

Efeito do laser terapêutico de baixa potência no gânglio da raiz dorsal L₅ de camundongos submetidos ao esmagamento do nervo ciático

Effect of low-power laser therapy in L₅ dorsal root ganglion of mice submitted to sciatic nerve crush injury

Ana Paula Inoe TOMAZINI¹; Lucas Guilherme Aparecido Parra de SOUZA²; Eduardo José de Almeida ARAÚJO³; Jorge Fernandes AZEVEDO²; Cláudio Vieira de ARAÚJO¹; Simone Inoe ARAÚJO¹; Marshal Costa LEME⁴; Gentil Ferreira GONÇALVES¹

¹Universidade Federal do Mato Grosso, Sinop - MT, Brasil

²Universidade Paranaense, Umuarama -PR, Brasil

³Universidade Estadual de Londrina, Londrina- PR, Brasil

⁴Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, Brasil

Resumo

Avaliou-se o efeito da terapia laser de baixa potência (TLBP) na regeneração de neurônios periféricos de animais adultos. O nervo ciático direito de doze camundongos machos adultos foi esmagado com pinça hemostática durante 30 segundos. Os animais foram divididos aleatoriamente e equitativamente em quatro grupos: HeNe, AsGa, NR e NOR. O grupo HeNe recebeu irradiação laser HeNe (3J/cm²). Os animais do grupo AsGa receberam irradiação laser AsGa (30 mJ) e os animais remanescentes (NR) não foram radiados. A irradiação transcutânea sobre o gânglio da raiz dorsal L₅ foi realizada uma vez ao dia, por 21 dias. Outros quatro animais não foram operados e serviram como controle de normalidade (NOR). Decorridos 21 dias, fragmentos do nervo ciático foram coletados para avaliação morfológica e contagem do número de axônios. O gânglio da raiz dorsal L₅ foi removido para a avaliação morfológica e contagem dos neurônios sensitivos sobreviventes à lesão. Os grupos que sofreram esmagamento do nervo sofreram redução no número de axônios quando comparados ao grupo não operado (NOR). O gânglio da raiz dorsal L5 também foi removido e seccionado em série para a contagem e mensuração dos neurônios sensitivos. Não se observou diferença entre os grupos quando considerada a área do pericário e o número de neurônios. Os resultados indicam que a TLBP não estimulou a regeneração de nervos em camundongos. A TLBP não teve ação neuroprotetora sobre os neurônios após a lesão dos seus axônios.

Palavras-chave: Camundongo. Regeneração. Nervo periférico. HeNe. AsGa.

Abstract

The purpose of this study was to assess the effect of low-power laser therapy (LPLT) on the regenerating peripheral neurons in adult animals. The right sciatic nerve of twelve mice adults was experimentally crushed with a Halstead forceps during 30 seconds. Animals were randomly distributed into three: HeNe, GaAs and NR. HeNe group received radiation laser HeNe (3 J/cm²). The animals of the GaAs group received GaAs laser irradiation (30 mJ) and the remnant animals (NR) were not radiated. The radiation was daily transcutaneously applied to L₅ dorsal root ganglion, for 21 days. Other four non-operated animals served as normal controls (NOR). After 21 days, the sciatic nerve was collected and processed for histological assessment and axonal counting. The L₅ dorsal root ganglion (DRG) was also removed for morphologic and morphometric evaluation of sensory surviving neurons. No difference was found in the number and size of DRG neurons among the experimental groups. The results indicate that LPLT did not improve regeneration of peripheral nerves in mice. LPLT had no neuroprotective effect on neurons after axonal lesion.

Keywords: Mouse. Regeneration. Peripheral nerve. HeNe. AsGa.

