

**Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento**

FILIPE ABDALLA DOS REIS

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA IRRADIAÇÃO DO LASER DE BAIXA
POTÊNCIA ARSENIETO DE GÁLIO E ALUMÍNIO (660 nm) SOBRE A
RECUPERAÇÃO FUNCIONAL E MORFOLÓGICA DO NERVO
CIÁTICO DE RATOS APÓS LESÃO POR NEUROTOMIA SEGUIDA
DE ANASTOMOSE EPINEURAL**

São José dos Campos, SP
2006

R31a

Reis, Filipe Abdalla dos

Análise da influência da irradiação do laser de baixa potência arsenieto de gálio e alumínio (660 nm) sobre a recuperação funcional e morfológica do nervo ciático de ratos após lesão por neurotmeose seguida de anastomose epineural. / Filipe Abdalla dos Reis. São José dos Campos: Univap, 2006.

1 Disco laser. color

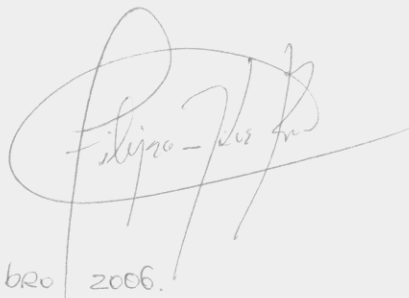
Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2006.

1. Nervo ciático 2. Terapia a laser de baixa intensidade 3. Ferimentos e lesões 4. Fisioterapia I. Nicolau, Renata Amadei, Orient II. Título

CDU:616-001.32

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores ou transmissão eletrônica, desde que citada a fonte.

Assinatura do aluno:



Data: 17 de novembro 2006.

FILIPE ABDALLA DOS REIS

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA IRRADIAÇÃO DO LASER DE BAIXA
POTÊNCIA ARSENIETO DE GÁLIO E ALUMÍNIO (660 nm) SOBRE A
RECUPERAÇÃO FUNCIONAL E MORFOLÓGICA DO NERVO
CIÁTICO DE RATOS APÓS LESÃO POR NEUROTOMIA SEGUIDA
DE ANASTOMOSE EPINEURAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioengenharia da Universidade do Vale do Paraíba, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Renata Amadei Nicolau

São José dos Campos, SP
2006

**“ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA IRRADIAÇÃO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA
ARSIENETO DE GÁLIO E ALUMÍNIO (660NM) SOBRE A RECUPERAÇÃO FUNCIONAL E
MORFOLÓGICA DO NERVO CIÁTICO APÓS LESÃO POR NEUROTIMISE SEGUIDA DE
ANASTOMOSE EPINEURAL”**

Filipe Abdalla dos Reis

Banca Examinadora:

Prof^ª. Dra. MAIRA REGINA RODRIGUES MAGINI. (UNIVAP)

Prof^ª. Dra. RENATA AMADEI NICOLAU (UNIVAP)

Prof. Dr. PAULO DE TARSO CAMILLO DE CARVALHO (UNIDERP)

Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco
Diretor do IP&D - UniVap

Dedico

Para meus queridos Pais Sebastião e Ana Maria, meus Irmãos Marcelo e Leonardo, para Ana Carulina e meus amigos.

Agradecimentos

A Deus, pela grandiosidade de poder transformar sonhos em realidades.

A professora Renata Amadei Nicolau, pelo incentivo à pesquisa, orientações e auxílio em grande parte da execução deste trabalho. Sua inteligência e dedicação sempre me inspiraram e me espelharei em sua sabedoria e humildade para o resto de minha vida.

A professora Máira Regina Rodrigues Magini, pelo auxílio no trabalho e principalmente pela amizade.

Ao professor e co-orientador Paulo de Tarso Camillo de Carvalho, meu eterno professor, grande amigo e chefe, por ter principalmente possibilitado a realização deste trabalho, auxiliando nas discussões e elaborações dos artigos científicos, auxílio para a obtenção da amostra e por ceder os laboratórios da Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal – UNIDERP, Campo Grande / MS.

A Professora Iandara S. Silva pela imensa colaboração com a realização dos procedimentos cirúrgicos e sua prestatividade, abdicando de momentos familiares para disponibilizar sua ajuda nesta pesquisa.

Aos professores e colegas de trabalho que me substituíram nas semanas de aula para o cumprimento dos créditos, principalmente os Professores Baldomero Antônio Kato da Silva e Daniel Martins Pereira que sempre se demonstraram prestativos e amigos nestes momentos.

Ao professor e amigo, Dr. Augusto Ken Sakihama, que me incentivou na carreira acadêmica e científica.

Ao meu tio Mauro, tia Dilze, meus primos Tiago e Pedro, pelo carinho, acolhimento, prestatividade e amparo em todos os momentos em que estive em São José dos Campos / SP. Vocês transformaram São José dos Campos em lar e o meu sonho de ser Mestre em realidade.

A minha noiva, Ana Carulina Guimarães Belchior, que sempre esteve junto, sempre cobrando, estudando, criticando, mas com certeza buscando o melhor para mim. Você muitas vezes foi minha orientadora nesta pesquisa e sou muito grato por fazer parte da sua vida.

Aos professores e amigos, Nadia Fernandes Marconi e Gil Lúcio Almeida, que me ensinaram os caminhos da carreira científica, quando residi em Ribeirão Preto.

A todos os professores, colegas e funcionários do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale da Paraíba, que em algum momento solicitei informação e auxílio.

"O único lugar onde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário".

Albert Einstein

Análise da influência da irradiação do laser de baixa potência arsenieto de gálio e alumínio (660 nm) sobre a recuperação funcional e morfológica do nervo ciático de ratos após lesão por neurotmesa seguida de anastomose epineural

RESUMO

Introdução e Objetivos: As lesões nervosas periféricas podem comprometer atividades diárias de um indivíduo e resultam em perda da sensibilidade e motricidade do território inervado. Com intuito de acelerar os processos regenerativos, objetivou-se analisar a influência da aplicação do laser de GaAlAs (660 nm) sobre a recuperação funcional e histomorfométrica do nervo ciático de ratos. **Material e Métodos:** O nervo ciático de 12 ratos *Wistar* foi submetido à lesão por neurotmesa e anastomose epineural e divididos em 2 grupos: placebo e laserterapia. Após a lesão, utilizou-se o laser de GaAlAs, 660 nm, 4 J/cm², 26,3 mW, feixe de 0,63 cm², em 3 pontos equidistantes sobre a lesão, por 20 dias. **Resultados e Conclusão:** A comparação do índice funcional do ciático (IFC) não resultou em diferença significativa entre os grupos e não houve diferença estatística na análise histomorfométrica entre os grupos. Conclui-se que os parâmetros e métodos utilizados demonstram resultados nulos sobre o IFC e não traz mudanças significativas quanto à análise histomorfométrica nervosa no período avaliado.

Palavras-chaves: Regeneração Nervosa / efeitos de radiação, Lasers / uso terapêutico, Terapia a Laser de Baixa Intensidade.

Analysis on the influence of Gallium Aluminum Arsenide laser application (660 nm) on functional and morphological recovery of the sciatic nerve in rats following neurotmesis lesion

ABSTRACT

Background and Objectives: Peripheral nerve lesions may compromise individual's daily activities. With the aim of accelerating the regenerative processes, the objective here was to study the influence of applying GaAlAs laser (660 nm) on functional and histomorphological recovery of the sciatic nerve in rats. **Design/Materials and Methods:** Twelve 12 Wistar rats were subjected to neurotmesis lesion on their sciatic nerve and anastomosis epineural were divided into two groups: placebo and laser therapy. For the latter, GaAlAs laser was utilized (660 nm, 4 J/cm², 26.3 mW and 0.63 cm² beam), at three equidistant points on the lesion, for 20 days. **Results and Conclusions:** Comparison of the sciatic functional index (SFI) showed that there was no significant difference between the pre-lesion value of the laser therapy group and the placebo group, while there was no statistical difference between the groups in the histomorphometric analysis. It is concluded that the parameters and methods utilized demonstrate no positive results on SFI and do not bring significant changes with regard to nerve morphometry over the time period evaluated.

Key-words: Nerve Regeneration / radiation effects, Lasers / therapeutic use, Laser Therapy, Low-Level.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
µs	micro segundos
ATP	Adenosina trifosfato
ATPase	Enzima adenosina trifosfato
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
Ca ²⁺	Íons cálcio
ClO ⁻	Íon hipoclorito
cm	Centímetros
cm ²	Centímetros quadrados
CO ₂	Dióxido de carbono
Cu	Cobre
DNA	Ácido desoxirribonucléico
GaAlAs	Arsenieto de Gálio e Alumínio
GaAs	Arsenieto de Gálio
GAP-43	Proteína-43 associada ao crescimento
GDNF	Glial cell line-derived neurotrophic factor
H ⁺	Íon hidrogênio
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
He-Ne	Hélio Neônio
IFC	Índice Funcional do Ciático
IGF	Insulin-like growth factor
ITS	Espaço entre a segunda e a quarta falange distal
J	Joule
J/cm ²	Joules pó centímetro quadrado
K ⁺	Íon potássio
L	Lombar
LBP	Laserterapia de baixa potência
mg/Kg	Miligrama por kilograma
MPa	Megapascal
mW	Mili Wattz
N ₃ ⁻	Íon nitreto
Na ⁺	Íon sódio
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NGF	Nerve growth factor
nm	Nanômetros
NO	Óxido nítrico
ns	Nano segundos
NT	Neurotrofinas
O ₂	Oxigênio
p	Nível de significância
PGF	Platelet-derived growth factor
PL	Espaço entre a borda proximal do pé e a terceira falange distal
RNA	Ácido ribonucléico
SNC	Sistema nervosos central
SNP	Sistema nervoso periférico
TGF-β	Transforming growth factor β
TS	Espaço entre a primeira e a quinta falange distal

W	Wattz
W/cm ²	Wattz por centímetro quadrado
Zn	Zinco
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
µs	micro segundos
ATP	Adenosina trifosfato
ATPase	Enzima Adenosina trifosfato
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
Ca ⁺	Cálcio
ClO ⁻	Óxido de cloro
cm	Centímetros
cm ²	Centímetros quadrados
CO ₂	Dióxido de carbono
Cu	Cobre
DNA	Ácido desoxirribonucléico
GaAlAs	Arsenieto de Gálio e Alumínio
GaAs	Arsenieto de Gálio
GAP-43	Proteína-43 associada ao crescimento
GDNF	Glial cell line-derived neurotrophic factor
H ⁺	Hidrogênio
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HeNe	Hélio Neônio
IFC	Índice Funcional do Ciático
IGF	Insulin-like growth factor
ITS	Espaço entre a segunda e a quarta falange distal
J	Joule
J/cm ²	Joule pó centímetro quadrado
K ⁺	Potássio
L	Lombar
LBP	Laserterapia de baixa potência
mg/Kg	Miligrama por kilograma
MPa	Megapascal
mW	Mili Wattz
N ₃	Nitreto
Na ⁺	Sódio
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NGF	Nerve growth factor
nm	Nanômetros
NO	Óxido nítrico
ns	Nano segundos
NT	Neurotrofinas
O ₂	Oxigênio
p	Nível de significância
PGF	Platelet-derived growth factor
PL	Espaço entre a borda proximal do pé e a terceira falange distal
RNA	Ácido ribonucléico
SNC	Sistema nervosos central
SNP	Sistema nervoso periférico
TGF-β	Transforming growth factor β

TS	Espaço entre a primeira e a quinta falange distal
W	Wattz
W/cm ²	Wattz por centímetro quadrado
Zn	Zinco

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Esquema da anatomia básica do nervo periférico.	7
2	Esquema da estrutura da bainha de mielina.	8
3	Fonte: http://www.unlu.edu.ar adaptado por Filipe Abdalla dos Reis Desenho esquemático de um feixe nervoso, observar em A) epineuro; B) Perineuro; C) endoneuro; D) Fio de sutura. Coloração Tetraóxido de ósmio. Aumento de 40 X.	8
4	Desenho esquemático do feixe nervoso, observar em: A) bainha de mielina; B) axônio; C) endoneuro. Coloração Tetraóxido de ósmio. Aumento 400X.	10
5	Esquema dos nódulos de Ranvier e condução saltatória. Fonte: www.schering.hu adaptado por Filipe Abdalla dos Reis	11
6	Célula de Schwann (azul) em nervo ciático de rato e núcleos (rosa). Técnica de fluorescência (DAPI). Fonte: Radtke et al. (2005).	12
7	Esquema dos tipos de lesões nervosas: A) neuropraxia; B) axoniotmese e C) neurotmese.	14
8	Esquema da degeneração Walleriana. Observar em: A) macrófago.	15
9	Esquema da seqüência de eventos em uma lesão neuronal, seguida de regeneração. Em: A) Lesão nervosa; B) Macrófagos englobam os restos de mielina; C) Cones de crescimento; D) Mielinização do axônio regenerado. Fonte: Johnson, Zoubos e Soucacos (2005).	19
10	Diagrama de técnicas de anastomose, incluindo: A) cola de fibrina; B) epineural simples; C) Bunnel e D) Tajima. Fonte: Temple et al. (2004).	28
11	Esquema da impressão em papel da pata de um rato normal com as medidas ITS (espaço entre o segundo e quarto dedo), TS (espaço entre o primeiro e quinto dedo), e PL (espaço entre o calcanhar e o terceiro dedo).	31
12	Efeitos físicos da interação laser-tecido biológico.	34
13	Coefficiente de absorção para alguns comprimentos de onda. Fonte: Cotton (2004)	35
14	Foto do procedimento cirúrgico no momento em que era realizada a lesão por neurotmese do nervo ciático. Observar em: A) coto distal; B) coto proximal.	42
15	Foto da anastomose do nervo ciático. Observar em: A) agulha não-traumática; B) Coto distal; C) Coto proximal; D) Fio de sutura.	42
16	Aplicação da laserterapia sobre a lesão do nervo ciático com auxílio de luva de borracha para contenção do animal.	43
17	Passarela de madeira (5 x 7 x 42 cm) para realização da marcha utilizada para a coleta do IFC.	44
18	Figura 18. Demonstração dos valores para o cálculo do IFC. Observar em: A) pata normal e B) membro lesionado.	45
19	Figura esquemática da lâmina e as regiões dos 5 quadrantes avaliados histomorfometricamente.	47
20	Imagem ilustrativa do programa Image-Pro Plus. Notar em: A)	48

	quadrante; B) 350 x 350; C) medida em μm e D) ferramenta <i>perform segmentation</i> .	
21	Imagem ilustrativa do programa Image-Pro Plus. Notar em: A) ferramenta <i>count and measure objects</i> ; B) <i>Meansure</i> ; C) <i>Count</i> ; D) <i>Auto-classification</i> ; E) <i>Statistics</i> ; F) Mean (média dos valores).	48
22	Montagem de Fotomicrografias do terceiro quadrante, onde A-B correspondem ao grupo 1 e C-D grupo 2. Observar: epineuro (Ep); perineuro (Pn); Bainha de mielina (BhM).	51
Figura		Página
1	Anatomia básica do nervo periférico. Fonte: http://www.guia.heu.nom.br	7
2	Esquema da estrutura da bainha de mielina. Fonte: http://www.unlu.edu.ar adaptado por Filipe Abdalla dos Reis	8
3	Desenho esquemático de um feixe nervoso, observar em A) epineuro; B) Perineuro; C) endoneuro; D) Fio de sutura. Coloração Tetraóxido de ósmio. Aumento de 40 X.	8
4	Desenho esquemático do feixe nervoso, observar em: A) bainha de mielina; B) axônio; C) endoneuro. Coloração Tetraóxido de ósmio. Aumento 400X.	10
5	Esquema dos nódulos de Ranvier e condução saltatória. Fonte: www.schering.hu adaptado por Filipe Abdalla dos Reis	11
6	Célula de Schwann (azul) em nervo ciático de rato e núcleos (rosa). Técnica de fluorescência (DAPI). Fonte: Radtke et al. (2005).	12
7	Esquema dos tipos de lesões nervosas: A) neuropraxia; B) axoniotmese e C) neurotmese.	14
8	Esquema da degeneração Walleriana. Observar em: A) macrófago.	15
9	Esquema da seqüência de eventos em uma lesão neuronal, seguida de regeneração. Em: A) Lesão nervosa; B) Macrófagos englobam os restos de mielina; C) Cones de crescimento; D) Mielinização do axônio regenerado. Fonte: Johnson, Zoubos e Soucacos (2005).	19
10	Diagrama de técnicas de anastomose, incluindo: A) cola de fibrina; B) epineural simples; C) Bunnel e D) Tajima. Fonte: Temple et al. (2004).	28
11	Esquema da impressão em papel da pata de um rato norma com as medidas ITS (espaço entre o segundo e quarto dedo), TS (espaço entre o primeiro e quinto dedo), e PL (espaço entre o calcanhar e o terceiro dedo).	31
12	Efeitos físicos da interação laser-tecido biológico.	34
13	Coefficiente de absorção para alguns comprimentos de onda. Fonte: Cotton (2004)	35
14	Foto do procedimento cirúrgico no momento em que era realizada a lesão por neurotmese do nervo ciático. Observar em: A) coto distal; B) coto proximal.	42
15	Foto da anastomose do nervo ciático. Observar em: A) agulha não-traumática; B) Coto distal; C) Coto proximal; D) Fio de sutura.	43
16	Aplicação da laserterapia sobre a lesão do nervo ciático com auxílio de luva de borracha para contenção do animal.	44
17	Passarela de madeira (5 x 7 x 42 cm) para realização da marcha utilizada para a coleta do IFC.	45

18	Figura esquemática da lâmina e as regiões dos 5 quadrantes avaliados histomorfometricamente.	47
19	Imagem ilustrativa do programa Image-Pro Plus. Notar em: A) quadrante; B) 350 x 350; C) medida em μm e D) ferramenta <i>perform segmentation</i> .	48
20	Imagem ilustrativa do programa Image-Pro Plus. Notar em: A) ferramenta <i>count and measure objects</i> ; B) <i>Meansure</i> ; C) <i>Count</i> ; D) <i>Auto-classification</i> ; E) <i>Statistics</i> ; F) Mean (média dos valores).	48
21	Montagem de Fotomicrografias do terceiro quadrante, onde A-B correspondem ao grupo 1 e C-D grupo 2. Observar: epineuro (Ep); perineuro (Pn); Bainha de mielina (BhM).	50

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico		Página
1	Comparação dos valores médios e respectivos desvios padrão do IFC entre grupo 1 (controle) e grupo 2 (laser) nos quatro dias de avaliação.	50

LISTA DE TABELAS

Tabela		Apêndice
1	Tabela 1. Valores individuais do IFC nos grupos experimentais nos quatro períodos de avaliação, com as respectivas médias e desvios padrão. Notar a análise comparativa dos valores dos IFC entre os diversos grupos, onde: $^a x^b < 0,05$; $^a x^c$, $^a x^d < 0,01$; $^e x^f$, $^e x^g$, $^e x^h < 0,001$ e demais comparações sem diferença significativa.	A
2	Valores individuais da área de bainha de mielina nos 5 quadrantes analisados em cada amostra do grupo 1 (controle) após o 21º dia de pós-operatório, com as respectivas médias e desvios padrões.	B
3	Valores individuais da área de bainha de mielina nos 5 campos analisados em cada amostra do grupo 2 (laserterapia) após o 21º dia de pós-operatório, com as respectivas médias e desvios padrões.	C
4	Teste t de Student entre os grupos experimentais.	Pg. 51

1. INTRODUÇÃO	2
2. OBJETIVOS	6
2.1 Objetivo geral	6
2.2 Objetivos específicos	6
3. REVISÃO DA LITERATURA	7
3.1 Anatomia do nervo periférico e processo de reparação	7
3.2 Papel da bainha de mielina	10
3.3 Células de Schwann	12
3.4 Lâmina Basal	13
3.5 Tipos de lesões	14
3.6 Processos decorrentes à lesão nervosa	15
3.7 Regeneração nervosa	17
3.8 Fator neurotrófico	21
3.8.1 Fator de crescimento nervoso (NGF)	22
3.8.2 Fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF)	23
3.8.3 Proteína-43 associada ao crescimento (GAP-43)	23
3.9 Reparo de nervos periféricos	24
3.9.1 Modelos experimentais	24
3.9.2 Procedimento cirúrgico	25
3.10 Análise Morfométrica	29
3.11 Análise Funcional	30
3.12 Laser de baixa potência	32
3.12.1 Aspectos Gerais	32
3.12.2 Interações biológicas	34
4. MATERIALS E MÉTODOS	41
4.1 Animais	41
4.2 Procedimento cirúrgico e terapia	41
4.3 Aplicação do Diodo Laser	43
4.4 Análise Funcional	44
4.5 Obtenção das Amostras e Análise histológica	46
4.6 Análise Histomorfométrica	47
4.7 Análise Estatística	49
5. RESULTADOS	50
5.1 Índice Funcional do Ciático	50
5.2 Análise Histomorfométrica	51
6. DISCUSSÃO	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
APÊNDICE A	72
APÊNDICE B	73
APÊNDICE C	74
ANEXO A	75

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos houve avanços importantes no estabelecimento de novas estratégias de tratamento para estimular a regeneração das lesões nervosas periféricas. Pesquisas reforçam que a regeneração é um processo complexo, que desencadeia complicações no quadro clínico e funcional do paciente quando ocorrerem falhas durante o reparo nervoso (ROCHKIND; QUAKNINE, 1992).

Os nervos periféricos são alvos constantes de lesões de origem traumática, como esmagamento e secções totais, resultando em diminuição ou perda da sensibilidade e motricidade no território inervado, cuja severidade dependerá do acometimento de estruturas. O comprometimento das atividades diárias de pacientes com lesão de nervo periférico é fator determinante para estabelecer metas de recuperação precoce do mesmo (RODRÍGUEZ; VALERO-CABRÉ; NAVARRO, 2004).

