



Ministério da Educação
Universidade Federal de São Paulo
Campus Baixada Santista
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA



Giuliana Castro Di Gangi

*Os efeitos do laser terapêutico na regeneração nervosa
após secção total do nervo ciático em ratos*

**SANTOS
2010**

Giuliana Castro Di Gangi

Os efeitos do laser terapêutico na regeneração nervosa após secção total do nervo ciático em ratos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Fisioterapia.

Orientadora: Ana Cláudia Muniz Renno

Apoio FAPESP 2009/08974-9

CEP: 1465/09

Ficha Catalográfica Elaborada pela Biblioteca da UNIFESP, Campus Baixada Santista

Di Gangi, Giuliana Castro

Os efeitos do laser terapêutico na regeneração nervosa após
secção total do nervo ciático em ratos / Giuliana Castro Di
Gangi – Santos, 2010

29 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade
Federal de São Paulo - UNIFESP - Campus Baixada Santista,
2010

Curso: Fisioterapia

Orientador: Ana Cláudia Muniz Renno

1. Tecido Nervoso. 2. Laser. 3. Nervo Ciático. 4. Marcha. 5.
Bainha de Mielina I. Ana Cláudia Muniz Renno. II. Os efeitos
do laser terapêutico, 808nm, na regeneração nervosa após secção
total do nervo ciático em ratos / Giuliana Castro Di Gangi –
Santos, 2010. III. Santos - Campus Baixada Santista.

CDD 615.82

Giuliana Castro Di Gangi

Os efeitos do laser terapêutico na regeneração nervosa após secção total do nervo ciático em ratos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Fisioterapia.

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof^a. Dr^a. Ana Claudia Muniz Rennó

Instituição: UNIFESP

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. Odair Aguiar Junior

Instituição: UNIFESP

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof^a. Dr^a. Carla Christina Medalha

Instituição: UNIFESP

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Dedico este trabalho aos meus pais, Ignázio e Maria Lúcia por sempre transmitirem sabedoria e conhecimento, pelo incentivo e presença constantes.

Agradecimentos

À minha orientadora Profa Dra. Ana Claudia Muniz Renno pela dedicação, profissionalismo, confiança, apoio e incentivo.

Às pessoas que trabalharam e colaboraram com o estudo: Caroline Bublitz, Carolina Goulart, Beatriz Amorim, Beatriz Peres, José Simões, Marcela Fernandes, Sandra Valente, Fábio Tadeu Montesano.

À Profa Dra. Carla Christina Medalha pela participação ativa, dedicação e paciência até mesmo durante as longas horas de perfusão.

Ao Prof. Dr. Odair Aguiar Junior pela disponibilidade durante as análises, inclusive aos finais de semana.

A todos meus amigos e familiares que de uma forma ou de outra transmitiram força e estímulo para que eu conseguisse completar este percurso. Em especial Ícaro, Rosária, Domenica, Tayla, Laís, Jéssica, Priscila, Mariana.

À Carolina, Beatriz e Tayla que contribuíram para que os quatro anos de faculdade fossem repletos de boas risadas.

Ao meu grupo de estágio pela união, parceria e companheirismo em todos os momentos, mesmo naqueles mais difíceis.

Resumo

Lesões de nervo periférico são freqüentemente encontradas na prática clínica da fisioterapia. Traumas como esmagamento e secções totais são as causas mais comuns de lesões nos nervos periféricos e, comumente, resultam incapacidades funcional, afetando atividades ocupacionais e sociais do indivíduo. Dentro deste contexto, muitos recursos vêm sendo pesquisados com o intuito de acelerar a regeneração nervosa, dentre estes se destaca a terapia laser de baixa potência. Estudos anteriores demonstraram que o laser de baixa potência (LLLT) promove diminuição do processo inflamatório e aumento da proliferação celular, resultando em aceleração da regeneração nervosa pós-lesão. No entanto, apesar da série de evidências da efetividade do LLLT no processo de regeneração do tecido nervoso, os mecanismos envolvidos nestes eventos são amplamente desconhecidos, e ainda há uma contradição entre os diversos parâmetros usados. Com isso, este projeto teve o objetivo de analisar os efeitos do LLLT na regeneração do nervo ciático em ratos após lesão por secção total. Para isso, foram utilizados ratos machos da raça Wistar, divididos nos seguintes grupos (n=10): grupo controle-lesão, grupo lesão irradiado com laser 808nm, fluência de 50 J/cm² e grupo lesão irradiado com laser 808nm, fluência de 10 J/cm². O protocolo de tratamento foi iniciado 24 horas após a cirurgia e realizado durante 15 dias. A cada 20 dias, os animais foram submetidos à avaliação do índice funcional do ciático (SFI). Após 90 dias os animais sofreram eutanásia por overdose de anestésico e o nervo ciático foi retirado para a realização de análises morfológica e morfométrica, nas quais foram mensurados o número de fibras mielínicas e amielínicas, área da fibra e axônio e espessura da bainha de mielina. O resultado do SFI não mostrou diferenças significativas entre os grupos tratados com laser e o grupo controle durante as avaliações. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre espessura da bainha de mielina, área de fibras nervosas e axônio e número de fibras mielínicas e amielínicas nos três grupos avaliados.

Palavras-Chaves: Tecido Nervoso, Laser, Nervo Ciático, Marcha, Bainha de Mielina.

Abstract

Peripheral nerve injuries are frequently founded in clinical practice of physiotherapy. Traumas such as crushing and sections totals are the most common causes of injury to peripheral nerves and usually result in functional disability, affecting social and occupational activities of the individual. Within this context, many resources are being done in order to accelerate nerve regeneration, among them stands out the low level laser therapy (LLLT), which promotes decrease inflammation and increase cell proliferation, resulting in acceleration of regeneration nerve after injury. However, despite the many evidences of the effectiveness of LLLT in the process of regeneration of nerve tissue, the mechanisms involved in these events are largely unknown, and there is a conflict between the various parameters used. Therefore, the aim of this project was analyze the effects of LLLT on the regeneration of sciatic nerve injury in rats after total section. For this, we used male Wistar rats divided into the following groups (n = 10) control-injury, injury group irradiated with 808nm laser fluence of 50 J/cm² and injury group irradiated with 808nm, fluence 10 J/cm². The treatment protocol was initiated 24 hours after surgery and held for 15 days. Every 20 days, the animals were subjected to the evaluation of sciatic functional index. After 90 days, the animals were euthanized by overdose of anesthetic and the sciatic nerve was removed to carry out morphological and morfometric analysis, which were measured the number of myelinated and unmyelinated fibers, fiber and axon area and sheath thickness myelin. The result of SFI didn't show differences between treatment groups and control group during the SFI evaluation. There weren't differences between the three groups when we evaluated sheath thickness myelin, fiber and axon area and number of myelinated and unmyelinated fibers.