Introdução

A seção ou esmagamento, por traumatismo, de um nervo periférico ainda constitui uma condição preocupante, pois a perda da função sensitiva e/ou motora resultante impossibilita a realização de diversas atividades¹. Nos mamíferos, o nervo periférico trans-se-

Endereço para correspondência:

Ana Paula Inoe Tomazini
Instituto de Ciências da Saúde
Universidade Federal de Mato Grosso – Campus Universitário Sinop
Avenida Alexandre Ferronato, s/n km 14
CEP 87500-000 Sinop- MT
ana-inoe@hotmail.com

Recebido: 26/06/2008

Aprovado: 09/12/2010

cionado possui capacidade de regeneração e de atingir, embora de maneira limitada, a recuperação funcional, pois o trauma pode levar a morte neuronal². O processo de regeneração dos nervos periféricos envolve a restauração do volume axoplasmático perdido em meio à intensa proliferação celular (fibroblastos, células endoteliais, células de Schwann)³. Visando otimizar as taxas de recuperação funcional, vários experimentos no campo da cirurgia, neurologia e neurobiologia, têm sido desenvolvidos na esperança de aumentar o processo reparador do sistema nervoso^{2,4}.

A terapia com laser de baixa potência (TLBP) produz efeitos biológicos, capazes de acelerar o processo de reparação dos tecidos traumatizados devido à ação fotoquímica e/ou fotofísica da irradiação. Os mecanismos e elementos envolvidos na conversão da energia luminosa em energia bioquímica, capaz de gerar processo regenerativo não são todos conhecidos, podendo ocorrer em nível molecular⁵. O laser terapêutico de baixa potência (LTBP) inclui as misturas dos gases Hélio-Neônio (HeNe), com ação regenerativa em tecidos superficiais e Arseneto de Gálio (AsGa), que age mais profundamente⁵.

A irradiação com o LTBP tem sido utilizada sobre o nervo para promover a maturação neural e a regeneração após a lesão e constitui um dos métodos terapêuticos empregados na recuperação dos nervos periféricos traumatizados por facilitar o processo de regeneração axonal^{6,7}. O LTBP aplicado transcutaneamente aos segmentos medulares correspondentes ao nervo lesado pode melhorar a recuperação do nervo periférico⁷, contudo, pouco se sabe a respeito da ação do laser na neuroproteção e estímulo da regeneração com radiação direta sobre os corpos celulares.

O trabalho visa avaliar o efeito da TLBP HeNe e AsGa na regeneração de neurônios periféricos, após esmagamento experimental do nervo ciático em camundongos adultos, com avaliação do gânglio da raiz dorsalçespinhal L5, que constitui a principal fonte de axônios sensitivos para o nervo ciático.

Material e Método

Foram utilizados 16 camundongos Swiss, machos, adultos, fornecidos pelo biotério da Universidade Paranaense. Durante o período de observação, os animais foram acondicionados em compartimentos apropriados, sendo mantidos em gaiolas individuais, recebendo ração comercial para ratos e água *ad libitum*.

Os camundongos foram divididos aleatória e equitativamente em quatro grupos assim denominados: HeNe, AsGa, NR e NOR. Os animais do grupo HeNe receberam irradiação HeNe. Os quatro animais do grupo AsGa foram radiados com laser Arseneto de gálio, outros quatro animais (NR) não receberam irradiação. Os quatro camundongos remanescentes não receberam qualquer tipo de tratamento, servindo como controle de normalidade (NOR).

Após avaliação da massa corporal, os animais foram anestesiados com isoflurano em sistema aberto. Os animais foram submetidos à tricotomia da face caudo-lateral do membro pélvico direito. Os camundongos foram posicionados em decúbito esternal e os membros fixados ao plano da mesa com o auxílio de fitas adesivas.

O acesso caudo-lateral à coxa foi realizado por incisão abrangendo a pele, o tecido subcutâneo e o plano muscular entre o músculo vasto lateral e o músculo bíceps femoral com exposição do nervo ciático direito.

O nervo ciático foi liberado, parcialmente, do leito conjuntivo e, a seguir, procedeu-se o esmagamento do mesmo na sua porção média, com pinça hemostática Halstead, durante 30 segundos. Ao final do procedimento cirúrgico, os planos anatômicos foram reconstituídos com sutura em pontos simples contínuo com fio de nylon monofilamentar n.º 6-0 na musculatura. As bordas da pele incisada foram unidas com fio de náilon monofilamentar n.º 4-0 em padrão simples contínuo.

