



Acta Ortopédica Brasileira

ISSN: 1413-7852

actaortopedicabrasileira@uol.com.br

Sociedade Brasileira de Ortopedia e  
Traumatologia  
Brasil

Endo, Cristina; Barbieri, Cláudio Henrique; Mazzer, Nilton; Fasan, Valéria S.  
A Laserterapia de baixa intensidade acelera a regeneração de nervos periféricos  
Acta Ortopédica Brasileira, vol. 16, núm. 5, 2008, pp. 305-310  
Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia  
São Paulo, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=65713429011>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica  
Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal  
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto



## ARTIGO ORIGINAL

# A LASERTERAPIA DE BAIXA INTENSIDADE ACELERA A REGENERAÇÃO DE NERVOS PERIFÉRICOS

## LOW-POWER LASER THERAPY ACCELERATES PERIPHERAL NERVES' REGENERATION

CRISTINA ENDO<sup>1</sup>, CLÁUDIO HENRIQUE BARBIERI<sup>2</sup>, NILTON MAZZER<sup>3</sup>, VALÉRIA S. FASAN<sup>3</sup>

### RESUMO

Há evidências de que a terapia com o laser pode estimular a regeneração de nervos e esta hipótese foi testada em ratos. Uma lesão por esmagamento controlado foi produzida no nervo isquiático de 20 ratos Wistar, metade dos quais foram submetidos a irradiação efetiva com o laser de arseneto de gálio (AsGa) e a outra metade a irradiação simulada, durante dez dias consecutivos, começando no primeiro dia pós-operatório. Os resultados foram avaliados com três semanas pela medida do índice funcional do isquiático (IFC) em intervalos semanais e pela medida do número total de fibras nervosas e da densidade de fibras dos nervos, após o sacrifício dos animais na terceira semana, com o nível de significância de 5% ( $p < 0.05$ ). Observou-se melhora progressiva do IFC tanto nos nervos irradiados como nos controles (69% e 45%, respectivamente), com diferença significativa entre ambos na segunda semana ( $p = 0.04$ ). A densidade de fibras aumentou para os nervos irradiados e diminuiu para os nervos controle, a diferença entre ambos sendo significativa ( $p = 0.001$ ). Os autores concluem que a terapia com o laser de baixa intensidade efetivamente acelera a regeneração do nervo isquiático do rato.

**Descritores:** Regeneração nervosa; Síndrome de esmagamento; Terapia a laser; Nervo ciático.

### SUMMARY

There are evidences that laser therapy may stimulate nerve regeneration and this hypothesis was tested in rats. A crush injury was produced on the sciatic nerve of 20 Wistar rats, which submitted to effective Ga-As laser irradiation and the other half to simulated irradiation for 10 consecutive days, starting on the first postoperative day. Results were evaluated postoperatively by measuring the sciatic functional index (SFI) at weekly intervals and the total number of nerve fibers and fiber density of the sciatic nerve at three weeks (postoperative) progressively improved for both irradiated and control nerves (69% and 45%, respectively) with a significant difference at two weeks ( $p = 0.04$ ). Nerve fiber density increased for irradiated nerves and decreased for the control nerves, the differences between them ( $p = 0.001$ ). Low intensity laser therapy accelerates nerve regeneration, as demonstrated by significance on the 21st postoperative day.

**Keywords:** Nerve regeneration; Crush syndrome; Laser therapy; Sciatic nerve.

**Citação:** Endo C, Barbieri CH, Mazzer N, Fasan VS. A laserterapia de baixa intensidade acelera a regeneração de nervos periféricos. *Acta Ortop Bras*. [periódico na Internet]. 2008; 16(5):305-10. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/aob>.

**Citation:** Endo C, Barbieri CH, Mazzer N, Fasan VS. Low-power laser therapy accelerates peripheral nerves' regeneration. *Acta Ortop Bras*. [Internet]. 2008; 16(5): 305-10. Available from URL: <http://www.scielo.br/aob>.

### INTRODUÇÃO

Muitas linhas de evidência mostraram que a regeneração de nervos periféricos pode ser acelerada por agentes físicos como eletricidade, campo magnético e ultra-som. A terapia com laser também tem sido estudada em relação a um possível papel positivo nesse campo particular, as primeiras investigações sendo direcionadas às alterações da condução do estímulo nervoso, com a demonstração eletrofisiológica da diminuição do tempo de latência e do aumento da velocidade de condução em nervos normais, tanto em animais<sup>(1)</sup> como em humanos<sup>(2-4)</sup>. Entretanto, alguns autores não observaram nenhuma alteração na condução nervosa em humanos<sup>(5)</sup> ou em animais<sup>(6-8)</sup>, ou na liberação de neurotransmissores na placa motora, em camundongos<sup>(9)</sup>, desse modo mantendo a dúvida quanto a um papel de estimulação do laser sobre os nervos.

