntivo são interrompidas, os axônios de regeneração são mal direcionados e podem não ser capazes de reinervar as terminações sensoriais ou motoras dos músculos e o padrão de recuperação muitas vezes acaba sendo incompleto (CHHABRA et al., 2014).

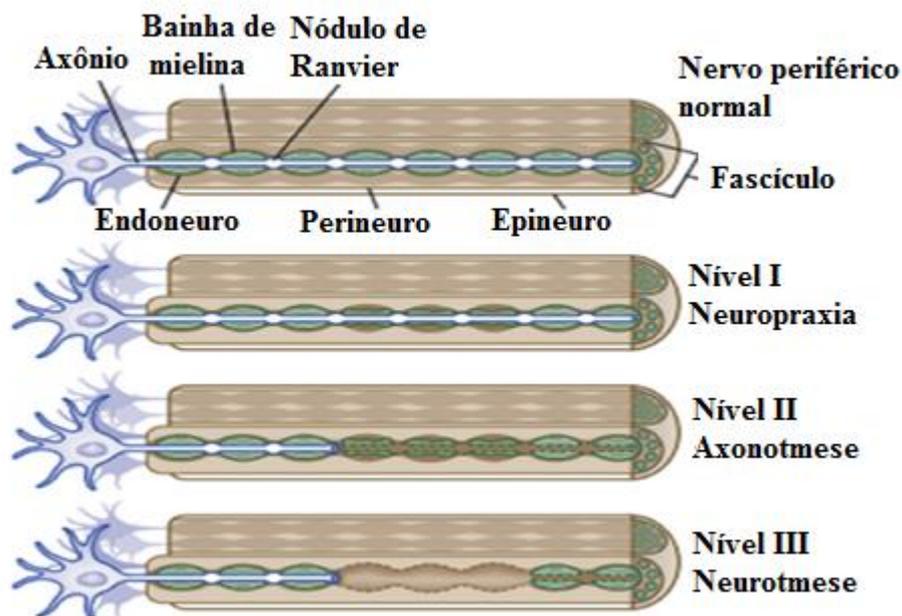


Figura 1- Classificação dos graus das lesões nervosas periféricas. Nervo normal; I: Neuropraxia; II: Axonotmese e III: Neurotmese (RON et al., 2013).

Degeneração e regeneração axonal

Após uma LNP, uma série de eventos fisiopatológicos ocorrem associados a alterações morfológicas e funcionais. Os primeiros sinais de degeneração são observados dentro de 24 horas, de proximal para região distal com início em torno de 6 horas após a lesão. Essa reação caracteriza-se por aumento do volume nuclear, deslocamento do núcleo para uma posição mais periférica e edema do corpo neuronal. Inicialmente, ocorre a infiltração de macrófagos, neutrófilos e monócitos no local para remover os detritos de mielina e axônio; Em torno de 24 a 48 horas, inicia-se a desintegração na região distal ao local da lesão, mediada por aumento nas concentrações intracelulares de cálcio nas células de Schwann, resultantes da agressão mecânica e pela interrupção do fluxo sanguíneo e, conseqüentemente, pela diminuição do aporte de oxigênio (GU; DING; WILLIAMS, 2014; LIMA et al., 2013; SVENNIGSEN; DAHLIN, 2013).

Caracterizada por um dano no axônio, a axonotmese também promove modificações na porção proximal à lesão, ocasionando uma degeneração de maneira retrógrada até chegar ao próximo nóculo de Ranvier, rompimento da bainha de mielina e conseqüentemente diminuição da condução

nervosa. Já no coto distal, ocorre o processo de degeneração Walleriana, cerca de 2 a 3 dias após a lesão, sendo que a cascata de eventos a partir da lesão envolve a migração de macrófagos e células de Schwann para os cotos nervosos para fagocitose dos restos mielínicos, contribuindo para a produção de citocinas (ALLODI; UDINA; NAVARRO, 2012; RAIMONDO et al., 2011).

Nesse período, ocorre um aumento da expressão de fatores pró-inflamatórios, incluindo TNF- α , IL-1 β e IL6. Cerca de três dias após a lesão, as células de Schwann se diferenciam, proliferam e alinham-se dentro do endoneuro, dando origem as BB, produzindo, assim, fatores neurotróficos e moléculas da matriz extracelular para estimular a regeneração axonal (GU; DING; WILLIAMS, 2014; STRATTON; SHAH, 2016).

As extremidades distais dos neurônios lesionados formam os “cones de crescimento”, guiados pelas BB, direcionando os axônios em regeneração em direção aos seus alvos sob a orientação de fatores neurotróficos. Assim que os cones de crescimento estabelecem conexões com os órgãos alvos, ocorre formação de uma nova bainha de mielina, pelas células de Schwann, o que promove a recuperação funcional (Figura 2) (ALLODI; UDINA; NAVARRO, 2012; LIMA et al., 2013; RUITER et al., 2014).

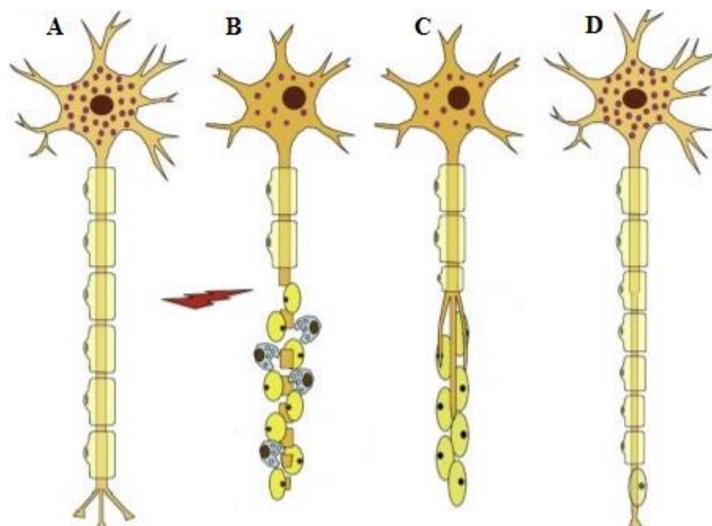


Figura 2 - Degeneração e regeneração nervo periférico. A: Neurônio normal. B: Degeneração Walleriana. C: Formação das bandas de Bungner. D: Reconexão axonal. (ALLODI; UDINA; NAVARRO, 2012).

Doença periodontal

A cavidade oral é extremamente importante para as funções nutricionais e comunicacionais. Inclui uma variedade de estruturas especializadas e apresentam sua própria barreira de proteção para reduzir a colonização de bactérias, como a gengiva e língua, superfícies epiteliais da mucosa que trabalham em conjunto com as secreções internas para proteger essa cavidade (SINGHRAO et al., 2015).

Dentre seus componentes, os dentes são estruturas rígidas constituídos por tecido conjuntivo e matriz mineral, inseridos nos ossos alveolares das arcadas dentárias, formado também pelo cimento, que promove a cobertura da raiz dos dentes, na qual se inserem as fibras que formam o ligamento periodontal e efetivamente ocorre a sustentação do dente. Cada dente é revestido em sua base, constituído pela diferenciação da mucosa oral em 3 compartimentos funcionais: epitélio gengival, epitélio sulcular e o juncional. Ao sofrerem inflamação, como no caso da DP, pode expor as estruturas que sustentam os dentes, o que pode levar a processos inflamatórios, infecciosos e até a perda dos dentes (TOREGANI et al., 2014).

A DP é uma condição inflamatória crônica das estruturas de fixação dos dentes (tecidos gengivais, ligamento periodontal e osso alveolar), iniciada predominantemente por bactérias gram-negativas, anaeróbias orais, como as *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Tannerella forsythia*. Consideradas agentes causadores da periodontite, essas bactérias colonizam a área subgengival levando à formação de bolsas periodontais e à indução de reabsorção do osso alveolar que culminam em perdas dentárias na sua forma mais grave. A má higienização continua sendo a principal causa dessa inflamação crônica (GARLET et al., 2012; HAJISHENGALLIS, 2015; MOOTHA et al., 2016).

Essa destruição é expressa por meio da perturbação da homeostase entre a resposta imune do hospedeiro e o agente causador. Os sinais clínicos comuns dessa doença são o sangramento e edema gengival, e, nos casos mais graves, recessão gengival, aumento do fluido crevicular e da mobilidade, até a perda do dente (GARLET et al., 2012; TOREGANI et al., 2014).

Na fisiopatologia da DP, as bactérias produzem lipopolissacarídeos capazes de desencadear a liberação de diversas citocinas pró-inflamatórias, bem como nas respostas sistêmicas ao processo inflamatório oral. Podem ser citados como exemplos: IL-1 β (stimula a produção de prostaglandina E2 (PGE2), a mais potente indutora de reabsorção óssea); IL-6 (estimula a produção de imunoglobulinas e reabsorção óssea, sua secreção é acentuada na inflamação periodontal); TNF- α (produzido por monócitos e macrófagos, ativa osteoclastos responsáveis pela reabsorção óssea por meio da fragmentação dos elementos da matriz extracelular, atuando sinergicamente com a IL-1 e IL-6); e proteína C reativa (reagente de fase aguda, serve como um marcador para a inflamação sistêmica) (GARLET et al., 2012; LINS et al., 2007; SCHENKEIN; LOOS, 2013).

Após o estímulo inflamatório, ocorre um aumento da produção PGE2 e da matriz de metaloproteinases (MMP), acarretando na destruição das estruturas de sustentação dos dentes, estimulando a reabsorção do osso alveolar. Além disso, com a evolução da doença e a produção dessas citocinas pró-inflamatórias, ocorrerá a formação de bolsas periodontais, aumentando as concentrações de PCR e fibrinogênio gerando uma resposta sistêmica. Ademais, ocorre ainda o aumento das MMPs, em especial a MMP-8, única proteinase que tem a capacidade de fragmentar os colágenos tipo I e III, sendo esses de suma importância para a manutenção estrutural do periodonto, intimamente ligada a progressão da doença e ao seu pior prognóstico (KALAKONDA et al., 2016; POLEPALLE et al., 2015; SCHENKEIN; LOOS, 2013; TOREGHEANI et al., 2014).

Objeto de pesquisas nas últimas décadas, a DP representa um dos principais problemas de saúde pública, devido à sua relativamente alta prevalência mesmo em países desenvolvidos. Além disso, há um interesse significativo na possível associação entre doenças bucais e sistêmicas, pois os agentes patogênicos das bolsas periodontais também podem entrar nos tecidos conjuntivos, nas células endoteliais e atingir a corrente sanguínea. Caso isso ocorra, as citocinas e radicais livres podem ocasionar danos musculares, hipóxia neuronal e degeneração axonal, promovendo efeito indireto sobre o estado geral de saúde, exacerbando outras complicações já existentes, tornando o paciente mais vulnerável pelo enfraquecimento do seu sistema imunológico (BRESOLIN et al., 2014; DE LETTER et al., 2001; NAGPAL; YAMASHIRO; IZUMI, 2015).

Associação entre doença periodontal e lesão nervosa

A proximidade anatômica do biofilme bacteriano com a vascularização periodontal facilita a disseminação sistêmica de bactérias. Assim, a inflamação local da cavidade oral, em paralelo com a bacteremia transitória, contribui para aumentar a carga inflamatória sistêmica do indivíduo, promovendo a inflamação sistêmica. O determinante final da progressão da doença é a resposta imune do hospedeiro, caracterizada por um aumento dos níveis circulantes de mediadores inflamatórios sistêmicos, o qual envolve a geração de citocinas, a ativação de osteoclastos e o recrutamento de células inflamatórias, como os linfócitos, os pneumócitos e as células apresentadoras de antígeno para o local (LEISHMAN; SEYMOUR; FORD, 2013).

O recrutamento e a ativação dessas células hospedeiras levam a um excesso de produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-12, IL-18, IL-21 e IL-6, juntamente com outros mediadores que ativam células para produzir proteases que ampliam ainda mais a destruição periodontal, bem como uma diminuição dos níveis de mediadores anti-inflamatórios como a IL-4 (MOOTHA et al., 2013; SCHENKEIN; LOOS, 2013).

Não há estudos relacionando à DP com o SNP; porém, existem com relação ao sistema nervoso central. Por exemplo, recentemente, um estudo *in vivo* em ratos infectados com *P. gingivalis* demonstrou a presença dessa bactéria no cérebro. Essa bacteremia pode causar o desenvolvimento precoce de uma doença neurodegenerativa tal como a doença de Alzheimer, sugerindo que ela acesse o sistema nervoso central durante as etapas saudáveis; todavia, parece que animais suscetíveis com traços inflamatórios são propensos a desenvolver doenças neurodegenerativas (SINGHRAO et al., 2015).

O mecanismo para a relação entre a DP e o declínio cognitivo ainda não é bem claro, mas há cada vez mais evidências apoiando o papel da inflamação sistêmica. Estudos têm mostrado a presença de anticorpos contra a flora bacteriana periodontal associados com um aumento de citocinas pró-inflamatórias sistêmicas, caracterizado por um aumento de proteína C reativa e TNF- α em participantes com doença de Alzheimer, estando associada a um aumento na taxa de declínio cognitivo (IDE et al., 2016).

Laser de baixa potência e seu efeito na lesão nervosa periférica

Diversos recursos têm sido utilizados para acelerar ou melhor obter a regeneração nervosa; porém, tem se dado atenção ao desenvolvimento de abordagens terapêuticas não cirúrgicas que auxiliam nesse processo de regeneração e de melhora funcional após LNP. Como exemplo desse tipo de recurso, existe o LBP, dispositivo que produz um feixe de radiação eletromagnética, compreendido dentro de uma faixa de radiação, que vai do invisível ao visível, podendo ser utilizado em conjunto com técnicas cirúrgicas ou isoladamente (ANTUNES et al., 2015; MARCOLINO et al., 2013).

O primeiro dispositivo laser foi produzido por Theodore Maimann, em 1960, e vem sendo cada vez mais utilizado na área da saúde. Os lasers podem transmitir variedades diferentes de energia, normalmente divididos em 3 grupos, sendo eles de baixa, de média e de alta energia, com maior interesse para o laser de baixa energia, intensidade ou potência, pois é atérmico e não invasivo (ROLA; DOROSZKOA; DERKACZ, 2014).

Os aparelhos existentes podem ser classificados de acordo com a emissão de radiação visível ou invisível (infravermelho), com os comprimentos de onda variando entre 532,8 nanômetros (nm) a 1.000 nm. De acordo com o tipo de radiação, podem ser à base de arseneto de gálio, arseneto de gálio associado ao alumínio e ao hélio-neônio. A resposta depende diretamente do comprimento da onda, da densidade de energia [Joules por cm² (J/cm²)], da energia entregue e da potência, além do tempo de aplicação (FARIVAR; MALEKSHAHABI; SHIARI, 2014; SOUZA; SILVA, 2016).

A eficácia do laser foi comprovada por meio de seu efeito fotoquímico, pois a radiação é absorvida pelo tecido, o que ocasiona uma mudança química, a proliferação de microvasos, a proliferação epitelial e endotelial e a atividade fagocitária, resultando na aceleração do processo de reparação e de inflamação, por meio da redução nos níveis de PGE₂, de TNF α e de IL-1, conseqüentemente, promove-se a analgesia além de minimizar o edema pós lesão (ASSIS et al., 2015; FARIVAR; MALEKSHAHABI; SHIARI, 2014; SOUZA et al., 2014; SOUZA; SILVA, 2016; ROLA; DOROSZKOA; DERKACZ, 2014).

Há evidências, tanto em pesquisas clínicas como experimentais, que um dos efeitos do laser é melhorar a função do nervo, por meio da aceleração

do metabolismo dos neurônios e da produção da mielina. A absorção da energia luminosa pelo tecido nervoso é capaz de modular as células do sistema imune, aumentar a síntese de adenosina trifosfato e a quantidade de fibroblastos e tecido conectivo, promovendo crescimento da bainha de mielina e de axônios mielinizados. Quando se acelera a condução nervosa, provoca-se, então, a expressão de fatores neurotróficos, aumentando a taxa de regeneração e direcionando o axônio ao órgão-alvo (ANDRADE et al., 2014; ANTUNES et al., 2015; ROSA-JUNIOR et al., 2016; MARCOLINO et al., 2013; SENE et al., 2013; WANG et al., 2014).

Um dos principais mecanismos responsáveis pelos efeitos anti-inflamatórios da terapia com o LBP é a diminuição plasmática de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-2 e IL-6) e mediadores químicos como a histamina, além da redução da migração de células inflamatórias (leucócitos, neutrófilos, macrófagos, astrócitos e linfócitos T), da diminuição do edema e hiperemia local, da melhora na distribuição de fibras de fibrocartilagem/elastina, da maior presença de fibras ganglionares ou células nervosas, do maior brotamento neuronal e do maior número total de axônios. São esses fatores que provavelmente levam ao melhor potencial evocado somatossensorial e, conseqüentemente, a melhor recuperação funcional (ABREU; NICOLAU, 2015; COUTO et al., 2012; PIVA et al., 2011).

O efeito analgésico pode ser explicado por mecanismos opióides e pela interrupção da conversão do ácido aracdônico em PGE2. Além de aumentar o fluxo sanguíneo local e promover a reabsorção de exsudatos inflamatórios, favorece a eliminação de substâncias como a bradicinina, a histamina e a acetilcolina, conduzindo à diminuição da inflamação e da dor (KARVAT et al., 2014).

A terapia com o laser de baixa potência gera efeitos fotoquímicos, físicos e biológicos, afetando não somente a área de aplicação local, mas também as regiões circundantes, por meio dos mediadores metabólicos. O efeito pode chegar às áreas mais distantes do corpo, gerando efeitos em níveis sistêmicos, por variação dos valores das proteínas séricas, que, após a irradiação, circularão pelos vasos sanguíneos e sistema linfático, prováveis mecanismos envolvidos na modulação da resposta inflamatória (ORTIZ et al., 2003).

Além disso, o LBP influencia parâmetros de estresse oxidativo como a alteração da atividade das enzimas antioxidantes e a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO). A absorção da luz do laser acelera a transferência de elétrons e induz uma produção inicial de ERO, especificamente aumentando a produção de superóxido. A produção em excesso dessas espécies pode acarretar danos nos constituintes celulares, como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos. Os danos no mecanismo celular como resultado da irradiação do laser e a sua influência nos parâmetros oxidativos não estão bem compreendidos. Entretanto, é possível que, dependendo da dose, do tempo de exposição e da intensidade, a terapia com o laser possa alterar os mecanismos de defesa contra a produção excessiva de ERO, haja vista que atua nos marcadores de estresse oxidativo, como proteínas e superóxido, (GUARALDO et al., 2016; HUANG et al., 2012; SILVEIRA et al., 2009).

Modelo animal

A análise do SNP em modelos animais, em geral, envolve lesão cirúrgica controlada, o que possibilita a análise de intensidade da condição neuropatológica e viabiliza o uso de métodos de intervenção para o desenvolvimento da hipótese do experimento (BOADA et al., 2015; SAVASTANO et al., 2014).

A popularidade do nervo isquiático para investigar as LNP é indiscutível, e provavelmente decorre da acessibilidade cirúrgica, além de ser o mais acometido dos membros inferiores. Historicamente, o rato tem sido o modelo preferido para a investigação de LNP e sua regeneração, tendo a estrutura microscópica semelhante à dos nervos humanos, diferindo na origem, pois emerge da medula espinal, no nível da 3ª vértebra lombar até a 6ª vértebra lombar (ANTUNES et al., 2015; SAVASTANO et al., 2014). O modelo experimental animal permite um alto controle de variáveis, melhorando a confiabilidade da pesquisa (ARAUJO et al., 2010).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, E. M. C.; NICOLAU, R. A. Terapia a laser de baixa intensidade na regeneração do tecido nervoso após lesão medular. **Revista Neurociências**, v.23, n.2, p.297-304, 2015.

ALLODI, I.; UDINA, E.; NAVARRO, X. Specificity of peripheral nerve regeneration: Interactions at the axon level. **Progress in Neurobiology**, v.98, n. 1, p.16-37,2012.

ANDRADE, P. V. C.; FUKUSHIMA, H.; ABREU, I. S.; AMBRÓSIO, L. M. B.; RODRIGUES, M. F.; CARVALHO, V. F.; HOLZHAUSEN, M. Laser de baixa potência na periodontia: uma revisão do estado atual do conhecimento. **Brazilian Journal periodontology**, v.24, n.4, p. 41-49, 2014.

ANTUNES, J. S.; KARVAT, J.; ARAGÃO, F. A.; BERTOLINI, G. R. F. Laser de baixa potência, no espectro de luz vermelha, em lesão nervosa periférica. **Revista Pesquisa em Fisioterapia**, v.5, n.1, p.43-48, 2015.

ASSIS, L.; YAMASHITA, F.; MAGRI, A. M. P.; FERNANDES, K. R.; YAMAUCHI, L.; RENNO, A. C. M. Effect of low-level laser therapy (808 nm) on skeletal muscle after endurance exercise training in rats. **Brazilian Journal of Physical Therapy**, v.19. n.6, p.457-465, 2015.

BRESOLIN, A. C.; PRONSATTI M. M.; PASQUALOTTO, L. N.; NASSAR, P. O.; JORGE, A. S.; DA SILVA E. A.; NASSAR, C. A. Effectiveness of periodontal treatment on the improvement of inflammatory markers in children. **Archives of Oral Biology**, v.59, n.6, p. 639-644, 2014.