Decorridas 24 horas do ato operatório, os animais dos grupos HeNe e AsGa receberam irradiação do la-

ser com método pontual, em um único ponto sobre a região dos gânglios dorsais L₅, diariamente durante três semanas. O aparelho utilizado para irradiação HeNe (Plasmax IV – KLD Biosistemas, São Paulo, SP), possui emissão de onda pulsada, comprimento de onda 632,8 nm, potência máxima 50 mW, com área do feixe 0,02 cm². A energia utilizada diariamente foi de 3 J/cm², com a canet em posição perpendicular e distante dois centímetros da superfície da pele. A energia laser AsGa 30 mJ foi entregue por fibra óptica de 0,01 cm² de área, com a caneta posicionada perpendicularmente em contato com a pele. Para a irradiação, utilizou-se laser semicondutor, diodo arseneto de gálio, 45 mW de potência, comprimento de onda 904 nm (Endophoton LLT-IR -KLD Biosistemas).

Após três semanas, os animais foram anestesiados para exposição cirúrgica do nervo ciático direito que foi dissecado em toda a sua extensão sob microscópio cirúrgico com aumento de dez vezes e seccionado transversalmente para colheita de um fragmento.

O gânglio espinhal L₅ correspondente ao antímero do membro que recebeu esmagamento, também foi removido (Figura 1). Todos os fragmentos coletados foram mantidos em solução de Karnovsky (paraformaldeído a 1%, glutaraldeído 2% em tampão fosfato de sódio 0,1 M com pH 7,3) durante 24 horas a 4 °C.

Os gânglios espinhais e os fragmentos do nervo ciático coletados foram desidratados em soluções crescentes de álcool etílico e incluídos em parafina. Cortes seriados longitudinais de 4 µm foram obtidos da extensão total do gânglio, e cortes transversais dos fragmentos coletados do nervo ciático, foram corados pela técnica da Hematoxilina e Eosina para posterior observação em microscópio de luz.

Os cortes obtidos do nervo ciático foram observados quanto à disposição dos elementos neuronais e conjuntivos que constituem o nervo. Os cortes longitudinais dos gânglios espinhais L₅ foram analisados quanto ao seu aspecto e disposição dos neurônios sensitivos.

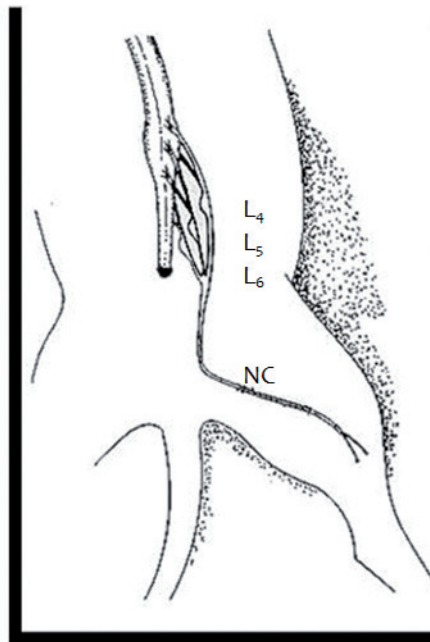


Figura 1 - Representação esquemática do modelo experimental utilizado. Estão representados os gânglios espinhais que contribuem para a formação do nervo ciático (NC), destacando-se o gânglio espinhal L₅

A análise quantitativa das fibras nervosas regeneradas foi feita por meio da determinação do número de axônios mielínicos encontrados nos cortes transversais obtidos dos fragmentos do nervo ciático. As lâminas foram observadas em microscópio óptico de luz com aumento de 100 vezes e manualmente contadas.

A análise quantitativa dos neurônios sensitivos sobreviventes à lesão axonal foi realizada pela contagem dos neurônios presentes nos cortes longitudinais do gânglio espinhal L₅. As imagens foram capturadas por câmera digital (Moticam 2000, 2.0 M Pixel) acoplada a microscópio de luz binocular (MOTIC B5) utilizando o software Motic Images Plus, versão 2.0, para contagem de todos os corpos celulares dos neurônios com nucléolo evidente, sob objetiva de 25X, na extensão total do gânglio.

A análise morfométrica dos neurônios de todos os animais foi realizada a partir dos mesmos cortes utilizados para a contagem dos neurônios. De cada corte foram utilizados três campos aleatórios e distintos com aumento de 40 vezes e captados por câmara digital. Os contornos de todos os corpos celulares dos neurônios com nucléolo evidente presentes no campo, foram contornados com cursor manual, determinando automaticamente sua área.

