

ANA FLORA SOUSA DE BRITO

**DIFERENTES DOSES DE LASER NO TRATAMENTO NEURAL APÓS
COMPRESSÃO EXPERIMENTAL DO NERVO CIÁTICO DE RATOS
SUBMETIDOS A HIPOCINESIA DOS MEMBROS PÉLVICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2010

ANA FLORA SOUSA DE BRITO

**DIFERENTES DOSES DE LASER NO TRATAMENTO NEURAL APÓS
COMPRESSÃO EXPERIMENTAL DO NERVO CIÁTICO DE RATOS
SUBMETIDOS A HIPOCINESIA DOS MEMBROS PÉLVICOS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Medicina
Veterinária, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

APROVADA: 14 de dezembro de 2010.

Prof. Sérgio Luis Pinto da Matta
(Co-orientador)

Prof. João Carlos Pereira da Silva
(Co-orientador)

Prof^a. Andréa Pacheco B. Borges

Prof^a. Betânia Souza Monteiro

Prof. Ricardo Junqueira Del Carlo
(Orientador)

Dedico este trabalho:
À Deus e a minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me iluminar na realização deste trabalho e por me fazer capaz de realizar meus sonhos.

À Universidade Federal de Viçosa pelas condições oferecidas para o desenvolvimento deste mestrado.

À FAPEMIG pela concessão da bolsa

Ao Prof. Dr. Ricardo Junqueira, pela oportunidade do Mestrado, pelos ensinamentos, pela compreensão e por contribuir no meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. Antônio José Natali, que me acolheu tão bem em seu laboratório e sempre me apoiou durante o experimento.

Ao Prof. Dr. Sergio Luis Pinto da Matta, pela atenção e paciência nos momentos de necessidade, por ter-me feito acreditar que era possível vencer este desafio e pela sua boa companhia e de sua equipe no laboratório.

À Prof.^a Dra. Andréa pelo apoio durante a finalização do trabalho.

Ao Prof. Dr. João Carlos Pereira da Silva pelo seu apoio irrestrito.

Ao Prof. Dr. Eduardo Paulino pelo auxílio na execução da estatística.

Aos funcionários da UFV que me apoiaram durante meus trabalhos nesta instituição.

À Bárbara Fernandes, Bárbara Okano, Betânia, Gustavo, Laila, Liana, Lucas, Márcia, Mateus, Miguel, Natália, Pablo, Sâmara, Simone Sá, Simone Galvão, Tatiana e aos amigos do biotério pela contribuição dada durante a realização deste estudo.

À todos com quem trabalhei no Hospital Veterinário, durante as sessões de reabilitação animal, por me ajudarem a praticar o que amo e fazer o bem aos meus pacientes.

À Andréia Vieira, Bárbara Fernandes, Liana, Sâmara, Simone Galvão e Wanda pela companhia e amizade.

À minha madrinha Rose pelo cuidado e atenção.

À D. Luzia, Sr. Marino e família por terem me “adotado” e se tornado a minha família em Viçosa.

À minha mãe e meu irmão, sem os quais nada disso seria possível, por estarem sempre ao meu lado e por sonharem meus sonhos comigo.

Ao meu pai por seu eterno exemplo.

À meu noivo Rafael Pietro que atravessou metade do país inúmeras vezes para poder estar ao meu lado sempre que preciso.

Aos meus familiares e amigos que, mesmo a distância, sempre me apoiaram de maneira incondicional.

Aos que foram meus professores nas disciplinas que cursei durante o mestrado, por me ajudarem a crescer a cada dia.

À todos os animais que deram a vida para tornar este estudo possível.

Serei eternamente grata a todos!

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1 - INTRODUÇÃO.....	1
2 – REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 – Lesão e cicatrização do nervo periférico.....	2
2.2 – Laser terapêutico.....	4
2.3 – Laser na regeneração de nervo periférico.....	6
2.4 – Imobilização por suspensão.....	8
2.5 – Avaliação funcional do ciático.....	9
2.6 – Avaliação morfométrica da regeneração nervosa.....	11
2.7 – Avaliação morfométrica dos músculos.....	12
3 – MATERIAL E MÉTODOS.....	13

3.1 – Animais.....	13
3.2 – Protocolo cirúrgico.....	13
3.3 – Protocolo de suspensão.....	14
3.4 – Tratamento com laser.....	16
3.5 – Avaliação Funcional do ciático.....	17
3.6 – Avaliação morfométrica.....	18
3.7 - Análise estatística.....	22
4 – RESULTADOS E DISCURSSÃO.....	22
4.1 – Avaliação morfométrica do nervo.....	23
4.2 – Avaliação funcional do ciático.....	36
4.3 – Avaliação muscular.....	38
5 – CONCLUSÕES.....	46
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática dos parâmetros medidos para calcular o Índice Funcional do Ciático (IFC).	10
Figura 2	Registro da pegada do rato no ato da marcha, utilizando-se câmara filmadora.	11
Figura 3	Nervo ciático (seta) observado após acesso cirúrgico na região lateral do membro pélvico direito ao nível do terço proximal do fêmur.	14
Figura 4	Animais imobilizados por sistema de suspensão pela cauda na porção anterior da prateleira de contenção	16
Figura 5	Aplicação do laser sobre a área de lesão do nervo ciático do rato.	17
Figura 6	Caixa para avaliação do índice funcional do ciático	18
Figura 7	Grade sobre o corte do nervo ciático para contagem de pontos.	20
Figura 8	Fibra mielinizada do nervo ciático onde A e B representam o seu diâmetro externo (axônio e mielina) e interno (axônio), respectivamente.	20
Figura 9	Grade sobre o corte histológico do músculo com grade para contagem de pontos.	21
Figura 10	Corte histológico da fibra muscular onde A representa seu diâmetro.	22

Figura 11	Porcentagem do tecido conjuntivo, axônio e mielina do nervo ciático nos vários grupos e períodos de avaliação.	24
Figura 12	Número de fibras do nervo ciático nos vários grupos e períodos de avaliação.	26
Figura 13	Diâmetro médio do axônio do nervo ciático nos vários grupos e períodos de avaliação.	27
Figura 14	Área média do axônio do nervo ciático nos vários grupos e períodos de avaliação.	27
Figura 15	Soma da área do axônio do nervo ciático nos vários grupos e períodos de avaliação.	28
Figura 16	Diâmetro médio da mielina do nervo ciático nos vários grupos e períodos de avaliação.	30
Figura 17	Área média da mielina do nervo ciático nos vários grupos e períodos de avaliação.	30
Figura 18	Soma da área da mielina do nervo ciático nos vários grupos e períodos de avaliação.	31
Figura 19	Mielinização do nervo ciático nos vários grupos e períodos de avaliação.	31
Figura 20	Diâmetro médio da fibra do nervo ciático nos vários grupos e períodos de avaliação.	33

Figura 21	Área média da fibra do nervo ciático nos vários grupos e períodos de avaliação.	33
Figura 22	Soma área da fibra do nervo ciático nos vários grupos e períodos de avaliação.	34
Figura 23	Cortes histológicos transversais do nervo ciático (objetiva 100x) dos diferentes grupos experimentais, onde se pode observar claramente o aumento da bainha de mielina e a diminuição da quantidade de tecido conjuntivo aos 28 dias, em relação aos 14.	35
Figura 24	IFC nos vários grupos e períodos de avaliação.	38
Figura 25	Peso, em gramas, do músculo sóleo nos vários grupos e períodos de avaliação.	39
Figura 26	Diâmetro médio da fibra muscular do músculo sóleo nos vários grupos e períodos de avaliação.	40
Figura 27	Porcentagem do tecido conjuntivo e de fibras musculares do músculo sóleo nos vários grupos e períodos de avaliação.	40
Figura 28	Cortes histológicos transversais do músculo sóleo dos diferentes grupos aos 14 dias corados com azul de tuloidina.	41
Figura 29	Cortes histológicos transversais do músculo sóleo dos diferentes grupos aos 28 dias corados com azul de tuloidina.	42
Figura 30	Peso, em gramas, do músculo gastrocnêmio nos vários grupos e períodos de avaliação.	43

Figura 31	Diâmetro da fibra muscular do músculo gastrocnêmio nos vários grupos e períodos de avaliação.	43
Figura 32	Porcentagem do tecido conjuntivo e de fibras musculares do músculo gastrocnêmio nos vários grupos e períodos de avaliação.	44
Figura 33	Cortes histológicos transversais do músculo Gastrocnêmio dos diferentes grupos aos 14 dias corados com azul de tuloidina.	45
Figura 34	Cortes histológicos transversais do músculo gastrocnêmio dos diferentes grupos aos 28 dias corados com azul de tuloidina.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Valores médios das porcentagens de tecido conjuntivo, de axônio e de mielina no nervo ciático lesionado.	25
Tabela 2	Valores médios do número de fibras do nervo ciático lesionado.	26
Tabela 3	Valores médios do diâmetro, área e soma da área do axônio do nervo ciático lesionado.	28
Tabela 4	Valores médios do diâmetro, área, soma da área da mielina e mielinização do nervo ciático lesionado.	32
Tabela 5	Valores médios do diâmetro, área, soma da área da fibra do nervo ciático lesionado.	34
Tabela 6	Valores médios do IFC.	38
Tabela 7	Valores médios do peso do músculo sóleo, do diâmetro fibra muscular e das porcentagens de tecido conjuntivo e de fibra muscular.	41
Tabela 8	Valores médios do peso do músculo gastrocnêmio, do diâmetro fibra muscular e das porcentagens de tecido conjuntivo e de fibra muscular.	44

RESUMO

Brito, Ana Flora Sousa de, M. Sc., Universidade Federal Viçosa, dezembro de 2010. **Diferentes doses de laser no tratamento neural após compressão experimental do nervo ciático de ratos submetidos a hipocinesia dos membros pélvicos.** Orientador: Ricardo Junqueira Del Carlo. Co-orientador: Sergio Luis Pinto da Matta e João Carlos Pereira da Silva.

A irradiação com o laser é muito empregada para tratar uma variedade de condições patológicas do sistema músculo-esquelético, inclusive dos nervos periféricos. O objetivo desse trabalho foi avaliar por análises clínicas e morfométricas, a reparação neural e muscular após a compressão do nervo ciático de ratos submetidos à imobilização por suspensão e tratados ou não com diferentes doses de laser terapêutico. Foram utilizados 48 ratos machos, com idade de 60 dias, da raça Wistar, distribuídos em três grupos de 16 animais, sendo um utilizado como controle (GA) e outros dois que receberam diferentes doses do laser (GB com dose de 4 J/cm² e GC com dose de 6 J/cm²). Após a compressão do nervo ciático os animais foram submetidos à hipocinesia dos membros pélvicos e ao tratamento com Laser de GaAIs três vezes por semana, durante 14 ou 28 dias. O índice funcional do ciático (IFC) foi avaliado nos períodos pré-operatório, aos 14 e aos 28 dias apresentando melhora para ambos os grupos, porém com destaque para o GA aos 28 dias. Os resultados da morfometria demonstraram que a recuperação do nervo foi melhor para os grupos tratados, principalmente aos 14 dias. Já os músculos não foram afetados pela laserterapia. A conclusão aponta para os benéficos da laserterapia sobre a recuperação morfológica do nervo ciático principalmente nos primeiros 14 dias após a lesão por axonotmese. Além de que a laserterapia, *per sí*, não é capaz de influenciar a recuperação e a funcionalidade dos músculos acometidos

ABSTRACT

Brito, Ana Flora Sousa de, M. Sc., Universidade Federal Viçosa, December 2010. **Different laser's doses in neural treatment neural after experimental axonotmese of sciatic nerve in rats under hind limb unloading.** Advisor: Ricardo Junqueira Del Carlo. Co-Advisor: Sergio Luis Pinto da Matta and João Carlos Pereira da Silva.

Laser irradiation is frequently used as treatment for many pathologies of skeletal muscle, including peripheral nerves lesion. Therefore, the aim of this research was to evaluate by clinical and morfometric analysis the effects of laser therapy on neural and muscle repair after crushing of sciatic nerve and hind limb unloading. 48 Wistar male rats machos, with 60 days old, were divided in three groups with 16 animals each, and they were performed as one control group (GA) and two irradiated groups (GB with 4 J/cm² dose; GC with 6 J/cm² dose). After the sciatic nerve was crushed animals were maintained under hind limb suspension and received laser (GaAIAs) irradiation three times per week, during 14 or 28 days. The sciatic functional index (SFI) were measured before surgery, at 14 and 28 days, recovery was observed in all groups especially to GA at 28 days. Morfometric analysis of the nerve showed that the nerve recovery was better to the treated groups, specially at 14 days. The muscle morfometric analysis weren't effected by laser therapy. Taken together the results allowed to conclude that laser therapy promotes morphological recover of the nerve, specially until 14 days. Yet laser isn't able to influence the muscle recovery and function.

1. INTRODUÇÃO

Nervos periféricos, principalmente aqueles que percorrem os membros, são alvos freqüentes de lesões de origem traumática, como compressões e secções (Milleisi, 2000), que resultam em perda ou diminuição da sensibilidade e controle motor, cuja severidade dependerá do tipo e da extensão da lesão. Inúmeros fatores influenciam na regeneração da fibra nervosa lesada, como a natureza e o nível da lesão, o tempo de denervação, o tipo e diâmetro das fibras nervosas afetadas, a idade do indivíduo, dentre outras (Verdú *et al.*, 2000). A recuperação morfológica e funcional é um processo lento que depende do tipo de lesão, bem como da regeneração e da maturação do nervo, raramente é completa e perfeita, apesar das técnicas modernas e sofisticadas de reconstrução (Robinson, 2000). Quanto mais tardio o restabelecimento das conexões neuromusculares, mais a atrofia se desenvolve, com isso, prolonga-se o tempo para o restabelecimento da função neuromuscular (Rochkind *et al.*, 2009).

Estima-se, em alguns países, que a incidência de lesões traumáticas, é maior do que 500.000 novos pacientes por ano (Rodrigues *et al.*, 2004). Destes, 2,8% continuam com algum déficit por toda a vida (Noble *et al.*, 1998). Estes dados justificam o desenvolvimento contínuo de tratamentos que permitam diminuir os níveis de lesões e déficit funcional (Mendonça *et al.*, 2003; Raso *et al.*, 2005).

No tratamento da lesão nervosa, diferentes recursos podem ser utilizados, como eletroestimulação fásica de baixa freqüência (Fernandes *et al.*, 2005), laserterapia (Endo, 2002), ultra-som (Monte-Raso *et al.*, 2006), exercício físico (Byun *et al.*, 2005), dentre outros.

A laserterapia tem recebido crescente atenção nas últimas décadas. Embora um estudo pioneiro sobre seus efeitos na regeneração das lesões traumáticas dos nervos tenha sido publicado em 1970, foi somente em meados da década de 80 que se despertou interesse científico para os seus efeitos benéficos (Rochkind, 2001), envolvendo aumento da circulação sangüínea, estímulo à formação de novos capilares, aumento na síntese de RNA e DNA, entre outros.

Outro tecido prejudicado pela lesão nervosa periférica é o músculo esquelético, pois a inervação é um fator crítico para sua integridade funcional e estrutural (Ishido *et al.*, 2004; Kostrominova, 2005). A lesão do nervo causa perda de massa e da

capacidade de geração de força do músculo (Billington e Carlson, 1996; Dow *et al.*, 2004).

Os mecanismos pelos quais a laserterapia interage com estruturas biológicas especialmente no tecido nervoso, até agora, não são muito bem compreendidos (Gigo-Benato *et al.*, 2004). Entretanto, a irradiação com o laser é muito empregada para tratar uma variedade de condições patológicas do sistema músculo-esquelético, inclusive dos nervos periféricos. Acredita-se que a laserterapia seja capaz de acelerar a regeneração das fibras nervosas durante as fases iniciais, comprovada por meio de observações *in vitro*, as quais mostraram que a luz devidamente aplicada estimula tanto o crescimento axonal (Wollman *et al.*, 1996; Ehrlicher *et al.*, 2002) quanto a proliferação das células de Schwann (Van Breugel e Bar, 1993). Para investigar esta hipótese, foram avaliados neste estudo os efeitos precoces da laserterapia na recuperação do nervo ciático após estabelecimento de lesão por compressão em ratos Wistar, para tal foram analisados os resultados do ponto de vista morfométrico e funcional.

Neste contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar por análises clínicas e morfométricas, a reparação neural após a compressão do nervo ciático de ratos submetidos à hipocinesia (imobilização por suspensão) dos membros pélvicos e tratados ou não com diferentes doses de laser terapêutico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Lesão e cicatrização do nervo periférico

O dano neural determina a interrupção da continuidade axonal com resultante degeneração das fibras nervosas distais ao sítio lesional. O tronco nervoso lesionado e a severidade da lesão determinam a necessidade de intervenção cirúrgica e o tipo de procedimento a ser aplicado (Lundborg, 2000). São conhecidos cinco graus de lesão nervosa, baseados na morfologia da lesão e no dano causado à bainha conjuntiva. O primeiro grau de lesão nervosa é conhecido como neuropraxia de Seddon e corresponde ao bloqueio focal na condução do impulso nervoso. As alterações histológicas observadas são desmielinização segmentar com anormalidades dos axônios e uma recuperação completa é esperada. O segundo grau de lesão é a axonotmese de Seddon e envolve lesão axonal levando à

degeneração Walleriana distal à lesão. A recuperação é relacionada com crescimento axonal individual através dos tubos intactos do endoneuro da lâmina basal das células de Schwann. É esperada uma regeneração completa. O terceiro grau de lesão inclui não somente lesão axonal como também cicatrização do endoneuro, o que pode impedir ou servir de obstáculo à regeneração axonal. A recuperação funcional é variável. O quarto grau de lesão descreve um nervo com continuidade física, mas com uma cicatriz funcional que bloqueia a sua porção transversal, tornando a regeneração impossível. O quinto grau é a neurotinese na qual ocorre a completa secção do nervo [Seddon (1943) e Sunderland (1951) citados por Bridge (1994)].

Após a lesão nervosa periférica constata-se, distalmente ao local da lesão: fragmentação de neurofibrilas (entre 8 e 12 horas); fragmentação da bainha de mielina e irregularidades na superfície do axônio (entre 12 e 24 horas), desintegração do axônio (48 horas) e reabsorção dos restos dos axônios (96 horas); macrófagos participando ativamente na remoção do material degenerado (5º dia) e reabsorção de restos da bainha de mielina processando-se entre o 15º e 30º dias; proliferação e hipertrofia das células de Schwann, a partir do 5º dia até cerca de 30 dias, quando readquirem seu aspecto normal; ausência de todo o conteúdo axonal, restando cordões de tecido conjuntivo e tubos endoneurais, com cordões de células de Schwann e sua lâmina basal, substrato adequado para a regeneração da fibra nervosa periférica. Após a recuperação das fibras nervosas inicia-se a regeneração do nervo lesado (Mikail e Pedro, 2006).

A velocidade de regeneração de um nervo depende do fato de o axônio ser mielinizado ou amielinizado e, no caso de fibras mielinizadas, da espessura da bainha de mielina. O crescimento dos axônios e das células de Schwann estende-se da extremidade do tronco nervoso proximal para o segmento distal. A bainha de mielina surge no axônio em regeneração aproximadamente no sexto ou sétimo dia. Os nódulos de Ranvier aparecem, em média, duas semanas após, e a mielina continua a ser depositada durante aproximadamente um ano (Peacock e Van Winkle, 1976).

Para que ocorra a mielinização, os axônios devem atravessar o ponto de secção e penetrar nas bandas de Büngner no segmento distal (Swaim, 1981). Segundo Haines (1972), a regeneração pode ser dificultada por abundante invasão de tecido conjuntivo, resultando em formação de neuroma.

A maior parte dos conhecimentos sobre a regeneração dos nervos tem sido gerada por investigações experimentais, nas quais inúmeras variáveis são controladas, garantindo a confiabilidade dos estudos. Assim, têm sido realizados estudos enfocando a recuperação funcional após lesões por esmagamento (Oliveira *et al.*, 2001) novas técnicas alternativas de reparo cirúrgico (De Sá *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2004) e o uso de recursos terapêuticos físicos (laser, eletricidade e ultra-som) que possam estimular a regeneração morfológica dos nervos (Mendonça *et al.*, 2003; Monte-Raso *et al.*, 2005).

De Medinaceli *et al.* (1982) concluíram que uma lesão provocada por compressão é uma modalidade útil para o estudo de regeneração dos nervos periféricos. Ela mimetiza um tipo de axonotmese, na qual os danos são suficientes para romper o axônio, levando à degeneração Walleriana distal, mas o prognóstico de recuperação funcional é bom, devido à preservação das estruturas de sustentação, como a célula satélite, a membrana basal e o tecido conjuntivo de suporte. Essas características facilitam o prolongamento dos axônios e, conseqüentemente, a re-inervação adequada do alvo (Lent, 2004). O grau de lesão depende do nervo envolvido, da magnitude e tipo de pressão exercida e da duração da compressão (Inserra *et al.*, 1998).

Bridge *et al.* (1994) compararam modelos de compressão nervosa utilizando pinças cirúrgica e de relojoeiro. Não houve diferença significativa entre os métodos, que foram considerados confiáveis e reproduzíveis como modelos de lesão por compressão. Segundo Gigo-Benato *et al.* (2004) a lesão por compressão como modelo experimental é o modelo mais estudado na literatura.

2.2. Laser terapêutico

A palavra laser originou-se da abreviação de Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation, cuja teoria é do físico Albert Einstein, que em seu artigo "Zur Quantum Theories der Strahlung", de 1917, expôs os princípios físicos da emissão estimulada (fenômeno laser). Por ser uma forma de emissão luminosa o laser está englobado dentro de um espectro de emissão eletromagnética, assim como outros recursos usados na fisioterapia, tais como a microondas, irradiação ultravioleta e infravermelha, etc. Porém, o que diferencia o laser das demais formas de irradiação

de ondas eletromagnéticas são as suas características de monocromaticidade, coerência, unidirecionalidade e alta concentração fotônica (Veçoso, 1993; Baxter, 1994; Vinck *et al.*, 2003).