Key Words: Nerve Tissue, Laser, Sciatic Nerve Myelin, Gait, Sheath

Sumário

1. Introdução	9
1.1 Laser de baixa intensidade.....	9
1.2 Efeitos do LLLT no tecido nervoso.....	11
2. Objetivo.....	13
3. Materiais e Métodos.....	14
3.1 Procedimento Cirúrgico.....	14
3.2 Grupos Experimentais.....	15
3.3 Protocolo de Tratamento Laser.....	15
3.4 Análise Morfológica e Morfométrica.....	16
3.5 Análise do SFI.....	16
3.6 Análise estatística dos dados.....	18
3.6.1 Análise do SFI.....	18
3.6.2 Análise Morfológica e Morfométrica.....	18
4. Resultados.....	19
4.1 Análise do SFI.....	19
4.2 Análise morfológica e morfométrica.....	21
5. Discussão.....	23
6. Conclusão.....	26
7. Referências Bibliográficas.....	27

1. Introdução

Lesões de nervo periférico são frequentemente encontradas na prática clínica da fisioterapia. Estima-se que aproximadamente 500 mil sujeitos sofram lesões traumáticas nos nervos periféricos a cada ano, e destes, 2,8% tornam-se permanentemente incapacitados (NOBLE et al., 1998 e RODRIGUES et al., 2004). Traumas como esmagamento e secções totais são as causas mais comuns de lesões nos nervos periféricos e, comumente, resultam incapacidades funcional, afetando atividades ocupacionais e sociais do indivíduo. A diminuição ou perda da sensibilidade e motricidade no território inervado, devido a degeneração dos axônios e dos correspondentes neurônios da medula espinhal, são acometimentos freqüentemente encontrados. (ROCHKIND, 2009).

Apesar dos grandes avanços das técnicas cirúrgicas nos últimos 25 anos, nenhuma técnica de reparação do nervo garante total recuperação e restauração da função (LUNDBORG, 2002). Portanto, a reparação das lesões nervosas e a reabilitação das mesmas constituem um grande desafio, uma vez que, a recuperação nervosa, embora ocorra, em geral é lenta e muitas vezes incompleta. Com isso, o desenvolvimento de técnicas e tratamentos que estimulem o processo de crescimento nervoso, torna-se de extrema importância. Dentro deste contexto, vários avanços biofísicos e bioquímicos têm sido estudados na tentativa de minimizar o tempo de regeneração tecidual e de diminuir as chances de possíveis complicações advindas do processo anormal de regeneração (HADJIARGYROU et al., 1998). Dentre estes, podem ser citados os efeitos dos recursos eletrofísicos como os campos eletromagnéticos, o ultra-som de baixa intensidade (US) e do laser terapêutico de baixa intensidade (LLLT) (GIGO-BENATO et al., 2006).

1.1 Laser terapêutico de baixa intensidade

O laser terapêutico de baixa intensidade (LLLT) tem sido utilizado desde 1960, com fins terapêuticos, como um tratamento seguro e efetivo para uma série de condições patológicas nos mais diversos tecidos (BASFOR, 1989). Desde então vem tendo um papel de destaque na tentativa de acelerar o processo de regeneração tecidual após um trauma (HADJIARGYROU et al., 1998). No entanto, muitos de seus efeitos ainda não foram explicados e ainda há uma

controvérsia muito grande em relação aos mecanismos de ação e os melhores parâmetros a serem utilizados.

O LLLT é caracterizado como uma radiação eletromagnética atérmica, não ionizante, que promove efeito a partir da interação da luz com o tecido (KARU, 1998). De acordo com vários autores, o LLLT tem ação principalmente nas organelas celulares, em especial nas mitocôndrias, lisossomos e membrana plasmática, gerando aumento de ATP e modificando o transporte iônico. Acredita-se que fotorreceptores celulares (cromóforos), sensíveis a determinados comprimentos de onda, ao absorverem fótons, desencadeiem reações químicas, convertendo energia fotoquímica em energia química. Desta forma o LLLT acelera, a curto prazo, a síntese de ATP (Glicólise e Oxidação Fosforilativa) e a longo prazo a transcrição e replicação do DNA (KARU, 1998). Acredita-se que após a absorção do laser, ocorrem quatro respostas: variações no estado de oxidação-redução dos componentes da cadeia respiratória, juntamente com uma aceleração da transferência de elétrons; alterações na atividade bioquímica e estrutural pelo aquecimento transitório dos cromóforos; aumento da produção do ânion superóxido (O_2^-), com o subsequente aumento da concentração do produto de sua dismutação (H_2O_2) e geração de oxigênio molecular ou singleto (O_2). Em seguida ocorre a transdução do fotosinal e amplificação ao núcleo por uma cascata de reações ocorridas no citoplasma e na membrana celular, conectadas a alterações dos parâmetros de homeostase celular (pH, concentração de Ca^{+2} , AMP cíclico, ATP e outros), as quais acontecem minutos ou horas após a irradiação. Isto condiciona a ocorrência de possíveis mudanças na taxa de síntese de DNA e RNA, alterações na taxa de consumo de O_2 , alteração do potencial de membrana, entre outras (KARU, 2000, 1998; BAXTER, 1997). Essas modificações irão culminar na aceleração do metabolismo celular e aumentar a proliferação de macrófagos, fibroblastos, condrócitos, osteoblastos e osteoclastos, aumentar o diâmetro e força de tração de úlceras cutâneas, melhorar a viabilidade de enxertos, bem como, aumentar a formação de novos vasos sanguíneos e linfáticos. Além disso, o laser também é eficaz para aumentar a deposição de colágeno, a cicatrização tecidual e acelerar a regeneração nervosa (OZAWA et al., 1998).

1.2. Efeitos do LLLT no tecido nervoso

No tecido nervoso, vários estudos vêm demonstrando que o LLLT aumenta a função nervosa e aumenta a produção de mielina em casos de lesões (MILORO et al., 2002). Além disso, a laserterapia induz a proliferação de células de Schwann e processos de brotamento neural (ROCHKIND, 2006).

Endo et al. (2008), investigaram os efeitos do laser Arsenieto de Gálio (904 nm, 20 W, largura de pulso de 180 ns e dose de 4 J/cm²) na regeneração após lesão nervosa por esmagamento e verificaram que a irradiação com o laser de baixa intensidade influenciou positivamente na velocidade de regeneração axonal e de sua estrutura de sustentação. Além disso, Miloro et al. (2002) realizaram um estudo com coelhos, para verificar a eficácia do LLLT (laser arsenieto de gálio e alumínio, 830 nm, 6J/cm²), no pós-operatório do nervo alveolar inferior reparado por tubulação. Em comparação com o grupo controle, não houve diferenças significativas em relação ao diâmetro axonal, porém houve melhora na regeneração nervosa ao longo do enxerto sintético em relação ao grupo não tratado.

