



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 ENDO¹, CLÁUDIO HENRIQUE BARBIERI², NILTON MAZZER³, VALÉRIA S. FASAN³

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 significante 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 significante ($p = 0.001$). Os autores concluem que a terapia com o laser de baixa intensidade efetivamente acelera a regeneração do nervo isquiático do rato.

Descriptores: 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 half to simulated irradiation for 10 consecutive days from the first postoperative day. Results were evaluated postoperatively by measuring the sciatic functional index (IFC) at weekly intervals and the total number of nerve fibers and fiber density of the sciatic nerve at three weeks (p < 0.05). IFC progressively improved for both irradiated and control rats (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, with differences between them ($p = 0.001$). Low intensity ultrasound accelerates nerve regeneration, as demonstrated 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⁽¹⁾ como em humanos⁽²⁻⁴⁾. Entretanto, alguns autores não observaram nenhuma alteração na condução nervosa em humanos⁽⁵⁾ ou em animais⁽⁶⁻⁸⁾, ou na liberação de neurotransmissores na placa motora, em camundongos⁽⁹⁾, 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⁽¹⁰⁾, intensas respostas positivas sovimento evocadas e significativo aumento do número e da densidade de axônios regenerados^(11,12) e recuperação morfológica mais rápida⁽¹³⁾. Por outro lado, efeitos deletérios também demonstrados, como uma taxa percentual menor de regeneração traduzida por uma organização ultraestrutural menor com menor área de secção transversal e menor número de mielinizados nos nervos irradiados em comparação com os não submetidos a irradiação simulada⁽¹⁴⁾, levando à conclusão de que a irradiação com o laser pulsado pode ter efeitos supostamente prejudiciais na regeneração dos nervos periféricos. A despeito da fácil disponibilidade atual do laser terapêutico, sua tendência de se tornar de uso generalizado no tratamento de lesões traumáticas de vários tecidos, seus efeitos sobre a regeneração dos nervos periféricos ainda são controversos e precisamente determinados, antes que ele possa ser recomendado com reservas. Foi, então, o propósito da presente investi-



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.

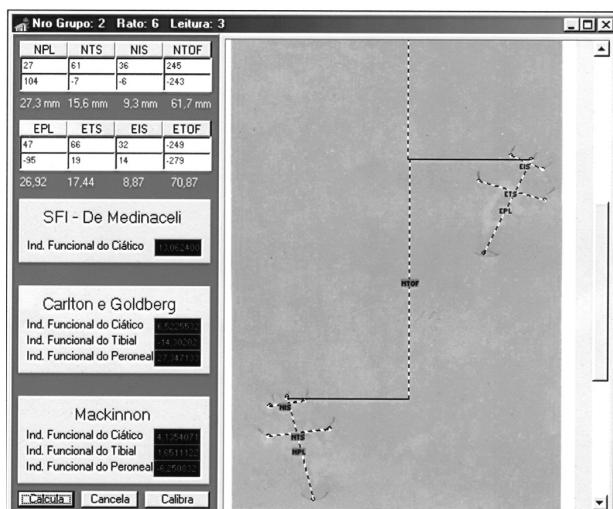
MATERIAIS E MÉTODOS

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. Antibiotocoterapia 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 casinha escura no final), até que eles pudessem caminhar direta e rapidamente em direção ao abrigo da casinha. 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.^(15,16) e modificado por Lowdon et al.⁽¹⁷⁾. O papel impregnado com o azul de bromofenol torna-se amarelo depois de seco, mas torna-se imediata e permanentemente 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 Ciático (IFC)⁽¹⁸⁾. 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 (Nembutal, 60 mg/kg de peso corporal) e após preparação rotina operatória (tricotomia, anti-sepsia com solução alcóolica 20%), o nervo isquiático direito era exposto através de uma incisão longitudinal pôstero-lateral na face lateral e por dissecção romba dos planos musculares, entre glúteo máximo e o quadríceps. O nervo era descolado dos vizinhos somente no seu terço médio, onde uma lesão de 5 mm de comprimento era produzida, tão curta quanto possível a 5 mm distal à sua emergência, com ponto marcado com um ponto de sutura epineural com fio mais fácil de identificação posterior (Prolene Ethicon 6-0), terminando cerca de 5 mm acima da sua divisão em três principais (nervos tibial, peroneiro e sural). Uma compressão de 15.000 g era aplicada por 10 minutos, com uma pressão especialmente desenvolvida e construída para esse fim, numa máquina universal de ensaios após o uso de cinco animais. A lesão infligida ao nervo era progressiva e uniforme, para tornar a regeneração espontânea mais fácil de comparar. Isso facilitou as comparações entre os nervos irradiados e não irradiados. O nervo isquiático era cuidadosamente descolado e colocado de volta no seu leito original, e a ferida era fechada com camadas. Uma solução anti-séptica era aspergida sobre a ferida, mas nenhum curativo era aplicado. Todos os passos eram idênticos para os dois grupos experimentais.