Os equipamentos de laser de uso corrente para fins médicos cirúrgicos ou para a indústria são classificados como de "alta potência" (com potencial destrutivo) e são utilizados em cirurgias ou na remoção de tecidos. Possuem ação fototérmica de corte, vaporização, coagulação e esterilização dos tecidos. O laser usado para fins terapêuticos é classificado como de "baixa potência" (sem potencial destrutivo). É utilizado em fisioterapia e possui ação fotoquímica de analgesia, antiinflamatória e de bioestimulação tecidual (Brugnera Júnior *et al.*, 1991; Veçoso, 1993; Genovese, 2000; Mello e Mello, 2001; Brugnera Júnior *et al.*, 2003; Vinck *et al.*, 2003).

Na terapia com o laser de baixa potência os mais utilizados são: Hélio-Neônio (HeNe) contínuo (632 nm), Argônio (Ar, 514nm), Arseneto de Gálio e Alumínio (GAAIAs) contínuo (830nm) e Rubi (694nm). Existe controvérsia a respeito do comprimento de onda ideal para o tratamento das diversas afecções (Khular *et al.*, 1995).

Existem alguns parâmetros de valores de densidade energética em função do efeito desejado como: efeito antiálgico (entre 2 a 4 J/cm²); efeito anti-inflamatório (entre 1 a 3 J/cm²); efeito regenerativo (entre 4 a 10 J/cm²); efeito circulatório (entre 1 a 3 J/cm²) (Tuner e Hode, 2003).

Pesquisas têm atribuído ao AsGa e ao HeNe efeito antiinflamatório, analgésico, estimulante celular e modulador do tecido conjuntivo na regeneração e na cicatrização de diferentes tecidos (Abergel *et al.*, 1984; Cruañes, 1984; Wanderer, 1991; Schmitt *et al.*, 1993). Várias afecções têm sido tratadas com irradiação de laser de baixa potência, como por exemplo, dor (Cunha *et al.*, 2008), doença periodontal, feridas (Abergel *et al.*, 1987), distúrbios temporomandibulares e fibromialgia (Bezuur, 1988; Hansson, 1989). Segundo Rochkind (2004), o laser terapêutico induz a ativação das células nervosas, previne ou diminui a degeneração dos neurônios motores correspondentes na medula espinhal e aumenta significativamente o crescimento axonal e a sua mielinização.

Atualmente, imputam-se como principais efeitos biológicos locais: aumento do metabolismo celular, aumento da circulação sangüínea, estímulo à formação de novos capilares, aumento da atividade do sistema linfático, aumento na síntese de DNA e RNA, aumento dos níveis de endorfina, aumento da liberação de histamina e

serotonina, aumento da quantidade de fibroblastos, estímulo de produção de colágeno pelos fibroblastos, estímulo dos osteoblastos, estímulo da fagocitose, aumento dos níveis de ATP (trifosfato de adenosina), liberação de fatores do crescimento, diminuição da velocidade de condução do nervo sensorial, redução do grau de excitabilidade dos receptores da dor e manutenção do potencial de membrana (Mikail e Pedro, 2006).

2.3. Laser na regeneração de nervo periférico

O laser começou a ser utilizado no processo de regeneração e recuperação funcional de lesões nervosas periféricas na década de 1970, havendo várias divergências em relação aos resultados obtidos (Basford, 1995).

Olson *et al.* (1981) utilizaram o laser, com comprimento de onda entre 490 e 685nm, sobre células de cerebelo de ratos, causando diminuição da excitabilidade elétrica das células nervosas. Com isto sugeriu-se que ocorre absorção da energia irradiada capaz de provocar alterações com a liberação de cálcio no citoplasma.

Foi demonstrado que o laser induz a proliferação de células de Schwann, afeta o metabolismo da célula nervosa e induz o aumento dos processos celulares. Também foi sugerido que interage com citocromos, estimulando a atividade redox na cadeia respiratória celular, resultando em ativação celular (Van Breugel e Bar, 1993; Wollman e Rochkind, 1998).

O laser Yb:glass (1495nm) tem potencial para ser utilizado em neuroestimulação, como uma alternativa à estimulação elétrica. Após a irradiação do nervo ciático com o laser foi observada movimentação do membro pélvico e a eletromiografia confirmou a ativação muscular (McCaughey *et al.*, 2010).

Stainki *et al.* (1998) observaram no nervo radial de cães, submetidos à reparação cirúrgica e a terapia laser de baixa potência (AsGa, 904 nm, doses de 6 J/cm² e 1 J/cm² em varredura), durante 10 dias, diminuição da reação inflamatória ao fio de sutura, mas também intensificação da formação de neuroma quando há impedimento na linha de anastomose.

Após o tratamento com laser (GaAlAs) foram observadas melhoras na função sensorial em pacientes que sofriam de parestesia do nervo mandibular em consequência da remoção cirúrgica do terceiro dente molar impactado (Midamba e Haanes, 1993).

Miloro *et al.* (2002) estudaram o efeito do laser terapêutico na regeneração de uma falha de 6mm no nervo alveolar inferior de coelhos após tubulização usando um condutor Gore-tex. O tratamento teve início durante a cirurgia com o nervo exposto e continuou durante aproximadamente um mês. Foi utilizado laser GaAlAs (820-30nm) numa dosimetria de 6 J/cm². Após 15 semanas os nervos foram avaliados e observou-se maior regeneração do nervo tratado em relação ao controle.

Khullar *et al.* (1995) observaram que o laser acelera o processo de regeneração após lesão por axonotmese em nervo misto, sensorial e motor, de mamíferos. Foi utilizado laser de GaAlAs (830 nm) numa dose de 6 J/cm², diariamente, durante 28 dias. A avaliação do índice funcional do nervo ciático indicou melhora da função motora, mas não foi observada diferença significativa entre os grupos tratado e controle em relação à atividade elétrica. Esse achado concorda com outros estudos que demonstraram que o aumento da atividade eletrofisiológica e o retorno da função nem sempre se correlacionam. Também foi observado que o número de animais automutilados foi maior no grupo tratado do que no grupo controle. Considerou-se que a volta da função motora veio acompanhada da volta da função sensitiva, ou seja, o retorno da função sensitiva pode ter sido acompanhado de sensações desagradáveis que levaram à automutilação.

Foi observado um efeito estimulatório do laser na regeneração do nervo ciático de ratos (Endo *et al.*, 2008), assim como sua ineficácia (Bagis *et al.*, 2003), com isso acredita-se que o laser tem um papel duplo, podendo auxiliar ou adiar a regeneração do nervo (Chen *et al.*, 2005).

Reis *et al.* (2009) observaram que o uso do laser AlGaAs (660nm) promoveu alteração significativa na quantidade de mielina em avaliação morfométrica, mas não obteve resultados positivos na recuperação funcional do nervo ciático de ratos após neurotmeze.

Belchior *et al.* (2009) observaram resultados positivos em relação à melhora demonstrada pelo índice funcional do ciático. A lesão nervosa por compressão foi tratada com laser GaAlAs (660 nm), na dose de 4 J/cm², durante 21 dias.

Os protocolos de tratamento da lesão nervosa com laserterapia variam em relação a doses tanto quanto ao período e ao intervalo de aplicação. As doses variam desde 0,31 J/cm² (Bagis *et al.*, 2003) até 40 J/cm² (Gigo-Betano *et al.*, 2004) usando-se laser pulsado ou contínuo. Os períodos de aplicação variam desde sete dias (Bagis *et al.*, 2003) até 69 dias (Khullar *et al.*, 1996). Os intervalos de aplicação

variam entre 18 horas e 7 dias, as vezes com intervalos variados dentro de um mesmo tratamento (Khullar *et al.*, 1995; Miloro e Repasky, 2000; Chen *et al.*, 2005). Com isso, acredita-se que a controvérsia em relação aos resultados dos estudos pode estar relacionada ao comprimento de onda, ao modo pulsado ou contínuo ou ainda a dose utilizada (Bagis *et al.*, 2003). Com isso seu uso nas lesões de nervos periféricos apresenta resultados diversos com ausência de protocolo definido.

2.4. Imobilização por suspensão

Estudos em que os animais são mantidos em suspensão ou hipocinesia têm sido executados simulando condições que acontecem em vôos espaciais e em pacientes que passam longos períodos acamados. Embora o método produza condições diferentes da imobilização, os animais podem realizar contrações dinâmicas com carga mínima e seus efeitos sobre os músculos são semelhantes aos produzidos pela imobilização com gesso ou fixações articulares (Berg *et al.*, 1997).

O músculo adulto mantém a sua plasticidade para se adaptar rapidamente a mudanças de atividade e demanda funcional (Thompson, 2002). Essa plasticidade, no entanto, pode resultar em mal funcionamento. O desuso muscular, por uma diminuição de carga simulada ou não, causa atrofia, perda da capacidade funcional, dificuldade de coordenação motora e diminui a resistência a fadiga (Fitts *et al.*, 1986). As maiores mudanças ocorrem nos músculos que atuam contra a gravidade como o sóleo (Allen *et al.*, 1996).

Thompson *et al.* (1998) observaram os efeitos da suspensão na musculatura, relatando redução de peso de 19% no sóleo e de 13% no gastrocnêmio, após 1 semana. Já Mercier *et al.* (1999) observaram, após 21 dias, de suspensão, redução de 40% no peso do músculo sóleo e 18% no músculo extensor longo dos dedos. Kourtidou-Papadeli *et al.* (2004) relataram redução do peso muscular de 33,87% no sóleo e 15,08% no extensor longo dos dedos, após 45 dias de imobilização.

Alguns estudos mostram que longos períodos de suspensão resultam numa mudança da forma oxidativa para a glicolítica no metabolismo (Chi *et al.*, 1992; Yoshioka *et al.*, 1992), uma transição das fibras lentas para rápidas (Caiozzo *et al.*, 1996; Andersen, 1999; Stevens *et al.*, 1999), aumento na velocidade de contração e

diminuição da capacidade de gerar força (Yamashita e Yoshioka, 1993; Yamashita-Goto *et al.*, 1994; Caiozzo *et al.*, 1996).

2.5. Avaliação funcional do ciático

Em condições experimentais, a recuperação das lesões nervosas periféricas é estudada principalmente através de técnicas de eletrofisiologia, histologia e morfometria. Embora os parâmetros eletrofisiológicos e morfológicos sejam úteis, é importante conhecer o grau de recuperação funcional que eles implicam. A avaliação funcional de humanos é relativamente fácil, mas de animais é praticamente impossível com os mesmos métodos, o que motivou a busca por métodos específicos em condições experimentais (Monte-Raso *et al.*, 2006).

Gutmann e Gutmann (1942) demonstraram que a perda da capacidade de espalhar os dedos da pata traseira, em ratos, é um parâmetro confiável para avaliar o grau de lesão, bem como para seguir sua recuperação. Seu método, todavia, era muito rudimentar e não permitia quantificar nem uma coisa, nem outra. De Medinaceli *et al.* (1982, 1984) desenvolveram um método quantitativo, confiável e reprodutível da condição funcional do nervo ciático de ratos, para a avaliação do grau de lesão e da recuperação, denominado de Índice Funcional do Ciático, e que foi posteriormente modificado por outros autores (Carlton e Golberg, 1986; Bain *et al.*, 1989). Gasparini *et al.* (2007) estudaram várias formas de avaliação funcional, dentre elas a filmagem (Figura 2).

O Índice Funcional do Ciático (IFC) corresponde à análise funcional da marcha e é calculado com base nas impressões das pegadas (Figuras 1), utilizando a fórmula modificada por Bain *et al.* (1989) como se segue:

$$SFI = -38.3 \times \left(\frac{EPL - NPL}{NPL} \right) + 109.5 \times \left(\frac{ETS - NTS}{NTS} \right) + 13.3 \times \left(\frac{EIT - NIT}{NIT} \right) - 8.8$$

Em que:

N: normal, ou não operado; E: experimental, ou operado; PL (*de print length*): comprimento da pegada; TS (*de total toe spread*): distância do primeiro ao quinto dedos; IT (*de intermediate toes spread*): distância entre o segundo e o quarto dedos.

Na interpretação dos resultados, os valores calculados para o IFC próximos de zero são considerados normais, ou seja, ausência de lesão. Já os valores próximos a -100 indicam lesão total do nervo (Lago *et al.*, 2005).

A laserterapia demonstrou efeito sobre o índice funcional do ciático. Apesar de não melhorar de forma espetacular a recuperação funcional, ainda assim seus resultados são melhores quando comparados aos animais não irradiados (Endo *et al.*, 2008; Belchior *et al.*, 2009). Também foi observado que é mais eficaz do que a eletroestimulação em animais submetidos à axonotmese (Lana e André, 2007).

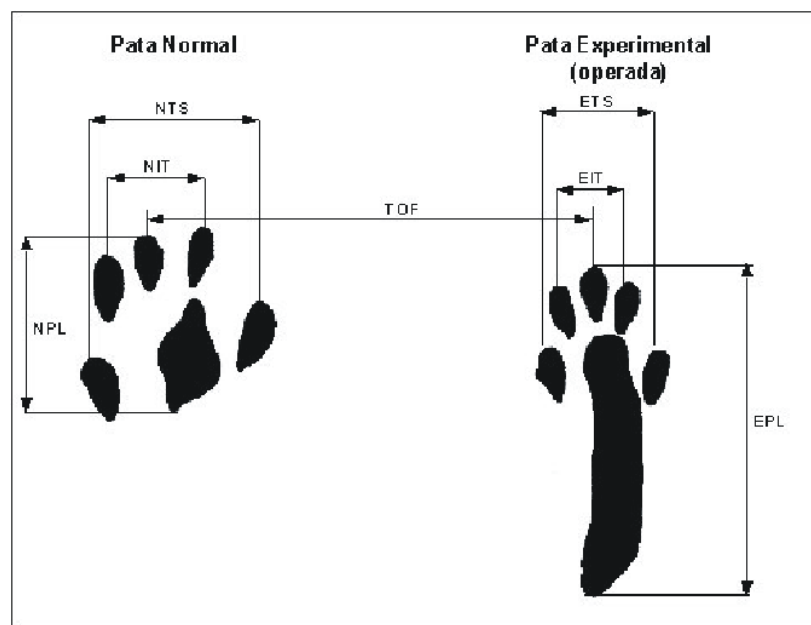


Figura 1. Representação esquemática dos parâmetros medidos para calcular o Índice Funcional do Ciático (IFC). **N**: Normal; **E**: Experimental (operada); **TS**: Abertura total dos dedos (1º ao 5º); **IT**: Abertura dos dedos intermediários (2º ao 4º); **PL**: Comprimento da pegada.

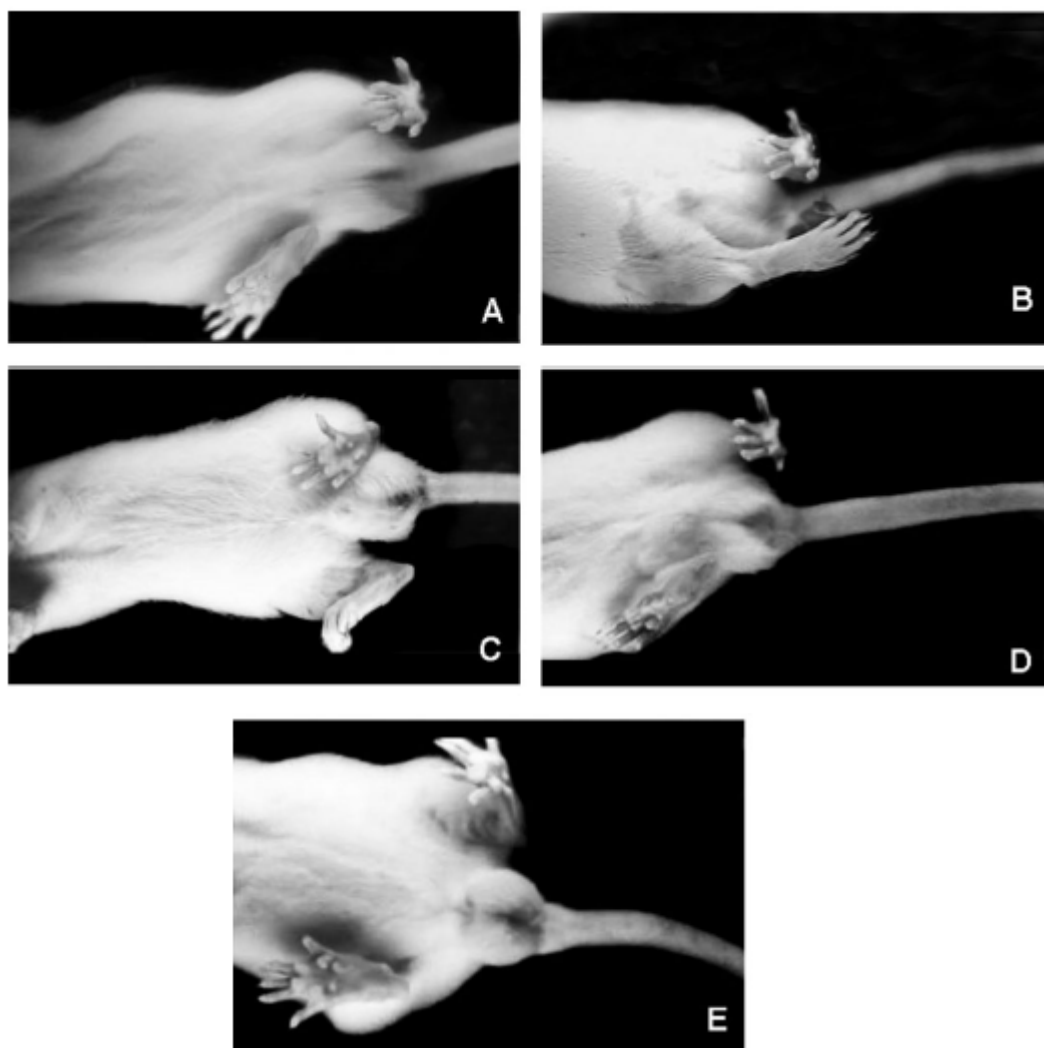


Figura 2. Registro da pegada do rato no ato da marcha, utilizando-se câmara filmadora. Deslocamento do rato no pré-operatório (A); no 1º dia de pós-operatório (B); no 7º dia de pós-operatório (C); no 14º dia de pós-operatório (D); no 21º dia de pós-operatório (E). Pata lesada (experimental) Direita e normal Esquerda (Gasparini *et al.*, 2007).

2.6. Avaliação morfométrica da regeneração nervosa

A avaliação morfométrica do nervo, geralmente, engloba os seguintes aspectos: número de fibras, área ou diâmetro de secção transversa da mielina, do axônio e da fibra nervosa, densidade de tecido conjuntivo, entre outros. Estes valores costumam ser avaliados em cerca de 10% da área do nervo, podendo ou não serem extrapolados para um valor equivalente à área total do mesmo (Mayhew e Sharma, 1984; Endo *et. al.*, 2008; Reis *et. al.*, 2009)

Mira (1979), estudando a regeneração de fibras nervosas mielinizadas de nervos ciáticos de ratos após lesão por esmagamento, observou que fibras

regeneradas aparecem em torno do 10° ao 15° dias, com retorno à normalidade em torno do 2° mês. Constatou também que o diâmetro médio das fibras regeneradas e mielinizadas não ultrapassava 80% do normal, mesmo após dois anos do esmagamento. No nervo normal, foi encontrado que 61% das fibras eram de grande calibre, com diâmetro médio equivalente a 131% do diâmetro médio das fibras restantes.

Mackinnon *et al.* (1985) estudaram a regeneração nervosa periférica em ratos, após a ressecção de um segmento de 4,5 cm do nervo ciático de trinta ratos e, observaram, crescimento axonal de $27,7 \pm 6,4$ mm. Análise morfológica, realizada em intervalos de 1 cm, demonstrou a formação de “brotamentos” axonais mielinizados no coto proximal e compartimentação de axônios regenerados, distribuídos em fascículos pequenos. Qualitativamente, constataram que a população de fibras mielínicas era percentualmente menor em número e diâmetro, quando comparada com valores normais.

2.7. Avaliação morfométrica dos músculos

A avaliação morfométrica do músculo se concentra no diâmetro ou área da fibra muscular e na densidade de tecido conjuntivo baseada na contagem de pontos (Lima *et al.*, 2007; Durigan *et al.*, 2006).

A lesão do nervo periférico causa profunda perda de massa e da capacidade de geração de força do músculo (Dow *et al.*, 2004). Além disso, a excitabilidade muscular também é alterada. A excitabilidade de um tecido pode ser definida pela relação entre a amplitude e a duração do estímulo. Quando um músculo está denervado ele torna-se menos excitável a uma estimulação direta (Salmons *et al.*, 2005).

As lesões nervosas periféricas podem causar muitas modificações na estrutura, metabolismo e expressão gênica do músculo esquelético. Uma mudança importante que ocorre quando músculos são denervados é o aumento de receptores de acetilcolina (ACh) no sarcolema. Receptores de ACh são normalmente expressos na junção neuromuscular em músculos denervados. Entretanto, a denervação causa aumento e proliferação das AChRs extrajuncionais. O que pode ser visto como um tipo de sinal que causa brotamentos de novos axônios dos nervos e também como

uma forma de preparação para formação de uma nova junção neuromuscular (Lieber, 2002).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal, do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa sob protocolo de número 45/2009 de 15/07/2009.