No que se refere à regeneração após algum tipo de lesão, tem havido relatos de efeitos benéficos, tais como o aumento na amplitude dos potenciais de ação e a redução do tecido cicatricial ao

redor do nervo<sup>(10)</sup>, intensas respostas positivas sob forma de axônios regenerados<sup>(11,12)</sup> e recuperação morfológica mais rápida<sup>(13)</sup>. Por outro lado, efeitos deletérios também foram demonstrados, como uma taxa percentual menor de regeneração traduzida por uma organização ultraestrutural menos organizada, menor área de secção transversal e menor número de fibras mielinizadas nos nervos irradiados em comparação com os nervos submetidos a irradiação simulada<sup>(14)</sup>, levando à conclusão de que a irradiação com o laser pulsado pode ter efeitos supressores na regeneração dos nervos periféricos.

A despeito da fácil disponibilidade atual do laser terapêutico, sua tendência de se tornar de uso generalizado no tratamento das lesões traumáticas de vários tecidos, seus efeitos sobre a regeneração dos nervos periféricos ainda são controversos e precisam ser precisamente determinados, antes que ele possa ser utilizado em larga escala. Foi, então, o propósito da presente investigação

Trabalho desenvolvido no Programa de Pós-graduação Inter-unidades Bioengenharia FMRP-EESC-IQSC-USP. Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação Locomotor (Laboratório de Bioengenharia), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Endereço de correspondência: Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP - Caixa Postal 261 - CEP 14049-900 - Ribeirão Preto SP BRASIL - E-mail: [chbarbie@fmrp.usp.br](mailto:chbarbie@fmrp.usp.br)

1. Fisioterapeuta. Aluna do Programa de Pós-graduação Interunidades Bioengenharia - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo.



a influência da irradiação com laser de arseneto de gálio (AsGa) de baixa intensidade sobre a regeneração do nervo isquiático de ratos, usando um modelo de lesão grave por esmagamento controlado e avaliando comparativamente a recuperação funcional e morfológica.

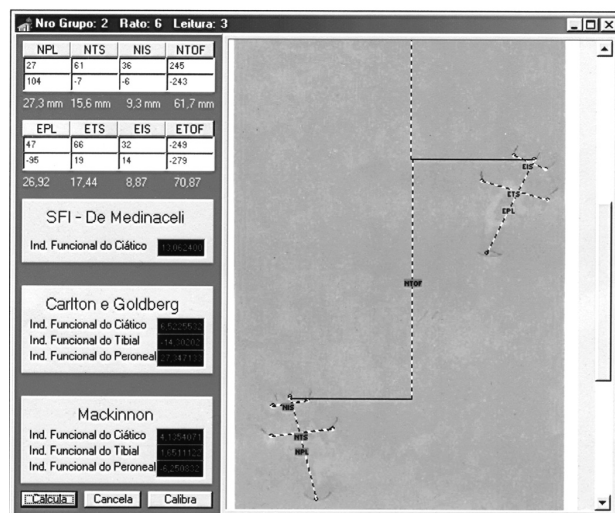
## MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no uso Experimental de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Vinte ratos Wistar machos com peso médio de 325 g (variação: 300 – 350 g) foram usados e mantidos em gaiolas individuais antes e após a operação, com acesso livre à água e ao alimento. Antibiotico-terapia profilática foi feita com uma dose única pré-operatória de Penicilina-procaína (400.000 UI) por meio de injeção subcutânea. Os animais foram divididos randomicamente em dois grupos, de acordo com o procedimento realizado:

Grupo 1: lesão por esmagamento, irradiação simulada com o laser (n=10);

Grupo 2: lesão por esmagamento, irradiação efetiva com o laser (n=10).

Procedimentos pré-operatórios: imediatamente antes da operação, os ratos eram treinados, por tentativas repetitivas, a caminhar numa passarela de madeira de análise da marcha (43 cm de comprimento, 8,7 cm de largura, uma casinhola escura no final), até que eles pudessem caminhar direta e rapidamente em direção ao abrigo da casinhola. Em seguida, três pares de pegadas das patas traseiras eram obtidas em tiras de papel impregnado com azul de bromofenol diluído a 1% em acetona, previamente preparadas, de acordo com o método proposto por De Medinaceli et al.<sup>(15,16)</sup> e modificado por Lowdon et al.<sup>(17)</sup>. O papel impregnado com o azul de bromofenol torna-se amarelo depois de seco, mas torna-se imediatamente azul quando em contato com a água ou qualquer solução aquosa. Ao invés de água, as patas traseiras dos animais eram imersas em detergente doméstico comum, que evita dispersão da impressão. As tiras de papel contendo as pegadas eram deixadas a secar e copiadas com um scanner de alta resolução. As pegadas digitalizadas eram armazenadas e analisadas no computador por meio de um programa gráfico especialmente desenvolvido para esse fim, permitindo o manuseio das pegadas e o cálculo automático do Índice Funcional do Cíatico (IFC)<sup>(18)</sup>. As pegadas obtidas no período pré-operatório constituíam o parâmetro normal para futuras comparações (Figura 1).