Irradiação com o laser: Foi usado um equipamento comercialmente disponível de irradiação pulsada (coolblue, onda 904 nm, potência de pico de 20 W, largura de 100 µm, freqüência de 1 MHz e dose de 4 J/cm²) de uso prática clínica. A área de irradiação foi de 0,07 cm², durante 10 minutos, numa região de pele intocada, bem solta e sem lesão do nervo. A irradiação foi iniciada no primeiro dia operatório e repetida diariamente por dez dias consecutivos. Foi realizada tanto na coxa direita como na esquerda. O nervo isquiático esquerdo foi tornado como controle (Grup 1 (irradiação simulada)), o equipamento foi mantido durante todo o tempo de aplicação, enquanto que o aparelho permaneceu ligado desde o início, de modo que só em comum apenas o efeito de massagem tecidual. Obtenção e análise das pegadas: as pegadas das patas eram obtidas a intervalos de sete dias, até o 21º dia, calculado automaticamente pelo programa de computador para esse fim, como já descrito em outras publicações. De modo similar, os parâmetros propostos por De Medinaceli et al.^(15,16) e modificado por Bain et al.⁽²¹⁾ e que são: 1) comprimento da pegada, ou a distância máxima entre a ponta do dedo do calcâncar (PL, de print length); 2) abertura total ou distância transversal entre o primeiro e o quinto dedo (spread); e 3) dedos intermediários, ou a distância entre o segundo e o quarto dedos (IT, de intermediate toe). Esses valores eram inseridos na fórmula:

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

Foram estabelecidas comparações entre as pegadas pré-operatórias e as pós-operatórias e entre as pegadas das coxas esquerda e direita.

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 ambos os nervos isquiáticos direito e esquerdo foram removidos através de uma incisão longitudinal pôstero-lateral da coxa. O nervo isquiático direito era dividido em três segmentos de 5 mm de comprimento, sendo



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 µm de espessura com um ultra-micrótomo (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 técnicas grosseiros (rachaduras, dobras, coloração pobre) eram descartados nessa fase. O próximo passo consistia da captura seqüencial 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/mm²) 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.

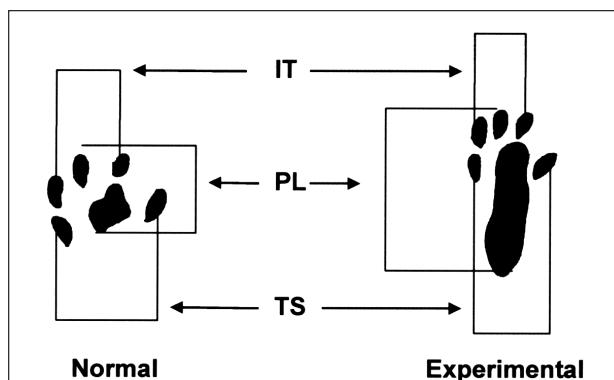


Figura 2 - Desenho esquemático dos parâmetros do IFC medidos numa pegada normal e outra experimental.

RESULTADOS

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

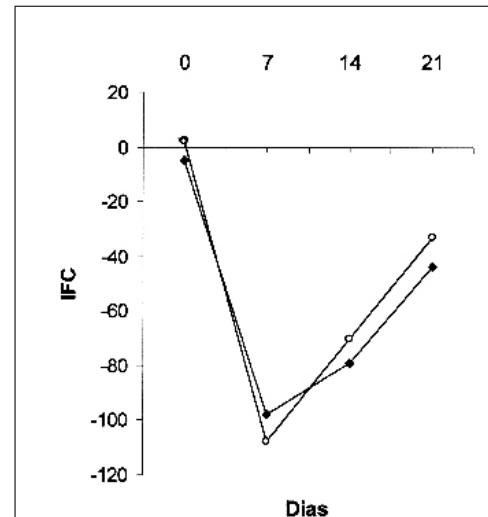
mal ao longo de todo o período de observação. Tais deformidades, como o apoio melhoraram lentamente na pata traseira direita, durante as duas semanas seguintes, mas não chegaram a voltar ao normal até o 21º dia, quando os animais eram sacrificados. Os nervos isquiáticos removidos para os estudos histológico e morfométrico mostraram que os mesmos recuperaram lentamente o diâmetro, ainda era possível detectar a lesão localizada pela sua aparência, começando na sutura epineural de fio de cor azul, facilmente visível ao final da passada.