Foram utilizados 48 ratos, machos, com idade de 60 dias, da raça Wistar e clinicamente saudáveis. Os animais foram distribuídos em três grupos de 16 animais, sendo um utilizado como controle e outros dois que receberam diferentes doses do laser. Oito animais de cada grupo foram avaliados aos 14 dias e outros oito aos 28 dias. Os grupos foram:

- Grupo A: Tratamento com laser na dose de 4 J/cm², em três aplicações semanais.
- Grupo B: Tratamento com laser na dose de 6 J/cm², em três aplicações semanais.
- Grupo C: Grupo controle

3.2. Protocolo cirúrgico

Todos os animais foram anestesiados com a associação de cetamina (95mg/kg) e xilazina (10mg/kg) (Quinton, 2005), aplicada por via intraperitoneal, posicionados em decúbito lateral esquerdo e tiveram a região lateral do membro pélvico direito, preparada para procedimento asséptico, com limpeza utilizando-se éter, pois produtos como iodopovidona e álcool iodado interferem na absorção do laser. A antibioticoterapia profilática com cefalexina (50 mg/kg/IM) (Quinton, 2005), o antiinflamatório (flunixin meglumine 2,5g/kg/SC) (Quinton, 2005) e a morfina (5mg/kg/SC) (Quinton, 2005) foram aplicados em todos os animais, no momento da aplicação dos anestésicos.

Para acesso ao nervo ciático foi feita uma incisão de pele, na região lateral ao nível do terço proximal do fêmur. Em seguida, promoveu-se a separação e dissecação dos músculos bíceps femoral e semimembranoso, visualizando o nervo

ciático (Figura 3). Neste momento, foram instiladas 3 gotas de lidocaína 1% diretamente sobre o nervo objetivando anestesia tópica.

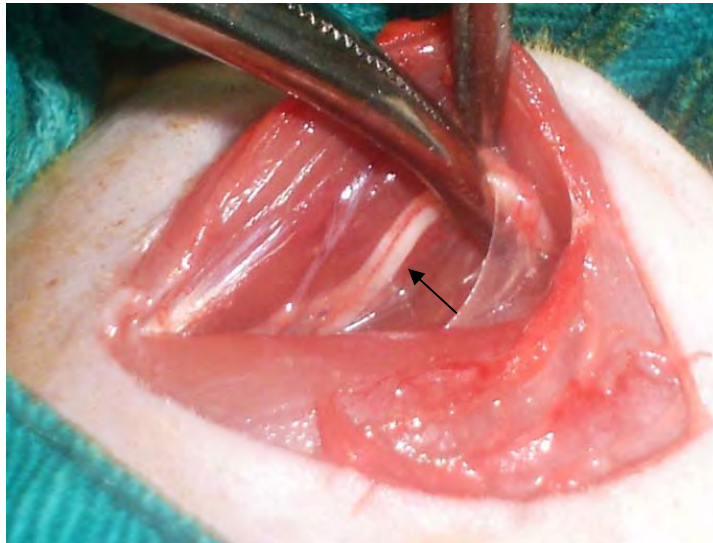


Figura 3. Nervos ciático (seta) observado após acesso cirúrgico na região lateral do membro pélvico direito ao nível do terço proximal do fêmur.

O local escolhido para realização da compressão para promoção da lesão no nervo ciático foi imediatamente antes da trifurcação em nervos sural, fibular e tibial, e que foi conseguida pela aplicação de uma pinça hemostática mosquito, por 1 minuto, apertando-se toda a cremalheira, tendo sido sempre realizada pela mesma pessoa. Esse tipo de lesão é denominada axonotmese cujo protocolo foi proposto por Bridge *et al.* (1994). As camadas musculares foram, então, reposicionadas e a pele suturada com fio mononáilon 3-0.

Após a recuperação anestésica os animais foram observados quanto a presença de sinais que indicassem a lesão no nervo ciático como: perda do controle motor, adução dos dedos (Monte-Raso *et al.*, 2006; Gasparini *et al.*, 2007).

3.3. Protocolo de suspensão

Os nervos periféricos são alvos freqüentes de lesões de origem traumática, como compressões e secções, que podem forçar o paciente a se manter em repouso (Milleisi, 2000). Neste sentido, a metodologia adotada mimetizou circunstâncias que envolvem a lesão do nervo ciático.

Após o procedimento cirúrgico, com o animal ainda sob anestesia, a cauda foi preparada para um procedimento asséptico. Realizou-se, então, caudectomia do

terço distal, para impedir automutilação. Os dois terços proximais foram protegidos com espuma, que foi envolvida por uma tira elástica tensionada homogeneamente, que por sua vez foi protegida e fixada por uma camada de esparadrapo na extremidade da imobilização. Na porção mais distal da imobilização foi aplicado um cadarço formando uma alça que permitiu a suspensão, assim como realizado por Barbosa (2009). Os animais somente foram suspensos após o retorno anestésico.

O sistema de suspensão foi estabelecido em duas estantes com 3 prateleiras cada, nas dimensões de 1 m de comprimento por 1,60 m de altura, 50 cm de profundidade e 42 cm de altura entre prateleiras. Na parte superior de cada prateleira foi fixada uma barra cilíndrica, rosqueada, com comprimento de 1,0 m e 4,5 mm de diâmetro, nas laterais da estante, que foi utilizada para fixação de acessórios como porcas borboletas que delimitaram uma área de 5 cm para movimentação de cada animal. Foi mantida uma distância de 10 cm entre os animais e da extremidade da estante. Assim apesar de vários animais estarem suspensos, em conjunto, não houve influência do grupo sobre o indivíduo, dadas as precauções com o espaçamento entre eles. Na base da prateleira, anteriormente e posteriormente, foi fixado um tubo de PVC 75 mm, medindo 100 cm de comprimento, com quatro orifícios de 5 cm de diâmetro localizados ao alcance de cada animal, para acesso a água.

Em cada prateleira foram suspensos 8 animais, sendo 4 na parte anterior e 4 na posterior. A alça presa à cauda do animal foi fixada na presilha metálica do sistema de suspensão e a altura foi regulada até que os membros pélvicos estivessem totalmente suspensos (Figura 4). A estrutura da estante permitiu aos animais movimentação com os membros torácicos, com apoio no assoalho da prateleira, porém, mantendo os membros pélvicos suspensos.

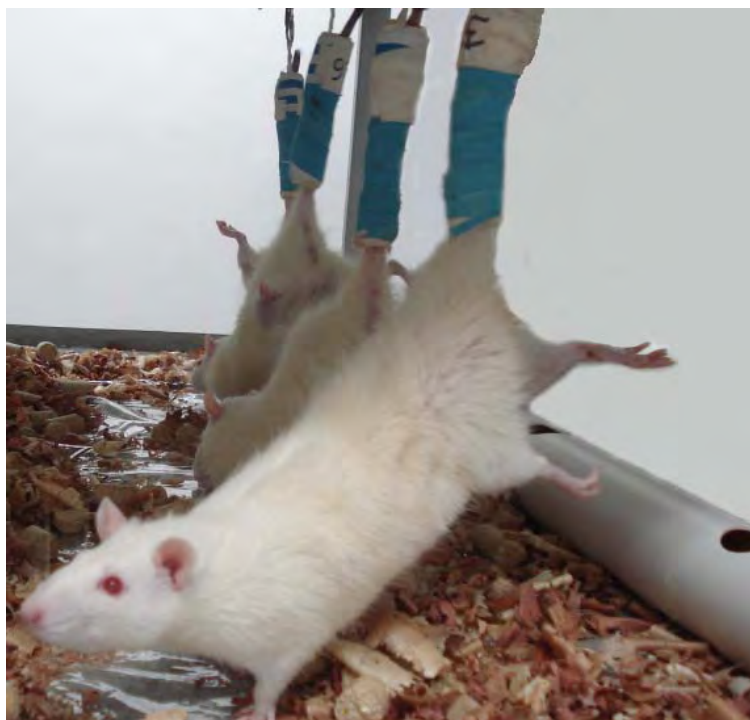


Figura 4. Animais imobilizados por sistema de suspensão pela cauda na porção anterior da prateleira de contenção.

Os ratos tiveram acesso livre à ração e água. A ração, maravalha e recipiente de água foram higienizados e trocados sempre que necessário.

Os animais foram mantidos sob imobilização por suspensão durante períodos de 14 e 28 dias dependendo dos subgrupos aos quais pertencessem.

3.4. Tratamento com laser

Nos grupos A e B, foram realizadas três aplicações semanais do laser de Arseneto de Gálio e Alumínio (GAAIAs)¹, de emissão contínua, com 40 mW de potência e comprimento de onda de 830 nm, com pelo menos um dia de intervalo entre elas, sempre nos mesmos horários. A primeira aplicação foi feita logo após a suspensão dos animais. O laser foi aplicado em 4 pontos sobre e ao redor do local da lesão, seguindo-se o trajeto do nervo ciático, do sentido proximal para distal. O ângulo de incidência do feixe foi mantido perpendicular (90°) à superfície irradiada. O grupo A recebeu a dose de 4 J/cm², enquanto o grupo B recebeu 6 J/cm². O procedimento para o grupo C (controle) foi similar à aplicação, mas sem emitir laser. A aplicação do laser (Figura 5) foi realizada sem uso de sedativos, pois o laser não produz desconforto.

¹ Bioset®, São Paulo, Brasil.

Os períodos de tratamento tiveram duração de 14 e 28 dias a partir do dia da cirurgia e conforme o subgrupo experimental, totalizando 6 e 12 aplicações, respectivamente. Após esse período, os animais foram submetidos à eutanásia em câmara de gás e sobredosagem anestésica com isofluorano.

Os animais foram acompanhados diariamente e comportamentos anormais (cuidado insuficiente com os pêlos, falta de apetite, comportamento agressivo e aparecimento de lesões auto-infringidas) foram anotados.



Figura 5. Aplicação do laser sobre a área de lesão do nervo ciático do rato.

3.5. Avaliação funcional do ciático

A avaliação funcional foi feita previamente à cirurgia (inicial) e aos 14 e 28 dias, dependendo dos subgrupos.

Os movimentos do animal ao caminhar (Índice funcional do ciático - IFC) foram analisados em uma caixa especialmente construída (47 cm de comprimento X 8,7 cm de largura) com uma linha de luz de ambos os lados e uma área escurecida no final da caminhada (Figura 6). O caminho foi recoberto com papel de fotocópia (80 g/m²), que tem uma absorção moderada e não é tão liso a ponto de permitir que o animal escorregue. A superfície plantar dos membros pélvicos foi pintada com nanquin preto, assegurando-se que toda a região fosse coberta. Esta combinação de tinta e papel teve por objetivo produzir uma impressão precisa com pouca distorção da impressão das pegadas devido à absorção excessiva da tinta (Johnston *et al.*, 1991).

A partir dessas impressões, utilizando um paquímetro digital, foram obtidas as medidas de acordo com o cálculo do índice funcional do ciático proposto por Bain *et al.* (1989), descrito a seguir.

$$SFI = -38.3 \times \left(\frac{EPL - NPL}{NPL} \right) + 109.5 \times \left(\frac{ETS - NTS}{NTS} \right) + 13.3 \times \left(\frac{EIT - NIT}{NIT} \right) - 8.8$$



Figura 6. Caixa para avaliação do índice funcional do ciático.

3.6. Avaliação morfométrica

Após a eutanásia o nervo ciático do membro operado e os músculos gastrocnêmio e sóleo de ambos os membros posteriores foram coletados e

submetidos à análise histológica nos dias 14 e 28 após a cirurgia. Para as análises morfométricas utilizou-se o programa *Image Pro Plus*.

O nervo ciático, em sua região lesionada, foi fixado em solução de glutaraldeído 4%, contrastado com tetróxido de ósmio 1%, desidratado, embebido e incluído em resina. Foram feitos cortes transversais ao eixo principal do nervo, no centro da região lesionada, com 2 μm de espessura que foram corados com azul de toluidina e borato de sódio 1% e avaliados em microscopia de luz. Foi utilizada a objetiva de 4X para mensurar a área transversal do nervo. Objetiva de maior aumento (100X) foi usada para fotografar 10 áreas aleatórias do nervo (representando, aproximadamente, 10% da sua área total), permitindo assim a avaliação morfométrica da área de lesão (Mayhew e Sharma, 1984).

Foram realizadas as seguintes avaliações morfométricas do nervo: percentual de tecido conjuntivo, mielina e axônio; número de fibras; diâmetro, área e soma da área de mielina; mielinização; diâmetro, área e soma da área do axônio; diâmetro, área e soma da área da fibra.

Os percentuais de tecido conjuntivo, mielina e axônio foram avaliados por contagem de pontos, utilizando-se um retículo contendo 100 intersecções de retas (Figura 7). Foram contados os pontos incidentes no tecido conjuntivo, mielina e axônio, nas 10 áreas fotografadas do nervo, perfazendo um total de 1000 pontos por nervo. Desse modo, as porcentagens foram calculadas relacionando-se a soma do número de pontos coincidentes nas intersecções de reta sobre cada porção do nervo dividida pelo número total de pontos.

O número de fibras do nervo foi determinado pela contagem de todas as fibras presentes na área fotografada sendo excluídas aquelas fibras que não se encontravam inteiramente dentro do campo avaliado.

Os diâmetros, interno (axônio) e externo (axônio + mielina), da fibra do nervo (Figura 8) foram determinados em todas as fibras presentes nas 10 áreas fotografadas. As áreas, interna (A_i , área do axônio) e externa (A_e , área da fibra do nervo), foram calculadas através da equação $A = \pi r^2$, para fibras circulares, e $A = \pi ab$, para fibras elípticas, a partir dos diâmetros interno e externo. A área de mielina foi considerada igual à diferença entre as áreas externa e interna da fibra. Após a mensuração de cada uma das áreas citadas acima, para todas as fibras presentes nas áreas fotografadas, foi realizada a soma das áreas, para cada item separadamente. A mielinização foi calculada a partir da relação entre a soma da

área de mielina e a área do nervo fotografada, conseqüentemente é um parâmetro sem unidade.

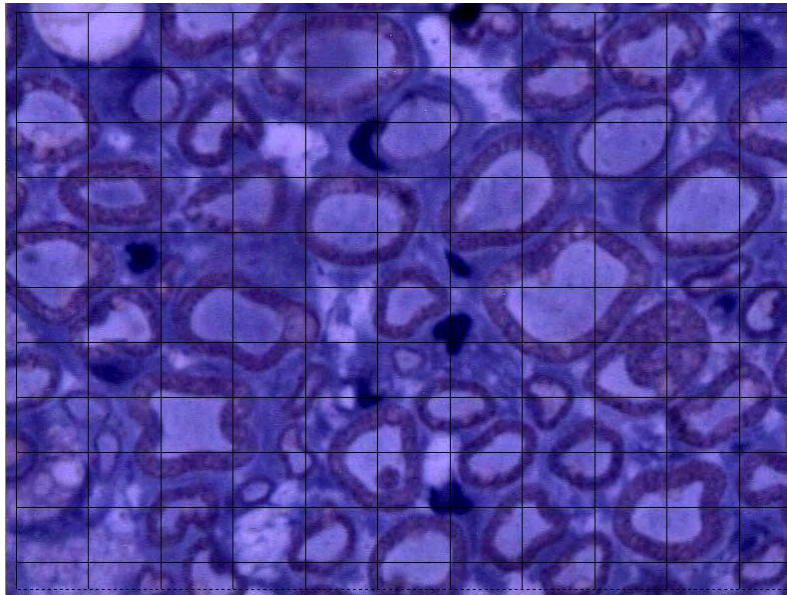


Figura 7. Grade sobre o corte do nervo ciático para contagem de pontos. Tetróxido de ósmio 1% e azul de toluidina + borato de sódio 1%.

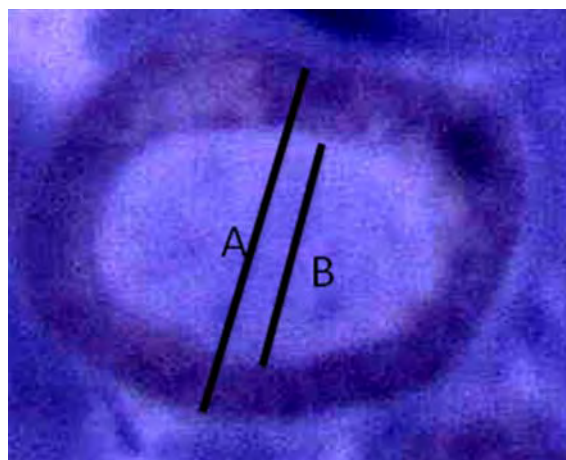


Figura 8. Fibra mielinizada do nervo ciático onde A e B representam o seu diâmetro externo (axônio e mielina) e interno (axônio), respectivamente. Tetróxido de ósmio 1% e azul de toluidina + borato de sódio 1%.

Após a coleta cada músculo foi pesado separadamente e fixado em solução de glutaraldeído 4%. O terço médio de cada músculo foi desidratado, embebido e incluído em resina. Os cortes histológicos foram transversais ao eixo principal das fibras musculares, com 5 μ m de espessura e foram corados com azul de toluidina + borato de sódio 1%.

O diâmetro das fibras musculares (Figura 10) foi mensurado utilizando-se o programa Image Pro Plus. Foram avaliadas 250 fibras por músculo da seguinte forma: 10 fibras por campo, cinco campos por corte, num total de cinco cortes por músculo, em secção transversal sob objetiva de 20X. Os percentuais de tecido conjuntivo e de fibras musculares foram mensurados por contagem de pontos. Com esta finalidade, foi utilizado um retículo contendo 100 intersecções de reta (Figura 9). Foram contados os pontos incidentes no endomísio, perimísio e fibras musculares, em cinco áreas por corte, sendo cinco cortes por animal, perfazendo um total de 2500 pontos por músculo. Desse modo, a densidade de tecido conjuntivo e de fibras musculares foi calculada relacionando-se a soma do número de pontos coincidentes nas intersecções de reta sobre o tecido conjuntivo (endomísio e perimísio) e sobre músculo, dividido pelo número total de pontos (Durigan *et al.*, 2006; Lima *et al.*, 2007).

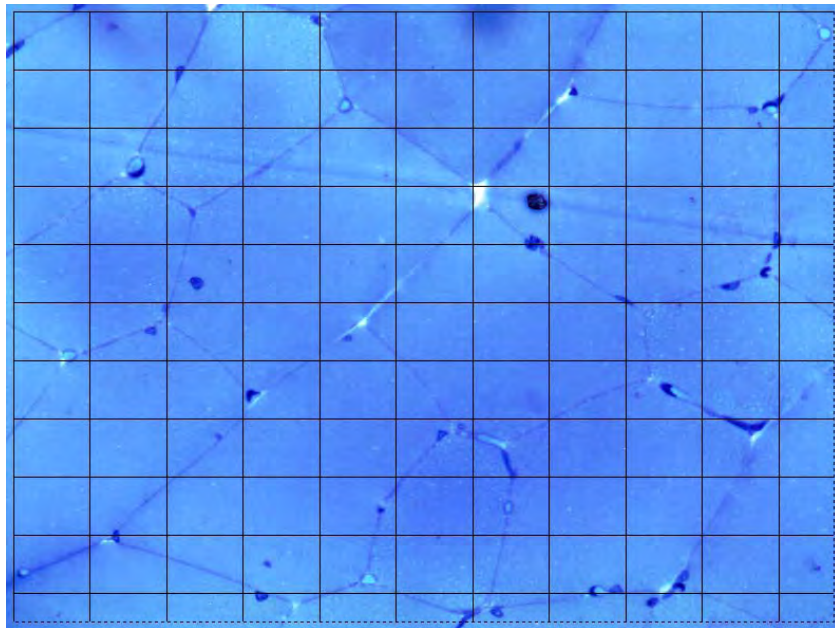


Figura 9. Grade sobre o corte histológico do músculo com grade para contagem de pontos. Azul de toluidina + borato de sódio 1%.

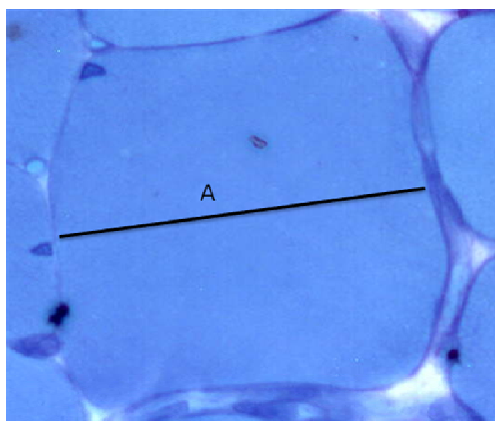


Figura 10. Corte histológico da fibra muscular onde A representa seu diâmetro. Azul de toluidina + borato de sódio 1%.

3.7. Análise estatística

As variáveis foram submetidas aos testes de Normalidade (Lilliefors) e Homocedasticidade (Cochran) e, posteriormente, à análise de variância. Quando apresentaram significância, foi realizado o teste de Duncan. Para a comparação entre períodos de avaliação utilizou-se o teste F. Ocorrendo significância em análises com dois graus de liberdade para tratamentos, foram realizados os testes de Duncan ou de Tukey, no intuito de evitar erro estatístico tipo I ou II.

Quando não atenderam as premissas de normalidade e homocedasticidade, mesmo após as transformações apropriadas, os dados foram submetidos ao teste não-paramétrico de Wilcoxon (quando feitas comparações entre os períodos de avaliação) ou Kruskal-wallis (quando feitas comparações entre os grupos) (SAEG,1999).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para realização dos testes, foi provocada uma lesão nervosa, bem como, foi simulado o modelo denominado hipocinesia dos membros pélvicos, por meio da imobilização por suspensão, o repouso ao qual um paciente é submetido quando acometido por lesões nervosas de origem traumática que impossibilitam a locomoção. Foram, então, avaliados os músculos sóleo e gastrocnêmico, o nervo ciático lesionado e o índice funcional do ciático, nestas circunstâncias, e após o nervo ciático ter sido submetido a aplicações de laser terapêutico.