A recuperação nervosa periférica após uma lesão tem intrigado os pesquisadores há muito tempo, com produção de grande quantidade de estudos científicos sobre as mais variadas técnicas de reparação, fenômenos envolvidos na regeneração e métodos de avaliação dos resultados. Embora haja certa recuperação na maioria das lesões nervosas, estas ocorrem lentamente e muitas vezes de forma incompleta (ROCHKIND; QUAKNINE, 1992).

Estima-se que a incidência das lesões traumáticas em alguns países seja superior a 500.000 novos casos anualmente (RODRÍGUEZ; VALERO-CABRÉ; NAVARRO, 2004) onde 2,8% dos pacientes adquirem incapacidades vitalícias (NOBLE; MUNRO; PRASAD, 1998). Tal fato justifica a continuidade da produção de terapias as quais permitam subtrair o nível de lesão e incapacidade.

É prática comum na fisioterapia a utilização de instrumentos terapêuticos com finalidade regenerativa. Para lesões nervosas periféricas, a estimulação elétrica (MENDONÇA; BARBIERI; MAZZER, 2003), o ultra-som (CHANG; HSU, 2004; RASO et al., 2005) e o laser de baixa potência (GIGO-BENATO; GEUNA; ROCHKIND, 2005) têm sido utilizados com intuito de acelerar os processos regenerativos, buscando o retorno precoce da funcionalidade do paciente.

O laser de baixa potência (LBP) começou a ser utilizado no processo de regeneração e recuperação funcional de lesões nervosas periféricas na década dos anos 70, havendo vários relatos e divergências sobre os resultados obtidos (BASFORD, 1995).

Rochkind et al. (1988) afirmaram que a irradiação com LBP, mais especificamente do laser de Hélio-Neônio (He-Ne, 632,8 nm), aumenta o potencial de ação do nervo ciático em rato. Simultaneamente, este tipo de irradiação quando aplicada de forma transcutânea sobre o nervo ciático com lesão por esmagamento previne a queda do potencial de ação e formação cicatricial, além de acelerar o processo regenerativo e atenuar mudanças degenerativas nos segmentos correspondentes na medula espinhal presentes após a lesão nervosa, efeitos estes que se perpetuam ao menos por 1 ano (ROCHKIND et al., 2001).

A laserterapia, empregando emissão de radiação em 780 nm, tem promovido bons resultados em nervos ciáticos de ratos após completa secção seguida de anastomose. A aplicação diária por 30 minutos em 21 dias consecutivos, transcutâneamente sobre os segmentos correspondentes da medula espinhal e na região lesionada promoveram respostas somato-sensórias positivas em 51% a mais em animais irradiados comparados a animais controle. O estudo histocitoquímico demonstrou aumento da quantidade de número de axônios e melhor qualidade do processo regenerativo devido à presença de axônios com maior diâmetro comparado ao grupo controle (SHAMIR et al., 2001).

Foram investigados por Miloro et al. (2002) os efeitos do LBP Arsenieto de Gálio (AsGa, 820 a 830 nm, 70 mW, 6,0 J/cm²) na regeneração do nervo alveolar inferior de coelhos, associado a tubos Gore-Tex. Após 10 dias de aplicação, os segmentos foram analisados histomorfometricamente, por meio de um sistema computadorizado, utilizando microscópio operacional acoplado a uma câmera de vídeo. Os resultados demonstraram que o grupo tratado com laser demonstrou maior densidade axonal, sugerindo ser esta uma terapia não-invasiva e benéfica na cura de lesões nervosas.

Com a análise dos trabalhos, verificou-se que o laser de He-Ne na região de emissão vermelha do espectro eletromagnético é o comprimento de onda mais analisado em biomodulação da resposta biológica em processo de reparação. No presente momento novos comprimentos de onda estão sendo desenvolvidos e pesquisados, como o lasers emitindo radiação nas faixas de 650 a 830 nm. Pode-se observar que em muitos estudos a descrição de parâmetros de irradiação como: dose, potência média, tempo e modo de aplicação são expressamente variados, o qual promove a difícil compreensão metodológica para a reprodução dos resultados e dificuldades comparativas entre os estudos.

É importante ressaltar que resultados divergentes quanto aos fatores benéficos do LBP são encontrados. Chelyshev, Kubitskii e Plakseichuk (1996) demonstraram que o laser com 890 nm (0,33 J/cm²) não interferia na quantidade de fibras mielinizadas do segmento distal em processo regenerativo. Além disto, o aumento da dose para 9,33 J reduzia em 49% o número de fibras mielinizadas. Essa redução ao processo regenerativo também foi encontrada com o laser de 1220 nm (0,98 J/cm²) e não houve influência do laser He-Ne (7 J/cm²) sobre a quantidade de fibras.

Em situações experimentais envolvendo análise da laserterapia sobre o processo de reparação neuronal, a avaliação funcional da marcha tem-se demonstrado um método confiável e reprodutível (VAREJÃO et al., 2003; KOKA; HADLOCK, 2001; DIJKSTRA et al., 2000).

De Medinacelli, Freed e Wyatt (1982) propuseram a utilização de um método de avaliação denominado Índice Funcional do Ciático (IFC) baseado em mensurações das patas traseiras de ratos. Este método foi realizado entre um grupo controle (normal) e grupos experimentais, após transecção completa e esmagamento do nervo ciático, apresentando boa confiabilidade e reprodutibilidade. O experimento consistia em obter imagens das pegadas dos animais, quando estes caminhassem numa passarela construída especificamente para esse fim, sendo estas imagens registradas e analisadas.

Aplicando o IFC combinado com a análise imunocitoquímica, Shin et al. (2003) analisaram o efeito terapêutico do laser (650 nm, 5 mW) em lesões do tipo axoniotmese do nervo ciático de ratos seguidos por 4 dias consecutivos de tratamento. Verificaram que o grupo tratado com laser, além de apresentarem um índice funcional mais elevado, possuía maior número de GAP-43, proteína envolvida no processo de regeneração nervosa, nas fases iniciais da recuperação nervosa. Porém após a 5ª semana, não havia diferença estatisticamente significativa entre o grupo tratado e o controle.

Considerando a escassa reprodutibilidade de diversos trabalhos citados na literatura adicionado a insatisfatória exposição metodológica dos dados previamente observados, estudos se tornam necessários para elucidar os efeitos da laserterapia de baixa potência sobre o processo de reparação do nervo ciático. A investigação de um modelo experimental ligada à análise da avaliação da recuperação funcional, correlacionada à análise histomorfométrica pode fornecer dados relevantes para uma base de aplicabilidade clínica futura no tratamento de lesões nervosas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo foi avaliar a influência da aplicação do laser de baixa potência Arsenieto de Gálio e Alumínio (660 nm) sobre a recuperação funcional e morfológica do nervo ciático de ratos, após lesão por neurotmese seguida de anastomose epineural.

2.2 Objetivos específicos

Análise da ação da laserterapia testada sobre a reparação nervosa periférica em animais tratados versus animais controle quanto ao:

- Índice funcional do Ciático.
- Área de bainha de mielina.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Anatomia do nervo periférico e processo de reparação

O sistema nervoso periférico (SNP) é toda porção que se externa do sistema nervoso central (SNC) e os motoneurônios, neurônios sensitivos primários, neurônios autonômicos, raízes dorsais e ventrais, gânglios nervosos, nervos espinhais e cranianos, terminações sensitivas e motoras são os elementos que o constituem (FERREIRA, 2001).

Os nervos periféricos (Figura 1) são feixes de fibras nervosas motoras e sensitivas enclausuradas em um invólucro gliconjuntivo. Estas fibras representam os prolongamentos axonais dos neurônios, cujos corpos celulares dos motoneurônios estão situados no corno anterior da medula, dos neurônios sensitivos situam-se no gânglio raquidiano e os corpos celulares dos neurônios autonômicos firmam-se nos gânglios paravertebrais (FERREIRA, 2001; ROWSHAN; JONES; GUPTA, 2004).

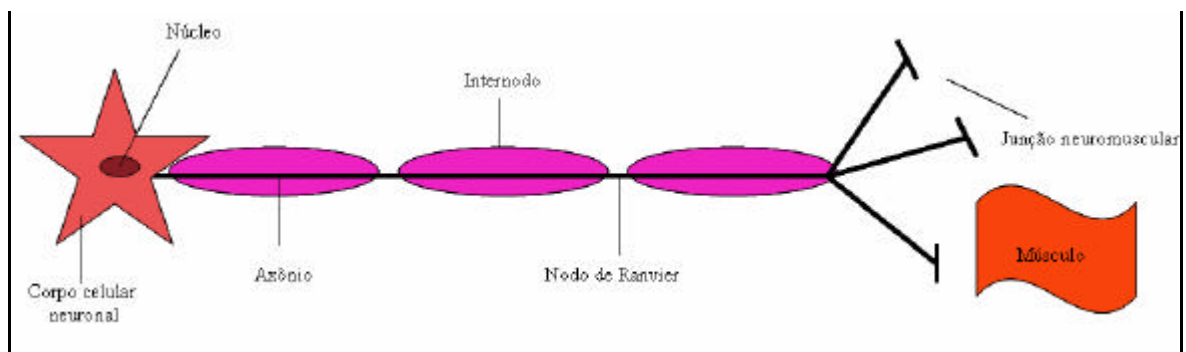


Figura 1. Esquema da anatomia básica do nervo periférico.

A unidade funcional do nervo periférico é a fibra nervosa, constituída pelo axônio sendo este recoberto por uma bainha, isto é, uma extensão do citoplasma da célula de Schwann, denominada de neurolema ou bainha de mielina (Figura 2). As fibras nervosas mielinizadas e com maior espessura, aproximadamente 2 a 22 μm (ROWSHAN; JONES; GUPTA, 2004)

conduzem os impulsos nervosos mais rapidamente, enquanto as fibras amielínicas com 0,4 a 1,25 μm transmitem mais lentamente (FERREIRA, 2001; ROWSHAN; JONES; GUPTA, 2004).

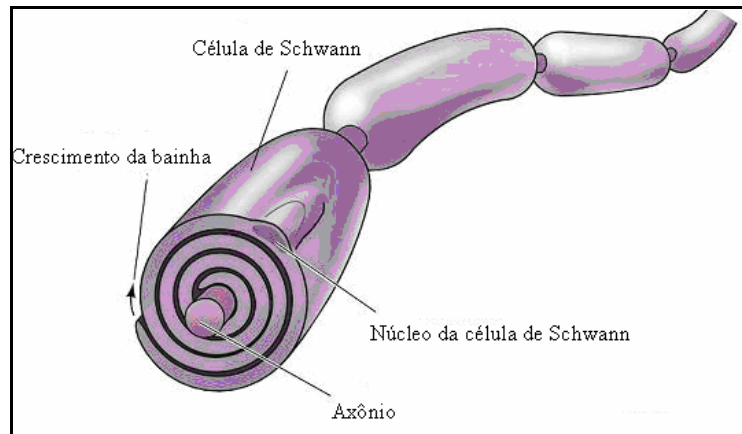


Figura 2. Esquema da estrutura da bainha de mielina.
Fonte: <http://www.unlu.edu.ar> adaptado por Filipe Abdalla dos Reis

Os nervos periféricos são compostos por 3 camadas de tecido: o epineuro, o perineuro e o endoneuro (Figura 3). O epineuro é uma camada de tecido conjuntivo colagenoso que circunda os limites da camada externa do nervo periférico, protegendo este nervo do estresse externo, sendo dividida em duas camadas denominadas de epineuro externa e interna.

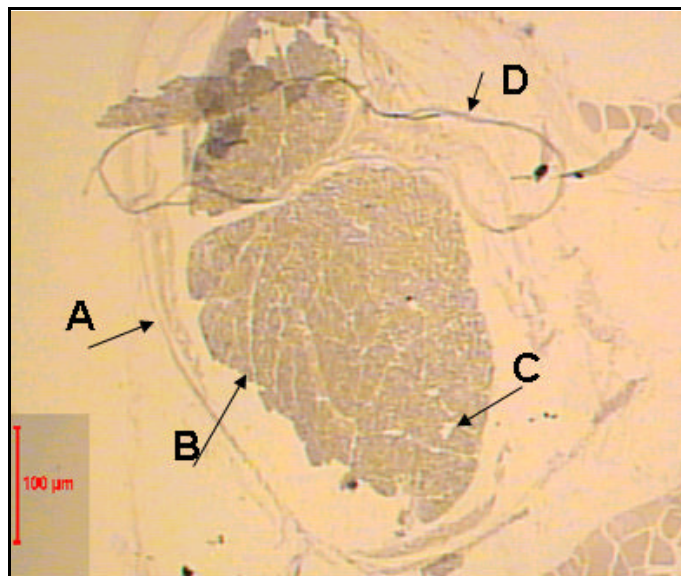


Figura 3. Desenho esquemático de um feixe nervoso, observar em **A)** epineuro; **B)** Perineuro; **C)** endoneuro; **D)** Fio de sutura. Coloração Tetraóxido de ósmio. Aumento de 40 X

A principal função da camada epineural externa é de proteger o nervo do seu ambiente adjacente. Já a camada epineural interna funciona como um amortecedor para os fascículos nervosos permitindo que eles se movam livremente uns contra os outros (FERREIRA, 2001).

Múltiplas coleções de fibras nervosas formam os fascículos e cada fascículo é circundado por coberturas de tecido conectivo composto por células perineurais. O perineuro é um conjunto de camadas com concentração elevada de fibroblastos, na forma de bainhas ao redor de cada fascículo, fazendo com que se torne a camada nervosa mais resistente contra a tração longitudinal e deste modo fornece ao nervo propriedades elásticas e serve também como uma barreira ao fluxo sanguíneo nervoso (ROWSHAN; JONES; GUPTA, 2004).

A camada nervosa mais interna é o endoneuro, com uma coleção de tecido colagenoso, fibroblastos, macrófagos, substância mucopolisacarídea e células tronco, com pouca resistência situada ao redor de cada axônio, sendo fundamental para providenciar suporte nutricional e proteção aos axônios. No interior do endoneuro encontram-se os axônios que estão associados às células de Schwann (DAHLIN, 2004).

Os morfotipos fasciculares são divididos em 3 tipos, como: monofascicular, oligofascicular e polifascicular. O monofascicular consiste em um fascículo grande, ao passo que o oligofascicular consiste em pequenos fascículos e o morfotipo polifascicular compõe-se de inúmeros fascículos de vários tamanhos que podem estar organizados ou não em grupos de fascículos. Estes morfotipos podem auxiliar a determinar qual tipo de reparo nervoso é apropriado para cada lesão (ROWSHAN; JONES; GUPTA, 2004).

Os nervos periféricos são amplamente vascularizados com sistemas microvasculares interconectados no epineuro, perineuro e endoneuro. O modelo vascular dos nervos periféricos é caracterizado por grupos de vasos orientados longitudinalmente, com grande número de anastomoses comunicantes. A vascularização é composta por sistema vascular intrínseco

consistindo de um plexo vascular no epineuro, perineuro e endoneuro e por um plexo vascular extrínseco derivado da associação das terminações vasculares com os nervos (ROWSHAN; JONES; GUPTA, 2004).

3.2 Papel da bainha de mielina

Uma das funções primárias da bainha de mielina é providenciar maior velocidade e transmissão mais eficiente do impulso nervoso. Esta bainha (Figura 4) atua como um isolante ao redor do axônio, reduzindo, de dentro para fora, a dissipação do potencial de ação que se propaga pelo axônio. A bainha de mielina, produzida pelas células de Schwann, apresenta-se como espiral dupla de lipoproteína que está em contato com a membrana plasmática do corpo desta célula, ambas envolvem uma zona histológica distinta chamada interno do (RUMMLER; DINH; GUPTA, 2004).

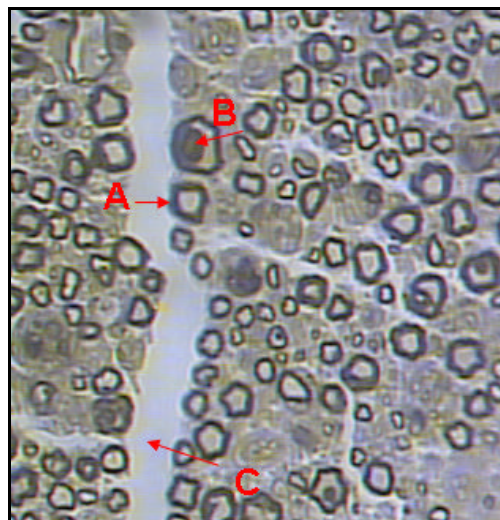


Figura 4. Desenho esquemático do feixe nervoso, observar em **A)** bainha de mielina; **B)** axônio; **C)** endoneuro. Coloração Tetraóxido de ósmio. Aumento 400X.

Nas fibras mielinizadas existem entre as células de Schwann uma pequena área descrita como nódulo de Ranvier (Figura 5), responsável pela transmissão dos impulsos nervosos. Estes

nódulos apresentam elevada concentração de canais de sódio e a chegada do potencial de ação estimula a abertura destes canais, gerando o influxo de íons sódio para o axônio. Este processo gera outro impulso elétrico que é propagado para o axônio pelo nódulo de Ranvier, processo conhecido como condução saltatória. Esta condução acelera a velocidade de transmissão do impulso nervoso e está presente nas fibras nervosas mielinizadas (RUMMLER; DINH; GUPTA, 2004).

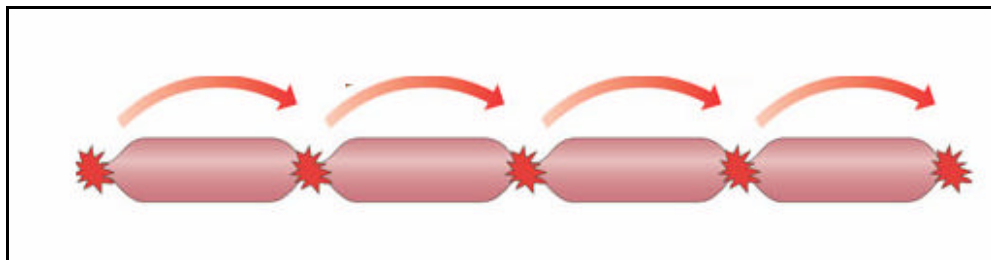


Figura 5. Esquema dos nódulos de Ranvier e condução saltatória.
Fonte: <http://www.schering.hu> adaptado por Filipe Abdalla dos Reis

A bainha de mielina é formada pela extensão do citoplasma das células de Schwann. A mielina é a única estrutura que apresenta alta concentração de lipídeos e proteínas, incluindo elevados conteúdos de longas cadeias de ácidos graxos. Para completar as propriedades isolantes da mielina, estruturas não condutoras como as moléculas aquosas citosólicas precisam ser excluídas. A mielina exclui grande quantidade deste material citoplasmático pela fusão de extensas superfícies do citoplasma com a membrana plasmática. Estas superfícies são denominadas de incisuras de Schmidt-Lantermann, isto é, canais citoplasmáticos que se estendem desde o limite interno até o externo da linha densa de mielina. Estes canais facilitam a comunicação o axônio e o corpo da célula de Schwann, assegurando suprimento nutricional adequado com as regiões de mielina compactada (RUMMLER; DINH; GUPTA, 2004).

Pelo fato das células de Schwann realizarem a síntese de bainha de mielina e participarem na formação de um canal que auxilia a regeneração axonal, a investigação da área de bainha de

mielina é importante para inferir o processo de regeneração nervosa, conforme utilizado em alguns trabalhos de De Medinacelli (1995), Happak et al. (2000), Adalbert et al. (2005) e Ünal et al. (2005).

3.3 Células de Schwann

As células de Schwann (Figura 6) são derivadas de uma população multipotente dentro da crista neural. As células de Schwann possuem 2 funções: formam um esqueleto para a regeneração axonal pelas moléculas de adesão na superfície da membrana plasmática e produção de vários fatores tróficos, isto é, de crescimento para a regeneração axonal (BEAU; ELLISMAN; POWELL, 1988; IDE, 1996; JOHNSON; ZOUBOS; SOUCACOS, 2005). Além das funções supracitadas as células de Schwann secretam moléculas durante o desenvolvimento que contribuem para a formação e organização do perineuro (JESSEN; MIRSKY, 2002) e também criam sinais próprios reguladores que são importantes para a regeneração nervosa (JESSEN; MIRSKY, 1999).

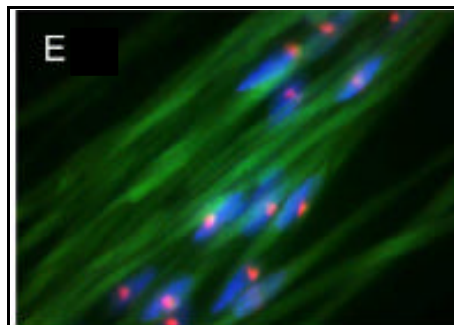


Figura 6. Células de Schwann (azul) em nervo ciático de rato e seus núcleos (rosa). Técnica de fluorescência (DAPI). Aumento de 20 μm .
Fonte: Radtke et al. (2005).

Tanto nos nervos mielinizados quanto nos não-mielinizados, as células de Schwann parecem imóveis, possuindo núcleo rico em heterocromatina e citoplasma eletro-densos.

Entretanto, após axoniotmese e neurotmese, as células de Schwann no segmento nervoso distal passam por intensivas mudanças através da degeneração axonal (IDE, 1996; GEUNA et al., 2003). As bainhas de mielina são degradadas pela fagocitose de macrófagos, em formas de esferas, dentro das células de Schwann e durante esta fase, os núcleos celulares de Schwann tornam-se esféricos e claros, contendo menor quantidade de heterocromatina e o citoplasma aparece relativamente translúcido (IDE, 1996).

As células de Schwann proliferam na fase inicial da degeneração Walleriana, estimulada por macrófagos que secretam várias citocinas, incluindo a Interleucina 1, conhecida como promotora da regeneração nervosa enquanto os processos citoplasmáticos estendem-se, formam os filamentos celulares chamados de coluna de células de Schwann servindo como meio de crescimento para os axônios em regeneração (IDE, 1996).