CHHABRA, A.; AHLAWAT, A.; ALLAN BELZBERG, A.; ANDRESEIK, G. Peripheral nerve injury grading simplified on MR neurography: As referenced to Seddon and Sunderland classifications. **The Indian Journal of Radiology & Imaging**, v. 24, n. 3, p. 217-224, 2014.

COUTO, M. A. S.; BENATO, D. G.; TIM, C. R.; PARIZOTTO, N. A.; SALVINI, T. F.; RUSSO, T. L. Effects of low-level laser therapy after nerve reconstruction in rat denervated soleus muscle adaptation. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v.16, n.4, p.320-327, 2012.

DE LETTER, M. C. J.; SCHMITZ, P. I. M.; VISSER, L. H.; VERHEUL, F. A. M.; SCHELLENS, R. L. L. A.; DOLF, A. W.; FRANS, G. M. Risk factors for the development of polyneuropathy and myopathy in critically ill patients. **Critical Care Medicine**, v. 29, n. 12, p. 2281-2286, 2001.

DISTAD, B. J.; WEISS, M. D. Clinical and electrodiagnostic features of sciatic neuropathies. **Physical medicine and rehabilitation clinics of north america**, v. 24, n. 1, p. 107–120, 2013.

FARIVAR, S.; MALEKSHAHABI, T.; SHIARI, R. Biological Effects of Low Level Laser Therapy. **Journal of Lasers in Medical Sciences**, v.5, n.2, p.58-62, 2014.

FARONI, A.; MOBASSERI, A.; KINGHAM, P. J.; REID, A. J. Peripheral nerve regeneration: Experimental strategies and future perspectives. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 82, n. 1, p.160–167, 2015.

GARLET, G. P.; ARANHA, A. M. F.; SILVEIRA, E. M.; GURAV, A. Alzheimer's disease and periodontitis – an elusive link. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 60, n. 2, p. 173-180, 2012.

GUARALDO, A. S.; SERRA, A. J.; AMADIO, E. M.; ANTÔNIO, E. L.; SILVA, F.; PORTES, L. A.; TUCCI, P. J. F.; LEAL-JUNIOR, E. C. P.; CARVALHO, P. T. C. The effect of low-level laser therapy on oxidative stress and functional fitness in aged rats subjected to swimming: an aerobic exercise. Resultados da pesquisa **Lasers in Medical Science**, v. 31, n. 5, p. 833-840, 2016.

GURAV, A. N. Alzheimer's disease and periodontitis – an elusive link. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.60, n.2, p. 173-180, 2014.

GU, X.; DING, F.; WILLIAMS, F. D. Neural tissue engineering options for peripheral nerve regeneration. **Biomaterials**, v. 35, n. 24, p. 6143-6156, 2014.

HAJISHENGALLIS, G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v.15, n.1, p.30-44, 2015.

HUANG, Y. Y.; NAGATA, K.; TEDFORD, C. E.; MCCARTHY, T.; HAMBLIN, M. R. Low-level laser therapy (LLLT) reduces oxidative stress in primary cortical neurons in vitro. **Journal of Biophotonics**, v. 6, n. 10, p.829-838, 2013.

IDE, M.; HARRIS, M.; STEVENS, A.; SUSSAMS, R.; HOPKINS, V.; CULLIFORD, D.; FULLER, J.; IBBETT, P.; RAYBOULD, R.; THOMAS, R.; PUENTER, U.; TEELING, J.; PERRY, H. V.; HOLMES, C. Periodontitis and Cognitive Decline in Alzheimer's Disease. **Plos One**, v.11, n.3, p. 1-9, 2016.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**, 12 ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2013.

KALAKONDA, B.; KOPPOLU, P.; BAROUDI, K.; MISHRA, A. Periodontal Systemic Connections-Novel Associations-A Review of the Evidence with Implications for Medical Practitioners. **International Journal of Health Sciences**, v. 10, n. 2, p. 294-307, 2016.

KARVAT, J.; ANTUNES, J. S.; BERNARDINO, G. R.; KAKIHATA, C. M. M.; BERTOLINI, G. R. F. Effect of low-level LASER and neural mobilization on nociceptive threshold in experimental sciatica. **Revista Dor**, v. 15, n. 3, p. 207-210, 2014.

LEISHMAN, S. J.; SEYMOUR, G. J.; FORD, P. J. Local and systemic inflammatory responses to experimentally induced gingivitis. **Disease Markers**, v. 35, n.5, p. 543-549, 2013.

LIMA, E. M.; CAVALCANTE, D. M.; DE OLIVEIRA, I. A. V. F.; PINHEIRO, E. S. S.; MARTINEZ, A. M. B.; BAPTISTA, A. F. Mobilização neurodinâmica e regeneração nervosa periférica: revisão bibliográfica. **Revista Pesquisa em Fisioterapia**, v.1, n.2, p.67-78, 2013.

LINS, R. D. A. U.; PEQUENO, M. T.; MELO, J. P. L. C.; FERREIRA, R. C. Q.; SILVEIRA, E. J. D. S.; DANTAS, E. M. Atividade ósteo-reabsortiva na doença periodontal: o papel das citocinas e prostaglandinas. **Revista de Cirurgia e Traumatologia**, v.7, n.2, p. 29-36, 2007.

MARCOLINO, A. M.; BARBOSA, R. I.; NEVES, L. M. S.; MAZZER, N.; GUIRRO, R. R. J.; FONSECA, M. C. R. Assessment of functional recovery of sciatic nerve in rats submitted to low-level laser therapy with different fluences. An experimental study. **Journal of Hand and Microsurgery**, v. 5, n. 2, p. 49-53, 2013.

MENORCA, R. M. G.; FUSSEL, T. S.; ELFAR, J. C. Peripheral nerve trauma: mechanisms of injury and recovery. **Hand Clinics**, v. 29, n.3, p. 317-330, 2013.

MOOTHA, A.; MALAIAPPAN, S.; JAVAKUMAR, N. D.; VARGHESE, S. S.; THOMAS, J.T. The effect of periodontitis on expression of interleukin-21: a systematic review. **International Journal of Inflammation**, v. 2016, p. 1-8, 2016.

NAGPAL, R.; YAMASHIRO, Y.; IZUMI, Y. The Two-Way Association of Periodontal Infection with Systemic Disorders: An Overview. **Mediators of Inflammation**, v.2015, p. 1-9, 2015.

OLIVEIRA, C.; WATT, R.; HAMER, M. Toothbrushing, inflammation, and risk of cardiovascular disease: results from Scottish Health Survey. **British Medical Journal**, p.1-9, 2010.

ORTIZ, M. C. U. S.; ROSA, S. M. M.; SOARES, E.; PARIZOTTO, N. A. Influência do laser de baixa potência nos níveis das proteínas plasmáticas de coelhos. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v.7, n. 3, p. 187-194, 2003.

PIVA, J. A. A. C.; ABREU, E. M. C.; SILVA, V. S.; NICOLAU, R. A. Effect of low-level laser therapy on the initial stages of tissue repair: basic principles. **Anais Brasileira de Dermatologia**, v.86, n.5, p.947-954, 2011.

POLEPALLE, T.; MOOGALA, S.; BOGGARAPU, S.; PESALA, D. S.; PALAGI, F. B. Acute phase proteins and their role in periodontitis: a review. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v.9, n.11, p.1-5, 2015.

RAIMONDO, S.; FORNARO, M.; TOSC, P.; BATTISTONC, B.; GIACOBINIROBECCHIB, M. G.; GEUNA, S. Perspectives in regeneration and tissue engineering of peripheral nerves. **Annals of Anatomy**, v. 193, p. 334–340, 2011.

ROLA, P.; DOROSZKOA, A.; DERKACZ, A. The use of low-level energy laser radiation in basic and clinical research. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v.23, n.5, p.835-842, 2014.

RON, M.G.; MENORCA, B. S. A.; THERON, S.; FUSSELL, B. A. A.; ELFAR C. Nerve Physiology Mechanisms of Injury and Recovery. **Hand Clinical**, v.29, n. 3, p.317-330, 2013.

ROSA-JUNIOR, G. M. R.; MAGALHÃES, R. M. G.; ROSA, V. C.; BUENO, C. R. S.; SIMIONATO, L. H.; BORTOLUCI, C. H. Efeito da associação da laserterapia com a natação no reparo morfológico do nervo isquiático e na recuperação funcional de ratos submetidos à axonotmese. **Pesquisa em Fisioterapia**, v. 23, n. 1, p. 12-20, 2016.

RUITER, G. C. W.; SPINNER, R. J.; VERHAAGEN, J. MALESSY, M. J. A. Misdirection and guidance of regenerating axons after experimental nerve injury and repair. **Journal of Neurosurgery**, v. 120, n. 2, p. 493–501, 2014.

SAVASTANO, L.; LAURITO, S. R.; FITT, M. R.; RASMUSSEN, J. A.; POLO, V. G.; PATTERSON, S. I. Sciatic nerve injury: A simple and subtle model for investigating many aspects of nervous system damage and recovery. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 227, n.30, p. 166-180, 2014.

SCHENKEIN, H. A.; LOOS, B. G. Inflammatory mechanisms linking periodontal diseases to cardiovascular diseases. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 40, n.14, p. 51-69, 2013.

SEDDON, H. J. Three types of nerve injury. **Brain**, v.66, n.4, p.237–288, 1943.

SENE, G. A. L.; SOUSA, F. F. A.; FAZAN, V. S.; BARBIERI, C. H. Efeitos da laserterapia na regeneração Nervosa periférica. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 21, n. 5, p. 266-270, 2013.

SILVEIRA, P. C. L.; SILVA, L. A.; TUON, T.; FREITAS, T. P.; STRECK, E. L.; PINHO, R. A. Effects of low-level laser therapy on epidermal oxidative response induced by wound healing. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v.13, n. 4, p. 281-287, 2009.

SINGHRAO, S. K.; HARDING, A.; POOLE, S.; KESAVALU, L.; CREAN, J. Porphyromonas gingivalis periodontal infection and its putative links with alzheimer's disease. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, p.1-10, 2015.

SIQUEIRA, R. Lesões nervosas periféricas: uma revisão. **Revista Neurociências**, v. 15, n. 3, p. 226-233, 2007.

SOUZA, M. V.; SILVA, M. O. Laserterapia em afecções locomotoras: revisão sistemática de estudos experimentais. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.22, n.1, p. 76-82, 2016.

SOUZA, N. H. C.; FERRARI, R. A. M.; SILVA, D. F. T.; NUNES, F. D.; BUSSADORI, S. K.; FERNANDES, K. P. S. Effect of low-level laser therapy on the modulation of the mitochondrial activity of macrophages. **Brazilian Journal of Physical Therapy**, v. 18, n. 4, p. 308-314, 2014.

STRATTON, J. A.; SHAH, P. T. Macrophage polarization in nerve injury: do Schwann cells play a role?. **Neural Regeneration Research**, v.11, n.1, p. 53-57, 2016.

SUNDERLAND, S. **Nerves and nerve injuries**. 2^o edition, New York: Churchill Livingstone, 1978, p.133-138.

SVENNIGSEN, A. F.; DAHLIN, L. B. Repair of the peripheral nerve – remyelination that Works. **Brain sciences**, v. 3, n. 3, p. 1182-1197, 2013.

TOREGEANI, J. F.; NASSAR, C. A.; TOREGANI, K. A. M.; NASSAR, P. O. Doença periodontal e aterosclerose. **Jornal Vascular Brasileiro**, v.13, n.3, p.208-216, 2014.

VETTORE, M. V.; MARQUES, R. A. A.; PERES, M. A. Desigualdades sociais e doença periodontal no estudo SBBrazil 2010: abordagem multinível. **Revista de Saúde Pública**, v.47, n.3, p.29-39, 2013.

WANG, C. Z.; CHEN, Y. J.; WANG, Y. H.; YEH, M. L.; HUANG, M. H.; HO, M. L.; LIANG, J. I.; CHEN, C. H. Low-level laser irradiation improves functional recovery and nerve regeneration in sciatic nerve crush rat injury model. **Plos One**, v.9, n.8, p.1-11, 2014.

VICENTE, E. J. D.; VIOTTO, M. J. S.; BARBOSA, C. A. A.; VICENTE, P. C. Estudo das relações anatômicas e suas variações entre o nervo ciático e o

músculo piriforme. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 11, n. 3, p. 227-232, 2007.

ARTIGO CIENTÍFICO 1

EUROPEAN JOURNAL OF NEUROSCIENCE

DOENÇA PERIODONTAL NÃO INFLUÊNCIA NA REGENERAÇÃO NERVOSA PERIFÉRICA EM RATOS WISTAR, PÓS AXONOTMESE.

Jéssica Aline Malanotte¹, Lucinéia de Fátima Chasko², Ana Luiza Peretti¹, Rose Meire Costa Brancalhão², Gladson Ricardo Flor Bertolini², Patricia Oehlmayer Nassar², Carlos Augusto Nassar².

1 -Discente do Programa de Pós-Graduação, Mestrado em Biociências e Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), campus Cascavel - Paraná.

2 - Docente do Programa de Pós-Graduação, Mestrado em Biociências e Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), campus Cascavel - Paraná.

Endereço para correspondência:

Carlos Augusto Nassar, Rua Universitária, 2069, Jardim Universitário, Colegiado de Odontologia, 85819-110, Cascavel PR. Fone: (45) 32203168. E-mail: canassar@yahoo.com

Doença periodontal não influência na regeneração nervosa periférica em ratos wistar, pós axonotmese.

- 22 páginas, 3 figuras e 5 tabelas
- 5486 palavras em todo o manuscrito; 250 no resumo

Palavras-chave: Periodontite, inflamação, nervo isquiático, lesão nervosa

Resumo

A associação entre doença periodontal (DP) e lesão nervosa foi sugerida devido a ação sistêmica da DP. Assim o objetivo deste estudo foi analisar o efeito da condição inflamatória da doença periodontal na regeneração nervosa periférica. Foram utilizados 32 ratos machos, divididos em 4 grupos: controle (GC); doença periodontal (GDP); lesão nervosa (GL); doença periodontal com lesão nervosa (GDPL). No 1º dia de experimento os animais foram submetidos a ligadura bilateralmente ao redor dos primeiros molares inferiores. No 15º dia, submetidos a lesão nervosa periférica, sendo todos eutanasiados no 30º dia, foram coletados o nervo isquiático e hemimandíbulas direitas. A indução da doença periodontal foi comprovada na histomorfometria da mandíbula. Na morfometria do nervo não houve diferença entre os grupos no total de fibras nervosas (FN), em relação as FN viáveis maiores que 4 micrómetros (μm), GC e GDP apresentaram maior quantidade que GL e GDPL, nas fibras menores de 4 μm os grupos foram semelhantes. GC e GDP apresentaram menor quantidade de fibras inviáveis. No diâmetro das FN, axônio e bainha de mielina, GC e GDP apresentaram maiores diâmetros nas FN maiores que 4 μm , enquanto nas menores que 4 μm apenas na BM houve diferença, GC apresentou diâmetro maior que GL e GDPL. Todos os grupos apresentaram quantidades semelhantes de vasos sanguíneos, na porcentagem de tecido conjuntivo e densidade dos núcleos celulares, GC e GDP apresentaram médias menores que os demais grupos. Logo, podemos sugerir que a doença periodontal induzida experimentalmente não influenciou no processo de regeneração do nervo isquiático.

Abstract

The association between periodontal disease (DP) and nerve injury was suggested because of the systemic action of DP. Thus the objective of this study was to analyze the effect of the inflammatory condition of periodontal disease on peripheral nerve regeneration. Thirty-two male rats were divided into four groups: control (GC); periodontal disease (GDP); nerve injury (GL); periodontal disease with nerve injury (GDPL). On the 1st day of the experiment, the animals were ligated bilaterally around the lower first molars. On the 15th day, submitted to peripheral nerve injury, all of them being euthanized on the 30th day, the sciatic nerve and right hemimandibula were collected. Induction of periodontal disease has been demonstrated in the histomorphometry of the mandible. In nerve morphometry there were no differences between the groups in total nerve fibers (FN), in relation to viable FN greater than 4 micrometers (μm), GC and GDP had higher amounts than GL and GDPL, in fibers smaller than 4 μm groups were similar. GC and GDP showed lower amounts of non-viable fibers. In the diameter of the FN, axon and myelin sheath, GC and GDP presented larger diameters in FN higher than 4 μm , while in smaller ones only 4 μm in BM there was difference, GC presented larger diameter than GL and GDPL. All groups presented similar amounts of blood vessels, in the percentage of connective tissue and density of the cellular nuclei, GC and GDP presented smaller means than the other groups. Therefore, we can suggest that periodontal disease induced experimentally did not influence the process of regeneration of the sciatic nerve.

Introdução

A doença periodontal (DP) é responsável por destruir os tecidos de suporte dos dentes, pois estimula desequilíbrios na região bucal, o que promove o crescimento de bactérias e a formação de uma placa bacteriana, desencadeando inflamações locais e sistêmicas (Marqueset al., 2015; Vieyra et al., 2016).

Essa inflamação sistêmica é originada por citocinas pró-inflamatórias liberadas no local da infecção periodontal que se infiltram na corrente sanguínea e atingem outros locais, sendo assim relacionada ao aumento no risco de alterações sistêmicas, como as doenças cardiovasculares, cerebrovasculares, aterosclerose e doença de Alzheimer (Gurav, 2014; Hosomi et al., 2012; Iqbal et al., 2015; Muramaki et al., 2013). Todavia, os mecanismos de ação ainda não estão bem esclarecidos (Nagpal et al., 2015).

Outra condição inflamatória conhecida são as lesões dos nervos periféricos (LNP), as quais são comuns e podem causar diminuição na qualidade de vida do paciente, resultando em incapacidade considerável a longo prazo. Quando as lesões causam danos somente aos axônios e às suas bainhas de mielina, são caracterizadas por lesões grau II, do tipo axonotmese, sem qualquer dano ao epineuro, sendo os traumas mecânicos sua causa mais comum (Bastien & Lacroix, 2014; Faroni, 2015; Menorca et al., 2013).

Após a lesão, ocorre uma série de alterações moleculares e celulares no nervo, sendo caracterizada a degeneração Walleriana, na qual o axônio e a bainha de mielina (BM) sofrem degeneração (Gu et al., 2014), ocasionando o influxo de macrófagos e a proliferação das células de Schwann, responsáveis pela remoção dessas estruturas. Isso gera uma resposta inflamatória local decorrente do aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 β (IL1 β) e (IL6) (Bombeiro, 2016; Stratton & Shah, 2016).

Quando concluída essa fase, as células de Schwann se alinham formando bandas de Bungners (Scheib; [Hoke](#), 2013), principal fonte de fatores neurotróficos, importante na regeneração axonal (Menorca et al., 2013). Entretanto, a recuperação completa não é muito frequente, podendo ser mal direcionada ou associada à dor neuropática debilitante, ocasionando, muitas vezes, uma resposta inflamatória crônica nesse tecido (Houschyar et al., 2016).

Gurav (2014) propôs uma possível associação entre a DP e a lesão nervosa, em que a DP, por meio da inflamação sistêmica, seria responsável pela exacerbção da degeneração neuronal, servindo como fonte de fatores pró-inflamatórios sistêmicos, capaz de afetar a integridade vascular no cérebro, perpetuando um processo inflamatório crônico pela ativação da resposta imune inata. No entanto, o mecanismo para a relação entre a DP e o declínio cognitivo na doença de Alzheimer ainda não está claro, mas há evidências crescentes para apoiar o papel da inflamação sistêmica na evolução da doença (Ide et al., 2016).

Atualmente, já está bem estabelecido na literatura especializada que a doença periodontal pode ser fator de risco para vários distúrbios sistêmicos (Nagpal et al., 2015); porém, não há relatos da sua ação em lesões nervosas periféricas. Dessa maneira, este estudo objetivou analisar o efeito da condição inflamatória da doença periodontal na regeneração nervosa periférica induzida experimentalmente.

Material e métodos

Esta pesquisa foi realizada no Laboratório de Estudo de Lesões e Recursos Fisioterapêuticos (LELRF), em conjunto com o Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), campus de Cascavel - PR. Todos os procedimentos experimentais foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal da Unioeste (Anexo 1).

Grupo amostral

Foram utilizados 32 ratos *Wistar* machos, com 8 semanas de idade, pesando em média cerca de 250g, provenientes do biotério central da Unioeste. Os animais permaneceram no biotério setorial do LELRF, em condições controladas de temperatura ($23 \pm 2^\circ \text{C}$) e de luz (ciclo claro-escuro de 12 horas), com água e ração comercial à vontade. Os animais foram distribuídos de forma aleatória em 4 grupos com 8 animais em cada. Os grupos foram estes:

- Grupo controle (GC) - não sofreram intervenção;
- Grupo doença periodontal (GDP) - submetidos ao procedimento de indução da DP por meio de ligadura no 1º dia de experimento;
- Grupo lesão nervosa (GL) - submetidos à lesão nervosa no 15º dia de experimento;
- Grupo doença periodontal com lesão nervosa (GDPL) - submetidos à indução da DP por meio de ligadura e a lesão nervosa.

Após as etapas descritas, todos os animais foram eutanasiados no 30º dia de experimento. Os procedimentos para o desenvolvimento da pesquisa ocorreram na sequência do esquema a seguir:



Figura 1 - Período de realização dos procedimentos experimentais. GDP: grupo doença periodontal, GL: grupo lesão nervosa, GDPL: grupo doença periodontal com lesão nervosa.

