UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INTERUNIDADES BIOENGENHARIA

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

**ESTUDO DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM
LASER NUM MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO
NERVOSA POR ESMAGAMENTO DO NERVO
CIÁTICO EM RATOS.**

CRISTINA ENDO

RIBEIRÃO PRETO

2002

**ESTUDO DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM
LASER NUM MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO
POR ESMAGAMENTO DO NERVO CIÁTICO DE
RATOS**

Cristina Endo

Dissertação apresentada em Programa de Pós-graduação Interunidades Bioengenharia / Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Bioengenharia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Cláudio H. Barbieri

Ribeirão Preto
2002

FICHA CATALOGRÁFICA

Endo, Cristina

Estudo dos efeitos do tratamento com laser num modelo experimental de lesão por esmagamento do nervo ciático de ratos / Cristina Endo. -- São Carlos, 2002.

Dissertação de Mestrado -- Programa de Pós-graduação Interunidades Bioengenharia - Escola de Engenharia de São Carlos/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Instituto de Química de São Carlos - Universidade de São Paulo, 2001.

Área: Bioengenharia.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Henrique Barbieri.

1.Nervos periféricos. 2.Lesão por esmagamento.
3.Nervo ciático. 4.Laser AsGa. 5.Ratos. I.Título

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Prof. Dr. Cláudio Henrique Barbieri, meus sinceros e especiais agradecimentos, pelos ensinamentos, confiança, orientação e pela infinita paciência na realização deste trabalho.

Aos meus pais e irmão por estarem sempre ao meu lado, me incentivando a trilhar os caminhos sem me perder.

Aos meus mestres pelos conselhos, discussões e ensinamentos para toda uma vida.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Nilton Mazzer pelo incentivo e boas idéias.

Ao Prof. Dr. Amilton Antunes Barreira pela acolhida em seu laboratório e pela colaboração na realização deste trabalho.

A Profa. Dra. Valéria Paula Sassoli Fazan pelo auxílio e inegável ajuda na compreensão dos resultados histológicos apresentados.

Ao Prof. Dr. Nivaldo Parizotto que produziu a faísca inicial de conhecimentos para realização desta pesquisa com laser.

Aos técnicos do Laboratório de Neurologia aplicada e experimental: Renato, Cristina e Vanessa, pelo auxílio nos procedimentos de avaliação histológica.

Aos técnicos do Laboratório de Bioengenharia: Chico e Henrique, que colaboraram na parte experimental do estudo, pela amizade e dedicação.

As secretárias do Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor: Fátima e Elizângela.

A todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho: Vanessa, Marquinhos Shimano, Marcelo Selli, Adriana Mendonça, Engenheiros Moro e Shimano e Terezinha.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	<i>i</i>
LISTA DE TABELAS.....	<i>ii</i>
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	<i>iii</i>
RESUMO.....	<i>v</i>
ABSTRACT.....	<i>vii</i>
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Lesão nervosa periférica	2
<i>1.1.1 Recuperação e regeneração nervosa periférica</i>	<i>3</i>
<i>1.1.2 Lesão nervosa por esmagamento</i>	<i>4</i>
<i>1.1.3 Avaliação morfológica da regeneração nervosa</i>	<i>7</i>
<i>1.1.4 Avaliação funcional da regeneração nervosa</i>	<i>8</i>
1.2 Laser e seus efeitos.....	14
<i>1.2.1 Laser na regeneração de tecido nervoso</i>	<i>15</i>
1.3 Objetivo.....	19
2 MATERIAL E MÉTODOS	21
2.1 Animal e grupos experimentais	21
2.2 Procedimento Cirúrgico.....	21
2.3 Aplicação do laser de arsenieto de gálio (AsGa).....	25
2.4 Registro de pegadas	26
2.5 Análise histológica.....	28
2.6 Análise funcional da marcha	30
2.7 Análise estatística.....	30

3	RESULTADOS.....	31
3.1	Índice Funcional do Ciático (IFC)	31
3.2	Análise Histológica.....	33
	3.2.1 Grupo 1 (não tratado)	<i>Erro! Indicador não definido.</i>
	3.2.2 Grupo 2 (tratado).....	<i>Erro! Indicador não definido.</i>
4	DISCUSSÃO	38
5	CONCLUSÃO	45
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Representação esquemática das medidas realizadas para cálculo do Índice Funcional do Ciático (IFC).....	8
FIGURA 2 - Programa utilizado para realizar as medidas do IFC.....	12
FIGURA 3 - Área de esmagamento do nervo ciático.....	21
FIGURA 4 - Esmagamento do nervo ciático.....	22
FIGURA 5 – Aplicação do laser de Arsenieto de Gálio (AsGa).....	23
FIGURA 6 - Registro das pegadas na passarela.....	25
FIGURA 7 - Gráfico dos valores médios do Índice Funcional do Ciático.....	30
FIGURA 8 - Histologia dos grupos controle e tratado (100obj x 1,6opt x 0,5cam)...	31
FIGURA 9 - Gráfico dos valores da densidade média de fibras.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores individuais do Índice Funcional do Ciático (IFC) do Grupo controle nos vários períodos de avaliação, com as respectivas médias e desvios-padrão.....	29
Tabela 2 - Valores individuais do Índice Funcional do Ciático (IFC) do Grupo tratado com laser nos vários períodos de avaliação, com as respectivas médias e desvios-padrão.....	29
Tabela 3 - Valores médios do IFC dos Grupo 1 (controle) e 2 (tratado), nos vários períodos de avaliação.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AsGa – Arsenieto de Gálio

cam – câmera

cm –centímetros

°C – Celsius

E –experimental

g -grama

HeNe – Hélio Neônio

Hz – hertz

h- hora

IFC – Índice Funcional do Ciático

IT – intermediate toes (espalhar de dedos intermediários)

J/cm² –Joules por centímetro quadrado

ml/100g – mililitros por 100 gramas

mm – milímetros

nm – nanômetros

ns- nanosegundos

N – normal

Obj – objetiva

Opt – optovar

Pl- print lenght (comprimento da pegada)

PFI – Peroneal Function Index (Índice Funcional do Fibular)

SIMS – Sciatic Index Managing System (sistema gerenciador do IFC)

SNP- sistema nervoso periférico

SNC – sistema nervoso central

TFI – Tibial Function Index (Índice funcional do tibial)

TS – toe spread (espalhar total de dedos do 1º ao 5º)

TOF – Opposite foot (distância de uma pata a outra)

W – watts

µm - micrômetro

RESUMO

O presente estudo avaliou a ação precoce do laser terapêutico de baixa potência de Arsenieto de Gálio (AsGa) no processo de regeneração de uma lesão experimental por esmagamento de nervo ciático de ratos. Foram utilizados vinte ratos, da linhagem Wistar, divididos em dois grupos: grupo não-irradiado (controle, n=10) e grupo irradiado (tratado com laser AsGa, n=10). O nervo ciático dos animais de ambos os grupos foi devidamente exposto, e, uma área de 5mm foi submetida a carga estática de 15000g, aplicada por meio de um dispositivo portátil de esmagamento, durante dez minutos. A irradiação transcutânea de laser de AsGa, com dose pontual de $4\text{J}/\text{cm}^2$, teve seu início no 1º dia pós-operatório, sendo a aplicação realizada diariamente, por um período de dez dias consecutivos. A recuperação funcional foi avaliada nos períodos pré-operatório, 7º, 14º e 21º dias, através de valores fornecidos por um programa de cálculo do Índice Funcional do Ciático (IFC), apresentando uma melhora progressiva em ambos os grupos, porém, com valores mais expressivos para o grupo irradiado com laser a partir do 14º dia. Os

animais foram sacrificados no 21º dia pós-operatório para a análise histológica e morfometria dos nervos. Os resultados demonstram um aumento de densidade média de fibras nervosas em grupo de animais irradiados com laser de baixa potência e uma melhora do aspecto morfológico em comparação ao grupo não-irradiado . A conclusão aponta que o laser de arsenieto de gálio (AsGa), na dose utilizada, possui efeito benéfico temporário sobre o nervo ciático de ratos submetido a lesão por esmagamento, contribuindo para a melhora do aspecto morfológico nervoso, evidenciando um processo regenerativo acentuado, em comparação com o grupo não tratado, segundo avaliação funcional e morfológica.

Palavras chave: nervos periféricos, lesão por esmagamento, nervo ciático, irradiação laser AsGa, laser de baixa potência

ABSTRACT

The present study has investigated the earlier influence of low power laser irradiation (GaAs) on nerve regeneration process after experimental crush injury of the sciatic nerve of rats . Twenty Wistar's rats were used and divided into two groups: non irradiated group (control, n=10) and irradiated group (laser treatment, n=10). The sciatic nerves were exposed, for both groups, and an area of 5mm was crushed with 15000g static load for ten minutes, in a portable crushing device. Low power irradiation ($4\text{J}/\text{cm}^2$) were applied transcutaneously for ten consecutive days, after the first day post-operative. Functional recovery was checked before crushing procedure, 7^o , 14^o and 21^o days after crush damage and was evaluated by means of the Sciatic Functional Index (SFI) calculated by a specific software. Values showed a progressive improvement in both groups but more marked in that with laser irradiation, beginning at 14^o day. Animals were killed on the 21^o postoperative day for morphometric and histological examination of the nerves. Results showed an increased nerve fiber density in the laser irradiated group, as well as an improvement in the

morphological aspects. In conclusion, low power laser irradiation GaAs
, with a dose of 4J/cm^2 , has a

temporary beneficial effect on the sciatic nerve of rats submitted a crush injury, improving morphological nerve aspects and showing an increase regenerative process, according to functional and histologic evaluation.