3.4 Lâmina Basal

As células de Schwann produzem a lâmina basal composta de moléculas de matriz extracelular de colágeno tipo IV e laminina (PATTON et al., 1997). A lâmina basal envolve os axônios e as células de Schwann unitariamente sendo o componente mais importante durante a regeneração nervosa, pois após a degeneração Walleriana a lâmina basal permanece íntegra na forma de tubos vazios. Assim, os axônios em regeneração do coto proximal crescem vigorosamente através dos tubos vazios da lâmina basal, não migrando para o compartimento tecidual endoneural conectivo (IDE, 1996).

3.5 Tipos de lesões

Lesões dos nervos periféricos resultam em perda motora, sensorial e autonômica, parcial ou total, no segmento corporal envolvido, sendo que a re-inervação dos alvos desnervados são alcançadas pela regeneração do axônio lesado ou pelo ramo colateral de um axônio não-lesado adjacente (RODRÍGUEZ; VALERO-CABRÉ; NAVARRO, 2004).

Após a lesão nervosa periférica a capacidade dos axônios em regenerar e recuperar funcionalmente dependerá do local, tipo de lesão e distância nas quais os axônios deverão crescer. O tronco nervoso lesionado, o tipo e severidade da lesão determinam a necessidade de reparo cirúrgico e o prognóstico de retorno funcional (BEAU; ELLISMAN; POWELL, 1988; RODRÍGUEZ; VALERO-CABRÉ; NAVARRO, 2004).

Pela classificação de Seddon em 1943 as lesões dos nervos periféricos podem ser neuropraxia, axionotmese (esmagamento ou *freeze injury*) e neurotmese (secção completa) (Figura 7).

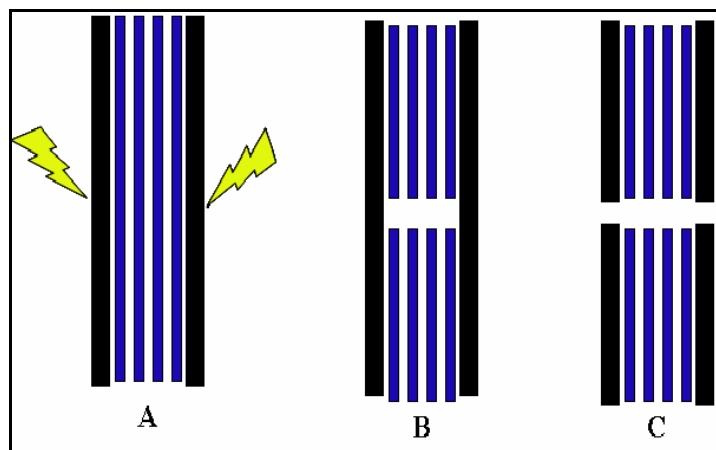


Figura 7. Esquema dos tipos de lesões nervosas : A) neuropraxia; B) axionotmese e C) neurotmese.

Na lesão por neurotmese ocorre perda da continuidade de todo o tronco nervoso. Todas as alterações decorrentes de uma lesão axonal tipo axionotmese também ocorrem na neurotmese. A recuperação é muito difícil e as alterações neuronais retrógradas são muito graves, apresentando

morte de grande número de neurônios. Este tipo de lesão é geralmente tratado cirurgicamente e, mesmo com o reparo cirúrgico adequado, o prognóstico de recuperação funcional completa é limitado (FERREIRA, 2001).

3.6 Processos decorrentes à lesão nervosa

As reações geradas após qualquer lesão de nervos periféricos ocorrem em duas fases. Na primeira ocorre a desintegração do axônio e a quebra da bainha de mielina, processo denominado de degeneração Walleriana (Figura 8). A segunda fase da reação à lesão é o processo de regeneração da continuidade entre o axônio e seu órgão terminal. O processo regenerativo é influenciado pela condição do endoneuro. Quando o endoneuro é preservado, a regeneração processa-se completamente, uma vez que o axônio cresce confinado no tubo originalmente ocupado por ele (DAHLIN, 2004).

Os produtos degenerados são eliminados pela ação cooperativa das células de Schwann desnervadas e pelo infiltrado de macrófagos. Embora as alterações mais importantes ocorram abaixo do nível da lesão, também ocorrem alterações acima desta, que podem levar a degeneração do neurônio e de toda via axonal (RODRÍGUES; VALERO-CABRÉ; NAVARRO, 2004).

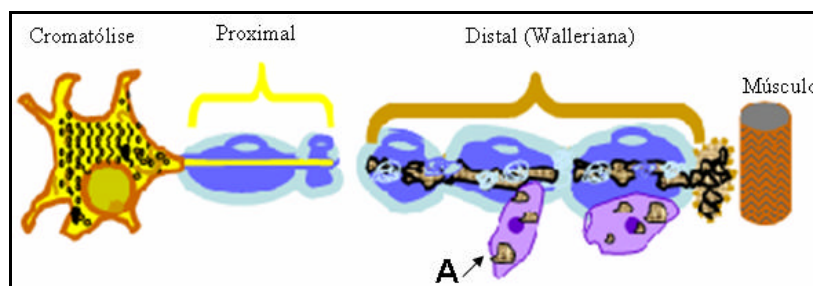


Figura 8 Esquema da degeneração Walleriana. Observar em: A) macrófago.

A reação retrógrada ou ascendente na porção proximal da lesão do axônio na neurotmeose ocorre em vários centímetros e uma característica desta reação é a redução do diâmetro axonal e na espessura da mielina devido ao extravasamento do conteúdo intra-axonal para os tecidos adjacentes (GEDDIS; REHDER, 2003).

A fase cromatolítica ou reativa inicia a reação retrógrada que afeta primariamente o núcleo do neurônio e os grânulos de Nissl, onde o núcleo é deslocado para a periferia e o nucléolo aumenta de volume (DAHLIN, 2004). A substância de Nissl, isto é, o retículo endoplasmático do corpo celular perde seu arranjo compacto, quebrando-se em partículas finas dispersas pelo citoplasma. Nesta fase também ocorre o aumento do número de células da glia (FERREIRA, 2001).

A parte proximal dos axônios transeccionados geralmente se retrai acima dos nódulos de Ranvier, onde o comprimento é dependente do número de células de Schwann lesionadas. A extremidade distal dos axônios lesionados é fechada rapidamente, este processo é dependente do Ca^{2+} (GEDDIS; REHDER, 2003).

Na neurotmeose as lesões acometem todo o tronco nervoso e o tecido que o circunda (endoneuro, perineuro e epineuro) impedindo o retorno do axônio para seu órgão terminal original, uma vez que escapa do tubo endoneural. Além disto, o axônio pode ter seu caminho obstruído por tecido fibroso (FERREIRA, 2001).

Além das alterações que ocorrem acima do local da lesão (retrógradas), ocorre uma série de modificações do tronco nervoso abaixo da lesão, processo denominado de degeneração Walleriana, devido à perda de contato dos axônios com o corpo celular. As proteases Cálcio-dependente são ativadas nos axônios distais a lesão, liderando um processo proteolítico que desintegra o axoplasma (GEORGE; GLASS; GRIFFIN, 1995; DAHLIN, 2004).

Os resíduos das partes de cada axônio, incluindo os fragmentos de mielina são digeridos pela proliferação de células de Schwann e pela invasão de macrófagos (HIRATA; KAWABUCHI, 2002). A decomposição da mielina pelas células de Schwann pode ser controlada por sinais positivos provenientes de axônios intactos ou até mesmo de axônios lesionados (DAHLIN, 2004).

A maior parte dos axônios, ao longo do coto distal do nervo transeccionado, é reduzida a fragmentos amorfos e granulares após 24 horas. Próximo de 48 horas, a bainha de mielina começa a se transformar em pequenos segmentos com formato ovalado. Os macrófagos são ativados e migram para o coto degenerado e fagocitam as fibras nervosas e mielinas desintegradas. As células de Schwann proliferam na forma de faixas longitudinais em resposta aos fragmentos de mielina e as citocinas derivadas dos macrófagos (DAHLIN, 2004).

Após 72 horas a bainha de mielina forma ovóides segmentados que englobam fragmentos axonais e o núcleo das células de Schwann iniciam atividades mitóticas fazendo com que todo o axônio abaixo da lesão se convertam em mielina. Após estes acontecimentos, as células de Schwann formam as bandas de Büngner dentro do tubo endoneural que se encontram cheios de fragmentos residuais de mielina e axônios (FERREIRA, 2001; DAHLIN, 2004).

A degeneração Walleriana serve para criar um micro-ambiente favorecendo o crescimento axonal. Os neurônios que sofrem neurotmeose mudam de um estado de transmissão para um estado regenerador e seus axônios geram cones de crescimento que progridem do coto proximal na direção do nervo distal (RODRÍGUES; VALERO-CABRÉ; NAVARRO, 2004).

3.7 Regeneração nervosa

Os precursores do processo regenerativo são as transformações que passam o corpo neuronal após uma lesão axonal e a proliferação de células de Schwann para o local da lesão.

Estes precursores surgem simultaneamente a uma única alteração degenerativa, onde ocorre a quebra e eliminação do axônio e bainha de mielina (degeneração Walleriana) (FERREIRA, 2001; DAHLIN, 2004; JOHNSON; ZOUBOS; SOUCACOS, 2005). No caso da lesão por neurotmesa, a mielinização das fibras regeneradas ocorre entre 14 a 21 dias após a lesão (BEAU; ELLISMAN; POWELL, 1988).

A bainha de mielina distal ao ponto da lesão se degenera e é acompanhada pela proliferação mitótica de células de Schwann que suprem o espaço dentro da lâmina basal do tubo endoneural antigo. Aonde existe espaço entre as extremidades nervosas ocorre a proliferação das células de Schwann (principalmente na extremidade distal) que formam uma série de cordões celulares (bandas de Büngner) gerando uma ponte entre as extremidades (FENRICH; GORDON, 2004; JOHNSON; ZOUBOS; SOUCACOS, 2005).

O crescimento axonal após uma transecção é um fenômeno muito delicado. Para cada ramo de axônio, numerosos brotos ou *sprouts* (cerca de 5 por ramo de axônio) são formados e em cada broto há um cone de crescimento. Estes cones exploram o ambiente com micromovimentos locais denominados de lamellipodia (protusão da membrana rica em actina) e filopodia (parecido com movimento de extensão dos dedos) (BELKAS; SCHOICHET; MIDHA, 2004; DAHLIN, 2004).

Embora não exista diferença essencial nas propriedades entre os brotos e os cones de crescimento, o broto refere a uma protusão inicial do axolema contendo poucas vesículas e mitocôndrias enquanto o cone refere-se à extremidade de um axônio já bem desenvolvido, contendo vesículas e mitocôndrias em abundância (IDE, 1996).

Uma nova membrana proveniente do corpo celular é transportada e incorporada dentro da superfície da membrana do cone de crescimento, fazendo com que ocorra o aumento do comprimento dos brotos. Os axônios do segmento nervoso proximal crescem de acordo com a

migração das células de Schwann e o microambiente em que os axônios e células de Schwann crescem pode ser atrativo ou repulsivo. Deste modo, o cone de crescimento, por meio da filopodia e com o auxílio da polimerização da actina, pode ser guiado por quimioatração, quimiorrepulsão, contato mediado por atração e contato mediado por repulsão (Figura 9) (BELKAS; SCHOICHET; MIDHA, 2004; DAHLIN, 2004).

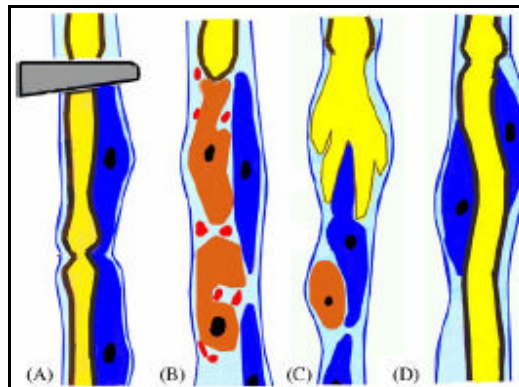


Figura 9. Esquema da seqüência de eventos em uma lesão neuronal, seguida de regeneração. Em: **A)** Lesão nervosa; **B)** Macrófagos englobam os restos de mielina; **C)** Cones de crescimento; **D)** Mielinização do axônio regenerado.

Fonte: Johnson, Zoubos e Soucacos (2005).

Os brotos estendem através do tubo da lâmina basal no segmento proximal, atravessam a estreita fenda do tecido conectivo entre os cotos proximal e distal, e finalmente entra no segmento nervoso distal. Todos os brotos estendem-se através do espaço entre a lâmina basal e a bainha de mielina no coto proximal e para tal, substâncias favoráveis para a regeneração axonal devem ser expressas na superfície da camada da lamina basal e na membrana plasmática das células da Schwann (IDE, 1996).

Neste contexto, deve ser dada menção ao termo “fator neurotrófico” com crescimento direto durante o desenvolvimento e regeneração. Os fatores de crescimento são moléculas difusíveis e solúveis que trabalham a distância, considerando que as moléculas de adesão e os fatores da matriz extracelular agem localmente (DAHLIN, 2004; RODRÍGUES; VALERO-CABRÉ; NAVARRO, 2004). Vários fatores neurotróficos incluindo o fator de crescimento

neural (NGF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator neurotrófico derivado da glia, neurotrofinas 3 e 4 têm sido investigados pela potencial promoção da regeneração (RUMMLER; GUPTA, 2004).

As moléculas de adesão podem ser atrativas ou repulsivas, dependendo do estado do cone de crescimento. Entre os fatores de crescimento neural, as proteínas laminina, fibronectina e a família das glicoproteínas têm papel crucial na integração de célula-célula e célula-matriz (RUMMLER; GUPTA, 2004).

A fibronectina, produzida por fibroblastos, monócitos, células endoteliais e outras células, está diretamente envolvida com a fixação, alongamento e migração de células, além disso, ela aumenta a sensibilidade de grande quantidade de células, com efeito proliferativo de fator de crescimento (ZHANG et al., 2003).

A laminina, a mais abundante glicoproteína presente na lâmina basal, media a adesão das células no tecido conectivo. Tanto a laminina quanto a fibronectina demonstraram aumentar a progressão da regeneração nervosa (ZHANG et al., 2003).

Zhang et al. (2003) examinaram os efeitos da fibronectina e laminina na regeneração do nervo ciático de ratos. Utilizaram para tanto 68 ratos com lesão por neurotmese bilateral e túbulos de silicone fixados entre as extremidades nervosas, deixando um espaço de 10 mm entre as mesmas. Trinta ratos receberam injeção de 10 µg de fibronectina e os outros trinta receberam 6 µg de laminina no nervo ciático da perna direita e solução salina no nervo da perna esquerda. Após 1, 3 e 4 meses foram realizadas análises eletrofisiológicas e histológicas que demonstraram que a aplicação destas proteínas aumenta significativamente a regeneração axonal e a maturação do nervo ciático após a neurotmese.

Radtke et al. (2005) avaliaram a integração do enxerto de células de Schwann dentro de nervos periféricos transecionados. Os axônios dos nervos ciáticos de ratos silvestres foram

transeccionados e as células de Schwann provenientes da proteína fluorescente verde (GFP) do nervo ciático adjacente foram transplantadas para o nervo lesionado. A proteína GFP foi observada presente no axoplasma e no compartimento citoplasmático das células de Schwann, mas não foram encontradas na bainha de mielina. Após o transplante a análise pelo microscópio imuno-eletrônico demonstrou a GFP nos compartimentos citoplasmáticos dos enxertos de células de Schwann com formação de mielina. Os resultados levam a conclusão de que as proteínas GFP do enxerto participam da mielinização das fibras nervosas em regeneração.

Outro componente da matriz extracelular de grande interesse é a fibrina. Após a lesão do nervo periférico, a barreira sangüíneo-nervosa é comprometida e as proteínas fibrinogênicas entram na matriz extracelular. A solução de plasma-fibrina é dividida formando a fibrina. A regulação do depósito de fibrina e sua liberação desempenham papel importante na regulação da função das células de Schwann durante a regeneração neural (AKASSOGLU et al., 2002). A fibrina interage com as células de Schwann formando o receptor $\alpha V\beta 8$ e captura as células de Schwann diferenciadas, segurando estas células em estado proliferativo (RUMMLER; GUPTA, 2004).

3.8 Fator neurotrófico

Vários fatores neurotróficos incluindo o fator de crescimento neural (NGF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator neurotrófico derivado da glia, neurotrofinas 3 e 4 têm sido investigados pela potencial promoção da regeneração (RUMMLER; GUPTA, 2004).

O segmento distal do nervo transeccionado exerce influências tróficas na regeneração dos axônios. Nos nervos normais, os fatores tróficos são produzidos em órgãos alvo e transportados até as células do corpo celular. Se a comunicação dos axônios com as células do corpo celular for

interrompida, as células de Schwann produzem fatores neurotróficos, incluindo o NGF e o BDNF (IDE, 1996).

As neurotrofinas são liberadas pelas células de Schwann e dispersas difusamente ao redor dos axônios em regeneração. Muitos outros fatores neurotróficos incluindo o fator de crescimento da insulina, fator de crescimento do fibroblasto tem demonstrado que estão diretamente envolvidos com a promoção da regeneração axonal (IDE, 1996; LEE et al., 2003).

Kimura et al. (2004) investigaram se o fator neurotrófico PACAP (polipeptídeo ciclase adenosina pituitária) proveniente do sistema nervoso central influenciava na regeneração dos nervos periféricos, especificamente o nervo facial. Utilizaram para tanto 59 porquinhos da índia e lesionaram por transecção o nervo facial, posteriormente injetaram 2 µg de PACAP no local da sutura nervosa. Após 4 semanas, realizaram avaliações histoquímicas e eletrofisiológicas, demonstrando que o fator neurotrófico PACAP promove o aumento da regeneração do nervo periférico quando comparado com o grupo controle.

Os fatores neurotróficos não são liberados por secreção e sim pelo dano mecânico causado pela lesão. As células de Schwann dos nervos sadios estão inativas morfológicamente. Porém, após a transecção elas começam a proliferar nas primeiras fases da degeneração Walleriana e esta proliferação é responsável pela liberação dos fatores neurotróficos (IDE, 1996).

3.8.1 Fator de crescimento nervoso (NGF)

As células de Schwann de nervos ciáticos sadios contêm pequena quantidade de NGF quando comparada com os nervos simpáticos que inervam a íris e os vasos sanguíneos. Entretanto, após a transecção, as células de Schwann do segmento distal começam a produzir NGF em um nível que atinge o pico em 24 horas e este é mantido por 10 a 15 dias (HEUMANN et al., 1987 apud IDE, 1996).

A manutenção de elevados níveis de produção de NGF pelas células de Schwann é regulado pela interleucina-1 proveniente dos macrófagos, que invadiram o local da lesão na degeneração Walleriana. Se os macrófagos não fossem recrutados, a degradação da bainha de mielina estaria comprometida e os níveis de NGF sintetizados pelas células de Schwann não aumentariam significativamente, resultando na diminuição da regeneração nervosa (BROWN et al., 1991). Além disso, foi demonstrado que o NGF facilita a regeneração no hipocampo neural ao lado da ponte do enxerto nervoso (LEE et al., 2003).

3.8.2 Fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF)

O BDNF não é sintetizado rapidamente pelas células de Schwann em nervos periféricos normais. Os níveis de BDNF aumentam 4 dias após a transecção nervosa e permanece por 4 semanas. O BDNF é efetivo na promoção da sobrevivência do brotamento não somente dos nervos sensoriais e simpáticos como também dos motores (IDE, 1996).

3.8.3 Proteína-43 associada ao crescimento (GAP-43)

A GAP-43 tem sido amplamente estudada desde que ela foi identificada na regeneração de axônios de coelhos e sapos (SKENE; WILLARD, 1981 apud IDE, 1996). Esta proteína apresenta diferentes nomes tais como: B50, Fl, pp46, p57 e neuromodulina (IDE, 1996) que foram criados por diferentes pesquisadores.

Visualiza-se a GAP-43 em grandes quantidades e em associação com as membranas plasmáticas de axônios em desenvolvimento e regeneração, especialmente concentrada nos cones de crescimento, aparecendo após uma lesão por transecção nervosa (IDE, 1996; SHIN et al., 2003; DAHLIN, 2004).

Sugere-se que a GAP-43 determina a polaridade dos axônios em crescimento, porém Aigner e Caroni (1995) demonstraram que esta proteína está envolvida com a expansão, ramificação e adesão dos cones de crescimento.

A GAP-43 não é uma proteína específica dos neurônios, ela também está presente nas células de Schwann, incluindo as junções neuromusculares desnervadas. As propriedades da GAP-43 são descritas como: ativação da proteína-G, substrato de proteína Kinase (PKC) e a ligação de calmodulina indicando que esta molécula apresenta importante função na transdução do sinal nos cones de crescimento. Ide (1996) sugeriu que esta proteína é a chave que regula as atividades dos axônios em regeneração.

3.9 Reparo de nervos periféricos

3.9.1 Modelos experimentais

Uma grande variedade de modelos de animais e nervos tem sido usada em pesquisa com regeneração nervosa periférica. Roedores, principalmente camundongos e ratos, tornaram-se os modelos mais freqüentemente utilizados devido ao baixo custo de manutenção e sua distribuição de troncos nervosos similares aos humanos (RODRÍGUEZ; VALERO-CABRÉ; NAVARRO, 2004).

Lesões em roedores em diferentes nervos têm sido analisadas como exemplo: em nervos femorais, medianos, braquial, e raízes espinhais lombares. O modelo do nervo ciático provê um tronco nervoso com adequado comprimento e espaço no meio da coxa para procedimentos cirúrgicos e introdução de enxertos ou guias, dividindo na região da fossa poplíteia em três ramos: tibial, fibular e sural. Cada um destes ramos conduz proporções diferentes de axônios motores, sensoriais e autonômicos em direção ao músculo, receptores de pele, vasos ou glândulas

sudoríparas, localizados em territórios definidos do membro traseiro (RODRÍGUEZ; VALERO-CABRÉ; NAVARRO, 2004).