Protocolo de indução da doença periodontal

No 1º dia do experimento, os animais dos grupos GDP e GDPL foram pesados e anestesiados com cloridato de quetamina (100 mg/Kg) e xilazina (50 mg/Kg) (Sespo Indústria e comércio Ltda, São Paulo, Brasil), via intraperitoneal, posicionados em mesa operatória apropriada a qual permitiu a manutenção da abertura bucal facilitando o acesso aos dentes da região posterior da mandíbula. Com o auxílio de uma pinça modificada e de uma sonda exploradora, colocou-se um fio de algodão número 40 ao redor do primeiro molar inferior direito e esquerdo. Essa ligadura atuou como irritante gengival por 30 dias, favorecendo o acúmulo de placa bacteriana e consequente desenvolvimento da doença periodontal (Nassar et al., 2009).

Modelo experimental de compressão do nervo isquiático

No 15º dia do experimento, prévio ao procedimento cirúrgico de compressão do nervo isquiático, os animais dos grupos GL e GDPL foram pesados e anestesiados. Realizou-se a tricotomia na região posterior da coxa direita e, em seguida, com auxílio de bisturi, foi realizada uma incisão paralela às fibras do músculo bíceps femoral, para expor o nervo isquiático e a sua subsequente compressão com uma pinça hemostática, durante 30 segundos. A pressão de pinçamento foi padronizada para todos os animais, utilizando-se como referência o segundo dente da cremalheira, sendo todos os pinçamentos realizados por um mesmo indivíduo, uma sutura epineural foi colocada para a demarcação do local lesionado (Antunes et al., 2014; Bridge et al., 1994).

Eutanásia dos animais

No último dia de experimento (30º dia), todos os animais foram pesados e anestesiados, sendo realizada a dissecação e a retirada de 2 cm do nervo isquiático, distal ao procedimento de compressão, para realização da análise morfológica do tecido nervoso. Em seguida, os animais foram eutanasiados por decapitação em guilhotina, e as hemimandíbulas do lado esquerdo foram coletadas para posterior análise radiográfica.

Análise histomorfométrica do nervo isquiático

O primeiro fragmento coletado proximal à lesão nervosa foi fixado em paraformol 7% em PBS (pH 7,4), durante 24 horas e, em seguida, armazenado em glicina e pós-fixados em tetróxido de ósmio a 2% em PBS, desidratados, diafanizados, infiltrados e emblocados em parafina histológica para obtenção de cortes transversais do nervo com espessura de 5 μm (Di Scipio et al., 2008). Posteriormente, as lâminas histológicas foram montadas, fotomicrografadas com objetiva de 100x (4 campos) e analisadas com programa *Image Pro-plus* 6.0.

As imagens obtidas foram analisadas com base nos seguintes parâmetros: quantidade total de fibras nervosas, quantidade total de fibras viáveis e quantidade total de fibras não viáveis (aquelas que não apresentassem contornos definidos, passíveis de mensuração), diâmetro do axônio, diâmetro da fibra nervosa e espessura da bainha de mielina (dada pelo diâmetro do axônio subtraído da fibra nervosa, divididos por 2).

Visando à distinção de fibras nervosas com maior ou menor diâmetro, utilizou-se como base os estudos de Mazzer et al., (2006) e Livnat et al., (2016), que descreveram a distinção dessas fibras maiores e menores em lesões do nervo isquiático, sendo a medida de referência de 4 μm para análise da fibra nervosa, assim, fibras maiores ou igual a 4 μm foram consideradas de maior diâmetro e fibras menores que 4 μm de menor diâmetro. Foram fotografadas quatro imagens de cada corte, sendo essas relativas à cada quadrante da imagem, quadrantes superiores direito e esquerdo, quadrantes inferiores direito e esquerdo, na objetiva de 100x. A análise foi feita de forma cega com relação aos grupos; foram mensuradas 25 fibras de maior diâmetro e 25 de menor diâmetro por quadrante, totalizando 200 fibras por nervo, ou até sua totalidade, caso não atingisse o número de fibras.

O segundo fragmento distal a lesão nervosa foi fixado em paraformol 7% durante 24 horas, seguindo o processamento histológico de rotina para inclusão em parafina histológica, cortados transversalmente com espessura de 5 μm . Posteriormente, foram corados em hematoxilina e eosina e fotomicrografados 4 campos, com a objetiva de 100x, para a contagem de núcleos celulares e vasos sanguíneos pelo programa *Image Pro-plus* 6.0. Na contagem, foram consideradas as bordas de inclusão, os objetos da análise que tocassem nas bordas superior e esquerda, enquanto a borda de exclusão foi a inferior e direita. O tecido conjuntivo foi

quantificado por meio da coloração Tricrômico de Masson pela contagem de pixels e por uma regra de três, dada pela quantidade de pixels do tecido conjuntivo dividido pela quantidade de pixels na imagem, pelo programa *Image Pro-plus 6.0*.

Análise histomorfométrica da mandíbula

Após a eutanásia dos animais, as hemimandíbulas do lado direito foram coletadas, dissecadas e fixadas em solução de formol a 10% por 24 horas. Após esse período, foram lavadas em água destilada e descalcificadas em ácido tricloroacético (TCA) a 5%, por aproximadamente 14 dias. As amostras foram desidratadas por 1 hora e meia nos álcoois 70%, 80% e 90% e *overnight* no álcool 95 %. No dia seguinte, passados no álcool 100% por 4 banhos de 1 hora cada.

Em seguida, o material foi diafanizado, impregnado e incluído em parafina. Posteriormente, foi realizada a microtomia, com cortes de 7 μ m em micrótomo semiautomático (*Hestion*®, *ERM3000*, *DaintreeScientific*, St. Helens, Austrália) e a coloração das lâminas histológicas em hematoxilina e eosina.

A medida da crista óssea alveolar foi realizada por meio de um microscópio acoplado a um computador, o que permitiu capturar as imagens com o *software LazEz*®. Foi realizada uma medida da menor distância entre o ápice da crista óssea alveolar vestibular e a junção cimento-esmalte, utilizando o programa analisador de imagens *Image Pro-plus 6.0*. As medidas foram repetidas uma vez por dia, em três dias diferentes, e então foi realizada uma média entre os valores (Boamorte et al., 2016).

Análise dos dados

Os resultados foram expressos e analisados por meio da estatística descritiva e inferencial. Primeiramente, foram avaliados quanto à sua normalidade pelo teste Shapiro-Wilk; como apresentaram distribuição normal, utilizou-se o teste Anova unidirecional, seguido do Teste de Tukey quando houve diferença significativa. As variáveis foram analisadas pelo programa BioEstat 5.0. Foi considerado significativo quando $p < 0,05$ (Field, 2009). Os resultados foram expressos pela média e desvio padrão.

Resultados

Mensuração da distância da crista alveolar até a junção cimento esmalte do primeiro molar inferior.

Na mensuração da distância da crista alveolar até a junção cimento-esmalte do primeiro molar inferior, verificou-se que houve perda de inserção dos tecidos de suporte dos dentes nos animais expostos à doença periodontal experimental ($p < 0,05$), demonstrando a efetividade da indução da doença periodontal sobre o tecido ósseo alveolar (Tabela 1).

Total de fibras nervosas, fibras nervosas viáveis e inviáveis

Com relação ao número total de fibras nervosas, não houve diferença estatística significativa entre os grupos ($p = 0,625$). Para a quantidade de fibras nervosas inviáveis, os grupos GC e GDP apresentaram comportamento semelhantes; já os grupos que tiveram lesão nervosa periférica, GL e GDPL, mostraram aumento na quantidade de fibras inviáveis ($p < 0,05$) (Figura 2). No total de fibras nervosas viáveis e nas fibras maiores que $4 \mu\text{m}$, os GC e GDP apresentaram resultados semelhantes. Por sua vez, os grupos que tiveram lesão nervosa periférica mostraram diminuição na quantidade de fibras viáveis ($p < 0,05$). Nas fibras menores que $4 \mu\text{m}$, o GDP apresentou menor quantidade de fibras viáveis do que GC e GDPL ($p < 0,05$), (Figura 3).

Diâmetro das fibras nervosas

Na análise do diâmetro das fibras nervosas maiores que $4 \mu\text{m}$, os GC e GDP apresentaram-se similares, enquanto os que tiveram lesão nervosa periférica mostraram diminuição no diâmetro das fibras nervosas ($p < 0,05$). Nas fibras menores que $4 \mu\text{m}$, não houve diferença entre os grupos ($p = 0,219$), (Tabela 2).

Diâmetro dos axônios

No que compete ao diâmetro dos axônios das fibras maiores que $4 \mu\text{m}$, os GC e GDP apresentaram resultados equivalentes, enquanto os que tiveram lesão nervosa periférica mostraram diminuição no diâmetro dos axônios ($p < 0,05$). Nas fibras

menores que 4 μm , o GC apresentou valor menor que os demais grupos ($p<0,05$), (Tabela 3).

Espessura da bainha de mielina

Nas fibras maiores que 4 μm , os GC e GDP apresentaram-se similares, já os grupos que tiveram lesão nervosa periférica mostraram diminuição na espessura da bainha de mielina ($p<0,05$). No caso das fibras menores que 4 μm , o GC apresentou maior espessura que os grupos com lesão nervosa periférica ($p<0,05$) (Tabela 4).

Quantificação dos vasos sanguíneos, núcleos celulares e porcentagem do tecido conjuntivo

Na análise dos vasos sanguíneos, não houve diferença estatística significativa entre os grupos ($p=0,41$). Com relação aos núcleos celulares, os GC e GDP apresentaram comportamento semelhantes, enquanto os grupos submetidos à lesão nervosa periférica apresentaram maior densidade de núcleos celulares ($p<0,05$). Além disso, o GDPL apresentou menor valor em relação ao GL ($p<0,05$). Na porcentagem de tecido conjuntivo, resultados equivalentes foram encontrados em GC e GDP. Por outro lado, os grupos submetidos à lesão nervosa periférica apresentaram maior porcentagem de tecido conjuntivo ($p<0,05$), (Tabela 5).

Discussão

Até o presente momento, não foram encontrados estudos que associem a LNP com a DP, assim, neste estudo buscou-se avaliar os efeitos da associação dessas duas condições, uma vez que a DP é uma doença com características inflamatórias. Porém, estudos têm relacionado cada vez mais a DP como fator de risco para o desenvolvimento de doenças sistêmicas, por meio da inflamação que seus agentes patogênicos ocasionam ao atingir a circulação sanguínea dos indivíduos afetados (Ide et al., 2016; Leite et al., 2017; Marques et al., 2015; Nagpal et al., 2015).

O nervo isquiático é composto por fibras nervosas longas, que se origina no plexo lombossacral com características motoras e sensoriais responsáveis pela inervação dos membros inferiores. Devido à sua grande extensão, traumas e isquemias que podem causar danos são relativamente comuns, o que pode ocasionar uma disfunção nos membros inferiores (Menorca et al., 2013). Assim, para o estudo das lesões de nervos periféricos, vários autores têm escolhido modelos experimentais de lesão por compressão, classificada por Seddon (1943) como uma axonotmese, que envolve danos diretos aos axônios além de desmielinização focal, preservando em partes as estruturas de sustentação, mantendo a continuidade do epineuro, que têm a função de guiar o novo axônio em regeneração até o órgão-alvo (Rosa-Junior, 2016).

No presente estudo, conduzido por 37 dias, 15 dias após axonotmese experimental, foi possível observar que todos os grupos apresentaram uma média semelhante com relação à quantidade total de fibras presentes no isquiático, diferindo apenas na contagem de fibras viáveis e inviáveis. Os GC e GDP apresentaram maior quantidade de fibras viáveis, enquanto para as fibras inviáveis os valores foram menores, se comparados com GL e GDPL (Figura 2 e 3). Esses últimos grupos apresentaram maior quantidade de fibras inviáveis, corroborando com o estudo de Antunes et al (2016), ao demonstrarem que a LNP foi responsável por alterações estruturais nessas fibras nervosas.

Não houve redução no total de fibras nervosas nos grupos lesionados; porém, suas estruturas nervosas eram menores e mais delgadas, ou seja, nos GL e GDPL, houve um aumento significativo na quantidade de fibras menores que 4 μm (Tabela 2), demonstrando uma possível regeneração nervosa, corroborando com o estudo de Sta et al. (2014), os quais demonstraram que os axônios recém regenerados apresentam diâmetro menor do que os axônios sobreviventes, e muitos ainda não estão

mielinizados, explicando, assim, a maior quantidade de fibras viáveis de diâmetro menor que 4 μm nesses grupos.

Segundo Svennigsen e Dahlin (2013), deficiências na liberação das metaloproteinases (MMP) 9 e 2, em especial, prejudicam a remielinização, interferindo no comprimento internodal, e regeneração dos nódulos de Ranvier, o que poderia ser suprido pelos efeitos sistêmicos provocados pela doença periodontal estabelecida. Isso ocasionaria um aumento na liberação de MMPs, após o estímulo inflamatório, que, dentre outras ações, levaria a uma destruição local dos tecidos que sustentam os dentes (Toregeani et al., 2014). Ainda, de acordo com Toregeani et al. (2014), a DP aumenta a liberação e a produção de fatores pró-inflamatórios como prostaglandinas, MMPs, IL 1 beta, IL6, TNF alfa e proteína C-reativa, e diminui IL10 e IL4 que são citocinas anti-inflamatórias (Mootha et al., 2016) que atuam sobre a regeneração nervosa, sendo que níveis mais elevados de biomarcadores inflamatórios circulantes poderiam desempenhar um papel de contribuição na doença sistêmica (Nagpal, 2015). Entretanto, neste estudo, pode não ter ocorrido essa ação, uma vez que, apesar do grupo GDPL apresentar baixa quantidade de fibras inviáveis e maior quantidade de fibras viáveis em relação ao GL, não houve diferença estatisticamente significativa entre eles; portanto, essas características inflamatórias provocadas sistemicamente pela DP não apresentam fatores suficientes para interferir positivamente, mas, por outro lado, também não atuaram de forma negativa na regeneração nervosa.

Assim sendo, a inflamação local na LNP é responsável por uma série de eventos fisiopatológicos associados a alterações morfológicas e funcionais, iniciando a degeneração nervosa e, posteriormente, a limpeza dos detritos mielínicos e axônicos, permitindo um ambiente propício a regeneração (Gu et al., 2014). Ademais, acarreta na reorganização e na proliferação de células de Schwann, responsáveis pela produção de fatores neurotróficos para o crescimento axonal (Stratton & Shah, 2016). Com isso, a inflamação sistêmica poderia ser um fator de agravamento da inflamação local, levando a uma desestruturação e a um aumento do processo inflamatório local, exacerbando, assim, a degeneração da fibra nervosa, apesar de não ter sido observada essa alteração neste estudo.

Com relação ao diâmetro da fibra nervosa, dos axônios e da espessura da bainha de mielina nas fibras maiores que 4 μm , os GC e GDP apresentaram resultados

melhores do que os que foram submetidos à LNP, evidenciando as alterações que acontecem nessas estruturas decorrente das LNP, na qual ocorre a diminuição dessas três estruturas. Esse achado é corroborado pelo estudo de Antunes et al., (2016), os quais observaram que essas estruturas também se apresentavam mais delgadas, indicando que seria necessário um tempo maior de estudo para registrar dados significativos com relação ao diâmetro das estruturas.

Já nas fibras menores que 4 μm , não houve diferença estatisticamente significativa no diâmetro da fibra nervosa, enquanto que, no diâmetro do axônio, o GC apresentou média menor que os demais, demonstrando o aumento desses axônios nos grupos submetidos à LNP. Uma justificativa para isso seria a regeneração nervosa que aconteceu nesses grupos. Apesar de não significativo, o GDPL apresentou maior espessura da BM do que o GL, podendo sugerir a hipótese de que a DP poderia ter exercido efeito sensibilizante sobre a regeneração da BM, provavelmente decorrente do efeito da liberação de MMP a nível sistêmico, atuando sobre a regeneração dessa estrutura (Svennigsen & Dahlin, 2013).

Quando comparados os GC e GDP com os grupos submetidos à lesão nervosa, foi possível observar valores menores na BM, evidenciando que a remielinização ainda não estava totalmente presente nesses grupos, corroborando com o resultado encontrado no estudo de Sta et al., (2014), os quais, ao analisaram as relações entre parâmetros eletrofisiológicos, comportamentais e morfológicos do nervo isquiático de ratos após lesão por compressão, observaram que os primeiros sinais de mielinização iniciam a partir do 21º de pós-operatório, indicando que possivelmente fosse necessário um tempo maior de estudo para registrar dados significativos. Tendo em vista que este estudo seguiu apenas até o 15º dia de pós-operatório de lesão nervosa periférica, não foi possível observar os sinais de remielinização completos.

Na análise dos vasos sanguíneos, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos; porém, sabe-se que após a lesão nervosa ocorre a angiogênese (Terra et al., 2012). Esse dado é relevante, haja vista que, durante a lesão nervosa, ocorre a lesão dos vasos com formação de hematoma endoneural, consequentemente isquemia, o que pode prejudicar a regeneração nervosa, decorrente da falta de nutrientes e suporte para retirada dos restos de axônio e mielina (Kakihata et al., 2016). Isso poderia ter sido prejudicial para a regeneração nervosa nos resultados

deste estudo, já que não foi observado o aumento na quantidade de vasos sanguíneos após a LNP.

No tocante à análise de núcleos celulares e à porcentagem de tecido conjuntivo, os GL e GDPL demonstraram maiores valores, ou seja, a LNP aumentou a quantidade desses núcleos celulares e a porcentagem do tecido conjuntivo. Durante o processo de regeneração, as fibras nervosas precisam restaurar-se rapidamente, antes que as bandas de Bungners sejam fechadas, caso contrário, será moldado um tecido cicatricial inacessível a uma nova inervação (Krueger-Beck et al., 2011), o que pode ter ocorrido nos grupos submetidos à LNP, justificando o aumento dos núcleos celulares devido a presença de fibroblastos, o que resultaria em grande quantidade de tecido endoneural. Além disso, as células inflamatórias e de Schwann podem estar presentes, pois 15 dias pós lesão ainda está em andamento a fase de regeneração, que pode ocorrer entre 7 e até 28 dias pós-lesão (Sta et al., 2014). Tal fase é caracterizada pelo aumento dessas células que se alinham e são responsáveis pela formação das bandas de Bungners, ocasionando, então, um ambiente rico em fatores tróficos, permitindo a regeneração axonal e o seu direcionamento ao coto distal (Faroni, 2015).

Comprovando a eficácia do modelo experimental de DP, na mensuração das mandíbulas, foi possível observar um aumento na distância da crista alveolar até a junção cimento-esmalte do primeiro molar inferior dos animais, demonstrando, assim, a efetividade da técnica em induzir a doença periodontal por meio de ligadura, ocasionando a reabsorção do tecido ósseo. Esses achados corroboram com o estudo de Nassar et al. (2009), que apontam essas características como sinais da ocorrência da DP.

Segundo Toregeani et al. (2014), no desenvolvimento da DP, após o estímulo inflamatório, ocorre um aumento da produção de prostaglandinas E2 e de MMP, que levam à destruição extracelular da gengiva e do ligamento periodontal, estimulando a reabsorção do osso alveolar. Os efeitos da liberação das MMPs e da proliferação bacteriana são a ativação de múltiplas células, como os fibroblastos, queratinócitos, macrófagos e células endoteliais, responsáveis pela reabsorção óssea por meio da fragmentação dos elementos da matriz extracelular pelos osteoclastos.

Logo, dentro dos limites deste estudo, conclui-se que a doença periodontal induzida experimentalmente não influenciou no processo de regeneração do tecido nervoso após a indução de uma lesão nervosa periférica.

Reconhecimentos

Ao programa de pós-graduação em Biociências e Saúde e à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, pela oportunidade do desenvolvimento deste estudo. A Capes, pela concessão da bolsa de estudos, e a Fundação Araucária pelo aporte financeiro.

Conflito de Interesses

Os autores declaram que não têm conflito de interesses.

Contribuição do Autor

Jéssica Aline Malanotte - Estudo experimental, dados e análise estatística; preparação, edição e revisão do manuscrito;

Lucinéia de Fátima Chasko - Definição de conteúdo; desenho; estudo experimental, dados e análise estatística; preparação, edição e revisão do manuscrito;

Camila Mayumi Martin Kakihata - Estudo experimental, dados e análise estatística; preparação, edição e revisão do manuscrito;

Ana Luiza Peretti - Estudo experimental, dados e análise estatística; preparação, edição e revisão do manuscrito;

Gladson Ricardo Flor Bertolini - definição de conteúdo; desenho; estudo experimental, dados e análise estatística; preparação, edição e revisão do manuscrito;

Patricia Oehlmayer Nassar - Estudo experimental, dados e análise estatística; preparação, edição e revisão do manuscrito;

Carlos Augusto Nassar - definição de conteúdo; desenho; estudo experimental, dados e análise estatística; preparação, edição e revisão do manuscrito.

Abreviaturas

BM, bainha de mielina; FN, fibra nervosa; GC, grupo controle; GDP, grupo doença periodontal; GDPL, grupo doença periodontal com lesão nervosa; GL, grupo lesão nervosa; IL, interleucina; LNP, lesão nervosa periférica; MMP, metaloproteinasas; TNF, fator de necrose tumoral; um, micrômetro.