Índice funcional do isquiático: foram analisadas 120 pegadas, sendo 80 da pata traseira direita e 40 da esquerda, com suas impressões pré-operatórias e do 7º, 14º e 21º dias pós-operatório. O IFC pré-operatório médio para a pata traseira direita era de -108,11 (variação: 019,69 a 8,23) no Grupo 1 (n=10), e 20,52 (variação: 13,62 a 18,99) no Grupo 2 (n=10), sem diferença significativa entre ambos ($p=0,65$).

No 7º dia pós-operatório, as pegadas eram mais longas e largas do que as pré-operatórias, em ambos os grupos, tanto usando tanto o calcaneus quanto os dedos encostados para apoiarem. O IFC médio foi de -98,16 (variação: -118,71 a -81,72) para o Grupo 1, e -108,11 (variação: -128,71 a -81,72) para o Grupo 2, sem diferença significante entre ambos ($p=0,10$). No 14º dia pós-operatório, as pegadas se tornaram mais curtas e largas e o IFC médio foi de -79,50 (variação: -98,16 a -59,83) para o Grupo 1, e -70,04 (variação: -78,46 a -53,62) para o Grupo 2, a diferença entre ambos sendo significativa ($p=0,0001$). Finalmente, no 21º 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 -33,52 (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 56% no 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 para -33,52 no mesmo período, significando uma melhora de 66% para 70% daquela observada no Grupo 1 (Figura 3).

Estudos histológicos e morfométricos: a morfologia dos nervos era absolutamente normal nos nervos isquiáticos esquerdos, com aspecto típico de fibras mielinizadas de vários diâmetros em 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 sanguíneos intraneurais e fibroblastos também eram observados.

Nos segmentos proximal e intermediário (local da lesão), os vasos sanguíneos 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 summarizados 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,

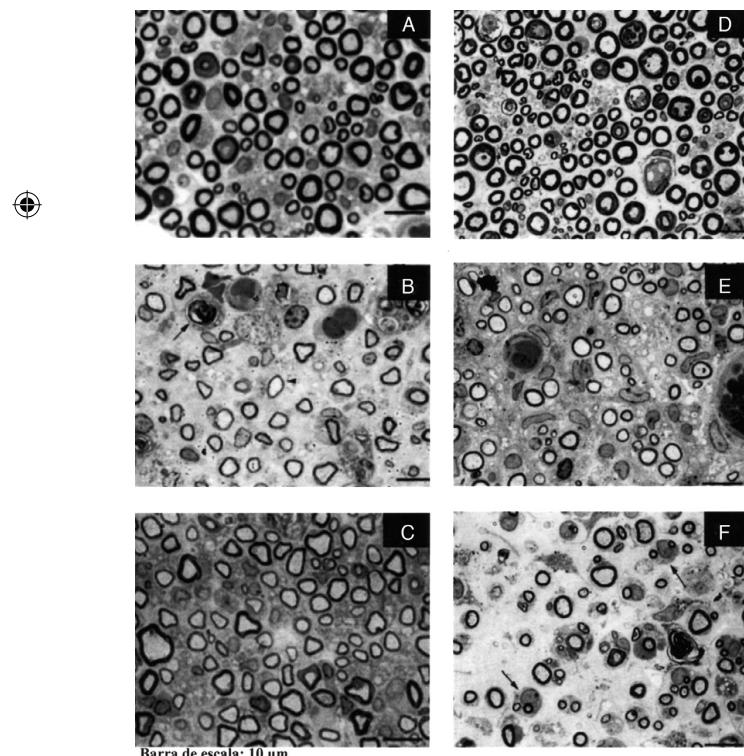


Figura 4 - Fotomicrografia de cortes histológicos de segmentos proximais, intermediários e distais de nervos do Grupo 1 (A, B, C) e do Grupo 2 (D, E, F), respectivamente. Aspecto normal dos segmentos proximais tanto no Grupo 1 (A) como no Grupo 2 (D), com fibras nervosas de grande e pequeno diâmetro com bainha de mielina de espessura proporcional, e vasos sanguíneos 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 11.112, respectivamente, com diferença significante entre o segmento proximal e intermediário e o segmento distal ($p=0.0001$). O número total médio de fibras foi de 9.528, 10.486 e 10.486 nos segmentos proximal, intermediário e distal, respectivamente, com diferença significante entre o segmento proximal e os segmentos intermediários e distal ($p=0.04$) (Figuras 5 e 6). As diferenças observadas para o número total de fibras entre segmentos e para a densidade de fibras entre segmentos

