

A IRRADIAÇÃO LOCAL COM O LASER DE BAIXA POTÊNCIA ACELERA A REGENERAÇÃO DO NERVO FIBULAR DE RATOS

LOCAL LOW POWER LASER IRRADIATION ACCELERATES THE REGENERATION OF THE FIBULAR NERVE IN RATS

RODRIGO ANTÔNIO CARVALHO ANDRAUS, CLÁUDIO HENRIQUE BARBIERI, NILTON MAZZER

RESUMO

Objetivo: Estudar a influência da irradiação com o laser AsGaAL de baixa potência na regeneração de um nervo periférico, após lesão por esmagamento controlado. Material e métodos: O nervo fibular comum direito de 30 ratos Wistar foi submetido a uma lesão por esmagamento com uma pinça de carga regulável (5.000 g, 10 minutos de aplicação), os animais sendo divididos em três grupos (n=10), de acordo com o procedimento pós-operatório (sem irradiação; irradiação simulada; irradiação efetiva). A irradiação com o laser (comprimento de onda: 830 nm; potência do emissor: 100 mW; modo contínuo; dose: 140 J/cm²) era iniciada no primeiro dia pós-operatório e realizada por 21 dias consecutivos. Foram analisados a massa corporal dos animais, o tempo de percurso na passarela de marcha e o índice funcional do fibular (PFI), pela análise das impressões das pegadas, no período pré-operatório e no 21º dia pós-operatório. Resultados: O tempo de marcha e o PFI melhoraram significativamente mais no grupo de irradiação efetiva com o laser, apesar do ganho significativo de massa corporal entre os períodos pré e pós-operatório. Conclusão: A irradiação com o laser AsGaAL de baixa potência com os parâmetros aqui empregados acelerou e melhorou a regeneração do nervo fibular do rato.

Descritores: Regeneração nervosa. Ratos. Síndrome de esmagamento. Nervo fibular.

ABSTRACT

Objective: To study the influence of low power GaAs-Al laser irradiation on the regeneration of a peripheral nerve, following a controlled crush injury. Material and methods: The right common fibular nerve of 30 Wistar rats was submitted to a crush injury with an adjustable load forceps (5 000 g, 10 minutes of application). The animals were divided into three groups (n=10), according to the postoperative procedure (no irradiation; sham irradiation; effective irradiation). Laser irradiation (830 nm wave-length; 100 mW emission power; continuous mode; 140 J/cm²) was started on the first postoperative day and continued over 21 consecutive days. Body mass, time spent on the walking track and functional peroneal index (FPI) were analyzed based the hind footprints, both preoperatively and on the 21st postoperative day. Results: Walking time and PFI significantly improved in the group that received effective laser irradiation, despite the significant gain in body mass between the pre- and post-operative periods. Conclusion: Low Power GaAs-Al laser irradiation, with the parameters used in our study, accelerated and improved fibular nerve regeneration in rats.

Keywords: Nerve regeneration. Rats. Crush syndrome. Peroneal nerve.

Citação: Andraus RAC, Barbieri CH, Mazzer N. A irradiação local com o laser de baixa potência acelera a regeneração do nervo fibular de ratos. *Acta Ortop Bras.* [online]. 2010; 18(3):152-7. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/aob>

Citation: Andraus RAC, Barbieri CH, Mazzer N. Local low power laser irradiation accelerates the regeneration of the fibular nerve in rats. *Acta Ortop Bras.* [online]. 2010; 18(3):152-7. Available from URL: <http://www.scielo.br/aob>

INTRODUÇÃO

A despeito de tratamento cirúrgico e de reabilitação adequados, as lesões traumáticas dos nervos periféricos nem sempre evoluem satisfatoriamente, com retorno das funções motora e sensitiva em níveis úteis. Recursos físicos, como a eletricidade,¹ o eletromagnetismo, o ultra-som terapêutico² e o laser,³ têm sido empre-

gados para estimular a regeneração dos nervos periféricos, com resultados ainda controversos, mas tendendo a positivos. Desses recursos, o laser é, talvez, o menos conhecido, no que se refere aos seus efeitos sobre o tecido biológico^{4,5} e aos parâmetros de utilização, como dose, comprimento de onda, modo contínuo ou pulsado,^{4,6} duração do tratamento³ e local de aplicação.

Todos os autores declaram não haver nenhum potencial conflito de interesses referente a este artigo.

Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP

Trabalho desenvolvido no Programa de Pós-graduação Ortopedia, Traumatologia e Reabilitação da FMRP-USP

Endereço de Correspondência: Cláudio Henrique Barbieri. Campus Universitário. CEP:14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brasil. E.mail: chbarbie@fmrp.usp.br

Trabalho recebido em 03/12/08, aprovado em 19/09/09

Gigo-Benato et al.⁷ aplicaram a irradiação com o laser de baixa potência (comprimentos de onda de 808 nm e 905 nm, e doses de 29 J/cm² e 40 J/cm², respectivamente) diretamente sobre o nervo mediano, seccionado e reparado pela neurorrafia término-lateral do coto distal no nervo ulnar intacto, em ratos; o tratamento foi realizado durante três semanas, desde o primeiro dia pós-operatório e, num grupo controle, o tratamento foi simulado. Demonstraram que ocorreram mielinização e recuperação da massa muscular, mais rapidamente no grupo tratado, com melhora significativa da função, em comparação com o grupo controle.

Endo et al.⁸ empregaram a irradiação com o laser (arseneto de gálio, AsGa) pulsado de baixa potência (comprimento de onda de 904 nm, potência de pico de 20 W, largura de pulso de 180 ns, frequência de 1 MHz e dose de 4 J/cm²) sobre o nervo ciático submetido a lesão por esmagamento, em ratos. Os resultados foram avaliados pela análise funcional da marcha e pela morfometria dos nervos tratados, ficando demonstrado que estes mostraram melhor recuperação, com maior número de fibras nervosas regeneradas, refletindo em melhora funcional. Os autores concluíram que o laser de baixa potência efetivamente acelera a regeneração dos nervos lesados, tendo potencial para aplicação clínica em humanos.

A avaliação funcional passou a ser um dos métodos de estudo da regeneração de um nervo periférico em animais, desde a descrição do índice funcional do ciático por De Medinaceli et al.^{9,10}, mais tarde modificado por Bain et al.¹¹ Esse método, que tem a vantagem de não ser invasivo, mostra estreita correlação com o grau de regeneração morfológica, medido pela morfometria, e pode ser empregado em substituição aos métodos invasivos, como a própria morfometria e métodos correlatos, em estudos longitudinais, pois não requerem o sacrifício dos animais.¹² Para sua execução, são obtidas as impressões das pegadas das patas traseiras dos animais, nas quais são medidos alguns parâmetros, introduzidos em uma fórmula matemática, cujo resultado é o índice funcional do ciático (IFC), que é um indicador negativo da função nervosa, variando de zero (0) a -100, zero significando ausência de disfunção e -100, disfunção completa.^{1,12-14}

Foi o objetivo da presente investigação analisar a influência da irradiação com o laser (arseneto de gálio e alumínio, AsGaAL) sobre a regeneração do nervo fibular submetidos a lesão por esmagamento, através da análise funcional da marcha, incluindo a medida da velocidade da marcha, em ratos.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no uso Experimental de Animais da instituição onde a investigação foi realizada. Foram utilizados 35 ratos machos da linhagem *Wistar*, com idade aproximada de três meses e peso médio de 220 g (variação: 190 – 250 g). Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, com cinco animais cada, recebendo ração padronizada e água, à vontade. Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais, conforme o procedimento realizado:

Grupo 1: nervo lesado, sem tratamento (n=10);

Grupo 2: nervo lesado, tratamento simulado (placebo) (n=10);

Grupo 3: nervo lesado, tratamento efetivo (n=10);

Foi constituído, ainda, um grupo controle, com cinco animais intactos e sem qualquer tratamento.

Procedimentos pré-operatórios

Nos três dias que antecediam a operação, os ratos eram treinados a caminhar numa passarela de madeira de análise da marcha de 43 cm de comprimento por 8,7 cm de largura, com uma casinhola escura no final, que lhes serviria de abrigo e onde eram colocados

alguns grãos de ração, que lhes serviriam de atrativo. A passarela foi, também, dotada de dois sensores de movimento, sendo um na sua entrada e outro na entrada da casinhola, ambos conectados a um cronômetro eletrônico, para medida do tempo de percurso. (Figura 1) Tão logo os animais caminhassem na passarela sem titubear, eram obtidas as impressões das pegadas normais das patas traseiras, que serviriam como parâmetro normal para futuras comparações. As pegadas eram obtidas em tiras de papel com as dimensões da passarela, impregnadas com azul de bromofenol diluído a 1% em acetona, previamente preparadas, de acordo com o método proposto por De Medinaceli et al.^{9,10}, Khullar et al.¹⁵, Rochkind et al.¹⁶ e modificado por Rochkind et al.¹⁷ e Lowdon et al.¹⁸ O papel impregnado com o azul de bromofenol apresenta coloração amarelo-laranja depois de seco, mas, em contato com soluções aquosas, torna-se permanentemente azul. Para os propósitos do estudo, foi empregado detergente doméstico para umedecer as patas traseiras dos animais, que apresenta a vantagem de evitar dispersão e o borramento da impressão. Depois de secas, as tiras de papel eram copiadas com um *scanner* de alta resolução e as imagens 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 PFI.¹⁹