Referências

- Antunes, J. S.; Lovison, K.; Karvat, J.; Peretti, A. L.; Vieira, L.; Higuchi, G. H.; Brancalhão, R. M. C.; Ribeiro, L. F. C. & Bertolini, G. R. F. (2016) Nociceptive and neuronal evaluation of the sciatic nerve of wistar rats subjected to compression injury and treated with resistive exercise. *Pain Res Manag.*, 16, 1-7.
- Bastien, D. & Lacroix, S. (2014) Cytokine pathways regulating glial and leukocyte function after spinal cord and peripheral nerve injury. *Exp Neurol.*, 258, 62–77.
- Boamorte, C. C.; Pasqualotto, L. F.; Brancalhão, R. M. C.; Ribeiro, L. F. C.; Nassar, P. O.; Schneider, S. C. S. & Nassar, C. A. (2016) Assessing the action of phytoestrogens on alveolar bone tissue of female of ovariectomized rats with induced periodontal disease. *American International J.*, 6, 166-178.
- Bombeiro, A. L.; Santini, J. C.; Thomé, R.; Ferreira, E. R. L.; Nunes, S. L. O.; Moreira, B. M.; Bonet, I. J. M.; Sartori, C. R.; Verinaud, L. & Oliveira, A. L. R. (2016) Enhanced immune response in immunodeficient mice improves peripheral nerve regeneration following axotomy. *Front Cell Neurosci.*, 10, 1-14.
- Bridge, P. M.; Ball, D. J.; Mackinnon, S. E.; Nakao, Y.; Brandt, K. & Hunter, D. A. (1994) Nerve crush injuries – A model for axonotmesis. *Exp Neurol.*, 127, 284-290.
- Di Scipio, F.; Raimondo, S.; Tos, P. & Geuna, S. (2008) A simple protocol for paraffin-embedded myelin sheath staining with osmium tetroxide for light microscope observation. *Microsc Res Tech.*, 71, 497-502.
- Faroni, A.; Mobasser, A.; Kingham, P. J. & Reid, A. J. (2015) Peripheral nerve regeneration: Experimental strategies and future perspectives. *Adv Drug Deliv Rev.*, 82, 160–167.
- Field, A. (2009) Descobrimos a estatística usando o SPSS.
- GIL, A.C. (2007) Como elaborar projetos de Pesquisa. São Paulo: Atlas.
- Gu, X.; Ding, F. & Williams, D. F. (2014) Neural tissue engineering options for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials.*, 35, 6143-6156.
- Gurav, A. N. (2014) Alzheimer's disease and periodontitis – an elusive link. *RAMB.*, 60, 173-180.
- Hosomi, N.; Aoki, S.; K. Matsuo, K.; Deguchi, K.; Masugata, H.; Murao K.; Ichihara, N.; Ohyama, H.; Dobashi, H.; Nezu, T.; Ohtsuki, T.; Yasuda, O.; Soejima, H.; Ogawa, H.; Izumi, Y.; Kohno, M.; Tanaka, J. & Matsumoto, M. (2012) Association of serum anti-periodontal pathogen antibody with ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis.*, 34, 385–392.
- Houshyar, K. S.; Momeni, A.; Pyles, M. N.; Cha, J. Y.; Maan, N.; Duscher, D.; Jew, O. S.; Siemers, F. & Schoonhoven, J. V. (2016) The Role of current techniques and concepts in peripheral nerve repair. *Plast Surg Int.*, 16, 1-8.
- Ide, M.; Harris, M.; Stevens, A.; Sussams, R.; Hopkins, V.; Culliford, D.; Fuller, J.; Ibbett, P.; Raybould, R.; Thomas, R.; Iqbal, P. S.; Nubesh Khan, S. N.; Haris, M.; Narayanan, M.; Laju, S. & Kumar, S. S. (2015) Assessment of Systemic

- Inflammatory Markers in Patients with Aggressive Periodontitis. *J Int Oral Health.*, 7, 48-51.
- Krueger-Beck, E.; Scheeren, E. M.; Nogueira, G. N.; Nohama, P. (2011) Electric and magnetic fields applied to peripheral nerve regeneration. *Rev Neurociênc.*, 19, 314-328.
- Rosa-Junior, G. M.; Magalhães, R. M. G.; Rosa, V. C.; Bueno, C. R. S.; Simionato, L. H. & Bortoluci, C. H. (2016) Efeito da associação da laserterapia com a natação no reparo morfológico do nervo isquiático e na recuperação funcional de ratos submetidos à axonotmese. *RPF.*, 23, 12-20.
- Junqueira, L. C. & Carneiro, J. (2013) *Histologia básica*, 12 ed. São Paulo: Guanabara Koogan.
- Kakihata, C. M. M.; Malanotte, J. A.; Karvat, J.; Brancalhão, R. M. C.; Ribeiro, L. F. C. & Bertolini, G. R. F. (2016) The morphological and functional effects of exercise in the aquatic environment, performed before and/or after sciatic nerve compression in Wistar rats. *JER.*, 12, 393-400.
- Leite, M. A.; Mattia, T. M.; Kakihata, C. M. M.; Bortolini, B. M.; Rodrigues, P. H. C.; Bertolini, G. R. F.; Brancalhão, R. M. C.; Ribeiro, L. F. C.; Nassar, C. A. & Nassar, P. (2017) O. Experimental periodontitis in the potentialization of the effects of immobilism in the skeletal striated muscle. *Inflam.*, 40, 2000-2011.
- Livnat, M. M. M.; Almog, M.; Nissan, M.; Loeb, E.; Shapira, Y. & Rochkind, S. (2016) Photobiomodulation triple treatment in peripheral nerve injury: nerve and muscle response. *Photomed Laser Surg.*, 34, 638-645.
- Sta, M.; Cappaert, N. L. M.; Ramekers, D.; Baas, F. & Wadmanb, W.J. (2014) The functional and morphological characteristics of sciatic nerve degeneration and regeneration after crush injury in rats. *J Neurosci Methods.*, 222, 189-198.
- Marques, T. V. F.; Gonçalves, L. & Marques, F. V. (2015) Influência da periodontite apical nos níveis séricos de marcadores de Proteína C-reativa: revisão da literatura. *Rev Bras Odontol*, 72, 16-19.
- Mazzer, P. Y. C. N.; Barbieri, C. H.; Mazzer, N. & Fazan, V. P. S. (2006) Avaliação qualitativa e quantitativa das lesões agudas por esmagamento do nervo isquiático do rato. *Acta Ortop Bras.*, 14, 220-225.
- Menorca, R. M. G.; Fussel, T. S. & Elfar, J. C. (2013) Peripheral nerve trauma: mechanisms of injury and recovery. *Hand Clin.*, 29, 317-330.
- Mootha, A.; Malaiappan, S.; Javakumar, N. D.; Varghese, S. S. & Thomas, J.T. (2016) The effect of periodontitis on expression of interleukin-21: a systematic review. *Int J Inflam.*, 16, 1-8.
- Nagpal, R.; Yamashiro, Y. & Izumi, Y. (2015) The Two-Way Association of Periodontal Infection with Systemic Disorders: An Overview. *Mediators Inflamm.*, 15, 1-9.
- Nassar, P. O.; Nassar, C. A.; Guimarães, M. R.; Aquino, S. G.; Andia, D. C.; Muscara, M. N.; Spolidorio, D. M.; Rossa, C. Jr. & Spolidorio, L. C. (2009)

- Simvastatin therapy in cyclosporine A-induced alveolar bone loss in rats. *J Periodontal Res.*, 44, 479-488.
- Puenter, U.; Teeling, J.; Perry, H. V. & Holmes, C. (1943) Periodontitis and
- Scheib, J., Hoke, A. (2013) Advances in peripheral nerve regeneration. *Nat Rev Neurol.*, 12. 668-676.
- Seddon, H. J., Medawar, P. B., Smith, H. (1943) Rate of regeneration of peripheral nerves in man. *J. Physiol.*, 102, 191-215.
- Stratton, J. A. & Shah, P. T. (2016) Macrophage polarization in nerve injury: do Schwann cells play a role? *NRR.*, 11, 53-57.
- Svinnigsen, A. F. & Dahlin, L. B. (2013) Repair of the peripheral Nerve - remyelination that works. *Brain sciences.*, 3, 1182-1197.
- Terra, R.; Silva, S. A.G.; Pinto, V. S. & Sutra, P. M. L. (2012) Effect of exercise on the immune system: response, adaptation and cell signaling. *RBME.*, 18, 208-214.
- Toregeani, J. F.; Nassar, C. A.; Toregeani, K. A. M. & Nassar, P. O. (2014) Doença periodontal e aterosclerose. *J Vasc Bras.*, 13, 208-216.
- Vyeira, R. C.; Rosales, C. & Querol, E. U. (2016) Neutrophil functions in periodontal homeostasis. *J Immunol Res.*, 16, 1-9.

Tabela 1 – Mensuração da distância da crista alveolar até a junção cimento esmalte do primeiro molar inferior.

Grupos	Médias
GC	17,18 ± 3,47 A
GDP	34,38 ± 9,73 B
GL	17,08 ± 3,56 A
GDPL	34,59 ± 9,68 B

GC: grupo controle, GDP: grupo doença periodontal, GL: grupo lesão nervosa, GDPL: grupo doença periodontal com lesão nervosa. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa. Os valores representam média ± desvio padrão.

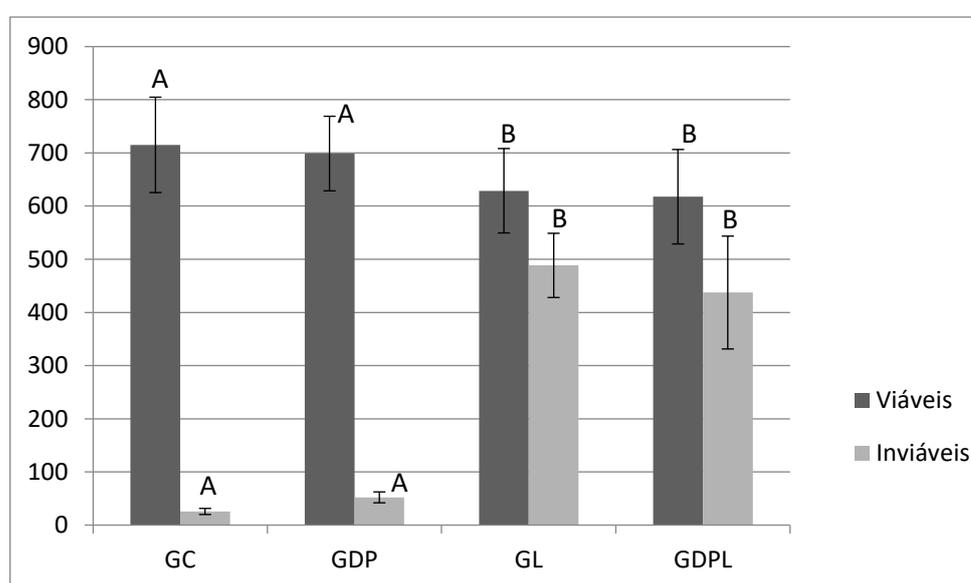


Figura 2 - Total de fibra nervosas viáveis e inviáveis. GC: grupo controle, GDP: grupo doença periodontal, GL: grupo lesão nervosa, GDPL: grupo doença periodontal com lesão nervosa. Os resultados são expressos em média. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa. Os valores representam média ± desvio padrão.

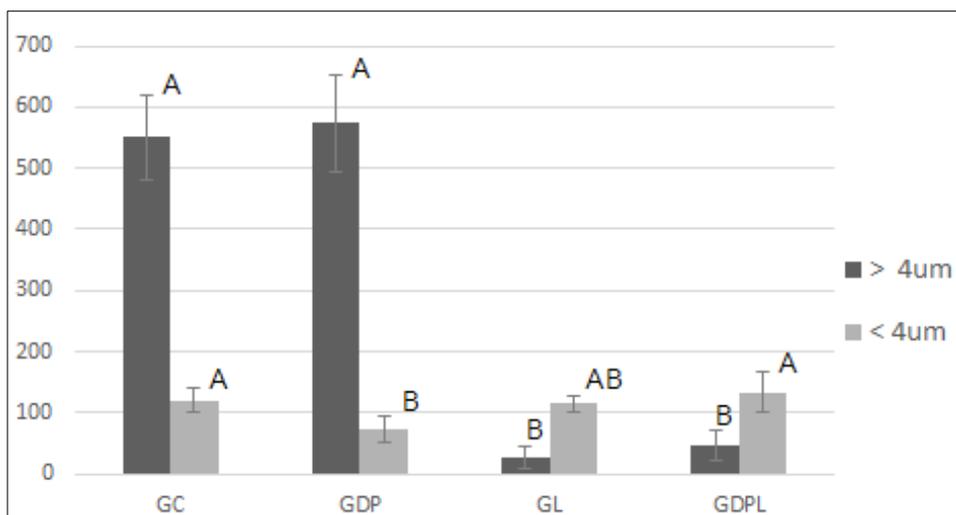


Figura 3 - Total de fibras nervosas viáveis, total de fibras maiores e menores que 4 micrômetros. GC: grupo controle, GDP: grupo doença periodontal, GL: grupo lesão nervosa, GDPL: grupo doença periodontal com lesão nervosa. Os valores são expressos em média \pm desvio padrão, > - maior, < - menor.

Tabela 2 - Diâmetro das fibras nervosas, maiores e menores que 4 μ m.

Grupos	> 4 μ m	< 4 μ m
GC	86,95 \pm 0,68 A	29,44 \pm 0,17 A
GDP	88,65 \pm 0,70 A	29,18 \pm 0,25 A
GL	44,77 \pm 0,09 B	30,86 \pm 0,11 A
GDPL	45,20 \pm 0,23 B	30,62 \pm 0,30 A

GC: grupo controle, GDP: grupo doença periodontal, GL: grupo lesão nervosa, GDPL: grupo doença periodontal com lesão nervosa, μ m – micrômetro, > - maior, < - menor. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa. Os valores representam média \pm desvio padrão.

Tabela 3 - Diâmetro dos axônios, maiores e menores que 4 micrômetros.

Grupos	> 4 μ m	< 4 μ m
GC	42,23 \pm 0,18 A	14,08 \pm 0,16 A
GDP	45,46 \pm 0,26 A	17,25 \pm 0,12 B
GL	26,07 \pm 0,20 B	18,28 \pm 0,12 B
GDPL	26,66 \pm 0,23 B	19,14 \pm 0,14 B

GC: grupo controle, GDP: grupo doença periodontal, GL: grupo lesão nervosa, GDPL: grupo doença periodontal com lesão nervosa, μ m – micrômetro, > - maior, < - menor. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa. Os valores representam média \pm desvio padrão.

Tabela 4 - Espessura da bainha de mielina das fibras maiores e menores que 4 micrômetros.

Grupos	> 4 μm	< 4 μm
GC	1,6 \pm 0,54 A	0,77 \pm 0,06 A
GDP	1,8 \pm 0,44 A	0,67 \pm 0,04 AB
GL	0,93 \pm 0,06 B	0,62 \pm 0,02 B
GDPL	0,92 \pm 0,10 B	0,65 \pm 0,06 B

GC: grupo controle, GDP: grupo doença periodontal, GL: grupo lesão nervosa, GDPL: grupo doença periodontal com lesão nervosa, μm – micrômetro, > - maior, < - menor. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa. Os valores representam média \pm desvio padrão.

Tabela 5 – Quantificação dos vasos sanguíneos, núcleos celulares e porcentagem de tecido conjuntivo.

Grupos	Vasos sanguíneos	Núcleos celulares	Tecido conjuntivo (%)
GC	14 \pm 5,33 A	115,6 \pm 20,9 A	2,38 \pm 0,27 A
GDP	9,4 \pm 0,89 A	109,8 \pm 15,1 A	2,22 \pm 0,25 A
GL	15 \pm 4,35 A	431,6 \pm 88,9 B	3,25 \pm 0,21 B
GDPL	15,8 \pm 10,63 A	319,4 \pm 75,0 C	3,54 \pm 0,45 B

GC: grupo controle, GDP: grupo doença periodontal, GL: grupo lesão nervosa, GDPL: grupo doença periodontal com lesão nervosa. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa. Os valores representam média \pm desvio padrão.

ARTIGO CIENTIFICO 2

Será submetido a: Journal of Lasers in Medical Sciences

<http://journals.sbmj.com/jlms>

Efeito Do Laser De Baixa Potência Na Regeneração isquiática Periférica Sob a Condição Inflamatória Sistêmica Da Doença Periodontal

Jéssica Aline Malanotte¹, Ana Luiza Peretti¹, Camila Mayumi Martin¹ Kakhata, Andrey Potulski², Ana Tereza Bittencourt Guimarães³, Gladson Ricardo Flor Bertolini³, Patricia Oehlmeyer Nassar³, Carlos Augusto Nassar³, Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro³.

1 - Discente do Programa de Pós-Graduação, Mestrado em Biociências e Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), campus Cascavel - Paraná.

2 – Discente do Programa de Pós-Graduação, Mestrado em Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável na Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS, campus de Laranjeiras do Sul – Paraná.

3- Docente do Programa de Pós-Graduação, Mestrado em Biociências e Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), campus Cascavel - Paraná.

Endereço para correspondência:

Carlos Augusto Nassar, Rua Universitária, 2069, Jardim Universitário, Colegiado de Odontologia, 85819-110, Cascavel PR. Fone: (45) 32203168. E-mail: canassar@yahoo.com

Resumo

Introdução: A doença periodontal (DP) é uma condição inflamatória crônica das estruturas de suporte dos dentes, podendo promover um estado pró-inflamatório sistêmico que pode atuar exacerbando a degeneração nervosa por meio da intensificação da inflamação. Nessa situação, a terapia com o laser pode estimular a regeneração. O objetivo deste estudo foi, então, avaliar o efeito do laser de baixa potência na regeneração nervosa periférica sob a condição inflamatória sistêmica da DP.

Métodos: Foram utilizados 32 ratos machos, distribuídos em 4 grupos: lesão nervosa (GL); doença periodontal com lesão nervosa (GDPL); lesão nervosa e tratamento (GLT); doença periodontal com lesão nervosa e tratamento (GDPLT). No 7º dia de experimento, os animais foram submetidos à ligadura bilateralmente ao redor dos primeiros molares inferiores. No 22º dia, submetidos à lesão nervosa periférica, e no 25º dia início do tratamento com laser de baixa potência, realizado por 2 semanas. Avaliou-se o índice funcional do isquiático (IFC), com posterior eutanásia de todos os animais no 37º dia de experimento. Foram coletados o nervo isquiático, para análise morfológica e do estresse oxidativo, e as hemimandíbulas esquerdas, para análise radiográfica.

Resultados: No IFC, não houve diferença entre os grupos na primeira avaliação (AV) pré-lesão. A partir da AV2; pós-lesão, todos os grupos apresentaram diminuição desses valores, que se mantiveram pós-tratamento. Na morfologia do tecido nervoso, o GDPL apresentou fibras de maior diâmetro, enquanto o GLT e o GDPLT fibras menor diâmetros, com organização endoneural. No sistema antioxidante, houve aumento da concentração de proteínas, maior atividade da superóxido e diminuição da atividade da glutathione transferase nos grupos tratados. Catalase e colinesterase não apresentaram diferença entre os grupos, a lipoperoxidação estava aumentada nos grupos com DP. Na análise radiográfica da mandíbula, foi possível comprovar a indução da DP.

Conclusão: O laser de baixa potência nos parâmetros utilizados auxiliou na regeneração das fibras nervosas, apesar da inflamação no local ainda estar presente. Além disso, o tratamento foi eficaz em proteger as células contra danos oxidativos devido ao aumento da superóxido dismutase e de proteínas, no entanto, a diminuição de glutathione S transferase demonstra a inibição desta etapa do sistema antioxidante.

Palavras chaves: Lasers; Periodonto; Inflamação; Tecido Nervoso.

Abstract

Introduction: Periodontal disease (PD) is an inflammatory condition, which causes tooth destruction, promoting a systemic inflammatory state that can act exacerbating nervous degeneration. While laser therapy may stimulate regeneration. The aim of this study was to evaluate the effect of low power laser on peripheral nerve regeneration under the systemic inflammatory condition of PD.

Methods: 32 male rats were used, distributed in 4 groups: nerve injury (GL); periodontal disease with nerve damage (GDPL); nerve damage and treatment (GLT); periodontal disease with nerve injury and treatment (GDPLT). On the 7th day of the experiment the animals were ligated bilaterally around the lower first molars. On the 22nd day, they underwent peripheral nerve damage, and on the 25th day beginning of the low power laser treatment, performed for 2 weeks. It was evaluated from the functional index of the ischiatic (IFC), with subsequent euthanasia of all the animals in the 37th day of experiment. The sciatic nerve was collected for morphological analysis and oxidative stress and left hemi Jaws for radiographic analysis.

Results: In the IFC, there was no difference between groups in the first evaluation (AV) pre-injury, since AV2, after injury, all groups presented a decrease in these values, which remained post treatment. In the morphology of the GDPL nervous tissue presented larger diameter fibers, whereas GLT and GDPLT fibers had smaller diameters, with endoneural organization. In the antioxidant system, there was an increase in protein concentration, higher superoxide activity, and decreased glutathione transferase activity in the treated groups. Catalase and cholinesterase did not differ between groups, and lipoperoxidation was increased in the PD groups. In the radiographic analysis of the mandible it was possible to verify the induction of PD.

Conclusion: The low-power laser in the parameters used was not effective in increasing the nociceptive threshold, but it aided in the regeneration of nerve fibers, although the inflammation in the site was still present. However, the treatment was effective in protecting cells against oxidative damage due to increased SOD and increased protein, however the decrease in GST demonstrates the inhibition of this stage of the antioxidant system.