Reis et al. (2008) não observaram nenhum efeito positivo do laser arsenieto de gálio e alumínio (comprimento de onda de 660nm, potência de 26,3 mW, densidade de energia de 4J/cm², densidade de potência de 0,0413W/cm²) na recuperação funcional em nervo ciático de ratos após lesão por neurotmeze seguida de anastomose epineural.

Barbosa et al. (2010), demonstraram que o laser arsenieto-gálio-alumínio (660 nm, 10J/cm², 30 mW e 0,06 cm²) obteve melhores resultados de SFI em ratos submetidos à lesão do nervo ciático por esmagamento após quatorze dias da cirurgia, quando comparado com o laser arsenieto-gálio-alumínio de 830 nm, 10 J/cm², 30 mW e 0.116 cm².

No estudo recente de Shin et al. (2003), foi observado que o LLLT tem efeito favorável com aumento na expressão da proteína associada ao crescimento (GAP-43) nos primeiros estágios do processo de recuperação após lesão ciática. A GAP-43 está presente no sistema nervoso durante o desenvolvimento e nos processos regenerativos, sendo correlacionada com o número de brotamentos axonais e podendo, portanto sua identificação ser utilizada como um indicador de regeneração nervosa após lesão periférica (SHAMIR et al., 2001). A irradiação a laser de baixa potência também acentuou o alongamento neurítico induzido pelo NGF *in vitro* e teve efeito protetor sobre o estresse oxidativo induzido pelo H₂O₂ (GIULIANI et al., 2009).

Os efeitos do LLLT He-Ne (comprimento de onda de 632,8 nm; densidade de energia de 10J/cm²) em nervos ciáticos de ratos após lesão por esmagamento também foram estudados por Rochkind et al. (1987), demonstrando que houve melhora do potencial de ação e aumento do crescimento axonal nos nervos submetidos à irradiação de LLLT He-Ne, em comparação com o grupo não irradiado.

Em outro estudo, randomizado e duplo-cego, realizado por Shamir et al. (2001) foi avaliado o efeito terapêutico do laser com comprimento de onda de 780 nm na regeneração de nervo periférico após transecção completa e anastomose direta do nervo ciático de ratos. Após este procedimento, 13 de 24 ratos receberam tratamento transcutâneo com laser no pós-operatório, durante 30 minutos por dia em 21 dias consecutivos, em segmentos da medula espinhal e no nervo ciático. Respostas positivas foram encontradas em 69,2% dos ratos tratados com laser, comparado com 18,2% dos ratos não tratados. Uma avaliação imunohistoquímica foi realizada no grupo tratado com laser e mostrou um aumento significativo do número total de axônios e melhor qualidade do processo de regeneração, em relação ao grupo não tratado. Este estudo sugere que o uso da fototerapia no pós-operatório aumenta a regeneração de nervos periféricos após transecção completa e anastomose.

A partir dos estudos apresentados, pode ser observado que a laserterapia apresenta um possível efeito estimulador no processo de reparo após lesão do nervo periférico. No entanto, há uma variedade muito grande de parâmetros e protocolos utilizados pelos diferentes autores, o que torna difícil a comparação entre os resultados. Além disso, sabe-se muito pouco a respeito dos mecanismos de ação do laser no tecido nervoso.

Devido à necessidade de encontrar e padronizar os parâmetros para o tratamento de lesões nervosas, este trabalho tem o objetivo de avaliar os efeitos da laserterapia de baixa potência sobre o processo de reparação do nervo ciático após ter sofrido lesão por secção completa. O uso de um modelo experimental é relevante para a aplicabilidade futura em tratamento de pacientes com lesões nervosas.

2. Objetivo

Este trabalho teve como objetivo analisar os efeitos do laser terapêutico de baixa potência 808nm, utilizados na fluência 50 e 10 J/cm² no processo de regeneração nervosa após secção total do nervo ciático em ratos.

3. Materiais e Métodos

O trabalho foi realizado no Laboratório de Ensaio Biológicos, do departamento de Biociências da UNIFESP, campus Baixada Santista em associação com outros laboratórios.

Foram utilizados 30 ratos machos da linhagem Wistar, com 9 semanas de idade e com peso corporal médio de 250-300 gramas no início do experimento, provenientes do biotério central da UNIFESP. Os animais foram mantidos no biotério deste departamento, alimentados com ração comercial e água a vontade, mantidos em regime de luz (12 horas claro e 12 horas escuro) e temperatura controlada a $22 \pm 2^\circ$ C. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal de São Paulo número 1465/09.

3.1 Procedimento cirúrgico

Todos os animais foram submetidos à realização da secção total do ciático, como modelo de neurotmesa. Este tipo de intervenção cirúrgica lesiva foi escolhido por aproximar-se mais da prática clínica da fisioterapia e por apresentar maiores desafios no tratamento, quando comparado a lesão por esmagamento, as quais apresentam regeneração espontânea a partir do segmento distal do nervo e pode-se esperar uma boa recuperação funcional (SUNDERLAND, 1991). As lesões foram realizadas de acordo com os princípios éticos de instrumentação animal, sob condições padrão de assepsia e anestesia geral. Os animais foram anestesiados com ketamina (20 mg/kg) e xilasina (30 mg/kg) e após tricotomia do dorso da cintura até o joelho direito foi realizada uma incisão de 2cm na pele da porção média da coxa, até a exposição do nervo ciático direito. Foi realizada uma transecção completa do nervo ciático, seguida de reparação termino-terminal. O procedimento cirúrgico foi realizado através de um microscópio cirúrgico e instrumentos micro-cirúrgicos pela Prof. Dra. Marcela Fernandes, no laboratório de Disciplina de Cirurgia de Mão e Membro Superior, do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da UNIFESP campus Vila Clementino, em associação com o Prof. Dr. Vilnei Matiulli Leite.



Figura 1: Aparelho portátil para LLLT

3.2 Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos:

GRUPO 1 (n=10): Grupo controle lesão: animais que foram submetidos ao procedimento de lesão, mas que não foram submetidos a nenhum tipo de tratamento.

GRUPO 2 (n=10): Grupo lesão irradiado laser 808nm, fluência de 50 J/cm²: animais que foram submetidos ao procedimento de lesão e tratados com terapia laser 808 nm, com fluência de 50J/cm².

GRUPO 3 (n=10): Grupo lesão irradiado laser 808nm, fluência de 10 J/cm²: animais que foram submetidos ao procedimento de lesão e tratados com terapia laser 808 nm, com fluência de 10J/cm².