Myckatyn et al. (2004) utilizaram um novo modelo experimental para estudar a regeneração de nervos periféricos. Este modelo consistia de ratos transgênicos com genes de proteínas fluorescentes codificadas sobre promotores neuro-específicos. Os nervos motores e sensitivos destes ratos aparecem verdes e amarelos ao microscópio fluorescente. Foi concluído que este novo modelo facilita a visualização da regeneração nervosa após lesão dos nervos periféricos, porém é uma técnica de alto custo e que necessita de novos estudos.

Embora a lesão de nervos ciáticos em humanos seja rara, este modelo prove um banco de teste para lesões que envolvem nervos pluri-fasciculares com axônios de tamanhos e tipos diferentes competindo no alcance dos tubos endoneurais distais e alvos de re-inervação (RODRÍGUEZ; VALERO-CABRÉ; NAVARRO, 2004).

3.9.2 Procedimento cirúrgico

Estratégias de reparo de lesões de nervos periféricos têm sido empreendidas há centenas de anos, com os primeiros relatos no século dezessete (BELKAS; SCHOICHET; MIDHA, 2004). Apesar de muitas estratégias terem sido criadas o reparo de longos espaços (*GAP*) nervosos foi classificado em 2 categorias principais: a primeira corresponde a operações de pontes, isto é, todos os enxertos, transposições e técnicas de tubulação e na segunda categoria estão inclusas as técnicas de microcirurgia manipulativa, que incluem a anastomose término-terminal (*end-to-end*) dos troncos nervosos e a término-lateral (*end-to-side*).

Para Belkas, Schoichet e Midha (2004) a categoria que utiliza enxertos é mais efetiva do que a manipulativa, pois favorece maior tensão ao redor de todo o espaço do nervo lesionado, porém esta categoria possui alto custo e necessita de treinamento prévio para ser realizada.

Grecco et al. (2003) estudaram, utilizando o Fluoro-Gold como marcador neuronal, a regeneração do nervo ciático de ratos com enxerto nervoso tradicional denominado de *Gold Standard*, isto é, “padrão ouro” e afirmaram que o enxerto nervoso denota uma perspectiva ruim de regeneração, pois funciona como um bloqueio parcial para a migração dos axônios em regeneração.

Métodos alternativos para o reparo nervoso têm sido explorados, incluindo o uso do laser de dióxido de carbono para soldar o reparo associado à cola de fibrina. Anticorpos de glicoproteínas associadas à mielina demonstraram que aumenta preferencialmente a re-inervação motora de nervos periféricos. O tratamento com ácido hialurônico proveniente do líquido amniótico humano também demonstrou reduzir a cicatrização do nervo periférico após reparo cirúrgico e regeneração (MENOVSKY; WEERMAN; BEEK, 2003).

Bunting et al. (2005) demonstraram que enxertos com fibras de biovidro 45S5 podem formar uma armação que tem por finalidade guiar os axônios em crescimento. Foi demonstrado pela análise histoquímica que culturas de células de Schwann e fibroblastos de ratos aceleram o crescimento nervoso com o biovidro 45S5 e após o crescimento ser iniciado, as fibras do biovidro são reabsorvidas pelo corpo.

Stang et al. (2005) utilizaram uma ponte de colágeno tipo I e III de 2 cm para unir os espaços de nervos ciáticos de ratos após a transecção. Os tubos tinham diferentes diâmetros e para acelerar a regeneração foram implantadas células de Schwann. Após 8 semanas o processo de regeneração foi monitorado clinicamente, histologicamente e morfometricamente. Foi concluído que as células de Schwann e os parâmetros estruturais determinam a regeneração do nervo periférico.

O objetivo primário do reparo nervoso é aproximar corretamente os segmentos nervosos na esperança de executar uma re-inervação funcional dos órgãos. Quatro princípios gerais para o preparo da neurotome foram criados. Inicialmente, a preparação dos cotos é realizada

cirurgicamente com auxílio de lâmina de bisturi. Após isto, deve-se identificar e separar fascículos individuais ou grupos de fascículos, limpando-os e removendo tecido lesionado. A seguir, se juntam os segmentos distal e proximal e realiza a coaptação ou anastomose dos cotos com auxílio de fio de sutura 10-0 (oftálmico) (ROWSHAN; JONES; GUPTA, 2004; BONTIOTI et al., 2005).

Evidências recentes sugerem que pacientes com lesões de nervos periféricos, paralisia fascial ou neuromas podem ser tratados com sucesso pela anastomose término-lateral ou término-terminal. Para explicar isso, quatro hipóteses foram propostas: (1) os nervos lesionados regeneram e crescem para dentro do nervo transplantado; (2) os nervos lesionados regeneram e crescem bidirecionalmente para dentro do nervo transplantado e para o nervo doador; (3) ocorre a formação de brotamentos colaterais provenientes do nervo doador; e (4) após o brotamento colateral, as fibras nervosas regeneradas gradualmente se podam para evitar a dupla inervação (HAYASHI et al., 2004).

Temple et al. (2004) avaliaram a resistência biomecânica à ruptura e ao espaçamento de nervos periféricos por 5 técnicas de reparo, incluindo a cola de fibrina, sutura epineural simples e 3 outros métodos de anastomose (horizontal, técnica de “Tajima” e “Bunnell”). Utilizaram para tanto uma célula de carga para mensurar a resistência à força de tensão imposta pela célula de carga nos nervos suturados. Os resultados demonstraram que as técnicas de “Bunnell” e “Tajima” foram significativamente mais resistentes do que as outras e a cola de fibrina foi a menos resistente à tensão (Figura 10).

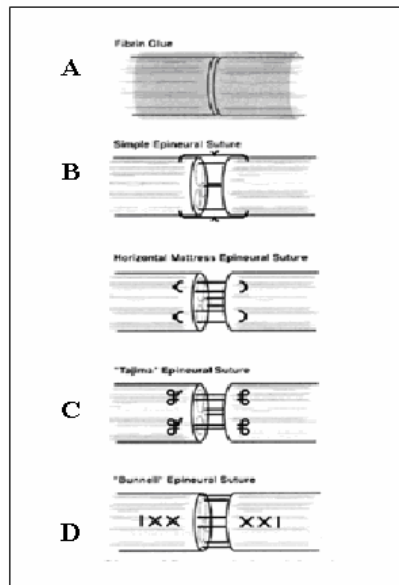


Figura 10. Diagrama de técnicas de anastomose, incluindo: **A)** cola de fibrina; **B)** epineural simples; **C)** Bunnel e **D)** Tajima.

Fonte: Temple et al., (2004).

Júnior, Valmaseda-Castellón e Gay-Escoda (2004) compararam a sutura epineural simples com a cola de fibrina no reparo do nervo facial de 17 coelhos. Por meio de parâmetros da avaliação eletrofisiológica e histológica pode-se concluir que a sutura epineural simples término-terminal ofereceu performance superior à cola de fibrina em termos de quantidade de axônios, porém a velocidade de condução do impulso nervoso permaneceu inalterada.

Yan et al. (2002) avaliaram 2 técnicas de reparo epineural término-lateral com capacidade para induzir o brotamento neural e a recuperação muscular. Utilizaram em 24 ratos a técnica de reparo epineural helicoidal e a técnica término-lateral padrão. Após 11 meses de pós-operatório os axônios foram contados pela análise histológica e a força tetânica do músculo extensor longo dos dedos foi mensurada. Foi concluído que o reparo helicoidal aumenta o número de brotamentos e acelera a recuperação muscular.

Kayıkçıoğlu et al. (2004) relataram uma nova técnica de reparo nervoso epineural com auxílio de um círculo metálico externo colocado em nervos ciáticos de 30 ratos. Após o

procedimento operatório os ratos foram avaliados pelo índice funcional do ciático (IFC) e pela análise histológica. Os resultados demonstraram que o IFC foi melhor no grupo com o anel metálico e a análise histológica demonstrou diferenças no diâmetro dos axônios, concluindo que o círculo metálico externo aumenta a regeneração do nervo ciático de ratos.

3.10 Análise Morfométrica

Em 1995, De Medinaceli afirmou que para realizar um estudo morfométrico de estruturas nervosas era necessário o conhecimento detalhado sobre a anatomia do sistema nervoso. Por meio da lesão por esmagamento (30 segundos) verificou-se que após 1 mês e meio a 2 meses de lesão a recuperação funcional nervosa alcançava o seu platô apesar de não ocorrer nenhuma mudança significativa morfometricamente. As mensurações histológicas avaliavam o número de fibras nervosas por área do nervo, média do diâmetro de cada neurite, média da espessura da bainha de mielina e áreas de tecido conjuntivo.

Existem dois pré-requisitos para uma função nervosa adequada: 1) Neurites individuais que possuem capacidade de transmitir impulsos nervosos, embora em menor quantidade do que antes do trauma sendo a morfometria uma excelente ferramenta para monitorar este requisito e 2) Organização global do nervo não pode ser descontínua, pois brotamentos de regeneração de forma cruzada podem levar à caminhos errados em direção as fibras e pode resultar em severa perda de função sendo que a morfometria não promove informação coerente de toda a função nervosa. Por essa razão, apenas nos casos em que axônios individuais ou pequenos fascículos nervosos restauram sua função, pode comparar com resultados histológicos. Se forem fascículos largos e todos os nervos, a correlação desaparece. Uma neurotização insuficiente e remielinização insatisfatória continua a ser correlacionada com função pobre, mas o contrário pode não ser verdadeiro. Nenhuma morfometria ou eletrofisiologia pode mensurar o mais importante

fator funcional e a proporção de fibras regeneradas que alcançam apropriadamente seu alvo. Assim, a análise morfométrica, após lesões traumáticas experimentais, promove uma imagem confiável das condições tróficas nos nervos regenerados, mas não auxiliam o entendimento da função (DE MEDINACELI, 1995).

3.11 Análise Funcional

Para avaliação do nível de lesão nervosa, em situações experimentais, a avaliação funcional da marcha tem-se demonstrado um método confiável e reproduzível (DIJKSTRA et al., 2000; KOKA; HADLOCK, 2001; VAREJÃO et al., 2003). Em 1982, De Medinacelli, Freed e Wyatt propuseram a utilização de um método de avaliação denominado de Índice Funcional do Ciático (IFC) baseado em mensurações das patas traseiras de ratos. Este método foi realizado entre um grupo controle (normal) e grupos experimentais, após secção e esmagamento do nervo ciático, apresentando boa confiabilidade e reprodutibilidade. O experimento consistia em obter as imagens das pegadas dos animais, quando estes caminhassem numa passarela construída especificamente para esse fim, sendo estas imagens registradas e analisadas.

As medidas coletadas são: 1) espaço entre a segunda e a quarta falange distal (ITS), 2) espaço entre a primeira e a quinta falange distal (TS) e 3) espaço entre a borda proximal do pé e a terceira falange distal (PL). Após obter os valores dessas variáveis, estes eram introduzidos numa equação matemática em que os resultados representavam o percentual do déficit do lado lesado (E – pata de estudo), comparado ao lado normal (N – pata normal). A função normal, ausência de lesão é indicada por um índice de 0% enquanto que -100% representa a perda completa da função, lesão total do nervo (Figura 11) (ABREU; WEI; ZUMIOTTI, 2002; LAGO Jr et al., 2005).

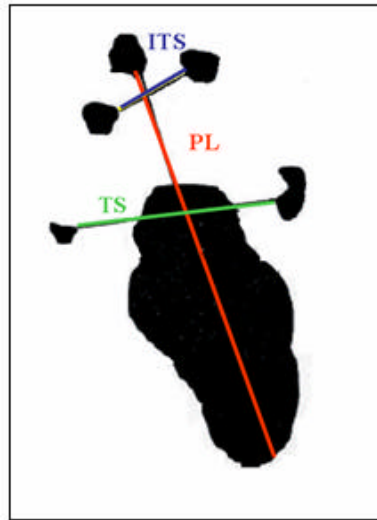


Figura 11. Esquema da impressão em papel da pata de um rato normal com as medidas **ITS** (espaço entre o segundo e quarto dedo), **TS** (espaço entre o primeiro e quinto dedo), e **PL** (espaço entre o calcanhar e o terceiro dedo).

Segue abaixo a fórmula utilizada do Índice Funcional do Ciático (IFC) (DE MEDINACELLI; FREED; WYATT, 1982):

$$IFC = -38.3 \frac{(EPL - NPL)}{NPL} + 109.5 \frac{(ETS - NTS)}{NTS} + 13.3 \frac{(EITS - NITS)}{NITS} - 8.8$$

Há uma relação direta entre a distribuição e a contribuição das fibras de nervos espinhais que formam o nervo ciático e a alteração dos índices funcionais para os nervos ciático, tibial e fibular. O ramo de L-4 contribui quase que inteiramente para o nervo fibular, L-5 para o nervo tibial e ciático, L-6 e outros ramos para o nervo sural. Após a lesão de L-4 uma redução significativa na função do índice do nervo fibular foi observada com redução do comprimento da imagem (PL), na lesão de L-5, significativa redução do índice do nervo ciático e tibial, com aumento em (PL) e redução no espalhamento entre os dedos opostos (TS). Na lesão de ambos, L-4-5 há redução significativa em todos os índices mensurados, aumento em (PL), e redução no dedo intermediário (ITS) e do (TS) (MONTROYA et al., 2002).

Empregando o IFC associado à imunocitoquímica, Shin et al. (2003) analisaram o efeito terapêutico do laser (650 nm, 5 mW) em lesões do tipo axoniotmese do nervo ciático de ratos seguidos por 4 dias consecutivos de tratamento. Os autores verificaram que o grupo tratado com laser além de apresentarem um índice funcional mais elevado quando comparado com o grupo controle, possuía maior número de GAP-43, proteína envolvida no processo de regeneração nervosa, nas fases iniciais da recuperação nervosa, mas após a 5ª semana não apresentava diferença estatisticamente significativa entre o grupo tratado e o controle. Porém, não relatam a densidade de energia empregada.

Lago Junior et al. (2005) avaliaram o reparo da transecção aguda produzida no nervo ciático de ratos após a aplicação de cola de fibrina, em comparação com sutura epineural, e a associação das duas técnicas. A avaliação funcional do IFC demonstrou resultados significativamente melhores no grupo empregado sutura associada à cola de fibrina em relação à aplicação das técnicas isoladamente.

Devido as dificuldades operacionais das técnicas de reparo nervoso, a utilização de instrumentos eletroterapêuticos com finalidade regenerativa, entre eles: as estimulações elétricas (MENDONÇA; BARBIERI; MAZZER, 2003) ultra-som (RASO et al., 2005) e o laser de baixa potência têm sido estudados.

3.12 Laser de baixa potência

3.12.1 Aspectos Gerais

A luz tem sido utilizada com fins terapêuticos ainda em tempos antigos. A origem do laser se dá a partir de eventos que ocorrem dentro de uma cavidade óptica, na qual determinado material após ter seus átomos excitados, culminando em geração de emissão estimulada de fótons com a mesma frequência, direção e comprimento de onda (COTTON, 2004).

O estágio final deste processo, denominado de amplificação da luz, decorre pela existência de espelhos dentro da cavidade, um totalmente refletor e outro parcialmente, fazendo com que os fótons sofram reflexão, estimulando novos fótons e emitindo o feixe laser (KARU et al, 2005; COTTON, 2004).

As características, isto é, as propriedades que diferem o feixe laser de outras fontes luminosas são a monocromaticidade, colimação, coerência e polarização (KARU et al, 2005). A monocromaticidade indica que cada meio gerador de laser corresponde a um único comprimento de onda, característica importante, pois determina quais moléculas absorverão o laser e sofrerão os efeitos fotobiológicos específicos. O laser é colimado por consequência de apenas os fótons que estão perpendiculares aos espelhos contribuem para o processo de amplificação. A coerência ocorre, pois os fótons estão em fase, consequências do processo de emissão estimulada. Esta coerência pode ser temporal, quando as ondas da luz se encontram em fase, ou espacial, quando os fótons estão ajustados em planos espaciais paralelos entre si, sendo mantidos por grandes distâncias (BAXTER, 1998, KARU et al, 2005).

A polarização ocorre quando as ondas de luz estão todas orientadas num só plano, gerando a vibração dos campos elétricos em uma só direção, podendo ser linear ou circular (COTTON, 2004).

O espectro eletromagnético mais utilizado na laserterapia de baixa potência está entre os comprimentos de onda de 630 a 1300 nm, incluindo a luz visível e parte próxima da luz infravermelha. Esta parte do espectro é denominada de janela óptica, por ser esta faixa capaz de penetrar nos tecidos e produzir os efeitos específicos (KARU et al, 2005).

3.12.2 Interações biológicas

A radiação luminosa ao atingir o tecido biológico pode ser refletida, transmitida, absorvida ou espalhada (Figura 12). A absorção é o principal parâmetro da interação laser-tecido, pois dela depende a quantidade de energia entregue ao tecido e por sua vez os efeitos nele provocados. Dependendo da energia do fóton, a radiação pode ser transferida à molécula causando transições rotacionais, vibracionais ou eletrônicos, provocando nos tecidos, efeitos fotoquímicos, fotofísicos, fototérmicos, fotomecânicos e fotoelétricos (KARU et al, 2005).

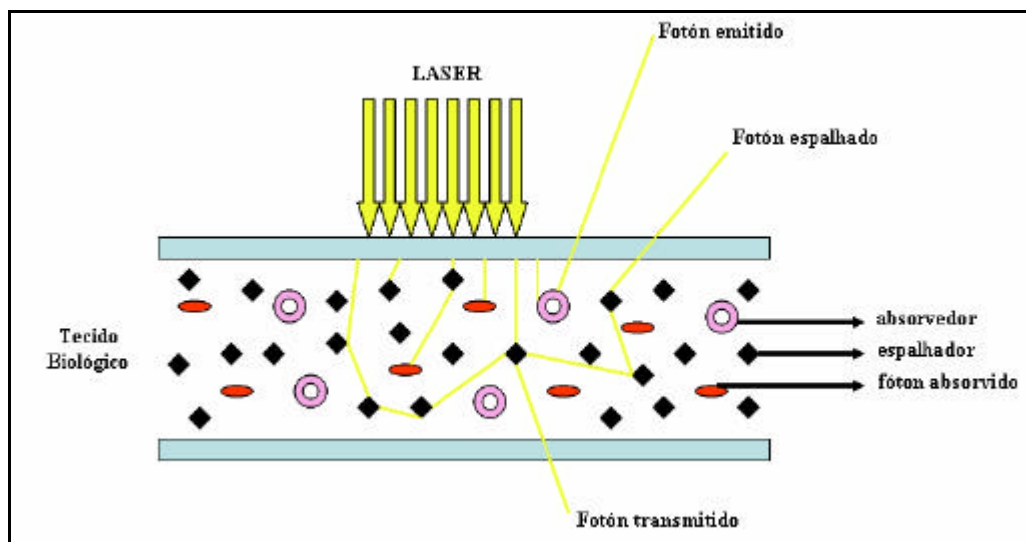


Figura 12. Efeitos físicos da interação laser-tecido biológico.

O princípio básico da terapia a laser é o fato que a irradiação, através da propriedade de monocromaticidade, possui capacidade de alterar o comportamento celular sem que seja necessária a presença de aquecimento. Por esta razão denomina-se de terapia de baixa potência ou intensidade. O fenômeno apesar de ser primeiramente denominado de bioestimulante, notou-se que em certos momentos apresenta-se efeito inibitório sobre as ações celulares tendo assim a sua terminologia modificada para biomodulador (BASFOR, 1995; BAXTER, 1998; VLADIMIROV; OSIPOV; KLEBANOV, 2004).

A interação biológica laser-tecido promove reações atérmicas, produzindo o efeito fotoquímico. Este efeito está associado à absorção particular de cada cromóforo, isto é, substâncias absorvedoras de luz presentes nos tecidos, tendo como alvo principal os citocromos presentes nas mitocôndrias (Figura 13). Para lasers de 488 e 515 nm (Argônio), tem-se a hemoglobina como cromóforo, enquanto que para 10.600 nm (CO₂) a água. Para o 632,8 nm (He-Ne), 904 nm (GaAs) e 630-830 nm (GaAlAs), ou seja, comprimentos na região do vermelho e infravermelho próximo, não apresentam fortes cromóforos, possibilitando maior capacidade de penetração (BASFORD, 1995; VLADIMIROV; OSIPOV; KLEBANOV, 2004; COTTON, 2004).

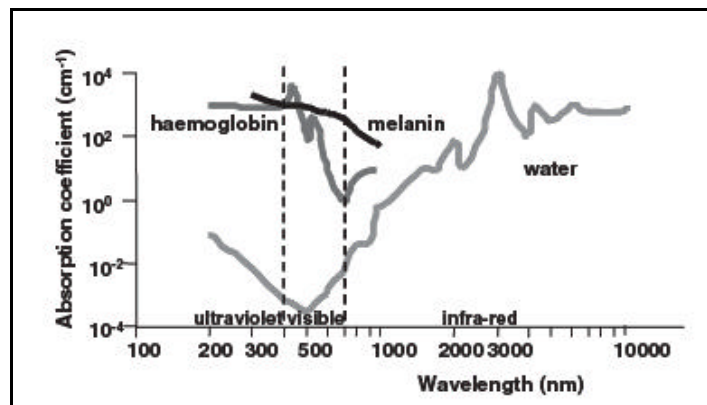


Figura 13. Coeficiente de absorção para alguns comprimentos de onda.
Fonte: Cotton (2004)

Karu et al. (2005) afirmou que estes efeitos podem ocorrer por processos que provocam modificações no potencial da membrana, resultando em aumento da síntese de ATP, gerando os efeitos de biomodulação.

As porfirinas endógenas, presentes nas mitocôndrias, absorvem a luz na parte vermelha do espectro servindo como cromóforos da irradiação a laser e atuando como fotosensibilizadores, induzindo reações de radicais livres (incluindo a peroxidação lipídica com formação predominante de hidroperóxido de ácidos e gorduras não saturadas nos fosfolipídios) após a absorção do quantum de energia (KLEBANOV et al., 2001).

