

Efeito do *laser* de baixa intensidade (660 nm) na regeneração do nervo isquiático lesado em ratos

Effect of low-power laser (660 nm) on regeneration of injured rat sciatic nerve

Rafael Inácio Barbosa¹, Alexandre Marcio Marcolino², Rinaldo Roberto de Jesus Guirro³,
Nilton Mazzer⁴, Cláudio Henrique Barbieri⁴, Marisa de Cássia Registro Fonseca³

Estudo desenvolvido no RAL/FMRP/USP – Depto. de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil

¹ Fisioterapeuta; Doutorando no RAL/FMRP/USP

² Doutorando no RAL/FMRP/USP

³ Profs. Drs. do Curso de Fisioterapia da FMRP/USP

⁴ Profs. titulares da FMRP/USP

Endereço para correspondência

Rafael Inácio Barbosa
RAL- FMRP-USP,
Av. Bandeirantes, 3900
14049-900 Ribeirão Preto SP
e-mail: ribarbosa@hcrp.usp.br

Este estudo teve apoio financeiro da Fapesp – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

Apresentação
ago. 2009

Aceito para publicação
jun. 2010

Resumo: Os nervos periféricos são estruturas que, ao sofrerem lesões, podem originar incapacidades motoras e sensitivas importantes. O laser de baixa intensidade é um dos diversos recursos terapêuticos para promover a regeneração nervosa precoce, mas ainda não há consenso sobre sua utilização. O objetivo deste estudo foi investigar, por meio de avaliação funcional, o efeito da terapia a laser de baixa intensidade (660 nm) na regeneração do nervo isquiático após esmagamento. Foram utilizados 18 ratos (Wistar) submetidos à lesão do nervo isquiático divididos em dois grupos, controle e grupo laser, submetido ao tratamento a laser (AsGaAl, 660 nm, 10J/cm², 30 mW e 0,06 cm²) por 21 dias no local da lesão. Para a avaliação funcional, foi aplicado o índice funcional do ciático (IFC) no pré-operatório e nos 7º, 14º e 21º dias de pós-operatório. Quando comparados o IFC dos grupos no 14º dia de pós-operatório, foi encontrada melhora significativa no grupo laser em relação ao controle. Na amostra analisada e nos parâmetros utilizados, pôde-se constatar que a aplicação do laser foi eficaz na recuperação funcional precoce do nervo ciático esmagado.

Descritores: Nervo ciático; Regeneração nervosa; Síndromes de compressão nervosa/reabilitação; Terapia a laser de baixa intensidade

Abstract: Peripheral nerves, when injured, may originate important motor and sensitive disability. Studies have used several therapeutic resources in order to achieve early nervous regeneration, such as low-power laser; but there is no consensus on its use, which leads to controversial conclusions. The purpose of this study was to assess the effect of GaAlAs laser (660 nm) on functional recovery of the sciatic nerve in rats. Sciatic nerves of 18 Wistar rats were crushed and divided into sham group and treated group, the latter submitted to laser therapy (660 nm, 10 J/cm², 30 mW and 0.06 cm²) for 21 days. The sciatic functional index (SFI) was measured before surgery and on the 7th, 14th and 21st postoperative days. A significant difference, showing better regeneration of the treated group, was found when comparing SFI on the 14th day. Hence, the use of low-power laser, with the parameters and methods here used, showed positive results in early regenerating rat crushed sciatic nerve.

Key words: Functional laterality; Infants and toddlers; Motor activity; Movement, reaching

INTRODUÇÃO

Os nervos periféricos são estruturas que, tal como outros tecidos, ao sofrer lesões originam incapacidades motoras e sensoriais importantes¹. Estima-se que a incidência das lesões traumáticas em alguns países seja superior a 500.000 novos casos anuais, dos quais 2,8% dos pacientes adquirem incapacidades vitalícias em virtude do elevado tempo de regeneração nervosa²⁻⁶.