3.3 Protocolo de Tratamento Laser

O protocolo de tratamento foi iniciado 24 horas após a cirurgia e durante três semanas, em um total de 15 aplicações (com intervalo de 2 dias a cada 5 dias). A aplicação foi pontual, sobre a região da lesão. O aparelho utilizado foi um modelo portátil de Laser DMC, classe 3B (figura 1), com comprimentos de onda 808 nm, emissão contínua, potência de saída de 30 mW, densidade de potência de 50W/cm², diâmetro do feixe de 0,6 mm, divergência de 1.5°, na fluência de 50 e

10J/cm². Este aparelho pertence ao laboratório de Fisioterapia Experimental e está sob responsabilidade da Prof. Dra. Ana Claudia Muniz Renno.

3.4 Análise Morfológica e Morfométrica

Após a finalização das irradiações, os animais ficaram acondicionados por um período de 90 dias. Após esse período, todos os grupos sofreram eutanásia por overdose de anestésico e foi realizada perfusão seguida da retirada no nervo ciático para a realização da análise morfológica e morfométrica. O fragmento de nervo foi fixado em glutaraldeído (2,5%) durante 24 horas a 4°C e foi armazenado em solução de cacodilato (cacodylate) sódico isotônico (0,025 M, pH 7,4) até o início do próximo procedimento. Em seguida o material foi revestido por resina plástica (Epon 812®), colocado em moldes de silicone à temperatura de 60°C, por 72 h. Em um micrótomo Reichert-Jung foram cortadas fatias semi-finas de 0,5 mm e coradas com azul de toluidina para análise morfológica e morfométrica.

As análises morfológica e morfométrica foram realizadas baseadas no trabalho de Fernandes et al, (2007) e Varejão (2004). Foram utilizados cortes transversais de dois nervos de cada grupo (1, 2 e 3) e em cada corte foram analisados quatro diferentes campos. As imagens obtidas no aumento de 100X, foram capturadas do microscópio Nikon ® Eclipse E200 para o computador através da câmera Moticam 2500 5.0 mpixel USB 2.0 e do software de análise de imagem Motic Images Plus 2.0. A área da fibra nervosa e axônio foram mensuradas, assim como a espessura da bainha de mielina em cada campo. O número de fibras mielínicas e amielínicas dos nervos foi contado.

3.5 Análise do SFI

Durante o período experimental, os animais foram avaliados através do cálculo do Índice Funcional do Ciático (SFI) descrito por Bain, Mackinnon & Hunter. (1989). Segundo Monte-Raso. (2008), o SFI apresenta alta correlação entre recuperação funcional e regeneração morfológica e morfométrica em nervos periféricos lesados. Para o cálculo do SFI, era necessário realizar testes de caminhada (walking tracks) antes da cirurgia e a cada 20 dias no período pós cirúrgico, totalizando seis testes de caminhada. Tais testes foram realizados da seguinte forma: as

patas traseiras dos animais eram pintadas com tinta de carimbo e estes eram colocados para caminhar sobre uma passarela de madeira fechada nas laterais e forrada com folha sulfite, a fim de obter os desenhos das patas e desta forma calcular o SFI (Figura 1). A passarela tinha as seguinte medidas: 34,5cm x 7,7 cm x 7,1 cm. As figuras das passadas foram scaneadas e para o cálculo do SFI, foi necessário medir, através do programa Image J, distância entre o terceiro dedo e o calcâneo (PL), distância entre o segundo e quarto dedo (IT) e distância entre o primeiro e quinto dedo (TS), sempre de ambas as patas direita (D) e esquerda (E) (Figura 2). A fórmula para o cálculo do SFI corresponde a:

$$\text{SFI} = -38,3 \times (\text{PL D} - \text{PL E})/\text{PL E} + 109,5 \times (\text{TS D} - \text{TS E})/\text{TS E} + 13,3 \times (\text{IT D} - \text{IT E})/\text{IT E} - 8,8$$



Figura 2: Representação do teste de caminhada realizado antes da cirurgia para lesão do nervo isquiático e a cada 20 dias no período pós-cirúrgico.

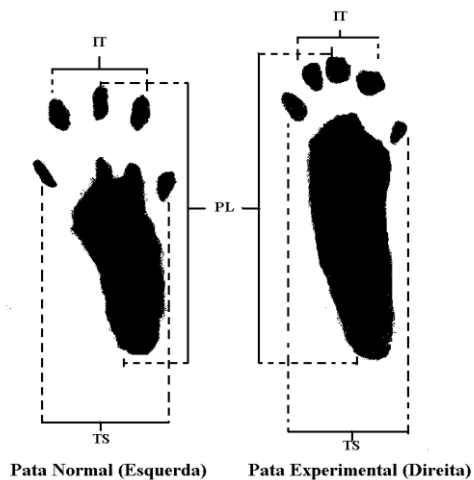


Figura 3: Representação esquemática dos parâmetros avaliados para o cálculo do SFI. PL: distância entre terceiro dedo e calcâneo, IT: distância entre segundo e quarto dedo, TS: distância entre primeiro e quinto dedo.

3.6 Análise estatística dos dados

3.6.1 Análise do SFI

Para comparar os perfis de cada grupo ao longo do tempo, considerando-se a relação existente entre observações feitas em uma mesma unidade amostral, empregou-se o modelo de Análise de variância com medidas repetidas e o método de comparações múltiplas de Bonferroni (WINER, 1991). Para as conclusões das análises estatísticas foi utilizado o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

3.6.2 Análise morfológica e morfométrica

Os dados foram analisados estatisticamente através de técnicas descritivas, tais como tabelas e gráficos, na forma de médias e desvios padrão. Na comparação entre os grupos foi utilizada análise de variância (ANOVA) e nos casos significantes, o teste de Duncan seria utilizado para discriminar as diferenças.

Para as conclusões das análises estatísticas foi utilizado o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

4. Resultados

4.1 Análise do SFI

O gráfico abaixo (figura 4) representa os resultados obtidos na avaliação do SFI dos seis testes de caminhada realizados durante o experimento para os três grupos. O WT 1 representa o SFI antes da cirurgia. Pode ser observado que os valores médios encontrados no SFI foram de -6,44, 1,53 e -0,65 para o grupo controle, grupo 808nm-10J/cm² e grupo 808nm-50J/cm², respectivamente. Observa-se também que os valores obtidos neste WT foram estatisticamente superiores quando comparados com os valores obtidos em todos os demais testes (testes 2,3,4,5 e 6).

As médias do SFI apresentadas pelo grupo controle, 808nm-10J/cm² e 808nm-50J/cm² no WT 2 foram -70,52; -69,64 e -68,82, respectivamente. Ainda, não foi observada nenhuma outra diferença estatística entre os grupos experimentais nesse período.