Keywords: Lasers; Periodontal; Inflammation; Nervous Tissue.

Introdução

A doença periodontal (DP) é uma condição inflamatória crônica nas estruturas de suporte do dente, iniciada por bactérias gram-negativas presentes na flora subgengival. Esses micro-organismos produzem várias endotoxinas que ativam a resposta imune do hospedeiro para produzir mediadores inflamatórios que ocasionam a destruição do tecido conjuntivo e do osso alveolar além de promover um estado pró-inflamatório sistêmico.^{1,2,3}

Outra condição inflamatória comum ocorre quando os nervos periféricos sofrem lesões por compressão, provocando alteração funcional decorrente de mudanças sensitivas e motoras.⁴ Ademais, macrófagos e células de Schwann trabalham em conjunto para remover os fragmentos de axônio e mielina.^{5,6}

Por meio da produção de mediadores inflamatórios locais, essa resposta inflamatória é intensificada pelo aumento na produção de radicais livres no local da lesão, sendo um dos mecanismos responsáveis pela intensificação da nocicepção, pois os oxidantes podem promover hiperalgesia por exacerbar o dano tecidual no local da lesão.^{4,7}

Para acelerar a regeneração nervosa periférica e, conseqüentemente, melhorar a qualidade de vida do paciente, várias técnicas e tratamentos têm sido desenvolvidas. Dentre eles, um dos recursos que vem sendo utilizado para promover melhora funcional é o laser de baixa potência (LBP),^{8,9} pois atua na proliferação fibroblástica e das células de Schwann, as quais secretam fatores neurotróficos para regeneração do nervo. Além do mais, o LBP apresenta efeito analgésico, inclusive pela liberação de citocinas anti-inflamatórias.¹⁰

Seus efeitos anti-inflamatórios se dão por meio da diminuição de interleucinas 6 e 1, fator de necrose tumoral, prostaglandinas e metaloproteinases.⁹ Todavia, ainda não existem trabalhos sobre o efeito do laser de baixa potência na regeneração nervosa periférica na presença da doença periodontal. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do laser de baixa potência na regeneração nervosa periférica sob a condição inflamatória sistêmica da doença periodontal, sobre os parâmetros do IFC, morfológicos e de estresse oxidativo.

Material e métodos

Esta pesquisa foi realizada no Laboratório de Estudo de Lesões e Recursos Fisioterapêuticos (LELRF), em conjunto com o Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), campus de Cascavel - PR. Todos os procedimentos experimentais foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal da Unioeste (Anexo 1).

Grupo amostral

Foram utilizados 32 ratos *Wistar* machos, com 8 semanas de idade, pesando em média 250g, provenientes do biotério central da Unioeste. Os animais permaneceram no biotério setorial do LELRF, sob condições controladas de temperatura ($23 \pm 2^\circ \text{C}$) e de luz (ciclo claro-escuro de 12 horas), com água e ração comercial à vontade. Os animais foram distribuídos de forma aleatória em 4 grupos, contendo 8 animais em cada, descritos a seguir:

- Grupo lesão nervosa (GL) - lesão nervosa no 15º dia do experimento;
- Grupo doença periodontal com lesão nervosa (GDPL) - indução da DP no 1º dia e lesão nervosa no 15º dia do experimento;
- Grupo lesão nervosa tratado (GLT) - lesão nervosa 15º dia, e tratados com laser de baixa potência a partir do 18º do experimento;
- Grupo doença periodontal com lesão nervosa e tratamento (GDPLT) - indução da DP no 1º dia, lesão nervosa no 15º dia e tratados com laser de baixa potência a partir do 18º do experimento.

Todos os animais foram eutanasiados no último dia de tratamento com o laser de baixa potência, ou seja, no 30º dia de experimento. Os procedimentos para o desenvolvimento da pesquisa foram descritos nas subseções seguintes.

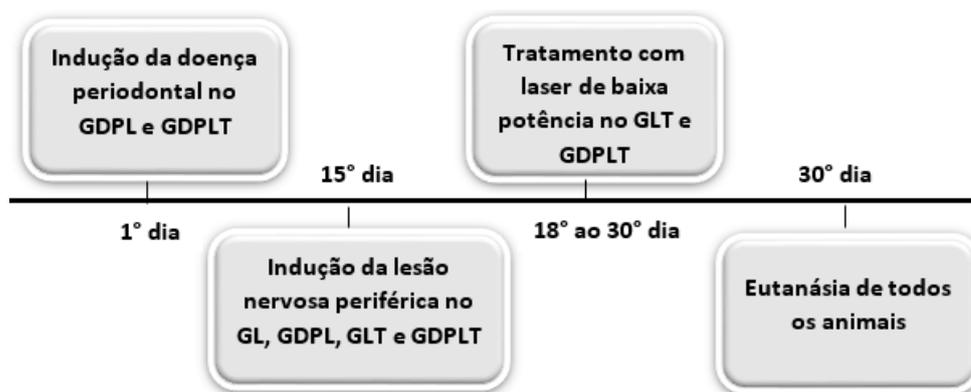


Figura 1 - Período de realização dos procedimentos experimentais. GDP: grupo doença periodontal, GL: grupo lesão nervosa, GDPL: grupo doença periodontal com lesão nervosa, GLT: grupo lesão nervosa tratado, GDPLT: grupo doença periodontal com lesão nervosa e tratamento.

Protocolo de indução da doença periodontal

Após 7 dias de aclimatação, os animais foram anestesiados com cloridato de quetamina (100 mg/Kg) e xilazina (50 mg/Kg) (Sespo Indústria e comércio Ltda, São Paulo, Brasil), e posicionados em mesa operatória apropriada, a qual permitiu a manutenção da abertura bucal facilitando o acesso aos dentes da região posterior da mandíbula. Com o auxílio de uma pinça modificada e de uma sonda exploradora, inseriu-se um fio de algodão número 40 ao redor do primeiro molar inferior direito e esquerdo. Essa ligadura atuou como irritante gengival por 30 dias, favorecendo o acúmulo de placa bacteriana e consequente desenvolvimento da doença periodontal.¹¹

Modelo experimental de compressão do nervo isquiático

No 22º dia do experimento, prévio ao procedimento cirúrgico de compressão do nervo isquiático, os animais foram pesados e anestesiados. Foi realizada a tricotomia na região posterior da coxa direita e, em seguida, com auxílio de bisturi, foi realizada uma incisão paralela às fibras do músculo bíceps femoral, para expor o nervo isquiático e sua subsequente compressão com uma pinça hemostática, durante 30 segundos. A pressão de pinçamento foi padronizada para todos os animais, utilizando-se como referência o segundo dente da cremalheira, sendo todos os pinçamentos realizados por um mesmo indivíduo. Uma sutura epineural com fio 6.0 foi utilizada para a

demarcação do local lesionado.¹² Em seguida, realizou-se a sutura da pele do animal com fio catgut 4.0.

Protocolo de tratamento

No terceiro dia após a lesão nervosa, ou seja, no 25º dia de experimento, iniciou-se o protocolo de tratamento com o laser de baixa potência infravermelho. O comprimento de onda foi de 830 nm (Ibramed®) previamente aferido, 30 mW de potência, 30 J/cm² de fluência, 0,3 cm² de área de saída da radiação, 0,1 W/cm² de irradiância e 9 J de energia entregue, total de 2 minutos de aplicação diária.¹³ A técnica terapêutica foi de forma pontual e contínua, sendo o equipamento posicionado perpendicularmente em um único ponto, especificamente sobre a incisão cirúrgica. Esse procedimento se repetiu cinco dias por semana, com um intervalo de 24 horas entre as aplicações, sendo um total de duas semanas de tratamento, com intervalo de dois dias entre as semanas, totalizando 10 aplicações. Esse tratamento foi realizado sempre pelo mesmo pesquisador nos grupos GLT e GDPLT.

Índice funcional do isquiático (IFC)

Os animais foram treinados a caminhar em uma esteira com base de acrílico durante os 5 dias prévios ao procedimento de compressão do nervo isquiático. Foram realizadas três avaliações (AV), em todos os animais, por um único avaliador, sendo a AV1, prévia ao procedimento de compressão nervosa, a AV2 no 3º dia de pós-operatório de lesão nervosa, prévio ao início do tratamento e a AV3 no 15º dia após finalizar o tratamento.

O IFC corresponde à análise funcional da marcha por meio da obtenção das imagens por vídeo, utilizando uma esteira com velocidade controlada (marca *Insight®*), Ribeirão Preto – São Paulo - Brasil). O registro da marcha foi realizado com uma *webcam*, dotada de um cabo USB, conectada diretamente a um computador portátil.¹⁴

Após as filmagens, foi selecionada uma imagem de cada animal e avaliada no programa *Image Pro-plus 6.0* (Media Cybernetics, Georgia, Estados Unidos), com a mensuração das variáveis, como sugerido por Bain et al.,¹⁵ comprimento da pegada (PL, ou *print length*), a abertura total dos

dedos, do 1º ao 5º (TS ou total *spread of toes*) e a abertura dos dedos intermediários, do 2º ao 4º (IT ou *intermediate toes*), no lado lesionado ou experimental (E) e no lado contralateral ou normal (N). Uma vez registrados, calculou-se o valor do IFC no Microsoft® Excel 2016 para Windows, pela fórmula: $IFC = -38.3 \times [(EPL - NPL) / NPL] + 109.5 \times [(ETS - NTS) / NTS] + 13.3 \times [(EIT - NIT) / NIT] - 8.8$

Eutanásia dos animais

No último dia de experimento (37º dia), todos os animais foram pesados e anestesiados, sendo realizadas a dissecação e a retirada de 2 cm do nervo isquiático, distal ao procedimento de compressão, para realização da análise morfológica e do estresse oxidativo do tecido nervoso. Em seguida, os animais foram eutanasiados por decapitação em guilhotina, e as hemimandíbulas do lado esquerdo foram coletadas para posterior análise radiográfica.

Análise Morfológica

O fragmento do nervo isquiático foi fixado em paraformol 7%, durante 24 horas, e armazenados em álcool 70%, seguindo o processamento histológico de rotina para inclusão em parafina: desidratação; diafanização; infiltração em parafina histológica; e emblocamento para obtenção de cortes transversais do nervo com espessura de 5 µm.¹⁶ Posteriormente, foram corados em hematoxilina e eosina para a realização da análise descritiva do tecido nervoso, quanto à integridade das fibras e à presença de núcleos de células de Schwann e de infiltrado inflamatório.

Análises Bioquímicas

Após a coleta, os fragmentos do nervo isquiático foram congelados, em seguida, homogeneizadas em 1 mL de tampão Tris HCl pH 7,4 e centrifugados a 12.000 g por 10 minutos, a 4°C. O homogenato foi congelado a -20°C para posteriores análises.

A quantificação de proteína das amostras foi determinada pelo método de Bradford,¹⁷ utilizando albumina de soro bovino como padrão. Todas as amostras foram então normalizadas para 1 mg de proteína/mL.

Dosagem enzimática associada à neurotoxicidade

A análise da atividade da enzima colinesterase (ChE) foi realizada por meio do método de Ellman et al.¹⁸ modificado para microplaca por Silva de Assis¹⁹ cujo princípio é a mensuração da produção da tiocolina quando a acetiltiocolina é hidrolisada. Isso é feito pela reação contínua do tiol com o íon 5:5-ditiobis-2-nitrobenzoato para produzir o ânion de coloração amarelada do ácido 5-tio-2-nitrobenzóico.

A reação foi realizada em triplicata, em 300 μ L de solução contendo 0,05 mM de ácido 5,5'-Ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) e 1,5 mM de Acetiltiocolina (ATC). Foi calculada a atividade da ChE em relação à concentração de proteína (mg/mL), usando o coeficiente de extinção molar do DTNB ($1,36\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). A quantificação da proteína foi calculada a partir da amostra bruta e a leitura realizada a 22°C. Os resultados foram expressos em $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}\text{ proteína}^{-1}$.

Dosagem enzimática associada ao sistema antioxidante

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi avaliada de acordo com o método proposto por Crouch et al.²⁰ modificado. O princípio dessa análise consiste em quantificar o complexo formado entre superóxido e azul de tetrazolium (NBT), mensurada a 560 nm durante 1,5 hora. Uma alíquota de 0,75 mg/mL de proteína em etanol 25% foi preparada em volume de 800 μ L e centrifugada a 13680 g (4 °C) durante 20 minutos. A partir do sobrenadante, o meio de reação foi preparado em microplaca de 96 poços. Em triplicatas, em volume final de 200 μ L contendo 0,1 mg de proteína. mL^{-1} , 0,09 mM de NBT, 0,015 mM de EDTA, 34,78 mM de sulfato de hidroxilamina, 79 mM de tampão carbonato de sódio pH 10,2 e a placa lida à 22°C. Uma unidade de SOD em $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}\text{ de proteína}^{-1}$.

A atividade da catalase (CAT) foi acompanhada pelo decréscimo da absorbância a 240 nm,²¹ a partir do princípio de dismutação do peróxido cujo

coeficiente de extinção molar é de $40 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. As duplicatas, em 2 mL de solução em uma cubeta de quartzo a 25°C , apresentaram concentração final de $0,01 \text{ mg de proteína.mL}^{-1}$, sendo que o meio de reação apresentou concentrações finais de $13,5 \text{ mM de H}_2\text{O}_2$, $50 \text{ mM de TRIS-HCl pH } 8,0$ e $0,25 \text{ mM de EDTA}$. Os resultados da atividade da enzima catalase foram expressos em $\text{mmol.min}^{-1}.\text{mg de proteína}^{-1}$.

O princípio da análise da atividade da glutathione transferase (GST) é de que a enzima catalisa a conjugação da glutathione reduzida (GSH) com o substrato sintético CDNB, que produz um conjugado detectado em 340 nm .²² Durante o ensaio, a atividade enzimática é proporcional à velocidade de produção do composto conjugado. O ensaio foi realizado em triplicata, em microplaca, sendo que a amostra apresentou concentração final de $0,020 \text{ mg de proteína mL}^{-1}$. O meio de reação apresentou concentrações finais de $0,94 \text{ mM de CDNB}$ e $0,94 \text{ mM de GSH}$. A leitura foi realizada à 22°C . O coeficiente de extinção molar do conjugado GSH/CDNB é $9,6 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ e a unidade foi expressa em $\text{nmol.min}^{-1}.\text{mg de proteína}^{-1}$.

Reação não enzimática associada ao sistema antioxidante

A determinação da reação de lipoperoxidação (LPO) foi realizada com objetivo de quantificar indiretamente os peróxidos, refletindo, assim, a intensidade da peroxidação lipídica.²³ Foi realizado o método de TBARS,²⁴ por meio de comparações de absorbância com curva de padrões de Malondialdeído (MDA), principal subproduto de peroxidação lipídica. Para preparação da amostra, o meio contendo alíquota de $0,33 \text{ mg/mL de proteína da amostra em ácido tricloroacético (TCA) } 6,7\%$ em volume final de $180 \mu\text{L}$ foi agitado em vórtex, deixado em banho de gelo por 5 minutos e centrifugado por 5 minutos a 12000 g a 4°C . Para a dosagem das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), $40 \mu\text{L}$ do sobrenadante, assim como de diferentes concentrações de MDA, foram adicionados em microplaca, em triplicata, a meio de reação contendo $21,42 \text{ mM de TBA}$, $17,86 \text{ mM de NaOH}$ (utilizado para solubilização do TBA), $0,73 \text{ M de TCA}$, $0,032 \text{ mM de BHT}$, etanol 3% (utilizado para solubilização do BHT) em PBS. A leitura da reação foi realizada a 22°C , após 60 minutos de incubação, a 60°C , em uma

absorbância de 535 nm. Os resultados da peroxidação lipídica foram expressos em nmol de MDA.mg de proteína⁻¹.

Análise radiográfica da mandíbula

As hemimandíbulas do lado esquerdo foram dissecadas, fixadas em formol 10%. Em seguida, colocadas com o lado lingual sobre o filme radiográfico periapical e posicionadas para que as cúspides vestibulares e linguais dos primeiros molares ficassem no mesmo plano vertical. Foi utilizado aparelho de raio X GE – 1000, regulado para 15 mA, 65 Vp, 18 impulsos, distância foco/filme de 50 cm com incidência de raio X perpendicular às peças. Para processamento dos filmes, foram utilizados revelador e fixador Kodac® no respectivo processamento de tempo/temperatura e digitalizadas com um “scanner” para dispositivos (*Polaroid Sprint Scan 35 Plus, Polaroid*). As imagens digitalizadas foram analisadas em 3 medidas pelo programa *Image Pro-plus 6.0* (Media Cybernetics, Georgia, Estados Unidos) e retiradas uma média entre elas, por meio de uma medida linear, que percorreu a distância da junção cimento-esmalte até a crista óssea alveolar do lado mesial do primeiro molar inferior esquerdo, com as medições em pixels.²⁵

Análise dos dados

Os resultados foram expressos e analisados por meio da estatística descritiva e inferencial. Primeiramente, foram avaliados quanto à sua normalidade pelo teste Shapiro-Wilk e, como apresentaram distribuição normal, foi utilizado o teste Anova unidirecional, seguido do Teste de Tukey quando houve diferença significativa. As variáveis foram analisadas pelo programa BioEstat 5.0. Foi considerado significativo quando $p < 0,05$.²⁶ As variáveis de análise radiográfica da mandíbula, proteína, ChE, SOD, CAT, GST, e LPO foram comparadas entre os grupos, tendo a normalidade dos resíduos verificada pelo teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias por meio do teste de Levene. As variáveis foram analisadas por meio do teste paramétrico ANOVA-fator duplo, seguido do teste de LSD-Fisher. Os resultados foram expressos pela média e desvio padrão.

Resultados

Índice funcional do isquiático

Na primeira avaliação, não houve diferença significativa entre os grupos ($p=0,316$); todavia, a partir da segunda avaliação, após serem submetidos à lesão nervosa periférica, todos os grupos apresentaram diminuição desses valores ($p<0,05$), não sendo observada melhora na última avaliação após o tratamento (Tabela 1).

Tabela 1 – Índice funcional do isquiático.

Grupos	AV1	AV2	AV3
GL	-18,56 ±24,22 Aa	-75,58 ± 14,23 Bb	-74,79 ± 21,12 Bb
GDPL	10,84 ± 27,77 Aa	-67,73 ± 18,46 Bb	-72,62 ± 23,71 Bb
GLT	0,34 ± 33,39 Aa	-74,83 ± 16,00 Bb	-71,44 ± 7,15 Bb
GDPLT	-4,59 ± 26,13 Aa	-62,85 ± 19,11 Bb	-67,78 ± 17,01 Bb

Grupo lesão nervosa (GL); Grupo doença periodontal com lesão nervosa (GDPL); Grupo lesão nervosa com tratamento (GLT) e Grupo doença periodontal com lesão nervosa e tratado (GDPLT). AV – Avaliação. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa. Letras maiúsculas para diferenças entre as colunas (avaliações) e letras minúsculas para diferenças entre as linhas (grupos). Os valores representam média ± desvio padrão.

Morfologia geral do tecido nervoso

A morfologia do tecido nervoso no grupo lesão nervosa (GL) se apresentou alterada, com fibras nervosas desorganizadas, não sendo possível a visualização do axônio e o rompimento do endoneuro. O meio extracelular revelou hipercelularidade com aumento do número de núcleos de células de Schwann, grande quantidade de infiltrado inflamatório, presença de macrófagos e fibroblastos (Figura 1 GL). Não se verificou alterações no perineuro, o qual manteve a organização em camadas concêntricas, contendo fibroblastos, da mesma forma que no epineuro, com suas fibras colágenas em várias orientações, de forma a suportar o estiramento do tecido.

No grupo GLT, foi possível visualizar uma menor quantidade de núcleos celulares e infiltrado no meio extracelular quando comparado ao GL. Ainda, houve a presença de fibras nervosas de maior e menor diâmetro, e reorganização do endoneuro (Figura 1 GLT).

No GDPL, verificou-se a presença de fibras nervosas íntegras, principalmente de maior diâmetro, média quantidade de núcleos celulares, células de Schwann, presença de vasos sanguíneos mais turgidos, além da remodelação do endoneuro (Figura 1 GDPL).

No GDPLT, foi constatada a presença de grande quantidade de fibras nervosas íntegras de menor diâmetro, presença de hiper celularidade quando comparada ao GDPL, aumento de células de Schwann e infiltrado inflamatório, com presença de macrófagos demonstrando que ainda havia inflamação (Figura 1 GDPLT).