A peroxidação lipídica aumenta a permeabilidade iônica da membrana plasmática, em particular, dos íons cálcio. O aumento intracelular da concentração de cálcio (Ca^{2+}) em leucócitos ativa processos dependentes de Ca^{2+} e finalmente incrementa o potencial funcional celular. Este processo é acompanhado pela reunião de NADPH-oxidases na membrana no estado ativo de espera e expressão de receptores de superfície. O aumento do potencial funcional dos leucócitos também é acompanhado pela produção de agentes bioativos como O_2 , H_2O_2 , ClO^- , NO e várias citocinas. Alguns possuem propriedades bactericidas enquanto outros afetam a microcirculação sanguínea (KLEBANOV et al., 2001).

A participação do citocromo-c-oxidase e do Ca^{2+} -ATPase atuantes como cromóforos, não explicam todos os efeitos da irradiação infravermelha (KLEBANOV et al., 2001).

O óxido nítrico (NO) é considerado um mediador dos efeitos celulares decorrentes à laserterapia sendo responsável pelo incremento da ligação celular, estando associado à produção de energia, estimulação da biogênese de mitocôndrias, apoptose e envolvido com efeitos analgésicos, aumento da microcirculação possuindo reservatório nas hemoglobinas (KARU; PYATIBRAT; AFANASYEVA, 2005).

A irradiação a laser (633 nm, 45,19 J, 162 J/cm^2) regula o aumento do peptídeo relacionado ao gene calcitonina (CGRP) que serve como um indicador da regeneração nervosa após a lesão e da sobrevivência neuronal (SNYDER et al., 2002).

A proliferação de fibroblastos gengivais é aumentada pela aplicação da terapia a laser, independentemente do comprimento de onda (670, 780, 692, 782 nm), mas com a mesma fluência (2 J/cm^2 , 0,02 J) e quanto menor o tempo de exposição (maior potência de saída) melhor serão os resultados (ALMEIDA-LOPES et al., 2001).

Na prática clínica, a laserterapia emprega densidades de energia de 1 a 4 J/cm², associado com potência de saída entre 10 a 90 mW sendo amplamente utilizada em diversas lesões músculo-esqueléticas, assim como em processos álgicos e inflamatórios (BASFOR, 1995).

Karu (1987) verificou que a irradiação de mitocôndrias isoladas induzia alterações na homeostasia celular resultando em reações em cascata. Sugerindo que alguns componentes da cadeia respiratória (citocromos e flavinas desidrogenase) serviriam como fotoreceptores ou cromóforos primários, ou seja, capazes de absorver luz de determinado comprimento de onda, ativando a cadeia respiratória. Resultando no aumento da síntese de ATP, afetando os níveis de hidrogênio da célula, ativando outros íons transportados como sódio e potássio, além de alterarem o fluxo de cálcio entre as mitocôndrias e o citoplasma.

Em 1999, foi confirmada a hipótese de que o citocromo-c-oxidase, enzima terminal da cadeia respiratória, é um fotoreceptor da luz na região do vermelho. A absorção da luz por esta enzima aceleraria o transporte de elétrons na cadeia respiratória levando ao aumento de potencial elétrico trans-membrana da mitocôndria, ativando a síntese de ATP, conseqüentemente, o metabolismo celular (MANTEIFEL; KARU, 2005).

Rochkind e Quaknine (1992) relataram que os efeitos do LBP são dependentes da densidade de energia, pois baixas densidades causam a regulação na oxidação do metabolismo celular, e com altas densidades ocorrem danos fotodinâmicos. Esta afirmação foi possível após analisarem diferentes comprimentos de ondas e densidades de energia aplicadas sobre células de fibroblastos, verificando que a 630 nm obtinha-se um maior número de mitoses em comparação a 360 nm e 780 nm enquanto que o pico era alcançado com densidade de energia de 15 J/cm², porém acima de 60 J/cm² apresentavam redução da reprodução celular.

3.12.3 Laser em Nervos Periféricos

Em 1986, Rochkind et al. obtiveram resultados eletrofisiológicos positivos quanto à aplicação do LBP com He-Ne (16 mW, 8 J/cm², por 30 minutos, durante 20 dias) em ratos submetidos à neurotmesa com GAP de 0,5 cm em nervo ciático.

Rochkind et al. (1988) fazem menção a estudos prévios sobre a irradiação com laser de baixa potência, mais especificamente empregando laser He-Ne (632,8 nm) e sua capacidade de aumentar o potencial de ação do nervo ciático normal de rato, além de minimizar a degeneração muscular seguida pela ruptura do nervo sendo estes efeitos observados em um ano. Concomitantemente, este tipo de irradiação quando aplicada no nervo ciático, com lesão por esmagamento, previne a queda do potencial de ação e formação de fibrose cicatricial, além de acelerar o processo regenerativo e atenuar as mudanças degenerativas nos segmentos correspondentes na medula espinhal que estão presentes após a lesão nervosa.

Estudos empregando laser terapêutico com 630 nm, em feridas cutâneas, queimaduras e lesão de nervo ciático, realizadas bilateralmente, demonstram efeito tanto local como sistêmico. Observou-se que lesões não tratadas, do lado contra-lateral das lesões tratadas, apresentam melhor reparação que animais do grupo controle, porém menos evidentes que nas lesões tratadas. Neste estudo os autores verificaram a efetiva ação do laser, reduzindo a degeneração retrógrada dos neurônios motores da medula espinhal, esperada após uma lesão nervosa periférica (ROCHKIND et al., 1989).

Rochkind e Quaknine (1992) afirmaram que a irradiação com LBP com um comprimento de onda e densidade de energia específicos mantinham a atividade eletrofisiológica de nervos periféricos lesionados em ratos, prevenindo a formação cicatricial no local da lesão assim como mudanças degenerativas dos neurônios motores, correspondentes na medula espinhal, induzindo o brotamento axonal e estimulando os capilares em transplantes nervosos.

Khullar et al. (1995) examinaram a ação do laser GaAlAs (830 nm, 46 J/cm², 6 J, 70 mW, 538 mW/cm², feixe de 0,13 cm², por 10 dias) em nervos alveolares inferiores da polpa do dente, primeiro molar, em ratos, submetidos a neurotme. Utilizando análises himucitoquímicas do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, encontraram grande quantidade desta proteína no grupo tratado em relação ao controle. Concluíram que o aumento da inervação, quando utilizado a laserterapia, poderia ser pela aceleração da regeneração nervosa, re-inervação colateral ou combinação de ambas as respostas.

A terapia com laser em 780 nm gerou bons resultados em nervos ciáticos de ratos após neurotme seguida de reparo. A aplicação diária por 30 minutos em 21 dias consecutivos, transcutâneamente sobre os segmentos correspondentes da medula espinhal e na região lesionada promoveram respostas somato-sensórias positivas em 69,2% em ratos irradiados contra 18,2% de animais controle. O estudo histocitoquímico demonstrou aumento da quantidade do número de axônios e melhor qualidade do processo regenerativo devido à presença de axônios com maior diâmetro comparado ao grupo controle (SHAMIR et al., 2001).

Miloro et al. (2002) investigaram os efeitos da fototerapia pós-operatória nos nervos alveolares inferiores de coelhos reparados com tubos Gore-Tex. Os resultados demonstraram que a fototerapia pode promover a regeneração neural ao longo dos tubos sintéticos usados como pontes sobre o defeito no nervo. Os nervos alveolares foram lesionados e reparados bilateralmente, onde apenas um lado recebeu irradiação transcutânea (AsGa, 70 mW) com 820-830 nm e densidade de energia de 29 J/cm² por 4 dias consecutivos, iniciando no primeiro pós-operatório, seguido por 6 sessões adicionais de irradiação uma por semana. Os resultados da investigação morfológica dos nervos reparados demonstram um aumento na densidade da fibra nervosa no grupo tratado em comparação com o não tratado, sugerindo ser um método não-invasivo e benéfico na cura de lesões nervosas.

Gigo-Benato et al. (2004) compararam a ação de dois tipos diferentes de emissão a laser após a lesão por transecção do nervo mediano seguida pela anastomose com o nervo ulnar (doador) em ratos. Observaram que quando aplicavamos laser de 808 nm (contínuo, 416 mW, 454 μ s, 1.100 Hz, 39 segundos, 0,28 cm^2 , 29 J/cm^2) associado ao de 905 nm (pulsado, 28 W, 200 ns, 10 kHz, 1 minuto e 12 segundos, 0,1 cm^2 , 40 J/cm^2) obtinham melhores resultados funcionais, recuperação da massa muscular e maior número de fibras nervosas regeneradas em relação à aplicação isolada, porém apresentando resultados significativamente positivos da irradiação.

Devido à escassa reprodutibilidade de diversos trabalhos citados na literatura adicionado as insatisfatórias exposições metodológicas dos dados previamente observados, estudos se tornam necessários para elucidar os efeitos da laserterapia de baixa potência sobre o processo de reparação do nervo ciático. A investigação de um modelo experimental ligada à análise da avaliação da recuperação funcional, correlacionada à análise histológica pode fornecer dados relevantes para uma base de aplicabilidade clínica futura no tratamento de lesões nervosas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

O grupo amostral foi composto por 12 ratos machos adultos (*Rattus norvegicus albinus*), da linhagem Wistar, com peso corporal variando entre 300 a 350 gramas (aproximadamente 90 dias), procedentes do Biotério da Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal - UNIDERP, mantidos em condições controladas de luminosidade e temperatura, seis animais por gaiola, com alimentação sólida padronizada e água *ad libitum*.

Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVAP sob o protocolo nº L185/2005/CEP (Anexo A).

Os animais foram divididos em dois grupos experimentais, conforme o procedimento realizado:

- Grupo 1 (placebo): animais submetidos à lesão por transecção completa do nervo ciático unilateral seguido de reparo epineural e não-irradiados (n= 6).

- Grupo 2 (laser): submetidos à lesão por transecção completa do nervo ciático unilateral seguido de reparo epineural e subsequente tratamento com laser na região lesionada por 20 dias consecutivos (n= 6).

4.2 Procedimento cirúrgico e terapia

Foi realizada a pesagem dos animais e administração de pré-anestésico Butorfanol[®] [Turbogestic, (2 mg/kg)] (KOZHAKHMETOV, 1993) associado à Acepromazina [Acepran[®], (1 mg/kg)] (ALMEIDA et al, 2000) ambos administrados em dose única via intramuscular. Após

15 minutos foram administrados Zolazepan e Tiletamina [Zoletil 50[®], (20 mg/kg)] (ALMEIDA et al., 2000). Após a tricotomia da face lateral da coxa direita, com o auxílio de lâmina de barbear estéril, em extensão suficiente para permitir a visualização da região a ser abordada, o animal foi posicionado em decúbito ventral, prendendo-se as patas dianteiras e traseiras em abdução, e o local da incisão preparado com anti-sepsia (álcool-iodado).

O nervo ciático (OLIVEIRA et al., 2004; KAYIKÇIOĞLU et al., 2004) foi abordado através de uma incisão longitudinal na face lateral da coxa direita, desde a altura do trocânter maior até o joelho. Sob aumento de uma lupa, foi realizada, a cerca de 3 mm distal a sua emergência, de forma padronizada, a secção completa do nervo (Figura 14). Após a neurotomia, foi realizada uma anastomose epineural do nervo ciático com três pontos simples com monofilamento nylon (Mononylo n 10-0, Polysuture[®]) (Figura 15).

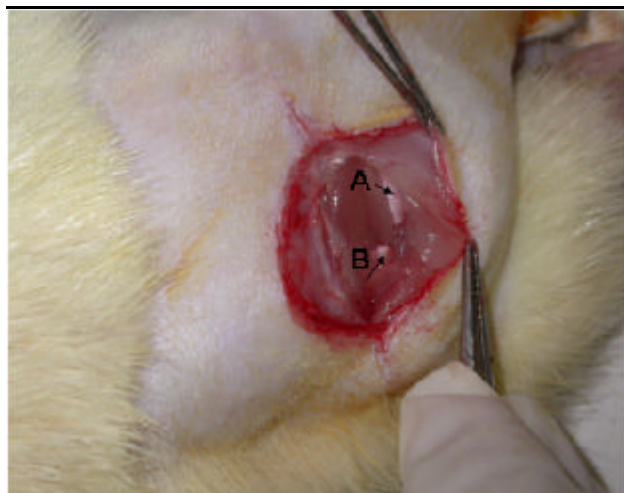


Figura 14. Foto do procedimento cirúrgico no momento em que era realizada a lesão por neurotome do nervo ciático. Observar em: **A**) coto distal; **B**) coto proximal.

Após a anastomose do nervo, os tecidos moles foram suturados por planos, com pontos simples de monofilamento nylon (Mononylon 5-0, Ethicon[®]).

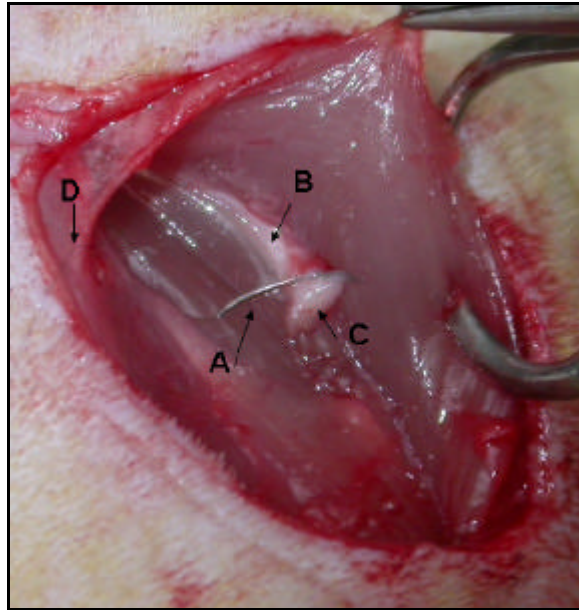


Figura 15. Foto da anastomose do nervo ciático. Observar em: **A)** Agulha não-traumática; **B)** Coto distal; **C)** Coto proximal; **D)** Fio de sutura.

Em seguida o animal recebeu uma única dose de antibiótico (Penicilina) para profilaxia de infecções. Para a analgesia pós-cirúrgica foi utilizada a droga Fentanil[®] por via intraperitoneal (IP) (PRIVADO et al., 2004) a uma dose de 0,032 mg/Kg, de 12/12 horas, por dois dias consecutivos após a lesão.

4.3 Aplicação do Diodo Laser

Foi utilizado o diodo laser de Arsenieto de Gálio e Alumínio (GaAlAs) da marca KLD[®] modelo Endophoton[®], potência de 26,3 mW, área do feixe de 0,63 cm² e comprimento de onda de 660 nm. A intensidade do equipamento foi aferida previamente ao experimento com o auxílio do medidor de potência (2-Watt Broadband Power/Energy Meter, Modelo 13 PEM 001/J, Holanda).

A forma de aplicação utilizada foi a transcutânea pontual, com densidade de energia determinada em 4 J/cm², densidade de potência de 0,0413 W/cm² e tempo de aplicação de 96,7 segundos. Foram aplicados 3 pontos sobre a incisão cirúrgica: um ponto em cada extremidade e

outro no centro (Figura 16). A aplicação foi iniciada no primeiro dia pós-operatório e durante os 20 dias consecutivos sobre a região da lesão no grupo experimental 2.

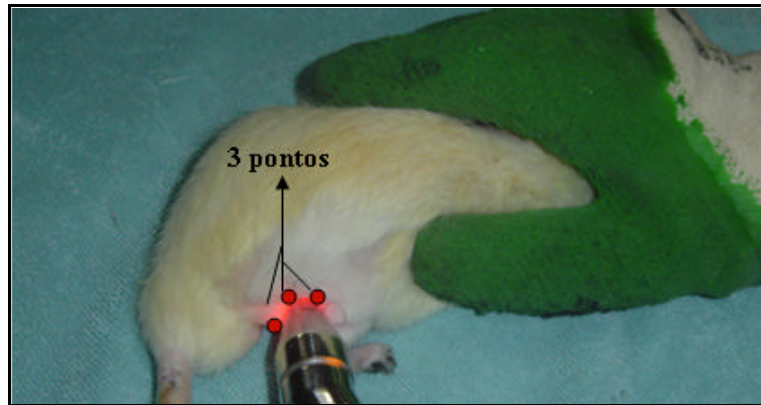


Figura 16. Aplicação da laserterapia sobre a lesão do nervo ciático com auxílio de luva de borracha para contenção do animal.

Os animais do grupo 1 foram submetidos ao mesmo procedimento sem que houvesse a irradiação a laser.

4.4 Análise Funcional

As impressões das pegadas dos animais foram obtidas, através do emprego de tiras de papel milimetrados acopladas em uma passarela de marcha construída com madeira (5 x 7 x 42 cm) de acordo com proposta de Dijkstra et al. (2000), esta passarela possuía uma casinhola no final, onde o animal procurava se abrigar após percorrer todo o comprimento.

Após o treino de marcha inicial (5 minutos), as patas traseiras dos animais foram pintadas com tinta nanquim e os animais foram colocados cuidadosamente na passarela obtendo-se assim o registro e impressão das pegadas (Figura 17). As tiras eram deixadas a secar e estocadas em embalagens de plástico, para evitar o contato com umidade. Após a formação das imagens das patas dos ratos, foram realizadas as medidas do Índice Funcional do Ciático (IFC).

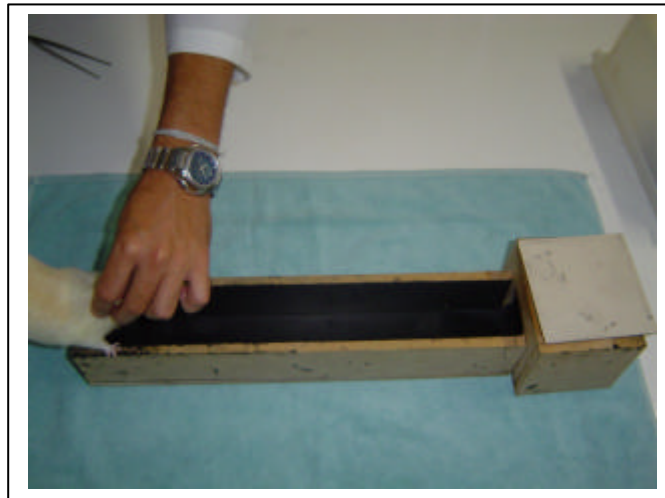


Figura 17. Passarela de madeira (5 x 7 x 42 cm) para realização da marcha utilizada para a coleta do IFC.

As impressões das pegadas foram obtidas antes da cirurgia e após 7, 14 e 21 dias da lesão inicial. Os valores de comprimento de pegada (PL), espalhar total dos dedos (ITS) e o espalhar dos dedos intermediário (IT) foram mensurados pelo mesmo examinador utilizando uma régua (Figura 18).

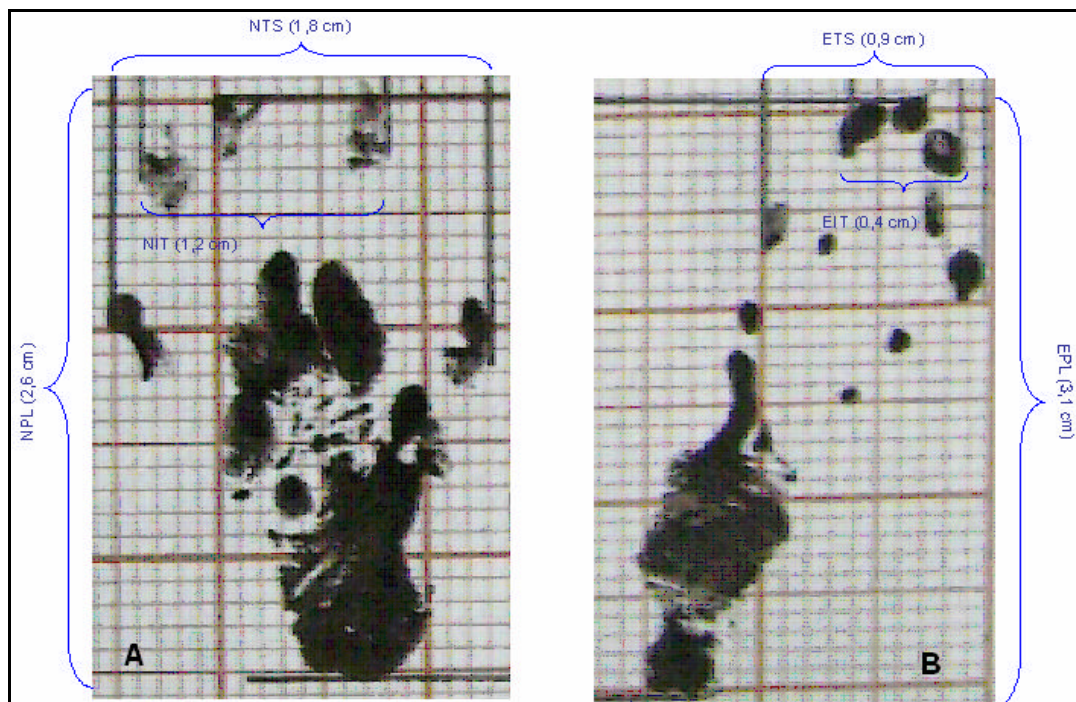


Figura 18. Demonstração dos valores para o cálculo do IFC. Observar em: **A**) pata normal e **B**) membro lesionado.

O pesquisador não tinha conhecimento de qual grupo pertencia cada animal durante a coleta do IFC.

4.5 Obtenção das Amostras e Análise histológica

A região lesionada dos animais foi acompanhada diariamente através avaliação clínica, observando-se: edema, exsudato, secreção purulenta, presença de sutura, deiscência. O avaliador não tinha conhecimento de qual grupo pertencia cada animal durante as análises. Foi realizada administração de pré-anestésico Butorfanol (Turbogestic, 2mg/kg) associado à Acepromazina (Acepran, 1mg/kg) ambos administrados em dose única via intramuscular. Após 15 minutos foram administrados Zolazepan e Tiletamina (Zoletil 50, 40mg/kg) e sacrificados com dose letal de cloreto de potássio (KCl, 0,4ml/100g de peso) via intra-cardíaca. Após o sacrifício dos animais, no 21º dia pós-operatório, foram empregadas análises histomorfométricas dos nervos ciáticos.