Procedimento operatório: sob anestesia geral com injeção intra-peritoneal de pentobarbital sódico (Nerv 60 mg/kg de peso corporal) e após preparação rotineira operatória (tricotomia, anti-sepsia com solução alcoólica 20%), o nervo isquiático direito era exposto através de uma incisão cutânea longitudinal pósterio-lateral na face lateral da coxa e por dissecação romba dos planos musculares, expondo o glúteo máximo e o quadríceps. O nervo era descolado cuidadosamente dos vizinhos somente no seu terço médio, onde uma lesão era feita com uma lâmina de 5 mm de comprimento era produzida, tão quanto possível a 5 mm distal à sua emergência, com uma agulha de ponto marcado com um ponto de sutura epineural para facilitar a identificação posterior (Prolene Ethicon). A lesão era terminando cerca de 5 mm acima da sua divisão em três nervos principais (nervos tibial, peroneo e sural). Uma cânula de 15.000 g era aplicada por 10 minutos, com uma pinça especialmente desenvolvida e construída para esse fim, numa máquina universal de ensaios após o uso com cinco animais. A lesão infligida ao nervo era propositalmente uniforme, para tornar a regeneração espontânea mais fácil. Para facilitar as comparações entre os nervos irradiados e os não irradiados, o nervo isquiático era cuidadosamente destachado e colocado de volta no seu leito original, e a ferida era fechada em camadas. Uma solução anti-séptica era aspergida na ferida, mas nenhum curativo era aplicado. Todos os passos da operação eram idênticos para os dois grupos experimentais. Irradiação com o laser: Foi usado um equipamento comercialmente disponível de irradiação pulsada (com comprimento de onda 904 nm, potência de pico de 20 W, largura de pulso de 10 ns, frequência de 1 MHz e dose de 4 J/cm<sup>2</sup>) de uso clínico. A área de irradiação foi de 0,07 cm<sup>2</sup> e durou 10 minutos, numa região de pele intacta, bem sob o ponto de lesão do nervo. A irradiação foi iniciada no primeiro dia pós-operatório e repetida diariamente por dez dias consecutivos. A lesão foi realizada tanto na coxa direita como na esquerda. O nervo isquiático esquerdo foi tomado como controle. No Grupo 1 (irradiação simulada), o equipamento foi mantido durante todo o tempo de aplicação, enquanto que no Grupo 2 permaneceu ligado desde o início, de modo que pudesse ser usado em comum apenas o efeito de massagem tecidual. Obtenção e análise das pegadas: as pegadas das patas traseiras eram obtidas a intervalos de sete dias, até o 21º dia pós-operatório. Os dados eram calculados automaticamente pelo programa de computador desenvolvido para esse fim, como já descrito em outras publicações, incluindo os parâmetros propostos por De Medinaceli et al.<sup>(15,16)</sup> e modificado por Bain et al.<sup>(21)</sup> e que são: 1) comprimento da pegada, ou a distância máxima entre a ponta do dedão e o calcanhar (PL, de *print length*); 2) abertura total da pegada, ou a distância transversal entre o primeiro e o quinto dedos (*spread*); e 3) dedos intermediários, ou a distância transversal entre o segundo e o quarto dedos (IT, de *intermediate toe*). Esses valores eram inseridos na fórmula:

$$SFI = -38.3 \times \frac{EPL - NPL}{NPL} + 109.5 \times \frac{ETS - NTS}{NTS} + 13.3 \times \frac{EIS - NIS}{NIS}$$

Foram estabelecidas comparações entre as pegadas pré-operatórias e as pós-operatórias e entre as pegadas das patas traseiras e operadas.

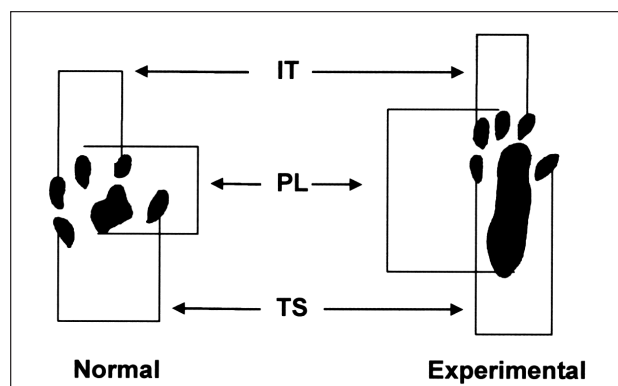
Análise histológica e morfométrica dos nervos: os ratos mortos com uma injeção intra-peritoneal de uma dose letal de anestésico (pentobarbital sódico, 120 mg/kg) e os ratos com os nervos isquiáticos direito e esquerdo foram removidos através de uma incisão pósterio-lateral da coxa. O nervo isquiático direito era dividido em três segmentos de 5 mm de comprimento, sendo o



identificados e fixados individualmente com uma solução aquosa tamponada (tampão fosfato a 0,1 M) de glutaraldeído a 2,5 % por duas horas a 6°C e pós-fixados com tetróxido de ósmio a 2% por 12 horas à temperatura ambiente, após o que eram desidratados em soluções aquosas de álcool etílico de concentrações crescentes, de 25% ao absoluto, a intervalos de 25%, por uma hora cada. Em seguida, os segmentos eram incluídos em resina epóxi (EPON-812) a 60°C por 72 horas. Cada segmento foi inteiramente fatiado em cortes seriados de 5  $\mu$ m de espessura com um ultra-microtomo (MT 6000-XL, RMC Inc.), de modo que foram obtidos cerca de 1.000 cortes de cada um; destes, 200 eram examinados (1:5) e 20 foram efetivamente contados (1:50). Os segmentos proximais e distais dos nervos isquiáticos direitos, bem como os segmentos intermediários dos nervos isquiáticos esquerdos, foram submetidos ao mesmo procedimento, mas apenas 10 cortes (1:100) foram efetivamente contados. Os cortes foram corados com azul de toluidina a 1% e examinados ao microscópio de luz (Zeiss Axiophoto), equipado com uma câmera de vídeo (JVC-TK1270) conectada a um micro-computador carregado com o programa KS 400 Measure Interactive versão 2.0.