Key words: peripheral nerves; crush injury; sciatic nerve; laser irradiation GaAs; low power laser irradiation.

1 INTRODUÇÃO

Os nervos periféricos são alvos constantes de lesões de origem traumática, como esmagamento e secções totais, que resultam em perda ou diminuição de sensibilidade e motricidade no território inervado, cuja severidade dependerá de acometimento de estruturas. O comprometimento das atividades diárias dos pacientes lesados é um fator determinante para estabelecimento de metas de recuperação precoce do mesmo.

A recuperação nervosa periférica após uma lesão tem intrigado os pesquisadores há muito tempo, com a produção de grande quantidade de investigações científicas sobre os mais diversos aspectos dos métodos de reparação, dos fenômenos envolvidos na regeneração e dos métodos de avaliação dos resultados (CRAGG & THOMAS, 1964; DEVOR et al., 1979; MIRA, 1979; ORGEL, 1982; DE MEDINACELI, FREED , WYATT, 1982; DE MEDINACELI, DERENZO, WYATT, 1984; BAIN, MACKINNON, HUNTER, 1989)

O uso de instrumentos terapêuticos com finalidade regenerativa é prática comum na fisioterapia. Para lesões nervosas periféricas, estimulação elétrica, ultra som e laser de baixa potência tem sido utilizados com intuito de acelerar os processos regenerativos, buscando um retorno precoce da funcionalidade do paciente.

Autores diversos estudaram o papel exercido pelo laser em processos regenerativos de lesões nervosas periféricas, encontrando resultados de estimulação ou ausência de qualquer efeito sobre a

estrutura nervosa (OLSON, SCHIMMERLING, TOBIAS, 1981; GREATHOUSE, CURRIER, GILMORE, 1985; ROCHKIND, 1990, 2001; ASSIA et al, 1989; HAMILTON, ROBINSON, RAY, 1992; ANDERS, BORKE, WOOLERY, DE MERWE, 1993; BREUGEL & BAR, 1993; BASFORD, 1990, 1993; LOWE, BAXTER, WALSH, ALLEN, 1994).

Buscamos por meio deste trabalho verificar a presença de efeitos precoces da irradiação laser de baixa potência sobre os processos regenerativos de uma lesão nervosa periférica.

1.1 Lesão nervosa periférica

O Sistema Nervoso Periférico (SNP) é descrito como sendo toda a porção do sistema nervoso situada fora do Sistema Nervoso Central (SNC), sendo este último constituído pelo cérebro e medula espinhal. Os elementos que constituem o SNP são os motoneurônios, neurônios sensitivos primários fora do SNC, neurônios autonômicos, raízes dorsais e ventrais, gânglios nervosos, nervos espinhais e cranianos, terminações sensitivas e motoras. (MACHADO, 1993)

A classificação das lesões dos nervos periféricos proposta por SEDDON (1975) é baseada no grau de ruptura das estruturas internas do nervo periférico, que está correlacionada com o prognóstico de recuperação, sendo dividida em neuropraxia, axoniotmese e neurotmese. A forma mais branda de lesão nervosa é a neuropraxia. Existe um bloqueio de condução de informações localizado, porém, as porções proximais e distais preservam a sua condutibilidade; aqui o

axônio não perde sua continuidade, sendo a recuperação rápida e completa em poucas semanas. A axoniotmese é uma lesão mais grave, com danos suficientes para promover a ruptura da continuidade axonal, levando à degeneração walleriana distal; o prognóstico de recuperação funcional é bom, desde que a continuidade de tecidos conectivos de suporte, células satélite e membrana basal permaneça íntegra. O tipo mais grave de lesão nervosa periférica é a neurotmese; há uma completa ruptura do nervo periférico e o prognóstico de recuperação não é favorável, a menos que a continuidade do nervo seja reconstruída.

1.1.1 Recuperação e regeneração nervosa periférica

Nervos periféricos sujeitos à aplicação de uma força deformante intensa e abrupta podem sofrer um bloqueio fisiológico rapidamente reversível, um bloqueio local com desmielinização ou, até mesmo, uma degeneração walleriana. Os neurônios são dependentes de um transporte bidirecional de substâncias, que é conhecido como transporte axonal, ou seja, de informações provenientes do sistema nervoso central (SNC) para a periferia e em sentido contrário, garantindo a sua função normal. Quando existe um bloqueio dessas informações a função nervosa pode estar deteriorada.

Os processos de degeneração e conseqüente regeneração nervosa periférica dependerão diretamente do grau de acometimento de suas estruturas nervosas. Num período de 4 a 5 dias após a lesão

nervosa periférica, o corpo celular prepara-se para o processo de regeneração, sintetizando o material axoplasmático, evidenciado pela presença de corpúsculos de Nissl junto à raiz axonal (SEDDON, 1975; SUNDERLAND 1985). No coto distal da fibra nervosa lesada ocorre a degeneração walleriana, evidenciada pela fagocitose da substância axonal, que deixa o tubo neural (envoltório de sustentação do axônio, com as células de Schwann) vazio, numa preparação para o novo crescimento axonal. No coto proximal da fibra nervosa, o axônio sofre degeneração semelhante até o último segmento internodal remanescente, em direção superior. No caso das lesões muito graves, pode ocorrer a degeneração irreversível do neurônio e do seu axônio. Quando o neurônio sobrevive, o corpo celular inicia o processo natural de regeneração, caracterizado pela síntese de proteínas estruturais, que são transportadas até o final do coto nervoso remanescente, promovendo o crescimento axonal. Se os cotos proximal e distal da fibra nervosa forem postos em contato, como ocorre no reparo cirúrgico do nervo lesado, o crescimento axonal progredirá até atingir o órgão por ela inervado, seja uma fibra muscular ou um corpúsculo sensitivo, ocorrendo então o retorno gradual da função. (DAHLIN & RYDEVIK, 1991)

1.1.2 Lesão nervosa por esmagamento

Lesões nervosas periféricas podem ser realizadas experimentalmente através de diversos procedimentos, como o

esmagamento (compressão), transecção, estiramento e congelamento. Na lesão experimental por esmagamento não há necessidade de efetuar o reparo cirúrgico do nervo, o que evita a introdução de inúmeras variáveis de difícil controle. Estudos diversos propuseram a utilização de modelos experimentais de esmagamento para avaliar tanto a lesão em si, como a regeneração e recuperação funcional (CRAGG & THOMAS, 1964; MIRA, 1979; DE MEDINACELLI, FREED, WYATT, 1982; DE MEDINACELI, DERENZO, WYATT, 1984; BAIN, MACKINNON, HUNTER, 1989; DELLON & MACKINNON, 1989; BRIDGE et al. 1994; OLIVEIRA, MAZZER, BARBIERI, SELLI, 2001).

BISBY (apud HARE et al., 1992) e DE MEDINACELLI; FREED; WYATT (1982) estabeleceram que a lesão por esmagamento é uma modalidade útil para o estudo de regeneração dos nervos periféricos, pois é um tipo de axoniotmese. Na axoniotmese, os danos são suficientes para romper o axônio, levando à degeneração walleriana distal, mas o prognóstico de recuperação funcional é bom, devido à preservação da estrutura de sustentação, como as células satélite, membrana basal e tecido conectivo de suporte.

BRIDGE et al. (1994) concluíram que a lesão produzida no nervo ciático de ratos com uma pinça cirúrgica ou de relojoeiro era do tipo axoniotmese. Como não houve diferenças significantes entre os grupos estudados, cada um com um tipo diferente de pinça e de modo de aplicação da lesão, o método foi considerado confiável e reproduzível como modelo de lesão por esmagamento.

DAHLIN & RYDEVIK (1991) observaram que, quando o nervo é submetido a um nível elevado de compressão, ocorrem alterações pronunciadas do fluxo sanguíneo intraneural, da permeabilidade vascular e da ultra-estrutura das fibras nervosas, que resultariam em um processo degenerativo do nervo. O grau de lesão varia de acordo com as dimensões das fibras, as maiores sendo mais suscetíveis à compressão. Os efeitos danosos sobre as estruturas nervosas dependem, ainda, da intensidade da força aplicada e da área sobre a qual a força foi exercida.

DEVOR; SCHONFELD; SELTZER; WALL (1979) relataram que, em modelos experimentais de esmagamento, a recuperação funcional do nervo ciático de ratos iniciava-se no 4º dia após a lesão e que, em torno do 20º dia, já havia um retorno importante da sensibilidade em territórios específicos de inervação.

DE MEDINACELLI; FREED; WYATT (1982), empregando técnica de análise funcional da marcha, observaram que a recuperação de nervos ciáticos esmagados ocorria entre o 16º e o 20º dias após a lesão.

BISBY (apud HARE et al, 1992) relata completa recuperação funcional do nervo ciático já na 4ª semana, após a lesão por esmagamento .

A velocidade da recuperação do nervo ciático de ratos após o esmagamento e a preservação de estruturas axonais permitem a

utilização deste modelo experimental para análise de recuperação morfológica e funcional.