Após a cirurgia e compressão do nervo ciático, os animais apresentaram os sinais de denervação, caracterizados por ausência de controle do membro pélvico a partir da área da lesão e ausência de sensibilidade. Não foi observada nenhuma complicação inerente ao pós-operatório cirúrgico, sendo possível a retirada dos pontos das suturas de todos os animais oito dias após a cirurgia.

A automutilação em dígitos do membro operado foi praticada por dois animais sendo, um animal do grupo B14 e um do grupo C28. O mesmo foi observado por Khullar *et al.* (1995) que acreditam que a automutilação deve-se ao retorno da função sensitiva, acompanhada por impressões desagradáveis. Como, nesse experimento, nenhum outro comportamento anormal foi observado, a automutilação pode ser imputada a um tipo de resposta individual. Lago *et al.* (2005) e Dijkstra *et al.* (2000) também observaram automutilação após a lesão do nervo.

4.1. Avaliação morfométrica do nervo

Quando se compara as porcentagens de tecidos aos 14 e 28 dias observa-se uma mudança ($p < 0,05$) nas mesmas, sendo esta alteração decrescente para a porcentagem de tecido conjuntivo e crescente para a porcentagem de mielina e de axônio, dentro de cada grupo (Figuras 11). Foi observado aos 14 dias que os grupos A e B destacaram-se ($p < 0,05$), em relação ao grupo C, com maior porcentagem de mielina. Já aos 28 dias, apenas o grupo B apresentou maior porcentagem ($p < 0,05$) de mielina em relação ao grupo C. O grupo C28 destacou-se ($p < 0,05$) pela maior porcentagem de axônio em relação aos outros dois. As porcentagens de tecido conjuntivo, de mielina e do axônio foram analisadas a partir dos conceitos que estabeleceram que a velocidade de regeneração de um nervo depende do fato de o axônio ser ou não mielinizado e, no caso de fibras mielinizadas, da espessura da bainha de mielina. O crescimento dos axônios e das células de Schwann estende-se da extremidade do tronco nervoso proximal para o segmento distal, em seguida a bainha de mielina surge no axônio em regeneração (Peacock e Van Winkle, 1976). E, segundo Swaim (1981), para que ocorra a mielinização, os axônios devem atravessar o ponto de secção. Também, segundo Haines (1972), a regeneração pode ser dificultada pela invasão de tecido conjuntivo, resultando em formação de neuroma.

Desta forma, o comportamento destas porcentagens auxilia no acompanhamento da recuperação do nervo, sendo, nestas circunstâncias, esperado o aumento da porcentagem de axônios e de mielina no local da lesão. Como os grupos tratados apresentaram maior porcentagem de mielina aos 14 dias, pode-se considerar que estes tiveram uma recuperação mais avançada da estrutura do nervo, quando comparado ao grupo controle. Entretanto, aos 28 dias apenas o grupo B manteve a recuperação mais avançada, sugerindo, dessa forma, interferência da dose no tratamento.

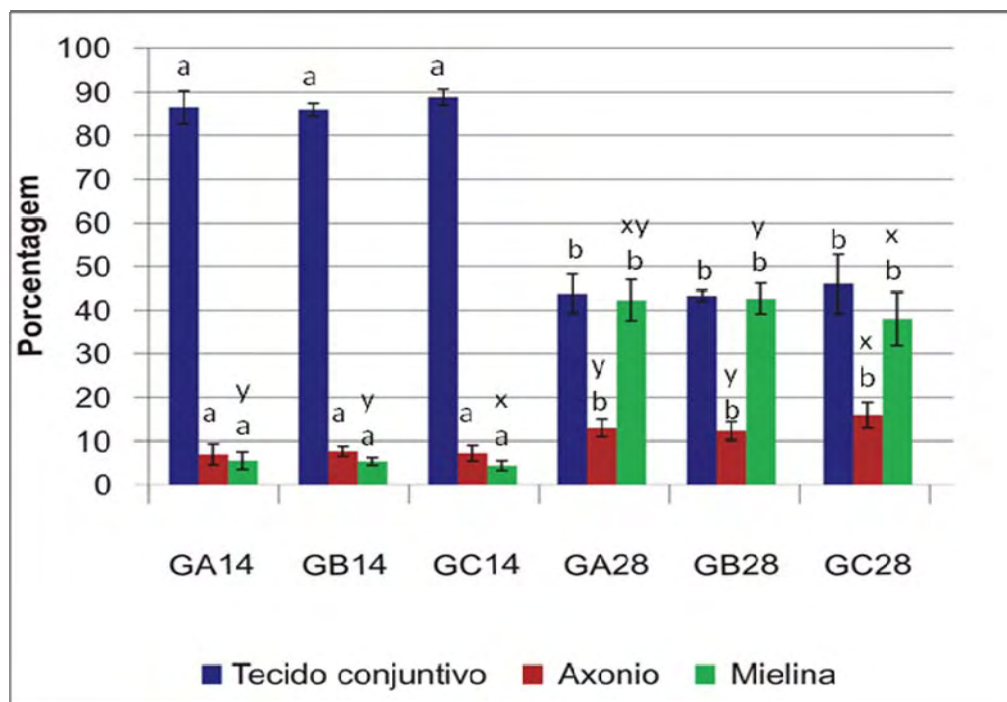


Figura 11. Porcentagem do tecido conjuntivo, axônio e mielina do nervo ciático nos vários grupos e períodos de avaliação. Onde: GA14, GB14 e GC14 correspondem aos Grupos A, B e C aos 14 dias, respectivamente. Enquanto GA28, GB28 e GC28 correspondem aos Grupos A, B e C aos 28 dias, respectivamente. As letras a e b representam diferenças estatísticas entre os momentos de avaliação; as letras y e x representam diferenças estatísticas encontradas entre os grupos.

Tabela 1. Valores médios das porcentagens de tecido conjuntivo, de axônio e de mielina no nervo ciático lesionado.

		GA	GB	GC
Porcentagem de tecido conjuntivo	14	86,888 ^a	86,55 ^a	88,7 ^a
	28	44,038 ^b	43,363 ^b	46,213 ^b
Porcentagem de axônio	14	7,225 ^a	7,925 ^a	7,075 ^a
	28	13,363 ^{bAB}	12,663 ^{bA}	15,9 ^{bB}
Porcentagem de mielina	14	5,888 ^{aA}	5,525 ^{aA}	4,225 ^{aB}
	28	42,6 ^{bAB}	43,975 ^{bA}	37,888 ^{bB}

Letras minúsculas indicam diferenças ($p < 0,05$) entre os períodos de avaliação dentro de cada grupo; letras maiúsculas indicam diferenças ($p < 0,05$) entre os grupos.

O número de fibras do nervo não apresentou diferença entre os grupos. Já entre os períodos de avaliação houve um aumento ($p < 0,05$) para os grupos A e C. O aumento do número de fibras do nervo entre os períodos de avaliação (Figura 12) pode ser imputado ao processo normal de reparação tecidual, esperado na axonotmese, uma vez que segundo Seddon (1943) e Sunderland (1951) citados por Bridge (1994) a recuperação do nervo após axonotmese é relacionada ao crescimento axonal individual através dos tubos intactos do endoneuro da lâmina basal das células de Schwann e, o aumento do número de fibras do nervo é esperado durante sua recuperação.

A diferença estatística quando comparados os momentos de avaliação para o grupo A e o grupo C (tratado com 4 J/cm²), pode ser em consequência de uma evolução menor nos primeiros 14 dias de pós operatório, representado por uma recuperação do número de fibras mais lenta do que o grupo B, pois houve diferença entre os períodos de avaliação. O grupo B (tratado com 6 J/cm²) não apresentou diferença entre os 14 e 28 dias de avaliação, ou seja, os resultados absolutos foram mais próximos. Portanto, o laser pode ter acelerado o processo de reparação, aumentando o número de fibras regeneradas já a partir dos 14 dias de tratamento. Dessa forma, o tratamento com 6 J/cm² apresentou melhor resposta quando comparado a dosagem de 4 J/cm². Portanto, esse tratamento deve ser considerado para essa variável. Assim como neste experimento Chen *et al.* (2005) e Gigo-Benato (2010) não observaram diferenças estatística em relação ao controle, independente do tipo de lesão do nervo ciático. Já Endo *et al.* (2008) observaram um maior número de fibras no grupo submetido a laserterapia, após a lesão por compressão.

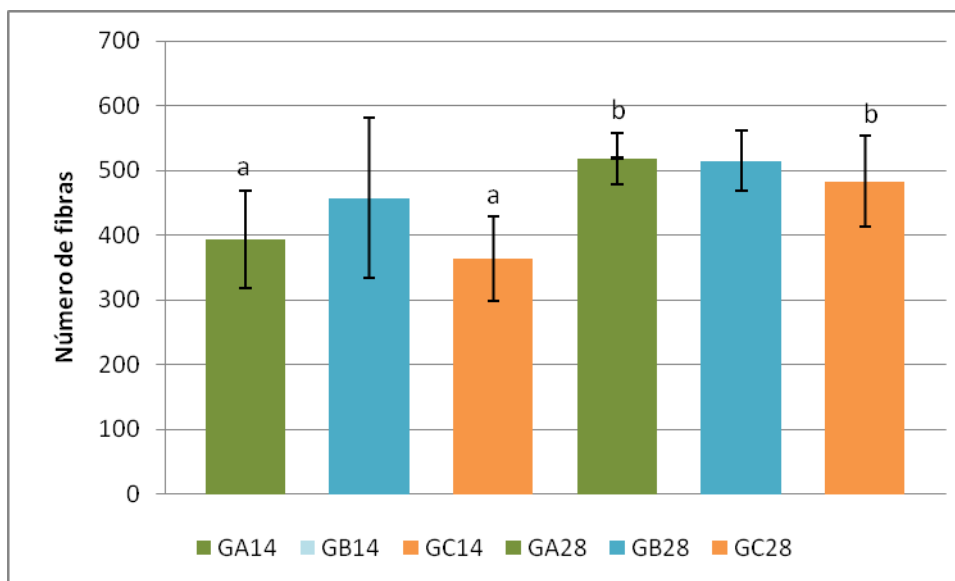


Figura 12. Número de fibras do nervo ciático nos vários grupos e períodos de avaliação. Onde: GA14, GB14 e GC14 correspondem aos Grupos A, B e C aos 14 dias, respectivamente. Enquanto GA28, GB28 e GC28 correspondem aos Grupos A, B e C aos 28 dias, respectivamente. As letras a e b representam diferenças estatísticas entre os momentos de avaliação.

Tabela 2. Valores médios do número de fibras do nervo ciático lesionado.

		GA	GB	GC
Número de fibras	14	394 ^a	457,125	364,25 ^a
	28	518,625 ^b	515	483,25 ^b

Letras minúsculas indicam diferenças ($p < 0,05$) entre os períodos de avaliação dentro de cada grupo.

Para o diâmetro do axônio (Figura 13), na comparação entre os períodos de avaliação, apenas o grupo C apresentou variação ($p < 0,05$). Já a comparação entre os grupos revelou que não houve diferença aos 14 dias. Aos 28 dias, os grupos A e B foram consideravelmente ($p < 0,05$) menores que o grupo C.

A área do axônio (Figura 14) não variou entre os períodos e ao comparar os grupos, obteve-se resultado igual ao relatado para o diâmetro do axônio.

A soma da área do axônio (Figura 15) variou entre os períodos para os grupos A e C. Na comparação entre os grupos aos 14 dias o grupo B apresentou o maior valor ($p < 0,05$), já aos 28 dias o grupo C que o fez ($p < 0,05$).

Aos 14 dias os grupos tratados mantiveram-se semelhantes ao controle. Já aos 28 dias os grupos tratados apresentaram valores menores do que para as variáveis de estudo do axônio. Gigo-Benato (2010) observou que a área do axônio em alguns de seus grupos submetidos à laserterapia foi menor do que no grupo controle 30 dias após a lesão. Chen *et al.* (2005) ao trabalharem com uma falha no nervo ciático

observaram que um dos seus grupos tratados com laser apresentou uma área axonal estatisticamente menor do que o controle.

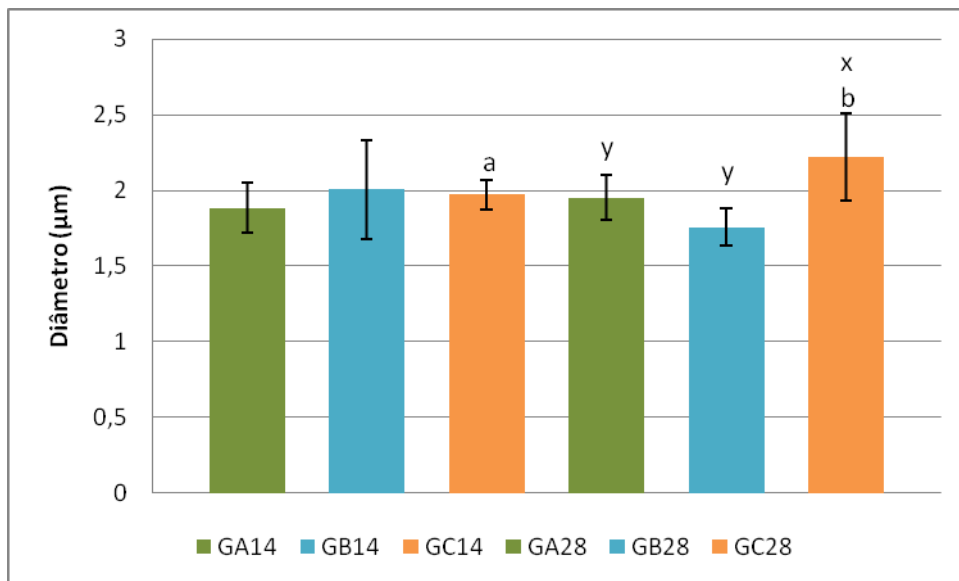


Figura 13. Diâmetro médio do axônio do nervo ciático nos vários grupos e períodos de avaliação. Onde: GA14, GB14 e GC14 correspondem aos Grupos A, B e C aos 14 dias, respectivamente. Enquanto GA28, GB28 e GC28 correspondem aos Grupos A, B e C aos 28 dias, respectivamente. As letras a e b representam diferenças estatísticas entre os momentos de avaliação; as letras y e x representam diferenças estatísticas encontradas entre os grupos.

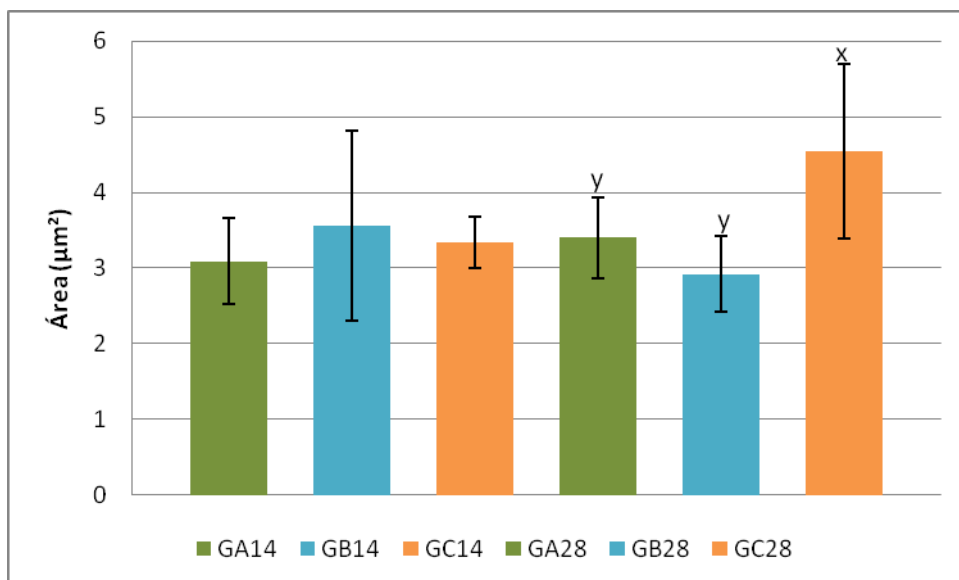


Figura 14. Área média do axônio do nervo ciático nos vários grupos e períodos de avaliação. Onde: GA14, GB14 e GC14 correspondem aos Grupos A, B e C aos 14 dias, respectivamente. Enquanto GA28, GB28 e GC28 correspondem aos Grupos A, B e C aos 28 dias, respectivamente. As letras y e x representam diferenças estatísticas encontradas entre os grupos em cada momento.

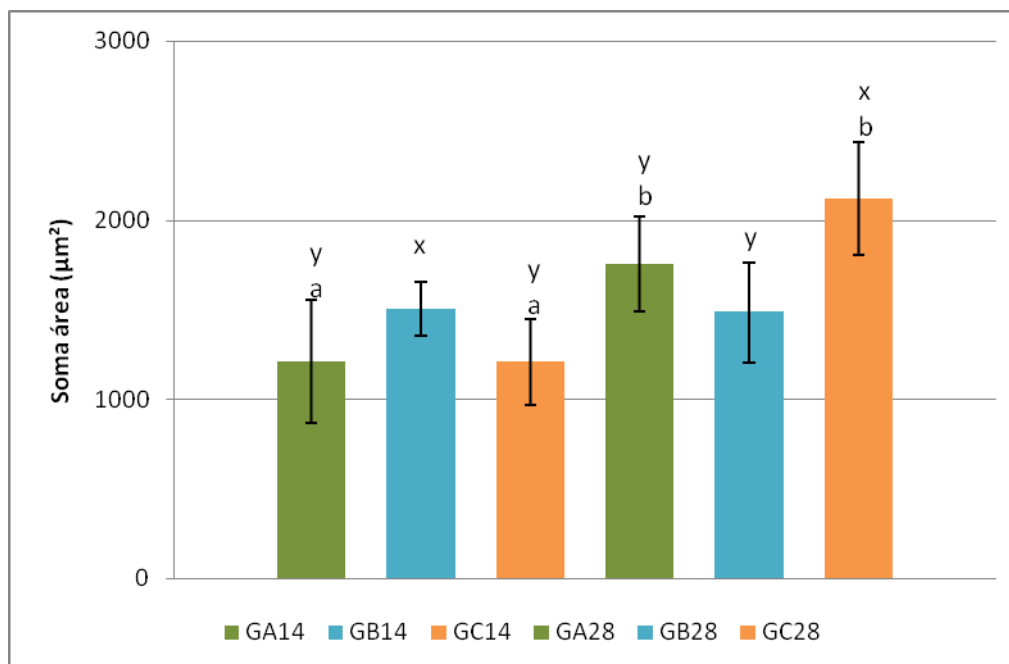


Figura 15. Soma da área do axônio do nervo ciático nos vários grupos e períodos de avaliação. Onde: GA14, GB14 e GC14 correspondem aos Grupos A, B e C aos 14 dias, respectivamente. Enquanto GA28, GB28 e GC28 correspondem aos Grupos A, B e C aos 28 dias, respectivamente. As letras a e b representam diferenças estatísticas entre os momentos de avaliação; as letras y e x representam diferenças estatísticas encontradas entre os grupos.

Tabela 3. Valores médios do diâmetro, área e soma da área do axônio do nervo ciático lesionado.

		GA	GB	GC
Diâmetro	14	1,885	2,007	1,973 ^a
	28	1,951 ^A	1,757 ^A	2,222 ^{bB}
Área	14	3,090	3,562	3,333
	28	3,403 ^A	2,922 ^A	4,541 ^B
Soma da área	14	1686,685 ^{aA}	1504,820 ^B	1127,018 ^{aA}
	28	1755,339 ^{bA}	1485,734 ^A	2120,632 ^{bB}

Letras minúsculas indicam diferenças ($p < 0,05$) entre os períodos de avaliação dentro de cada grupo; letras maiúsculas indicam diferenças ($p < 0,05$) entre os grupos.

Nesse experimento, avaliou-se o diâmetro (Figura 16), a área (Figura 17), a soma da área (Figura 18) e a mielinização (Figura 19), permitindo, dessa maneira, avaliar os possíveis efeitos do laser na recuperação da fibra. Todas estas variáveis aumentaram ($p < 0,05$) entre os períodos de avaliação, dentro de cada grupo. Aos 14 dias, o grupo C apresentou os menores ($p < 0,05$) diâmetro, soma da área de mielina e mielinização em relação aos grupos tratados. Já aos 28 dias não foram encontradas diferenças entre os grupos. Segundo Oh (2001) citado por Gigo-Benato (2010), a bainha de mielina é responsável pela condução do potencial de ação ao

longo do axônio e a falta ou redução dela no nervo causa a diminuição ou perda da função axonal. Também, após lesão no nervo, a última parte da regeneração da fibra mielinizada é o depósito de mielina (Peacock e Van Winkle, 1976; Swaim, 1981).

Como esperado todas estas variáveis aumentaram ($p < 0,05$) entre os períodos de avaliação, dentro de cada grupo, até porque, segundo Peacock e Van Winkle (1976), a mielina continua a ser depositada sobre o axônio até um ano após a lesão. Assim, o efeito da laserterapia foi identificado, principalmente, nos primeiros 14 dias de tratamento, quando os grupos tratados apresentaram melhores resultados para as variáveis relacionadas à mielina. A ausência de diferenças entre os grupos aos 28 dias pode ser explicado pelo fato de que a regeneração após a lesão por compressão apresenta uma recuperação rápida, sem qualquer tipo de tratamento. Por exemplo, na quarta semana após a lesão por compressão, Varejão *et al.* (2004) observaram cerca de 80% da recuperação da função sem nenhuma intervenção terapêutica.