As causas das lesões do sistema nervoso periférico (SNP) incluem ferimentos cortantes, por arma de fogo⁷, traumas por alterações de temperatura, compressões, mecanismos de tração e ainda as causas infecciosas e tóxicas, sendo que pode haver diferentes mecanismos como laceração, avulsão, secção, estiramento, compressão e esmagamento^{8,9}. Essas lesões promovem uma agressão à integridade do tecido produzindo disfunções importantes nas estruturas inervadas pelo nervo lesado, pois implicam alterações da condução nervosa e no transporte axonal^{10,11}.

Dentre os instrumentos terapêuticos para regeneração do SNP mencionados na literatura, a estimulação elétrica¹², o ultra-som¹³ e o laser de baixa intensidade¹⁴⁻¹⁹ são utilizados com o intuito de acelerar os processos regenerativos, buscando o retorno precoce da funcionalidade.

A laserterapia de baixa intensidade é utilizada em várias pesquisas clínicas e experimentais nas lesões do SNP por ocasionar um estímulo na microcirculação, pela paralisação dos esfíncteres pré-capilares, provocando a vasodilatação de arteríolas e capilares e pela neoformação vascular, levando assim a um aumento do fluxo sanguíneo na área irradiada. Também é empregada para cicatrização de vários tecidos, por estimular um aumento na produção de ATP celular, provocando aceleração na atividade mitótica celular²⁰⁻²⁴. Nos estudos recentes sobre a influência do laser de baixa intensidade nas lesões do SNP, utilizam-se diferentes modelos, variando comprimentos de onda (632-904 nm), energia, densidade, tempo de intervenção, mecanismo e tipo de lesão, além de seu tratamento e a forma de avaliação (funcional e morfométrica)^{15,19,25-30}.

Em condições experimentais, a recuperação das lesões nervosas periféricas é estudada principalmente por técnicas de eletrofisiologia, histologia e morfometria. Embora os parâmetros eletrofisiológicos e morfológicos sejam úteis, eles não permitem um entendimento funcional do segmento¹⁵. Em 1982, De Medinacelli *et al.*³¹, tendo analisado a relação entre lesão no ciático e o apoio das patas na marcha, propuseram a utilização de um método de avaliação denominado índice funcional do ciático (IFC), baseado em mensurações nas patas traseiras de ratos. Gasparini *et al.*³² fizeram avaliação funcional da marcha de ratos com lesão por esmagamento do nervo isquiático pelo IFC, utilizando uma passarela de acrílico e registrando as pegadas por uma câmara digital. As imagens foram avaliadas por programa de computador para quantificar os parâmetros predeterminados por De Medinacelli *et al.*³¹, modificados por Bain *et al.*³³.

O objetivo deste estudo foi investigar, pelo grau de funcionalidade inferido pelo IFC, o efeito da terapia a laser de baixa intensidade (660 nm, utilizando energia emitida de 0,6J) na regeneração do nervo isquiático após esmagamento. Há evidências de que o laser de baixa intensidade pode melhorar a recuperação funcional na lesão nervosa por esmagamento; essa hipótese foi aqui testada visando contribuir com a literatura preexistente, pois a metodologia e os parâmetros estão bem definidos, para que outros autores possam reproduzi-los.

METODOLOGIA

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal e Pesquisa da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Foram utilizados 18 ratos Wistar adultos machos, pesando de 290 a 320 gramas, que foram divididos aleatoriamente em dois grupos:

- Grupo controle (n=9): simulação da radiação laser
- Grupo laser (n=9): radiação laser com fluência de 10 J/cm², energia emitida (E) = 0,6J e tempo de exposição de 20 s.

Procedimentos

Para o esmagamento do nervo isquiático dos ratos, foi utilizado um dispositivo portátil de peso morto, confeccionado pela Oficina de Precisão da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Figura 1). A carga de esmagamento utilizada foi a de 5000 g por um período de 10 minutos, sendo suficiente para provocar uma lesão tipo axonotmese no segmento, ocasionando uma disfunção na marcha dos animais³⁴. Pachioni *et al.*³⁵ concluíram que não há necessidade de utilizar cargas acima de 5000 g nesse modelo de esmagamento, pois esta é suficiente para lesar os vasos intraneurais, especialmente os capilares endoneurais, produzindo uma importante lesão axonal, caracterizando a axonotmese.