Pela natureza das variáveis estudadas optou-se pelo teste de Kruskal-Wallis (Teste H). Este é um teste utilizado para variáveis não-normais. Utiliza a ordem dos dados observados, sem levar em conta seus valores absolutos. O valor para o teste de Kruskal-Wallis foi estimado pela fórmula:

$$H = \frac{12}{N(N+1)} \sum ((\sum R_i)^2/n) - 3(N+1)$$

com distribuição de qui-quadrado

onde: N = número total de unidades; n = número de unidades por tratamento; R_i = tratamentos; gl = k-1.

Resultados

Os cortes transversais do nervo ciático dos animais que sofreram esmagamento do nervo mostraram or-

ganização similar nos três grupos com axônios de diâmetro reduzido em meio a algumas fibras de grande calibre envoltas por tecido conjuntivo delimitados pelo epineuro. No grupo NOR o nervo ciático apresentava-se com aspecto de nervo normal com fibras de grande calibre, uniformemente distribuídas, contidas por epineuro. A avaliação histológica do nervo em regeneração reflete o grau de maturação e recuperação funcional⁸. A semelhança entre os grupos que tiveram o nervo ciático esmagado indica ausência de ação positiva do LTBP nos grupos que receberam irradiação sobre os gânglios dorsais L5, corroborando com o relatado por Bagis et al.⁹.

A descrição dos dados experimentais obtidos a partir da contagem do número de axônios mielínicos encontrados no nervo ciático dos camundongos dos quatro grupos pode ser observada na tabela 1. Não houve diferença estatística entre os grupos que sofreram esmagamento do nervo (p > 0,05), porém estes apresentaram redução no número de axônios quando comparados ao grupo que não sofreu esmagamento do nervo.

A histologia dos cortes longitudinais dos gânglios espinhais L5 correspondente ao antímero do membro operado e do gânglio direito no grupo não operado, revelou estrutura semelhante em todos os grupos, ou seja, a cápsula de tecido conjuntivo envolvia os gânglios, os corpos das células ganglionares e feixes de fibras nervosas, além dos vasos sanguíneos (Figura 2).

As médias e desvios-padrão da área e número de neurônios sensitivos encontrados no gânglio espinhal L₅ foram estatisticamente semelhantes (p > 0,05) em todos os grupos, conforme observado na tabela 1, mostrando efeito positivo da TLBP.

Discussão

A lesão por esmagamento preserva a estrutura dos tubos endoneurais, sendo empregada para testar a ação de fatores que estimulam a regeneração. A le-

Tabela 1 - Médias, desvios-padrão e resultado estatístico do número de axônios, número de neurônios e área dos neurônios de camundongos submetidos ao esmagamento do nervo ciático – Umarama – 2007

Variável	AsGa		HeNe		NR		NOR	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
n° Axônios	218,75a ⁽¹⁾	84,10	244,75 ^a	71,93	285,00 ^a	59,58	1189,75 ^b	107,55
n° neurônios	358,75 ^a	43,87	341,75 ^a	34,56	348,00 ^a	65,27	448,75 ^a	144,35
Área neurônios μm^2	535,56 ^a	55,38	395,48 ^a	42,74	481,93 ^a	126,34	520,90 ^a	120,92

⁽¹⁾Médias seguidas de mesma letra na linha, não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis, ao nível de 5% de significância