Os resultados evidenciam que a laserterapia estimulou a deposição de mielina nos nervos tratados, influenciando positivamente a recuperação. O que se assemelha aos achados de Rochkind *et al.* (1987), Rochkind e Ouakaine (1992), Rochkind (2004) e Endo *et al.* (2008), que afirmaram que o laser terapêutico induz a ativação das células nervosas e aumenta significativamente o crescimento axonal e a sua mielinização. Também foi demonstrado por Van Breugel e Bar (1993) e Wollman e Rochkind (1998) que o laser induz a proliferação de células de Schwann, afeta o metabolismo da célula nervosa e induz o aumento dos processos celulares. Da mesma forma, Khullar *et al.* (1995) demonstraram que o laser acelera o processo de regeneração, após lesão por axonotmese, em nervo misto de mamíferos, utilizando o laser de GaAIs (830 nm) numa dose de 6 J/cm², diariamente, durante 28 dias.

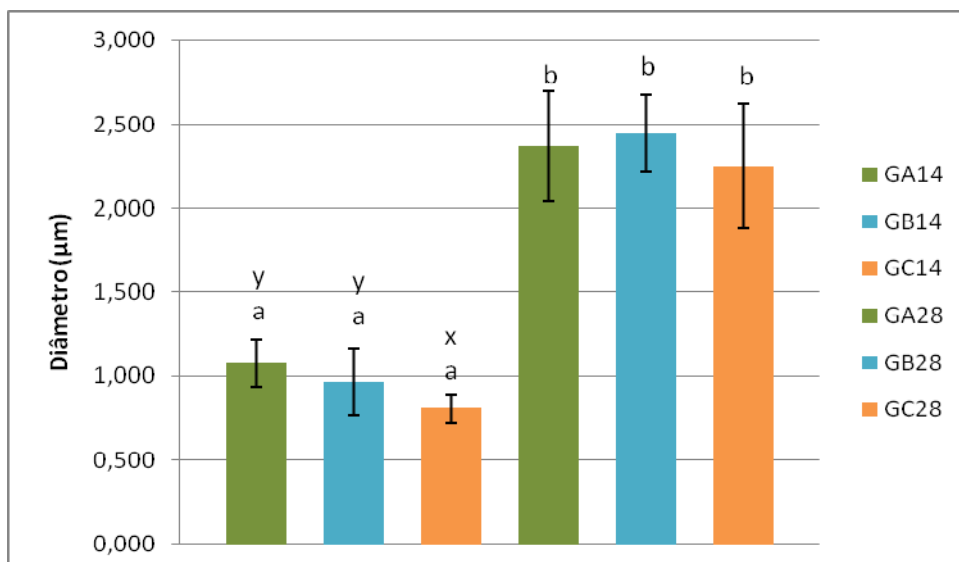


Figura 16. Diâmetro médio da mielina do nervo ciático nos vários grupos e períodos de avaliação. Onde: GA14, GB14 e GC14 correspondem aos Grupos A, B e C aos 14 dias, respectivamente. Enquanto GA28, GB28 e GC28 correspondem aos Grupos A, B e C aos 28 dias, respectivamente. As letras a e b representam diferenças estatísticas entre os momentos de avaliação; as letras y e x representam diferenças estatísticas encontradas entre os grupos.

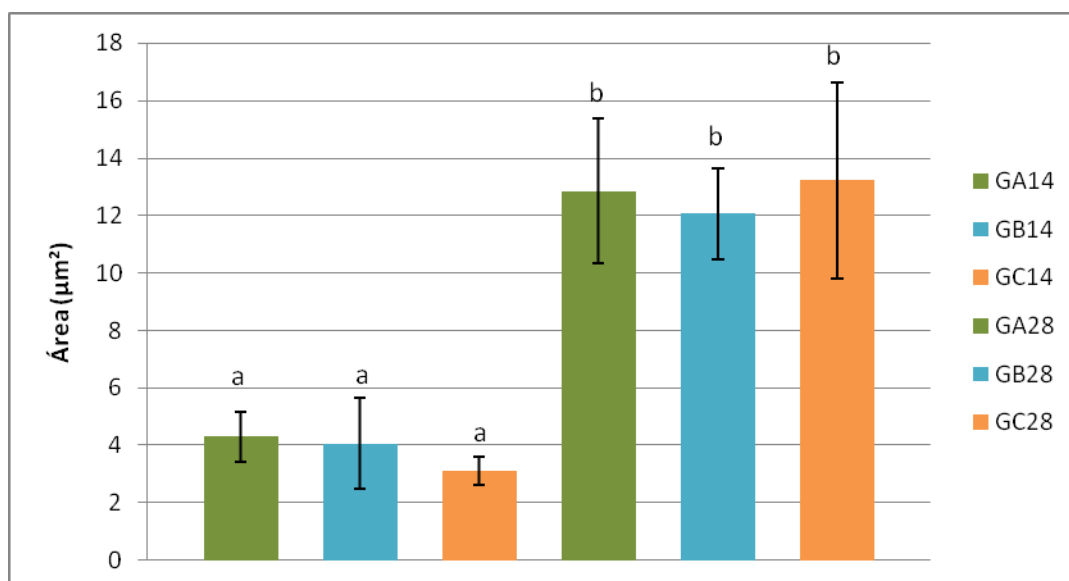


Figura 17. Área média da mielina do nervo ciático nos vários grupos e períodos de avaliação. Onde: GA14, GB14 e GC14 correspondem aos Grupos A, B e C aos 14 dias, respectivamente. Enquanto GA28, GB28 e GC28 correspondem aos Grupos A, B e C aos 28 dias, respectivamente. As letras a e b representam diferenças estatísticas entre os momentos de avaliação; as letras y e x representam diferenças estatísticas encontradas entre os grupos.

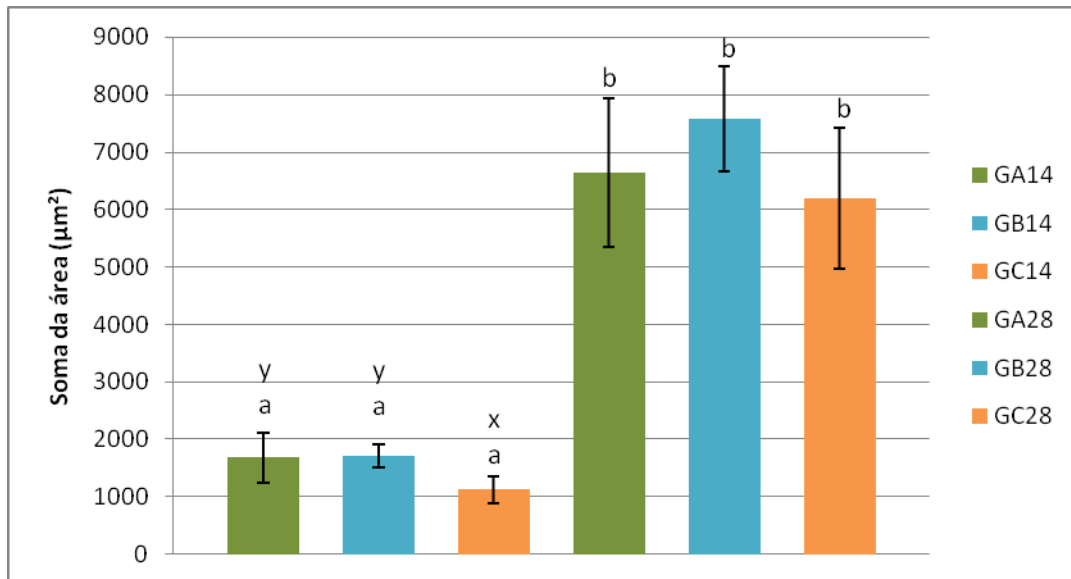


Figura 18. Soma da área da mielina do nervo ciático nos vários grupos e períodos de avaliação. Onde: GA14, GB14 e GC14 correspondem aos Grupos A, B e C aos 14 dias, respectivamente. Enquanto GA28, GB28 e GC28 correspondem aos Grupos A, B e C aos 28 dias, respectivamente. As letras a e b representam diferenças estatísticas entre os momentos de avaliação; as letras y e x representam diferenças estatísticas encontradas entre os grupos em cada momento.

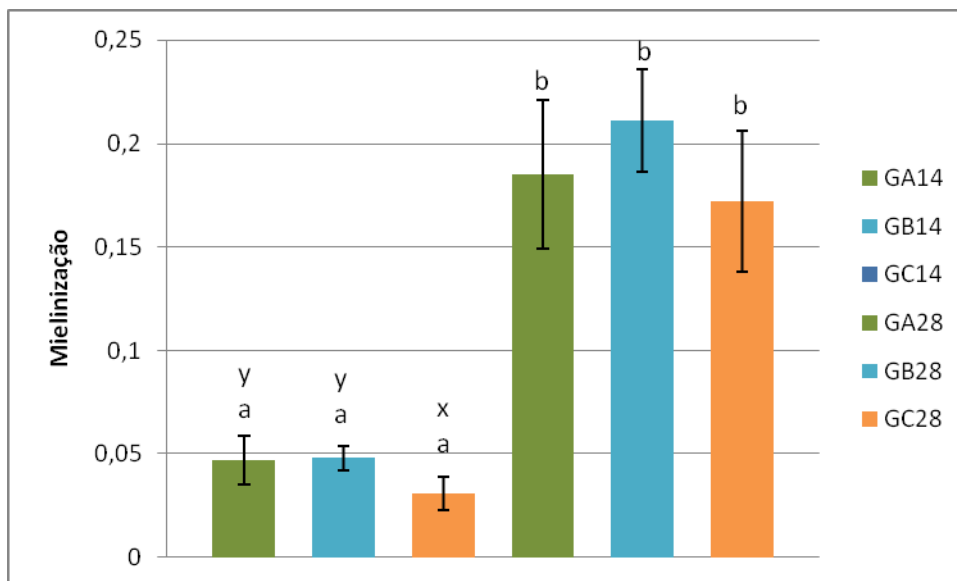


Figura 19. Mielinização do nervo ciático nos vários grupos e períodos de avaliação. Onde: GA14, GB14 e GC14 correspondem aos Grupos A, B e C aos 14 dias, respectivamente. Enquanto GA28, GB28 e GC28 correspondem aos Grupos A, B e C aos 28 dias, respectivamente. As letras a e b representam diferenças estatísticas entre os momentos de avaliação; as letras y e x representam diferenças estatísticas encontradas entre os grupos em cada momento.

Tabela 4. Valores médios do diâmetro, área, soma da área da mielina e mielinização do nervo ciático lesionado.

		GA	GB	GC
Diâmetro	14	1,078 ^{aA}	0,966 ^{aA}	0,806 ^{aB}
	28	2,370 ^b	2,446 ^b	2,249 ^b
Área	14	4.308 ^{aA}	4.074 ^{aA}	3.105a ^B
	28	12,848 ^b	12, 508 ^b	13,223 ^b
Soma da área	14	1686.685 ^{aA}	1709.135 ^{aA}	1127,018 ^{aB}
	28	6640,077 ^{bA}	7576,237 ^{bA}	6192,113 ^{bB}
Mielinização	14	0,047 ^{aA}	0,048 ^{aA}	0,031 ^{aB}
	28	0,185 ^{bA}	0,211 ^{bA}	0,172 ^{bB}

Letras minúsculas indicam diferenças ($p < 0,05$) entre os períodos de avaliação dentro de cada grupo; letras maiúsculas indicam diferenças ($p < 0,05$) entre os grupos.

Ocorreu aumento ($p < 0,05$) nas medidas do diâmetro, da área e da soma da área da fibra para todos os grupos entre os períodos de avaliação (Figura 23). O que era esperado com base em dados estabelecidos por Peacock e Van Winkle, (1976), que observaram crescimento do axônio e deposição de mielina de forma continuada durante a regeneração.

Não houve variação entre os grupos em relação ao diâmetro (Figura 20) e à área da fibra do nervo (Figura 21).

Aos 14 dias a soma da área da fibra (Figura 22) os grupos A e B, apresentaram soma maior do que grupo C ($p < 0,05$). Já aos 28 dias não houve variação entre os grupos.

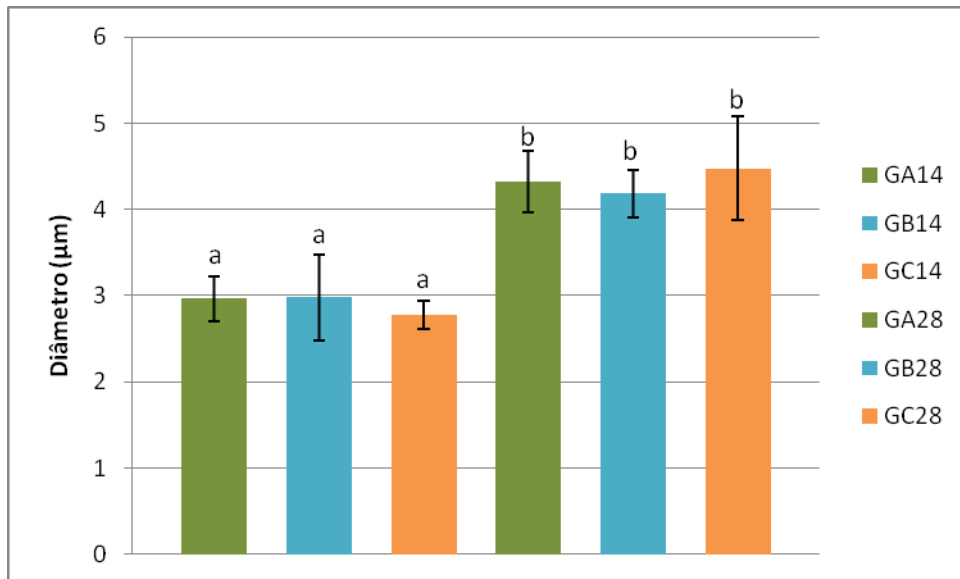


Figura 20. Diâmetro médio da fibra do nervo ciático nos vários grupos e períodos de avaliação. Onde: GA14, GB14 e GC14 correspondem aos Grupos A, B e C aos 14 dias, respectivamente. Enquanto GA28, GB28 e GC28 correspondem aos Grupos A, B e C aos 28 dias, respectivamente. As letras a e b representam diferenças estatísticas entre os momentos de avaliação.

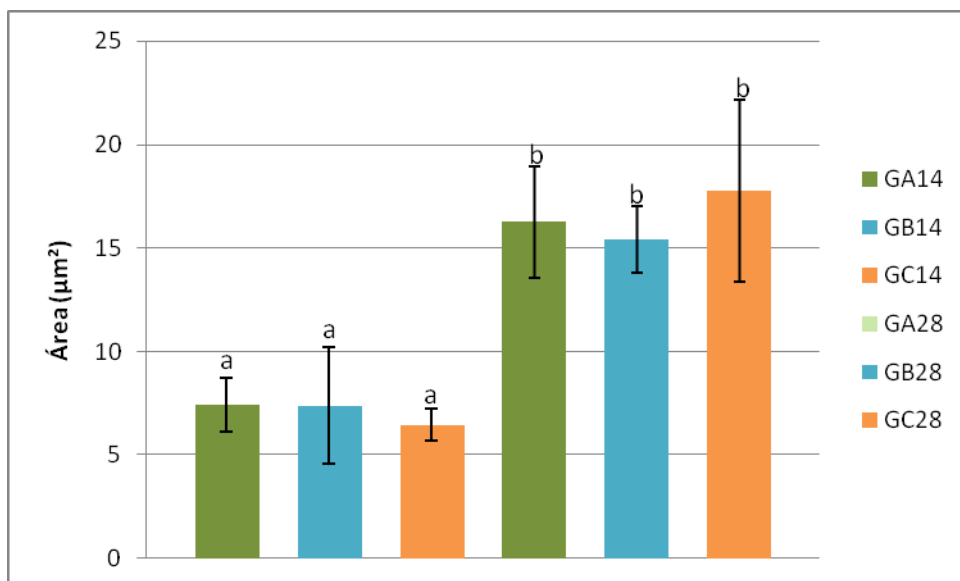


Figura 21. Área média da fibra do nervo ciático nos vários grupos e períodos de avaliação. Onde: GA14, GB14 e GC14 correspondem aos Grupos A, B e C aos 14 dias, respectivamente. Enquanto GA28, GB28 e GC28 correspondem aos Grupos A, B e C aos 28 dias, respectivamente. As letras a e b representam diferenças estatísticas entre os momentos de avaliação.

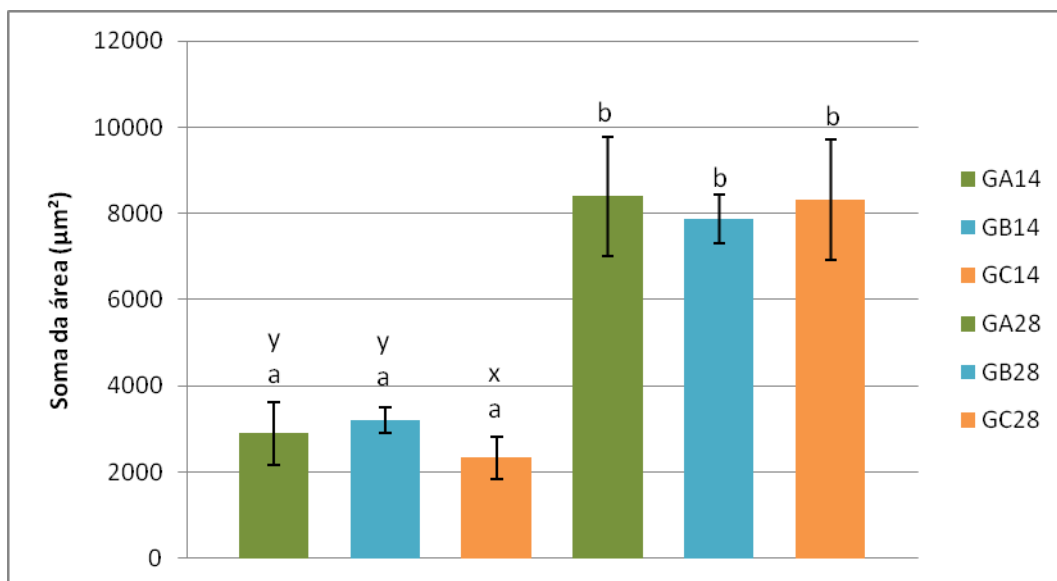


Figura 22. Soma área da fibra do nervo ciático nos vários grupos e períodos de avaliação. Onde: GA14, GB14 e GC14 correspondem aos Grupos A, B e C aos 14 dias, respectivamente. Enquanto GA28, GB28 e GC28 correspondem aos Grupos A, B e C aos 28 dias, respectivamente. As letras a e b representam diferenças estatísticas entre os momentos de avaliação; as letras y e x representam diferenças estatísticas encontradas entre os grupos.

Tabela 5. Valores médios do diâmetro, área, soma da área da fibra do nervo ciático lesionado.

		GA	GB	GC
Diâmetro	14	2,964 ^a	2,979 ^a	2,78 ^a
	28	4,321 ^b	4,183 ^b	4,476 ^b
Área	14	7,398 ^a	7.636 ^a	6,438 ^a
	28	16,251 ^b	15,430 ^b	17.764 ^b
Soma da área	14	2899,883 ^{aA}	3213,955 ^{aA}	2336,080 ^{aB}
	28	8395,417 ^b	7879,710 ^b	8312.745 ^b

Letras minúsculas indicam diferenças ($p < 0,05$) entre os períodos de avaliação dentro de cada grupo; letras maiúsculas indicam diferenças ($p < 0,05$) entre os grupos.

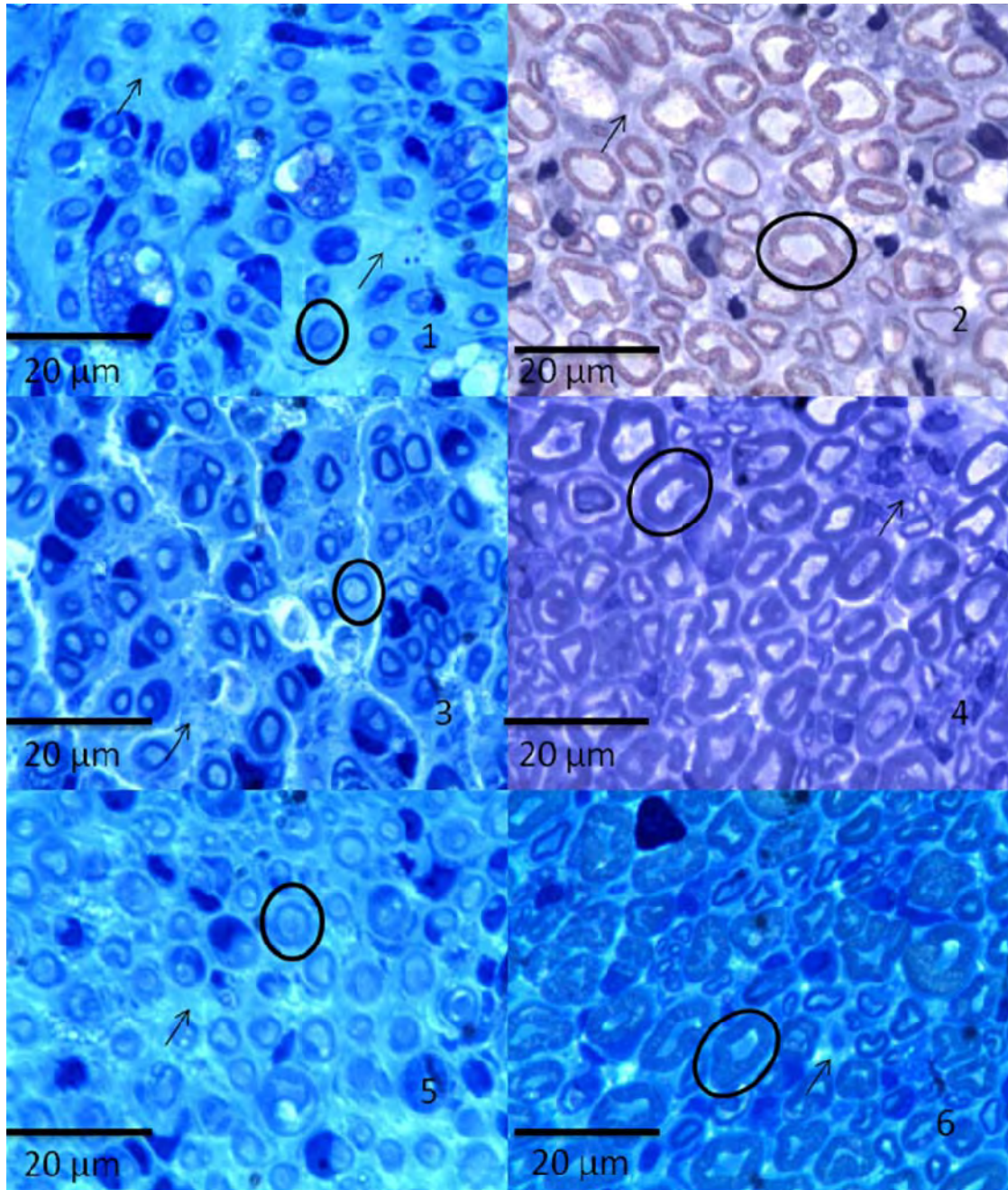


Figura 23. Cortes histológicos transversais do nervo ciático (objetiva 100x) dos diferentes grupos experimentais, onde se pode observar o aumento da bainha de mielina e a diminuição da quantidade de tecido conjuntivo aos 28 dias, em relação aos 14 dias. Os números representam os seguintes grupos 1- GA14, 2- GA28, 3- GB14, 4- GB28, 5- GC14 e 6- GC28. As setas indicam o tecido conjuntivo, enquanto as elipses destacam fibras mielinizadas. Tetróxido de ósmio 1% e azul de toluidina + borato de sódio 1%.