Antes da retirada do material de análise, este foi embebido com solução de glutaraldeído a 25% em cacodilato de sódio a 0,025M, por dois minutos para a pré-fixação. Em seguida, foram removidos e mergulhados na mesma solução supramencionada, onde permaneceram por 12 horas, em geladeira a 6°C para a fixação.

Após este período foi feita a pós-fixação do segmento com tetróxido de ósmio a 2%, acrescido de cacodilato de sódio a 0,2% por um período de 8 horas. 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 48h a 60°, em estufa.

Obtidos os blocos, foram realizados os cortes finos (2,0 µm de espessura) sendo analisados em microscópio de luz. A captura e armazenamento das imagens das fibras nervosas

foram realizados com microscópio óptico (Leica[®] Slandasd), acoplado a uma câmera de CCD. Foram capturadas imagens para análise morfométrica, sendo realizada pelo programa computacional Leica Q-Win[®].

4.6 Análise Histomorfométrica

A análise histomorfométrica foi realizada com o auxílio do programa *Image Pro Plus* (versão 4.5.0.29). Cada animal forneceu uma lâmina, onde cada amostra foi fotografada em cinco quadrantes, sendo quatro periféricas e uma central (Figura 19). Em cada quadrante, selecionou-se uma área retangular de 350 x 350 µm e a partir desta área foi realizada a contagem da área total de bainha de mielina.

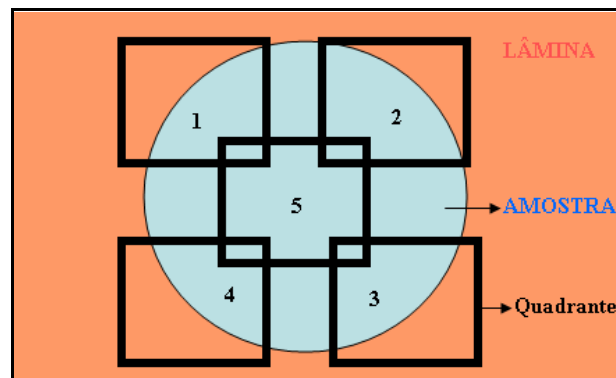


Figura 19. Figura esquemática da lâmina e as regiões dos 5 quadrantes avaliados histomorfometricamente.

Os passos para a análise foram: a) carregar a figura a ser analisada no programa *Image Pro Plus*; b) selecionar o quadrante conforme ilustrado na figura acima; c) selecionar a ferramenta *perform segmentation*; d) abrindo o histograma básico, foi padronizado o valor de coloração de 150; e) abriu-se a ferramenta *count and measure objects*; f) entrou-se na ferramenta *measures-select measurements*, utilizando como filtro a área de bainha de mielina; g) fechou-se a ferramenta *perform segmentation*; h) prosseguiu-se com a contagem (*count*); i) selecionou-se

novamente *measure*, *auto-classification*, j) seleccionou-se a opção *view* e *statistics*, k) finalmente observou-se o valor médio da área de bainha de mielina (Figuras 20 e 21).

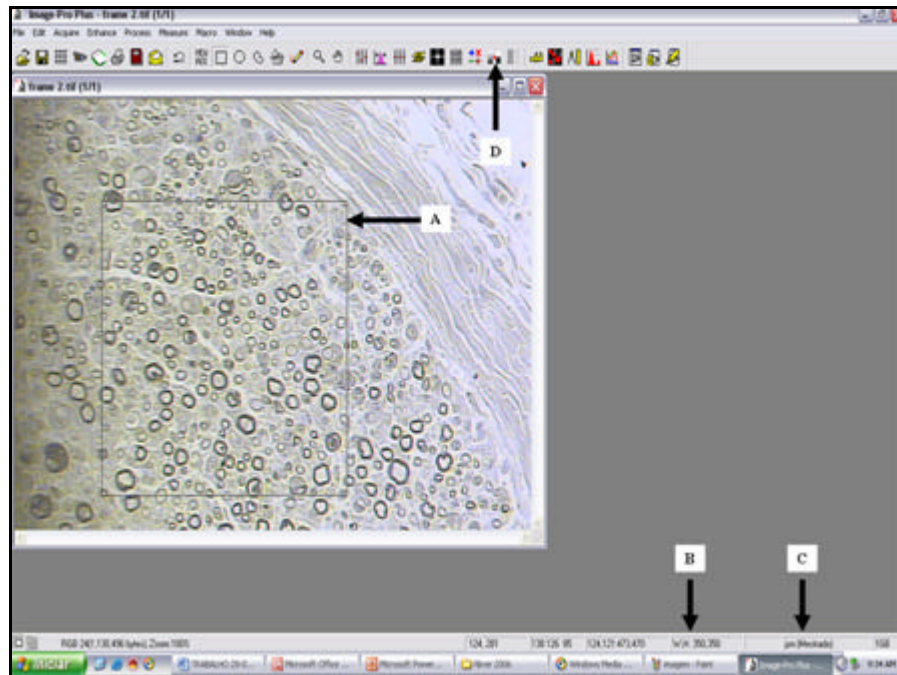


Figura 20. Imagem ilustrativa do programa Image-Pro Plus. Notar em: A) quadrante; B) 350 x 350; C) medida em μm e D) ferramenta *perform segmentation*.

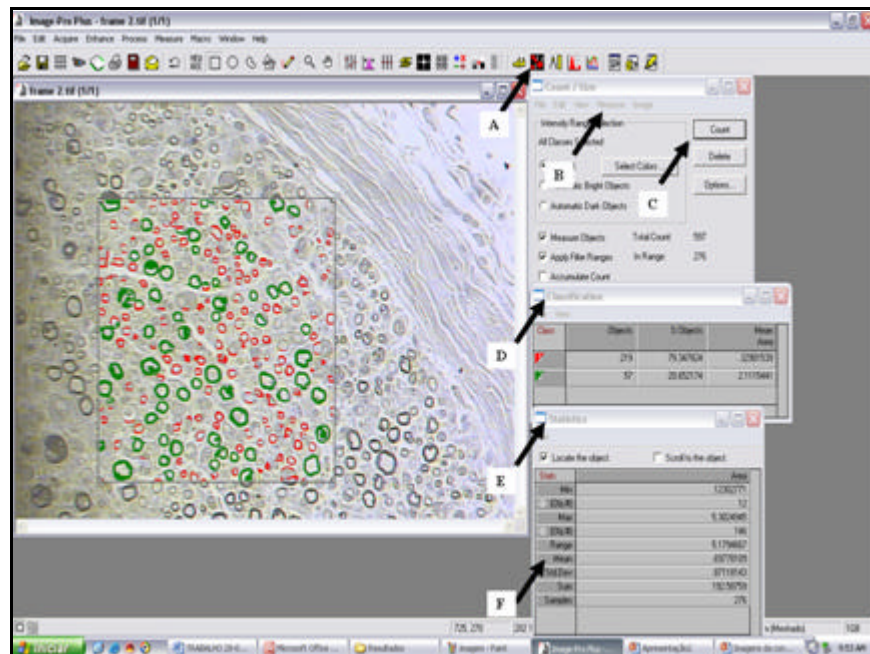


Figura 21. Imagem ilustrativa do programa Image-Pro Plus. Notar em: A) ferramenta *count and measure objects*; B) *Measure*; C) *Count*; D) *Auto-classification*; E) *Statistics*; F) Mean (média dos valores).

4.7 Análise Estatística

Os dados coletados através do índice funcional do ciático foram submetidos ao tratamento estatístico, com auxílio do programa Bioestat 3.0, para determinação do coeficiente de variação e aplicou-se para tanto a Análise de variância (ANOVA one way). Aplicou-se o teste de Comparação Múltipla *Bonferroni*. Também foi utilizado o teste *t* de *Student* não-pareado (*t test*) para a verificação da ação da laserterapia sobre a regeneração do tecido nervoso periférico, assim como análises comparativas entre os grupos do estudo. Adotou-se como nível de significância 5% ($p < 0,05$) para ambos os testes.

5. RESULTADOS

5.1 Índice Funcional do Ciático

O IFC no grupo 1 (controle) foi em média de $-35,9 (\pm 48,0)$ nos valores coletados pré-lesão, $-88,8 (\pm 23,2)$ no 7º dia de pós-operatório, $-101,9 (\pm 25,9)$ no 14º dia de pós-operatório e de $-98,3 (\pm 34,3)$ no 21º dia de pós-operatório. No grupo 2 (laser) obtiveram-se média de $-7,3 (\pm 18,3)$ para valores coletados pré-lesão, $-98,2 (\pm 18,7)$ no 7º dia de pós-operatório, $-87,4 (\pm 9,1)$ no 14º dia de pós-operatório e $-79,0 (\pm 11,2)$ no 21º dia de pós-operatório (Apêndice A).

A análise de variância no grupo controle entre os diferentes dias de coleta do IFC demonstrou que apenas os valores da pré-lesão eram estatisticamente significantes quando comparado com os demais dias ($p < 0,01$) (Apêndice A).

No grupo 2 (laser) os valores entre pré-lesão comparados com o 7º, 14º e 21º dias de pós-operatório apresentaram diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,001$). Porém, não houve diferença entre o 7º e 14º, 14º e 21º dias de pós-operatório ($p > 0,05$) (Apêndice A).

Fazendo a comparação entre os dois grupos experimentais (Controle X Laser) notou-se que não houve diferença significativa nos valores entre os quatro períodos de avaliação ($p > 0,05$) (Gráfico 1).

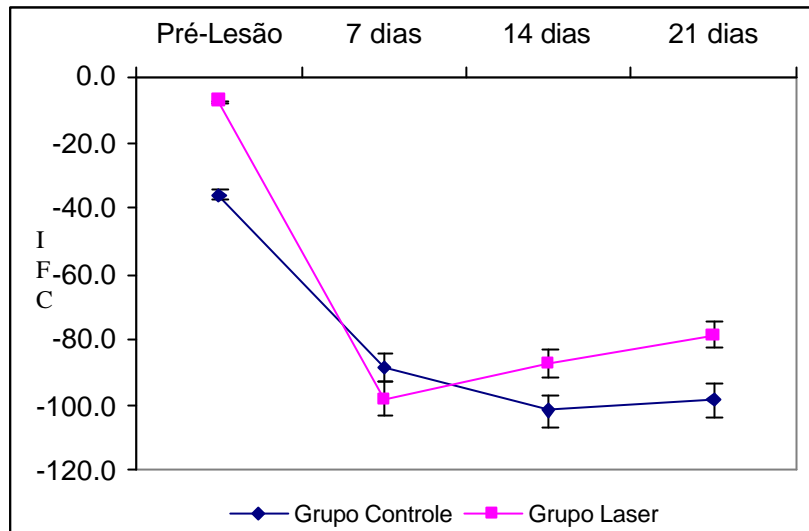


Gráfico 1. Comparação dos valores médios e respectivos desvios padrão do IFC entre grupo 1 (controle) e grupo 2 (laser) nos quatro períodos de avaliação.

5.2 Análise Histomorfométrica

No grupo 1 (controle), o número médio da área de bainha de mielina (Figura 22) nos 5 quadrantes analisados, após 21 dias de pós-operatório, foi de 0,51 ($\pm 0,11$) e no grupo 2 (laser) este valor foi de 1,31 ($\pm 0,22$) (Apêndices B e C).

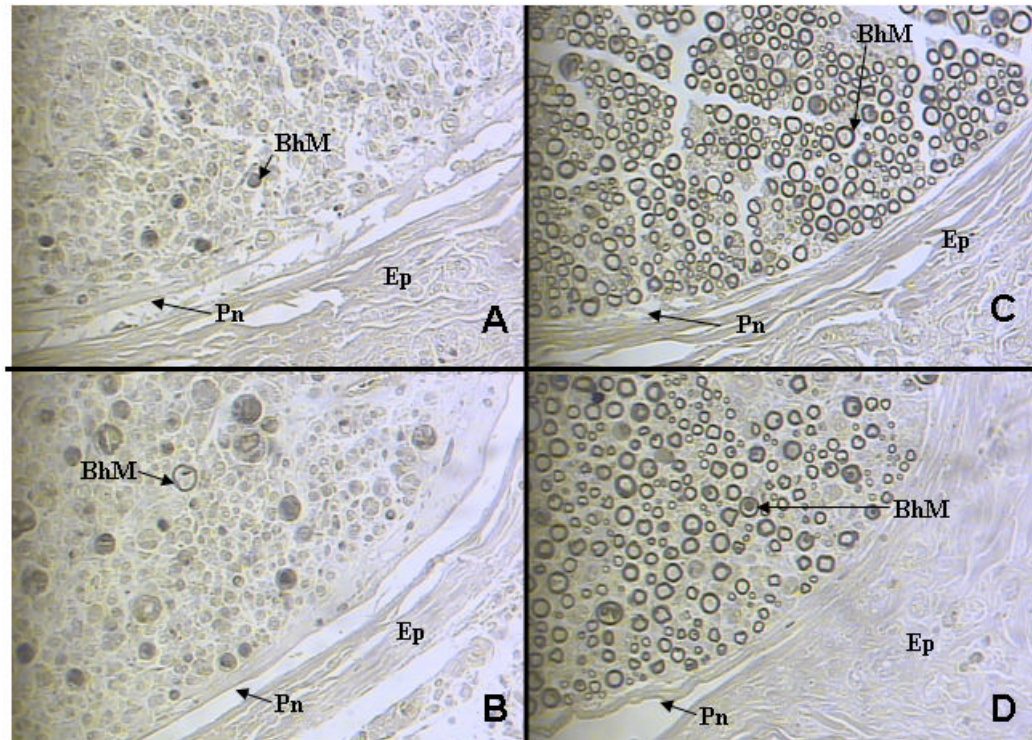


Figura 22. Montagem de Fotomicrografias do terceiro quadrante, onde **A-B** correspondem ao grupo 1 e **C-D** grupo 2. Observar: epineuro (**Ep**); perineuro (**Pn**); Bainha de mielina (**BhM**).

Após este procedimento, com as médias e desvios padrões das áreas de bainhas de mielina obtidos nos dois grupos experimentais (controle e laser) aplicou-se o teste t de student com nível de significância estabelecido em 5 %, obtendo-se o valor de $p=0,07$, isto é, valor não significativo entre os valores médios de área das bainhas de mielina entre os grupos 1 e 2 (Tabela 4).

Tabela 4. Teste t de student entre os grupos experimentais .

Grupos	Controle	Laser
<i>Média</i>	0.5100	1.310
<i>Amostra</i>	6	6
<i>Desvio Padrão</i>	0.1100	0.2200
<i>Erro</i>	0.04491	0.08981
Valor de p	0.0772 *	0.0772 *

* $p > 0,05$

6. DISCUSSÃO

Este estudo objetivou avaliar se o diodo laser (AsGaAl) com 660 nm influenciava na regeneração do nervo ciático de ratos submetidos a lesão por transecção completa e seguido de anastomose epineural, avaliando por meio do Índice Funcional do Ciático e da histomorfometria.

Há evidências, em pesquisas clínicas e experimentais recentes, que os efeitos do laser foram de aumentar a função do nervo, diminuir a formação de feridas, elevar o metabolismo dos neurônios e aumentar a capacidade de produção da mielina. Pelo fato da laserterapia não ser invasiva, a habilidade de irradiar nervos lesionados sem intervenções cirúrgicas é proveitosa.

Miloro et al. (2002) investigaram os efeitos da fototerapia pós-operatória nos nervos alveolares inferiores de coelhos reparados com tubos Gore-Tex. Os resultados demonstraram que a fototerapia pode promover a regeneração neural ao longo dos tubos sintéticos usados como pontes sobre o defeito no nervo. Os nervos alveolares foram lesionados e reparados bilateralmente, onde apenas um lado recebeu irradiação transcutânea com 820-830 nm com densidade de energia de 6 J/cm^2 por 4 dias consecutivos, iniciando no primeiro pós-operatório, seguido por 6 sessões adicionais de irradiação, uma por semana. Os resultados da investigação morfológica dos nervos reparados demonstram aumento na densidade da fibra nervosa no grupo tratado em comparação com o não tratado.

Khullar et al. (1995) ao avaliarem o efeito do laser AsGaAl (820 nm, 70 mW, 6 J por ponto, total de 48 J/cm^2) em nervos ciáticos de ratos submetidos à axoniotmese verificaram ação benéfica nas avaliações funcionais e eletrofisiológicas enquanto que a histológica não demonstrou resultado significante.

Apesar de muitos estudos relatarem os efeitos positivos da irradiação com LBP na regeneração da pele, diminuição da dor e intensificação da regeneração nervosa, existem muitas controvérsias sobre os benefícios terapêuticos do laser (MILORO et al., 2002).

Gift (1996) apud Miloro et al. (2002) examinou cultura de células in vitro, estimulando a regeneração com o laser e não apresentou resultados estatisticamente significantes, apenas um aumento na densidade das células foi observado.

O rato foi escolhido como animal de experimentação pela facilidade de aquisição, manuseio e também pelo baixo custo operacional. Além destes fatores, a similaridade de distribuição dos troncos nervosos com os humanos e a adequada característica anatômica para procedimentos cirúrgicos facilitou a escolha deste animal (RODRÍGUEZ; VALERO-CABRÉ; NAVARRO, 2004).

As patologias que afetam o nervo ciático são muito comuns na prática clínica, tais como: hérnia de disco, estenose do canal medular, síndrome do piriforme, porém lesões isoladas do nervo ciático como a neurotmeose são muito raras, portanto este modelo provê um banco de teste para lesões que envolvam nervos pluri-fasciculares com axônios de tamanhos e tipos diferentes competindo no alcance dos tubos endoneurais distais e alvos de re-inervação (RODRÍGUEZ; VALERO-CABRÉ; NAVARRO, 2004).

Endo (2002) afirmou que a lesão por transecção completa introduz uma série de variáveis de difícil controle e padronização, porém não encontramos muitas dificuldades no presente estudo, visto que a lesão foi padronizada em todos os animais de ambos os grupos experimentais e a técnica microcirúrgica foi realizada por um profissional com experiência e treinamento especializado.

A lesão por transecção completa foi preferida a uma lesão por esmagamento, por exemplo, pois a lesão por esmagamento preserva a estrutura de sustentação do nervo, visto que os tubos neurais estão em continuidade, facilitando assim a regeneração, e o principal objetivo deste estudo era de verificar se o laser influenciava na regeneração nervosa, sem qualquer interferência, isto é, sem ajuda. Outro fato importante na escolha deste tipo de lesão é pela escassez de

trabalhos que utilizam o laser na lesão por transecção, justificando a realização de estudos que elucidem os mecanismos de ação da laserterapia neste tipo de lesão.

Em um dos poucos estudos, Shamir et al. (2001) demonstraram que a laserterapia pós-operatória foi efetiva para promover a regeneração em casos de transecção completa do nervo seguida por reparo cirúrgico. Este estudo duplo-cego randomizado avaliou a regeneração do nervo ciático de ratos transeccionados e suturados (*end-to-end*) com a aplicação da fototerapia. Um comprimento de onda de 780 nm foi aplicado transcutâneamente por 30 minutos diariamente por 21 dias consecutivos no segmento correspondente da raiz espinhal e no nervo lesionado. Respostas somato-sensórias positivas foram encontradas em 69% dos ratos irradiados e em 18% dos não irradiados. Uma análise histoquímica do grupo tratado com laser demonstrou um crescimento axonal mais intenso e melhor qualidade do processo de regeneração, assim como o aumento no diâmetro dos axônios. Estes resultados sugerem que a fototerapia acelera o processo de regeneração dos nervos periféricos após a transecção completa e anastomose cirúrgica, podendo servir como um tratamento complementar.

Geuna et al. (2003) e Gigo-Benato et al. (2004) encontraram efeitos positivos na regeneração nervosa administrando fototerapia nos nervos medianos de ratos reparados pela técnica término-lateral (*end-to-side*) de anastomose. Os animais operados receberam a fototerapia 3 vezes por semana durante 3 semanas, iniciando no primeiro dia pós-operatório, comparando com os outros animais operados que receberam um tratamento placebo (com o aparelho desligado). Os lasers de 808 e 905 nm usados para a bioestimulação transcutânea tinham densidades de energia entre 29 J/cm^2 e 40 J/cm^2 respectivamente. Os resultados deste estudo duplo-cego mostraram que a fototerapia induz à significativa rapidez de mielinização das fibras nervosas regeneradas e recuperação da massa muscular, resultando significativamente rápido da função em comparação com o grupo controle.

Chen et al. (2005) relataram a ocorrência de um efeito supressivo na emissão de 904 nm do laser pulsado (com média de densidade de energia de 2,33 a 15,5 J/cm²) na regeneração do nervo ciático de ratos ao longo de tubos de borracha de silicone usados como ponte por 10 mm de espaço (*GAP*). Os resultados negativos deste estudo são difíceis para interpretar, pois que foram obtidos num modelo experimental com diferentes aspectos: 1) o uso de uma borracha de silicone como guia para os nervos pode ter interferido na luz; 2) a utilização de uma alta frequência (5 a 20 kHz) de irradiação pulsada; 3) o início da fototerapia 1 semana após a cirurgia e 4) a estimulação prolongada por 2 meses.

Uma diversidade de modalidades cirúrgicas tem sido utilizada no reparo dos nervos periféricos, incluindo o reparo epineural, perineural, enxertos autógenos, enxertos de veias e entubulação, com ou sem fatores neurotróficos associados (DE SÁ et al., 2004; KAYKÇIOĞLU et al., 2004). Adotou-se a técnica de anastomose epineural simples pela facilidade de execução e por ter demonstrado alta resistência biomecânica à tração, conforme Temple et al. (2004).