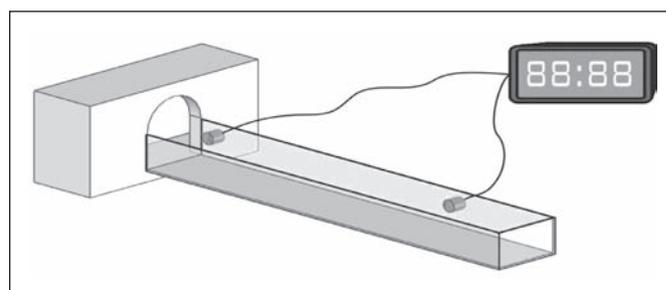


Figura 1 – Figura esquemática da passarela de análise da marcha, com os sensores de registro do tempo de percurso.

Procedimento operatório

Os animais eram operados sob anestesia geral, com uma mistura de Ketamina a 5% e Xilazina a 2%, na proporção de 1:4, sendo administradas doses de 0,10 a 0,15 ml/100 g de peso corporal do animal, por via intra-peritoneal. O animal era posicionado em decúbito ventral sobre uma mesa apropriada, com as patas traseiras e dianteiras fixadas em abdução e o local operatório na coxa direita do animal era preparado de maneira rotineira, com tricotomia, antiseptia (álcool iodado a 20%) e colocação de um campo cirúrgico. O nervo ciático era abordado através de uma incisão cutânea longitudinal de cerca de 3 cm de comprimento, desde o trocanter maior até o joelho, seguida da dissecação romba entre o músculo glúteo máximo e o quadríceps. O nervo era tracejado até sua divisão nos três ramos principais (tibial, fibular e sural), sendo isolado o nervo fibular, objeto do estudo, no qual era produzida uma lesão por esmagamento circunscrita a um segmento de 5 mm de comprimento, imediatamente distal à sua emissão, aplicando-lhe uma pinça regulável confeccionada para essa finalidade e calibrada para uma carga estática de 5.000 g, por dez minutos. (Figura 2) A calibração da pinça era feita a cada cinco aplicações consecutivas, com o auxílio de uma célula de carga. Decorridos os dez minutos de aplicação da pinça, o nervo fibular era cuidadosamente destacado e recolocado em seu leito, a ferida operatória sendo fechada por planos, com pontos separados de nylon 5/0 (Mononylon®, Ethicon).



Figura 2 – Representação da lesão nervosa por esmagamento do nervo fibular comum.

Irradiação com o laser

A irradiação do laser (Figura 3) foi realizada com um equipamento de laser de diodo de baixa potência de arseneto de gálio e alumínio (AsGaAL)^{1*}, com as seguintes características: comprimento de onda de 830 nm, potência do emissor de 100 mW, modo contínuo, dose de 140 J/cm². A irradiação foi feita por 21 dias consecutivos, começando no primeiro dia pós-operatório, pelo método transcutâneo pontual, por contato estático, em cinco pontos na região da lesão. Cada ponto de irradiação distava 1 cm do outro, com um tempo de 40 segundos por ponto, num total de 2 minutos de irradiação por animal.

Avaliação funcional da marcha (PFI)

Foram analisadas 60 (2 x 30) impressões de pegadas, totalizando 60 avaliações. O registro das imagens captadas foi analisado por meio do programa de computador AFNP – Análise Funcional dos Nervos Periféricos, desenvolvido no Laboratório de Bioengenharia^{2*3*}, o qual calculou os parâmetros pré-determi-



Figura 3 – Laser portátil.

1* DMC, São Carlos, Brazil.

2,3* Yamasita, Mazzer, Barbieri, 2008.

nados para a avaliação funcional da marcha. (Figura 4) O programa permite a análise de todos os índices funcionais, mas nesta investigação foi utilizado somente o índice funcional do fibular (PFI, de peroneiro).

Nas impressões das pegadas foram medidos os parâmetros: comprimento da pegada (PL, de print length), espalhar total dos dedos (TS, de toe spread) e espalhar dos dedos intermediários (IT, de intermediate toes), nas pegadas ditas normais (N) e experimentais (E). Estes mesmos dados foram lançados na fórmula de Bain, Mackinnon, e Hunter (10) específica para o índice funcional do fibular (PFI):

$$PFI = 174,9 \times \left(\frac{EPL - NPL}{NPL} \right) + 80,3 \times \left(\frac{ETS - NTS}{NTS} \right) - 13,4$$



Figura 4 – Visualização da tela do monitor, com duas impressões de pegada, mostrando os pontos-chave a serem clicados, com o uso do programa modificado por Yamasita, Mazzer e Barbieri (2008).