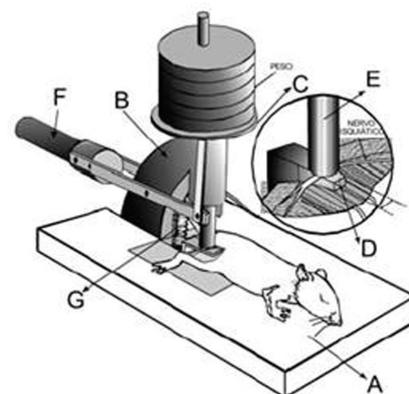


Figura 1 Representação esquemática do dispositivo de esmagamento do nervo: (A) plataforma para o apoio do animal, (B) estrutura principal, (C) suporte de apoio para os pesos, (D) base de apoio para o nervo, (E) eixo de aplicação de pressão, (F) alavanca para acionar os pesos, (G) mola para manter a alavanca em equilíbrio (Adaptado de Pachioni *et al.*³⁵)

Todos os ratos foram anestesiados com uma mistura de Ketamina a 10% (0,1 ml/100 g peso corpóreo) e Xylazina a 2% (0,07 ml/100 g peso corpóreo), administradas por via intraperitoneal. Após a incisão, o nervo isquiático foi abordado e o esmagamento, utilizando o dispositivo de peso morto, foi feito 5 mm acima da divisão dos três ramos principais (fibular, tibial e sural). Após o esmagamento, o nervo foi recolocado em seu leito e realizada a sutura dos músculos e da pele.

A radiação *laser* foi aplicada em um ponto predeterminado no ato cirúrgico, sobre o local da realização do esmagamento do nervo. A caneta foi posicionada a 90° em relação ao tecido cutâneo, utilizando a técnica pontual com contato, imediatamente após a operação e nos 20 dias subseqüentes.

Foi utilizado um equipamento *laser* (modelo Laserpulse da Ibramed Equipamentos Médicos, RS) de diodo de arseneto de gálio aluminizado (AsGaAl), com comprimento de onda de 660 nm, 10 J/cm², potência de 30 mW e área do feixe de 0,06 cm², em modo de pulso contínuo. O equipamento foi adquirido para realização desta pesquisa; a emissão do *laser* foi aferida inicialmente pelo fabricante e, após o término do experimento, foi realizada aferição no Laboratório de Bioengenharia da USP São Carlos.

Para a avaliação funcional usando o IFC, procedeu-se ao registro das pegadas dos animais. As impressões foram registradas por uma câmera digital (Handycam – Digital Video Camera Recorder), tal como a utilizada por Gasparini *et al.*³², fixada sob uma passarela de acrílico transparente com 43 cm de comprimento, 5,5 cm de altura e 8,7 cm de largura, tendo ao seu final uma casinhola de madeira. Os vídeos das pegadas foram digitalizados pelo programa Magix para obtenção das imagens das pegadas. As imagens foram analisadas por meio do programa Image J, para transformar os pixels em milímetros, de modo a poder calcular os parâmetros predeterminados para a avaliação do índice funcional do ciático (Figura 2). As impressões das pegadas foram obtidas no pré-operatório e após 7, 14 e 21 dias da lesão inicial em ambos os grupos. As imagens foram avaliadas pela fórmula do IFC proposta por Bain *et al.*³³:

$$IFC = - 38,3 \times \frac{(PLE - PLN)}{PLN} + 109,5 \times \frac{(TSE - TSN)}{TSN} + 13,3 \times \frac{(ITE - ITN)}{ITN} - 8,8$$

Onde: IFC = índice funcional do ciático; E = experimental; N = normal
 PL = comprimento da pata (*print lenght*)
 TS = abertura total dos dedos (*total spread*)
 IT = abertura dos dedos intermediários (*intermediate toes*)

Análise estatística

Para comparar as atividades foi proposto um modelo linear de efeitos mistos com o alpha (nível de significância) assumido de 5%³⁶. Esse modelo (efeitos aleatórios e fixos) é utilizado na análise de dados onde as respostas de um mesmo indivíduo estão agrupadas e a suposição de independência entre observações num mesmo grupo não é adequada. No modelo de efeitos mistos utilizado, foram considerados como efeito aleatório os indivíduos e, como efeitos fixos, os grupos, os tempos e a interação entre os mesmos. Tal modelo tem como pressuposto que o resíduo obtido pela diferença entre os valores preditos pelo modelo e os valores observados tenha distribuição normal, com média 0 e variância constante. Nas situações onde tal pressuposto não foi observado, foram feitas transformações na variável resposta. O ajuste do modelo foi feito pelo programa SAS (v.9)^{37,38}.