O primeiro passo da análise morfométrica consistia da captura da imagem de cada fascículo individual, com o maior aumento possível para que ela coubesse inteiramente na tela do monitor, sendo feita, então, a medida da área fascicular (aumento: objetiva 2,5X, optovar 1.6X, câmera 0,5X); cortes com artefatos de técnica grosseiros (rachaduras, dobras, coloração pobre) eram descartados nessa fase. O próximo passo consistia da captura sequencial de áreas internas de cada fascículo (aumento: objetiva 100X, optovar 1,6X, câmera 0,5X), que eram convertidas em imagens binárias (preto e branco) e limpas de qualquer vaso sanguíneo, fibras degeneradas e artefatos. As fibras mielinizadas individuais eram contadas e a densidade de fibras (fibras/mm<sup>2</sup>) automaticamente calculada. A densidade de fibras correspondia à soma das densidades de cada fascículo, em cada um dos cortes histológicos. Foi, então, calculado um valor médio para as densidades medidas nos vinte cortes de cada segmento do nervo (dez no nervo isquiático esquerdo, de controle).

Os valores do IFC foram submetidos à análise estatística pelo teste *t* de Student, no nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ), usando o programa SigmaStat® versão 2.03. Os valores da morfometria foram analisados pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney, no mesmo nível de significância.



**Figura 2** - Desenho esquemático dos parâmetros do IFC medidos numa pegada normal e outra experimental.

## RESULTADOS

Tanto no Grupo 1 (irradiação simulada) como no Grupo 2 (irradiação efetiva), os animais apresentaram grave deformidade em

mal ao longo de todo o período de observação. Tanto como o apoio melhoraram lentamente na pata traseira duas semanas seguintes, mas não chegaram a valores normais até o 21<sup>o</sup> dia, quando os animais eram sacrificados e os isquiáticos removidos para os estudos histológico e morfométrico. O exame macroscópico dos nervos mostrou que, quando tivessem recobrado o diâmetro, ainda era possível identificar a local da lesão pela sua aparência, começando na sutura epineural de fio de cor azul, facilmente visível após a passada.

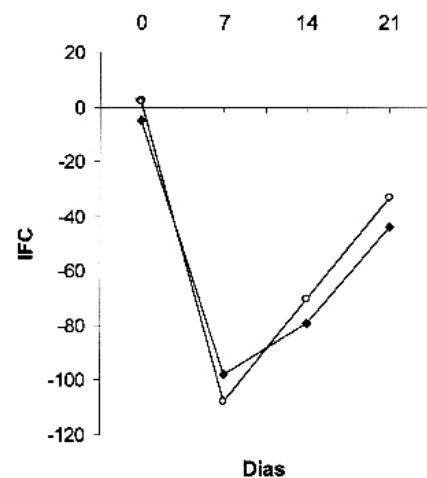
Índice funcional do isquiático: foram analisadas as pegadas sendo 80 da pata traseira direita e 40 da esquerda antes das impressões pré-operatórias e do 7<sup>o</sup>, 14<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dias pós-operatório. O IFC pré-operatório médio para a pata traseira direita foi de -108,11 (variação: -128,71 a -81,7) e -108,11 (variação: -128,71 a -81,7) no Grupo 1 (n=10), e -108,11 (variação: -128,71 a -81,7) no Grupo 2 (n=10), sem diferença significativa entre ambos ( $p=0,65$ ).

No 7<sup>o</sup> dia pós-operatório, as pegadas eram mais longas do que as pré-operatórias, em ambos os grupos, com o animal usando tanto o calcanhar como os dedos encostados para apoiar. O IFC médio foi de -98,16 (variação: -118,16 a -78,16) para o Grupo 1, e -108,11 (variação: -128,71 a -81,7) para o Grupo 2, sem diferença significativa entre ambos ( $p=0,10$ ).

No 14<sup>o</sup> dia pós-operatório, as pegadas se tornaram mais curtas e largas e o IFC médio foi de -79,50 (variação: -99,50 a -59,50) para o Grupo 1, e -70,04 (variação: -90,04 a -50,04) para o Grupo 2, a diferença entre ambos sendo significativa ( $p=0,05$ ). Finalmente, no 21<sup>o</sup> dia, as pegadas se tornaram ainda mais curtas e largas, embora menos do que o normal, e o IFC médio foi de -44 (variação: -57,1 a -21,61) para o Grupo 1, e -30,44 (variação: -53,62 a -3,04) para o Grupo 2, sem diferença significativa entre ambos ( $p=0,065$ ).

Esses resultados significam que, no período de observação, houve uma melhora do IFC de 45% para o Grupo 1, visto que ele aumentou de -98,11 na primeira semana para -44 na terceira. Já no Grupo 2, o IFC aumentou de -108,11 no mesmo período, significando uma melhora de 61% daquela observada no Grupo 1 (Figura 3).