Pode ser observado também os resultados obtidos no WT 3, 4, 5 e 6 (figura 4). Essa figura demonstra que não houve nenhuma diferença estatística entre os grupos tratados quando comparados com o grupo controle em nenhum dos testes realizados.

Na tabela 1 pode ser observada os valores de p na comparação realizada entre todos os WTs, mostrando que só houve diferença significativa entre o WT1 e as demais avaliações (2,3,4,5 e 6).

A tabela 2 mostra uma comparação realizada entre ambos os grupos experimentais e entre os mesmos e o controle. Nota-se que não houve diferenças significativas entre os grupos.

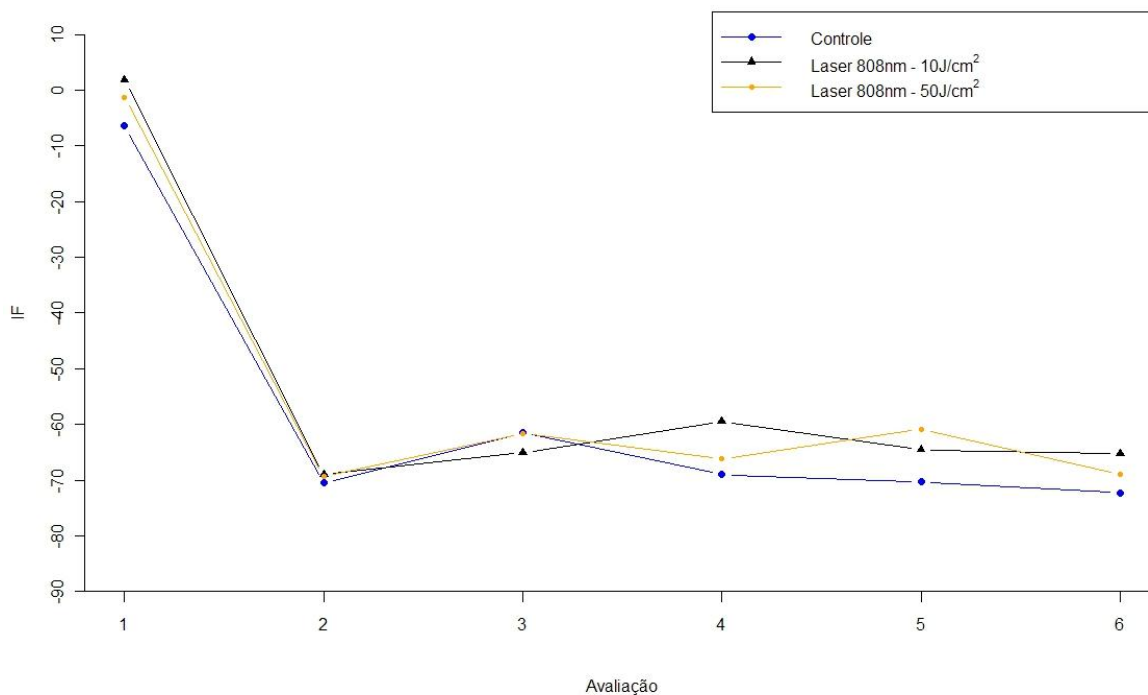


Figura 4: Perfis médios do SFI nos grupos Controle, Laser 808nm – 50J/cm² e Laser 808nm – 10J/cm²

Tabela 1: Resultados da comparação entre as avaliações feitas em diferentes instantes.

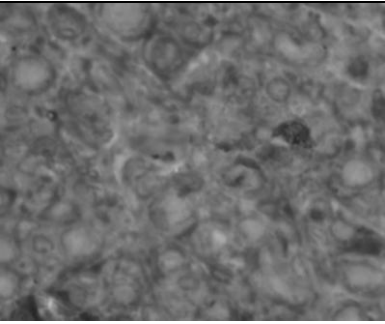
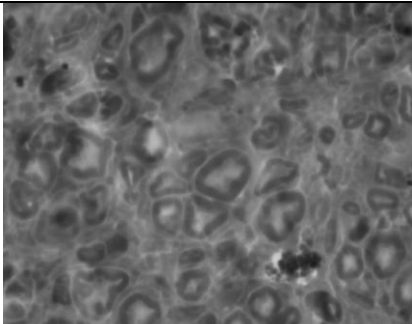
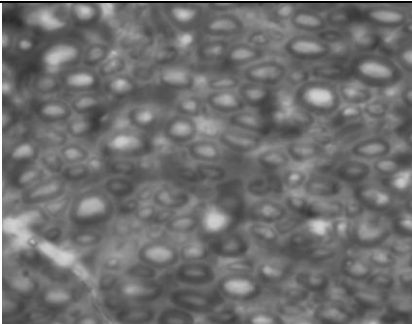
WTs comparados		Nível descritivo
1	2	0,001
1	3	0,001
1	4	0,001
1	5	0,001
1	6	0,001
2	3	0,268
2	4	0,498
2	5	0,695
2	6	0,820
3	4	0,999
3	5	0,999
3	6	0,999
4	5	0,999
4	6	0,999
5	6	0,999

Tabela 2: Resultados da comparação entre os grupos de estudo dois a dois.

Grupos comparados		Nível descritivo
Controle	Laser 808nm - 50J/cm ²	0,999
Controle	Laser 808nm - 10J/cm ²	0,999
Laser 808nm - 50J/cm ²	Laser 808nm - 10J/cm ²	0,999

4.2 Análise morfométrica e morfológica

As figuras 7, 8 e 9 representam as imagens de lâminas contendo corte transversal do nervo ciático de três animais distintos, cada um pertencente a um grupo diferente. A figura 5 corresponde à fotomicrografia do nervo de um animal do grupo controle. Embora não tenha sido o foco deste estudo avaliar qualitativamente a condição do nervo ciático, pode-se observar nesta imagem maior desorganização tecidual deste animal quando comparado com os outros grupos. Além disso, pode ser observada grande presença de tecido conjuntivo ao redor das fibras nervosas e pequena espessura da bainha de mielina, com delimitação celular indefinida. As figuras 6 e 7 representam as fotomicrografias dos animais tratados (808nm-10J/cm² e 808nm-50J/cm² respectivamente). Pode ser observado que ambas as figuras apresentam delimitação axonal bem definida, assim como o revestimento pela bainha de mielina.

		
Figura 5: Fotomicrografia de lâmina do animal do grupo controle. Coloração azul de toluidina (100X)	Figura 6: Fotomicrografia de lâmina do animal do grupo 808nm-10J/cm ² . Coloração azul de toluidina (100X)	Figura 7: Fotomicrografia de lâmina do animal do grupo 808nm-50J/cm ² . Coloração azul de toluidina (100X)

A tabela 3 apresenta os dados referentes à área da fibra nervosa e do axônio e espessura de mielina. Pode ser observado nesta tabela que não houve diferenças estatísticas entre os valores obtidos para a avaliação da área das fibras de axônios entre os três grupos.