Estudos de Khullar *et al.*, (1995), Endo *et al.*, (2008) e Reis *et al.*, (2009) demonstraram que a laserterapia pode influenciar a função e a regeneração de nervos periféricos, com a vantagem de não ser um método invasivo. Para avaliar a reparação neural e muscular, após a compressão do nervo ciático de ratos

submetidos à imobilização por suspensão e tratados ou não com diferentes doses de laser terapêutico, foi escolhido o rato como animal de experimentação por ser de fácil aquisição e manuseio, além das características anatômicas favoráveis para o procedimento cirúrgico.

A lesão do nervo provocada por compressão, modelo experimental utilizado neste projeto, é uma modalidade útil para o estudo de regeneração dos nervos periféricos, quando o objetivo é mimetizar a axonotmese. Nessa, a agressão é suficiente para romper o axônio, levando à degeneração Walleriana distal, mas o prognóstico de recuperação funcional é bom, como observado nos animais do grupo controle. Segundo De Medinaceli *et al.* (1982) e Lent (2004) a preservação das estruturas de sustentação, como a célula satélite, a membrana basal e o tecido conjuntivo de suporte facilitam o prolongamento dos axônios e, conseqüentemente, a re-inervação adequada do alvo.

Além da lesão nervosa também foi simulado, por meio da imobilização por suspensão, modelo denominado hipocinesia dos membros pélvicos, o repouso ao qual um paciente é submetido quando acometido por lesões nervosas de origem traumática que impossibilitam a locomoção. A hipocinesia também possibilita o isolamento do efeito do laser sobre o nervo, já que o animal não se exercita.

Ao se considerar os dados como um todo se observa que ambos os grupos tratados apresentam melhor recuperação em relação ao controle aos 14 dias.

4.2. Avaliação funcional do ciático

Os resultados obtidos na avaliação inicial (Figura 24), prévia a cirurgia, foram iguais entre os grupos, uma vez que nenhum nervo ciático havia sofrido axonotmese.

Quanto as avaliações realizadas aos 14 e 28 dias (Figura 24), o grupo C28 destacou-se ($p < 0,05$) como a melhor avaliação entre os grupos. Com isso pode-se afirmar que aos 28 dias de tratamento o IFC não foi beneficiado pela laserterapia. Também confirma a evolução positiva quando a lesão nervosa compressiva está presente, independentemente de tratamentos.

A regeneração de nervos periféricos é em geral, abordada em trabalhos onde são avaliados dados histológicos, morfométricos e eletrofisiológicos, não apresentando informação sobre a recuperação funcional que, do ponto de vista

clínico, é muito importante para o paciente. Talvez, justifique-se essa falta de informação pela dificuldade de realização dos testes. Entretanto o IFC, apresentado por Bain *et al.*(1989), permite uma avaliação quantitativa adequada da recuperação funcional do nervo ciático de ratos, conforme realizado nessa pesquisa.

Como nos experimentos de Khullar *et al.* (1995), Reis *et al.* (2009) e Andraus *et al.* (2010) o IFC inicial foi negativo e próximo de zero. Após a lesão, o IFC se distanciou de zero, mantendo-se negativo. Com o passar do tempo tendeu a se aproximar do valor inicial, demonstrando melhora na recuperação funcional.

Khullar *et al.* (1995) observou que a avaliação do IFC indicou melhora da função motora, mas sem diferença entre os grupos tratado e o controle. Apesar da recuperação mais rápida da morfologia do nervo ciático nos grupos A14 e B14, esta não foi acompanhada da recuperação de função. Esses resultados foram também encontrados no experimento de Reis *et al.* (2009) que observaram que o uso do laser AlGaAs (660nm) promoveu alteração significativa na quantidade de mielina em avaliação morfométrica, após neurotome, mas não obteve resultados positivos na recuperação funcional do nervo ciático de ratos após neurotome. Belchior *et al.* (2009) observaram que o laser auxilia na recuperação funcional após lesão por compressão.

Ainda assim, em estudos como os de Khullar *et al.* (1995) e de Reis *et al.* (2009), o IFC do grupo tratado ficou próximo ao do grupo controle. Em seus protocolos os animais eram mantidos livres dentro de gaiolas realizando movimentos com carga sobre o membro tratado, ao contrário deste experimento, em que os animais foram mantidos sob imobilização por suspensão realizando apenas exercícios sem carga. Tendo em vista que a atividade física é conhecidamente benéfica para a recuperação do nervo, como observado por Santos (2006), pode-se inferir que a laserterapia como único método terapêutico, não foi suficiente para uma melhor recuperação do IFC.

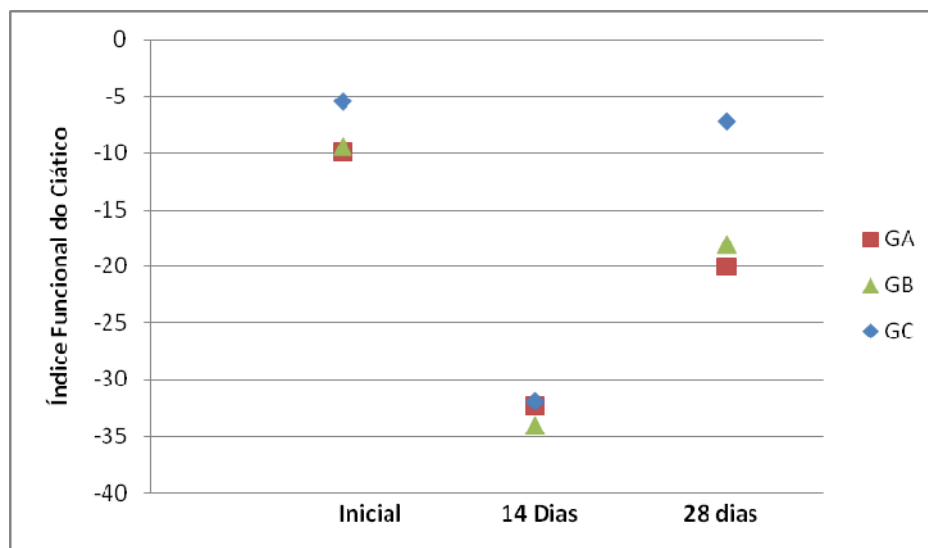


Figura 24. IFC nos vários grupos e períodos de avaliação.

Tabela 6. Valores médios do IFC.

		GA	GB	GC
IFC	Inicial	-9,86 ^a	-9,448 ^a	-5,418 ^a
	14	-32,383 ^b	-34,081 ^b	-31,969 ^b
	28	-20,036 ^{abA}	-18,085 ^{aA}	-7,195 ^{abB}

Letras minúsculas indicam diferenças ($p < 0,05$) entre os períodos de avaliação dentro de cada grupo; letras maiúsculas indicam diferenças ($p < 0,05$) entre os grupos.

4.3. Avaliação muscular

O membro esquerdo do músculo sóleo, que não foi submetido ao procedimento cirúrgico apresentou aumento ($p < 0,05$) do peso (Figura 25) e do diâmetro da fibra muscular (Figura 26, 28 e 29). Já a porcentagem do tecido conjuntivo e de fibras musculares (Figura 27) não variou entre os períodos. Desta forma, depreende-se que este ganhou peso e massa muscular ao longo do tempo devido ao crescimento dos animais ocorrido durante o período experimental. O peso do músculo sóleo esquerdo se assemelha àquele de outros estudos como o de Thompson *et al.* (1998) que, após uma semana de imobilização, observaram o peso do sóleo variar entre 132mg e 142mg e o de Mercier *et al.* (1999) que, após 21 dias de suspensão, observaram o peso deste músculo variar entre 72,8 a 82,6.

No membro direito, submetido à cirurgia, o peso, o diâmetro da fibra muscular e a porcentagem do tecido conjuntivo e de fibras musculares se comportaram da mesma forma que o membro esquerdo. Estes dados permitem inferir que os

músculos sóleos dos membros direitos também ganharam peso e massa muscular ao longo do tempo.

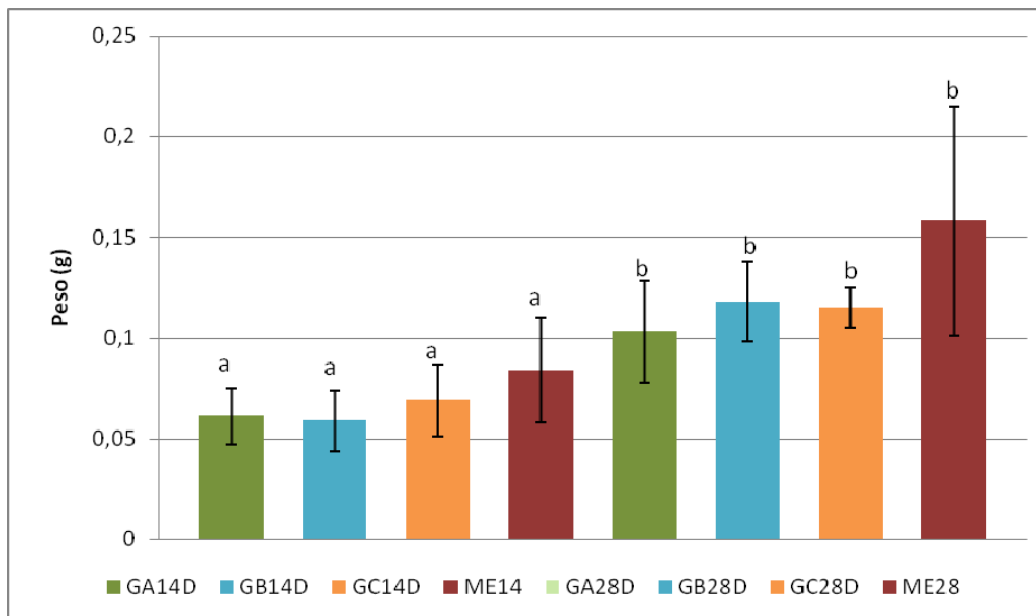


Figura 25. Peso, em gramas, do músculo sóleo nos vários grupos e períodos de avaliação. Onde: GA14D, GB14D, GC14D e ME14 correspondem aos Grupos A, B, C e membro esquerdo aos 14 dias, respectivamente. Enquanto GA28D, GB28D, GC28D e ME28 correspondem aos Grupos A, B, C e membro esquerdo aos 28 dias, respectivamente. As letras a e b representam diferenças e semelhanças estatísticas entre os momentos de avaliação; as letras y e x representam diferenças estatísticas encontradas entre os grupos.

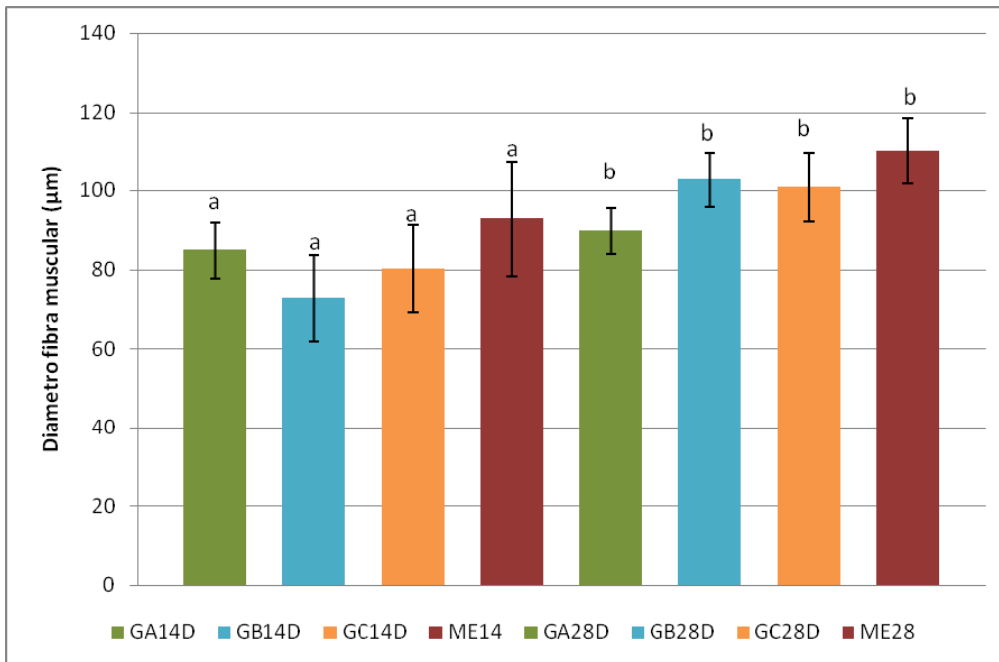


Figura 26. Diâmetro médio da fibra muscular do músculo sóleo nos vários grupos e períodos de avaliação. Onde: GA14D, GB14D, GC14D e ME14 correspondem aos Grupos A, B, C e membro esquerdo aos 14 dias, respectivamente. Enquanto GA28D, GB28D, GC28D e ME28 correspondem aos Grupos A, B, C e membro esquerdo aos 28 dias, respectivamente. As letras a e b representam diferenças estatísticas entre os momentos de avaliação.

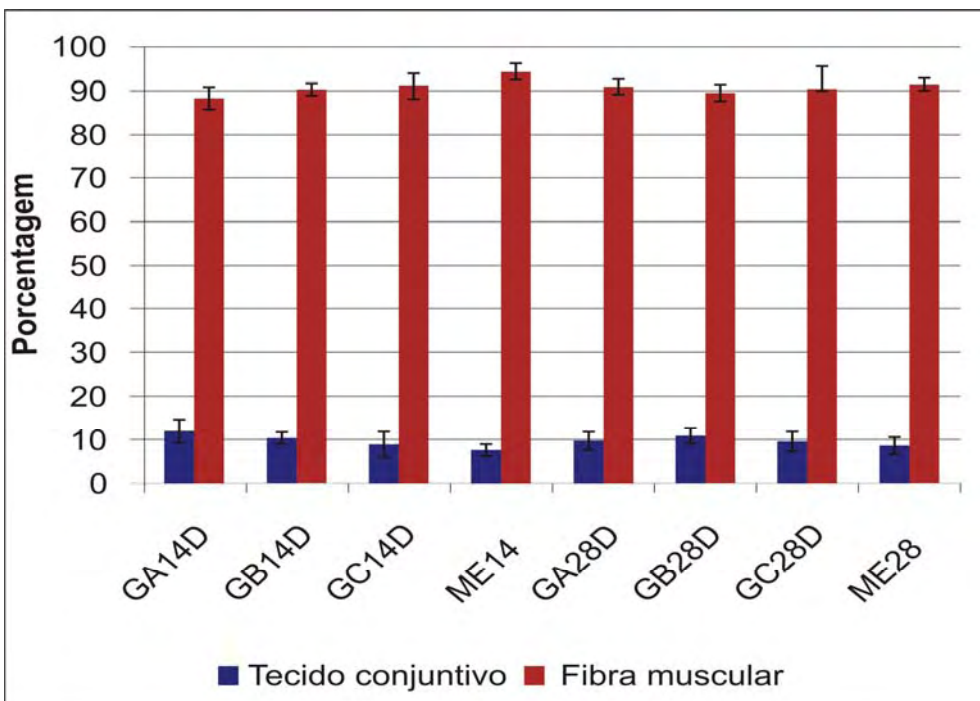


Figura 27. Porcentagem do tecido conjuntivo e de fibras musculares do músculo sóleo nos vários grupos e períodos de avaliação. Onde: GA14D, GB14D, GC14D e ME14 correspondem aos Grupos A, B, C e membro esquerdo aos 14 dias, respectivamente. Enquanto GA28D, GB28D, GC28D e ME28 correspondem aos Grupos A, B, C e membro esquerdo aos 28 dias, respectivamente.

Tabela 7. Valores médios do peso do músculo sóleo, do diâmetro fibra muscular e das porcentagens de tecido conjuntivo e de fibra muscular.

		GA	GB	GC	ME
Diâmetro	14	84,916	72,763 ^a	80,227 ^a	92,909
	28	89,731 ^B	102,805 ^{bA}	101,011 ^{bA}	110,133
Peso	14	0,061 ^a	0,059 ^a	0,069 ^a	0,084 ^a
	28	0,103 ^{bA}	0,118 ^{bABC}	0,115 ^{bABC}	0,158 ^{bC}
Porcentagem de tecido conjuntivo	14	11,795	10,015	8,87	7,595
	28	9,435	10,615	9,57	8,975
Porcentagem de fibra muscular	14	88,205	89,985	91,13	92,98
	28	90,565	89,385	90,43	91,01

Letras minúsculas indicam diferenças ($p < 0,05$) entre os períodos de avaliação dentro de cada grupo; letras maiúsculas indicam diferenças ($p < 0,05$) entre os grupos.

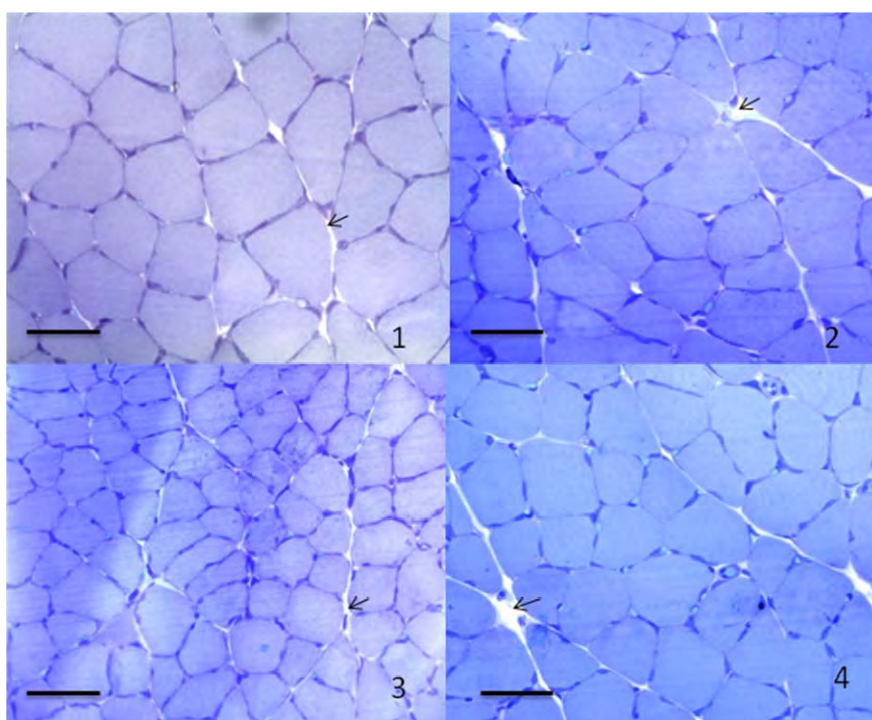


Figura 28. Cortes histológicos transversais do músculo sóleo (objetiva 20x) dos diferentes grupos, aos 14 dias. Onde os números representam os seguintes grupos 1- ME14, 2- GA14 D, 3- GB14 D, 4- GC14 D. As setas indicam áreas de tecido conjuntivo. Barras representam 100 μm. Azul de toluidina + borato de sódio 1%.