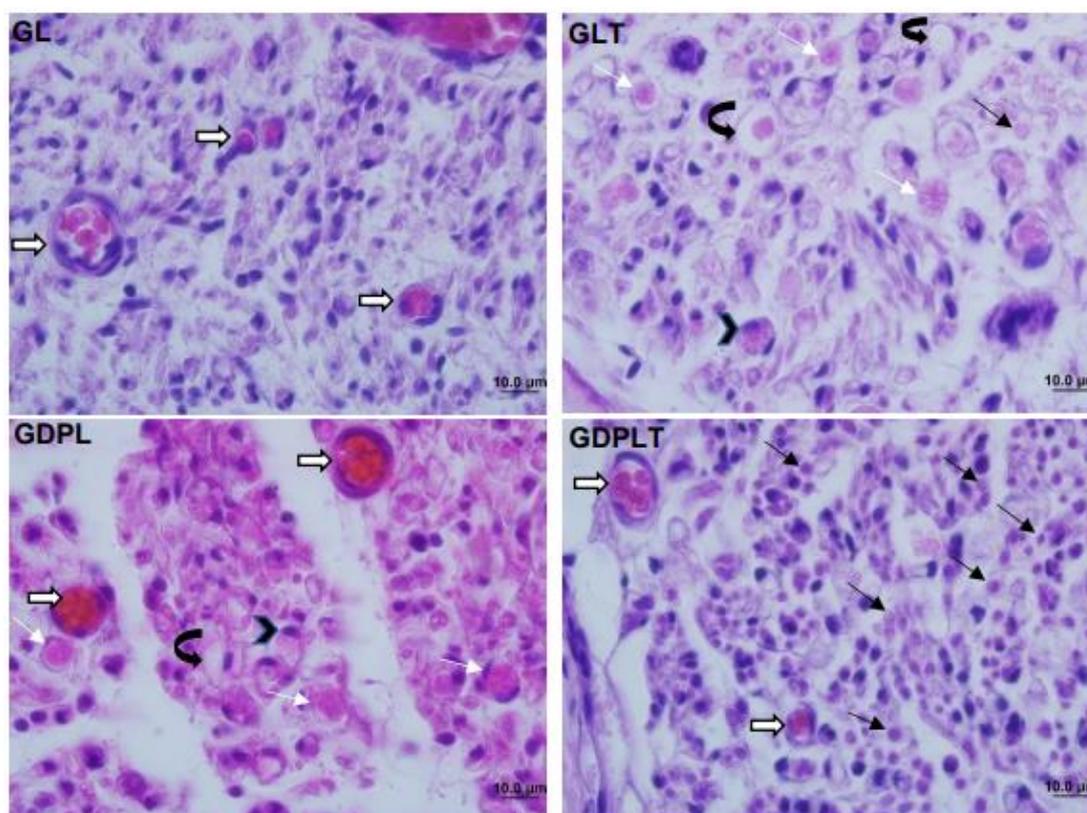


Figura 2 - Fotomicrografias do nervo isquiático de ratos *Wistar* em corte transversal, coloração Hematoxilina e Eosina. Grupo lesão nervosa (GL); Grupo doença periodontal com lesão nervosa (GDPL); Grupo lesão nervosa com tratamento (GLT) e Grupo doença periodontal com lesão nervosa e tratado (GDPLT). Fibras íntegras de maior diâmetro (seta fina branca), fibras íntegras de menor diâmetro (seta fina preta), núcleo de célula de Schwann (ponta de seta), endoneuro (seta curvada), vaso sanguíneo (seta branca).

Análise do sistema antioxidante

Ao avaliar a SOD, foi possível observar que não houve significância estatística na interação dos fatores doença e aplicação laser ($F=0,435$; $p=0,546$), bem como em com relação ao fator isolado doença ($F=2,099$;

$p=0,221$). Contudo, o fator laser foi considerado estatisticamente significativo ($F=14,517$; $p=0,019$), sendo que, nos grupos em que foi aplicado o procedimento, os valores de SOD foram mais elevados ($GLT=16,32\pm 2,57$ mg/mL; $GDPLT=14,53\pm 1,66$) (figura 2A).

Ao avaliar a CAT, foi possível observar que não houve significância estatística na interação dos fatores doença e aplicação laser ($F=3,94$; $p=0,062$), bem como em relação aos fatores isolados ($p>0,05$), indicando que tais variáveis explicativas não promoveram efeito sobre a variação da enzima catalase (figura 2B).

Ao avaliar a GST, foi possível observar que não houve significância estatística na interação dos fatores doença e aplicação laser ($F=0,665$; $p=0,425$), bem como em relação ao fator isolado doença ($F=0,534$; $p=0,474$). Todavia, o fator laser foi considerado estatisticamente significativo ($F=6,321$; $p=0,021$), sendo que nos grupos em que foi aplicado o procedimento os valores de GST foram menores do que os demais ($GLT=5,736\pm 0,801$ mg/mL; $GDPLT=5,983\pm 0,906$) (figura 2C).

Ao avaliar a LPO, foi possível observar que não houve significância estatística na interação dos fatores doença e aplicação laser ($F=0,031$; $p=0,860$), assim como o fator laser também não foi estatisticamente significativo ($F=0,452$; $p=0,506$) (figura 2D). Entretanto, o fator isolado doença foi considerado estatisticamente significativo ($F=7,049$; $p=0,012$), sendo que os grupos com a doença apresentaram médias significativamente maiores ($GDPL=0,019\pm 0,008$; $GDPLT=0,015\pm 0,006$).

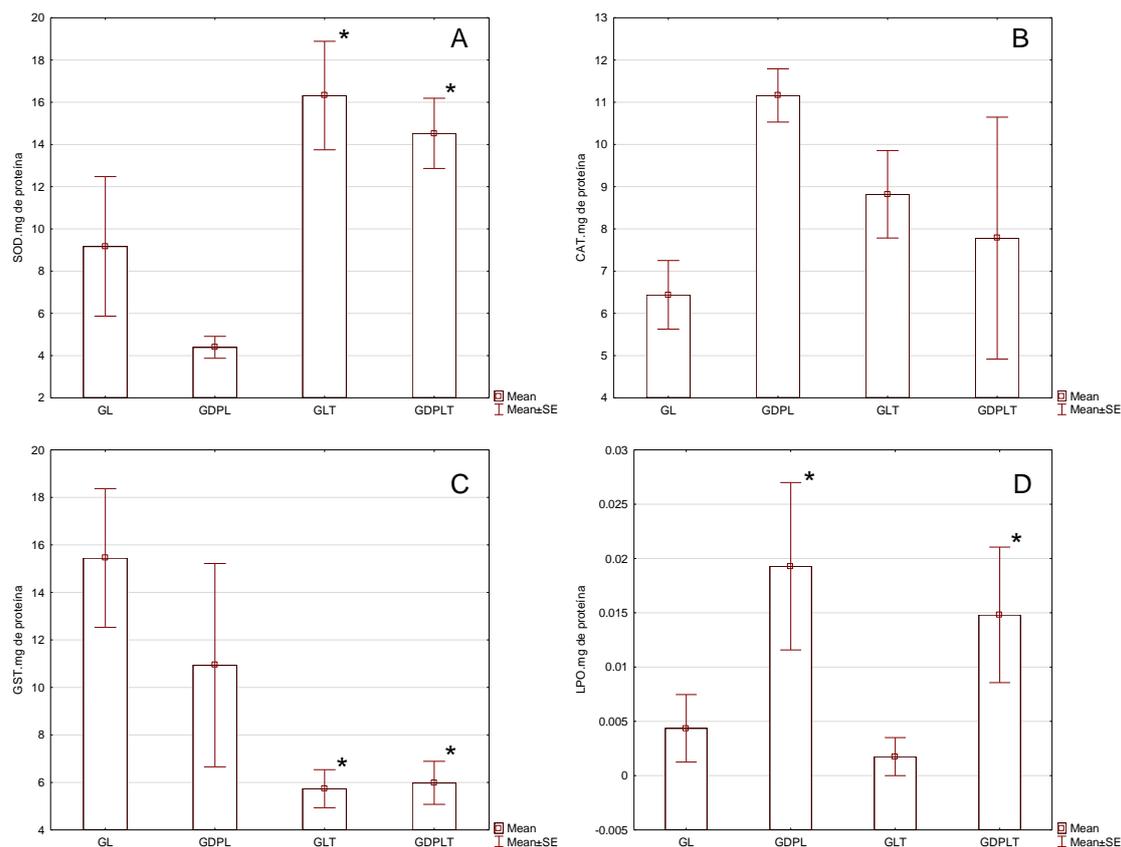


Figura 3 - Atividade de biomarcadores no nervo isquiático de ratos *Wistar*. A) Superóxido dismutase (SOD); B) Catalase (CAT); C) Glutaciona Transferase (GST); D) Lipoperoxidação (LPO). Grupo lesão nervosa (GL); Grupo doença periodontal com lesão nervosa (GDPL); Grupo lesão nervosa com tratamento (GLT) e Grupo doença periodontal com lesão nervosa e tratado (GDPLT). * Diferença estatisticamente significativa

Análises Bioquímicas

Ao avaliar a concentração de proteínas, observou-se que não houve significância estatística na interação dos fatores doença e aplicação laser ($F=0,072$; $p=0,791$), bem como em relação ao fator isolado doença ($F=1,06$; $p=0,313$), mas o fator laser foi considerado estatisticamente significativo ($F=5,73$; $p=0,024$), sendo que nos grupos em que foi aplicado o procedimento os valores de proteína foram mais elevados ($GLT=1,06 \pm 0,02$ mg/mL; $GDPLT=1,04 \pm 0,03$) (figura 3A).

Quanto à colinesterase, não houve diferença significativa na interação dos fatores ($F=0,4$; $p=0,534$), bem como em relação aos fatores isolados ($p>0,05$), indicando que tais variáveis explicativas não promoveram efeito sobre a variação da enzima colinesterase (figura 3B).

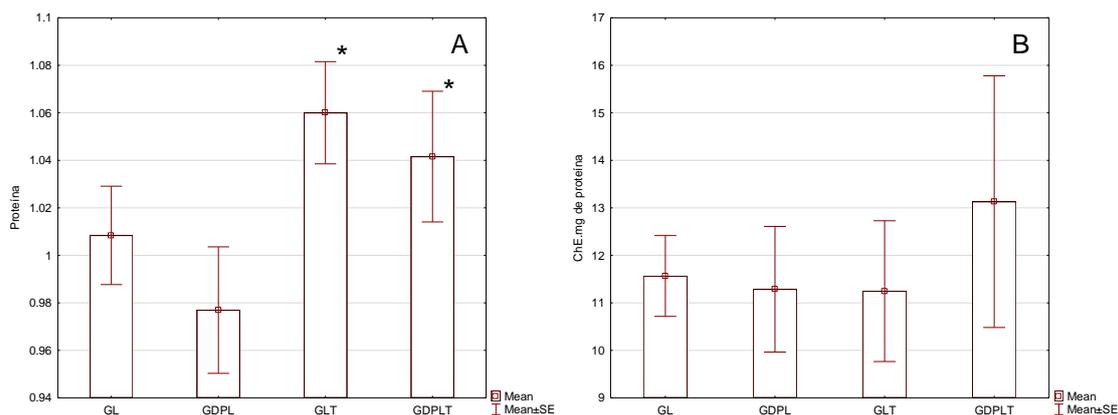


Figura 4 - Atividade de biomarcadores no nervo isquiático de ratos *Wistar*. A) Proteína; B) Colinesterase (CHE). Grupo lesão nervosa (GL); Grupo doença periodontal com lesão nervosa (GDPL); Grupo lesão nervosa com tratamento (GLT) e Grupo doença periodontal com lesão nervosa e tratado (GDPLT). * Diferença estatisticamente significativa

Análise radiográfica

Na análise radiográfica, verificou-se que houve perda de inserção dos tecidos de suporte dos dentes nos animais expostos à doença periodontal experimental ($p < 0.01$), demonstrando a efetividade da indução da doença periodontal sobre o tecido ósseo alveolar (Tabela 2).

Tabela 2 - Média da distância da junção cimento-esmalte até a crista óssea alveolar do lado mesial do primeiro molar inferior esquerdo.

Grupos	Médias
GL	0.85 ± 0.05 A
GDPL	1.11 ± 0.11 B
GLT	0.81 ± 0.04 A
GDPLT	1.11 ± 0.05 B

Grupo lesão nervosa (GL); Grupo doença periodontal com lesão nervosa (GDPL); Grupo lesão nervosa com tratamento (GLT) e Grupo doença periodontal com lesão nervosa e tratado (GDPLT). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa. Os valores representam média ± desvio padrão e estão expressos em pixels.

Discussão

Após a lesão nervosa periférica, raramente o indivíduo apresenta uma recuperação total da funcionalidade. Embora a capacidade de regeneração seja maior que a do sistema nervoso central, em muitos casos, a reinervação motora e sensorial são mal direcionadas ou associadas à dor neuropática debilitante, sendo um problema para o sistema nervoso central interpretar um novo padrão de sinal da periferia, fenômeno que de fato se torna um obstáculo importante à recuperação e ao resultado funcional.²⁷

Neste estudo, não foi possível observar uma melhora funcional por meio da avaliação do IFC 15 dias pós-LNP e tratamento com o laser. Houve diferença apenas entre a AV1 (pré-lesão) com as demais (pós-lesão), sendo que AV2 e AV3 apresentaram um limiar nociceptivo menor, ou seja, não houve melhora nos animais submetidos à LNP e tratados, enquanto a DP parece não ter exercido influência sobre esse parâmetro.

Resultado semelhante foi encontrado no estudo de Karvat et al.²⁸, em que, após a compressão do nervo isquiático, tratamento com LBP de 830 nm 4 J/cm² e mobilização neural, constatou-se que houve diferença significativa entre AV1 (maior limiar nociceptivo) com as demais, concluindo que o protocolo utilizado não foi eficaz em alterar o limiar nociceptivo.

Por sua vez, no estudo de Rosa-Junior et al.¹⁰, que associou LNP, tratou com laser, natação e laser associado à natação, utilizando o LBP 904 nm 40J/cm², 8J/cm² e 120J/cm², concluíram que a associação dos recursos de tratamento favoreceu a recuperação funcional desses animais,¹⁰ ou seja, apenas o laser não foi capaz de apresentar um bom resultado, sendo necessário um tratamento complementar.

Na maioria dos casos, resultados satisfatórios geralmente são limitados ao tipo de lesão, como na neurapraxia e axonotmese, classificadas como lesões relativamente pequenas.²⁹ Assim, lesões do tipo axonotmese têm as condições ideais para novo crescimento axonal, pois a presença do tubo endoneural intacto conduz a um melhor resultado na regeneração nervosa periférica.³⁰ Esse fato foi observado no presente estudo, no GLT e no GDPL, nos quais foi possível observar a presença do arcabouço endoneural formado, dando suporte para o crescimento axonal já presente. Enquanto no

GDPLT, foi possível observar que a regeneração já estava ocorrendo; porém, ainda havia processo inflamatório local, demonstrando que o fator doença periodontal acelera, mesmo que de uma forma pequena, a regeneração nervosa periférica.

Nos resultados obtidos do estudo de Gonçalves et al.³¹, a terapia com aplicação do laser 830 nm, 4 J/cm², por 14 dias, contribuiu para a diminuição do processo inflamatório decorrente da lesão por esmagamento do nervo isquiático²⁸. Isso é corroborado com os achados deste estudo, em que se observa a melhora do processo inflamatório do GLT, sendo que o laser atua como regulador do microambiente e propicia a regeneração nervosa de forma eficiente³². Assim como observado neste estudo, constatou-se a presença de fibras integras; porém, na sua maioria de pequeno diâmetro nos grupos tratados.

Logo após a lesão, as células de Schwann são responsáveis pela degradação e fagocitose da mielina, sendo aumentada com a chegada de macrófagos no local. Essa fase tem um pico de três dias após a lesão, podendo continuar cerca de 14 a 21 dias,⁵ o que pode ter ocorrido no grupo GL, que não foi submetido ao tratamento e apresentou-se ainda com processo inflamatório intenso.

À medida que os axônios se regeneram, as interações das células axônicas-Schwann são renovadas. Isso desencadeia a remielinização e a restauração da função fisiológica da fibra nervosa. Embora a regeneração e a remielinização sejam possíveis no sistema nervoso periférico, os axônios remodelados geralmente têm bainhas de mielina mais finas e diminuição do comprimento internodal, levando a uma condução mais lenta do impulso nervoso,²⁷ fato esse observado no grupo GLT e GDPLT, que apresentam fibras regeneradas, mas ainda com menor diâmetro.

Além disso, o estudo de Svennigsen e Dahlin²⁷ demonstrou que a matriz de metaloproteinases 9 (MMP-9), responsável pela regulação dos níveis, a funcionalidade dos componentes da matriz extracelular e os receptores de sinalização da superfície celular, está envolvida no processo de mielinização, bem como na determinação do comprimento internodal, pois relataram que, nos nervos remielinizados de ratos que não apresentam MMP-

9, as células de Schwann são incapazes de formar internodos longos, implicando esta proteína tanto na geração de desenvolvimento como na geração regenerativa dos nódulos de Ranvier.²⁷ Dessa maneira, a presença de fibras nervosas de maior diâmetro no GDPLT pode estar relacionada ao aumento na liberação de MMP ocasionada pela DP, podendo restaurar a condução adequada nas fibras remielinizadas.

Apesar do aumento da área de células nervosas, não foi possível evidenciar alteração na atividade colinérgica, mensurada neste estudo por meio da avaliação da atividade da enzima colinesterase. Essa enzima tem a função de encerrar a neurotransmissão colinérgica por hidrólise, clivando a acetilcolina em ácido acético e colina. Ela é encontrada principalmente em junções neuromusculares e sinapses colinérgicas, em que sua atividade serve para finalizar a transmissão sináptica, enzima chave da transmissão do impulso nervoso.³³

O tratamento com LBP ocasionou o aumento da concentração de proteínas. Tal resultado corrobora com as informações de Phillipin et al.³⁴, que investigaram os efeitos do LBP sobre o sistema antioxidante e sobre o processo de fibrose em um modelo experimental de lesão do tendão do calcâneo. No estudo citado, os autores mencionaram que o LBP 904 nm, com dose de 5 J / cm², aplicado durante 14 e 21 dias, aumentou significativamente a concentração de proteínas plasmáticas.

A lesão nervosa causa muitas adaptações neuroquímicas, regulando o conjunto de compostos químicos, envolvendo espécies reativas de oxigênio (ERO) neste processo.³⁵ Quando a produção de ERO é maior do que a atividade do sistema antioxidante, caracteriza-se um estado de estresse oxidativo e danos celulares podem ocorrer.³⁶

Com relação à atividade do sistema antioxidante, a resposta inflamatória induzida pela LNP provoca a migração de neutrófilos e macrófagos, que realizam um rápido consumo de oxigênio. Esse mecanismo ativa a NADPH-oxidase, catalisando a transferência de elétrons da NADPH para o oxigênio, formando superóxido,³⁷ o que pode ter ocorrido no GLT e GDPLT que apresentaram maior concentração de SOD. Nesses grupos o processo inflamatório ainda estava presente, como observado na morfologia

geral do tecido nervoso, supondo que o tratamento do LBP, com 30 J/cm², promoveu a formação de ROS, conseqüentemente o resultado foi o aumento da atividade enzimática da SOD. Ainda, no estudo de Silveira et al.³⁷, os resultados demonstraram a diminuição na atividade enzimática da SOD em ratos tratados com LBP por 5 dias com dose de 2 e 4J/cm², durante o processo de cicatrização de feridas induzidas experimentalmente.

Quanto à enzima CAT, que catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio à oxigênio e água,³⁵ sendo subsequente à atividade da enzima SOD do sistema antioxidante, os resultados sugerem que nenhuma intervenção dos fatores do estudo (laser e doença periodontal) afetou essas enzimas nos animais com lesão. Já as GSTs, enzimas do sistema antioxidante que catalisam muitas reações, estando principalmente envolvidas na desintoxicação de compostos endógenos e exógenos eletrofílicos prejudiciais ao organismo, envolvem a conjugação de glutathione com moléculas alvo.³⁸ Esse complexo enzimático apresentou-se reduzido no GLT e no GDPLT, indicando que o tratamento promoveu a inibição dessa etapa do sistema antioxidante, o que pode ter ocorrido devido ao efeito da radiação, 30 J/cm² como neste estudo, afetar outros sistemas corporais, como pH dos fluídos e transporte de cálcio.³⁹

Com relação a LPO, um dos principais marcadores da degradação lipídica teve aumento nos grupos GDPL e GDPLT, sugerindo que a DP promoveu o aumento dessa reação, o que pode ter ocorrido devido ao processo inflamatório local e sistêmico. Bastos et al.⁴⁰ correlacionaram os níveis de LPO com o estado periodontal e as citocinas inflamatórias em pacientes diabéticos e não diabéticos, verificando uma associação importante dessa reação com a gravidade da resposta inflamatória às bactérias da DP, indicando uma relação direta entre níveis de LPO e a gravidade da inflamação e secreção de citocinas inflamatórias. Por sua vez, no estudo de Silveira et al.³⁷, foi observado que o laser de baixa potência irradiado por cinco dias, tanto de 2 J/cm² como o de 4 J/cm², promoveram redução da reação de lipoperoxidação, aparentemente este tratamento para a DP não foi eficaz para minimizar o dano lipídico.

Apesar dos resultados serem de ampla relevância, fica evidente a necessidade de mais estudos investigativos, visto que na literatura não foram encontrados estudos relatando a associação da LNP com a DP, assim como o efeito do laser sobre elas, sendo necessária uma padronização na aplicação do laser de baixa potência em relação ao tempo, à dose e ao número de sessões, contribuindo, assim, com o aprimoramento no tratamento terapêutico na regeneração nervosa periférica.

Conclusão

Diante do exposto, é possível concluir que o laser de baixa potência com comprimento de onda de 830nm e fluência de 30J/cm² auxiliou na regeneração das fibras nervosas, apesar da inflamação no local ainda estar presente. Além disso, o tratamento foi eficaz em proteger as células contra danos oxidativos devido ao aumento da SOD e aumento de proteínas; no entanto, a diminuição de GST demonstra a inibição desta etapa do sistema antioxidante.

Conflitos de interesse

Os autores declaram que não têm conflito de interesses.

Considerações Éticas

Não aplicável.