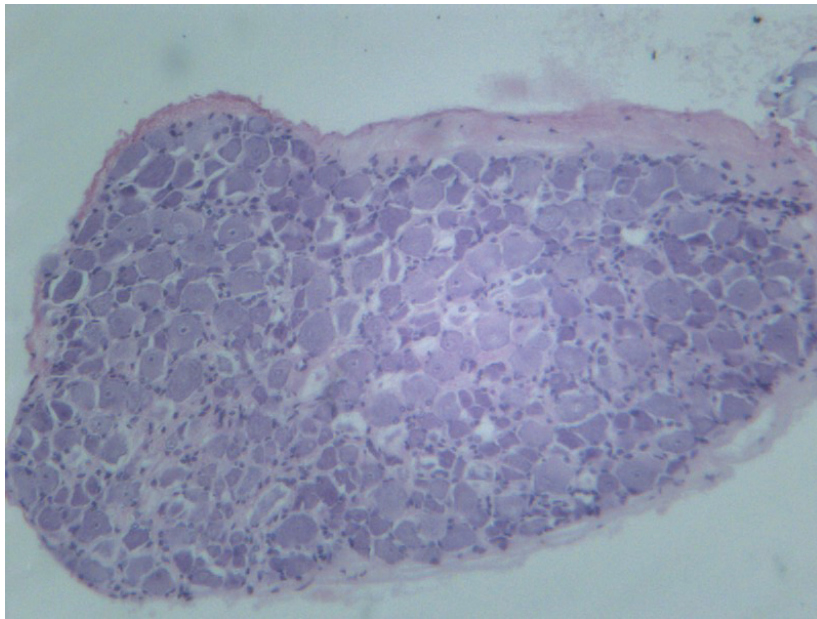


Figura 2 - Fotomicrografia representativa dos cortes longitudinais obtidos dos gânglios espinhais L₅ dos camundongos que sofreram esmagamento do nervo ciático três semanas após o ato operatório. Observar a presença dos neurônios, células arredondadas com núcleo evidente

são por esmagamento constitui modalidade útil para avaliar a regeneração dos nervos periféricos, visto que promove axonotmese. Neste tipo de lesão o prognóstico é favorável, pois apesar de haver degeneração walleriana no segmento distal, há a preservação das estruturas de sustentação, tecido conjuntivo de suporte, trata-se de método confiável e reprodutível^{10,11}.

As variáveis frequentemente adotadas para avaliar a regeneração de um nervo periférico incluem a morfologia, a morfometria e análise quantitativa dos axônios regenerados¹², a eletrofisiologia⁸, a morfometria

e análise quantitativa dos neurônios sobreviventes à lesão^{10,13}. A contagem do número de axônios mielínicos constitui parâmetro que avalia a maturação do axônio, conforme preconiza Lundborg¹⁴. Dentre os métodos de avaliação disponíveis, empregou-se a análise morfológica do nervo ciático e do gânglio dorsal L₅, visando avaliar quantitativamente as alterações histológicas provocadas pela ação do LTBP após lesão no nervo ciático.

A presença predominante de fibras de diâmetro reduzido nos grupos que sofreram esmagamento do

nervo, com aspecto semelhante nos três grupos indica não ter havido ação positiva da TLBP no processo de maturação dos axônios em regeneração. Após a lesão axonal, ocorre o crescimento de novas projeções axoplasmáticas distalmente na tentativa de recompor o nervo periférico lesado¹⁴.

Houve redução no número de axônios em consequência do esmagamento do nervo. Na tabela 1 observa-se maior média no número de axônios no nervo ciático no grupo NOR em relação aos demais grupos ($p < 0,05$), sem diferença estatística entre os grupos submetidos ao esmagamento do nervo. A análise quantitativa dos axônios revelou que o tratamento com laser HeNe ou AsGa não estimulou a regeneração dos nervos periféricos. Resultados semelhantes foram relatados por Wu et al.¹⁵ e Chen et al.¹⁶, podendo inclusive exercer efeito supressor¹⁶. Bagis et al.⁹, conduziram estudo com esmagamento do nervo ciático de ratos, e irradiação com AsGa nos segmentos correspondentes da medula e declararam ação ineficaz no processo de regeneração. Contrariamente, em outros estudos a TLBP sobre o nervo periférico lesado estimulou a regeneração, levando a aumento no número de axônios e estrutura organizacional mais madura, com axônios de tamanho maior com bainha de mielina espessa^{6,17}. A TLBP aplicada diretamente na medula espinhal melhorou a recuperação do nervo periférico correspondente⁷. Anders, Geuma e Rochkind⁴ sugerem que o efeito do TLBP na regeneração do nervo periférico pode ser maior se a irradiação for aplicada no trajeto do nervo e sobre o segmento medular correspondente.

Não foram observados na literatura consultada, estudos que avaliassem o efeito da TLBP sobre o corpo celular do axônio lesado. Rochkind et al.⁷ sugerem que no sistema nervoso central a TLBP estimule a proliferação de astrócitos e oligodendrócitos, melhorando o metabolismo dos neurônios com conseqüente acréscimo na produção de mielina.