Tabela 1- Número total e densidade de fibras nervosas proximal, intermediário e distal do nervo isquiático, no Grupo 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	10.486 ± 2.040
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	20.486 ± 7.040
Mediana	18.116	19.184	11.120	16.308	16.308

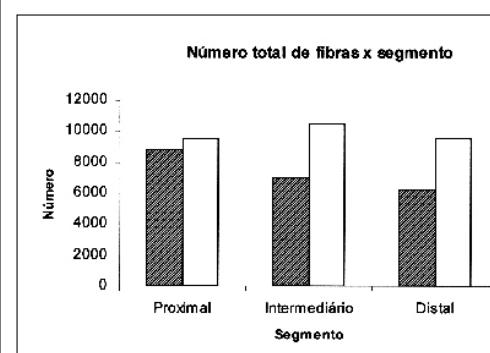
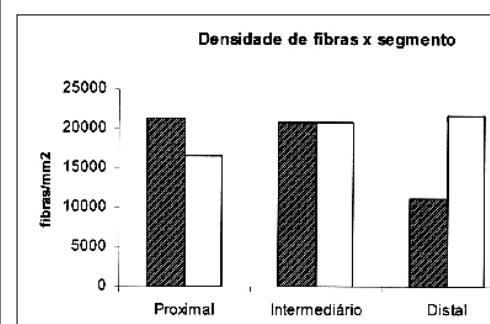


Figura 5 - Distribuição do número total de fibras nervosas por segmento do nervo, nos Grupos 1 e 2.





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显著mente 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显著mente 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/mm² (variação: 15.702 – 23.554 fibras/mm²) no Grupo 1, e de 21.403 fibras/mm² (variação: 14.667 – 23.786 fibras/mm²) 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^(1,4). Também, a despeito de poucas demonstrações em contrário⁽¹⁴⁾, há evidências experimentais de que o laser tem um efeito positivo na regeneração de nervos lesados^(10-13,22-24), 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.^(15,16) e modificado por Bain et al.⁽²¹⁾ 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^(18-20,25,26).

Comparado com a secção seguida de neurorrafia 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^(15,18-20,27,28,29). 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 de forma mais acentuada para os primeiros nas subsequentes, embora a diferença entre ambos permaneça significante na segunda semana. De qualquer modo, houve uma diferença de 69% entre a primeira (1^a semana) e a segunda (2^a semana) avaliação para os nervos irradiados, em contraste com uma 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 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 uma grande diminuição da segunda para a terceira semana 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 evidente no segmento proximal dos nervos irradiados (16.667 fibras/mm²) que não teve base estatística. De início se pensou que tal achado estaria ligado ao tipo de animal empregado no experimento, mas o achado foi explicado pelo relativo aumento da área de seção do nervo, devido ao edema intersticial ou congestão, podendo paralelamente um maior número de vasos sanguíneos de menor diâmetro do que nos nervos não irradiados. Assim, o que aconteceu nos nervos irradiados foi que havia uma redistribuição de fibras nervosas distribuídas numa área maior, o que reduziu a densidade. O aumento do número de vasos sanguíneos nos nervos irradiados provavelmente resulta de efeitos da irradiação com o laser.

O estudo histológico mostrou que as fibras de periferônico de bainha de mielina igualmente fina predominaram no segmento distal dos nervos irradiados, ao lado de fibras de gâlio de menor diâmetro e bainha de mielina de espessura regular, típicas da degeneração. Para os nervos de controle, entretanto, predominaram fibras de grande diâmetro e bainha de mielina fina, característica da degeneração. Foi também importante o achado de uma maior densidade de células de Schwann com o núcleo reacional, com síntese protéica, tanto nos nervos irradiados como nos não irradiados, mas nos primeiros, demonstrando intensa atividade mitótica, provavelmente como resultado da irradiação com o laser, embora por mecanismo ainda por ser explicado. A regeneração dos nervos periféricos depende da capacidade de resposta neuronal ao traumatismo ou doença, que é a via para que o axoplasma produzido no corpo do axônio alcance os órgãos-alvo (fibras musculares, terminações sensoriais e vasos sanguíneos) e promova sua recuperação funcional. O axoplasma, como produzido na presente investigação, é formado dos axônios, que são ou restaurados ou substituídos por novos axônios, no processo natural de regeneração. A maioria da regeneração observada com a irradiação com o laser pode ter sido devida a um efeito local, acelerando a regeneração do próprio 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, que podem ser afastada a possibilidade de que o laser também libera mediadores químicos e quimiotáxicos que interfiram na