O laser de He-Ne (632,8 nm) na região de emissão vermelha do espectro eletromagnético era o comprimento de onda mais estudado em biomodulação da resposta biológica em processo de reparação (ROCHKIND et al., 1986; ROCHKIND et al., 1988; ANDERS et al., 1993; SOTELO et al., 1996; ROCHKIND et al., 2001; SCHWARTZ et al., 2002; SNYDER et al., 2002). Atualmente outros comprimentos de onda estão sendo desenvolvidos e pesquisados, como os lasers emitindo em 650-830 nm (AsGaAl) (KHULLAR et al., 1995; KHULLAR et al., 1999; WALSH; BAXTER; ALLEN, 2000; SHAMIR et al.; 2001; MILORO et al., 2002; SHIN et al., 2003; GIGO-BENATO et al., 2004; NICOLAU, et al., 2004; BYRNES et al., 2005) e o de 904 nm (AsGa) (BAGIS et al., 2002; BAGIS et al. 2003; GIGO-BENATO et al., 2004).

Adotou-se o laser de AsGaAl com 660 nm por ser de baixa potência e com comprimento de onda muito utilizado na prática clínica, além disso, este comprimento de onda não possui

números expressivos de estudos prévios sobre seus efeitos na regeneração nervosa periférica (SHIN et al., 2003; NICOLAU et al., 2004).

Na prática clínica, a laserterapia emprega densidades de energia de 1 a 4 J/cm², associado com potência entre 10 a 90 mW sendo amplamente utilizada em diversas lesões músculo-esqueléticas, assim como em processos álgicos e inflamatórios (BASFOR, 1995). Baseado neste fato justificou-se a densidade de 4 J/cm² nesta pesquisa, sendo importante salientar que este parâmetro é extremamente variável nas pesquisas de laserterapia em regeneração nervosa.

A utilização do LBP como método terapêutico ainda possui contradições e seu efeito biomodulador sobre os nervos periféricos ainda está obscuro, pois alguns estudos apresentam resultados positivos (ROCHKIND et al., 1988; ROCHKIND et al., 1986; ANDERS et al., 1993; KHULLAR et al., 1995; SOTELO et al., 1996; KHULLAR et al., 1999; ROCHKIND et al., 2001; SHAMIR et al., 2001; SCHWARTZ et al., 2002; SNYDER et al., 2002; MILORO et al., 2002; SHIN et al., 2003; GIGO-BENATO et al., 2004; BYRNES et al., 2005) enquanto outros indicam que o laser não exerce qualquer influência sobre os nervos periféricos (CHELYSHEV; KUBITSKII; PLAKSEICHUK, 1996; BAGIS et al., 2002; BAGIS et al., 2003; NICOLAU et al., 2004). Muitas destas pesquisas não foram claras, deixando de descrever parâmetros necessários como dose, potência média do aparelho, tempo de aplicação, área do feixe e modo de aplicação, promovendo a difícil compreensão metodológica para a reprodução dos resultados e dificuldades comparativas entre os estudos.

Os valores obtidos neste trabalho, quanto ao IFC, demonstram que após a lesão nervosa por transecção completa, ocorreu uma perda funcional severa nos dois grupos experimentais no 7º dia pós-operatório, porém no grupo controle o índice de função reduziu ainda mais no 14º e 21º dia enquanto que neste período, o grupo laser apresentava melhora funcional comparado ao 7º dia, apesar da análise estatística não demonstrar resultados significativos entre os grupos.

A lesão do nervo ciático implica em perdas funcionais em relação ao padrão da marcha devido à relação direta entre a distribuição e a contribuição das fibras de nervos espinhais que formam o nervo ciático conforme afirma Montoya et al. (2002).

Uma provável explicação para os baixos IFC do grupo irradiado no 7º dia pós-operatório pode ter-se dado pelo fato de nas primeiras horas após a ruptura do axônio, o corpo celular passa a apresentar alterações denominadas de cromatólise, caracterizada histologicamente por ingurgitamento da célula, degeneração da substância de Nissl (retículo endoplasmático rugoso do neurônio) e migração do núcleo do centro para a periferia, sendo que estas alterações visam à síntese de proteínas (actina e tubulina) relacionadas à regeneração do citoesqueleto do axônio, em detrimento da produção de neurotransmissores, estando relacionadas ao transporte intracelular e à movimentação do cone de crescimento (FERREIRA, 2001; DAHLIN, 2004; JOHNSON; ZOUBOS; SOUCACOS, 2005; MARTINS et al., 2005).

Provavelmente, o período de 7 dias após a lesão está marcado por estes eventos, mas a utilização da laserterapia dentro das 24 horas após a lesão, reduz a perda funcional imediata, demonstrando que a terapia deve ser iniciada neste período, corroborando com a afirmação de Dahlin (2004).

Após o 7º dia de pós-operatório, o grupo 2 (laser) apresentou uma linha de tendência positiva quanto à melhora da função, e esta linha só foi estabilizada e positiva no grupo 1 (controle) após o 14º dia. Porém esta linha foi mais acentuada e com melhores valores no grupo tratado com laser, conforme demonstrado no gráfico 1.

No 21º de pós-operatório observou-se que houve diferenças entre os IFC dos grupos laser e controle, porém sem diferença estatística. Entretanto, quando se analisa a evolução das curvas no gráfico 1, observa-se que os valores médios foram diferentes, demonstrando a provável continuidade da ação do laser sobre o nervo ciático, se houvesse maior tempo de avaliação.

Segundo De Medinacelli (1995), através da lesão por esmagamento (30 segundos) verificou-se que após 1 mês e meio a 2 meses da lesão a recuperação funcional nervosa alcança o seu platô apesar de não ocorrer nenhuma mudança significativa morfometricamente. Beau, Ellisman e Powell (1988) afirmaram que a mielinização das fibras regeneradas ocorrem entre 14 a 21 dias após a lesão. Todavia, mais estudos são necessários, com período de avaliação superior aos 21 dias de tratamento, ou até mesmo a 5 semanas.

Um fato importante a ser mencionado trata-se do nível funcional pré-lesão, notando-se que ambos os grupos, neste período de avaliação, não apresentaram diferença estatisticamente significativa, demonstrando homogeneidade da amostra da pesquisa.

Apesar de não haver significância estatística entre os grupos experimentais, quando se compara o IFC, pode-se observar que no grupo 2 (laser) não houve indícios de infecções e deiscências de pontos de sutura, apesar da análise macroscópica não ter sido um item da análise metodológica deste estudo. Outro fato observado, é que os animais deste grupo utilizavam constantemente o membro lesionado para se alimentar, ficando em apoio bipodal e até mesmo para se coçar, enquanto que no grupo controle houve formação de deiscências, tornando-se clara a dificuldade de cicatrização da lesão.

Durante a última década, grandes avanços têm ocorrido para tentar entender as interações da laserterapia com estruturas biológicas. Entretanto, os mecanismos de ação do LBP sobre a reparação neuronal não são esclarecidos. Um número variado de teorias têm sido criadas para explicar a ocorrência de mudanças nas estruturas biológicas pela laserterapia, como o aumento da síntese de ATP (GAGLIARDI; ATLANTE; PASSARELLA, 1997) ou na proliferação celular (KREISLER et al, 2003).

Há evidências de que a irradiação com laser em mitocôndrias isoladas induzia alterações positivas na homeostasia celular. Foi sugerido que alguns componentes da cadeia respiratória

(citocromos, flavinas, desidrogenase) que seriam fotoreceptores ou cromóforos primários, ou seja, capazes de absorver luz de determinado comprimento de onda, ativando a cadeia respiratória. Assim, resultaria no aumento da síntese de ATP, afetando os níveis de hidrogênio da célula, ativando outros íons transportados como sódio e potássio, além de alterarem o fluxo de cálcio entre as mitocôndrias e o citoplasma (MANTEIFEL; KARU, 2005). Este nível energético favorecido pela laserterapia poderia ter influenciado no processo estudado.

Em 1999, Karu confirmou a hipótese que o citocromo-c-oxidase, enzima terminal da cadeia respiratória, é um fotoreceptor da luz na região do vermelho. A absorção da luz por esta enzima aceleraria o transporte de elétrons na cadeia respiratória levando ao aumento do potencial elétrico trans-membrana da mitocôndria, ativando a síntese de ATP, conseqüentemente, o metabolismo celular (MANTEIFEL; KARU, 2005).

Rochkind e Quaknine (1992) relataram que os efeitos do LBP são dependentes da dose, pois baixas doses causam a regulação da oxirredução do metabolismo celular, e em altas ocorrem danos fotodinâmicos. Esta afirmação foi possível após analisarem diferentes comprimentos de ondas e doses de energia aplicadas sobre fibroblastos, verificando que a 630 nm obtinha-se maior número de mitoses em comparação a 360 nm e 780 nm, enquanto que o pico de mitoses era alcançado com dose de 15 J/cm², mas que acima de 60 J/cm² apresentavam redução da reprodução celular.

Klebanov et al. (2001) descrevem as porfirinas endógenas como absorvedoras da luz na parte vermelha do espectro eletromagnético, servindo como cromóforos da irradiação laser e atuando como fotosensibilizadores, induzindo reações de radicais livres (incluindo a peroxidação lipídica com formação predominante de hidroperóxido de ácidos e gorduras não saturados nos fosfolipídios) e que após a absorção do quantum de energia, leva ao aumento da permeabilidade iônica da membrana plasmática, em particular, dos íons cálcio em leucócitos, ativando processos

dependentes de Ca^{2+} e finalmente incrementaria o potencial funcional celular. Este processo é acompanhado pela reunião de NADPH-oxidases na membrana no estado ativo de espera e expressão de receptores de superfície.

A observação chave, isto é, a hipótese chave é de que a irradiação com laser de baixa potência induz a formação maciça de brotamentos e a protuberância das células neurais em cultura (WOLLMAN et al, 1998).

Outra hipótese é de que o laser estimula diretamente o brotamento axonal terminal *in vivo*, quando os axônios são transecionados ou brotamentos laterais em casos de suturas término-lateral (GIGO-BENATO et al, 2004). Um estudo recente de Shin et al (2003) proporcionou uma explicação molecular possível pela demonstração no aumento na imunoreatividade da proteína GAP-43 nos primeiros estágios de regeneração do nervo ciático após a laserterapia. Outro estudo de Snyder et al (2002) mostrou que a aplicação do laser (633 nm, 162 J/cm²) regulariza o peptídeo calcitonina (CGRP) expressão de RNAm no núcleo motor facial após neurotomia.

Uma hipótese fascinante é que a laserterapia pode servir de guia para o crescimento neuronal *in vitro*, talvez devido à interação com as proteínas citoplasmáticas, particularmente, intensificando a polimerização da actina na direção do final do axônio. Ao lado dos efeitos diretos de crescimento dos axônios, a demonstração experimental da irradiação laser pode estimular a proliferação de células de Schwann de ratos *in vitro*. Considerando que a presença de um número adequado de células de Schwann vivas é um fator chave para o sucesso da regeneração nervosa (GEUNA et al, 2003) a ação gliotrófica da fototerapia pode representar um indicador forte a favor do seu uso no reparo pós-traumático e pós-cirúrgico (GIGO-BENATO et al, 2004).

A utilização da passarela de marcha é um método de avaliação muito comum (DIJKSTRA et al., 2000; KOKA; HADLOCK, 2001; VAREJÃO et al., 2001) possuindo grande aplicabilidade nas pesquisas experimentais pela fácil execução e baixo custo do método.

Alguns estudos estão buscando a modernização desta coleta com a utilização de câmeras digitais tornando possível a avaliação dinâmica (DIJKSTRA et al., 2000). Porém, o propósito desta pesquisa encaixava-se na utilização do método convencional com a passarela de madeira e utilização de tinta nanquim.

De fato, neste trabalho não se observou os benefícios da laserterapia pela avaliação histomorfométrica. Foi possível observar sinais de franca recuperação dos nervos tratados com laser, em comparação com o grupo controle. Porém não se obteve resultados significativos pela análise estatística.

Segundo De Medinacelli (1995), através da lesão por esmagamento (30 segundos) verifica-se que após 1 mês e meio a 2 meses da lesão a recuperação funcional nervosa alcança o seu platô apesar de não ocorrer nenhuma mudança significativa morfometricamente, o que justifica o resultado histomorfométrico não significativo neste trabalho que utilizou um tempo de avaliação de 21 dias.

Beau, Ellisman e Powell (1988) afirmavam que a mielinização das fibras regeneradas ocorrem entre 14 a 21 dias após a lesão, porém o tipo de lesão utilizada foi a neurotmeze.

Rummler, Dinh e Gupta (2004) relataram que há indução da proliferação das células de Schwann e apoptose, com uma mínima patologia axonal detectável sendo que as células de Schwann aumentam em 6 envoltórios dentro de 4 semanas de lesão e o número destas células decai com o tempo, mas ainda mantém-se mais alto que o normal. Porém, o aumento da área de bainha de mielina não foi detectável nesta pesquisa, talvez pelo período compreendido de 3 semanas.

Entretanto, nenhuma morfometria ou eletrofisiologia pode mensurar o mais importante, isto é, a função, provavelmente devido à proporção de fibras regeneradas que alcançam apropriadamente seu alvo. Assim, a análise morfométrica, após lesões traumáticas experimentais, provê uma imagem confiável das condições tróficas nos nervos regenerados, mas não auxiliam o entendimento da função (DE MEDINACELLI, 1995).

7. CONCLUSÃO

Este estudo pôde demonstrar os benefícios da utilização do LBP no processo de regeneração nervosa periférica, como os altos valores do IFC e a ausência de infecções e melhora da cicatrização das lesões. Porém a utilização do LBP Arsenieto de Gálio e Alumínio (660 nm) não trouxe mudanças significativas quanto a área da bainha de mielina avaliada histomorfometricamente em nervo ciático de ratos após lesão por neurotmese seguida de anastomose epineural.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, A.A.N.; WEI, T.H.; ZUMIOTTI, A.V. Avaliação dos gangliosídeos na regeneração nervosa de ratos. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 37, n. 1/ 2, p. 39-44, 2002.
- ADALBERT, R.; GILLINGWATER, T.H.; HALEY, J.E.; BRIDGE, K.; BEIROWSKI, B.; BEREK, L.; WAGNER, D.; GRUMME, D.; THOMSON, D.; CELIK, A.; ADDICKS, K.; RIBCHESTER, R.R.; COLEMAN, M.P. A rat model of slow wallerian degeneration (Wld`s) with improved preservation of neuromuscular synapses. **European Journal of Neuroscience**, v. 21, p. 271-277, 2005.
- AIGNER, L.; CARONI, R. Absence of persistent spreading branchiog and adhesion in Gap-43-depleted growth cones. **Journal Cellular Biology**, v. 128, p. 647-660, 1995.
- AKASSOGLU, K.; YU, W.M.; AKPINAR, P. Fibrin inhibits peripheral nerve remyelination by regulating Schwann cell differentiation. **Neuron**, v. 33, p. 861-875, 2002.
- ALMEIDA, E.M.P.; NUNES, N.; FANTINATTI, A.P.; SANTOS, P.S.P.; BOLZAN, A.A.; REZENDE, M.L. Efeitos cardiorrespiratórios da associação de tiletamina/zolazepam em cães (*Canis familiaris*) pré-tratados ou não pela acepromazina. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n. 3, p. 45-51, 2000.
- ALMEIDA-LOPES, L.; RIGAU, J.; ZÂNGARO, R.A.; GUIDUGLI-NETO, J.; JAEGER, M.M.M. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. **Laser in Surgery and Medicine**, v. 29, p. 179-184, 2001.
- ANDERS, J. J.; BORKE, R. C.; WOOLERY, S. K.; MERWE, W. P. V. Low power laser irradiation alters the rate of regeneration of the facial nerve. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 13, p. 72-182, 1993.
- BAGIS, S.; COMELEKOGLU, U.; COSKUN, B.; MILCAN, A.; BUYUKAKILLI, B.; SAHIN, G.; OZISIK, S.; ERDOGAN, C. No effect of GA-AS (904 nm) laser irradiation on the intact skin of the injured rat sciatic nerve. **Lasers in Medical Science**, v. 18, n. 2, p. 83-88, 2003.
- BAGIS, S.; COMELEKOGLU, U.; SAHIN, G.; BUYUKAKILLI, B.; ERDOGAN, C.; KANIK, A. Acute electrophysiologic effect of pulsed gallium-arsenide low energy laser irradiation on configuration of compound nerve action potential and nerve excitability. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 30, p. 376-380, 2002.
- BASFORD, J.R. Low intensity laser therapy: still not an established clinical tool. **Laser in Surgery and Medicine**, v. 16, p. 331-342, 1995.
- BAXTER, D. Laserterapia de Baixa Intensidade. In: KITCHEN, S.; BAZIN, S. **Eletroterapia de Clayton** 10 ed. São Paulo: Manole, 1998. p. 191-210.

- BEAU, J.M.L.; ELLISMAN, M.H.; POWELL, H.C. Ultrastructural and morphometric analysis of long-term peripheral nerve regeneration through silicone tubes. **Journal of Neurocytology**, v. 17, p. 161-172, 1988.
- BELKAS, J.S.; SCHOICHET, M.S.; MIDHA, R. Axonal guidance channels in peripheral nerve regeneration. **Operative Techniques in Orthopaedics**, n. 14, p. 190-198, 2004.
- BONTIOTI, E.; KANJE, M.; LUNDBORG, G.; DAHLIN, L.B. End-to-side nerve repair in the upper extremity of rat. **Journal of Peripheral Nervous System** v. 10, p. 58-68, 2005.
- BROWN, M.C.; PERRY, V.H.; LUNN, E.R.; GORDON, S.; HEUMANN, R. Macrophage dependence of peripheral sensory nerve regeneration: possible involvement of nerve growth factor. **Neuron**, v. 6, p. 359-370, 1991.
- BUNTING, S.; DI SILVIO, L.; DEB, S.; HALL, S. Bioresorbable glass fibres facilitate peripheral nerve regeneration. **Journal of Hand Surgery**, article in press, 2006.
- BYRNES, K.R.; WAYNANT, R.W.; ILEV, I.K.; WU, X.; BARNA, L. SMITH K.; HECKERT, R.; GERST, H.; ANDERS, J.J. Light promotes regeneration and functional recovery and alters the immune response after spinal cord injury. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 9999, p. 1-15, 2005.
- CHANG, C.J.; HSU, S.H. The effects of low intensity ultrasound on peripheral nerve regeneration in poly (DL-lactic acid-co-glycolic acid) conduits seeded with Schwann cells. **Ultrasound in Medicine & Biology**. v. 30, n. 8, p. 1079-1084, 2004.
- CHELYSHEV, I.A.; KUBITSKII, A.A.; PLAKSEICHUK, A. Regeneratsiia nervnykh volokon pri obluchenii nizkointensivnymi lazerami. **Morfologija**, v. 110, n. 5, p. 47-50, 1996.
- CHEN, Y.; HSU, S.F.; CHIU, C.W.; LIN, J. G.; CHEN, C.T.; YAO, C.H. Effect of lower pulsed laser on peripheral nerve regeneration in rats. **Microsurgery**, v. 25, p. 83-89, 2005.
- COTTON, A.M. A review of the principles and use of lasers in lower limb problems. **Lower Extremity Wounds**, v. 3, n. 3, p. 133-142, 2004.
- DAHLIN, L.B. The biology of nerve injury and repair. **Journal of the American Society for Surgery of the Hand**, v. 4, n. 3, p. 143-155, 2004.
- DE MEDINACELI, L. Interpreting nerve morphometry data after experimental traumatic lesions. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 58, p. 29-37, 1995.
- DE MEDINACELLI, L.; FREED, W.J.; WAYTT, R.J. An index of the functional conduction of the rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. **Experimental Neurology**, n. 77, p. 6634-6643, 1982.
- DE SÁ, J.M.R.; MAZZER, N.; BARBIERI, C.H.; BARREIRA, A.A. The end-to-side peripheral nerve repair Functional and morphometric study using the peroneal nerve of rats. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 136, p. 45-53, 2004.

DIJKSTRA, J.R.; MEEK, M.F.; ROBINSON, P.H.; GRAMSBERGEN, A. Methods to evaluate functional nerve recovery in adult rats: walking track analysis, video analysis and the withdrawal reflex. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 96, p. 89-96, 2000.

ENDO, C. **Estudo dos efeitos do tratamento com laser num modelo experimental de lesão nervosa por esmagamento do nervo ciático em ratos**. 2002. 70 f. Tese (Mestrado em Bioengenharia) Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.

FENRICH, K.; GORDON, T. Canadian association of Neuroscience review: axonal regeneration the peripheral and central nervous systems – current issues and advances. **Canada Journal Neurologic Science**, v. 31, p. 142-156, 2004.

FERREIRA, A.S. **Lesões nervosas periféricas: diagnóstico e tratamento**. 2 ed., São Paulo: Editora Santos, 2001. p. 1-9.

GAGLIARDI, S.; ATLANTE, A.; PASSARELLA, S. A novel property of adenine nucleotides: sensitivity to helium-neon laser in mitochondrial reactions. **Biochemical Molecular Biology International** v. 41, p. 449-460, 1997.

GEDDIS, M.S.; REHDER, V. Initial stages of neural regeneration in *Helisoma trivolvis* are dependent upon PLA2 activity. **Journal of Neurobiology**, v. 54, p. 555-565, 2003.

GEORGE, E.B.; GLASS, J.D.; GRIFFIN, J.W. Axotomy-induced axonal degeneration is mediated by calcium influx through ion-specific channels. **Journal of Neurobiology**, v. 15, p. 6445-6452, 1995.

GEUNA, S.; RAIMONDO, S.; NICOLINO, S.; BOUX, E.; FORNARO, M.; TOS, P.; BATTISTON, B.; PERROTEAU, I. Schwann-cell proliferation in muscle-vein combined conduits for bridging rat sciatic nerve defects. **Journal of Reconstructive Microsurgery**, v. 29, n. 2, p. 119-123, 2003.

GIFT, J.J. Low Level laser irradiation of nerve cells in vitro [Master's Thesis]. Columbus, Ohio: The Ohio State University, 1996. In: MILORO, M.; HALKIAS, L.E.; MALLERY, S.; TRAVERS, S.; RASHID, R.G.; NEB, O. Low-level laser effect on neural regeneration in Gore-Tex tubes. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology**, v. 93, n. 1, p. 27-34, 2002.