1.1.3 Avaliação morfológica da regeneração nervosa

MIRA (1979), estudando a regeneração de fibras nervosas mielinizadas de nervos ciáticos de ratos após lesão por esmagamento, observou que fibras regeneradas aparecem em torno do 10º ao 15º dias, com retorno a normalidade em torno do 2º mês. Nesse período, os nervos em regeneração contêm cerca de 15% a mais de fibras mielinizadas do que o lado controle. Constatou que o diâmetro médio das fibras regeneradas e mielinizadas não ultrapassava 80% do normal, mesmo após dois anos do esmagamento. No nervo normal, foi encontrado que 61% das fibras eram de grande calibre, com diâmetro médio equivalente a 131% do diâmetro médio das fibras restantes. No nervo regenerado, em torno do 7º mês, observou que 47% das fibras eram de grande calibre.

MACKINNON; HUDSON; HUNTER (1985) estudaram a regeneração nervosa periférica em ratos. Após a ressecção de um segmento de 4,5 mm do nervo ciático de trinta ratos, observaram um crescimento axonal de $27,7 \pm 6,4$ mm. Análise morfológica, realizada a intervalos de 1 cm, demonstrou a formação de “brotamento” axonais (*sprouting*) mielinizados no coto proximal e compartimentação de axônios regenerados, distribuídos em fascículos pequenos. Qualitativamente, constataram que a população de fibras mielínicas era

percentualmente menor em número e diâmetro, quando comparado com valores normais.

1.1.4 Avaliação funcional da regeneração nervosa

Em situações experimentais, a avaliação funcional da marcha tem-se mostrado um método confiável e reproduzível, em relação aos métodos convencionais de avaliação, como a morfometria e a eletroneuromiografia. GUTMANN & GUTMANN (1942) demonstraram que a perda da habilidade de "espalhar dos dedos", avaliada durante a marcha, seria uma medida confiável do grau de lesão de nervo fibular, em coelhos.

DE MEDINACELLI; FREED; WYATT (1982) propuseram a utilização de um método de avaliação funcional, denominado Índice Funcional do Ciático (IFC), baseado em mensurações das pegadas das patas traseiras de ratos. Este método foi realizado entre grupo controle (normal) e grupos experimentais, após transecção e esmagamento do nervo ciático, apresentando uma boa confiabilidade e reprodutibilidade, quando comparado com métodos tradicionalmente utilizados. O experimento consistia em obter as imagens das pegadas dos animais, quando estes caminhassem numa passarela construída especificamente para esse fim (HRUSKA ,KENNEDY, SILBERGELD, 1979), sobre uma tira de filme radiográfico, em seguida processado. Os parâmetros coletados eram a distância de uma pata a outra (TOF), o comprimento da pegada (PL), o espalhar total de dedos (TS) e o

espalhar intermediário de dedos (IT), demarcados segundo demonstra a FIGURA 1.

FIGURA 1 - Representação esquemática das medidas realizadas para cálculo do Índice Funcional do Cíatico (IFC). E: experimental (pata irradiada); N: normal (pata oposta); TS: espalhar total de dedos (1º ao 5º); IT: espalhar de dedos intermediário (2º ao 4º); PL: comprimento da pata.

Os dados obtidos através do registro das pegadas eram, então, introduzidos na seguinte equação:

$$IFC = \left[\frac{(ETOF - NTOF)}{NTOF} + \frac{(NPL - EPL)}{EPL} + \frac{(ETS - NTS)}{NTS} + \frac{(EIT - NIT)}{NIT} \right] \times \frac{220}{4}$$

onde:

E: experimental

N: normal

TOF: distância de uma pata à outra

PL: comprimento da pegada

TS: espalhar total dos dedos

IT: espalhar dos dedos intermediários

Os resultados obtidos através desta fórmula representam o percentual do déficit do lado lesado, comparado ao lado não lesado (normal). A função normal é indicada por um índice de 0%, enquanto que -100% representa a perda completa da função, resultante de uma transecção total do nervo ciático.

DE MEDINACELLI; DERENZO; WYATT (1984) propuseram a utilização de um sistema gerenciador do índice funcional do ciático (SIMS, ou Sciatic Index Managing System), realizado por meio de um computador, com imagens digitalizadas das impressões das patas traseiras de ratos. Foram analisadas as impressões das pegadas de sete ratos Sprague-Dawley submetidos ao procedimento de esmagamento em intervalos regulares. O uso do SIMS permitiu que avaliação funcional dos dados deste experimento, quando comparados

com aqueles obtidos através de cálculo manual, fosse mais homogênea, precisa e rápida.

O Índice Funcional do Ciático descrito por DE MEDINACELLI; FREED; WYATT (1982) envolvia a medida da distância de uma pata à outra (TOF), que induzia a muitos erros de cálculo, diminuindo a sensibilidade do índice. CARLTON & GOLDBERG (1986) propuseram a avaliação também dos índices funcionais dos nervos fibular e tibial e a eliminação do parâmetro TOF, baseados na análise da regressão linear das variáveis estudadas, introduzindo a fórmula:

$$IFC = \frac{(NPL - EPL)}{EPL} + \frac{(ETS - NTS)}{NTS} + \frac{(EIT - NIT)}{NIT} \times 73$$

$$\text{EPL} \quad \text{NTS} \quad \text{NIT}$$

$$IFT = 125 \times \frac{(NPL - EPL)}{EPL} - 43.8 \times \frac{(ETS - NTS)}{NTS} - 252 \times \frac{(EIT - NIT)}{NIT}$$

$$IFP = 2 \times IFC - IFT$$

onde:

IFT: Índice Funcional do Tibial

IFP: Índice Funcional do Fibular

BAIN; MACKINNON; HUNTER (1989) modificaram os Índices Funcionais do Ciático (IFC), do Tibial (IFT) e do Fibular (IFP), baseados na análise de regressão linear múltipla de fatores derivados das medidas das impressões das pegadas de ratos com lesões nervosas definidas. Assim, como nos demais índices, a lesão total do nervo é representado por - 100, enquanto que a função normal é representada por 0. Os parâmetros utilizados nas fórmulas foram o comprimento da

pegada (PL), o espalhar total de dedos (TS) e o espalhar de dedos intermediário (IT), acrescido de um fator de correção gerado para cada uma das variáveis :

$$IFC = -38.3 \times \frac{EPL - NPL}{NPL} + 109.5 \times \frac{ETS - NTS}{NTS} + 13.3 \times \frac{EIT - NIT}{NIT} - 8.8$$

$$IFT = -37.2 \times \frac{EPL - NPL}{NPI} + 104.4 \times \frac{ETS - NPS}{NPS} + 45.6 \times \frac{EIT - NIT}{NIT} - 8.8$$

$$IFP = 174.9 \times \frac{EPL - NPL}{NPL} + 80.3 \times \frac{ETS - NTS}{NTS} - 13.4$$

O uso de filme radiográfico para a obtenção da impressão das pegadas torna o método de avaliação funcional trabalhoso e dispendioso. LOWDON; SEABER; URBANIAK (1988) propuseram a utilização de tiras de papel impregnadas com uma solução de azul de bromofenol, como um meio mais econômico e eficiente de obtenção das impressões. O papel impregnado com o azul de bromofenol apresenta uma cor amarelada, tornando-se azulado em contato com a água ou umidade. Deste modo, as impressões das patas traseiras dos animais, embebidas em detergente, poderiam ser visualizadas no papel em cor azul. As vantagens descritas pelos autores, justificando o uso deste material, eram o baixo custo (cerca de 1/3 do filme radiográfico), uma superfície menos escorregadia e com melhor aderência e a boa qualidade de impressão das pegadas, que eram mais nítidas, facilitando a identificação e mensuração dos parâmetros.

SELLI (1998) desenvolveu um programa de computador (*software*) para medição dos parâmetros utilizados na avaliação funcional, conforme descrito por DE MEDINACELLI; DERENZO; WYATT (1984) e modificado por BAIN; MACKINNON; HUNTER (1989), analisando a impressão de pegadas obtidas. As imagens eram digitalizadas por meio de um *scanner* e os parâmetros eram analisados e medidos, utilizando-se o cursor do *mouse* em uma sequência pré-estabelecida. Os cálculos eram realizados imediatamente pelo programa desenvolvido, fornecendo os valores dos índices propostos dos nervos ciático, fibular e tibial (FIGURA 2).

FIGURA 2 - Programa utilizado para realizar as medidas do IFC (SELLI, 1998).

1.2 Laser e seus efeitos

O termo LASER é uma sigla que se refere à expressão *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, ou seja, amplificação da luz por emissão de radiação estimulada. Sendo uma forma de emissão luminosa, o laser está englobado dentro de um espectro de emissão eletromagnética, do mesmo modo que outros recursos utilizados na fisioterapia, tais como a diatermia por ondas curtas, microondas, irradiação ultravioleta e infravermelha, etc. Porém, o que diferencia o laser das demais formas de irradiação de ondas eletromagnéticas são as suas características de monocromaticidade, coerência, unidirecionalidade e alta concentração fotônica (COLLS, 1984; VEÇOSO, 1993; BAXTER, 1994).

Os equipamentos de laser de uso corrente na indústria ou para fins medico-cirúrgicos são de alta potência, ao passo que o laser empregado para fins terapêuticos é de baixa potência. O meio para a produção do laser de baixa potência pode ser gasoso (hélio - neônio, ou HeNe) ou baseado em um diodo semicondutor (arsenieto de gálio, ou AsGa). O laser de AsGa é infravermelho, de emissão pulsada e comprimento de onda de 904 nm. Devido ao maior comprimento de onda, o laser de AsGa é indicado para uso terapêutico em processos

lesivos profundos, sendo o laser de HeNe mais indicado para lesões superficiais (VEÇOSO, 1993).