Estudos histológicos e morfométricos: a morfologia dos nervos era absolutamente normal nos nervos isquiáticos esquerdos, apresentando o aspecto típico de fibras mielinizadas de vários diâmetros, variando de dois a quatro fascículos. O aspecto histológico era essencialmente normal nos segmentos proximais

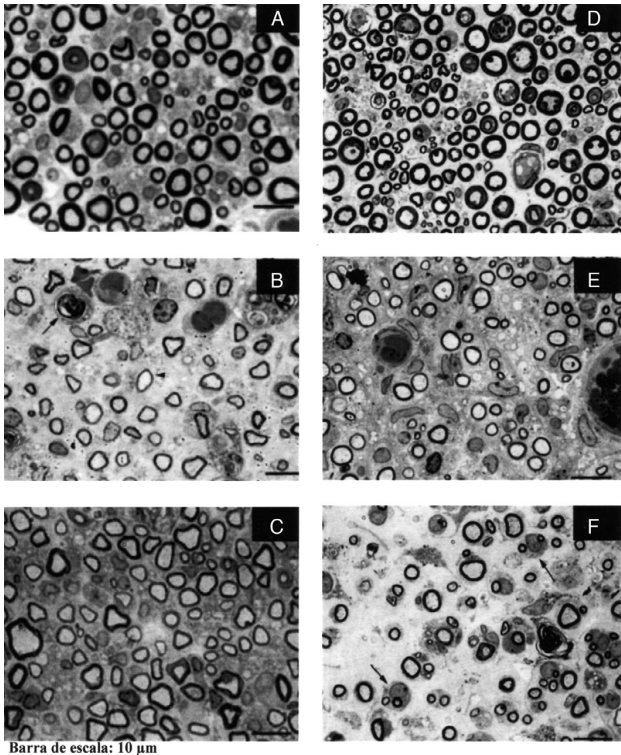


isquiático direito, nos dois grupos experimentais, com a distribuição regular de fibras nervosas de pequeno e grande diâmetro e uma proporção aparentemente normal entre a espessura das bainhas de mielina e o diâmetro das fibras; numerosas fibras não-mielinizadas, vasos sangüíneos intraneurais e fibroblastos também eram observados.

Nos segmentos proximal e intermediário (local da lesão), os vasos sangüíneos eram mais numerosos e de maior calibre para o Grupo 2 do que para o Grupo 1. Fibras de grande diâmetro com bainha de mielina muito fina predominavam no segmento intermediário, nos dois grupos. Células de Schwann com o núcleo de aspecto reacional, característico de atividade de síntese, bem como figuras características de brotamento axonal (*sprouting*) eram mais freqüentes no Grupo 2, ao passo que a degeneração Walleriana era mais evidente no Grupo 1.

Para ambos os grupos, no segmento distal predominavam fibras de pequeno diâmetro e bainha de mielina fina, embora fibras de grande diâmetro e bainha de mielina espessa também fossem freqüentes no Grupo 2, ao lado de muitas células de Schwann com núcleo de aspecto reacional e de figuras de brotamento axonal. Nesse segmento, a degeneração Walleriana não era tão evidente para o Grupo 1 (Figura 4).

Os resultados da morfometria estão sumarizados na Tabela 1. No Grupo 1, o número total médio de fibras contadas foi de 8.851, 7.057 e 6.268, nos segmentos proximal, intermediário e distal, respectivamente. A densidade média de fibras nos segmentos proximal,

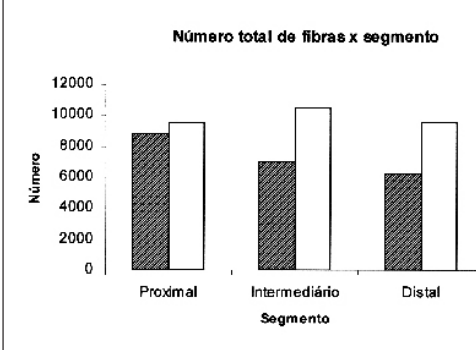


**Figura 4** - Fotomicrografia de cortes histológicos de segmentos proximais, intermediários e distais de nervos do Grupo 1 (A, B, C) e do Grupo 2 (D, E, F), respectivamente. Aspecto normal dos segmentos proximais tanto no Grupo 1 (A) como no Grupo 2 (D), com fibras nervosas de grande e pequeno diâmetro com bainha de mielina de espessura proporcional, e vasos sangüíneos ocasionais. Segmentos intermediários com predomínio de fibras nervosas de grande diâmetro e bainha de mielina fina em ambos os grupos (B e E), algumas delas sofrendo degeneração Walleriana (B, seta) e algumas mostrando