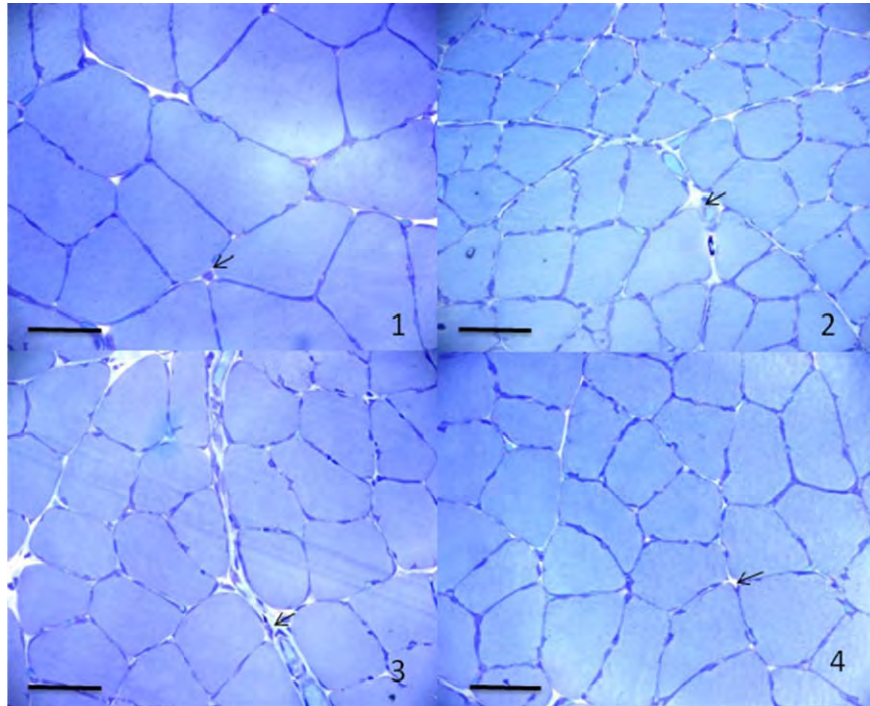


Figura 29. Cortes histológicos transversais do músculo sóleo (objetiva 20x) dos diferentes grupos, aos 28 dias. Onde os números representam os seguintes grupos 1- ME28, 2- GA28 D, 3- GB28 D, 4- GC28 D. As setas indicam áreas de tecido conjuntivo. Barras representam 100 μ m. Azul de toluidina + borato de sódio 1%.

O membro esquerdo do músculo gastrocnêmio, que não foi submetido ao procedimento cirúrgico apresentou aumento do peso (Figura 30) entre os períodos de avaliação. O diâmetro das fibras musculares (Figura 31) manteve-se semelhante entre os períodos de avaliação. Desta forma, depreende-se que o este ganhou peso e massa muscular ao longo do tempo, que pode ser imputada ao crescimento dos animais ocorrido durante o período experimental (Figuras 32 e 33). O peso do músculo gastrocnêmico esquerdo se assemelha a de outros estudos como o de Thompson *et al.* (1998) que após uma semana de imobilização observou o peso do gastrocnêmico variar entre 1,565g e 1,615g.

No membro direito, submetido à cirurgia, o peso e o diâmetro da fibra muscular se comportaram da mesma forma que no membro esquerdo. Não houve diferença entre os grupos para os parâmetros citados anteriormente. Aos 14 dias a porcentagem do tecido conjuntivo e de fibras musculares foi menor e maior, respectivamente, para o grupo C ($p < 0,05$), já aos 28 dias não houve diferença entre os grupos (Figura 32). Estes dados permitem inferir que os músculos gastrocnêmios dos membros direitos também ganharam peso e massa muscular ao longo do tempo.

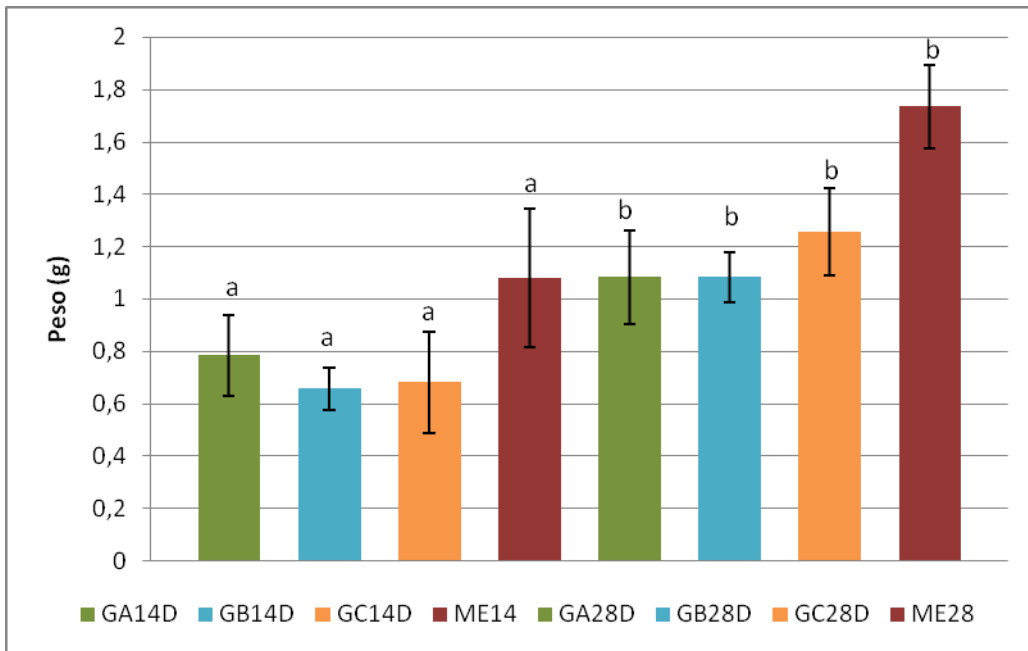


Figura 30. Peso, em gramas, do músculo gastrocnêmio nos vários grupos e períodos de avaliação. Onde: GA14D, GB14D, GC14D e ME14 correspondem aos Grupos A, B, C e membro esquerdo aos 14 dias, respectivamente. Enquanto GA28D, GB28D, GC28D e ME28 correspondem aos Grupos A, B, C e membro esquerdo aos 28 dias, respectivamente. As letras a e b representam diferenças estatísticas entre os momentos de avaliação.

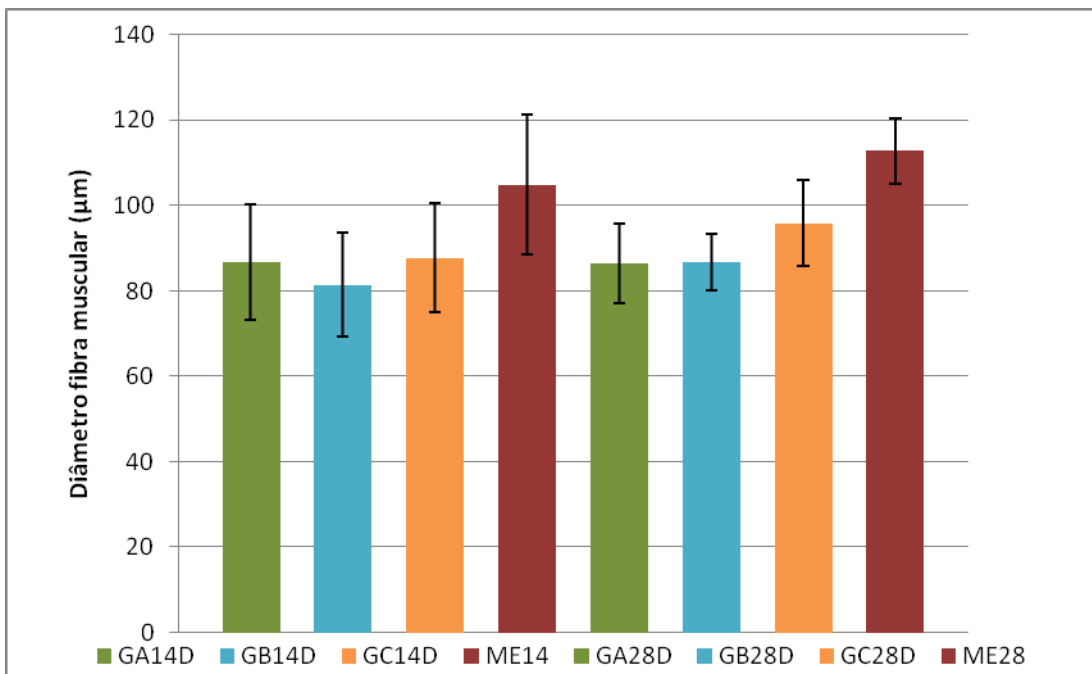


Figura 31. Diâmetro da fibra muscular do músculo gastrocnêmio nos vários grupos e períodos de avaliação. Onde: GA14D, GB14D, GC14D e ME14 correspondem aos Grupos A, B, C e membro esquerdo aos 14 dias, respectivamente. Enquanto GA28D, GB28D, GC28D e ME28 correspondem aos Grupos A, B, C e membro esquerdo aos 28 dias, respectivamente. As letras y e x representam diferenças estatísticas encontradas entre os grupos.

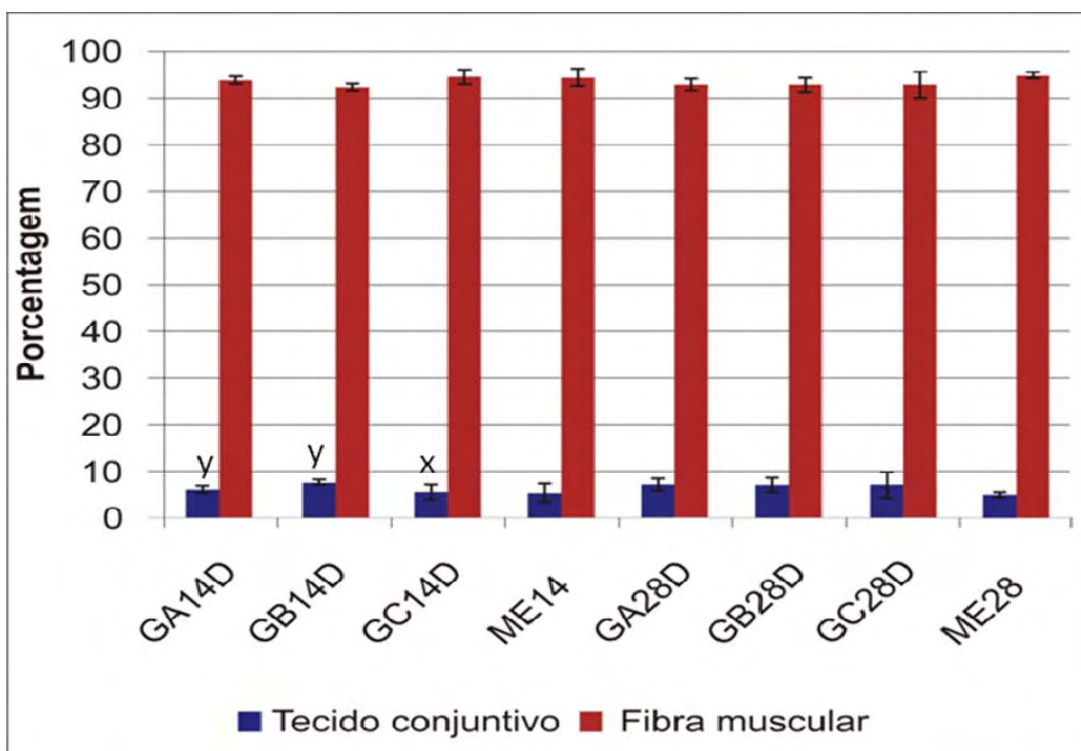


Figura 32. Porcentagem do tecido conjuntivo e de fibras musculares do músculo gastrocnêmio nos vários grupos e períodos de avaliação. Onde: GA14D, GB14D, GC14D e ME14 correspondem aos Grupos A, B, C e membro esquerdo aos 14 dias, respectivamente. Enquanto GA28D, GB28D, GC28D e ME28 correspondem aos Grupos A, B, C e membro esquerdo aos 28 dias, respectivamente. As letras y e x representam diferenças estatísticas encontradas entre os grupos.

Tabela 8. Valores médios do peso do músculo gastrocnêmio, do diâmetro fibra muscular e das porcentagens de tecido conjuntivo e de fibra muscular.

		GA	GB	GC	ME
Diâmetro	14	86,754	81,396	87,827	104,934
	28	86,411	86,767	95,941	112,821
Peso	14	0,783 ^a	0,658 ^a	0,679 ^a	1,08 ^a
	28	1,082 ^b	1,082 ^b	1,257 ^b	1,773 ^b
Porcentagem de tecido conjuntivo	14	6,02 ^A	7,505 ^A	5,365 ^B	5,3
	28	6,99	7,005	7,01	4,88
Porcentagem de fibra muscular	14	93,98	92,635	94,635	94,61
	28	93,01	92,995	92,99	95,115

Letras minúsculas indicam diferenças ($p < 0,05$) entre os períodos de avaliação dentro de cada grupo; letras maiúsculas indicam diferenças ($p < 0,05$) entre os grupos.

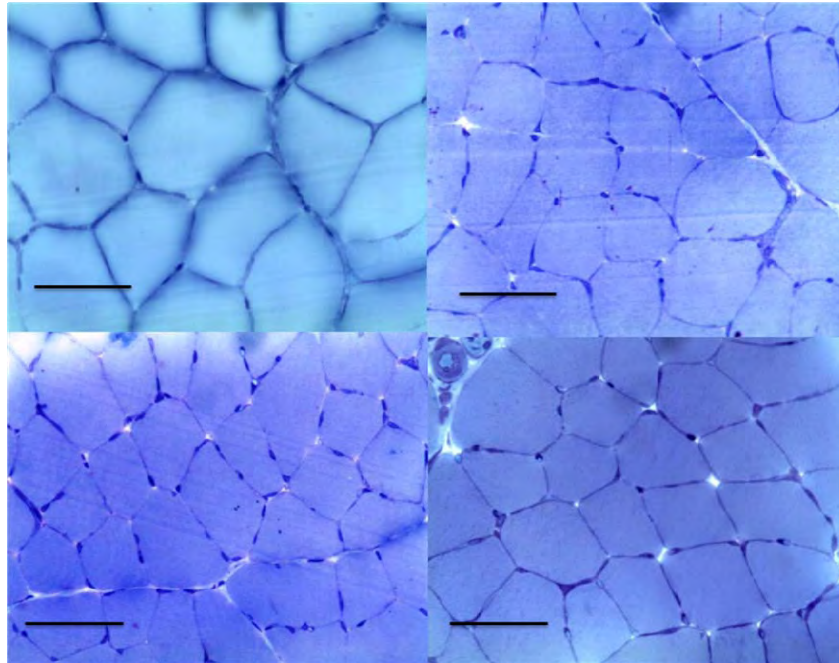


Figura 33. Cortes histológicos transversais do músculo gastrocnêmio (objetiva 20x) dos diferentes grupos, aos 14 dias. Onde os números representam os seguintes grupos 1- ME14, 2- GA14 D, 3- GB14 D, 4- GC14 D. As setas indicam áreas de tecido conjuntivo. Barras representam 100 μ m. Azul de toluidina + borato de sódio 1%.

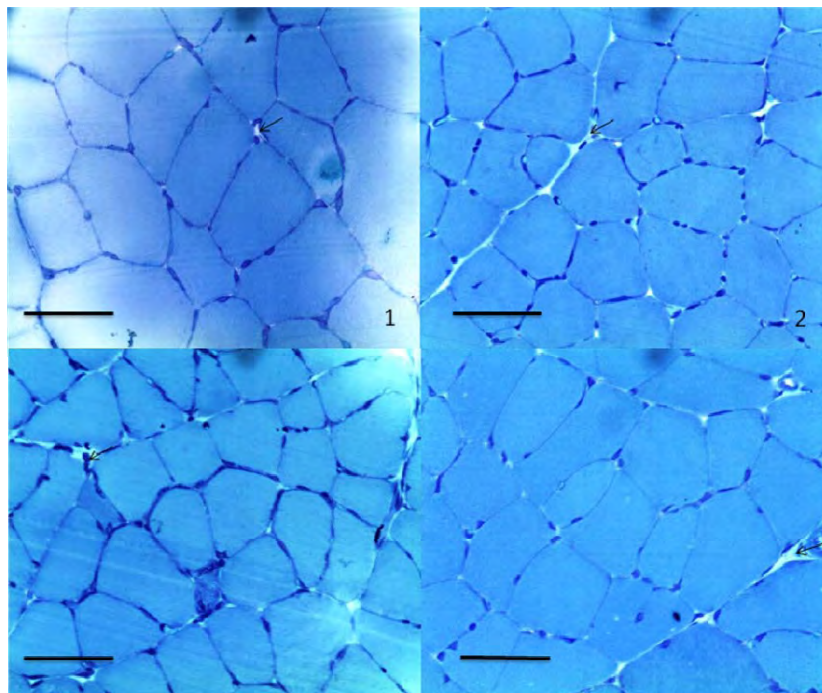


Figura 34. Cortes histológicos transversais do músculo gastrocnêmio (objetiva 20x) dos diferentes grupos, aos 28 dias. Onde os números representam os seguintes grupos 1- ME28, 2- GA28 D, 3- GB28 D, 4- GC28 D. As setas indicam áreas de tecido conjuntivo. Barras representam 100 μ m. Azul de toluidina + borato de sódio 1%.

Neste experimento, procedeu-se a avaliação muscular para que seus dados pudessem complementar aqueles obtidos após análise da área de axonotmese, pois, segundo Ishido *et al.* (2004) e Kostrominova (2005), um dos tecidos mais afetados pela lesão nervosa periférica é o músculo esquelético, uma vez que a inervação é um fator crítico para sua integridade funcional e estrutural. Também, a lesão do nervo causa, segundo Billington e Carlson (1996) e Dow *et al.*, (2004), perda de massa e da capacidade de geração de força do músculo. Da mesma forma a ausência de peso sobre o músculo é causa de atrofia, redução da capacidade funcional e aumento da fadiga nos músculos esqueléticos dos membros, com as maiores mudanças ocorrendo em músculos posturais e que agem contra a gravidade como o sóleo e o gastrocnêmio (Rapcsak *et al.*, 1983; Riley *et al.*, 1987; Caiozzo *et al.*, 1994 e Widrick *et al.*, 1999). Thompson *et al.* (1998) observaram que a imobilização por suspensão por uma semana leva a perda de 10 a 26% de massa dos músculos sóleo e gastrocnêmio.

Todos os grupos com lesão do nervo ciático apresentaram um comportamento semelhante ao membro esquerdo, demonstrando assim que os músculos foram re-inervados. Apesar disso, segundo Nicolau *et al.* (2004), a laserterapia (830nm) afeta a liberação de neurotransmissores nas placas motores de camundongos, esperava-se que os grupos tratados apresentassem uma recuperação mais rápida da massa muscular o que não ocorre pois não observadas diferenças estatísticas entre os grupos tratados e o controle. Esse fato permite refletir que não basta apenas a laserterapia para se conseguir uma resposta muscular mais rápida, mas que sua associação a outros procedimentos fisioterápicos poderiam facilitar a recuperação dos pacientes.

5. CONCLUSÕES

A laserterapia, independente das doses utilizadas, apresenta efeitos benéficos sobre a recuperação morfológica do nervo ciático nos primeiros 14 dias após a lesão por axonotmese.

A laserterapia apresenta um efeito protetor sobre a musculatura esquelética observado nos primeiros 14 dias após a lesão por axonotmese.

A laserterapia, *per si*, não é capaz de influenciar a recuperação e a funcionalidade dos músculos acometidos

6. REFERÊNCIAS

ABERGEL, R.P.; MEEKER, C.A.; LAM, T.S.; DWYER, R. M.; LESAVOY, M. A.; UITTO, J. Control of connective tissue metabolism by lasers: recent developments and future prospects. **Journal American Academy of Dermatology**, v.11, n.6, p.1142-50, 1984.

ABERGEL, R. P.; LYONS, R. F.; CASTEL, J. C.; DWYER, R. M.; UNITTO, J. Biostimulation of wound healing by laser: experimental approaches in animal models and in fibroblast cultures. **Journal of Dermatologic Surgery & Oncology**, v.13, p.127–33, 1987.

ALLEN, D.; YASUI, W.; TANAKA, T.; OHIRA, Y.; NAGAOKA, S.; SEKIGUCHI, C.; HINDS, W.; ROY, R.; EDGERTON, V. Myonuclear number and myosin heavy chain expression in rat soleus single muscle fibres after spaceflight. **Journal of Applied Physiology**, v.81, p.145–151, 1996.

ANDERSEN, J.L.; GRUSCHY-KNUDSEN, T.; SANDRI, C.; LARSSON, L. ; SCHIASNO, S. Bed rest increases the amount of mismatched fibres in human skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v.86, p.455–460, 1999.

ANDRAUS, R. A. C.; BBARBIERI, C. H.; MAZZER N. A irradiação local com o laser de baixa potência acelera a regeneração do nervo fibular de ratos. **Acta Ortopédica Brasileira**. v. 18, n.3, p.152-7, 2010.

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**. n.3, p.83-8, 2003.

BAIN, J. R.; MACKINNON, S.E.; HUNTER, D. A. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal and posterior tibial nerve lesions in the rat. **Journal of the American Society of Plastic Surgeons**, v.83, p.129–36, 1989.

BARBOSA, A. A. Densidade mineral óssea e propriedades mecânicas de fêmur de ratos submetidos à hipocinesia dos membros pélvicos e a diferentes programas de reabilitação. Dissertação (mestrado) Universidade Federal de Viçosa, 2009. 47p.

BASFORD, J. R. Low intensity laser therapy: still not an established clinical tool. **Lasers Surgery Medicine**, v.16, p.331-42, 1995.

BAXTER, G. D. **Therapeutic lasers – Theory and practice**. 1Ed. Churchill Livingstone: New York, 1994. 259 p.

BELCHIOR, A. C. G.; REIS, F. A.; NICOLAU, R. A.; SILVA, I. S.; PERREIRA, D.M.; CARVALHO, P. T. C. Influence of laser (660 nm) on functional recovery of the sciatic nerve in rats following crushing lesion, **Lasers in Medical Science**, v.24, p.893–9, 2009.

BERG, H. E.; LARSSON, L.; TESCH, P. A. Lower limb skeletal muscle function after 6 wk of bed rest. **Journal of Applied Physiology**, v.82, p.182-8, 1997.

BEZUUR, N. J.; LUC, L. M. H.; HABETS, L. L.; HANSSON, T. L. The effect of therapeutic laser treatment in patients with craniomandibular disorders. **Journal of craniomandibular disorders : facial & oral pain**, v.2, p.83-6, 1988.