Análise estatística

utilizou-se o modelo de regressão linear, tendo como variável-resposta o aumento/diminuição obtido após a intervenção, para cada uma das variáveis. Esse aumento/diminuição é dado pela razão dos respectivos valores de cada animal entre o período pós e pré-operatório (Pós/Pré). Considerou-se como variável independente o grupo ao qual o animal pertencia: grupos 1 a 3 e grupo controle. As análises foram realizadas no software SAS 9.0, através do procedimento PROC REG, considerando o nível de significância de 5% (p < 0,05).

RESULTADOS

Todos os animais dos Grupos 1 a 3 apresentaram deformidade moderada da pata traseira direita, com contratura em flexão da pata e flexão-adução dos dedos, resultantes da paralisia da musculatura extensora/eversora da pata e extensora dos dedos. Eram capazes de apoiar-se na pata operada, mas a marcha era do tipo escarvante, até o final da primeira semana pós-operatória, quando o apoio passou a ser mais completo. Aparência e apoio melhoraram lentamente na pata traseira direita nas duas semanas seguintes, o que se refletiu na melhora do PFI, mas não chegaram

a voltar inteiramente ao normal até o 21^o dia, término do período experimental. Mas foi possível diferenciar que a marcha era melhor no Grupo 3 (lesão + irradiação efetiva) que nos Grupos 1 (lesão, sem irradiação) e 2 (lesão + irradiação simulada).

O valor médio do PFI pré-operatório foi de -12,19, no grupo controle, e de -5,61, -8,37 e -3,56, nos Grupos 1, 2 e 3, respectivamente, sem diferença estatística entre os grupos. (Tabela 1) O tempo necessário para percorrer a passarela nessa fase foi de 68,4 ms no grupo controle, e 69,6 ms, 62,4 ms e 62,7 ms, nos Grupos 1, 2 e 3, respectivamente, sem diferença estatística entre os grupos. (Tabela 2) O peso médio dos animais na fase pré-operatória foi de 224 g no grupo controle, 225 g no Grupo 1, 226 no Grupo 2 e 219,5 no Grupo 3, não havendo diferença estatística entre os grupos. (Tabela 3)

Tabela 1 – Descrição da variável PFI, de acordo com os grupos e o período, e da diferença obtida antes e após a intervenção (21-0), em cada um dos grupos.

Grupo	Período	N	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo
PFI							
Controle	Pré	5	-12,19	7,3	-24,23	-9,38	-6,03
	21 d	5	-3,93	1,32	-5,48	-4,14	-1,93
1	Pré	10	-5,61	1,88	-8,74	-5,01	-3,4
	21 d	10	-37,46	25,97	-81,99	-26,67	-13,54
2	Pré	10	-8,37	3,42	-15,19	-9,27	-3,18
	21 d	10	-26,59	20,63	-64,53	-17,35	-11,92
3	Pré	10	-3,56	2,6	-8,01	-2,84	-0,78
	21 d	10	-4,16	1,71	-6,39	-4,59	-1,37
Razão							
Controle		5	0,4	0,21	0,14	0,44	0,59
1		10	7,21	5,17	2,48	6,5	18,45
2		10	3,75	3,81	1,4	2,08	13,65
3		10	2,2	2	0,37	1,06	5,05

Tabela 2 - Descrição da variável TEMPO, de acordo com os grupos e o período, e da diferença obtida antes e após a intervenção (21-0), em cada um dos grupos.

Grupo	Período	N	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo
Tempo							
Controle	Pré	5	68,04	2,41	65	69	71
	21 d	5	64,6	3,65	61	63	69
1	Pré	10	69,6	4,03	62	69,5	76
	21 d	10	79,5	1,65	77	79,5	82
2	Pré	10	62,4	7,12	55	60,5	75
	21 d	10	78,4	4,77	72	77	86
3	Pré	10	62,7	1,49	60	63	65
	21 d	10	52,9	1,79	50	53	56
Razão							
Controle		5	0,94	0,04	0,9	0,9	0,97
1		10	1,15	0,06	1,05	1,13	1,29
2		10	1,27	0,12	1,09	1,27	1,47
3		10	0,84	0,04	0,78	0,85	0,92

Tabela 3 – Descrição da variável PESO, de acordo com os grupos e o período, e da diferença obtida antes e após a intervenção (21-0), em cada um dos grupos.