O IFC médio dos grupos foi: no pré operatório, controle -6,10 e grupo *laser*, -8,42; no 14o dia, controle -83,70 e grupo *laser*, -59,01; e, no 21o dia, controle -32,58 e grupo *laser*, -22,97. A Figura 3 permite visualizar a variação do IFC em todo o período de estudo. A análise intergrupos apontou diferença estatisticamente significativa quando comparados os grupos controle e *laser* no 14o dia (*p*<0,01). A análise intragrupos mostrou diferença significativa entre o pré-operatório e o 21o dia (*p*<0,01 em ambos os grupos), indicando que até esse dia nenhum dos grupos tinha alcançado seu padrão inicial de marcha.

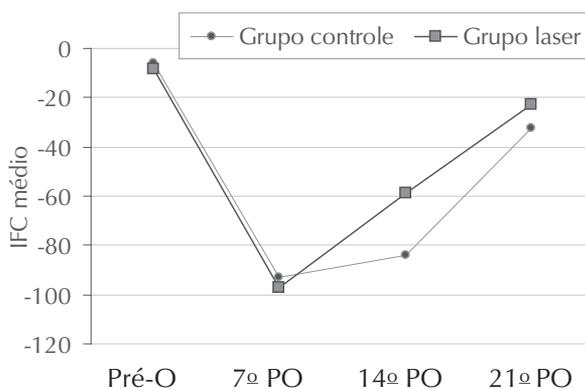


Figura 3 Médias do índice funcional do ciático (IFC) obtidas pelos grupos controle (n=9) e laser (n=9) no pré-operatório (Pré-O) e no 7º, 14º e 21º dias após a lesão e respectiva sutura (PO)

RESULTADOS

Para a análise funcional da marcha foram utilizados os registros das pegadas tomados no pré-operatório, no 7º, 14º e 21º dias do pós-operatório, totalizando 72 pegadas.

DISCUSSÃO

Vários parâmetros, como comprimento de onda, densidade de energia, modo do pulso e potência do *laser*, estão sendo utilizados para estimular a regeneração e acelerar a recuperação funcional do nervo periférico^{15,16,28,39-42}. Em geral as publicações cujo tratamento utilizou o *laser* de emissão contínua apresentaram resultados positivos na regeneração nervosa periférica, podendo ser esse modelo a primeira escolha para tal na regeneração⁴³.

Rochkind *et al.*^{19,44,45} e Anders *et al.*⁴⁶ descreveram os mecanismos da atuação do *laser* na recuperação do tecido nervoso, relatando efeito imediato de proteção

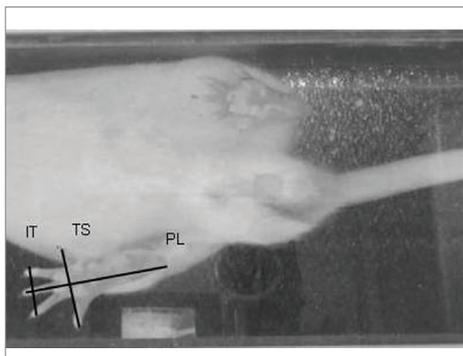


Figura 2 Representação dos parâmetros avaliados para calcular o índice funcional do ciático (IFC); IT = abertura dos dedos intermediários; PL = comprimento da pegada; TS = abertura total dos dedos

e aumento da atividade funcional, manutenção da atividade funcional na lesão nervosa em tempo excedente, influência na diminuição da formação de tecido cicatricial no local da lesão, prevenção ou diminuição da degeneração no neurônio motor correspondente na medula espinhal e influência no crescimento axonal e da bainha de mielina.