Os resultados para número de neurônios foram semelhantes nos grupos que sofreram esmagamento do

nervo, indicado não ter havido influência positiva da TLBP sobre os neurônios lesados. Houve discreta redução no número de neurônios ($p > 0,05$). Após a lesão do nervo periférico, a total recuperação funcional raramente ocorre. Isto se deve à morte de neurônios nos gânglios dorsais e medula espinal ocorrida em consequência ao trauma, especialmente em animais recém-nascidos¹⁰, ou por falha dos axônios em atingir o seu órgão alvo corretamente¹⁴. A lesão de um nervo periférico pode levar à morte neuronal¹³, como no caso em questão.

Não houve diferença entre os grupos quando considerado o tamanho do corpo celular. Frente a situações patológicas e em resposta à lesão do axônio, há aumento na área do corpo celular, processo denominado cromatólise, caracterizado por aumento no volume do corpo celular. O núcleo se torna excêntrico e desenvolve nucléolo evidente, além de haver aumento no retículo endoplasmático rugoso o qual se dispersa pelo citoplasma (corpúsculo de Nissl), tornando-se basofílico¹⁴. Esperava-se encontrar neurônios com tamanho aumentado reativos ao trauma provocado pelo esmagamento do nervo. Talvez a avaliação a intervalos diferentes, com início nos primeiros dias após a lesão, pudesse elucidar tal achado.

Os resultados disponíveis na literatura são contraditórios, particularmente acerca dos mecanismos envolvidos da TLBP na regeneração dos nervos periféricos. A TLBP tem sido utilizada com o intuito de promover a regeneração de nervos periféricos³ apesar dos resultados variados^{7,16,18,19}.

A utilização da TLBP ainda é controversa e seu efeito sobre o tecido nervoso ainda não foi esclarecido. Uma das hipóteses é a de que a energia do laser tenha ação inibindo a degeneração^{7,20}.

A TLBP possui efeito mais pronunciado em tecidos afetados por condição patológica. Tunér e Hode⁵ sugerem que o laser estimule diretamente o sistema imune e, portanto animais sadios não respondem tão bem quanto aqueles imunodeprimidos. As condições

clínicas de um paciente ou tecido imunologicamente deprimidos não podem ser experimentalmente repetidas, e este fator é significante na eficácia da TLBP. Isto pode justificar a discrepância algumas vezes observada entre os estudos clínicos e experimentais, bem como os resultados aqui obtidos.

A ausência de parâmetros estabelecidos para a aplicação TLBP dificulta a comparação entre os diversos experimentos. Há grande variabilidade entre o tipo de laser, dosimetria, comprimento de onda, modo de aplicação, e espécie estudada. É preciso estabelecer protocolos eficazes da aplicação do laser permitindo a utilização desta terapia com padronização. São necessários estudos que elucidem os efeitos da TLBP nos tecidos nervosos, fornecendo ao clínico, subsídios

para a utilização deste recurso, visando a melhorar a regeneração pós-traumática do nervo lesado.

Conclusão

A TLBP não promoveu estímulo à regeneração de neurônios periféricos em camundongos adultos submetidos ao esmagamento experimental do nervo ciático.

A TLBP não teve ação protetora na sobrevivência dos neurônios sensitivos após o esmagamento do nervo.

Agradecimento

Ao Instituto de Pesquisa, Estudos e Ambiência Científica pelo fomento.