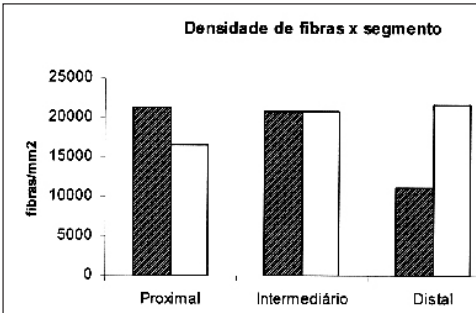
intermediário e distal foi de 21.268, 20.848 e 11.103, respectivamente, com diferença significativa entre o segmento proximal e intermediário e o segmento distal ( $p=0,001$ ). O número total médio de fibras foi de 9.528, 10.488 e 10.488 nos segmentos proximal, intermediário e distal, respectivamente. A densidade média de fibras nos segmentos proximal, intermediário e distal foi de 16.667, 20.727 e 21.588 fibras/mm<sup>2</sup>, respectivamente, com diferença significativa entre o segmento proximal e intermediário e o segmento distal ( $p=0,04$ ) (Figuras 5 e 6). As diferenças observadas para o número total de fibras e para a densidade de fibras entre segmentos

**Tabela 1** - Número total e densidade de fibras nervosas nos segmentos proximal, intermediário e distal do nervo isquiático, nos Grupos 1 e 2.

	Grupo 1			Grupo 2	
	prox.	interm.	dist.	prox.	interm.
Número total de fibras (média ± dp)	8.851 ± 3.055	7.057 ± 3.283	6.268 ± 2.501	9.528 ± 2.220	10.488 ± 2.593
Mediana	7.639	6.773	6.676	9.059	9.059
Densidade de fibras (média ± dp)	21.268 ± 8.309	20.848 ± 10.018	11.103 ± 3.115	16.667 ± 2.593	20.727 ± 2.593
Mediana	18.116	19.184	11.120	16.308	16.308



**Figura 5** - Distribuição do número total de fibras nervosas nos segmentos proximal, intermediário e distal do nervo isquiático, nos Grupos 1 e 2.





dos Grupos 1 e 2 não foram significantes ( $p=0,23$  e  $p=0,11$ , respectivamente). Nos segmentos intermediários (local da lesão), o número total de fibras contadas foi significativamente maior no Grupo 2 ( $p=0,05$ ), mas a densidade de fibras não ( $p=0,97$ ). Nos segmentos distais, tanto o número total como a densidade de fibras foram significativamente maior no Grupo 2 ( $p=0,02$  e  $0,001$ , respectivamente).

Para os nervos isquiáticos esquerdos intactos, a densidade de fibras mielinizadas foi em média de 20.256 fibras/mm<sup>2</sup> (variação: 15.702 – 23.554 fibras/mm<sup>2</sup>) no Grupo 1, e de 21.403 fibras/mm<sup>2</sup> (variação: 14.667 – 23.786 fibras/mm<sup>2</sup>) no Grupo 2, com distribuição aparentemente normal de fibras de diferentes diâmetros, mas com predominância de fibras de pequeno diâmetro.

## DISCUSSÃO

Comparado com o ultra-som terapêutico, sabe-se muito pouco sobre o papel da irradiação com o laser no tratamento de reabilitação dos tecidos do aparelho locomotor. Entretanto, a irradiação com o laser é muito empregada para tratar uma variedade de condições patológicas do sistema músculo-esquelético, inclusive os nervos periféricos. Que a irradiação com o laser interfere de algum modo com a função do nervo parece ser um fato, de acordo com a demonstração de que ele diminui o tempo de latência e aumenta a velocidade da condução nervosa<sup>(1,4)</sup>. Também, a despeito de poucas demonstrações em contrário<sup>(14)</sup>, há evidências experimentais de que o laser tem um efeito positivo na regeneração de nervos lesados<sup>(10-13,22-24)</sup>, o que encorajou o seu emprego em humanos. Todavia, as conclusões de tais estudos ainda parecem ser incompletas e controversas, o que estimulou ao desenvolvimento da presente investigação para analisar se de fato a irradiação com o laser de arseneto de gálio de baixa intensidade pode estimular a regeneração de um importante tronco nervoso, o nervo isquiático, utilizando um modelo de lesão grave por esmagamento em ratos, cuja recuperação natural é muito rápida, e analisando os resultados do ponto de vista funcional e do morfométrico.

Num trabalho experimental, nervos periféricos em regeneração são usualmente avaliados por meio de estudos histológicos, morfométricos e eletrofisiológicos, os quais não adiantam nenhuma informação sobre a recuperação funcional. Por outro lado, a avaliação funcional em animais é sempre difícil, por razões óbvias, mas o IFC desenvolvido por De Medinaceli et al.<sup>(15,16)</sup> e modificado por Bain et al.<sup>(21)</sup> permite uma avaliação quantitativa muito precisa da recuperação funcional do nervo isquiático de ratos, praticamente em qualquer tipo de investigação. Além disso, trata-se de um método com o qual os autores estão muito afeitos, por terem-no empregado em várias investigações anteriores, por meio das quais ficou evidente uma forte correlação com os resultados dos estudos morfométricos<sup>(18-20,25,26)</sup>.