BILLINGTON, L.; CARLSON, B. M. The recovery of long-term denervated rat muscles after machine treatment and grafting. **Journal neurology Science** v.144, p.147-155, 1996.

BRIDGE, P. M.; BALL, D.J.; MACKINNON, S.E.; NAKAO, Y.; BRANDT, K.; HUNTER, D.A.; HERTL, C. Nerve crush injuries – a model for axonotmesis. **Experimental neurology**, v.127, n.2, p.284-90, 1994.

BRUGNERA JÚNIOR, A.; SANTOS, A. E. C. G.; BOLOGNA, E. D.; LADALARDO, T. C. C. G. P. **Atlas de laserterapia aplicada à clínica odontológica**. 1. ed. São Paulo: Ed. Santos, 2003. 119 p.

BRUGNERA JÚNIOR, A.; VILLA, R. G.; GENOVESE, W. J. **Laser na odontologia**. 1. ed. São Paulo: Pancast, 1991. 115 p.

BYUN, Y. H.; LEE, M. H.; KIM, S. S. CHANG, H. K.; LEE T. H.; Treadmill running promotes functional recovery and decreases brain-derived neurotrophics factor mRNA expression following sciatic crushed nerve injuries in rats. **Journal Sports Medicine Physiotherapy Fitness** v.45, n.2, p.222-28, 2005.

CAIOZZO, V.J.; HADDAD, F. ; BAKER, M.J.; HERRICK, R.E.; PRIETTO, N.; BALDWIN, K.M. Microgravity-induced transformations of myosin isoforms and contractile properties of skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v.81, p.123-32, 1996.

CAIOZZO, V. J.; BAKER, M. J.; HERRICK, R. E.; TAO, M.; BALDWIN, K. M. Effect of spaceflight on skeletal muscle: mechanical properties and myosin isoform content of a slow muscle. **Journal of Applied Physiology**, v.76, p.1764-73, 1994.

CHEN, Yueh-Sheng; HSU, Sheng-Feng; CHIU, Chih-Wen; LIN, Jaung-Geng; CHEN, Chao-Tzung; YAO, Chun-Hsu. Effect of low-power pulsed laser on peripheral nerve regeneration in rats. **Microsurgery**, v.25, n.1, p.83-89, 2005.

CHI, M.M.Y.; CHOKSI, R.; NEMETH, P. ; KRASNOV, I.; ILYINA-KAKUEVA, E.; MANCHESTER, J.K. ; LOWRY, O. H. Effects of microgravity and tail suspension on enzymes of individual soleus and tibialis anterior fibres. **Journal of Applied Physiology**, v.73, p.66S-73S, 1992.

CARLTON, J. M.; GOLBERG, N. H. Quantitative integrated muscle function following reinnervation. **Surgery Forum, Chicago**, n. 37, p. 611-12, 1986.

CRUAÑES, J. C. **La terapia laser hoy**. Barcelona : Centro de documentación Laser de meditec, 1984.164p.

CUNHA, N. B.; Moesch, J.; Mallmann, J. S.; Ciena, A. P.; Bertolini, G. R. F. Uso do laser, 670 nm, no quadro álgico de ratos submetidos à modelo experimental de ciatalgia. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**. vol.14, n.2, p. 115-118, 2008.

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**, n.96, p. 89–96, 2000.

DE MEDINACELI, L.; FREED, W. J.; WYATT, R. J. An index of the functional conduction of rat sciatic nerve base don measurements made from walking tracks. **Experimental Neurology**, n.77, p.634–43, 1982

DE MEDINACELI, L.; DERENZO, E.; WYATT, R. J. Rat sciatic funcional index data management system with digitated input, **Computer Biomedical Research**, v.17, p.185-92, 1984.

DE SÁ, J. M.; MAZZER, N.; BARBIERI, C. H.; BARREIRA, A. The end to side periferal nerve repair functional and morfometric study using the peroneal nerve of rats. **Journal Neuroscience Methods**, v.136, p.45-53, 2003.

DOW, D. E.; CEDERNA, P. S., HASSET, C. A.; KOSTROMINOVA, T. Y.; FAULKNER, J. A. Number of contractions to maintain mass and for of a denervated rat muscle. **Muscle Nerve**, v.30, p.77-86, 2004.

DURIGAN, J. L. Q.; CANCELLIERO, K. M.; DIAS, C. N. K.; SILVA, C. A.; GUIRRO, R. R. J.; POLACOW, M. L. O. Estudo morfométrico do músculo sóleo de ratos submetidos à imobilização aguda associado à estimulação elétrica neuromuscular. **Fisioterapia em Movimento**, v.19, n.2, p.117-26, 2006.

EHRLICHER, A.; BETZ, T.; STUHRMANN, B.; KOCH, D.; MILNER, V.; RAIZEN, M. G.; KAS, J. Guilding neuronal growth with light. **Prociodings National Academy Science**, v.99, p.16924-028, 2002.

ENDO, C. **Estudo dos efeitos do tratamento com laser num modelo experimental de lesão nervosa por esmagamento do nervo ciático em ratos**. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 2002.

ENDO, C.; BARBIERI, C. H.; MAZZER,N.; FASAN V. S. A laserterapia de baixa intensidade acelera a regeneração de nervos periféricos. **Acta Ortopédica Brasileira**, v.16, n.5, p.305-10, 2008.

FERNANDES, K. C. B. G.; POLACOW, M. L. O.; GUIRRO, R. R. J.; CAMPOS, G. E. R.;SOMAZZ, M. C.; PINTO, V. F. Análise morfométrica dos tecidos muscular e conjuntivo após denervação e estimulação elétrica de baixa frequência. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v.9, n.2, p.235-41, 2005.

FITTS, R. H. METZGER, J. M.; RILEY, D. A.; UNSWORTH, B. R. Models of disuse: a comparison of hindlimb suspension and immobilization. **Journal of Applied Physiology**, v.60, p.1946-53, 1986.

Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002, 265. **Sistema de análise estatística e genética (SAEG)**, UFV, Central de processamento de dados Viçosa-M.G.,1999.

GASPARINI, A. L. P.; BARBIERI, C. H.; MAZZER, N. Correlação entre diferentes métodos de avaliação funcional da marcha de ratos com lesão por esmagamento do nervo isquiático, **Acta Ortopédica Brasileira**, v.15, p.285-9, 2007.

GENOVESE, W. J. laser de baixa intensidade: aplicações terapêuticas em Odontologia. 1. ed. São Paulo: Lovise, 2000. 130 p.

GIGO-BENATO, D.; GEUNA, S.; RODRIGUES, A. C.; TOS, P.; FORNARO, M.; BOUX, E.; BATTISTON, B.; GIACOBINI-ROBECCHI, M. Low-power laser biostimulation enhances nerve repair after end-to-side neurorrhaphy: a double-blind randomized study in the rat median nerve model. **Lasers in Medical Science**, v.19, n.1, p.57-65, 2004.

GIGO-BENATO, D. **Análise da regeneração do nervo isquiático de ratos em lesões moderadas e graves sob ação do laser de baixa intensidade**. Tese (doutorado) – Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2010.

GUTMANN, E.; GUTMANN, L. Factors affecting recovery of sensory function after nerve lesion, **Journal Neurology Psychiatry**, v.5, p117-29, 1942.

HAINES, D.E. Degeneration and regeneration of nerve tissue. In: JENKINS, T.W. **Functional mammalian neuroanatomy**. Philadelphia : Lea & Febiger, cap.8, p.118-28, 1972.

HANSSON, T. L. Infrared laser in the treatment of craniomandibular disorders, arthrogenous pain. **The Journal of prosthetic dentistry**, v.61, p.614–17, 1989.

INSERRA, M.M.; BLOCH, D.A.; TERRIS, D.J. Functional indices for sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the mouse, **Microsurgery**, v.18, p.119–24, 1998.

ISHIDO, M.; KAMI, K.; MITSUHIKO, M. In vivo Expression Patterns of MyoD, P21 and Rb Proteins in Myonuclei and Satellite Cells of Denervated rat skeletal muscle. **American Journal Physiology Cell Physiology**, v.287, p.484-93, 2004.

JOHNSTON, R. B.; ZACHARY, L.; DELLON, A. L.; SEILER, W. A. Teplica DM. Improved imaging of rat hind foot prints for walking track analysis. **Journal of Neuroscience Methods**. N.38, p. 111-4, 1991.

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.

KHULLAR, S. M.; BRODIN, P.; BARKVOLL, P.; HAANAES H. R. Preliminary study of low-level laser for treatment of long-standing sensory aberrations in the inferior alveolar nerve. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.54, n.1, p.2-8, 1996

KOURTIDOU-PAPADELI, C. KYPAROS, A.; ALBANI, M.; FROSSINIS, A.; PAPADELIS, C.L.; BAMIDIS, P.; VIVAS A.; GUIBA-TZIAMPURI, O. Electrophysiological, histochemical, and hormonal adaptation of rat muscle after prolonged hindlimb suspension. **Acta Astronautica**, v.54, p.737-47, 2004.

KOSTROMINOVA, T.Y. Comparison of gene expression of two-month denervated, two-month stimulated-denervated and control rat skeletal muscles. **Physiological Genomics**, v.22, p.227-47, 2005.

LAGO, O. Jr.; BORTOLLETO, C. V.; ARAÚJO, A. M.; DONOSO, C. P. M.; 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. , p. 69-78, 2005.

LANA, G. C.; ANDRÉ, E. S. Investigação comparativa entre a laserterapia e a estimulação elétrica muscular sobre a regeneração nervosa periférica em ratos Wistar. **Dynamis Revista Tecno-Científica**, v.13, n.1, p.113-119, 2007.

LENT, R. **Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais da neurociência**. 3ed. Atheneu: São Paulo, 2004. 135p.

LIEBER, R. **Skeletal muscle structural, function & plasticity**. 2ed. Lippincott: Philadelphia, 2002. 369.

LIMA S.C.; CAIERÃO, Q.M.; DURIGAN, J.L.Q.; SCHWARZENBECK, A.; SILVA, C.A.; MINAMOTO, V.B.; GUIRRO, R.R.J. Short-term immobilization causes morphometric and mechanical alterations on rat muscles. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v.11, n.4, p.261-66, 2007.

LUNDBORG, G. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: evolving neuroscientific concepts and clinical significance. **Journal of Hand Surgery**, v.25, p.391-414, 2000.

MCCAUGHEY, R.G.; CHLEBICKI, C.; Wong BRIAN, J. F. Novel Wavelengths for Laser Nerve Stimulation Lasers in Surgery and Medicine. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 42, n. 1, p. 69-75, 2010

MACKINNON, S.E.; HUDSON, A. R.; HUNTER, D.A. Histologic assessment of nerve regeneration in the rat. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v.75, n.3, p.384-88, 1985.

MAYHEW, T.M.; SHARMA, A.K. Sampling schemes for estimating nerve fibre size. . I Methods for nerve trunks of mixed fascicularity. **Journal of Anatomy**, v.139, p.45–58, 1984.

MELLO, J. B.; MELLO, G. P. S. **Laser em odontologia**. 1ed. São Paulo: Santos, 2001. 174.

MENDONÇA, A.C.; BARBIERI, C.H.; MAZZER, N. Directly low intensity direct electric current enhances peripheral nerve regeneration in rats. **Journal Neuroscience Methods**, v.129, p.183-90, 2003.

MERCIER, C. JOBIN, J.; LÉPINE, C.; SIMARD, C. Effects of hindlimb suspension on contractile properties of young and old rat muscles and the impact of electrical stimulation on the recovery process. **Mechanisms of Ageing and Development**, v.106, p.305-20, 1999.

MIDAMBA, E.; HAANES, H.R. Therapeutic effect of low level laser irradiation on inferior alveolar, mental and lingual nerve paresthesia. **Laser Therapy**, v.5, p.89-94, 1993.

MIKAIL, S.; PEDRO, C.R. **Fisioterapia veterinária**. São Paulo: Malone. 2006. 242 p.

MILLESI, H. Techniques for Nerve Grafting. **Hand Clinics**, v.16, p.73-91, 2000.

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

MILORO M.; REPASKY M. Low-level laser effect on neurosensory recovery after sagittal ramus osteotomy. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v.89, n.1, p.12-18, 2000.

MIRA, J. C. Quantitative studies of the regeneration of rat myelinated nerve fibres: variations in the number and size of regeneration fibers after repeated localized freezings. **Journal Anatomy**, v.129, p.77-93, 1979.

MONTE RASO, V. V.; MAZZER, N.; BARBIERI, C. H.; FAZAN, V. S. Can therapeutic ultrasound influence the regeneration of peripheral nerves? **Journal Neuroscience Methods**, v.42, p.185-92, 2005.

MONTE RASO, V. V.; MAZZER, N.; BARBIERI, C. H.; FAZAN, V. S. Índice funcional do ciático nas lesões por esmagamento do nervo ciático de ratos. Avaliação da reprodutibilidade do método entre examinadores, **Acta Ortopédica Brasileira**, v.14, p.133-6, 2006.

NICOLAU, R. A.; MARTINEZ, M. S.; RIGAU, J.; TOMAS, J. Effect of low power 655 nm diode laser irradiation on the neuromuscular junctions of the mouse diaphragm. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 34, p. 277-84, 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 Trauma**, v.45, p.116–22, 1998.

OLIVEIRA, E.F.; MAZZER, N.; BARBIERI, C.H.; SELLI, M. Correlation between functional index and morphometry to evaluate recovery of the rat sciatic nerve following crush injury: experimental study. **Journal Reconstructive Microsurgery**, v.17, p.69-75, 2001.

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

OLSON, J. E.; SCHIMMERLING, W.; TOBIAS, C. A. Laser action apesctrum of reduced excitability in nerves cells. **Brain Research**, v.204, p.436-40, 1981.

PEACOCK, E. E.; VAN WINKLE, W. **Surgery and biology of wound repair**. 2.ed. Philadelphia : W.B. Saunders, 1976. 630.

QUINTON, J. F. **Novos animais de estimação: pequenos mamíferos**. Roca: São Paulo, 2005. 280p.

RAPCSAK, M.; OGANOV, V. S.; SZOOR, A.; SKURATOVA, S. A.; SZILAGYI, T.; TAKACS, O. Effect of weightlessness on the function of rat skeletal muscles on the biosatellite "Cosmos-1129." **Acta Physiological Hungary**, v.62, p.225–228, 1983.

RASO, V. V. M.; BARBIERI, C. H.; MAZZER, N.; FASAN, V. S. Can therapeutic ultrasound influence the regeneration of the peripheral nerves? **Journal Neuroscience Methods**, v.142, p.185–92, 2005.

REIS, F.A.; BELCHIOR, A.C.G.; CARVALHO, P.T.C.; SILVA, B.A.K.; PEREIRA, D.M.; SILVA, I.S.; NICOLAU, R.A. Effect of laser therapy (660 nm) on recovery of the sciatic nerve in rats after injury through neurotmesis followed by epineural anastomosis. **Lasers Medicine Science**, v.24, p.741–47, 2009.

RILEY, D.A.; ELLIS, S.; SLOCUM, G.R.; SATYANARAYANA, T.; BAIN, J.L.W.; SEDLAK, F.R. Hypogravity-induced atrophy of rat soleus and extensor digitorum longus muscles. **Muscle Nerve**, v.10, p.560–68, 1987.

ROBINSON, A.J.; LAWRENCE, R. Traumatic injury to peripheral nerves. **Muscle and Nerve**, v.23, n.6, p.863-73, 2000.

ROCHKIND, S.; BARNEA, L.; RAZON, N.; BARTALL, A.; SCHWARTZ, M. Stimulatory effect of HeNe low dose laser on injured sciatic nerves of rats. **Neurosurgery**, v.20, p.843-47, 1987.

ROCHKIND, S.; OUAKAINE, G. New trend in neuroscience: Low power laser effects on peripheral and central nervous systems (basic science, pre-clinical and clinical studies). **Neurological Research**, v.14, n.1, p.2-11, 1992.

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 Medicine Science**, v.28, p.216–19, 2001.

ROCHKIND, S. The role of laser in nerve tissue regeneration and repair: research development with perspective for clinical application. In: CONGRESS OF THE WORLD ASSOCIATION FOR LASER THERAPY, 5., Guarujá-SP, 2004, p.15.

ROCHKIND, S.; GEUNA, S.; SHAINBERG, A. Chapter 25 phototherapy in peripheral nerve injury effects on muscle preservation and nerve regeneration. **International Review of Neurobiology**. v.87, p.445-64, 2009.

RODRÍGUES, F.J.; VALERO-CABRÉ, A.; NAVARRO, X. Regeneration and functional recovery following peripheral nerve injury. **Drug Discovery Today Disease Models**, v.1, p.177–85, 2004.

SALMONS, S.; ASHLEY, Z.; SUTHERLAND, H.; HUSSOLD, M. F.; LI, F.; JARVIS, J. C. Functional electrical stimulation of denervated muscles: basic issue. **Artificial Organs**. v. 29, p.202, 2005

SANTOS, C.M.T.O. O exercício físico induz recuperação funcional pós-traumática do nervo ciático em ratos. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Sergipe, 2006.

SCHMITT, I.; RAISER, A.G.; GRAÇA, D.L. Os efeitos da radiação *laser* Arseneto de Gálio (AsGa) sobre a regeneração de tendões em cães. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.30, n.2, p.145-9, 1993.

STAINKI, D.R.; RAISER, A.G.; GRAÇA, D.L.; BECKER, C.; FERNANDEZ, G.M.S. The galium arsenide (GaAs) laser radiation in the radial nerve regeneration submitted to secondary surgical repair. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.35, n.1, p.37-40, 1998.

STEVENS, L.; SULTAN, K.R.; PEUKER, H.; GOHLSCH, B.; MOUNIER, Y.; PETTE, D. Time-dependent changes in myosin heavy chain mRNA and protein isoforms in unloaded soleus muscle of rat. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v.277, p.C1044–49, 1999.

SWAIM, S.F. Peripheral neuropathies. *In*: BOJRAB, M.J. **Pathophysiology in small animal surgery**. Philadelphia:Lea & Febiger, Cap.24. p.233-42, 1981.

THOMPSON, L. V.; JOHNSON, S. A.; SHOEMAN, J. A. Single soleus muscle fiber function after hindlimb unweighting in adult and aged rats. **Journal of Applied Physiology**. v. 84, p. 1937-42, 1998.

THOMPSON, L.V. Skeletal muscle adaptations with age, inactivity, and therapeutic exercise. **Journal Orthopedics Sports Physiotherapy and Therapy**, v.32, p.44-57, 2002.

TUNER, J.; HODE, L. Laser therapy: clinical practice and scientific background. Grangesberg, Prima Books, 2003. 403 p.

VAN BREUGEL, H. H.; PAR, P.R. He Ne laser irradiation affects proliferation of cultured rat Schwann cells in a dose dependent manner. **Journal of neurocytology**, v.22, p.185–90, 1993.

VAREJÃO, A.S.; CABRITA, A.M.; MEEK, M.F.; BULAS-CRUZ, J.; MELO PINTO, P.; RAIMONDO, S.; GEUNA, S.; GIACOBINI-ROBECCHI, M.G. Functional and morfological assessment of a standardized rat sciatic nerve injury with a non-serrated clamp. **Journal Neurotrauma**, v.21, p.1652–70, 2004.

VEÇOSO, M.C. **Laser em fisioterapia**. 1ed. São Paulo: Lovise Científica, 1993.

VERDÚ, E.; CEBALLOS, D.; VILCHES, J. J.; NAVARRO, X. Influence of aging on peripheral nerve function and regeneration. **Journal Peripheric Nerve Injures**, v.5, n.4, p.191-208, 2000.

VINCK, E.M.; CAGNIE, B.J.; CORNELISSEN, M.J.; DECLEREQ, H.A.; CAMBIER, D.C. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. **Lasers in Medical Science**, v.18, p.95-9, 2003.

WANDERER, C. **Avaliação clínica, macro e microscópica dos efeitos das radiações laser sobre o processo de cicatrização cutânea em cães**. Santa Maria, RS, 1991. 69p. Dissertação (Mestrado em cirurgia) – Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, 1991.

WIDRICK, J.J.; KNUTH, S.T.; NORENBURG, K.M.; ROMATOWSKI, J.G.; BAIN, J.L.W.; RILEY, D.A.; KARHANEK, M.; TRAPPE, S.W.; TRAPPE, T.A.; COSTILL, D.L.; FITTS, R.H. Effect of a 17 day spaceflight on contractile properties of human soleus muscle fibres. **Journal Physiology**, v.516, p.915–30, 1999.

WOLLMAN, Y.; ROCHKIND, S.; SIMANTOV, R. Low power laser irradiation enhances migration and neurite Sprouting of cultured rat embryonic brain cells. **Neurological Research**, v.18, p.467-70, 1996.

WOLLMAN, Y.; ROCHKIND, S. In vitro cellular processes sprouting in cortex microexplants of adult rat brains induced by low power laser irradiation. **Neurological Research**, v.20, p.470–72, 1998.

YOSHIOKA, T.; TAKEKURA, H.; YAMASHITA, K. Efect of endurance training on disuse muscle atrophy induced by body suspension in rats,a structural and biochemical study. **Medicine and Sports Science**, v.37, p.150–161, 1992.

YAMASHITA, K.; YOSHIOKA, T. Shortening velocity and calcium sensitivity of single fbres from hindlimb suspended muscle in rats. **Japanese Journal of Aerospace Environment and Medicine**, v. 30, p.71–80, 1993.

YAMASHITA-GOTO, K.; SHIROTA, T.; HIRAOKA, A.; YOSHIOKA, T. Efect of exercise training on muscle function of different aged rats,the proper exercise program to maintain the muscle function during aging, Bulletin of the Physical Fitness. **Research Institute**, v.85, p.6–17, 1994.