Estudos recentes utilizaram o *laser* com comprimento de onda de 660 nm para otimizar o processo de regeneração neural. Reis *et al.*¹⁶ utilizaram-no (26,3 mW, 0,63 cm², 2,54 J) na recuperação do nervo isquiático de ratos após neurtomese; os grupos foram tratados por 20 dias consecutivos, com densidade de energia de 4 J/cm² por 3 pontos na incisão cirúrgica, encontrando melhora significativa na avaliação morfométrica. Belchior *et al.*¹⁵ utilizaram os mesmos parâmetros do estudo anterior também no processo de regeneração após lesão por esmagamento do nervo isquiático, tendo obtido resultados positivos considerando a recuperação funcional pelo IFC se comparado o grupo experimental ao controle. No presente estudo, os parâmetros utilizados foram diferentes dos estudos anteriores; quanto aos valores médios de IFC, porém, que foram de -59,01 no 7^o e -22,97 no 14^o dia no grupo experimental, são melhores do que os encontrados por Belchior *et al.*¹⁵, cujos valores médios de IFC foram -83,0 no 7^oe -57,8 no 14^o dia de pós-operatório.

Gonçalves *et al.*⁴⁷ verificaram os efeitos da irradiação do *laser* 830 nm na regeneração do nervo isquiático de ratos submetido a esmagamento e concluíram que contribuiu para a redução do processo inflamatório, tendo verificado menor degeneração da bainha de mielina e menos infiltrado inflamatório. Estudos que utilizaram o *laser* de baixa intensidade na regeneração de lesão nervosa periférica apresentam variação na energia utilizada, de 0,086 J até 105 J; foram feitos em células isoladas e em experimentação em animais. Dentre os relatos avaliados como benéficos, pode-

-se observar uma “janela terapêutica” que varia de 0,6 J a 28,8 J.

A interação da luz *laser* com as biomoléculas depende de vários parâmetros físicos, sendo evidente a relação entre o comprimento de onda e a resposta biológica. As vias de ativação propostas para o *laser* de baixa intensidade levam em conta a sua ação sobre os cromóforos situados na mitocôndria e na membrana celular. A radiação vermelha apresenta uma ação preferencial na mitocôndria e a infravermelha sobre os cromóforos da membrana celular^{48,49}. Portanto, os efeitos terapêuticos são específicos, o que leva a crer que exista possibilidade de se utilizar comprimentos de ondas definidos com objetivo de incrementar uma resposta biológica particular.

Um ponto bastante estudado e que pode ter relação com os resultados obtidos está relacionado com a produção de ATP. Nas células animais, os controles de gradiente de Na⁺-K⁺ dirigem o transporte ativo de açúcares e aminoácidos, tornando as células nervosas e musculares eletricamente excitáveis. O fato de mais de um terço do ATP consumido por um animal em repouso ser usado para operar essa bomba ressalta a importância desse mecanismo⁵⁰. Há de se considerar que um citocromo c-oxidase é um fotorreceptor da região vermelha do espectro, sendo responsável pela ativação da síntese de ATP e, conseqüentemente, do metabolismo celular. A possibilidade de a célula ter maior aporte energético durante o processo de reparação pode estar ligada à melhor resposta observada no uso do *laser* 660 nm, já que uma mitocôndria absorve seletivamente nesse comprimento de onda⁵⁰.

No presente estudo o *laser* foi aplicado sobre a pele e portanto sobre o tecido muscular, onde se pode considerar a possibilidade de um aumento dos níveis do fator de crescimento do nervo, que é um fator neurotrópico secretado pelos músculos esqueléticos, já que foi demonstrado que o *laser* de baixa intensidade, no comprimento de onda de 632 nm, possibilita tal resposta⁵¹.

A avaliação funcional da marcha é uma oportunidade de avaliar os aspectos específicos da recuperação nervosa de maneira não-invasiva³³. O método pelo IFC foi utilizado em nosso laboratório em pesquisas com o nervo isquiático de ratos, mostrando clara correlação entre o IFC e a avaliação morfométrica do nervo^{12,13}. As imagens das pegadas forneceram os dados para o cálculo do índice funcional do ciático, que alguns autores avaliaram como um método quantitativo confiável e reprodutível⁴⁸. A medida do IFC apresentou alto grau de correlação com a recuperação funcional e a regeneração morfológica e morfométrica das lesões do tecido nervoso periférico⁴⁵. De fato, o IFC tem-se mostrado um instrumento confiável para avaliar o processo de regeneração nervosa periférica, fornecendo um valor numérico à função e permitindo a análise estatística dos resultados.