Referências

1. RAMÓNY CAJAL, S. **Cajal's Degeneration and regeneration of the nervous system**. London: University Press, 1991. 976 p.
2. WEST, C. A.; DAVIES, K. A.; HART, A. M.; WIBERG, M.; WILLIAMS, S. R.; TERENCEHI, G. Volumetric magnetic resonance imaging of dorsal root ganglia for the objective quantitative assessment of neuron death after peripheral nerve injury. **Experimental Neurology**, v. 203, n. 1, p. 22-23, 2007.
3. LUNDBORG, G.; LONGO, F.M.; VARON, S. Nerve regeneration model and trophic factors in vivo. **Brain Research**, v. 232, n. 1, p. 157-161, 1982.
4. ANDERS, J. J.; GEUMA, S.; ROCHKIND, S. Phototherapy promotes regeneration and functional recovery of injured peripheral nerve. **Neurological Research**, v. 26, p. 233-239, 2004.
5. TUNÉR, J.; HODE, L. It's all in the parameters: a critical analysis of some well known studies. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**, v. 16, n. 5, p. 245-248, 1998.
6. BAE, C. S.; KIM, K. Y.; SONG, C. H.; PAK, S.; KIM, S. G.; JANG, C. H. Effect of Ga-as laser on the regeneration of injured sciatic nerves in the rat. **In Vivo**, v. 18, n. 4, p. 489-495, 2004.
7. ROCHKIND, S.; NISSAN, M.; SHAMIR, M.; SALAME, K. Effects of laser irradiation on the spinal cord for the regeneration of crushed peripheral nerve in rats. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 28, n. 3, p. 216-219, 2001.
8. DELLON, A. L.; MACKINNON, S. E. Selection of appropriate parameter to measure neural regeneration. **Journal of Plastic Surgery**, v. 23, n. 3, p. 197-202, 1989.
9. BAGIS, S.; COMELEKOGLU, U.; COSKUN, B.; MILCAN, A.; BUYUKAKILLI, B.; SAHIM, G.; OZISIK, S.; ERDOGAN, C. No effect of GA-AS (904 nm) laser irradiation on the intact skin of the injured rat sciatic nerve. **Lasers in Medical Science**, v. 18, p. 83-88, 2003.
10. KUZIS, K.; COFFIN, J. D.; ECKENSTEIN, F. P. Time course and age dependence of motor neuron death following facial nerve crush injury: role of fibroblast growth factor. **Experimental Neurology**, v. 157, n. 1, p. 77-87, 1999.
11. MAZZER, P. Y.; BARBIERI, C. H.; MAZZER, N.; FAZAN, V. P. Morphologic and morphometric evaluation of experimental acute crush injuries of the sciatic nerve of rats. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 173, n. 2, p. 249-258, 2008.
12. MACKINNON, S. E.; DOOLABH, V. B.; NOVAK, C. B.; TRULOCK, E. P. Clinical outcome following nerve allograft transplantation. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 107, n. 6, p. 1419-1429, 2001.
13. LISS, A. G.; EKENSTAM, F. W.; WIBERG, M. Loss of neurons in the dorsal root ganglia after transection of a peripheral sensory nerve. **Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery**, v. 30, p. 1-6, 1996.
14. LUNDBORG, G. Nerve regeneration In: LUNDBORG, G. **Nerve injury and repair**. Churchill Livingstone: Edinburgh, 1988. p. 149-195.
15. WU, W.; PONNUDURAI, R.; KATZ, J.; POTT, C. B.; CHILCOAT, R.; UNCINI, A.; RAPOPORT, S.; WADE, P.; MAURO, A. Failure to confirm of light-evoked response of peripheral nerve to low power helium-neon laser light stimulus. **Brain Research**, v. 401, n. 2, p. 407-408, 1987.
16. CHEN, Y. S.; HSU, S. F.; CHIU, C. W.; LIN, J. G.; CHEN, C. T.; YAO, C. H. Effect of low-power pulsed laser on peripheral nerve regeneration in rats. **Microsurgery**, v. 25, n. 1, p. 83-89, 2005.
17. SHAMIR, M. H.; ROCHKIND, S.; SANDBANK, J. ALON, M. Double-blind randomized study evaluating regeneration of the rat transected sciatic nerve after suturing and postoperative low-power laser treatment. **Journal of Reconstructive Microsurgery**, v. 17, n. 2, p. 133-137, 2001.
18. ROCHKIND, S. Phototherapy in peripheral nerve injury for muscle preservation and nerve regeneration. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 27, n. 2, p. 219-220, 2009.

19. SOUSA, F. F. A.; ANDRAUS, R. A. C.; BARBIERI, C. H.; MAZZER, N. Influence of laser radiation in nerve regeneration in different treatment sites. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 17, n. 6, 2009. Doi: 10.1590/S1413-78522009000600003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-78522009000600003&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 20 set. 2010.
20. TUNÉR, J. Is low-power pulsed laser ineffective in neural growth? **Microsurgery**, v. 29, n. 3, p. 251, 2009.