Tabela 3: Médias e desvios padrões (DP) da área da fibra nervosa e axônio e espessura da bainha de mielina nos três grupos (controle, 808nm-10J/cm² e 808nm-50J/cm²)

	Controle	808nm e 10 J/cm²	808nm e 50J/cm²
Média área da fibra (um²)	179,96±93,37	180,15±70,24	158,81±59,71
Média área axônio (um²)	78,67±74,4	75,49±70,2	53,49±44,47
Média da espessura da bainha de mielina (um)	7,79±6,02	5,63±6,26	6,36±5,02

A tabela 4 compara os três grupos quanto ao número de fibras mielínicas e amielínicas. É possível observar que não houve diferenças estatísticas entre os grupos comparados nestas variáveis.

Tabela 4: Médias e desvios padrões (DP) do número de fibras mielínicas e amielínicas nos três grupos (controle, 808nm-10J/cm² e 808nm-50J/cm²)

	Controle	808nm e 10 J/cm²	808nm e 50J/cm²
Média fibras mielínicas	56,7±18,27	61,56±13,54	63,43±19,22
Média fibras amielínicas	37,85±10	36,25±8,63	40,81±10,98

5. Discussão

Este estudo investigou os efeitos do LLLT com comprimento de onda 808nm em duas fluências diferentes (50 J/cm^2 e 10 J/cm^2) no processo de reparo de nervo após secção total em ratos. Com base nos resultados obtidos na avaliação histológica e na avaliação do SFI, pode-se sugerir que o LLLT com comprimento de onda de 808nm, nas fluências utilizadas neste estudo, não foi eficaz na melhora do padrão de marcha em ratos.

Este resultado corrobora com o encontrado por Gigo-Benato (2006), que também não observou melhora funcional da marcha de ratos submetidos a lesão por esmagamento e posteriormente tratados com laser arsenieto de gálio-alumínio (AsGaAl), comprimento de onda de 830nm e potencia de 60 mW, em comparação com o grupo controle não irradiado.

De forma similar, Reis et al. (2008) não observaram nenhum efeito positivo do laser arsenieto de gálio e alumínio (comprimento de onda de 660nm, potência de 26,3 mW, densidade de energia de 4 J/cm^2 , densidade de potência de $0,0413 \text{ W/cm}^2$) na recuperação funcional em nervo ciático de ratos após lesão por neurotome seguida de anastomose epineural.

Contrariamente, Rochkind et al. (2007) constataram que na avaliação do SFI, o grupo irradiado pelo laser 780nm, na potência de 200mW, apresentou melhor marcha que o grupo não irradiado.

Ainda, em um estudo realizado por nosso grupo de pesquisa da UNIFESP, utilizando o mesmo modelo experimental do presente trabalho, investigou a ação do laser 660nm, nas fluências de 50 J/cm^2 e 10 J/cm^2 no processo de reparo de nervo periférico após secção total. Interessantemente, esse estudo demonstrou que o laser 660nm, em ambas as fluências foi eficaz para melhorar o controle motor dos animais irradiados uma vez que, os mesmos apresentaram valores estatisticamente maiores do SFI quando comparados com o grupo controle. Estes resultados evidenciam os efeitos positivos do LLLT na regeneração do tecido nervoso e confirma a existência de uma curva dose-resposta e da especificidade de cada tecido a um determinado comprimento de onda (RENNO et al, 2007).

Barbosa et al. (2010), compararam os efeitos do LLLT nos comprimentos de onda 660nm e 830nm na funcionalidade da marcha utilizando o SFI e seus resultados mostraram que o laser arsenieto-gálio-alumínio (660 nm, 10 J/cm^2 , 30 mW e $0,06 \text{ cm}^2$) obteve melhores resultados de SFI em ratos submetidos à lesão do nervo ciático por esmagamento após quatorze dias da cirurgia, quando comparado com o laser arsenieto-gálio-alumínio de 830 nm, 10 J/cm^2 , 30 mW e $0,116 \text{ cm}^2$.

Como já mencionado acima, os resultados obtidos nas análises morfológicas sugerem que o laser terapêutico de baixa intensidade não foi eficaz em aumentar a espessura da bainha de mielina, área de fibras nervosas e axônio e número de fibras mielínicas e amielínicas. Nossos resultados corroboram com os de Miloro et al. (2002), os quais não observaram efeitos significativos do LLLT (laser arsenieto de gálio e alumínio, 830 nm, 6J/cm²) no diâmetro axonal no pós-operatório do nervo alveolar inferior de coelhos reparado por tubulação, em comparação com o grupo controle.

Contrariamente, um estudo com coelhos realizado por Ihsan et al. (2007) mostrou que o grupo tratado com o laser terapêutico de baixa potência (comprimento de onda de 901 nm, potência de 10 mW com janela de 16 cm²) obteve maior espessura das fibras nervosas, camadas de mielina mais regulares e nódulos de Ranvier mais claros, quando comparado com o grupo controle. Ambos os grupos foram submetidos a lesão de secção total de nervo periférico.

Endo et al. (2008), observaram maior velocidade de regeneração axonal e de sua estrutura de sustentação no grupo tratado com laser Arsenieto de Gálio (904 nm, 20 W, largura de pulso de 180 ns e dose de 4 J/cm²), após lesão nervosa por esmagamento.

Rochkind et al. (2007) constatou que o grupo irradiado pelo laser (780nm e potência de 200mW) durante quatorze dias apresentou maior intensidade de crescimento axonal e maior mielinização axonal em nervos ciáticos após lesões de secção total seguida por operações de reconstrução utilizando-se de um neurotubo biodegradável.

Zhang et al.(2010) compararam três formas de tratamento para lesão completa de nervo ciático: transplante autólogo, laser terapêutico de baixa potência (660 nm) e ARSN (Acellular Rat Sciatic Nerve) e mostrou que em comparação com o ARSN grupo, a terapia com laser aumentou significativamente a velocidade de condução nervosa, a restauração do índice de massa muscular do tibial anterior, número de nervos mielinizados, proteínas CGRP e expressão de mRNA na medula espinhal L4 no local da lesão.

A literatura atual apresenta poucos estudos com laserterapia de baixa potência, principalmente em lesões nervosas por secção. Além disso, não há consentimento de qual parâmetro deve ser utilizado a fim de promover melhor reparo nervoso, o que torna difícil comparar os trabalhos entre si.