Grupo	Período	N	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo
Peso							
Controle	Pré	5	224	11,94	210	225	240
	21 d	5	417	38,83	390	405	485
1	Pré	10	225	7,45	215	225	235
	21 d	10	415,5	41,19	375	405	495
2	Pré	10	226	7,38	215	227,5	235
	21 d	10	384,5	22,66	345	387,5	425
3	Pré	10	219,5	5,99	210	220	230
	21 d	10	389,5	8,96	380	387,5	405
Razão							
Controle		5	1,87	0,26	1,7	1,76	2,31
1		10	1,85	0,22	1,6	1,81	2,3
2		10	1,7	0,13	1,53	1,69	1,93
3		10	1,78	0,08	1,65	1,77	1,93

No 21^o dia pós-operatório, o valor médio do PFI foi de -3,93 no grupo controle e de -37,46 no Grupo 1, -26,59 no Grupo 2 e -4,16 no Grupo 3 (Tabela 1), com diferenças significantes nas comparações entre o grupo controle e os Grupos 1, 2 e 3 ($p < 0,05$), e entre os Grupos 1 com o Grupo 3, mas não obtendo diferença estatisticamente significativa entre os Grupos 1 e 2, e Grupos 2 e 3. O tempo de percurso no período pós-operatório foi de 64,6 ms no grupo controle e de 79,5 ms, 78,4 ms e 52,9 ms nos Grupos 1, 2 e 3, respectivamente (Tabela 2), não tendo diferenças estatisticamente significantes entre os grupos nesse período. O peso médio dos animais foi de 417 g no grupo controle e de 415,5 g, 384,5 g e 389,5 g, nos Grupos 1, 2 e 3, respectivamente (Tabela 3), as diferenças entre os grupos nesse período não sendo significantes, ($p < 0,05$). Houve diferenças significantes nas comparações entre os valores pré e pós-operatórios do peso dos animais para todos os grupos ($p < 0,01$). Para o tempo de percurso, as diferenças foram significantes para os Grupos 1, 2 e 3 ($p < 0,01$), mas não para o grupo controle ($p = 0,06$). Já para o PFI, as diferenças foram significantes para o grupo controle e para os Grupos 1 e 2 ($p < 0,01$), mas não para o Grupo 3 ($p = 0,19$). (Tabela 4)

Houve diferenças significantes na razão entre os valores observados nos períodos pré e pós-operatório (aumento/diminuição) para a variável PFI na comparação entre o grupo controle e os Grupos 1, 2 e 3 ($p < 0,01$) e entre os Grupos 1 e 3 ($p < 0,01$), mas não entre os Grupos 1 e 2 ($p = 0,06$) e entre os Grupos 2 e 3 ($p = 0,07$). Para a variável tempo de percurso, as diferenças foram significantes em todas as comparações ($p < 0,01$), ao passo que para a variável peso, não houve diferença significativa para nenhuma comparação. (Tabela 5)

DISCUSSÃO

Apesar de sua utilização rotineira para o tratamento de lesões dos tecidos músculo-esqueléticos, o laser ainda é um recurso físico pouco conhecido, no que se refere tanto aos parâmetros de utilização, como aos seus efeitos. Há muitas evidências de que o laser interfere com a função dos nervos periféricos, podendo diminuir o tempo de latência e aumentar a velocidade de condução

Tabela 4 – Valores médios pré e pós-operatórios para as três variáveis e razão aumento/diminuição.

Variável	Grupos	Pré		Pós		Aumento/ Diminuição		P
		Média	DP	Média	DP	(Razão)		
						Média	DP	
PFI	Controle	-12,19	7,3	-3,93	1,32	0,4	0,21	< 0,01
	Grupo 1	-5,61	1,88	-37,46	25,97	7,21	5,17	< 0,01
	Grupo 2	-8,37	3,42	-26,59	20,63	3,75	3,81	< 0,01
	Grupo 3	-3,56	2,6	-4,16	1,71	2,2	2	0,19
Tempo	Controle	68,4	2,41	64,6	3,65	0,94	0,04	0,06
	Grupo 1	69,6	4,03	79,5	1,65	1,15	0,06	< 0,01
	Grupo 2	62,4	7,12	78,4	4,77	1,27	0,12	< 0,03
	Grupo 3	62,7	1,49	52,9	1,79	0,84	0,04	< 0,01
Peso	Controle	224	11,94	417	38,83	1,87	0,26	< 0,01
	Grupo 1	225	7,45	415,5	41,19	1,85	0,22	< 0,01
	Grupo 2	226	7,38	384,5	22,66	1,7	0,13	< 0,01
	Grupo 3	219,5	5,99	389,5	8,96	1,78	0,08	< 0,01

Tabela 5 – Comparações do aumento/diminuição obtido entre os grupos, nos períodos pré e pós-operatório, para cada variável