Durante aplicação do laser, vários eventos biofísicos ocorrem concomitantemente, como a reflexão, refração, transmissão, dispersão e absorção do feixe luminoso, resultando em efeitos primários bioquímicos e bioelétricos, que são a base de sustentação do uso terapêutico deste tipo de irradiação.

1.2.1 Laser na regeneração de tecido nervoso

Em lesões parciais por esmagamento do nervo não há secção total de axônios e das estruturas adjacentes, ocorrendo degeneração walleriana e regeneração nervosa, na seqüência (UMPHREAD, 1994). Para a recuperação de tais lesões, são utilizados alguns recursos terapêuticos de uso corrente na fisioterapia, como o ultra-som, a estimulação elétrica e o laser.

O laser começou a ser utilizado no processo de regeneração e recuperação funcional de lesões nervosas periféricas na década dos anos 80, havendo vários relatos sobre os resultados obtidos.

OLSON; SCHIMMERLING; TOBIAS (1981) utilizaram a irradiação laser, com comprimento de onda variando entre 490 e 685 nm, sobre células de cerebelo de ratos para observar alterações nos limiares de excitabilidade celular. Segundo os resultados obtidos, houve uma diminuição da excitabilidade elétrica das células nervosas, sugerindo

que ocorre uma absorção da energia irradiada capaz de provocar alterações com a liberação de cálcio no citoplasma .

WALKER (1985) relatou que a aplicação bilateral do laser de HeNe (comprimento de onda de 632 nm) nos nervos safenos de pacientes paraplégicos, durante 40 segundos, foi capaz de suprimir o clônus do tornozelo. Tal efeito não foi observado nos pacientes não-irradiados (grupo placebo). O autor sugeriu que os efeitos obtidos poderiam ser decorrentes de uma fotossensibilidade dos nervos periféricos.

NISSAN; ROCHKIND; RAZON; BARTAL(1986), através da irradiação transcutânea dos nervos ciáticos de ratos com laser HeNe, com doses variando entre 4 e 10J/cm², observaram um aumento significativo no potencial de ação, efeito que poderia perdurar por até oito meses após a última aplicação.

ROCHKIND et al (1987) estudaram o potencial de uso terapêutico da irradiação laser de baixa potência na prevenção da degeneração ou na estimulação da regeneração nervosa periférica. Após lesões repetitivas por esmagamento de nervo ciático de ratos, durante 20 dias consecutivos, realizaram o tratamento com laser de baixa potência (HeNe), observando um aumento significativo da amplitude do potencial de ação nervosa no lado lesado, que alcançou níveis semelhantes aos valores do lado não-lesado. Esta manifestação eletrofisiológica do efeito do laser foi acompanhada por uma diminuição do volume de tecido cicatricial nos nervos lesados.

WU et al (1987) não obtiveram respostas neurofisiológicas ou alteração do potencial de ação provocados pela estimulação transcutânea do nervo mediano de nove indivíduos com o laser HeNe. Este achado contradiz os resultados obtidos em trabalhos anteriores, de que ocorreria uma modificação no potencial de ação de nervos periféricos estimulados com uma fonte de irradiação laser.

ROCHKIND et al. (1989) conduziram uma série de experimentos para investigar os efeitos da irradiação com laser sobre feridas cutâneas, queimaduras e lesões de nervos periféricos (lesão de nervo ciático). Os animais eram submetidos a altas doses de irradiação, que variavam de 7,6 a 10 J/cm², diariamente, e os parâmetros de medição eram eletrofisiológicos. Concluíram que a quantidade de irradiação que alcançava o nervo ciático, da ordem de 2 a 10%, era pequena em relação àquela que atingia a pele, de modo que os resultados de um eventual tratamento poderiam não ser satisfatórios.

ASSIA et al. (1989) observaram uma diminuição do processo de degeneração após esmagamento do nervo ciático de ratos, utilizando o laser de HeNe, aplicado sobre a região lesada. Os resultados foram obtidos por meio de uma análise do registro da atividade eletrofisiológica desses nervos.

JARVIS; MAC IVER; TANELIAN (1990) investigaram o efeito da irradiação laser HeNe (632,5 nm) sobre fibras sensoriais aferentes A-delta e C, na córnea de coelhos. Os potenciais de ação foram analisados quanto ao período de latência, amplitude, tempo de subida,

duração e frequência, não sendo observada alteração desses parâmetros após a irradiação laser.

BASFORD et al. (1993) realizou um experimento em que mediu a velocidade de condução do nervo mediano, em humanos submetidos à aplicação de irradiação laser (830 nm) sobre dez pontos ao longo do trajeto do nervo (1,2 J/ponto - 9.6 J/cm²). Os eletrodos de superfície foram colocados no cotovelo e no segundo dedo da mão dos sujeitos do estudo e os dados coletados mostraram uma diminuição do tempo de latência, evidenciando a melhora do quadro neurológico.

HAMILTON; ROBINSON; RAY (1992) conduziram um estudo para determinar se a irradiação com laser HeNe poderia alterar o processo de regeneração de um nervo esmagado. Foram utilizados 12 coelhos fêmeas divididos em dois grupos (tratado e não tratado), que tiveram os nervos peroneais das patas traseiras esmagados. Os resultados mostraram que, no grupo tratado, a recuperação após 15 dias da lesão foi em média de 67% do nível de amplitude de condução pré-lesão, enquanto que no grupo não tratado, a recuperação foi em média de 52%.

WALSH ; LOWE; BAXTER (1995) investigaram os efeitos da irradiação direta com laser no nervo ciático de sapos. Sob condições monitoradas e cuidadosamente controladas, demonstraram um aumento da latência de condução nervosa em resposta à irradiação com baixas dosagens com laser (2,38 J), as doses mais altas (3,57J) provocando uma diminuição do tempo de latência.

LOWE et al (1994) estudaram os efeitos da irradiação laser (830 nm, doses entre 1,5 e 1,2 J/cm²) sobre os parâmetros eletrofisiológicos do nervo mediano e a temperatura da pele, por meio da análise da condução antidrômica em 30 indivíduos. Foram estudados um grupo controle (não-irradiado) e grupos irradiados com doses variáveis do laser. Os resultados mostraram que alterações (aumento ou diminuição) da latência de condução antidrômica eram inversamente relacionadas com mudanças da temperatura cutânea, sugerindo que efeitos neurofisiológicos periféricos ocorriam após a aplicação laser.

Os estudos realizados com o laser até o presente indicam que esse agente físico pode ser utilizado como instrumento de auxílio na recuperação de lesões nervosas periféricas, embora nada ainda exista de concreto. Na realidade, os resultados disponíveis são até contraditórios e carecem de esclarecimento, particularmente no que se refere aos mecanismos envolvidos no processo de regeneração e recuperação.

1.3 Objetivo

A literatura traz somente resultados coletados a partir de análises eletrofisiológicas e histológicas da ação do laser de baixa

potência sobre estruturas nervosas periféricas. A ausência de relatos de outros meios de análise justifica o uso de um meio de avaliação da recuperação funcional baseado na marcha de animais experimentais, cujos valores obtidos possuem uma correlação com os resultados histológicos apresentados.

Foi o objetivo do presente trabalho estudar a influência das aplicações do laser de baixa potência (AsGa) na recuperação funcional e morfológica do nervo ciático de ratos, após lesão por esmagamento, através da análise funcional da marcha dos animais e da avaliação morfométrica dos nervos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido e realizado no Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

2.1 Animal e grupos experimentais

Foram utilizados no estudo 20 ratos machos adultos, da linhagem Wistar, com peso corporal variando de 300 a 350 gramas, fornecidos pelo Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto. Os ratos foram divididos em dois grupos experimentais, conforme o procedimento realizado:

Grupo 1: de controle, constituído por dez animais submetidos à lesão por esmagamento e não-irradiados;

Grupo 2: de ensaio, composto por dez animais submetidos à lesão por esmagamento e subsequente irradiação com o laser por 10 dias consecutivos.

Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, com cinco animais cada, e alimentados com ração-padrão do biotério e água *ad libitum*, até o dia do sacrifício, no 21º dia pós-operatório.

2.2 Procedimento Cirúrgico

O procedimento cirúrgico foi realizado com a finalidade de produzir uma lesão nervosa por esmagamento do nervo ciático sob controle estrito da intensidade de pressão e do tempo de aplicação, em

ambos os grupos experimentais. Inicialmente, os ratos foram pesados e devidamente marcados para identificação posterior. A seguir, todos foram treinados a caminhar na passarela de marcha, que seria utilizada em todas as fases da avaliação funcional. Tão logo tivessem aprendido, era obtido o registro pré-operatório das impressões das pegadas, que viriam a ser o parâmetro inicial de avaliação, para comparação com os registros pós-operatórios.

Para a realização da lesão por esmagamento, os animais eram anestesiados com uma mistura de Ketamina (Ketamina a 5%) e Xilazina (Xilasina a 2%), na proporção 1:4, em doses de 0,10 - 0,15 ml/100 g de peso corporal, por via intraperitoneal. Uma vez anestesiados os animais, era feita a tricotomia da face lateral da coxa direita, em extensão suficiente para permitir a visualização da região a ser abordada. O animal era, então, posicionado em decúbito ventral, prendendo-se as patas dianteiras e traseiras em abdução, e o local era preparado com anti-sepsia com uma solução alcoólica de iodo a 20% (álcool-iodado).