Comparado com a secção seguida de neurografia convencional, a lesão por esmagamento realizada na presente investigação tem a vantagem de preservar pelo menos em parte a estrutura de suporte do nervo, assim favorecendo a regeneração<sup>(15,18-20,27,28,29)</sup>. A carga de 15.000 g aplicada ao nervo isquiático por dez minutos produz um lesão grave provavelmente do tipo 4 de Sunderland, cuja regeneração é lenta, difícil e freqüentemente incompleta; é, portanto, uma lesão adequada para os propósitos da investigação proposta, com resultados a serem avaliados no curto prazo. De fato, as diferenças entre os nervos tratados e não-tratados são mais fáceis de detectar numa fase precoce da recuperação (21 dias de pós-operatório), pois a recuperação espontânea normalmente observada em ratos tende a tornar qualquer comparação mais

o IFC foi virtualmente o mesmo para os nervos irradiados e de controle, na primeira semana pós-operatória, mas a recuperação de forma mais acentuada para os primeiros nas semanas subsequentes, embora a diferença entre ambos não foi significativa na segunda semana. De qualquer modo, houve uma diferença de 69% entre a primeira (1ª semana) e a segunda (2ª semana) avaliação para os nervos irradiados, em comparação com a diferença de apenas 45% para os nervos de controle. O número total médio de fibras contadas diminuiu progressivamente para os nervos de controle, da primeira até a terceira semana, enquanto para os nervos irradiados aumentou discretamente da primeira para a segunda, da segunda para a terceira, para os nervos irradiados. A média de fibras seguiu essa tendência e diminuiu progressivamente da primeira até a terceira semana nos nervos de controle, enquanto para os nervos irradiados houve uma grande diminuição da segunda para a terceira semana, o que para os nervos irradiados ela aumentou progressivamente. A densidade de fibras aumentada no segmento distal dos nervos irradiados acompanhou a melhora do IFC e só pode ser explicada pelo brotamento de fibras (*sprouting*), provavelmente induzido pela irradiação com o laser, o qual também pode ter contribuído para o aumento das células de Schwann francamente ativas nesses segmentos.

Fato intrigante foi a densidade de fibras evidentemente aumentada no segmento proximal dos nervos irradiados (16.667 fibras/mm<sup>2</sup>), embora sem significância estatística. De início se pensou que esta poderia estar ligada ao tipo de animal empregado no experimento. O achado foi explicado pelo relativo aumento da área do segmento proximal do nervo, devido ao edema intersticial ou congestão, por haver ali paralelamente um maior número de vasos sanguíneos. O aumento do diâmetro do que nos nervos não irradiados. Assim, o aumento da área aconteceu nos nervos irradiados foi que havia um aumento da área de fibras nervosas distribuídas numa área maior, o que não reduziu a densidade. O aumento do número de vasos sanguíneos nos nervos irradiados provavelmente resulta de efeito da irradiação com o laser.

O estudo histológico mostrou que as fibras de pequeno diâmetro de bainha de mielina igualmente fina predominaram no segmento distal dos nervos irradiados, ao lado de fibras de grande diâmetro e bainha de mielina de espessura regular, típicas dos nervos de controle. Para os nervos de controle, predominantemente de grande diâmetro e bainha de mielina fina, caracterizada por degeneração. Foi também importante o achado de um aumento das células de Schwann com o núcleo reacional, com síntese protéica, tanto nos nervos irradiados como nos nervos de controle, mais nos primeiros, demonstrando intensa atividade regenerativa, provavelmente como resultado da irradiação com o laser, embora por mecanismo ainda por ser explicado.

A regeneração dos nervos periféricos depende da resposta neuronal ao traumatismo ou doença, e não da resposta do sistema de suporte. É a via para que o axoplasma produzido no corpo celular migre para os órgãos-alvo (fibras musculares, terminações sensoriais e sangüíneas) e promova sua recuperação funcional. A regeneração, como produzido na presente investigação, é a regeneração dos axônios, que são ou restaurados ou substituídos por novos axônios, no processo natural de regeneração. A regeneração observada com a irradiação com o laser pode ter sido devida a um efeito local, acelerando a regeneração do axônio e de sua estrutura de sustentação, assim como a progressão do axoplasma regenerado. Tal efeito pode ser mediado por fatores de crescimento de ação local, ou por ser afastada a possibilidade de que o laser também libere mediadores químicos e quimiotáticos.



de baixa intensidade influenciou positivamente a regeneração do nervo isquiático do rato após grave lesão por esmagamento. Assim, ela pode ser útil no tratamento de uma variedade de lesões patológicas dos nervos periféricos em humanos, com dose ainda por ser estabelecida, com a vantagem de que o laser é virtualmente destituído de efeitos deletérios.

## Agradecimentos

Os autores agradecem ao Prof. Amilton Antunes Barreto, do Departamento de Neurologia, Psiquiatria e Psicologia Médica, pela gentil permissão para usar as instalações e equipamentos do Laboratório de Neurociências, e ao Sr. Antônio Renato de Azevedo e à Sra. Maria Cristina Lopes Schiavoni, pela assistência técnica.