Reconhecimentos

Ao programa de pós-graduação em Biociências e Saúde e à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, pela oportunidade do desenvolvimento deste estudo. A Capes, pela concessão da bolsa de estudos e a Fundação Araucária pelo aporte financeiro.

Referências

1. Ide M, Harris M, Stevens A, Sussams R, Hopkins V, Culliford D, Fuller J, Ibbett P, Raybould R, Thomas R, Puenter U, Teeling J, Perry HV, Holmes C. Periodontitis and Cognitive Decline in Alzheimer's Disease. *Plos One*. 2016; 11 (3): 1-9.
2. Mootha A, Malaiappan S, Javakumar ND, Varghese SS, Thomas JT. The effect of periodontitis on expression of interleukin-21: a systematic review. *International Journal of Inflammation*. 2016; 16 (1): 1-8.
3. Vieyra RC, Rosales C, Querol EU. Neutrophil functions in periodontal homeostasis. *Journal of Immunology Research*. 2016; 16 (1): 1-9.
4. Karvat J, Kakihata CMM, Vieira L, Antunes JS, Ribeiro LFC, Bertolini GRF. Evaluation of nociception and edema in experimental sciatic nerve compression model in Wistar rats treated with cryotherapy. *Revista Dor*. 2016; 17 (3): 210-214.
5. Bombeiro AL, Santini JC, Thomé R, Ferreira ERL, Nunes SLO, Moreira BM, Bonet IJM, Sartori CR, Verinaud L, Oliveira ALR. Enhanced immune response in immunodeficient mice improves peripheral nerve regeneration following axotomy. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2016; 10 (1): 1-14.
6. Sta M, Cappaertlm, Ramekers D, Baasf, Wadmanwj. The functional and morphological characteristics of sciatic nerve degeneration and regeneration after crush injury in rats. *Journal of Neuroscience Methods*. 2014; 222 (1): 189-198.
7. Guedes RP, Dal Bosco L, Teixeira CM, Araújo ASR, Llesuy S, Klein AB, Ribeiro MFM, Partata WA. Neuropathic Pain Modifies Antioxidant Activity in Rat Spinal Cord. *Neurochemical Research*. 2006; 31(1): 603-609.
8. Antunes JS, Karvat J, Aragão FA, Bertolini GRF. Laser de baixa potência, no espectro de luz vermelha, em lesão nervosa periférica. *Revista Pesquisa em Fisioterapia*. 2015; 5 (1): 43-48.
9. Souza MV, Silva MO. Laserterapia em afecções locomotoras: revisão sistemática de estudos experimentais. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*. 2016; 22 (1): 76-82.
10. Rosa-Junior GMR, Magalhães RMG, Rosa VC, Bueno CRS, Simionato LH, Bortoluci CH. Efeito da associação da laserterapia com a natação no reparo morfológico do nervo isquiático e na recuperação funcional de ratos submetidos à axonotmese. *Pesquisa em Fisioterapia*. 2016; 23 (1): 12-20.
11. Nassar PO, Nassar CA, Guimarães MR, Aquino SG, Andia DC, Muscara MN, Spolidorio DM, Rossa CJR, Spolidorio LC. Simvastatin therapy in

cyclosporine A-induced alveolar bone loss in rats. *Journal of Periodontal Research*. 2009; 44 (4): 479-488.

12. Bridge PM, Ball DJ, Mackinnon SE, Nakao Y, Brandt K, Hunter DA. Nerve crush injuries – A model for axonotmesis. *Experimental neurology*. 1994; 127 (2): 284-290.

13. Andreo L, Soldera CB, Ribeiro BG, Matos PRV, Bussadori SK, Fernandes KPS, Mesquita-Ferrari RA. Effects of photobiomodulation on experimental models of peripheral nerve injury. *Lasers in Medical Science*. 2017; 32 (9): 2155-2165.

14. Monte-Raso VV, Fonseca MCR, Mazzer N, Barbieri G, Rosa RC, Zamarioli A, Barbieri CH. Treadmill with controlled speed for recording gait. *Acta Ortopédica Brasileira*. 2010; 18 (1): 49-53.

15. Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 1989; 83 (1): 129-138.

16. Junqueira LC, Junqueira LMMS. *Técnicas Básicas de Citologia e Histologia*, São Paulo: Guanabara Koogan, 1983.

17. Bradford MM. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram 15 Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochemistry*, 1976; 72 (1): 248–254.

18. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. 1961; 7 (2): 88-90.

19. Silva De Assis, H.C. Der einsatz von biomarkern zur summarischen erfassung vom Gewässerverschmutzungen. (Ph.D. thesis). University of Berlin, Berlin, 1998.

20. Crouch RK, Gandy SE, Kimsey G, Galbraith RA, Galbraith GMP, BUSE MG. The Inhibition of Islet Superoxide Dismutase by Diabetogenic Drugs. *Diabetes*. 1981; 30 (3): 235–241.

21. Aebi H. Catalase in Vitro. *Methods Enzymol*. 1984; 105 (1):121–126.,

22. Habig H, Pabst J, Jakoby B. Glutathione AA from Rat Liver. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1976; 175: 710-716.

23. Lushchakov, Kubrak OI, Storey J M, Storey KB, Lushchak VI. Low 2 toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. *Chemosphere*. 2009; 76 (7): 932–937.

24. Buege JA, Aust SD. Microsomal Lipid Peroxidation. *Methods in Enzymology*. 1978; 52 (1): 302–310.
25. Nassar CA, Nassar PO, Inagaki NS, Girelli-Junior C. Efeito de antiinflamatório no desenvolvimento da doença periodontal induzida. Avaliação radiográfica em ratos. *Revista de Odontologia*. 2003; 32 (2): 125-130.
26. Field, A. Descobrimo a estatística usando o SPSS. Porto Alegre: 2009.
27. Svehlens AF, Dahlin LB. Repair of the peripheral nerve – remyelination that Works. *Brain sciences*. 2013; 3(1): 1182-1197.
28. Karvat J, Antunes JS, Bernardino GR, Kakihata CMM, Bertolini GRF. Effect of low-level LASER and neural mobilization on nociceptive threshold in experimental sciatica. *Revista Dor*. 2014; 15 (3): 207-210.
29. Houschyar KS, Momeni A, Pyles MN, Cha JY, Maan N, Duscher D, Jew OS, Siemers F, Schoonhoven JV. The Role of current techniques and concepts in peripheral nerve repair. *Plastic Surgery International*. 2016; 16(1): 1-8.
30. Menorca RMG, Fussel TS, Elfar, JC. Peripheral nerve trauma: mechanisms of injury and recovery. *Hand Clinics*. 2013; 29(3): 317–330.
31. Gonçalves RB, Marques JC, Monte-Raso VV, Zamarioli A, Carvalho LC, Fazan VPS, Tavares MR. Efeitos da aplicação do laser de baixa potência na regeneração do nervo isquiático de ratos. *Fisioterapia e Pesquisa*. 2010; 17(1): 34-39.
32. Stratton JA, Shah PT. Macrophage polarization in nerve injury: do Schwann cells play a role?. *Neural Regeneration Research*. 2016; 11 (1): 53-57.
33. Gupta VK, Kumar A, Siddiqi NJ, Sharma B. Rat brain acetyl cholinesterase as a biomarker of cadmium induced neurotoxicity. *Journal of Toxicology*. 2016; 1 (1): 001-007.
34. Fillipin LI, Mauriz JL, vedovelli k, Moreira AJ, Zettler CG, Lech O, Marroni N P, Gallego JG. low-level laser therapy (lllt) prevents oxidative Stress and Reduces Fibrosis in Rat Traumatized Achilles Tendon. *Lasers in surgery and medicine*. 2005; 37 (1):293–300.
35. Guedes RP, Dal Bosco L, Araújo ASR, Klein AB, Ribeiro MFM, Partata WA. Sciatic nerve transection increases glutathione antioxidant system

activity and neuronal nitric oxide synthase expression in the spinal cord. *Brain Research Bulletin* 2009; 80:422–427.

36. Guaraldo AS, Serra AJ, Amadio EM, Antônio EL, Silva F, Portes LA, Tucci PJF, Leal-Junior ECP, Carvalho PTC. The effect of low-level laser therapy on oxidative stress and functional fitness in aged rats subjected to swimming: an aerobic exercise. *Lasers Med Sci.* 2016; 31 (5):833-840.

37. Silveira PCL, Silva LA, Tuon T, Freitas TP, Streck EL, Pinho RA. Effects of low-level laser therapy on epidermal oxidative response induced by wound healing. *Revista Brasileira de Fisioterapia.* 2009; 13(4):281-287.

38. Ashor AW, Siervo M, Mathers J C. Vitamin C, Antioxidant Status, and Cardiovascular Aging. In: Malavolta M, Eugenio Mocchegiani E. (Eds) *Molecular Basis of Nutrition and Aging.* Elsevier; 2016. 609-619.

39. Bavrina AP, Monich VA, Malinovskaya SL. Photomodification of Glutathione S-Transferase Activity by Low-Intensity Light against Various Stress Factors. *Biofizika.* 2017; 62(5): 862-865.

40. Bastos AS, Graves DT, Loureiro APM, Rosa-Junior C, Abdalla DSP, Faulin TES, Câmara NO, Andriankaja OM, Orrico SRP. Lipid Peroxidation Is Associated with the Severity of Periodontal Disease and Local Inflammatory Markers in Patients with Type 2 Diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2012; 97 (8): E1353–E1362.

ANEXO 1



Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA

PARECER DE PROTOCOLO

O protocolo intitulado “Avaliar a reparação da lesão nervosa periférica em ratos com doença periodontal induzida, tratados com laser de baixa potência”, sob vossa coordenação, foi avaliado pelo CEUA como **APROVADO** para execução.

ATENÇÃO!

O Certificado Experimental deste Protocolo, somente será emitido após o encerramento das atividades previstas e após o encaminhamento do Relatório Final ao CEUA. Este Parecer **NÃO** tem valor como Certificado Experimental.

Impresso na UNIOESTE - Luciana Fariña

Cascavel, 24/08/2016

Profa. Dra. Luciana Oliveira de Fariña
Coordenadora do CEUA
Portaria nº 2729/2014 - GRE

ANEXO 2 – NORMAS REVISTA 01

EUROPEAN JOURNAL OF NEUROSCIENCE (Artigo 01)

1. General

EJN is an international general neuroscience journal that publishes original research articles and reviews in the broad fields of developmental, molecular, cellular, systems, behavioural, computational and cognitive neurosciences. Our aim is to advance the understanding of the organization and function of the nervous system in health and disease, thereby improving the diagnosis and treatment of neurological and neuropsychiatric disorders. Manuscripts submitted to EJN should describe novel results generated by experiments that were guided by clearly defined aims or hypotheses and should not have been published or submitted for publication elsewhere. Please note that EJN does not publish case reports.

EJN is a hybrid journal, so authors can opt to publish their accepted manuscripts as open access papers (please see OnlineOpen).

[Back to Top](#)

2. Types of Manuscripts

Research Reports The major part of each Issue of EJN is devoted to *Research Reports*. These must describe significant and original scientific data from experimental or theoretical neuroscience studies and provide sufficiently detailed information in the Materials and method section for the observations to be critically evaluated and, if necessary, repeated.

Short Communications *Short Communications* should report a significant advance in the field and should represent a 'complete' study rather than preliminary observations. They should contain a maximum of 3500 words, up to 4 Figures and 2 Tables and should be organized as described for *Research Reports*. The total word count must be indicated on the title page. We strongly discourage the use of supplementary material. Manuscripts not conforming to these guidelines may be returned to the authors or re-classified as a standard *Research Report*.

Reviews *Reviews* in EJN are full-length articles on topics of particular current interest. Extensive overviews of the literature are discouraged. Rather, review articles should aim to critically evaluate a timely issue of interest for the broad readership of EJN. While their length is not limited, the writing should be concise and precise. Illustrations, which effectively convey key topics of the review, are encouraged. Proposals for *Reviews* are welcomed by the Editors-in-Chief and the Section Editors. **Technical Spotlights** *Technical Spotlights* are brief reviews (total ~ 5000 Words) that evaluate and discuss novel techniques as well as controversial research approaches, or issues of validity concerning a major methodology or research avenue. Proposals for *Technical Spotlights* are welcomed by the Editors-in-Chief and the Section Editors.

Registered Reports *Registered Reports* represent a new format of research article in which manuscripts containing a study proposal are reviewed for publication consideration prior to data collection. Thus, *Registered Reports* are evaluated based solely on the intrinsic merit of the research proposal rather than the statistical significance of the eventual results.

The peer review process for *Registered Reports* happens in two stages. Initial Stage 1 submissions include the complete Introduction, Method, and Proposed Analyses. Stage 1 submissions are evaluated based on: 1) the significance of the research question(s) and potential contribution of findings to knowledge; 2) the logic, rationale and plausibility of the proposed hypotheses; 3) the rigor of the proposed methodology and statistical analysis; and 4) the extent to which the methodology is sufficiently clear such that an independent investigator could replicate the procedures and analysis. If the Stage 1 submission is accepted in principle, authors are guaranteed publication of their final manuscript predicated upon them carrying out the research protocol exactly as proposed and drawing appropriate conclusions about the findings. Upon completion of their study, authors submit the final manuscript as a Stage 2 submission to ensure those conditions were met.

Manuscripts submitted to EJN:

- Must not have been published before (in any language). Anything published, other than an abstract of less than 500 words, is considered as prior publication. If it is necessary to include the authors' own previously published material, it should be referenced in the usual way and appropriate permission must be obtained from the copyright holder. This policy applies to text, figures and parts of figures.
- Must not be under consideration for publication elsewhere.
- Should have been approved by all authors and the institutions where the work was carried out.
- If accepted, will not be published elsewhere in the same form or slightly modified form, in any language, without the consent of Wiley.
- Must not merely consist of expanded versions of work published elsewhere.
- Must be accompanied by (as supplementary document files) copies of any material the authors have published in the last two years (or which is in the process of publication) that overlaps with the content of the submitted manuscript.

3. Editorial Policies

All studies and articles submitted for publication in EJN should abide by the highest of ethical standards relating to the conduct of scientific research, the publishing of scientific data, the use of human subjects and the use of experimental animals. All studies should abide by the ethical standards as described in the Society for Neuroscience guidelines on Responsible Conduct Regarding Scientific Communication.

As per the recommendation of ICMJE, authorship at EJN is based on the following four criteria: "i) Substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data for the work; ii) Drafting the work or revising it critically for important intellectual content; iii) Final approval of the version to be published and iv) Agreement to be accountable for all aspects of the work. All those designated as authors should meet all 4 criteria. Those who do not meet all four criteria should be acknowledged. It is the collective responsibility of the authors to determine that all people named as authors meet all four criteria. In the event of authorship disputes, it is the responsibility of the institution(s) where the work was performed to investigate.

Any changes to the order of the authors, or the removal or addition of authors, needs to be approved in writing by all authors.

EJN follows the Code of Conduct of the Committee on Publication Ethics (COPE) and handles cases of research and publication misconduct accordingly (<http://publicationethics.org/about>).

Whenever an author uses previously published words or images (in text, tables or figures), the author must cite the original work (even if it is their own). If the author wishes to use previously published text word for word, this text should be in quotations and limited to a couple of sentences; the source should also be referenced in the bibliography. EJN uses the CrossCheck plagiarism detection software to check all submitted manuscripts for all forms of plagiarism, including self-plagiarism.

Manuscripts submitted to EJN:

Must not have been published before (in any language). Anything published, other than an abstract of less than 500 words, is considered as prior publication. If it is necessary to include the authors' own previously published material, it should be referenced in the usual way and appropriate permission must be obtained from the copyright holder. This policy applies to text, figures and parts of figures.

Must not be under consideration for publication elsewhere.

Should have been approved by all authors and the institutions where the work was carried out.

If accepted, will not be published elsewhere in the same form or slightly modified form, in any language, without the consent of Wiley.

Must not merely consist of expanded versions of work published elsewhere.

Must be accompanied by (as supplementary document files) copies of any material the authors have published in the last two years (or which is in the process of publication) that overlaps with the content of the submitted manuscript.

ORCID iDs

EJN now requires the submitting author (only) to provide an ORCID iD when submitting their manuscript. For each journal account, authors will only need to provide an ORCID iD during submission once. For future submissions, their ORCID iD will appear as part of their author details. Once registered with ORCID, researchers will be able to manage the privacy settings of their individual ORCID Record data, ensuring them complete control over how their information is used, in line with ORCID's Privacy Policy.

4. Preparing Manuscripts for Submission

4.1 'Your Paper Your Way' 4.2 Text Formatting and English 4.3 Layout and File Requirements 4.3.1 *Original Submissions* 4.3.2 *Revisions and Resubmissions* 4.3.3 *NPRC submissions* 4.3.4 *Wiley transferable peer review*

4.1 'Your Paper Your Way' If you have had a paper rejected by another journal you may submit it to EJN without re-formatting to EJN guidelines. When submitting, please make this clear in the cover letter. Re-formatting to EJN guidelines will only be required following the initial round of peer review. Please

ensure there is sufficient detail in the Materials and Methods to enable reviewers to assess the work.

4.2 Text Formatting and English The text of your manuscript should be prepared throughout in a standard font (Times/Times New Roman for text, and Helvetica/Arial and Symbol for figures) no smaller than 12 points. The manuscript should be formatted in double spacing and the lines should not be numbered. Headings and sub-headings should not end with a period ".". We recommend that manuscripts are proof-read by a native English-speaking scientist. A list of Wiley Editing Services can be found at <http://wileyeditingservices.com>. These services are arranged and paid for by the author, and their use does not guarantee acceptance or preference for publication.

4.3 Layout and File Requirements When uploading your files, please use

simple filenames which do not include spaces or special characters (do not use underscores). The submission files should not exceed 250MB in total. If you have trouble loading large files, please contact the editorial office at editorial.office@ejneurosci.org for assistance. For manuscripts that contain complex equations or other mathematical content, it is possible to submit LaTeX files. If you do, please also upload the PostScript or PDF version of your compiled file.

5. Detailed Manuscript Preparation Guidelines

Manuscripts should be prepared according to the guidelines below and submitted online at <http://mc.manuscriptcentral.com/ejn>

5.1. Title Page 5.2 Abstract 5.3 Introduction 5.4. Materials and Methods 5.4.1 *Ethical standards i.) Studies Involving human subjects ii.) Experimental animals* 5.4.2 *Suppliers* 5.4.3 *Reagents* 5.4.4 *Microscopy* 5.4.5. *Gels and blots* 5.4.6. *Handling of image data* 5.4.7. *Statistical methods* 5.5. Results and Statistical Analyses 5.6 Discussion 5.7 Acknowledgements 5.8 Competing Interests 5.9 Author Contributions 5.10 Data Accessibility 5.10.1 *Data and materials policy* 5.10.2 *Data citation policy* 5.11 Abbreviations 5.12 References 5.12.1. *Reference list* 5.13 Tables

5.14 Figure Captions

5.15 Figures

5.15.1 Colour figures

5.15.2 Permissions

5.16 Graphical Abstracts

5.17 Supporting Information

5.1 Title Page

The Title page must include:

- The proposed Journal section
- A clear and concise title, avoiding the use of abbreviations
- The authors' first name(s) and surnames Note: Authors who normally write their names in non-Latin characters may include both a transliterated version of their names, followed in parenthesis by their names in their native writing system. Any

non-Latin languages that can be represented in Unicode characters will be accepted.

- The address(es) from which the work originated
- The name, institutional affiliation, address, fax number and e-mail address of the person who will deal with correspondence, including proofs (which are sent electronically)
- A running title not in excess of 50 characters (including spaces)
- The total number of pages, figures, tables and equations
- The total number of words in: (i) the whole manuscript; (ii) the Abstract
- A list of four or five keywords not appearing in the title, preceded by "Keywords" In cases where animals are used, if the species used does not appear in the title, it should be included in the keywords and be mentioned in the first few lines of the abstract.

5.2 Abstract

The Abstract should be written in complete sentences without headings and should provide a summary not exceeding 250 words, in a form comprehensible to any neuroscientist and suitable for publication without the full article text. The aim of the study and working hypothesis should be stated. If appropriate, the species of animal used should be indicated if it is not given in the title. The Abstract should provide a concluding statement highlighting the significance and impact of the results for the neurosciences. The use of references, as well as abbreviations and statistical results, should be avoided in the Abstract.

5.3 Introduction

The main part of a *Research Report* or *Short Communication* should start with a brief introduction, which outlines the historical or logical origins of the study and clearly states the aim of the study and/or hypothesis to be tested, without repeating the Abstract or summarising the results.

5.4 Materials and Methods

The Materials and Methods section should provide a sufficiently detailed description of the methods to allow another researcher to repeat your work. Important methodological aspects of your work, such as generation of mutant animals or the method of sample preparation, should be described, even if such descriptions can also be found in prior publications.

5.4.1 Ethical standards: Studies using human or animal subjects should include an explicit statement identifying the Institution or Review Committee which approved the study, and preferably providing the permit number given. Editors reserve the right to reject papers if there is doubt whether appropriate procedures were followed. *(i) Studies involving human subjects* When human subjects are used, manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject, and that the study conforms with World Medical Association Declaration of Helsinki published on the website of the Journal of American Medical Association. In addition, the name of the institutional review board (or appropriate review

committee) that approved the study should be given and their approval should be explicitly stated. (ii) *Studies involving experimental animals* When experimental animals are used, specify the species, strain, sex, age, supplier, and numbers of animals used in total and for individual experimental conditions. The species should be identified in the Title or Abstract. If genetically modified mice were used, the *Standards for the publication of mouse mutant studies* (see Crusio *et al.*, *Genes, Brain and Behavior* (2009) 8:1–4) should be followed. Please provide detailed and full strain and sub-strain information and use the correct nomenclature.