O nervo ciático era abordado através de uma incisão longitudinal na face lateral da coxa direita, indo desde a altura do trocânter maior até o joelho, expondo-o desde sua emergência na borda inferior do glúteo maior até sua bifurcação nos três ramos distais. Sob aumento com uma lupa, um ponto de sutura (Prolene 6/0, Ethicon®) era passado no epineuro, a cerca de 3 mm distalmente à sua emergência, para facilitar a visualização da região a ser esmagada (FIGURA 3). A área de

esmagamento, distal ao ponto de sutura, era de cerca de 5 mm de comprimento.

FIGURA 3 - Área de esmagamento, delimitada por fio de polipropileno azul (6/0 - Prolene, Ethicon®)

O esmagamento era produzido com um dispositivo portátil, especialmente desenvolvido para os propósitos deste trabalho, tendo sido projetado para produzir a lesão por esmagamento com uma carga estática pré-fixada de 15.000 g. Este dispositivo substituiu, com vantagens, a máquina de ensaios (MENDONÇA, 2000; OLIVEIRA, 1995) utilizada em estudos anteriores semelhantes, tornando o procedimento de esmagamento rápido e facilmente reproduzível. O dispositivo é constituído de um cilindro impulsionado por uma mola de pressão regulável, capaz de produzir o esmagamento de um segmento de 5 mm de comprimento do nervo, que permanece apoiado sobre uma base com essa dimensão (FIGURA 4). A calibração do dispositivo era

realizada periodicamente, com auxílio de uma célula de carga, não tendo sido observadas variações da pressão exercida pela mola em nenhuma das medidas de calibragem.

FIGURA 4 - Esmagamento do nervo ciático. A) Posicionamento do animal no dispositivo; B) Posicionamento do nervo no acessório do dispositivo; C) Procedimento de esmagamento

A pressão era exercida sobre o nervo por 10 minutos, após o que o dispositivo era retirado e a ferida, suturada com pontos simples de nylon monofilamento (Mononylon 5/0, Ethicon®). A área era, então, lavada com solução anti-séptica de álcool-iodado e o animal recebia uma dose única de antibiótico (Penicilina associada à estreptomicina), para profilaxia de infecções.

2.3 Aplicação do laser de arsenieto de gálio (AsGa)

A aplicação do laser de arsenieto de gálio (AsGa) foi iniciada já no primeiro dia pós-operatório, pelo método direto transcutâneo pontual (FIGURA 5), e mantida por 10 dias consecutivos, com dose pré-determinada de 4 J/cm^2 , utilizando um equipamento comercialmente disponível (Ibramed), com as seguintes características:

- a. comprimento de onda: 904 nm
- b. potência de pico: 20 W
- c. largura de pulso: 180 nseg
- d. frequência: 1000 Hz
- e. área pontual de aplicação: 0.07cm^2

FIGURA 5 – Aplicação do laser de Arsenieto de Gálio (AsGa) transcutaneamente

2.4 Registro de pegadas

As impressões das pegadas dos animais foram obtidas pelo método proposto por DE MEDINACELI et al. (1982, 1984), modificado por LOWDON; SEABER; URBANIAK (1988), que emprega tiras de papel impregnado com azul de bromofenol. O preparo desse papel é iniciado pela dissolução a 1% da forma anidra do azul de bromofenol (Sigma®) em acetona absoluta. Essa solução adquire cor alaranjada, que se mantém nas folhas de papel nela mergulhadas e secas ao ar livre; o contato com água ou umidade torna-as azuladas. Depois de secas, as folhas de papel eram cortadas em tiras de 43 cm de comprimento por 8,7 cm de largura (dimensões da passarela empregada para obtenção das impressões das pegadas) e estocadas em embalagens de plástico, para evitar o contato com umidade. A passarela de marcha foi construída de acordo com a proposta de DE MEDINACELLI et al. (1982, 1984), contando com uma casinhola no final, onde o animal procura se abrigar após percorrer todo o seu comprimento.

Após o treino de marcha inicial, os animais eram colocados para caminhar na passarela revestida com as tiras de papel impregnado com o azul de bromofenol, com as patas embebidas numa solução de água e detergente, registrando-se a impressão das pegadas (FIGURA 6). As tiras eram deixadas a secar e estocadas novamente, até o momento da realização das medidas do Índice Funcional do Ciático, no computador, de acordo com o cálculo proposto por BAIN; MACKINNON; HUNTER (1989).

As impressões das pegadas foram obtidas antes da cirurgia e após 7, 14 e 21 dias da lesão inicial. No 21º dia, os animais eram sacrificados para a retirada do nervo ciático, que foi analisado através de estudos histológicos e morfométricos.

FIGURA 6 - Registro das pegadas na passarela. A) Vista geral da passarela; B) Pegadas registradas.

As imagens das impressões das pegadas obtidas nas tiras de papel eram oportunamente digitalizadas por meio de um *scanner* e

introduzidas num programa (software) desenvolvido no Laboratório de Bioengenharia por SELLI (1998), que possibilita a captura e análise das imagens das pegadas, o cálculo do IFC pelos métodos de DE MEDINACELLI et al. (1982, 1984), CARLTON & GOLDBERG (1986) e BAIN; MACKINNON; HUNTER (1989), e a estocagem de todos os dados obtidos.

2.5 Análise histológica

Todos os procedimentos de análise histológica e morfométrica dos nervos foram realizados no Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Após o sacrifício dos animais, no 21º dia pós-operatório, os nervos ciáticos foram abordados com cuidado, através da mesma incisão longitudinal, e embebidos com uma solução de glutaraldeído a 25% em cacodilato de sódio a 0,025M, por dois minutos, para a pré-fixação. Em seguida, foram integralmente removidos, desde a sua emergência até a bifurcação em ramos fibular e tibial, e divididos em três segmentos, um proximal (da emergência até o ponto de marcação), um intermediário (zona de lesão) e um distal, que foram mergulhados na mesma solução supramencionada, onde permaneceram por 12 horas, em geladeira a 6°C, para fixação.

Depois desse período, foi feita a pós-fixação dos segmentos em tetróxido de ósmio a 2%, acrescido de cacodilato de sódio a 0,2%, por

um período de 8h. Posteriormente, os segmentos foram lavados em solução tampão de cacodilato de sódio isotônico e desidratados em soluções de concentração crescente de etanol e de óxido de propileno. Finalmente, foram inclusos em resina plástica (EPON 812) por 48 h a 60°C, em estufa.

Obtidos os blocos, procedeu-se à obtenção de cortes semi-finos (0,5 µm de espessura), que foram corados com azul de toluidina e analisados em microscópio de luz (ZEISS Axiophoto). Na primeira etapa da análise, era observada a integridade das estruturas; lâminas com cortes de difícil visualização das estruturas e com artefatos de técnica, como a coloração fraca, ausência de perineuro, dobras e rachaduras, foram excluídas da análise.

A captura e armazenamento das imagens das fibras nervosas foram realizados com o mesmo microscópio, dotado de uma câmera de vídeo (JVC, modelo TK 1270) e de uma platina motorizada (ZEISS), e acoplado a um microcomputador (IBM-PC) e mesa de recursos fotográficos. As imagens foram capturadas em quadros seqüenciais com objetiva 100X e optovar de 1,6X. A medida dos parâmetros morfométricos, como a área fascicular e outros, foi executada com o programa (*software*) KS 400 V.2.0 - Measure Interactive. Os quadros capturados seqüencialmente de cada um dos fascículos analisados foram devidamente identificados.

O parâmetro estudado foi a densidade de fibras nervosas (número de fibras contadas / área total ocupada pelas fibras), que

requer a contagem das fibras nervosas na área interessada, após o processo de "limpeza", que exclui as fibras inadequadas. A densidade de fibras obtida em cada caso resultou no cálculo da densidade média de fibras em cada grupo, tratado e não tratado.

2.6 Análise funcional da marcha

Nas impressões da marcha dos ratos obtidas nas várias etapas do experimento, foram efetuadas as medidas do comprimento da pegada (PL), o espalhar total de dedos (TS) e o espalhar de dedos intermediário (IT), que permitiram o cálculo do IFC de BAIN e colaboradores (1989), utilizando o programa de computador (*software*) desenvolvido por SELLI (1998) para obtenção e análise de imagens digitalizadas. Os resultados obtidos pelo método de BAIN e colaboradores expressam a perda funcional em termos percentuais, sendo que o valor 0 (zero) representa a função normal, ou ausência de disfunção, e o valor de -100 (menos cem) representa a perda total da função do nervo.

2.7 Análise estatística

A análise estatística dos valores do IFC obtidos nos grupos tratado e não tratado foi realizada utilizando-se o teste *t de Student*, com nível de significância de 5%, por meio do programa *Sigma Stat*® v.2.03.

Para a análise estatística dos valores do número de fibras e da densidade média de fibras foi utilizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

3 RESULTADOS

3.1 Índice Funcional do Ciático (IFC)

No Grupo 1 (não tratado), o IFC foi em média de -98,2 no 7º dia pós-operatório, melhorando para -79,5 no 14º dia, e -44 no 21º. No Grupo 2, o IFC foi em média de -108,1 no 7º dia pós-operatório, melhorando para -70,0 no 14º dia e para -32,8 no 21º (FIGURA 7).

A análise estatística dos valores do IFC mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos no 7º e no 21º dias pós-operatórios (respectivamente, $p=0,107$ e $p=0,065$). A diferença só foi estatisticamente significativa no 14º dia ($P=0,040$) (Tabelas 1,2 e 3).