Um grande número de pesquisas são feitas com o *laser* de baixa intensidade, mas não há padronização dos parâmetros empregados; a falta de dados nos estudos consultados dificulta a comparação dos resultados e o entendimento dos mecanismos envolvidos. Enwemeka²⁵ relata, em uma recente revisão, que por volta de 30% dos artigos publicados com uso do *laser* de baixa intensidade carecem de informações relevantes para determinar a dose ou reportam dados imprecisos. Dessa forma, tornam-se necessários novos estudos para verificar a importância e a dependência entre os parâmetros do *laser* usando a mesma metodologia, o que pode levar à melhor utilização do *laser* de baixa intensidade em protocolos de tratamento mais seguros e eficazes em humanos.

CONCLUSÃO

Na amostra e nos parâmetros utilizados, verificou-se que a utilização do *laser* AsGaAl (660 nm) foi eficaz na recuperação funcional precoce do nervo isquiático de ratos, sugerindo uma benéfica atuação do *laser* no processo de regeneração nervosa.

REFERÊNCIAS

- 1 Krarup C, Archibald SJ, Madison RD. Factors that influence peripheral nerve regeneration: an electrophysiological study of the monkey median nerve. *Ann Neurol.* 2002;51:69-81.
- 2 Noble J, Munro CA, Prasad VS, Midha R. Analysis of upper and lower extremity peripheral nerve injuries in a population of patients with multiple injuries. *J Trauma.* 1998;45(1):116-22.

Referências (cont.)