Variável	Grupos	Aumento/Diminuição		Grupo	Aumento/Diminuição		P
		(Razão)	DP		(Razão)	DP	
PFI	Controle	0,4	0,21	Grupo 1	7,21	5,17	< 0,01
	Controle	0,4	0,21	Grupo 2	3,75	3,81	< 0,01
	Controle	0,4	0,21	Grupo 3	2,2	2	< 0,01
	Grupo 1	7,21	5,17	Grupo 2	3,75	3,81	0,06
	Grupo 2	7,21	5,17	Grupo 3	2,2	2	< 0,01
	Grupo 3	3,75	3,81	Grupo 3	2,2	2	0,07
TEMPO	Controle	0,94	0,04	Grupo 1	1,15	0,06	< 0,01
	Controle	0,94	0,04	Grupo 2	1,27	0,12	< 0,01
	Controle	0,94	0,04	Grupo 3	0,84	0,04	< 0,01
	Grupo 1	1,15	0,06	Grupo 2	1,27	0,12	< 0,01
	Grupo 2	1,15	0,06	Grupo 3	0,84	0,04	< 0,01
	Grupo 3	1,27	0,12	Grupo 3	0,84	0,04	< 0,03
PESO	Controle	1,87	0,26	Grupo 1	1,85	0,22	0,84
	Controle	1,87	0,26	Grupo 2	1,7	0,13	0,08
	Controle	1,87	0,26	Grupo 3	1,78	0,08	0,36
	Grupo 1	1,85	0,22	Grupo 2	1,7	0,13	0,06
	Grupo 2	1,85	0,22	Grupo 3	1,78	0,08	0,37
	Grupo 3	1,7	0,13	Grupo 3	1,78	0,08	0,29

de um nervo normal^{1,5,8} e acelerar a regeneração morfológica e funcional de um nervo lesado.^{7,8,20-22} Segundo a observação desses autores, o laser de baixa potência aumenta a quantidade de tecido conectivo (colágeno) e acelera a cura da lesão^{7,15}, aumenta o número de fibroblastos e o de axônios mielinizados no local da lesão, acelera a condução nervosa²³, induz uma recuperação mais rápida do trofismo muscular⁷ e promove uma recuperação funcional significativa^{7,22,23}, e atua tanto na regeneração quanto

na prevenção da degeneração das fibras nervosas.¹⁶ Todavia, as conclusões dos vários estudos mostram um grau inaceitável de controvérsia, demonstrando que ainda não há um consenso sobre os reais efeitos da irradiação com o laser na regeneração dos nervos periféricos.

De fato, por um lado Rochkind et al.¹⁶, Khullar et al.⁶ e Gigo-Benato et al.⁷ encontraram efeitos positivos para a regeneração nervosa. Mas, Bagis et al.⁵ concluíram que o laser é ineficiente no reparo da lesão nervosa, pois não encontraram nenhuma evidência de melhora na regeneração nervosa, o que pode ser atribuído, entretanto, ao tempo curto de tratamento (7 dias consecutivos) e ao tipo de emissão empregada (pulsada e de baixa intensidade). Em trabalho anterior realizado em nosso laboratório, mas com o nervo ciático do rato, ficou demonstrado que a recuperação morfológica e a funcional foram mais completas nos animais submetidos à irradiação com o laser, embora em dose bem mais baixa do que na presente investigação.⁸ Esses resultados foram o ponto de partida para a presente investigação, agora utilizando o nervo fibular comum de ratos e focada apenas na recuperação funcional, que é, no final, o que importa.

Até recentemente, acreditava-se que as células necessitavam de aplicações prolongadas do laser para que atingissem um limiar de resposta e que, inclusive, os equipamentos terapêuticos com alta potência pudessem estar depositando energia de modo muito rápido e impedindo a absorção celular adequada. Entretanto, alguns autores começaram a trabalhar com potências mais altas, inicialmente com 35 a 50 mW e, atualmente, entre 100 e 300 mW, assim depositando maiores densidade de energia.^{19,24} Chegaram à conclusão de que, quando se trata de alta densidade de energia, a aplicação mais rápida resulta em maior absorção celular, o que induz respostas mais satisfatórias. Por esse motivo, na presente investigação foi empregada uma dose de 140 J/cm², bem mais elevada que em outras investigações.

O modelo experimental empregado foi o da lesão por esmagamento controlado, agora empregando uma pinça especialmente desenvolvida para esse fim, que pode ser calibrada com as mesmas cargas utilizadas na máquina universal de ensaios¹² ou na máquina de peso morto^{25,26}, com a vantagem de que é de muito mais fácil utilização e não submete o nervo estudado a tensões de tração, como ocorre durante a adaptação às máquinas referidas. A carga empregada para produzir a lesão, entretanto, foi de 5.000 g, menor do que nos trabalhos anteriores, em que se empregou até 15.000 g de carga, porque o objetivo da investigação era produzir uma lesão não muito grave, que pudesse se beneficiar mais rapidamente da irradiação com o laser, posto que o período de estudo seria de somente 21 dias. De fato, foi demonstrado que, a partir de 5.000 g e até 10.000 g, o tipo (axonotmesis) e o grau de lesão não mudam significativamente com o aumento da carga aplicada^{25,26}; com cargas de 10.000 g a 15.000 g, a lesão ainda é do tipo axonotmesis, sem destruição do arcabouço de sustentação do nervo, mas bem mais grave, pois há a preservação apenas das fibras de muito pequeno calibre.