Tabela 1 - Valores individuais do Índice Funcional do Ciático (IFC) do Grupo 1 (não tratado) nos vários períodos de avaliação, com as respectivas médias e desvios-padrão.

GRUPO CONTROLE				
Ratos	Pré-op.	7º dia	14º dia	21º dia
R1	-14,80	-82,54	-59,83	-39,73
R2	8,23	-100,26	-96,41	-57,10
R3	-1,31	-89,83	-85,01	-40,43
R4	-8,44	-115,79	-89,72	-44,95
R5	-5,55	-95,39	-76,39	-51,56
R6	-19,69	-87,21	-82,10	-21,61
R7	15,33	-93,86	-78,08	-45,92
R8	-1,16	-110,71	-80,35	-43,22
R9	-9,61	-96,05	-77,16	-52,52

R10	-11,81	-109,97	-69,98	-42,92
Média	-4,88	-98,16	-79,50	-44,00
Desv. Padrão	10,58	10,93	10,13	9,66

Tabela 2 - Valores individuais do Índice Funcional do Ciático (IFC) do Grupo 2 (tratado) nos vários períodos de avaliação, com as respectivas médias e desvios-padrão.

GRUPO TRATADO - LASER				
Ratos	Pré-op.	7º dia	14º dia	21º dia
R1	-1,89	-81,74	-63,62	-3,04
R2	18,99	-87,99	-72,32	-41,01
R3	-12,85	-128,71	-77,85	-44,40
R4	33,93	-97,78	-48,18	-27,73
R5	2,44	-115,49	-71,14	-23,10
R6	-10,10	-106,19	-78,46	-45,43
R7	13,82	-109,83	-73,57	-21,37
R8	-13,62	-119,82	-77,05	-25,30
R9	-2,07	-121,42	-67,43	-42,71
R10	-6,92	-112,16	-70,72	-53,62
Média	2,17	-108,11	-70,04	-32,77
Desv. Padrão	15,53	14,99	8,99	15,22

Tabela 3 - Valores médios do IFC dos Grupo 1 (não tratado) e 2 (tratado), nos vários períodos de avaliação.

Grupo	Pré-op.	7º dia	14º dia	21º dia
1	-4,88	-98,16	-79,50	-43,99
2	2,17	-108,11	-70,04	-32,77

FIGURA 7 - Gráfico dos valores médios do Índice Funcional do Ciático dos Grupos 1 (não-tratado) e 2 (tratado com laser); diferença estatisticamente significativa ($p= 0,040$; $dp= 8,99$) somente no 14º dia, com grupo irradiado com laser evidenciando melhor IFC.

3.2 Análise Histológica

A análise histológica foi realizada pela avaliação, ao microscópio de luz, dos cortes semifinos ($0,5 \mu\text{m}$ de espessura) corados com azul de toluidina a 1%.

FIGURA 8 - Análise histológica: grupo controle (esquerda) e grupo tratado (direita); (B) seta e ponta de seta demonstram degeneração Walleriana e axônios grandes com bainha de mielina fina,

respectivamente; (F) setas apontam brotamentos axonais; densidade de fibras, com diferença estatisticamente significativa, maiores para o grupo 2 ($p < 0.001$)

3.2.1 Análise Morfológica

Para o grupo 1, em seu segmento proximal à lesão (Figura 8A), o aspecto morfológico era tipicamente normal, com fibras mielinizadas de grande e pequeno diâmetro e bainha de mielina regular e uniforme, de espessura proporcional ao diâmetro axonal. Observava-se, também, a presença de quantidade normal de fibras amielínicas, fibroblastos e vasos capilares. No grupo 2 (Figura 8D), proximalmente à lesão, o aspecto morfológico das fibras nervosas era semelhante ao do Grupo 1, ou seja, aspecto morfológico normal típico, com fibras mielinizadas de grande e pequeno diâmetro e bainha de mielina, regular e uniforme,

de espessura proporcional ao diâmetro axonal, observando-se ainda a presença de fibras amielínicas, fibroblastos e vasos capilares.

No segmento correspondente à lesão (Figura 8B) do grupo 1, havia uma diminuição das fibras de pequeno diâmetro, com manutenção do número de fibras de grande diâmetro, mas com bainha de mielina proporcionalmente fina em relação ao diâmetro do axônio, sugerindo um processo de desmielinização, além de franca degeneração *walleriana*. No grupo 2 (Figura 8E) o aspecto morfológico era, também, semelhante ao do segmento correspondente do Grupo 1, observando-se, entretanto, maior número de núcleos de células de Schwann com aspecto reacional, o que indica uma franca atividade metabólica, de síntese.

Analisando-se o segmento distal à lesão (Figura 8C) do grupo 1, foi observado o predomínio de fibras de pequeno calibre e com bainha de mielina fina, sem evidências de brotamento (*sprouting*). No grupo 2, segmento distal à lesão (Figura 8F) predominavam as fibras de pequeno calibre, misturada a um número significativo de fibras de maior calibre, ambas com bainha de mielina proporcionalmente fina em relação ao diâmetro do axônio. Observavam-se, ainda, muitos núcleos de células de Schwann com aspecto reacional, bem como a ocorrência de brotamento axonal (*sprouting*).

3.2.2 Análise Morfométrica

No Grupo 1, o número médio de fibras nervosas observadas foi 8851,10 (desvio padrão: 3055,94; mediana: 7639,00) no segmento proximal à lesão, 7057,10 (desvio padrão: 3283,75; mediana: 6773,50) no segmento da lesão, e 6268,60 (desvio padrão 2501,32; mediana: 6676,00) no segmento distal. A densidade média de fibras foi 21268,10 (desvio padrão: 8309,78; mediana: 18116,50) no segmento proximal à lesão, 20848,30 (desvio padrão: 10018,47; mediana: 19184,50) no segmento da lesão, e 11003,70 (desvio padrão: 3115,62; mediana: 11128,00) no segmento distal (FIGURA 9).

No Grupo 2, o número médio de fibras nervosas (FIGURA 9) observadas foi 9528,10 (desvio padrão: 2220,49; mediana: 9059,00) no segmento proximal à lesão, 10485,20 (desvio padrão: 4111,18; mediana: 9720,00) no segmento da lesão, e 9529,30 (desvio padrão: 3290,29; mediana: 8466,50) no segmento distal. A densidade média de fibras foi 16667,60 (desvio padrão: 2593,72; mediana: 16308,00) no segmento proximal à lesão, 20727,70 (desvio padrão: 9098,07; mediana: 17391,50) no segmento da lesão, e 21588,401 (desvio padrão: 6046,81; mediana: 21618,50) no segmento distal.

A análise estatística comparativa mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores do número de fibras ($p=0,23$) e da densidade média de fibras ($p=0,11$) observados no segmento proximal dos nervos de ambos os grupos.

No segmento correspondente à lesão, não houve diferenças significantes entre as densidades médias de fibras medidas nos dois grupos ($p=0,97$), mas sim entre os números totais de fibras ($p=0,05$), que foram maiores no Grupo 2 (tratado).

Já no segmento distal à lesão, houve diferença significativa para ambos os parâmetros estudados nos dois grupos, o número total de fibras e a densidade de fibras sendo significativamente maiores no Grupo 2 (respectivamente, $p=0,02$ e $p<0.001$).

FIGURA 9 - Gráfico dos valores da densidade média de fibras; no segmento distal, o grupo controle apresentou valor de densidade média de 11000 e o grupo tratado valor de 21589, com diferença estatisticamente significativa ($p<0.001$) evidenciando maior densidade em grupo tratado.

4 DISCUSSÃO

Estudos preliminares dão conta de que a irradiação com laser pode ter um papel sobre a função e, eventualmente, a regeneração dos nervos periféricos (NISSAN et al,1986; ROCHKIND, 1986, 1987a, 1987b, 1988, 1989, 1990, 2001; ASSIA et al, 1989; HAMILTON, ROBINSON, RAY, 1992; ANDERS, BORKE, WOOLERY, DE MERWE, 1993; BREUGEL & BAR, 1993; BASFORD, 1990, 1993; LOWE, BAXTER,WALSH, ALLEN, 1994).

O objetivo da presente investigação foi o de analisar a influência do laser de baixa potência (AsGa) na regeneração de lesões por esmagamento do nervo ciático de ratos, no curto prazo, avaliando os resultados por meio do Índice Funcional do Ciático (IFC) e da morfometria.

Primeiramente, realizamos uma análise da metodologia utilizada neste estudo.

O rato foi escolhido como animal de experimentação mais por ser um animal de fácil aquisição e manuseio, do que por ser o mais adequado para os propósitos do trabalho. De fato, a regeneração nervosa natural desses animais é muito rápida e próxima do normal, às vezes tornando difícil estabelecer parâmetros fidedignos de comparação, particularmente num experimento como este, em que um agente pretensamente de estimulação está sendo testado, e no longo prazo. Este foi o motivo porque o experimento foi idealizado para coleta dos resultados no curto prazo. Por outro lado, a estrutura morfológica dos nervos periféricos dos ratos se assemelha muito à dos nervos de humanos, bem como a fisiologia e os processos biológicos envolvidos na regeneração.

A lesão por esmagamento foi preferida a uma lesão por secção, por exemplo, porque preserva a estrutura de sustentação do nervo, mesmo com a aplicação de cargas de grande magnitude, como os 15.000 g empregados neste trabalho. A preservação da estrutura de sustentação indubitavelmente facilita a regeneração, visto que os tubos neurais estão em continuidade, não havendo a zona de reparo que existe quando se trata de lesão por secção seguida de reparo cirúrgico. Aliás, este foi outro fato que pesou na escolha do modelo de lesão por esmagamento: a lesão por secção deve ser reparada com técnica microcirúrgica, que demanda treinamento longo e especializado, mas que introduz uma série de variáveis de difícil controle e padronização.