- 3 Rodrigues FJ, Valero-Cabré A, Navarro X. Regeneration and functional recovery following peripheral nerve injury. *Drug Discov Today Dis Models*. 2004;1:177-85.
- 4 Lundborg G. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: evolving neuroscientific concepts and clinical significance. *J Hand Surg*. 2000;25:391-414.
- 5 Fonseca MCR, Mazzer N, Barbieri CH, Elui VMC. Traumas da mão: estudo retrospectivo. *Rev Bras Ortop*. 2006;41:181-6.
- 6 Novak CB, Mackinnon SE. Evaluation of nerve injury and nerve compression in the upper quadrant. *J Hand Ther*. 2005;18:230-40.
- 7 Marcolino AM, Barbosa RI, Fonseca MCR, Mazzer N, Elui VMC. Reabilitação fisioterapêutica na lesão de plexo braquial: estudo de caso. *Fisioter Mov*. 2008; 21(2):53-61.
- 8 Sulaiman OA, Gordon T. Effects of short- and long-term Schwann cell denervation on peripheral nerve regeneration, myelination, and size. *Glia*. 2000;32:234-46.
- 9 Dahlin LB. The biology of nerve injury and repair. *J Am Soc Surg Hand*. 2004;4:143-55.
- 10 Bell JA, Groswald DE, Luttges MW. Alterations in the mechanical properties of peripheral nerve following crush injury. *J Biomech*. 1984;17:185-93.
- 11 Sunderland S. The anatomy and physiology of nerve injury. *Muscle Nerve*. 1990;13:771-84.
- 12 Mendonça AC, Barbieri CH, Mazzer N. Directly applied low-intensity electric currents enhances peripheral nerve regeneration in rats. *J Neurosci Methods*. 2003;129:183-90.
- 13 Monte-Raso VV, Barbieri CH, Mazzer N, Fazan VS. Can therapeutic ultrasound influence the regeneration of peripheral nerves? *J Neurosci Methods*. 2005;142:185-92.
- 14 Endo C, Barbieri CH, Mazzer N, Fazan VS. A laserterapia de baixa intensidade acelera a regeneração de nervos periféricos. *Acta Ortop Bras*. 2008;16:305-10.
- 15 Belchior ACG, Reis FA, Nicolau RA, Silva IS, Pereira DM, Carvalho PTC. Influence of laser (660 nm) on functional recovery of the sciatic nerve in rats following crushing lesion. *Lasers Med Sci*. 2009;12:284-9.
- 16 Reis FA, Belchior ACG, Nicolau RA, Fonseca TS, Carvalho PTC. Efeito da terapia com laser de arsenieto de gálio e alumínio (660nm) sobre a recuperação do nervo ciático de ratos após lesão por neurotome seguida de anastomose epineural: análise funcional. *Rev Bras Fisioter*. 2008;12(3):215-21.
- 17 Rochkind S, Drory V, Alon M, Nissan M, Ouaknine GE. Laser phototherapy (780 nm), a new modality in treatment of long-term incomplete peripheral nerve injury: a randomized double-blind placebo-controlled study. *Photomed Laser Surg*. 2007;25:436-42.
- 18 Rochkind S, Leider-trejo L, Nissan M, Shamir MH, Kharenko O, Alon M. Efficacy of 780 nm laser phototherapy on peripheral nerve regeneration after neurotube reconstruction procedure (double-blind randomized study). *Photomed Laser Surg*. 2007;25:137-43.
- 19 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 Surg Med*. 2001;28:216-9.
- 20 Kitchen SS, Partridge CJ. A review of low-level laser therapy, part I: background, physiological effects and hazards. *Physiotherapy*. 1991;77:161-3.
- 21 Karu TI, Pyatibrat L, Kalendo G. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. *J Photochem Photobiol B Biol*. 1995;27:219-33.
- 22 Khullar SM, Brodin P, Fristad I, Kvinnsland IH. Enhanced sensory reinnervation of dental target tissues in rats following low-level laser (LLL) irradiation. *Lasers Med Sci*. 1999;14(3):177-84.
- 23 Schindl A, Schindl M, Schindl L, Jurecka W, Hönigsmanh H, Breier F. Increased dermal angiogenesis after low-intensity laser therapy for a chronic radiation ulcer determined by a video measuring system. *J Am Acad Dermatol*. 1999;40(3):481-4.
- 24 Manteifel V, Bakeeva L, Karu T. Ultrastructural changes in chondriome of human lymphocytes after irradiation with He-Ne laser: appearance of giant mitochondria. *J Photochem Photobiol B*. 1997;38(1):25-30.
- 25 Enwemeka CS. Intricacies of dose in laser phototherapy for tissue repair and pain relief. *Photomed Laser Surg*. 2009;27(3):387-93.
- 26 Chen YS, Hsu SF, Chiu CW, Lin JG, Chen CT, Yao CT. Effects of low-power pulsed laser on peripheral nerve regeneration in rats. *Microsurgery*. 2005;25(1):83-9.
- 27 Gigo-Benato D, Geuna S, Rodrigues AC, Fornaro PTM, Boux E, Battiston B, Giacobini-Robecchi MG. Low-power laser biostimulation enhances nerve repair after end-to-side neurotomy: a double-blind randomized study in the rat median nerve model. *Lasers Med Sci*. 2004;19(1):57-65.
- 28 Stainki DR, Raiser AG, Graça DL, Becker C, Fernandez GMS. A radiação laser arseneto de gálio (AsGa) na regeneração do nervo radial submetido a reparação cirúrgica secundária. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 1999;35(1):37-40.
- 29 Ozen T, Orhan K, Gorur I, Ozturk A. Efficacy of low-level laser therapy on neurosensory recovery after injury to the inferior alveolar nerve. *Head Face Med*. 2006;2:3-?
- 30 Khullar SM, Brodin P, Messelt EB, Haanaes HR. The effects of low level laser treatment on recovery of nerve conduction and motor function after compression injury in the rat sciatic nerve. *Eur J Oral Sci*. 1995;103:299-305.

Referências (cont.)