The Materials and Methods section must briefly but explicitly state measures which were taken to minimize pain or discomfort, e.g. type and dose of anesthetic used and peri-operative care, and how the number of animals used was minimized. Experiments should be carried out in accordance with the Council Directive 2010/63EU of the European Parliament and the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes or with the Guidelines laid down by the NIH in the US regarding the care and use of animals for experimental procedures. In addition, the name of the Animal Use and Care Committee or Institution that approved the study should also be given and their approval should be explicitly stated. Work using animals that does not conform to these standards would not be repeatable in Europe or the USA and so falls outside of the scope of the journal.

EJN is a signatory of the Animal Research: Reporting In Vivo Experiments (ARRIVE) guidelines, supported by the NC3Rs (<http://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.1000412>). A convenient checklist can be obtained here. We strongly recommend that authors adhere to these guidelines and use the checklist (which should be uploaded as a supplementary file). **5.4.2 Suppliers** Suppliers of materials should be named and, with the exception of well-known suppliers, such as Sigma, Kodak and Zeiss, their location (city, state, country) included. **5.4.3 Reagents** The origin and specificity of reagents, notably antibodies, oligonucleotides, cDNA constructs, need to be documented, including the nucleic acid sequence or peptide sequence used. Nucleic acid probes should be fully sequenced when applicable. Control experiments that were conducted to ensure the specificity of the method (immunohistochemistry, immunoprecipitation, western blotting, *in situ* hybridization) should be described, along with key references to previous work with this reagent. For antibodies, this documentation must include a precise description of the antigen, the nature of the antibody (species, purification), the supplier, catalogue number, and specificity tests performed (e.g., western blot, immunoprecipitation, validation with knockout tissue, etc). For reports involving immunohistochemical methods, please consult the criteria and recommendations discussed in Fritschy JM (2008) *EJN* 28:2365-2370.

5.4.4 Microscopy Information necessary to evaluate the resolution of images from microscopy (type of microscope, numerical aperture of the lens) must be provided. Microscopic images must include calibration bars (statements about original magnification are insufficient, as final published images can be any size). For confocal laser scanning microscopy, the voxel size and the number of confocal planes included in an image must be indicated. For quantification of digital parameters (signal intensity, size or number of objects), detailed information about the procedure, notably criteria for threshold determination,

normalization, and calibration (if applicable) should be provided. The counting of cells etc. should be performed by unbiased stereological methods.

5.4.5 Gels and blots Gels and blots should be presented with molecular weights noted. Cropping of images for the purposes of clarity and conciseness is acceptable, but at least several band-widths should be kept above and below the cropped band and all important bands must be shown. Merging images from different experiments is not acceptable. If splicing of data from a single experiment is necessary to reorder the samples, this should be clearly indicated on the figure and in the figure caption. The method of normalization of results must be explicitly stated in the figure captions.

5.4.6 Handling of image data EJM follows the guidelines set by the Rockefeller University Press and endorsed by the Council of Science Editors (<http://www.councilscienceeditors.org/i4a/pages/index.cfm?pageid=3363>):

- No specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced.
- Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if they are applied to the whole image and as long as they do not obscure, eliminate, or misrepresent any information present in the original. Every pixel should be treated in exactly the same way.

The grouping of images from different parts of the same gel, or from different gels, fields, or exposures must be made explicit by the arrangement of the figure (e.g., using dividing lines) and in the text of the figure caption.

- If the original data cannot be produced by an author when asked to provide it, the acceptance of the manuscript may be revoked.

5.4.7 Statistical methods A complete description of statistical methods is required. The recommendations described in the EJM Editorial on Reporting Statistical Methods and Results (*EJM 2008, 28, 2363-2364*) are a component of these Author Guidelines and should be followed in detail.

5.5 Results and Statistical Analyses The observations should be presented with minimal reference to earlier literature or to possible interpretations. The main statistical results should be reported in the Results section. The description of the statistical results should include the proper statistical term (such as the F statistic) as well as the degrees of freedom and the precise value of P. The description of statistical results in the figure captions should be limited to important post hoc comparisons. The recommendations described in the EJM Editorial on Reporting Statistical Methods and Results should be followed in detail. These recommendations are summarized in a convenient checklist that can be downloaded [here](#).

5.6 Discussion The Discussion should begin by summarizing the major findings, while avoiding repetition of statements provided in the Abstract or the Results section. For clarity, the use of subheadings is recommended.

5.7 Acknowledgements A short statement about grant and other financial support should be given, along with a list of contributions from collaborators who are not co-authors (it is implicit that they agree with this mention). All sources of funding should be declared in the Acknowledgements. If a private/commercial sponsor supported the research, authors are advised to describe the role of the

study sponsor (s), if any, in study design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication. If the funding source had no such involvement, this should be stated.

5.8 Competing Interests EJN requires that all authors disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise, which might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. The existence of a conflict of interest does not preclude publication in this journal. The absence of conflicts of interest should also be stated. It is the responsibility of the corresponding author to ensure this policy is adhered to.

5.9 Author Contributions The contribution of each author should be listed.

5.10. Data Accessibility All manuscripts which report primary data should include a Data Accessibility section which states where the article's supporting data and materials can be accessed. If Authors choose not to archive their data and materials, they must explicitly state this in the Data Accessibility section and explain why the information will not be made publicly available.

5.10.1 Data and materials policy EJN expects that data supporting the results in the paper will be archived in an appropriate public repository. As a minimum, sufficient data should be deposited so that the results of your article are fully reproducible. Whenever possible the statistical tools, protocols, software etc. Used to generate the analyses presented in the paper should also be publicly archived (and the accession codes provided in the Methods section of the manuscripts). The journal also expects authors to supply any supporting materials such as stimuli, computer code, or simulations necessary to allow readers to reproduce the methodology in the published article, unless this is precluded by copyright. This may be in any form (s) the authors feel is most accessible for use, including programming code, SAS commands, R functions and packages, etc.

Wiley have partnered with Figshare in order to facilitate the data archiving process. Submitting authors may upload their data and code as "Data Files" in the online submission system. These files will then be made available for peer review. Upon acceptance of an article, the Data File(s) will be deposited to Figshare on the Author's behalf with a CC-Zero license (no rights reserved) applied by default. The data will be assigned a single DOI and will be automatically and permanently associated with the HTML version of the manuscript.

5.10.2 Data citation policy

When citing or making claims based on data, please refer to the data in the text and provide a formal citation in the reference list. We recommend the format proposed by the Joint Declaration of Data Citation Principles: span> Authors; Year; Dataset title; Data repository or archive; Version (if any); Persistent identifier (e.g. DOI). p>

5.11 Abbreviations Abbreviations should be kept to a minimum as they save relatively little space but often diminish the readability of a manuscript. In general, abbreviations should not appear in the Title or Abstract. The word/phrase to be abbreviated must be written out in full when first used, followed by the abbreviation in parentheses. A list of all abbreviations used in the text and their meanings must be provided (in alphabetical order).

5.12 References Citations in the text should be given in parenthesis, e.g. (Blanc & White, 1985; Weiss *et al.*, 1986), except when the author's name is part of a sentence, e.g. "White (1985) reported that ...". Where there are two authors, both should be named, but with three or more, only the first author's name plus 'et al' should be given. Note that when more than one paper refers to the same first author in the same year, a, b, c suffixes must be used in the text and reference list, written as (Weiss *et al.*, 1986a; White, 1986c). **5.12.1 Reference list** The use of a tool such as EndNote, Reference Manager, or Bookends is recommended for reference management and formatting. EndNote reference styles can be searched for at <http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>, and Reference Manager reference styles can be searched for at <http://www.refman.com/support/rmstyles.asp>. Note that some reference managing software includes unnecessary details about the journal, so please proof-read the list. The reference list should be in alphabetical order according to the name of the first author, and then chronologically where several papers by the same author are cited. All authors should be included in each reference listed; these should not be abbreviated to et al. Only published and 'In Press' (i.e. accepted for publication in a specific journal or book), material should be included in the reference list. No numbering or tabs should be included before each list entry. Please consult recent EJM articles to ensure that you have formatted the list correctly.

(i) *Journal Articles* The titles of journals should be abbreviated in accordance with the *World List of Scientific Periodicals*, 4th edition. Single-word titles, e.g. *Psychoneuroendocrinology*, should not be abbreviated. They should be formatted as follows: Lancaster, B. & Boxall, A. R. (1998) Tyrosine kinases and synaptic transmission. *Eur. J. Neurosci.*, **10**, 2-7. (Note the *emboldening of the Volume number.*)

(ii) *Books and Symposia* Books should be listed as follows: Katz, D.I. (1997) Traumatic brain injury. In Mills, V.M., Cassidy, J.W. & Katz, D.I. (eds), *Neurologic Rehabilitation. A Guide to Diagnosis, Prognosis and Treatment Planning*. Blackwell Science, Oxford, pp. 105-143. Symposia contributions should take a similar format to books, including the place and date of the meeting, the name and location of the organiser/publisher, both overall and contribution titles, all authors and Editors names, and page number(s). For example: Fuss, S.H., Çelik, A. & Korsching, S.I. (2001) Levels of olfactory information processing in the zebrafish olfactory bulb. In Elsner, N. & Kreuzberg, G.W. (eds), *Göttingen Neurobiology Report 2001. Proceedings of the 4th Meeting of the German Neuroscience Society 2001*, Vol. II, 28th Göttingen Neurobiology Conference. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, p. 474.

5.13 Tables Tables must be supplied as editable text and not as embedded figures/objects (except for original submissions, where it is possible to submit a single PDF file). Tables should be numbered, have a bold title and appear in the text following the references. Each column should have a heading.

5.14 Figure Captions Figure captions should be listed as part of the main manuscript text file, at the end of the document. They should explain each figure as fully as possible. The reader should rarely be referred to the text, except where it is necessary in order to avoid repetition. Where a figure contains 5 abbreviations or fewer, they should all be explained in the caption. For figures with larger numbers of abbreviations, the authors should include these in the abbreviations list (see abbreviation section). Scale bars are required for all

photographs. The main statistical findings should be described in the Result section, but the captions may describe the results of important post-hoc comparisons (usually also symbolized in graphs depicting data).

5.15 Figures All figures should be uploaded separately and must be labelled with a figure number (except for initial submissions, where it is possible to submit a single PDF file). Before uploading figure files, all white/blank spaces around the figure should be cropped out. To ensure accurate conversion of characters, standard fonts such as Times, Times New Roman, Ariel or Helvetica should be used for preparing the text and figures. Symbol font should be used to convert Greek characters and other non-standard characters, such as the degree symbol.

For production, figures need to be of a high resolution and saved as .tiff files (300 d.p.i. for colour/half tone and 800 d.p.i. for line work (black line art, white background), or saved as .eps .doc or .docx files. Photoshop or IrfanView (free to download on the Web) may be used to produce high resolution figures. In their final size, figures need to fit the width of a single column of text, (88 mm) or, if necessary, the full page width (184 mm). The final size of the printed figure cannot exceed 230 x 184 mm including captions. Lettering should be no less than 2 mm in height in the final printed figure, should be in proportion to the overall dimensions of the figure and be consistent between figures. Where several figures are mounted together they should be squared accurately and separated by about 5 mm. All of the figures in such a group should have approximately the same contrast values.

Avoid bar or line graphs with only two data points, such results should be described in the text only. We encourage the use of scatter plots in preference to bar charts to enable the reader to get a more accurate representation of the data.

There is no limit to the number of figures allowed for *Research Reports*, but authors should make sure that each figure is relevant to the text and that the figures are presented and numbered in the order in which they are mentioned in the text. When there are large numbers of figures, layout problems are less likely to occur if the figures are of similar shapes and sizes. The submitted files should not exceed a total of 250MB. If you have difficulty uploading large files, please contact the editorial office at editorial.office@ejneurosci.org for assistance. Please refer to http://media.wiley.com/assets/7323/92/electronic_artwork_guidelines.pdf for general guidelines on preparing electronic artwork.

5.15.1 Colour figures Authors can elect to have colour illustrations in the online version of their published manuscript, while having them reproduced in black-and-white in the printed version, free of charge. In this case, both colour and black-and-white versions of the figure should be uploaded and the figure caption should not refer to colour as it will be used for both the print and online versions. If authors elect to have colour figures published in the printed journal, the cost per figure is 400 GBP plus VAT. These charges are waived for all Review articles, and on request for authors from former Eastern Bloc countries publishing *Research Reports* or *Short Communications*.

Following acceptance, a signed copy of the completed Color Work Agreement Form must be sent to Customer Services before colour figures can be processed.

5.15.2 Permissions Permission must be obtained from the copyright-holder for the use of previously published illustrations. Authors are free to re-use their own figures that appear in another Wiley publication, as long as the original publication is properly cited. Please address permissions queries to permissionsuk@wiley.com.

5.16 Graphical Abstracts Graphical abstracts are aimed at promoting articles. They appear in the online tables of contents for issues of EJM and in the list of Early View articles.

For all Revised and Resubmitted manuscripts, please upload the following files as part of the submission process:

- a Word document file with the file designation "Graphical Abstract Text". This should consist of 2-3 sentences (maximum 500 characters, including spaces) highlighting the major findings of the article and their impact for the neurosciences.
- a figure file with the file designation "Graphical Abstract Figure". This figure should be representative of your manuscript and should contain no caption, heading or outline. Labels on the figure may be removed when appropriate. The figure needs to be of a high resolution and saved as a .tiff file (300 d.p.i. for colour/half tone and 800 d.p.i. for line work), or saved as a .eps .doc or .docx file. Before uploading the file, all white/blank spaces around the figure should be cropped out.

5.17 Supporting Information The use of supporting information should be limited to non-essential items, such as documentation of experiments controlling the specificity of reagents, etc. Authors need to justify in the cover letter the need for supporting information in their manuscript.

Supporting information will not be published in the print edition of the journal but will be included in the online edition. Supporting information has to be submitted for review purposes and should appear at the end of the manuscript, following the figures. Supporting information will be published as submitted and will not be copyedited, thus authors should make sure the data is clearly presented and that it conforms to the style of the rest of the paper. All supporting information, including supplementary figures and captions, should be merged and uploaded as a separate single PDF file, except video or audio files which should be uploaded separately with the file designation "Media files".

Cover illustrations If you have any colour illustrations, either appearing in your paper or relating to it, that would make good images for the front cover, please upload them as high resolution JPG or TIFF files during the file upload step of the submission process, with the file designation "Cover Image Suggestion".

ANEXO 2 – NORMAS REVISTA 02

JOURNAL OF LASERS IN MEDICAL SCIENCES

Author Guidelines

JLMS publishes Original Papers, Review Articles, Case Reports and brief reports, Case series, photo essay. Letters to the Editor and commentary in the fields of laser or lights in any field of medicine. In addition to technical papers on: The development of new laser and non-laser light devices, Light delivery systems, Sensors to monitor laser effects, Basic lasers-tissue interactions and Modeling of laser-tissue interactions.

- **Type of Articles**

Original Articles: Should contain title page, abstract, keywords, introduction, materials and methods, results, discussion, acknowledgment, references, tables and figures. The length of the text should be limited to 4500 words excluding the references.

Review Articles: Should be requested by the editor, but J Lasers Med Sci will also accept submitted reviews. The authors of review articles are invited to contact the Editorial Office before preparing a review article. Both solicited and unsolicited review articles are subjected to editorial review such as the original papers. This type of articles should be limited to 5000 words.

Case Reports and Brief Reports: Should not exceed 2000 words. Both should include abstract, keywords, case presentation, discussion, acknowledgment, references, and 1 to 4 figures. Necessary documentations of the case(s) like pathology and laboratory test reports should be included in the submission package. Brief reports should not have more than one figure and/or table.

Case Series: It is included all of the reports about the special treatment and new procedure in some limited cases with good results but not confirmed yet internationally as a global choice. It should be limited to 2500 words.

Photo Essay: It is a quiz type article which should be presented by a high quality picture, a brief history about the picture and a question about the best modality of intervention. It should be limited to 2500 words.

Letters to the Editor: J Lasers Med Sci accepts letters to the editor. Letters, less than 500 words, should discuss articles published in the journal during the previous six months. Letters will undergo peer-review processing and will be edited for clarity.

Commentary: J Lasers Med Sci accepts the comment(s) from the experts in the shape of Commentary Letter not more than 1000 words.

- **Submission**

Manuscript submission to the J Laser Med Sci is only possible through the Journal's Online Paper Submission page. Manuscript must be accompanied by a covering letter to the Editor-in-Chief, including title and author(s) name and undertaking that it has not been published or submitted elsewhere. In case the manuscript was earlier submitted to some other journals and was rejected, the authors must provide full information for proper analysis. Manuscript should be typed as a Microsoft Word document in double space on the A-4 size page set up with clear margins on both sides. Tables as well as illustrations should be typed and drawn at the end of the manuscript after the references. Do not submit tables as photographs. All text documents should be uploaded in Microsoft Word format as an attachment. The figures should be sent in a format of JPEG or GIF which will produce high quality images in the online edition of the journal.

The Title Page: The complete title of the manuscript, the name of all the authors with their highest qualifications, the department or institution to which they are attached, address for correspondence with telephone numbers, e-mail, and fax number.

The Abstract: All original articles must accompany a structured abstract up to 350 words. It should be structured as Background, Methods, Results and Conclusion followed by 3 to 5 Keywords. Keywords will assist indexers in cross indexing the article as they are published with abstract. Use terms from the Medical Subject Headings (MeSH) list of Index Medicus. Authors need to be careful so that the abstract reflects the content of the article accurately.

Introduction: This should summarize the purpose and the rationale for the study. It should neither review the subject extensively nor should it have data or conclusions of the study.

Methods: This should include exact method or observation or experiment. If an apparatus is used, its manufacturer's name and address should be given in parenthesis. Please note that for any article dealing with laser details such as type of laser, energy, pulse duration and the spot size should be mentioned precisely. If the method is established, give reference but if the method is new, give enough information so that another author be able to perform it. If a drug is used, its generic name, dose and route of administration must be given. For patients, age, sex with mean age \pm standard deviation should be given. Statistical method must be mentioned and specify any computer software used.

Results: It must be presented in the form of text, tables and illustrations. The contents of the tables should not be all repeated in the text. Instead, a reference to the table number may be given. Long articles may need sub-headings within some sections (especially the Results and Discussion parts) to clarify their contents.

Discussion: This should emphasize the present findings and the variations or similarities with other work done in the field by other workers. The detailed data should not be repeated in the discussion again. Emphasize the new and important aspects of the study and the conclusions that follow from them. It must be mentioned whether the hypothesis mentioned in the article is true, false or no conclusions can be derived.

Acknowledgement: All contributors who do not meet the criteria for authorship should be covered in the acknowledgement section. It should include persons who have provided technical help, writing assistance and departmental head who has only provided general support. Financial and material support should also be acknowledged.

Tables: In limited numbers should be submitted with the legends placed above. Do not submit tables as photograph. Place explanatory matters in footnotes, not in the heading.

Figures: Should be in limited numbers, with high quality art work and mounted on separate pages. The legends should be placed below. The same data should not be presented in tables, figures and text, simultaneously.

References: All manuscripts should be accompanied by relevant references. The author should ensure reference to locally published studies by doing proper literature search. It may not be possible for the editor and reviewers to check the accuracy of all reference citations. To minimize such errors author should verify references against the original documents. The Reference should provide the following information as stated in the presented models as follows:

- Article: Tallab TM, Bahamdah KA, Mirdad S, Johargi H, Mourad MM, Ibrahim K, et al. Cutaneous leishmaniasis: Schedules for intralesional treatment with sodium stibogluconate. *Int J Dermatol.* 1996;35:594-7.
- Chapter: Bigby M. The hierarchy of evidence. In: Williams HC, Bigby M, Diepgen T, et al. (Eds). *Evidence-based dermatology.* Oxford: BMJ Publishing Group; 2003. 44-8.
- Book: Norman IJ, Redfern SJ (Eds). *Mental health care for elderly people.* New York: Churchill Livingstone;1996.

Abbreviations and Symbols: Use only standard abbreviations. Avoid using them in the title and abstract. The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement.

- **The Corresponding Author**

The corresponding author should be the person who is willing and able to handle all correspondence with the journal editor, including responding to reviewers' comments and proofreading the final version.

- **Ethical Guidelines**

Ethical considerations must be addressed in the Materials and Methods section.

- Please state that informed consent was obtained from all human adult participants and from the parents or legal guardians of minors. Include the name of the appropriate institutional review board that approved the project.
- Indicate in the text that the maintenance and care of experimental animals complies with National Institutes of Health guidelines for the humane use of laboratory animals, or those of your Institute or agency.

- **Conflicts of Interest**

Authors must acknowledge and declare any sources of funding and potential conflicting interest, such as receiving funds or fees by, or holding stocks and shares in, an organization that may profit or lose through publication of your paper. Declaring a competing interest will not lead to automatic rejection of the paper, but we would like to be made aware of it.

- **Page Charges**

There are no charges for publication in this Journal.

- **Peer Review Process**

All manuscripts are considered to be confidential. They are peer-reviewed by at least 2 anonymous reviewers selected by the Editorial Board. The corresponding author is notified as soon as possible of the editor decision to accept, reject, or require modifications. If the manuscript is completely acceptable according to the criteria set forth in these instructions, it is scheduled for the next available issue.