A metodologia empregada neste trabalho pode ser considerada adequada para alcançar os objetivos propostos. O modelo de lesão por secção total foi preferido neste estudo a uma lesão por esmagamento, pois esta última preserva a estrutura de sustentação do nervo, aumentando o prolongamento axonal, visto que os tubos neurais estão em continuidade, facilitando, assim, a regeneração (REIS et al., 2008). Varejão et al. (2004) observaram que houve aumento da densidade e número das fibras de axônios até três meses após a lesão nervosa por esmagamento. Além disso, o SFI aproxima-se do normal após aproximadamente sete semanas, sem intermédio de nenhuma forma de tratamento. Logo, formas de tratamento associadas ao modelo de secção total são mais fidedignas, reduzindo a hipótese de uma possível regeneração ter sido atribuída puramente aos mecanismos fisiológicos naturais e não aos efeitos do laser.

Além disso, o protocolo de tratamento escolhido foi iniciado 24 horas após a lesão, na tentativa de maximizar os efeitos potenciais do tratamento na regeneração de axônios, acelerar o retorno da acetilcolintransferase no núcleo motor e produção de oligodendrócitos e astrócitos (ANDERS, 2004). Shin et al. (2003), observaram que o LLLT teve efeito favorável nos estágios iniciais de recuperação após lesão do nervo ciático, pois aumentou a expressão da proteína associada ao crescimento (GAP-43), a qual está presente no sistema nervoso durante o desenvolvimento e nos processos regenerativos, sendo correlacionada com o número de brotamentos axonais e podendo, portanto sua identificação ser utilizada como um indicador de regeneração nervosa após lesão periférica. Logo, o LLLT é mais eficaz quando aplicado logo após o período pós-traumático. Além disso, a aplicação das terapias foi feita durante 15 dias não consecutivos, com pausas de dois dias por semana, simulando sessões da prática clínica.

6. Conclusão

Através dos resultados obtidos nesse trabalho, pode ser observado que o laser terapêutico com comprimento de onda 808 nm na fluência 50J/cm² e 10 J/cm² não foi eficaz na melhora do padrão de marcha e mielinização de axônios em ratos submetidos a lesão por secção do nervo ciático.

Por ser de uma tecnologia muito recente, a laserterapia necessita de melhor parametrização das variáveis para se obter os estímulos mais apropriados, pois muitos dos reais efeitos e limitações ainda não estão totalmente claros e há muita controvérsia sobre seu mecanismo de ação sobre os tecidos (ORTIZ, 2001). Entretanto, excelentes estudos abrem horizontes para esse campo, que no futuro levarão o indivíduo acometido por uma lesão nervosa a um retorno mais rápido às suas funções normais (BAXTER, 1997), evitando as conseqüências de uma imobilização prolongada, como a perda de massa muscular, bloqueio articular, entre outras ou mesmo comprometimento de atividades sociais e ocupacionais.

Estudos com metodologia similar e padronizada precisam ser realizados para que possamos estabelecer protocolos de tratamentos mais fidedignos e eficazes, e dessa forma, incorporá-los na prática clínica da fisioterapia.

7. Referências Bibliográficas

- ANDERS, JJ; GEUNA, S; ROCHKIND, S. Phototherapy Promotes Regeneration and Functional Recovery of Injured Peripheral Nerve. **Neurol Res.** 26: 233-239, 2004.
- BASFORD, JR. Low-energy laser therapy: controversies and new research findings. **Lasers in Surgery and Medicine.** 9: 1-5, 1989.
- BAIN, JR; MACKINNON, SE; HUNTER RT. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal and posterior tibial nerve lesions in the rat. **Plast Reconstr Surg** 83:129–138, 1989.
- BARBOSA, RI; MARCOLINO, AM; GUIRRO, RJ; MAZZER N; BARBIERI, CH; FONSECA, MR. Comparative effects of wavelengths of low-power laser in regeneration of sciatic nerve in rats following crushing lesion. **Lasers Med Sci** 25:423–430, 2010.
- BAXTER, G.D. Therapeutic lasers: theory and practice. **United States of America:** Ed. Churchill Livingstone, p.1-19. 1997
- ENDO, C; BARBIERI, CH; MAZZER, N; FASAN VS. A laserterapia de baixa intensidade acelera a regeneração de nervos periféricos. **Acta Ortop Bras.** 16(5):305-10, 2008.
- FERNANDES, M; VALENTE, SG; AMADO, D; FERNANDES, MJS; NAFFAH-MAZZACORATTI, MG; SANTOS, JBG; FALOPPA, F; LEITE, VM. Estudo comparativo entre enxerto autógeno e enxerto muscular coberto com tubo de veia autógeno em nervos tibiais de ratos wistar utilizando o fluoro-gold® como marcador neuronal. **Acta Ortop Bras** 15 2: 97-100, 2007.
- FERNANDES, M; VALENTE, SG; FERNANDES, MJS; FÉLIX, EPV; NAFFAH-MAZZACORATTI, MG; SCERNI, DA; SANTOS, JBG; FALOPPA, F; LEITE, VM. Bone marrow cells are able to increase vessels number during repair of sciatic nerve lesion. **Journal of Neuroscience Methods** 170:16–24, 2008.
- GIGO-BENATO, D. **Ação do laser de baixa intensidade e da eletroestimulação na regeneração nervosa periférica.** 2006.132p. Dissertação (Mestrado)-Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- GIULIANI, A; LORENZINI, L; GALLAMINI, M; MASSELLA, A; GIARDINO, L; CALZÀ, L. Low infra red laser light irradiation on cultured neural cells: effects on mitochondria and cell viability after oxidative stress. **BMC Complementary and Alternative Medicine.** 9:8, 2009.
- HADJIARGYROU, M.; McLEOD, K.; RYABY, J.P.; RUBIN, C. Enhancement of fracture healing by low intensity ultrasound. **Clinical orthopaedics and related research,** (355 Suppl):S216-29. Review, 1998.