A avaliação dos resultados foi feita pela medida do IFC e da densidade de fibras nervosas do nervo ciático, que apresentam correlação entre si, como demonstrado anteriormente (OLIVEIRA, MAZZER, BARBIERI, SELLI, 2001). De fato, o IFC tem-se mostrado um instrumento bastante confiável para avaliar o processo de regeneração nervosa periférica, fornecendo um valor numérico à função e permitindo uma análise estatística dos resultados.

O laser utilizado foi o de arsenieto de gálio (AsGa) por ser de baixa potência e de uso corrente na prática clínica, com antecedentes de emprego na regeneração de nervos periféricos (OLSON, SCHIMMERLING, TOBIAS, 1981; ROCHKIND et al., 1986, 1987a, 1989, 2001 ; WU et al. , 1987; ASSIA et al., 1989; JARVIS, MAC IVER, TANELIAN, 1990; BASFORD et al., 1990; HAMILTON, ROBINSON, RAY, 1992; ANDERS et al., 1993; LOWE et al., 1994). O uso do laser de baixa potência como instrumento terapêutico ainda é objeto de controvérsias e o seu efeito sobre estruturas nervosas não está claro. Não existem evidências concretas de que haja benefícios com o seu emprego, conhecendo-se ainda muito pouco sobre os mecanismos de interação com o meio biológico. Alguns resultados indicam que o laser não exerce qualquer influência sobre os nervos periféricos, como demonstraram GREATHOUSE ; CURRIER; GILMORE (1985), que empregaram o laser AsGa na tentativa de induzir alterações sobre a velocidade de condução do nervo radial superficial em humanos, nada obtendo de positivo, ou WU et al. (1987) que empregaram o laser HeNe

sobre o nervo mediano de humanos e falharam em demonstrar mudanças nos potenciais de ação induzidas pelo tratamento. Resultados semelhantes foram obtidos por BASFORD et al.(1990).

Por outro lado, algumas evidências foram obtidas de que a irradiação com o laser induz algumas mudanças no processo de regeneração do nervo periférico (ROCHKIND et al., 1986, 1987b, 1988, 1989, 1990, 2001; BAXTER, 1994; ASSIA et al., 1989; NISSAN, ROCHKIND, RAZON,BARTAL, 1986), tendo sido possível mesmo aventar prováveis mecanismos de ação.

Os resultados obtidos neste trabalho para o IFC mostraram que a recuperação funcional foi maior no grupo irradiado com o laser do que no grupo controle, já no 14º dia após a lesão por esmagamento, indicando que o laser AsGa pode ter um efeito benéfico sobre as estruturas nervosas periféricas. Entretanto, os resultados da análise estatística referentes ao 7º e ao 21º dias apontam para a inexistência de um efeito positivo sobre as estruturas nervosas danificadas. Na prática clínica, porém, ao tratarmos pacientes com comprometimento nervoso periférico, observamos melhoras precoces, em torno da 1ª semana de tratamento, segundo relatos subjetivos coletados dos próprios pacientes. É o caso de tratamento de lesões do nervo ciático e trigêmeo, cuja manifestação clínica dolorosa diminui após a aplicação da irradiação laser. Estes resultados são empíricos e não podemos verificar a real validade dos mesmo por meio de parâmetros objetivos.

Uma provável explicação para os baixos IFC do grupo irradiado no 7º dia pós-lesão seria a ainda baixa interação do laser de baixa potência com o tecido neural durante os sete primeiros dias, não atingindo um limiar de valor energético suficiente para desencadear reações sobre os tecidos, conforme relatado por OLSON; SCHIMMERLING; TOBIAS (1981). Estes autores observaram o nível de excitabilidade celular nervosa de acordo com o nível de densidade energética aplicada por um laser de 694 nm de comprimento de onda. Aparentemente existe um efeito crescente e cumulativo de energia que desencadeia a resposta celular nervosa ao atingir um determinado limiar. ROCHKIND et al. (1996), ao irradiar nervos ciáticos esmagados de ratos com laser HeNe, observou igualmente que há um valor limiar de energia, dependente do tempo de aplicação, que produz alterações no potencial de ação; acima ou abaixo desse limiar não existem efeitos benéficos.

No 21º dia após a lesão observou-se que houve diferenças entre os IFC dos grupos irradiado e de controle, mas que não foram de significância estatística. Todavia, analisando a evolução das curvas observa-se que os valores médios foram diferentes, demonstrando provável continuidade da ação do laser sobre o nervo ciático. Por outro lado, ASSIA et al. (1989) demonstraram que os efeitos da irradiação com laser são transitórios, permanecendo por até três semanas, sendo mais efetivos com duas semanas. Indicaram que a maioria dos efeitos da irradiação laser são encontrados após uma semana de irradiação .

A resposta ao estímulo do laser de baixa potência deriva da quantidade de energia total aplicada, portanto do tempo de estimulação sobre a estrutura, conforme observado por NISSAN; ROCHKIND; RAZON;BARTAL (1986); comparando os potenciais de ação do nervo após 1, 3, 7, 10,14, 21 e 30 minutos de estimulação com laser HeNe, demonstraram que esse parâmetro aumentou nos primeiro 7 minutos, permanecendo alto até os 14 minutos, seguido-se uma queda, embora o efeito persistisse após o início do declínio da curva.

Os mecanismos envolvidos na ação da irradiação laser sobre tecidos nervosos não estão ainda bem esclarecidos. Sugerem-se alterações na permeabilidade de membrana celular, na ação de enzimas mitocondriais e de processos fotoquímicos e fotofísicos, e na taxa de produção de RNA, como fatores resultantes da estimulação pelo laser de baixa potência. Sabe-se, entretanto, que a dose estipulada neste experimento não é capaz de produzir elevação de temperatura tecidual e, portanto, efeitos térmicos não são os responsáveis pela produção de resultados positivos sobre os nervos. Outro fator já pesquisado em diversos estudos é o de que a energia laser age principalmente evitando a degeneração nervosa (ROCHKIND et al., 1986, 1987,1989, 2001; ASSIA et al., 1989; BASFORD et al, 1990; JARVIS,MAC IVER, TANELIAN, 1990; HAMILTON, ROBINSON, RAY,1992; LOWE, BAXTER, WALSH, ALLEN, 1994).

Entretanto, sabe-se que a regeneração nervosa é dependente mais da função do corpo celular do neurônio, que se prepara

ativamente para produzir o axoplasma, do que do axônio, onde está a lesão e onde a irradiação com laser é aplicada. Assim, um possível efeito benéfico da irradiação com laser deverá estar ocorrendo no processo de reconstituição dos tubos neurais lesados, facilitando a evolução do preenchimento com o novo axoplasma.

De fato, neste trabalho a análise histológica mostrou processos de franca recuperação no segmento nervoso distal à lesão, no nervos tratados com o laser de baixa potência, em comparação com aqueles não tratados. Evidência disso foram os núcleos das células de Schwann com aspecto reacional, indicando um processo de intensa síntese de material na região, além das áreas de brotamento axonal (*sprouting*), típicas dos processos regenerativos nervosos. A análise estatística do número e da densidade de fibras também aponta para a regeneração no segmento do nervo distal à lesão por esmagamento. Estes achados indicam que o processo de reparo nervoso apresenta-se mais intenso no grupo tratado com laser, do que no não tratado. A ausência na literatura especializada de trabalhos que tivessem analisado os aspectos relativos à avaliação histológica dos nervos após o uso do laser de baixa potência (comprimento de onda de 904 nm) dificulta qualquer comparação. De fato, os estudos realizados sobre a possível atuação da irradiação com laser de baixa potência utilizam, na maioria dos casos, métodos eletrofisiológicos de avaliação.

5 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados no presente estudo permitem concluir que:

- 1. O laser de arsenieto de gálio (AsGa), na dose utilizada, possui efeito benéfico temporário sobre o nervo ciático de ratos**

submetido a lesão por esmagamento, segundo os resultados da avaliação funcional;

2. A irradiação laser contribuiu para a melhora do aspecto morfológico nervoso após lesão por esmagamento, evidenciando um processo regenerativo acentuado, em comparação com o grupo não tratado.
3. Novos estudos, mais profundos, são necessários para esclarecer o papel desempenhado pela irradiação com o laser, bem como os possíveis mecanismos, na regeneração dos nervos periféricos.
4. Existe a necessidade de realização de experimentos clínicos com laser de baixa potência, cujos resultados possam ser analisados e aplicados nas atividades de atendimento a pacientes portadores de lesões nervosas periféricas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERS, JJ; BORKE, RC; WOOLERY, SK; DE MERWE, WP (1993). *Low power laser irradiation alters the rate of regeneration of the rat facial nerve*. Laser Surg. Med. 13: 72-82.

ASSIA, E; ROSNER, M; BELKIN, M; SOLOMON, A; SCHWATZ, M (1989). *Temporal parameters of low energy laser irradiation for optimal delay of post-traumatic degeneration of rat optic nerve*. Brain Research, 476: 205-212.

BAIN, JR; MACKINNON, SE; HUNTER, RT (1989). *Functional evaluation of complete sciatic, peroneal e posterior tibial nerve lesions in the rat*. Plastic and Reconst. Surgery, 83: 129-138.