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, MSc, pelo seu apoio no desenvolvimento da pesquisa, ao Prof. Dr. Edson Medinaceli, MSc, pelo seu apoio no tratamento de Neurologia, Psiquiatria e Psicologia MSc, ao Dr. Renato Sá, MSc, pelo seu apoio no laboratório de Neurociências, e ao Sr. Antônio Renato Sá e à Sra. Maria Cristina Lopes Schiavoni, pela assistência técnica.

REFERÊNCIAS

- 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.
- 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.
- Basford JR, Hallman HO, Matsumoto JY, Moyer SK, Buss JM, Baxter GD. Effects of 830nm continuos wave laser diode irradiation on median nerve function in normal subjects. *Lasers Surg Med*. 1993; 13:597-604.
- Lowe AS, Baxter GD, Walsh DM, Allen JM. Effect of low intensity laser (830nm) irradiation on skin temperature and antidiromic conduction latencies in the human median nerve: Relevance of radiant exposure. *Lasers Surg Med*. 1994; 14:40-6.
- 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.
- Jarvis D, MacLver MB, Tanellian DL. Electrophysiologic recording and thermodynamic modeling demonstrate that Helium-Neon laser irradiation does not affect peripheral A-gama ou C fibers nociceptors. *Pain*. 1990; 43:235-42.
- 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; 34:376-80.
- 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.
- 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.
- Rochkind S, Nissan M, Barr-Nea L, Razon N, Schwarts M, Bartal A. Response of peripheral nerve to He-Ne laser: experimental studies. *Laser Surg Med*. 1987; 7:441-3.
- 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.
- 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.
- Gigo-Benito D, Geuna S, de Castro Rodrigues A, Tos P, Fornari M, Boux E, et al. De Medinaceli L, Derenzo E, Wyatt RJ. Rat sciatic functional index system with digitized input. *Comput Biomed Res*. 1984; 17:63-72.
- De Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ. An index of the functional state of rat sciatic nerve based on measurement made from walking. *Sci Methods*. 1982; 77:634-43.
- Lowdon IMR, Seaber AV, Urbaniak JR. An improved method for tracking for measurement of the sciatic functional index of De Medinaceli. *Sci Methods*. 1988; 24:279-81.
- Oliveira EF, Mazzer N, Barbieri CH, Sellli M. Correlation between functional and morphometry to evaluate recovery of the rat sciatic nerve after complete transection: experimental study. *J Reconstr Microsurg*. 2001; 17:69-74.
- Mendonça AC, Barbieri CH, Mazzer N. Directly applied low intensity electric current enhances peripheral nerve regeneration in rats. *J Neurosci Methods*. 2003; 129:183-90.
- Monte-Raso VV, Barbieri CH, Mazzer N, Fasan VS. Can the influence of the electric current on the regeneration of peripheral nerves? *J Neurosci Methods*. 2002; 124:185-92.
- Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of the peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg*. 1983; 129:19-36.
- Assia E, Rosner M, Belkin M, Solomon A, Schwartz M. Temperature-controlled low energy laser irradiation for optimal delay of post-traumatic optic nerve. *Brain Res*. 1989; 476:205-12.
- Breugel HHFI, Bär PR. He-Ne laser irradiation affects proliferation of Schwann cells in a dose-dependent manner. *J Neurocytol*. 1990; 18:111-20.
- 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*. 1990; 15:209-14.
- Oliveira EF, Mazzer N, Barbieri CH, DelBel EA. The use of a model of segmentary nerve defect. An experimental study using the rat sciatic nerve as model. *J Neurosci Methods*. 2003; 129:183-90.
- De Sá JMR, Mazzer N, Barbieri CH, Barreira AA. The effect of low intensity electric current on the regeneration of the rat sciatic nerve repair. Functional and morphometric study using the rat sciatic nerve as model. *J Neurosci Methods*. 2004; 136:45-53.
- Cragg BG, Thomas PK. The conduction velocity of regenerated peripheral nerve fibres. *J Physiol*. 1964; 171:164-75.