## REFERÊNCIAS

1. Nissan M, Rochkind S, Razon N, Bartal A. HeNe Laser irradiation delivered transcutaneously: its effect on the sciatic nerve of rats. *Lasers Surg Med.* 1986; 6: 435-8.
2. Basford JR, Daube JR, Hallman HO, Millard TL, Moyer SK. Does low-intensity helium-neon laser irradiation alter sensory nerve active potentials or distal latencies? *Laser Surg Med.* 1990; 10:35-9.
3. Basford JR, Hallman HO, Matsumoto JY, Moyer SK, Buss JM, Baxter GD. Effects of 830nm continuous wave laser diode irradiation on median nerve function in normal subjects. *Lasers Surg Med.* 1993; 13:597-604.
4. Lowe AS, Baxter GD, Walsh DM, Allen JM. Effect of low intensity laser (830nm) irradiation on skin temperature and antidromic conduction latencies in the human median nerve: Relevance of radiant exposure. *Lasers Surg Med.* 1994; 14:40-6.
5. Wu W, Ponnudurai R, Katz J, Pott CB, Chilcoat R, Uncini A, et al. Failure to confirm light-evoked response of peripheral nerve to low power helium-neon laser light stimulus. *Brain Res.* 1987; 401:407-8.
6. Jarvis D, MacIver MB, Tanellian DL. Electrophysiologic recording and thermodynamic modeling demonstrate that Helium-Neon laser irradiation does not affect peripheral A-gamma or C fibers nociceptors. *Pain.* 1990; 43:235-42.
7. Bagis S, Comelekoglu U, Sahin G, Buyukakilli B, Erdogan C, Kanik A. Acute electrophysiologic effect of pulsed gallium-arsenide low energy laser irradiation on configuration of compound nerve action potential and nerve excitability. *Lasers Surg Med.* 2002; 30:376-80.
8. Bagis S, Comelekoglu U, Coskun B, Milcan A, Buyukakilli B, Sahin G, et al. No effect of GA-AS (904 nm) laser irradiation on the intact skin of the injured rat sciatic nerve. *Lasers Med Sci.* 2003; 18:83-8.
9. Nicolau RA, Martinez MS, Rigau J, Tomas J. Effect of low power 655 nm diode laser irradiation on the neuromuscular junctions of the mouse diaphragm. *Lasers Surg Med.* 2004; 34:277-84.
10. Rochkind S, Nissan M, Barr-Nea L, Razon N, Schwartz M, Bartal A. Response of peripheral nerve to He-Ne laser: experimental studies. *Laser Surg Med.* 1987; 7:441-3.
11. Shamir MH, Rochkind S, Sandbank J, Alon M. Double-blind randomized study evaluating regeneration of the rat transected sciatic nerve suturing and postoperative low-power laser treatment. *J Reconstr Microsurg.* 2001; 17:133-7.
12. Bae CS, Lim SC, Kim KY, Song CH, Pak S, Kim SG, et al. Effect of Ga-as laser on the regeneration of injured sciatic nerves of rat. *In Vivo.* 2004; 18:489-95.
13. Gigo-Benato D, Geuna S, de Castro Rodrigues A, Tos P, Fornaro M, Boux E, et al.
14. De Medinaceli L, Derenzo E, Wyatt RJ. Rat sciatic functional index: a measurement system with digitized input. *Comput Biomed Res.* 1984; 17:634-43.
15. De Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ. An index of the functional recovery of the rat sciatic nerve based on measurement made from walking. *J Neurosci Methods.* 1982; 77:634-43.
16. Lowdon IMR, Seaber AV, Urbaniak JR. An improved method for measurement of the sciatic functional index of the rat. *J Neurosci Methods.* 1988; 24:279-81.
17. Oliveira EF, Mazzer N, Barbieri CH, Selli M. Correlation between electrophysiological and morphometric to evaluate recovery of the rat sciatic nerve after injury: experimental study. *J Reconstr Microsurg.* 2001; 17:634-43.
18. Mendonça AC, Barbieri CH, Mazzer N. Directly applied low energy laser electric current enhances peripheral nerve regeneration in rats. *J Neurosci Methods.* 2003; 129:183-90.
19. Monte-Raso VV, Barbieri CH, Mazzer N, Fasan VS. Can the use of low energy laser influence the regeneration of peripheral nerves? *J Neurosci Methods.* 1989; 24:279-81.
20. Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of the rat sciatic nerve after peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg.* 1983; 72:329-36.
21. Assia E, Rosner M, Belkin M, Solomon A, Schwartz M. The effect of low energy laser irradiation for optimal delay of post-traumatic optic nerve. *Brain Res.* 1989; 476:205-12.
22. Breugel HHFI, Bär PR. He-Ne laser irradiation affects proliferation of Schwann cells in a dose-dependent manner. *J Neurocytol.* 1983; 12:185-92.
23. Hamilton GF, Robinson TK, Ray RH. The effects of helium-neon laser on the regeneration of the crushed peroneal nerve. *J Orthop Sports Phys Ther.* 1983; 15:209-14.
24. Oliveira EF, Mazzer N, Barbieri CH, DelBel EA. The use of a model of a segmentary nerve defect. An experimental study using the rat sciatic nerve. *J Neurosci Methods.* 2003; 129:183-90.
25. De Sá JMR, Mazzer N, Barbieri CH, Barreira AA. The effect of low energy laser on nerve repair. Functional and morphometric study using the rat sciatic nerve. *J Neurosci Methods.* 2004; 136:45-53.
26. Cragg BG, Thomas PK. The conduction velocity of regenerated peripheral nerves. *J Physiol.* 1964; 171:164-75.