Optou-se, nesta etapa da investigação, por realizar apenas a avaliação funcional da marcha, não relatando ainda os resultados de outras análises que serão feitas sobre o nervo. De fato, ficou demonstrado que a avaliação funcional guarda estreita correlação com a análise morfométrica, podendo, em determinadas situações, ser realizada e analisada isoladamente.^{1,2,12} O método empregado para a avaliação funcional da marcha de ratos é de uso rotineiro em nosso laboratório, particularmente para investigações sobre o nervo ciático, estando baseado no método inicialmente

introduzido por De Medinaceli et al.^{9,10} e aperfeiçoado por Bain et al.¹¹ e por Lowdon et al.¹⁸ As impressões da pegada do rato eram digitalizadas e armazenadas e analisadas em um computador, com o emprego de um programa específico para esse fim, desenvolvido em nosso laboratório e empregado rotineiramente para esse tipo de estudo. Há que se levar em consideração que o padrão patológico de marcha varia com o nervo lesado; no caso do nervo fibular, há paralisia da musculatura extensora/eversora da pata e extensora dos dedos, do que resulta uma flexão plantar/inversão da pata e flexão/adução dos dedos, a marcha ficando muito dificultada, particularmente na primeira semana após a lesão, quando o apoio era feito praticamente na face dorso-lateral da pata e dorsal dos dedos. Com a recuperação funcional, o apoio passa paulatinamente a ser feito na extremidade distal da pata e na face plantar dos dedos, do que resulta uma impressão plantar mais curta e estreita que o normal, pois há uma grande diminuição da abertura total dos dedos, a despeito da integridade da musculatura intrínseca da pata.¹⁰ Em investigação anterior do nosso grupo, ficou demonstrado que a obtenção de impressões de boa qualidade e mais fácil interpretação só é possível a partir da terceira semana, para as lesões do nervo ciático²¹, e tal estratégia foi adotada na presente investigação, realizando a avaliação funcional apenas no 21º dia e não semanalmente. Os resultados mostraram que, como esperado, os animais ganharam peso significativo entre o período pré-operatório e o 21º dia pós-operatório, mas isso aparentemente não influiu na velocidade

com que caminharam na passarela. De fato, no 21º dia, a marcha esteve mais lenta nos Grupos 1 (lesão, sem irradiação) e 2 (lesão + irradiação simulada), nos quais o PFI não apresentou melhora significativa, tendo sido mais rápida no Grupo 3 (lesão + irradiação efetiva), no qual o PFI melhorou praticamente ao normal, posto que não houve diferença significativa ($p=0,19$) entre os valores obtidos nas avaliações pré e pós-operatória. Como observado em investigações anteriores¹, o PFI pré-operatório, assim como o IFC (ciático) e o TFI (tibial), nunca foi igual a zero, variando entre -3,56, no Grupo 3, a -12,19, no grupo controle, o que pode ser considerado uma deficiência da fórmula matemática empregada para o seu cálculo, ou uma falha na maneira de medir os parâmetros, que pode estar presente inclusive no cálculo do PFI pós-operatório, mas atingindo todos os grupos e certamente não ao ponto de produzir uma diferença tão elevada e significativo como a observada entre o Grupo 3 (-4,16) e os Grupos 1 (-37,46) e 2 (-26,59). Vale lembrar que o PFI mais elevado no Grupo 2 que no Grupo 3 pode significar que a irradiação simulada (placebo) teve um efeito positivo sobre a regeneração, o que, todavia, não é provável.

CONCLUSÃO

A irradiação com o laser AsGaAL de baixa potência acelerou e, provavelmente, potencializou o processo de regeneração do nervo fibular do rato no 21º dia após a lesão por esmagamento controlado e conforme constatado pela avaliação funcional da marcha.