- IHSAN, FR MOHAMMED; NUHAAL-MUSTAWFI, BVMS; LAITH, N; KAKA, MB. Promotion of Regenerative Processes in Injured Peripheral Nerve Induced by Low-Level Laser Therapy. **Photomedicine and Laser Surgery**. 25: 107-111, 2007.
- KARU, T.I. The science of low-power laser therapy. **Amsterdam: Copyringht**, 1998
- KARU, T.I.; LUBART, R.. Effects of low-power light on biological systems V. **Amsterdam, Netherlands: Proceedings of SPIE**, v.41, p.1-17, 2000.
- LUNDBORG, G. Enhancing posttraumatic nerve regeneration. **J Peripher Nerv Syst**. 7:139-140, 2002.
- MILORO, M; HALKIAS, LE; MALLERY, S; TRAVERS, S; RASHID, RG. Low Laser Effect On Neural Regeneration In Gore-Tex Tubes. **Oral Surg Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. 93:27-34, 2002.
- MONTE-RASO, VV; BARBIERI, CH; MAZZER, N; YAMASITA, AC; BARBIERI, G. Is the sciatic funcional index always reliable and reproducible? **J Neurosci Methods**. 170: 255-261, 2008.
- NOBLE, J; MUNRO, CA; PRASAD, VS; MIDHA, R. Analysis of upper and lower extremity peripheral nerve injuries in a population of patients with multiple injuries. **J Trauma** 45:116-122, 1998.
- OZAWA, Y; SHIMIZU, N; KARIYA, G; ABIKO, Y. Low-energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells. **Bone**. 22: 347-354, 1998.
- REIS, FA; BELCHIOR, ACG; NICOLAU, RA; FONSECA, TS; CARVALHO, PTC. Efeito da terapia com laser de arseneto de gálio e alumínio (660nm) sobre a recuperação do nervo ciático de ratos após lesão por neurotmese seguida de anastomose epineural: análise funcional. **Revista Brasileira de Fisioterapia**. 12: 215-21, 2008.
- RENNO, ACM.; McDONNELL, PA.; PARIZOTTO, NA; LAAKSO, EL. The Effects of Laser Irradiation on Osteoblast and Osteosarcoma Cell Proliferation and Differentiation *In Vitro*. **Photomedicine Laser Surg**. 25: 275-280, 2007.
- ROCHKIND, S; BARR-NEA, L; RAZON, N; BARTAL,A; SCHWARTZ, M. Stimulatory Effect of He-Ne Low Dose Laser on Injured Sciatic Nerves of Rats. **Neurosurgery**. 20: 843-847, 1987.
- ROCHKIND, S. Photoengineering of Neural Tissue Repair Processes in Peripheral Nerves and the Spinal Cord: Research Development with Clinical Applications. **Photomedicine and Laser Surgery**. 24: 151-17, 2006.
- ROCHKIND, S; SHAHAR, A; FLISS, D; EL-ANI, D; ASTACHOV, L; HAYON, T; ALON, M; ZAMOSTIANO, R; AYALON, O; BITON, IE; COHEN, Y; HALPERIN, R; SCHNEIDER, D; ORON, A; NEVO, Z. Development of a tissue-engineered composite implant for treating traumatic paraplegia in rats. **European Spine Journal**. 15: 234-245, 2006.

ROCHKIND, S; LEIDER-TREJO, L; NISSAN, M; SHAMIR, MH; KHARENKO, O; ALON, M. Efficacy of 780-nm Laser Phototherapy on Peripheral Nerve Regeneration after Neurotube Reconstruction Procedure (Double-Blind Randomized Study). **Photomedicine and Laser Surgery**. 25:137-143, 2007.

ROCHKIND, S. Phototherapy in peripheral nerve regeneration: From basic science to clinical study. **Neurosurg Focus**.v.26.n.2, 2009.

RODRIGUES, FJ; VALERO-CABRÉ, A; NAVARRO, X. Regeneration and functional recovery following peripheral nerve injury. **Drug Discov Today Dis Models** 1:177–185, 2004.

SHAMIR, MH; ROCHKIND, S; SANDBANK, J; ALON, M. Double-blind randomized study evaluating regeneration of the rat transected sciatic nerve after suturing and postoperative low power laser treatment. **J Reconstr Microsurg** .17:133–138, 2001.

SHIN, DH; LEE, E; HYUN, J; LEE, SJ; CHANG, YP; KIM, J. Growth-associated protein-43 is elevated in the injured rat sciatic nerve after low power laser irradiation. **Neuroscience Letters**.344:71-74, 2003.

SUNDERLAND S. The anatomy and physiology of nerve injury. **Muscle Nerve** 13:771–784, 1991.

VAREJÃO, AS; CABRITA, AM; MEEK, MF; BULAS-CRUZ, J; MELO-PINTO, P; RAIMONDO, S; GEUNA, S; GIACOBINI-ROBECCHI, MG. Functional and Morphological Assessment of a Standardized Rat Sciatic Nerve Crush Injury with a Non-Serrated Clamp. **Journal of Neurotrauma**. 21: 1652–1670, 2004.

WINER, B.J. **Statistical principles in experimental design**. McGraw-Hill, 3ed, 1991.

ZHANG, LX; TONG, XJ; YUAN, XH; SUN, XH; JIA, H. Effects of 660-nm Gallium–Aluminum–Arsenide Low-Energy Laser on Nerve Regeneration After Acellular Nerve Allograft in Rats. **Synapse**. 64:152–160, 2010.



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO/HOSPITAL SÃO PAULO

Data: 11-10-2009 10:10:47
 Página: 1/2
 At = 0297

São Paulo, 02 de Outubro de 2009
 CEP 1485/09

Ilmo(s). Sr(a).
 Pesquisador(a) Ana Claudia Renno
 Co-investigadores: Ana Claudia Renno
 Disciplina/Departamento Eletrotermofototerapia da
 Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo
 Patrocinador (Recursos Próprios)

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado:
 "Comparação dos efeitos do laser terapêutico 660 e 808 nm, utilizado em diferentes fluências, na regeneração nervosa após
 secção total do nervo ciático em ratos

CARACTERÍSTICA DO ESTUDO: EXPERIMENTAL - CATEGORIA C - ESTUDO CRÔNICO

OBJETIVOS: Verificar os efeitos do laser terapêutico de baixa potência 808nm e do laser de 660nm, utilizado em 2 fluências no processo de regeneração nervosa após secção total do nervo ciático em ratos.

RESUMO: Trabalho experimental, que será realizado no laboratório Multidisciplinar do departamento de biociências da UNIFESP, Baixada Santista. Serão utilizados 40 ratos da linhagem Wistar com 3 meses provenientes do CEDEME- Biotério da UNIFESP. Os animais serão anestesiados por ketamina e xilazina. Após a cirurgia será administrado antibiótico (composto de ampicilina e penicilina) anti-inflamatório e analgésico por cinco dias. Os animais serão divididos em 5 grupos de 8 animais cada onde haverá um grupo controle e 4 grupos que receberão tratamento com laser a diferentes medidas.

FUNDAMENTAÇÃO RACIONAL: Fundamentação apresentada

MATERIAL E MÉTODO: Materiais e métodos adequadamente descritos

DETALHAMENTO FINANCEIRA: Sem financiamento externo

CRONOGRAMA: 12 meses

OBJETIVO ACADÊMICO: Graduação

PRIMEIRO RELATÓRIO PREVISTO PARA: 07/10/2010, os demais relatórios deverão ser entregues ao CEP anualmente até o término do estudo

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo ANALISOU e APROVOU o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO/HOSPITAL SÃO PAULO

Data: 11-11-2022 10:26:47
Página: 07
de = 0207

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'José Omar Medina Pestana', is written over a faint, illegible background.

Prof. Dr. José Omar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