BASFORD, JR; DAUBE, JR; HALLMAN, HO; MILLARD, TL; MOYER, SK (1990). *Does low-intensity helium-neon laser irradiation alter sensory nerve active potentials or distal latencies?* Laser Surg Med 10: 35-39.

BASFORD, JR; HALLMAN, HO; MATSUMOTO, JY; MOYER, SK; BUSS, JM; BAXTER, GD (1993). *Effects of 830nm continuous wave laser diode irradiation on median nerve function in normal subjects*. Laser Surg. Med., 13: 597-604.

BAXTER, GD (1994). *Therapeutic lasers - Theory and practice*. 1st Ed. Churchill Livingstone, New York.

- BAXTER, GD; BELL, AJ; ALLEN, JM et al (1991). *Low-laser therapy. Current clinical practice in Northern Ireland* , Physiotherapy, 77: 171-178.
- BREUGEL, HHFI; BÄR, PR (1993). *He-Ne laser irradiation affects proliferation of cultured rat Schwann cells in a dose-dependent manner*. J. Neurocytology, 22: 185-190.
- BRIDGE, PM; BALL, DJ; MACKINNON, SE; NAKAO, Y; BRANDT, K; HUNTER, DA; HERTL, C (1994). *Nerve crush injuries - A model for axonotmesis*. Exp. Neurol., 127: 284-290
- CARLTON, JM; GOLDBERG, NH (1986). *Quantitating integrated muscle function following reinnervation*. Surgical Forum, 37: 611-612.
- COLLS, J. (1984). *La terapia laser, hoy*. 1ª Ed., Centro Documentación Láser de Meditec. Barcelona.
- CRAGG, BG; THOMAS, PK (1964). *The conduction velocity of regenerated peripheral nerve fibres*. J. Physiol, 171: 164-175
- DAHLIN, LB; RYDEVIK, B (1991) *Pathophysiology of nerve compression*. In: GELBERMAN,RH. Operative nerve repair and reconstruction. Philadelphia. J.B. Lippincott Company. Vol2, p.847-862.

- DELLON, AL; MACKINNON, SE (1989). *Sciatic nerve regeneration in the rat. Validity of walking track assessment i the presence of chronic contractures*. Microsurgery, 10: 220-225.
- DE MEDINACELLI, L; FREED, WJ ; WYATT, RJ (1982). *An index of the functional condiction of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks*. Exp. Neuro, 77, 6634-643.
- DE MEDINACELI, L; DERENZO, E; WYATT, RJ (1984). *Rat sciatic functional index data management system with digitized input*. Comp Biom Res, 17: 185-192.
- DEVOR, M; SCHONFELD, D; SELTZER, Z; WALL, PD (1979). *Two modes of cutaneous reinnervation following peripheral nerve injury*. J.Comp Neurology, 185: 211-220.
- GREATHOUSE, DG; CURRIER, DP; GILMORE,RL (1985). *Effects of clinical infrared laser on superficial radial nerve conduction*. Phys Ther, 65: 1184-1187.
- GUTMANN, E; GUTMANN, L (1942). *Factors affecting recovery of sensory function after nerve lesions*. Journal Nuerol Psychiat, 5: 117-129.
- HAMILTON, GF; ROBINSON, TK; RAY, RH (1992). *The effects of helium-neon laser upon regeneration of the crushed peroneal nerve*. JOSP, 15 (5): 209-214.

HARE, GMT; EVANS, PJ; MACKINNON, SE; BEST, TJ; BAIN, JR; SZALAI, JP; HUNTER, DA (1992). *Walking track analysis: a long-term assessment of peripheral nerve recovery*. Plastic and Reconst.Surgery, 89 (2): 251-258

HRUSKA, RE; KENNEDY, S; SILBERGELD, EK (1979). *Quantitative aspects of normal locomotion in rats*. Life Sci. 25: 171-180.

JARVIS, D; MACIVER, MB; TANELLAN, DL (1990). *Eletrophysiologia recording and thermodynamic modeling demonstrate that Helium-Neon laser irradiation does not affect peripheral A-gama ou C fibers nociceptors*. Pain, 43, 235-242.

LOWDON, IMR; SEABER, V; URBANIAK, JR (1988). *An improved method of recording rat tracks for measurement of the sciatic functional index of De Medinaceli*. J. Neuroscience Meth, 24: 279-281.

LOWE, AS; BAXTER, GD; WALSH, DM; ALLEN, JM (1994). *Effect of low intensity laser (830nm) irradiation on skin temperature and antidromic conduction latencies in the human median nerve: Relevance of radiant exposure*. Laser Surg. Med., 14: 40-46.

MACHADO, ABM (1993). *Neuroanatomia Funcional*, 2^a ed, Ed. Atheneu, S.P.

MACKINNON, SE; HUDSON, AR; HUNTER, DA (1985). *Histologic assessment of nerve regeneration in the rat*. Plastic and reconstructive surgery, 75 (3): 384-388.

MENDONÇA, AC (2000). *Estudo da regeneração do nervo ciático de ratos submetidos à estimulação elétrica após lesão por esmagamento*._Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto -USP.

MIRA, JC (1979). *Quantitative studies of the regeneration of rat myelinated nerve fibres: variations in the number and size of regenerating fibres after repeated localized freezings*. J. Anat, 129: 77-93.

NISSAN,M; ROCHKIND, S; RAZON, N; BARTAL, A (1986). *HeNe Laser irradiation delivered transcutaneously: its effect on the sciatic nerve of rats*. Laser Surg. Med., 6: 435-438.

OLIVEIRA, EF (1995). *Estudo experimental da recuperação das lesões do nervo ciático por esmagamento- análise funcional da marcha e correlação morfométrica*. Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP.

OLIVEIRA,EF; MAZZER,N; BARBIERI,CH; SELLI,M (2001). *Correlation between functional index and morphometry to evaluate recovery of the rat sciatic nerve following crush injury: experimental study*. J Reconstr Microsurg, 17(1): 69-75.

OLSON, JE; SCHIMMERLING, W; TOBIAS, CA (1981). *Laser action spectrum of reduced excitability in nerve cells*. Brain Research, 204: 436-440.

ORGEL, MG (1982). *Experimental studies with clinical application to peripheral nerve injury: a review of the past decade*. Clin Orthop, 163: 98-106.

ROCHKIND,S; NISSAN, M; RAZON, N; SCHWARTZ, M; BARTAL, A (1986). *Electrophysiological effect of HeNe laser on normal and injured sciatic nerve in the rat*. Acta Neurochir, 83: 125-130.

ROCHKIND,S; NISSAN, M; BARR-NEA, L; RAZON, N; SCHWARTZ, M; BARTAL, A (1987a). *Response of peripheral nerve to He-Ne laser: experimental studies*. Laser Surg Med, 7: 441-443.

ROCHKIND,S; BARR-NEA, L; RAZON, N; BARTAL, A; SCHWARTZ,M (1987b). *Stimulatory effect of HeNe dose laser on injured sciatic nerves of rats*. Neurosurgery , 20(6): 843-847.

ROCHKIND, S; NISSAN, M; LUBART, R; AVRAM, J; BARTAL, A (1988). *The in-vivo-nerve response to direct low-energy-laser irradiation*, Acta Neurochir, 94: 74-77.

ROCHKIND,S; ROUSSO, M; NISSAN, M; VILARREAL,M; BARR-NEA, L; REES, DG (1989). *Systemic effects of low-power laser irradiation on the peripheral and central nervous system, cutaneous wounds and burns*. Laser Surg Med, 9: 174-182.

ROCHKIND, S; VOGLER, I; BARR-NEA, L (1990). *Spine cord response to laser treatment of injured peripheral nerve*. Spine, 15 (1): 06-10.

ROCHKIND, S; NISSAN,M; ALON, M; SHAMIR, M; SALAME, K (2001). *Effects of laser irradiation on the spinal cord for the regeneration of crushed peripheral nerve in rats*. Laser Surg. Med., 28: 216-219.

SEDDON, H.J. (1975). *Surgical disorders of the peripheral nerves*. 2nd Ed. Churchill Livingstone, Edinburgh (clássico)

SELLI, MF (1998). *Desenvolvimento de um método computadorizado para avaliação funcional das lesões de nervos periféricos através da análise da marcha: modelo experimental em ratos*. São Carlos, 70p. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação Interunidades Bioengenharia - EESC/FMRP/IQSC - USP.

SUNDERLAND, S (1985). *Nerve and nerve injuries*. 2nd Ed. Churchill Livingstone, London (clássico)

UMPHREAD,DA, (1994). *Fisioterapia Neurológica*. 1^aed, Ed. Manole, S.P.

VEÇOSO, MC (1993). *Laser em Fisioterapia*. 1^a Ed., Editora Lovise Científica, São Paulo.

WALKER,JB (1985). *Temporary supression of clonus in humans by brief photobiostimulation*, Brain Research, 344 : 281-285.

WALSH,DM; LOWE,AS & BAXTER,GD (1995). *An investigation of the effect of 820nm laser irradiation upon nerve conduction in the frog sciatic nerve in vitro*, Irish Journal of Medical Science, 24 :23-34.

WU, W; PONNUDURAI, R; KATZ, J; POTT, CB; CHILCOAT, R; UNCINI, A; RAPOPORT S; WADE, P; MAURO, A (1987). *Failure to confirm of light-evoked response of peripheral nerve to low power helium-neon laser light stimulus*. Brain Research, 401: 407-408.