REFERÊNCIAS

- Medonça AC, Barbieri CH, Mazzer N. Directly applied low intensity direct electric currents enhances peripheral nerve regeneration in rats. *J Neurosci Methods*. 2003;129:183-90.
- Raso MVV, Barbieri CH, Mazzer N, Fazan VS. Can therapeutic ultrasound influence the regeneration of peripheral nerves? *J Neurosci Methods*. 2005;142:185-92.
- Anders JJ, Geuma S, Rochkind S. Phototherapy promotes regeneration and functional recovery of injured peripheral nerve. *Neurol Res*. 2004;26:233-9.
- Rochkind S, Nissam M, Alon M, Shamir M, Salame K. Effect of laser irradiation on the spinal cord for the regeneration of crushed peripheral nerve in rats. *Lasers Surg Med*. 2001;28:216-9.
- Bagis S, Comelekoglu U, Coskun B, Milcan A, Buyukakilli B, Sahim G et al. No effect of GA-AS (904 nm) laser irradiation on the intact skin of the injured rat sciatic nerve. *Lasers Surg Med*. 2003;18:83-8.
- Khullar SM, Brodin P, Messelt EB, Haanaes HR. The effects of low level laser treatment on recovery of nerve conduction and motor function after compression injury in the rat sciatic nerve. *Eur J Oral Sci*. 1995;103:299-305.
- Gigo-Benato D, Geuma S, Rodrigues AC, Tos P, Fornaro M, Boux E et al. Low-power laser biostimulation enhances nerve repair after end-to-side neurorrhaphy: a double-blind randomized study in the rat median nerve model. *Lasers Med Sci*. 2004;19:57-65.
- Endo C, Barbieri CH, Mazzer N, Fazan VS. A laserterapia de baixa intensidade acelera a regeneração de nervos periféricos. *Acta Ortop Bras*. 2008;16:305-10.
- De Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ. An index of the functional conduction of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol*. 1982;77: 634-43.
- De Medinaceli L, Derenzo E, Wyatt RJ. Rat sciatic functional index data management with digitized input. *Comput Biomed Res*. 1984;17:185-92.
- Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *J Reconstr Microsurg*. 1989;3:129-38.
- Oliveira EF, Mazzer N, Barbieri CH, Selli M. Correlation between functional index and morphometry to evaluate recovery of the rat sciatic nerve following crush injury: experimental study. *J Reconstr Microsurg*. 2001;17:69-75.
- Dijkstra JR, Meek MF, Robinson PH, Gramsbergen A. Methods to evaluate functional nerve recovery in adult rats: walking track analysis, video analysis and the withdrawal reflex. *J Neurosci Methods*. 2000;96:89-96.
- Varejão ASP, Meek MF, Ferreira AJA, Patrício JAB, Cabrita AMS. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis. *J Neurosci Methods*. 2001;108:1-9.
- Khullar SM, Brodin P, Messelt EB, Haanaes HR. The effects of low level laser treatment on recovery of nerve conduction and motor function after compression injury in the rat sciatic nerve. *Eur J Oral Sci*. 1995;103:299-305.
- Rochkind S, Barnea L, Razon N, Bartal A, Schwartz M. Stimulatory effect of He-Ne low dose laser on injured sciatic nerves of rats. *Neurosurgery*. 1987;20:843-7.
- Rochkind S, Leider-Trejo L, Nissam M, Shamir MH, Kharenko O, Alon M. Efficacy of 780-nm laser phototherapy on peripheral nerve regeneration after neurotube reconstruction procedure (double-blind randomized study). *Photomed Laser Surg*. 2007;25:137-43.
- Lowdon IMR, Seaber AV, Urbaniak JR. An improved method of recording rat tracks for measurement of the sciatic functional index of De Medinaceli. *J Neurosci Methods*. 1988;24:279-81.
- Rochkind S. Central nervous system transplantation benefited by low-power laser irradiation. *Lasers Med Sci*. 1992;7:143-51.
- Rodríguez FJ, Valero-Cabré A, Navarro X. Regeneration and functional recovery following peripheral nerve injury. *Drug Discovery Today: Disease Models*. 2004;1:177-85.
- Monte-Raso VV, Barbieri CH, Mazzer N, Yamasita AC, Barbieri G. In the sciatic functional index always reliable and producible? *J Neurosci Methods*. 2008;170:255-61.
- Rochkind S. Photobiology of neural tissue repair processes in peripheral nerves and the spinal cord: research development with clinical applications. *Photomed Laser Surg*. 2006;24:151-7.
- Rochkind S, Drory V, Alon M, Nissam M, Ouaknine GE. Laser phototherapy (780 nm), a new modality in treatment of long-term incomplete peripheral nerve injury: a randomized double-blind placebo-controlled study. *Photomed Laser Surg*. 2007;25:436-42.
- Rochkind S. Laser therapy in the treatment of peripheral nerves, brachial plexus and spinal cord injuries. In: *Proceedings of the International Laser Congress*. Athens, Greece, Sep 25-28, 1996.
- Mazzer PYCN, Barbieri CH, Mazzer N, Fazan VPS. Avaliação qualitativa e quantitativa das lesões agudas por esmagamento do nervo isquiático do rato. *Acta Ortop Bras*. 2006;14:220-5.
- Pachioni CAS, Mazzer N, Barbieri CH, Fazzan VPS, Padovani CR, Moro CA et al. Lesão por esmagamento do nervo isquiático de ratos: estudo da vascularização. *Acta Ortop Bras*. 2006;14:203-7.