- 31 De Medinacelli L, Freed WJ, Wyatt RJ. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol.* 1982;77(3):634-43.
- 32 Gasparini ALP, Barbieri CH, Mazzer N. Correlação entre diferentes métodos de avaliação funcional da marcha de ratos com lesão por esmagamento do nervo isquiático. *Acta Ortop Bras.* 2007;15(5):285-9.
- 33 Bain JR, Mackinnon SE, Hunter RT. Functional evaluation of complete sciatic, peroneo and posterior tibial nerve lesion in the rat. *Plast Reconstr Surg.* 1989;83:129-38.
- 34 Mazzer PYCN, Barbieri CH, Mazzer N, Fazan VPS. Morphologic and morphometric evaluation of experimental acute crush injuries of the sciatic nerve of rats. *J Neurosci Methods.* 2008;173(2):249-58.
- 35 Pachioni CAS, Mazzer N, Barbieri CH, Fazan VPS, Moro CA, Silva CAA. Lesão por esmagamento do nervo isquiático de ratos: estudo da vascularização. *Acta Ortop Bras.* 2006;14(4):203-7.
- 36 Mclean RA, Sanders WL, Stroup WW. A unified approach to mixed linear models. *Am Stat.* 1991;45:54-64.
- 37 Littell RC, Milliken GA, Stroup WW, Wolfinger RD. SAS system for mixed models. Cary: SAS Institute; 1996.
- 38 SAS/STAT® user's guide: version 9. Cary: SAS Institute; 2003.
- 39 Mazzer PYCN, Barbieri CH, Mazzer N, Fazan VPS. Avaliação qualitativa e quantitativa das lesões agudas por esmagamento do nervo isquiático do rato. *Acta Ortop Bras.* 2006;14(4):220-5.
- 40 Rochkind S, Barrnea L, Razon N, Bartal A, Schwartz M. Stimulatory effect of He-Ne low-dose laser on injured sciatic nerves of rats. *Neurosurgery.* 1987;20(6):843-7.
- 41 Walsh DM, Baxter GD, Allen JM. Lack of effect of pulsed low-intensity infrared (820 nm) laser irradiation on nerve conduction in the human superficial radial nerve. *Lasers Surg Med.* 2000;26(5):485-90.
- 42 Mohammed IFR, Al-Mustawfi NBV, Kaka LN. Promotion of regenerative processes in injured peripheral nerve induced by low-level laser therapy. *Photomed Laser Surg.* 2007;25(2):107-11.
- 43 Gigo-Benato D, Geuna S, Rochkind S. Phototherapy for enhancing peripheral nerve repair: a review of the literature. *Muscle Nerve.* 2005;31(6):694-701.
- 44 Rochkind S. Photoengineering of neural tissue repair processes in peripheral nerves and the spinal cord: research development with clinical applications. *Photomed Laser Surg.* 2006;24(2):151-7.
- 45 Rochkind S, Vogler I, Barr-Nea L. Spinal cord response to laser treatment of injured peripheral nerve. *Spine.* 1990;15(1):6-10.
- 46 Anders JJ, Geuna S, Rochkind S. Phototherapy promotes regeneration and functional recovery of injured peripheral nerve. *Neurol Res.* 2004;26(2):233-9.
- 47 Gonçalves RB, Marques JC, Monte-Raso VV, Zamarioli A, Carvalho LC, Fazan VPS. Efeitos da aplicação do laser de baixa potência na regeneração do nervo isquiático de ratos. *Fisioter Pesq.* 2010;17:(1)34-9.
- 48 Amat A, Rigau J, Waynant RW, Ilev IK, Anders JJ. The electric field induced by light can explain cellular responses to electromagnetic energy: a hypothesis of mechanism. *J Photochem Photobiol B.* 2006;82(2):152-60.
- 49 Vladimirov YA, Osipov AN, Klebanov GI. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. *Biokhimiya Biochemistry (Moscow).* 2004;69(1):81-103.
- 50 Manteifel VM, Karu TI. Structure of mitochondria and activity of their respiratory chain in successive generations of yeast cells exposed to He-Ne laser light [abstract]. *Izv Akad Nauk Ser Biol.* 2005;32:556-66.
- 51 Schwartz F, Brodie C, Appel E, Kazimirsky G, Shainberg A. Effect of helium/neon laser irradiation on nerve growth factor synthesis and secretion in skeletal muscle cultures. *J Photochem Photobiol B.* 2002;66(3):195-200.