GIGO-BENATO, D.; GEUNA, S.; ROCHKIND, S. Phototherapy for enhancing peripheral nerve repair: a review of the literature. **Muscle Nerve**, v. 31, p. 694-701, 2005.

GIGO-BENATO, D.; GEUNA, S.; RODRIGUES, A.C.; FORNARO, P.T.M.; BOUX, E.; BATTISTON, B.; GIACOBINI-ROBECCHI, M.G. Low-power laser biostimulation enhances nerve repair after end-to-side neurorrhaphy: a double-blind randomized study in the rat median nerve model. **Laser in Medical Science**, v. 19, p. 57-65, 2004.

GRECCO, M.A.S.; LEITE, V.M.; ALBERTONI, W.M.; DOS SANTOS, J.B.G.; HIRAKAWA, C.K.; FALOPPA, F.; VALENTE, S.G. Estudo da regeneração nervosa em nervos tíbiais de ratos

- Wistar utilizando o Fluoro-Gold[®] como marcador neuronal. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 11, n. 4, p. 225-229, 2003.
- HAPPAK, W.; NEUMAYER, C.; HOLAK, G.; KUSBARI, R.; BURGGASSER, G.; GRUBER, H. Morphometric and functional results after CO2 laser welding of nerves coaptations. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 27, p. 66-72, 2000.
- HAYASHY, A.; YANAI, A.; KOMURO, Y.; NISHIDA, M.; INOUE, M.; SEKI, T. Collateral sprouting occurs following end-to-side neurotomy. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 114, n. 1, p. 129-137, 2004.
- HEUMANN, R.; KORSHING, S.; BANDTLOW, C.; THOENEN, H. Changes of nerve growth factor synthesis in non-neuronal cells in response to sciatic nerve transection. *Journal Cellular Biology*, v. 104, 1987. In: IDE, C. Peripheral nerve regeneration. **Neuroscience Research**, v. 25, p. 101-121, 1996.
- HIRATA, K.; KAWABUCHI, M. Myelin phagocytosis by macrophages and nonmacrophages during Wallerian degeneration. **Microscopy Research Technology**, v. 57, p. 541-547, 2002.
- IDE, C. Peripheral nerve regeneration. **Neuroscience Research**, v. 25, p. 101-121, 1996.
- JESSEN, K.R.; MIRSKY, R. Schwann cells and their precursors emerge as major regulators of nerve development. **Trends Neuroscience**, v. 22, p. 402-410, 1999.
- JESSEN, K.R.; MIRSKY, R. Signals that determine Schwann cell identity. **Journal Anatomy**, v. 200, p. 367-376, 2002.
- JOHNSON, E.O.; ZOUBOS, A.B.; SOUCACOS, P.N. Regeneration and repair of peripheral nerves. **International Care Injured**, v. 36, p. 24-29, 2005.
- JUNIOR, E.D.P.; VALMASEDA-CASTELLÓN, E.; GAY-ESCODA, C. Facial nerve repair with epineural suture and anastomosis using fibrin adhesive: an experimental study in the rabbit. **Journal Oral Maxillofacial Surgery**, v. 62, p. 1524-1529, 2004.
- KARU, T.I. Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. **IEEE Journal of Quantum Electronics**, n. 10, p. 1703-1719, 1987.
- KARU, T.I.; PYATIBRAT, L.V.; AFANASYEVA, N.I. Cellular effects of low power laser therapy can be mediated by nitric oxide. **Laser in Surgery and Medicine**, v. 36, p. 307-314, 2005.
- KARU, T.I.; PYATIBRAT, L.V.; KOLYAKOV, S.F.; AFANASYEVA, N.I. Absorption measurements of a cell monolayer relevant to phototherapy: reduction of cytochrome c oxidase under near IR radiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 81, p. 98-106, 2005.

- KAYIKÇIOĞLU, A.; KARAMÜRSEL, S.; DEMIRCI, M.; ERDEM, S.; KEÇİK, S. A new epineural nerve repair technique with external metallic circle. **Surgery Neurologic**, v. 62, p. 387-392, 2004.
- KHULLAR, S. M.; BRODIN, P.; FRISTAD, I. KVINNSLAND, I. H. Enhanced sensory reinnervation of dental target tissues in rats following low level laser (LLL) irradiation. **Lasers in Medicine and Science**, v. 14, p. 177-184, 1999.
- KHULLAR, S.M.; BRODIN, P.; MESSELT, E.B.; HAANAES, H.R. The effects of low level laser treatment on recovery of nerve conduction and motor function after compression injury in the rat sciatic nerve. **European Journal of Oral Sciences**, v. 103, p. 299-305, 1995.
- KIMURA, H.; KAWATANI, M.; ITO, E.; ISHIKAWA, K. PACAP facilitate the nerve regeneration factors in the facial nerve injury. **Regulatory Peptides**, v. 123, p. 135-138, 2004.
- KLEBANOV, G.I.; KREININA, M.V.; POLTANOV, E.A.; KHRISTOFOROVA, T.V.; VLADIMIROV, Y.A. Mechanism of therapeutics effect of low-intensity infrared laser irradiation. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 131, n. 3, p. 286-289, 2001.
- KOKA, R.; HADLOCK, T.A. Quantification of functional recovery following rat sciatic nerve transaction. **Experimental Neurology**, v. 168, p. 192-195, 2001.
- KOZHAKHMETOV, A.N. The evaluation of the adequacy of anesthesia during delivery. **Akush Ginekol**, v. 2, p. 36-39, 1993.
- KREISLER, M.; CHRISTOFFERS, A.B.; WILLERSHAUSEN, B.; d'HOEDT, B. Effect of GaAlAs laser irradiation on the proliferation rate of human periodontal ligament fibroblasts: an in vitro study. **Journal Clinical Periodontology**, v. 30, p. 353-358, 2003.
- LAGO JUNIOR, O.; BORTOLLETO, C.V.; ARAÚJO, A.M.; DONOSO, C.P.M.; KUME, P.K.; KUME, P.K.; REPKA, J.C.D. Avaliação funcional e histológica do reparo de nervo ciático utilizando cola de fibrina e sutura em ratos Wistar. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 40, n. 1/2, p. 69-78, 2005.
- LEE, A.C.; YU, V.M.; LOWE, J.B.; BRENNER, M.J.; HUNTER, D.A.; MACKINNON, S.E.; SAKIYAMA-ELBERT, S.E. Controlled release of nerve growth factor enhances sciatic nerve regeneration. **Experimental Neurology**, v. 184, p. 295-303, 2003.
- MANTEIFEL, V.M.; KARU, T.I. Structure of mitochondria and activity of their respiratory chain in successive generations of yeast cells exposed to He-Ne laser light. **Biology Bulletin**, v. 32, n. 6, p. 556-566, 2005.
- MARTINS, R.S.; SIQUEIRA, R.S.; SILVA, C.F.; PLESE, J.P.P. Mecanismos básicos da regeneração de nervos. **Arquivo Brasileiro de Neurociência**, v. 24, n. 1, p. 20-25, 2005.
- MENDONÇA, A.C.; BARBIERI, C.H.; MAZZER, N. Directly applied low intensity direct electric current enhances peripheral nerve regeneration in rats. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 129, p. 183-190, 2003.

MENOVSKY, T.; WEERMAN, M.V.D.B.; BEEK, J.F. Effect of CO₂-milliwatt laser on peripheral nerves: part II. A histological and functional study. **Microsurgery**, v. 20, p. 150-155, 2000.

MILORO, M.; HALKIAS, L.E.; MALLERY, S.; TRAVERS, S.; RASHID, R.G.; NEB, O. Low-level laser effect on neural regeneration in Gore-Tex tubes. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology**, v. 93, n. 1, p. 27-34, 2002.

MONTOYA, J.V.; ARIZA, J.; SUTACHÁN, J.J.; HURTADO, H. Relationship between functional deficiencies and the contribution of myelin nerve fibers derived from L-4, L-5, and L-6 spinolumbar branches in adult rat sciatic nerve. **Experimental Neurology**, v. 173, p. 266-274, 2002.

MYCKATYN, T.M.; MACKINNON, S.; HUNTER, D.A.; BRAKEFIELD, D.; PARSADANINA, A. A novel model for the study of peripheral nerve regeneration following common nerve injury paradigms. **Journal of Reconstructive Microsurgery**, v. 20, n. 7, p. 533-544, 2004.

NICOLAU, R.A.; MARTINEZ, M.S.; RIGAU, J.; TOMÀS, J. Effect of power 655 nm diode laser irradiation on the neuromuscular junctions of the mouse diaphragm. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 34, p. 277-284, 2004.

NOBLE, J.; MUNRO, C.A.; PRASAD, V.S.S.V. Analysis of upper and lower extremity peripheral nerve injuries in a population of patients with multiple injuries. **Journal of Trauma**, n. 45, p. 116-122, 1998.

OLIVEIRA, E.F.; MAZZER, N.; BARBIERI, C.H.; DELBEL, E.A. The use of muscle graft repair a segmentary nerve defect An experimental study using the sciatic nerve of rats as model. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 133, p. 19-26, 2004.

PATTON, B.L.; MINER, J.H.; CHIU, A.Y.; SANES, J.R. Distribution and function of laminins in the neuromuscular system of developing, adult, and mutant mice. **Journal Cell Biology**, v. 139, p. 1507-1521, 1997.

PRIVADO, M.S.; SAKATA, R.K.; ISSY, A.M. Estudo comparativo entre fentanil por vias peridural e venosa para analgesia de operações ortopédicas. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 54, n. 5, p. 634-639, 2004.

RADTKE, C.; AKIYAMA, Y.; LANKFORD, K.L.; VOGT, P.M.; KRAUSE, D.S.; KOCSISJ.D. Integration of engrafted Schwann cells into injured peripheral nerve: Axonal association and nodal formation on regenerated axons. **Neuroscience Letters**, v.387, p.85-89, 2005.

RASO, V.V.M.; BARBIERI, C.H.; MAZZER, N.; FASAN, V.S. Can therapeutic ultrasound influence the regeneration of the peripheral nerves? **Journal of Neuroscience Methods**, v. 142, p. 185-192, 2005.

ROCHKIND, S. NISSAN, M.; RAZON, N.; SCHWARTZ, M.; BARTAL, A. Electrophysiological effect of He-Ne Laser on normal and injured sciatic nerve in the rat. **Acta Neurochirurgica**, v. 83, p. 125-130, 1986.

ROCHKIND, S.; BARR-NEA, L.; BARTAL, A.; NISSAN, M.; LUBART, R.; RAZON, N. New methods on treatment of severely injured sciatic nerve and spinal cord: an experimental study. **Acta Neurochirurgica**, n. 43, p. 91-93, 1988.

ROCHKIND, S.; NISSAN, M.; ALON, M.; SHAMIR, M.; SALAME, K. Effects of laser irradiation on the spinal cord for the regeneration of crushed peripheral nerve in rats. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 28, p. 216-219, 2001.

ROCHKIND, S.; QUAKNINE, G.E. New trend in neuroscience: low-power laser effect on peripheral and central nervous system (basic science, preclinical and clinical studies). **Neurological Research**, v. 14, p. 2-11, 1992.

ROCHKIND, S.; ROUSSO, M.; NISSAN, M.; VILLARREAL, M.; BARR-NEA, L.; REES, D.G. Systemic effects of low power laser irradiation on the peripheral and central nervous system, cutaneous wounds, and burns. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 9, n. 2, p. 174-182, 1989.

RODRÍGUEZ, F.J.; VALERO-CABRÉ, A.; NAVARRO, X. Regeneration and functional recovery following peripheral nerve injury. **Drug Discovery Today: Disease Models**, v. 1, n. 2, p. 177-185, 2004.

ROWSHAN, K.; JONES, N.F.; GUPTA, R. Current surgical techniques of peripheral nerve repair. **Operative Techniques in Orthopaedics**, v. 14, p. 163-170, 2004.

RUMMLER, L.S.; DINH, P.T.; GUPTA, R. The anatomy and biochemistry of myelin and myelination. **Operative Techniques in Orthopaedics**, v. 14, p. 146-152, 2004.

RUMMLER, L.S.; GUPTA, R. Peripheral nerve repair: a review. **Current Opinion in Orthopaedics**, v. 15, p. 215-219, 2004.

SCHWARTZ, F.; BRODIE, C.; APPEL, E.; KAZIMIRSKY, G.; SHAINBERG, A. Effect of helium/neon laser irradiation on nerve growth factor synthesis and secretion in skeletal muscle cultures. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 66, p. 195-200, 2002.

SEDDON, H.J. Tree types of nerve injury. *Brain*, v. 66, n. 237, 1943. In: FERREIRA, A.S. **Lesões nervosas periféricas: diagnóstico e tratamento**. 2 ed., São Paulo: Editora Santos, 2001. p. 1-9.

SHAMIR, M.H.; ROCHKIND, S.; SANDBANK, J.; ALON, M. Double-blind randomized study evaluating regeneration of the rat transected sciatic nerve after suturing and postoperative low-power laser treatment. **Journal of Reconstructive Microsurgery**, v.17, n. 2, p. 133-137, 2001.

SHIN, D.H.; LEE, E.; HYUN, J.; LEE, S.J.; CHANG, Y.P.; KIM, J.; CHOI, Y.S.; KWON, B.S. Growth-associated protein-43 is elevated in the injured rat sciatic nerve after low power irradiation. **Neuroscience Letters**, v. 344, p. 71-74, 2003.

SKENE, J.H.P.; WILLARD, M. Axonally transported proteins associated with axon growth in rabbit central and peripheral nervous system. *Journal Cellular Biology*, v. 89, 1981. In: IDE, C. Peripheral nerve regeneration. **Neuroscience Research**, v. 25, p. 101-121, 1996.

SNYDER, S.K.; BYRNES, K.R.; BORKE, R.C.; SANCHES, A.; ANDERS, J.J. Quantitation of calcitonin gene-related peptide mRNA and Neuronal cell death in facial motor nuclei following axotomy and 633 nm low power laser. **Laser in Surgery and Medicine**, v. 31, p. 216-222, 2002.

SOTELO, P.R.; SOSA, V.M.R.; MARTINEZ, R.T.; BARRY, H.G. El láser de helio-neon en la regeneración del nervio ciático seccionado y suturado. **Revista Cubana de Cirugía**, v. 35, n. 2, p. 15-20, 1996.

STANG, F.; FANSA, H.; WOLF, G.; REPPIN, M.; KEILHOFF, G. Structural parameters of collagen nerve grafts influence peripheral nerve regeneration. **Biomaterials**, v. 26, p. 3083-3091, 2005.

TEMPLE, C.L.F.; ROSS, D.C.; DUNNING, C.E.; JOHNSON, J.A. Resistance to disruption and gapping of peripheral nerve repairs: An in vitro biomechanical assessment of techniques. **Journal of Reconstructive Microsurgery**, v. 20, n. 8, p. 645-650, 2004.

ÜNAL, B.; TAN, H.; ORBAK, Z.; KIKI, Z.; BILICI, M.; BILICI, N.; ASLAN, H.; KAPLAN, S. Morphological alterations produced by zinc deficiency in rat sciatic nerve: A histological, electron microscopic, and stereological study. **Brain Research**, v. 1048, p. 228-234, 2005.

VAREJÃO, A.S.P.; CABRITA, A.M.; GEUNA, S.; MELO-PINTO, P.; FILIPE, V.M.; GRAMSBERGEN, A.; MEEK, M.F. Toe out angle: a functional index for the evaluation of the sciatic nerve recovery in the rat model. **Experimental Neurology**, v. 183, p. 695-699, 2003.

VAREJÃO, A.S.P.; MEEK, M.F.; FERREIRA, A.J.A.; PATRÍCIO, J.A.B.; CABRITA, A.M.S. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis. **Journal of Neurosciences Methods**, v. 108, p. 1-9, 2001.

VLADIMIROV, Y.A.; OSIPOV, A.N.; KLEBANOV, G.I. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. **Biochemistry**, v. 69, n. 1, p. 89-90, 2004.

WALSH, D.M.; BAXTER, G.D.; ALLEN, J.M. Lack of the effect of pulsed low-intensity infrared (820 nm) laser irradiation on nerve conduction in the human superficial radial nerve. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 26, p. 485-490, 2000.

WOLLMAN, Y.; ROCHKIND, S. In vitro cellular processes sprouting in cortex microexplants of adult rat brains induced by low power laser irradiation. **Neurology Research**, v. 20, p. 470-472, 1998.

YAN, J.; MATLOUD, H.S.; SANGER, J.R.; ZHANG, L.; RILEY, D.A.; JARADEH,S.S. A modified end-to-side method for peripheral nerve repair: large epineurial window helicoid technique versus small epineurial window standard end-to-side technique. **The Journal of Hand Surgery**, v. 27A, n. 3, p. 484-492, 2002.

ZHANG, J.; OSWALD, T.; LINEAWEAVER, W.C.; CHEN, Z.; ZHANG, G.; CHEN, Z.; ZHANG, F. Enhancement of rat sciatic nerve regeneration by fibronectin and laminin through a silicone chamber. **Journal of Reconstructive Microsurgery**, v. 19, n. 7, p. 467-472, 2003.

APÊNDICE A

Tabela 1. Valores individuais do IFC nos grupos experimentais nos quatro períodos de avaliação, com as respectivas médias e desvios padrão. Notar a análise comparativa dos valores dos IFC entre os diversos grupos, onde: $^a \bar{x}^b < 0,05$; $^a \bar{x}^c$, $^a \bar{x}^d < 0,01$; $^e \bar{x}^f$, $^e \bar{x}^g$, $^e \bar{x}^h < 0,001$ e demais comparações sem diferença significativa.

INDICE FUNCIONAL DO CIÁTICO								
Controle					Laser			
Rato	Pré-lesão ^a	7 dias ^b	14 dias ^c	21 dias ^d	Pré-lesão ^e	7 dias ^f	14 dias ^g	21 dias ^h
1	-6,60	-79,72	-93,30	-93,30	-9,53	-125,48	-93,30	-76,73
2	-18,38	-93,30	-124,53	-62,53	-25,88	-79,59	-75,30	-90,81
3	-24,91	-128,91	-141,94	-135,81	-1,58	-93,30	-93,30	-83,75
4	-133,07	-77,90	-84,94	-91,53	23,16	-116,28	-93,30	-60,13
5	-19,48	-59,67	-73,49	-65,19	-27,18	-93,30	-93,30	-87,91
6	-12,71	-93,30	-93,02	-143,38	-2,97	-81,17	-75,91	-74,59
?	-35,9	-88,8	-101,9	-98,6	-7,3	-98,2	-87,4	-79,0
D.P.	48,0	23,2	25,9	34,3	18,6	18,7	9,1	11,2

APÊNDICE B

Tabela 2. Valores individuais da área de bainha de mielina nos 5 quadrantes analisados em cada amostra do grupo 1 (controle) após o 21º dia de pós-operatório, com as respectivas médias e desvios padrões.

Grupo Controle							
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Média	DP
Rato 1	0,86	0,68	0,26	0,36	1,07	0,65	0,34
Rato 2	0,42	0,16	0,19	0,50	0,25	0,30	0,15
Rato 3	0,87	0,66	0,79	0,52	0,77	0,72	0,14
Rato 4	0,46	0,30	0,29	0,44	0,49	0,40	0,10
Rato 5	0,44	0,28	0,38	0,42	0,49	0,40	0,08
Rato 6	0,28	1,00	0,52	0,35	0,64	0,56	0,29
					Grupo	0,51	0,11

Q: quadrante

APÊNDICE C

Tabela 3. Valores individuais da área de bainha de mielina nos 5 campos analisados em cada amostra do grupo 2 (laser) após o 21º dia de pós-operatório, com as respectivas médias e desvios padrões.

Grupo Laserterapia							
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Média	DP
Rato 1	2,50	1,59	2,39	1,78	1,62	1,98	0,43
Rato 2	0,73	0,46	0,41	0,60	0,51	0,54	0,12
Rato 3	2,12	3,04	2,03	1,46	1,88	2,11	0,58
Rato 4	0,72	0,46	0,43	0,35	0,67	0,53	0,16
Rato 5	0,55	0,96	1,12	1,10	1,15	0,98	0,25
Rato 6	1,04	1,89	2,64	1,26	1,83	1,73	0,62
					Grupo	1,31	0,22

Q: quadrante

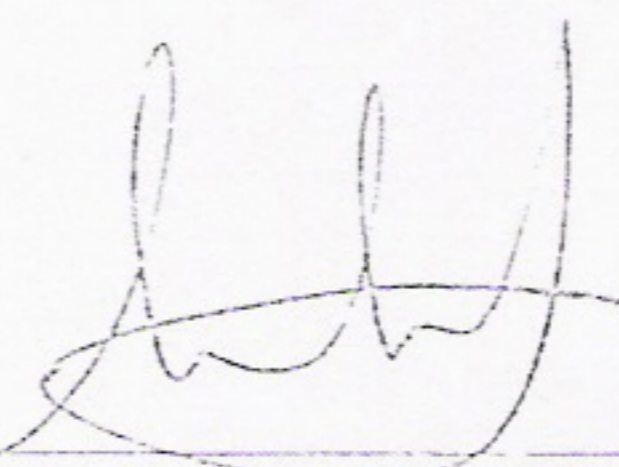
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVAP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo n.º L185/2005/CEP, intitulado "*Análise da influência da irradiação do laser de baixa potência Arsenieto de gálio e alumínio (650nm) sobre a recuperação funcional e morfológica do nervo ciático de ratos após lesão por neurotmeose seguida de reparo erineural*", sob a responsabilidade da Profa. Dra. Máira Regina R. Magini, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA/Junho de 1991) e segue as Normas Para a Prática Didático-Científica da Vivisseccção de Animais (Lei 6638 de 08/05/1979) sendo, portanto, **aprovado** por esta Comissão de Ética em Pesquisa.

Informamos que o pesquisador responsável por este Protocolo de Pesquisa deverá apresentar a este Comitê de Ética um relatório das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação.

São José dos Campos, 11 de novembro de 2005.



PROF. DR. LANDULFO SILVEIRA JÚNIOR
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVAP