

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

DAVILENE GIGO-BENATO

AÇÃO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE E DA
ELETROESTIMULAÇÃO NA REGENERAÇÃO NERVOSA
PERIFÉRICA

SÃO CARLOS - SP

2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

DAVILENE GIGO-BENATO

AÇÃO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE E DA
ELETROESTIMULAÇÃO NA REGENERAÇÃO NERVOSA
PERIFÉRICA

Tese de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Fisioterapia.

SÃO CARLOS – SP

2006

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

G461aL

Gigo-Benato, Davilene.

Ação do laser de baixa intensidade e da
eletroestimulação na regeneração nervosa periférica /
Davilene Gigo Benato. -- São Carlos : UFSCar, 2006.
120 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2006.

1. Fisioterapia. 2. Laserterapia. 3. Estimulação elétrica
transcutânea do nervo. 4. Axoniotmese. 5. Índice funcional
do nervo ciático. I. Título.

CDD: 615.82 (20^a)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA PARA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE DAVILENE GIGO BENATO, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 31 DE MARÇO DE 2006.

BANCA EXAMINADORA:



**Nivaldo Antonio Parizotto
UFSCar**



**Francesco Langone
UNICAMP**



**Antonio de Castro Rodrigues
USP-Bauru**

Dedicatória

*Á Deus por colocar tudo em minha vida
no seu devido tempo e lugar.*

*Aos meus familiares e amigos por todo
seu empenho.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqui citados pela ajuda na realização dessa dissertação (ordem alfabética): Ademar amigo marceneiro que construiu nosso “corredor” para a realização do *Walking Track*.

Alunas: Gabriela Cillo, Helena Rodrigues e Natalia Rezende de S. R. Domingues pela dedicação, força de vontade por me ajudarem sempre nos experimentos mesmo na hora do almoço, feriados e das festas.

Prof. Dr. Antonio de Castro Rodrigues pelas discussões sobre o tema, correções da dissertação e ensinamentos de cirurgia experimental, e também por comparecer a minha banca.

Prof. Dr. Artur Varejão por ter me cedido a pinça de precisão para a lesão do nervo padronizada. Pelas discussões sobre as análises da marcha do rato. Por me acolher em sua casa.

CAPES por me subsidiar por 25 meses com uma bolsa de mestrado

Mestrando Charles Taciro (Japa) por ser meu companheiro de laboratório, sempre a me salvar de situações difíceis.

Companheiros de Laboratórios : Adriane, Ana Claudia, “Anas Raqueis”, Cris, Daniel, Dório, Eliani, Fernanda, Jamací, Jamilson, Livia, Olga, Paulinha, Paulo Bossini, Paulo (Stela), Wolber, que sempre me animavam e agüentavam minhas brincadeiras e assim como meus dias de mau humor.

Delegacia de polícia de São Carlos no setor de RG. que nos forneceram tinta de impressão digital para marcarmos as pegadas dos animais.

Prof. Dr. Francesco Langone pelas discussões sobre o tema, correções da dissertação, colaborações e por comparecer a minha banca.

Prof. Dra. Maria Giusepina Giacobini-Robecchi por me ceder seu laboratório de *Scienze Cliniche e Biologiche della Università Degli Studi di Torino-Itália*, por me ensinar técnicas histológicas.

Prof. Milton Benato (Mirtão), pelas ajudas das traduções e versões de inglês.

Prof. Doutor Nivaldo Antonio Parizotto por me acolher em seu laboratório com tanta alegria e me acompanhar nessa trajetória.

Dr. PierLuigi Tos por me ensinar várias técnicas de cirurgias experimentais e me fornecer fios de sutura.

Dorutoranda Sabrina Perviani por me ajudar nos experimentos e preparo de soluções.

Prof. Stefania Raimondo por me acompanhar em todas as análises das minhas amostras que foram realizadas na Itália.

Prof. Dr. Stefano Geuna por me proporcionar ajuda de custo na Itália com o fundo da universidade voltado a pesquisa, por todas as orientações e discussões sobre os trabalhos, ajuda na edição dos textos em língua inglesa, assim como todas as análises estatísticas e principalmente a sua disposição a qualquer hora para me ajudar nos temas dos trabalhos

Profa Tania de Fátima Salvini por me ceder o espaço do seu laboratório, pelas orientações e análises dos músculos.

A técnica de laboratório Teresa que sempre me ajudou a preparar soluções e dava dicas interessantes.

Doutorando Thiago Luís de Russo por ter analisado tão bem os músculos e ajudado nas realizações das aplicações da eletroestimulações, acompanhamento dos dias de sacrifício, orientações sobre eletroestimulação e músculo, por orientar também minhas alunas e principalmente por ter sido sempre muito companheiro.

DAVILENE GIGO BENATO

PARTE I

Introdução Geral Sobre Regeneração Nervosa Periférica, Alterações nos Músculos e Técnicas Para a Recuperação Funcional Após Lesão e Após Cirurgia Nervosa Periférica.

PARTE II

Artigos

- A) Revisão da Literatura: A Laserterapia na Regeneração do Nervo Periférico**
- B) Ação da Laserterapia na Recuperação Inicial do Nervo Ciático do Rato Após Lesão por Esmagamento.**
- C) Eletroestimulação Dificulta a Recuperação Inicial do Nervo Ciático do Rato Após Lesão por Esmagamento.**

PARTE III

Conclusões Gerais

Tese de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Fisioterapia.

Orientador: Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto

Apoio Financeiro: CAPES

Esta Dissertação de Mestrado foi estruturada em modo de artigos redigida com base na norma metodológica da *BNT* e foi dividida em três partes.

A parte I contém uma breve exposição do problema e justificativa do tema sobre a alterações das funções neuromusculares e suas implicações pós-traumática nervosa periférica e seus instrumentos de aplicações terapêuticas, justificando a importância dos estudos propostos.

A parte II são três artigos, o primeiro já foi publicado, refere-se a Metanálise intitulada: “Laserterapia na Regeneração do Nervo Periférico: Revisão da Literatura”, *Gigo-Benato D, Geuna S, Rochkind S (2005) Phototherapy for enhancing peripheral nerve repair: a review of the literature. Muscle Nerve 31:694-701.*

O segundo e o terceiro artigo são experimentais e estão em fase de submissão a revistas internacionais. O segundo artigo é intitulado:

“Ação da Laserterapia na Recuperação Inicial do Nervo Ciático do Rato Após Lesão por Esmagamento”.

O terceiro artigo diz respeito a eletroestimulação que é um outro agente físico utilizado para a recuperação funcional neuromuscular e foi intitulado:

“Eletroestimulação Dificulta a Recuperação Inicial do Nervo Ciático do Rato Após Lesão por Esmagamento”.

Por fim, a parte III abordará as conclusões gerais obtidas a partir dos dados experimentais associados aos dados observados nos trabalhos da revisão de literatura.

Os artigos originais em língua inglesa estão no final da dissertação.

SUMÁRIO

PARTE I	<i>xii</i>
RESUMO	<i>xiii</i>
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	14
1.2 Lesões Nervosas Periféricas e Alterações Neuromusculares	14
1.3. BIBLIOGRAFIA	18
PARTE II	20
ARTIGO 1: “Laserterapia na Regeneração do Nervo Periférico: Revisão da Literatura”	
2.1.1. INTRODUÇÃO	21
2.1.1. O Uso da Luz Terapêutica	22
2.1.2. Efeito da Laserterapia na Regeneração do Nervo Periférico	23
2.1.3. Hipóteses dos Possíveis Mecanismos de Ação da Laserterapia no Tecido Nervoso	28
2.1.4. A Laserterapia na Aplicação Clínica	30
2.1.5. Estudos Futuros	32
2.1.6. Tipos de Lasers e Comprimento de Onda	34
2.1.6.1 Densidade de Energia e Tempo de Emissão	34
2.1.6.2 Tipos de Emissão da Luz	34
2.1.7. Protocolo de Tratamento	35
2.1.8. Tipo e Local de Aplicação	35
2.1.2. BIBLIOGRAFIA	37
ARTIGO 2: “Ação da Laserterapia na recuperação Inicial do Nervo Ciático do Rato Após Lesão Por Esmagamento”	
RESUMO	43
2.2.1. INTRODUÇÃO	44
2.2.2. MATERIAIS E MÉTODOS	46
2.2.3. RESULTADOS	51
2.2.4. DISCUSSÃO	58
2.2.5. BIBLIOGRAFIA	62
ARTIGO 3: “Eletroestimulação Dificulta a Recuperação Inicial do Nervo Ciático do Rato Após Lesão por Esmagamento”	
RESUMO	68

2.3.1. INTRODUÇÃO	69
2.3.2. MATERIAIS E MÉTODOS	71
2.3.3. RESULTADOS	75
2.3.4. DISCUSSÃO	80
2.3.5. BIBLIOGRAFIA	82
PARTE III	84
3.1.1. CONCLUSÕES GERAIS	85
ARTIGOS PUBLICADOS E SUBMETIDOS	88

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1	Resultados da avaliação do índice funcional do n.cíático. Até a segunda semana os grupos lesionados não demonstraram diferenças entre si.	52
Figura 2.2	Visão histológica após a coloração do corte transversal do músculo tibial anterior com azul de toluidina. Os músculos desnervados não mostraram diferenças entre si, mas todos foram diferentes do normal	53
Figura 2.3	Média das áreas das fibras musculares do tibial anterior. Diferença da área entre todos os grupos dos músculos desnervados comparados ao normal.	54
Figura 2.4	Corte transversal do nervo ciático corado com Hematoxilina e Eosina. Os grupos lesionados não apresentaram diferenças morfológicas de diâmetro e estrutura entre si, mas foram observados diferenças quando comparados ao grupo normal.	55
Figura 2.5	Corte transversal do nervo corado com Papanicolau do n. ciático. Os grupos lesionados não apresentaram diferenças morfológicas de diâmetro e estrutura entre eles, mas todos os grupos lesionados foram diferentes em relação ao grupo normal.	56
Figura 2.6	Imagem confocal das fibras nervosas do n. ciático após a imunorreação com anticorpos anti neurofilamento. Os grupos lesionados não apresentaram diferenças morfológicas estruturais entre si, mas os grupos dos nervos lesionados tiveram diferença com o grupo normal.	57
Figura 3.1	Avaliação do cálculo do índice funcional do ciático mostrou um déficit dos grupos tratados eletroestimulados e não tratados quando comparados com a pré-lesão.	76
Figura 3.2	Avaliação morfológica após a coloração do corte transversal do músculo tibial anterior com azul de toluidina. Os grupos desnervados não apresentaram diferença de diâmetro entre eles, mas ambos foram diferentes em relação ao grupo normal.	77
Figura 3.3	Microscopia de Luz (Hematoxilina e Eosina) e Confocal (Imunorreação com anti-neurofilamento- 200 KD) com imagens de nervos ciáticos normais, não tratados e tratados. Tanto os nervos tratados e não tratados não demonstraram diferenças morfológicas e estruturais entre eles, mas ambos foram diferentes em comparação ao grupo normal.	78
Figura 3.4	Média das massas dos músculos tibiais anteriores normais, não tratados e tratados. Os nervos tratados e não tratados não	79

tiveram diferenças estatísticas significativas entre si, porém ambos os grupos foram menores em comparação com a média dos normais.

Figura 3.5

Média das áreas das fibras musculares em corte transversal dos músculos tibiais normais, não tratados e tratados. Diferenças foram encontradas somente quando o grupo normal foi comparado com o diâmetro das fibras dos grupos dos músculos desnervados.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1.

33

PARTE I

Introdução Geral Sobre Regeneração Nervosa Periférica, Alterações nos Músculos e Técnicas Para a Recuperação Funcional Após Lesão e Após Cirurgia de Nervos Periféricos.

RESUMO

Os nervos periféricos são freqüentemente alvo de lesões traumáticas e a recuperação funcional é relativa e raramente completa. Dentre vários recursos que visam acelerar e melhorar o processo de regeneração do nervo periférico foi escolhido neste trabalho a radiação a laser de baixa intensidade e a eletroestimulação. Tais recursos terapêuticos possuem relação com o objetivo proposto, que foi o de verificar a eficácia desses agentes físicos na regeneração nervosa periférica após a lesão do tipo axoniotmese. A eficácia da laserterapia de baixa intensidade na regeneração nervosa periférica foi comprovada na nossa revisão bibliográfica e mostrou que mais de 80 % dos estudos experimentais conduzidos sobre o uso da laserterapia na promoção da regeneração nervosa periférica leva a uma positiva recuperação nervosa, após axoniotmese e após cirurgia reparadora. Seguindo as indicações que a laserterapia acelera o processo de regeneração do nervo o primeiro estudo experimental teve como objetivo verificar a eficácia do laser no período inicial de recuperação do nervo ciático após lesão por esmagamento. Os ratos foram irradiados transcutaneamente com laser de GaAlAs (830nm), contínuo, com potência de 60 mW e fluência de 40 J.cm², com tempo de irradiação de 19 segundos, por cinco dias consecutivos, um grupo a partir do primeiro dia do pós-operatório, e o segundo grupo a partir da segunda semana do pós-operatório e sacrificados no 14º dia após lesão. Nesse experimento foram analisados a função motora por meio do índice funcional do ciático, a morfologia do nervo ciático e do músculo tibial anterior e morfometria das fibras musculares. Nenhuma dessas análises detectaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados e o controle simulado ($p > 0,05$) sugerindo que a laserterapia não foi eficaz na fase inicial da recuperação da lesão nervosa. Entretanto, é possível que a ausência dos efeitos positivos da laserterapia na regeneração nervosa seja devido tanto à inadequação da escolha do laser e do protocolo de irradiação, quanto do modelo de lesão empregado. O segundo trabalho experimental foi realizado para investigar os efeitos precoces da estimulação elétrica na

recuperação neuromuscular. A aplicação da eletroestimulação foi baseada pelo eletrodiagnóstico do músculo tibial anterior após a lesão de esmagamento do nervo ciático do rato. Um total de cinco sessões de eletroestimulação foram administradas em dias alternados, iniciado no terceiro dia após a lesão até o final do experimento (14 dias). Nesse experimento foram analisados a função motora por meio do índice funcional do ciático, a morfologia do nervo ciático e do músculo tibial anterior, massa muscular do m. tibial anterior e morfometria das fibras musculares. Em todas as análises os grupos controle e tratado não tiveram diferenças estatísticas entre si, com exceção da análise funcional, cujos resultados demonstraram que a função nos ratos eletroestimulados no 14º dia após lesão foram significativamente menores quando comparados aos animais não tratados. Os resultados sugerem que, diferente da estimulação elétrica direta do nervo, a eletroestimulação muscular nas fases precoces após o trauma devem ser usadas com cuidado, uma vez que poderá inibir a recuperação neuromuscular funcional. Concluindo, os resultados dos dois estudos experimentais sugerem que a efetividade da utilização dos agentes físicos como o laser tanto quanto a eletroestimulação na regeneração nervosa periférica, ainda continua aberta e, se não for apropriadamente definida a parametrização dos equipamentos, protocolos, tempos de aplicação, início do tratamento, eles poderão não só serem ineficazes, mas também, poderão inibir o processo de recuperação da função neuromuscular.

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1.2 Lesões Nervosas Periféricas e Alterações Neuromomusculares

Os nervos periféricos, principalmente aqueles que percorrem os membros, frequentemente são alvo de lesões traumáticas (MILLES, 2000). Segundo dados de um estudo realizado nos EUA, 50 mil sujeitos sofrem lesões traumáticas nos nervos periféricos a cada ano (EVANS, 2001). A gravidade do dano nervoso pode variar muito em relação às dimensões do evento traumático (LUNDBORG, 2000). As lesões causadas no nervo são usualmente classificadas em cinco categorias de acordo com Sunderland (1978).

Numa compressão leve dos nervos periféricos, a continuidade axonal é geralmente preservada e a lesão pode ser classificada como neuropraxia tipo 1 na escala de Sunderland (1978). Isto indica um bloqueio local da condução nervosa, com boa possibilidade de recuperação funcional, em torno de poucas semanas, ou meses.

Numa compressão nervosa mais grave, na qual ocorre uma tração, ou até mesmo um rompimento das fibras nervosas, resulta-se em uma interrupção da continuidade axonal, tendo como consequência uma degeneração a partir da lesão, seguindo para todo o segmento distal, os tubos endoneurais permanecem íntegros, sendo classificadas como axoniotmese tipo 2 de Sunderland (1978). A regeneração axonal do segmento proximal é guiada por orientação intrínseca do tubo endoneural e ocorre a regeneração no sentido correto para a periferia. Portanto, após uma lesão desta natureza, pode-se esperar uma regeneração espontânea com uma excelente recuperação funcional (SEDDON, 1943; SUNDERLAND; 1978). Quando o trauma é mais severo pode danificar os tubos endoneurais e os componentes conectivos (neurotmese do tipo 3 a 5 de Sunderland, 1978). Essa situação é mais grave em relação aos dois casos anteriores, porque, não existem estruturas que possam guiar a regeneração através da região da lesão, portanto, neste caso é necessário a intervenção cirúrgica.

Nos últimos 25 anos as técnicas cirúrgicas para a reparação e reconstrução de um nervo que sofreu uma neurotmeose tiveram muitos avanços (LUNDBORG, 2000; MILLESI, 2000; STRAUCH, 2000; MEEK & COERT, 2002; DVALI & MACKINNON, 2003). Portanto a regeneração nervosa periférica já é um fato fundamentado e, por esta razão, pesquisas são realizadas no intuito de detalhar os fatores, mecanismos e técnicas designadas à restauração nervosa (CRISCI & FERREIRA, 2002). Todavia, a recuperação funcional é muito relativa entre um paciente comparando-se a outro devido a influências de fatores naturais e de danos do nervo periférico, como tipo e diâmetro das fibras danificadas, gravidade da lesão, idade do indivíduo, doenças coadjuvantes no prognóstico negativo e outras variáveis individuais (SUNDERLAND, 1978). Apesar da aplicação de tais técnicas modernas e sofisticadas de tratamento incluindo reconstrução nervosa, a regeneração morfológica e funcional é raramente completa (AZZE & MATTAR, 2000) e nem sempre é satisfatória (LUNDBORG, 2000). Portanto, se dá muita importância ao tratamento de recuperação no pós-operatório com a finalidade de garantir a todos os pacientes a suficiente restauração da função nervosa.

Partindo dessa necessidade de regeneração nervosa, o processo de reabilitação conta com várias terapias não-invasivas tais como laser de baixa intensidade, ultra-som, eletroestimulação, magnetoterapia, entre outros, na tentativa de influenciar positivamente a melhora da função (MENDONÇA, BARBIERI & MAZZER, 2003).

Além das alterações ocorridas no nervo, outro tecido que é bastante afetado após uma lesão nervosa periférica é o músculo esquelético. A inervação é um fator crítico para a integridade funcional e estrutural do músculo (ISHIDO, KAMI & MITSUHIKO, 2004; KOSTROMINOVA, 2005). A lesão do nervo periférico causa uma profunda perda de massa e da capacidade de geração de força do músculo (BILLINGTON & CARLSON, 1996; DOW, 2004). Além disso, a excitabilidade muscular também está alterada. A excitabilidade de um tecido pode ser definida pela relação entre a amplitude e a duração do estímulo elétrico. Quando um músculo está

desnervado 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 tornam-se desnervados é o aumento de receptores de acetilcolina (AChR) no sarcolema. AChRs são normalmente expressos na junção neuromuscular em músculos desnervados. Entretanto, a desnervação causa aumento e proliferação de ACRs extrajuncionais. Alguns vêem isso como um tipo de “sinal” que causa brotamentos de novos axônios dos nervos e também como uma forma de preparação para a formação de uma nova junção neuromuscular (LIEBER, 2002).

A eletroestimulação vem sendo usada no processo de recuperação do músculo após lesão nervosa periférica e mostra-se eficaz ao reverter a perda de massa e força muscular (DOW, 2004) bem como impedir a expressão de genes durante a desnervação (KOSTROMINOVA, 2005). No entanto, a estimulação elétrica nestes modelos experimentais é aplicada de forma crônica, diferentemente do que é visto da clínica e no tratamento de seres humanos (SALMONS et al., 2005).

Diferentes tentativas de estímulos destinados a melhoria da regeneração nervosa e para manutenção do trofismo muscular sob condições de desnervação foram realizadas anteriormente. Dentre vários recursos que visam acelerar e melhorar o processo de regeneração do nervo periférico foi escolhido dois protocolos de tratamento, ou seja, a radiação a laser de baixa intensidade e a eletroestimulação. Tais recursos terapêuticos possuem relação com o objetivo proposto, que foi o de verificar a eficácia desses agentes físicos na regeneração nervosa periférica após a lesão do tipo axoniotmese. Esses dois protocolos serão descritos separadamente, por tratar-se de experimentos individuais. Um outro estudo que foi descrito no primeiro capítulo antecedendo todos os demais experimentos, é uma revisão bibliográfica publicada na revista *Muscle and Nerve* em 2005, que por meio de uma metanálise, foram

detectados onze estudos sobre o uso da laserterapia na regeneração nervosa com o objetivo de ilustrar os efeitos positivos deste tipo de tratamento.

Seguindo essa necessidade de estabelecer protocolos clínicos de aplicação da laserterapia, a finalidade deste estudo foi de continuar aprofundar a análise dessa radiação sobre o nervo periférico, focalizando especial atenção na escolha do tipo de laser, nos parâmetros de irradiação e no período de aplicação (precoce), os quais são aspectos relevantes nas perspectivas de aplicação clínica em pacientes. Foi utilizado como modelo experimental a lesão do tipo axoniotmese realizada mediante a pinça fabricada por Gertrude Beer da Universidade de Zurique, Suíça (BEER, 2001), e recentemente padronizada para o nervo ciático do rato por Artur Varejão da Universidade Trás-os-Montes e Alto Douro de Vila Real, Portugal (VAREJÃO et al., 2004).

O segundo motivo pelo qual foi escolhida a lesão por esmagamento como modelo experimental é por ser o modelo mais estudado na literatura (GIGO-BENATO, GEUNA & ROCHKIND, 2005) e, além disso, existe uma necessidade de observar os efeitos precoces da laserterapia na primeira e segunda semana após lesão por esmagamento no nervo ciático do rato.

1.3. BIBLIOGRAFIA

AZZE R J, MATTAR Jr. R. Lesões dos Nervos Periféricos. In: Pardini Jr. AG, editor. **Traumatismos da mão**, 3^a ed., Rio de Janeiro, Medsi, 2000.

BEER G M, STEURER J, MEYER V E . Standardizing Nerve Crushes with a non-Serrated Clamp. **J Reconstr Microsurg.** 17:531-534, 2001.

BILLINGTON L, CARLSON BM. the recovery of Long-Term Denervated rat muscles after Marcaine Treatment and Grafting. **Jneuro Sci.**144:147-155, 1996.

CRISCI A R., FERREIRA L F. Low-Intensity Pulsed Ultrasound Accelerates the Regeneration of the Sciatic Nerve after Neurotomy in Rats. **Ultrasound in Med. & Biol.** 28 (10):1335-1341, 2002.

DOW DE, CEDERNA PS, HASSETT CA, KOSTROMINOVA TY, FAULKNER JA, DENNIS RG. Number of Contractions to Maintain Mass and for of a Denervated Rat Muscle. **Muscle Nerve.** 30, 77-86, 2004.

DVALI L., MACKINNON S. Nerve repair, Grafting, and Nerve Transfers. **Clinical Plastic Surgery**, 30: 203-221, 2003.

EVANS G R. Peripheral Nerve Injury: a Review and Approach to Tissue Engineered Constructs. **The Anatomical Record.** 263: 396-404, 2001.

GIGO-BENATO D, GEUNA S, ROCHKIND S. Phototherapy for Enhancing Peripheral Nerve repair: a Review of the Literature. **Muscle Nerve** 31:694-701, 2005.

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. **Am J Physiol Cell Physiol.** 287: C484-C493, 2004.

KOSTROMINOVA TY, DOW DE, DENNIS RG, MILLER RA, FAULKNER JA. Comparison of Gene Expression of Two-Month Denervated, Two-Month Stimulated-Denervated and Control Rat Skeletal Muscles. **Physiol Genomics.** 22: 227-243, 2005.

LIEBER R. Skeletal Muscle Structural, Function, & Plasticity. **Lippincott Williams & Wilkins.** 2nd edition, Philadelphia, 2002.

LUNDBORG G.A. 25-Year Perspective Of Peripheral Nerve Surgery: Evolving Neuroscientific Concepts and Clinical Significance. **American Journal of Hand Surgery** 25: 391-414, 2000.

MEEK MF, COERT JH. Clinical Use of Nerve Conduits in Peripheral-Nerve Repair: Review of the Literature. **J Reconstr Microsurg.** 18: 97–109, 2002.

MENDONÇA C, BARBIERI H, and MAZZER N. Directly Applied Low Intensity Direct Electric Current Enhances Peripheral Nerve Regeneration in Rats, **J Neurosci Meth** 129: 183–190, 2003.

MILLES I H. Techniques for Nerve Grafting. **Hand Clinics** 16: 73-91, 2000.

SALMONS S, ASHLEY Z, SUTHERLAND H, RUSSOLD MF, LI F, JARVIS JC. Functional Electrical Stimulation of Denervated Muscles : Basic Issue. **Artif Organs**. 29:1999-202, 2005.

SEDDON, H. Three Types of Nerve Injury. **Brain**. 66: 227-288, 1943.

STRAUCH B. Use of Nerve Conduits in Peripheral Nerve Repair. **Hand Clin** 16:123–130, 2000.

SUNDERLAND S. **Nerves and nerve injuries**. Churchill Livingstone, New York, 1978.

VAREJÃO A S, CABRITA A M, MEEK M F, BULAS-CRUZ J, MELO-PINTO P, RAIMONDO S, GEUNA S, GIACOBINI-ROBECCHI MG. Functional and Morphological Assessment of a Standardized Rat Sciatic Nerve Crush Injury with a non-Serrated Clamp. **J Neurotrauma**. 21:1652-1670, 2004.

PARTE II

ARTIGO 1 :

A LASERTERAPIA NA REGENERAÇÃO DO NERVO PERIFÉRICO:

REVISÃO DA LITERATURA

2.1. INTRODUÇÃO

A recuperação do nervo periférico após lesão severa depende da regeneração das fibras nervosas ao longo do segmento distal da lesão (LUNDBORG, 2000). Se a continuidade nervosa for perdida, uma cirurgia será necessária para restabelecer a continuidade entre os cotos distais e proximais. Ambos podem ser suturados quando não ocorre perda de substância (neurorrafia termino-terminal) (DVALI & MACKINNON, 2003). Mas se houver perda de substância é necessário unir os cotos por meio de um enxerto autólogo como um tubo de músculo-na-veia, ou enxerto sintético de silicone, polipropileno (KLINE et al., 1998; MILLESI H, 2000; STRAUCH B, 2000; MEEK & COERT, 2002), ou induzir a um crescimento colateral por meio de um nervo doador intacto (neurorrafia termino-lateral) (ROVAK, EDERNA & KUZON, 2001). Tais lesões com perda de continuidade tem um prognóstico de recuperação mais lento e podem ocorrer uma melhora parcial (ALON & ROCHKIND, 2000).

Apesar dos grandes avanços na cirurgia reparadora dos nervos periféricos nos últimos vinte e cinco anos, nenhuma técnica de reparação dos nervos garante uma total recuperação e normalização da função e geralmente resultados clínicos nas proximidades das lesões nervosas permanecem deficientes (LUNDBORG, 2000, 2002; SAMII et al., 1997). Portanto, a reparação das lesões nervosas ainda representa um grande desafio para a medicina de reabilitação, a qual necessita encontrar métodos efetivos para melhorar a regeneração nervosa após a cirurgia de reconstrução dos nervos periféricos (EVANS, 2000; LUNDBORG, 2002; DVALI & MACKINNON, 2003).

A laserterapia tem recebido uma crescente atenção ao longo das duas últimas décadas. Embora um estudo pioneiro sobre os efeitos da laserterapia na regeneração das lesões traumáticas dos nervos periférico fora publicado em 1970, foi somente em meados da década de

80 que se despertou um interesse científico, para os efeitos positivos da laserterapia nesse tecido (ROCHKIND, 2000).

O objetivo desse artigo foi promover uma revisão da literatura percorrendo os últimos 15 anos sobre os efeitos da laserterapia no reparo das células nervosas periféricas. A intenção é destacar o fato que a laserterapia ainda requer muitas pesquisas, além de elucidar os mecanismos biológicos da fototerapia no tecido nervoso, e também, favorecer aos clínicos uma base para o planejamento de protocolos clínicos da laserterapia na aceleração da regeneração nervosa pós-traumática em seus pacientes.

2.1.1. O Uso da Luz Terapêutica

O termo fototerapia refere-se à utilização da luz para a produção de efeitos terapêuticos em tecidos vivos. Embora qualquer fonte de luz possa ser utilizada para obter um efeito fototerápico, lasers representam a mais recente tecnologia de fonte de luz, e desta forma tornam-se mais reconhecida como fototerapia (TURNER & HODE, 2003). O termo laserterapia de baixa intensidade é comumente usado como um sinônimo de fototerapia. A diferença entre o uso dos aparelhos de laser cirúrgico e terapêutico é a colimação. O aparelho a laser para a cirurgia possui um feixe de luz estreito e intenso que é utilizado para destruir precisamente os tecidos (efeito térmico). Já o terapêutico apresenta intensidades da radiação da luz tão baixas que os efeitos resultam em respostas biológicas, as quais são aplicáveis a mudanças químicas e físicas associadas com interação de células e tecidos irradiados com o laser (SHIN et al., 2003). Embora muitos cientistas e clínicos encontrem dificuldades em aceitar que essa energia de luz possa promover melhora nos processos metabólicos que resulta em reparo tecidual (ENWEMEKA, 1999; BARTELS, 2002), muitos estudos experimentais e clínicos se referiram como positivos os efeitos da fototerapia para a promoção do processo de reparação de vários tecidos e órgãos, como o osso (GUZZARDELLA et al., 2002), cartilagem (MORRONE et al., 2000), músculos

(AMARAL, PARIZOTTO & SALVINI, 2001), tendão (REDDY, STEHNO-BITTEL & ENWEMEKA, 1998), ligamentos (FUNG et al., 2002) e pele (ALAM & DOVER, 2003). Contudo resultados negativos foram publicados quando a irradiação foi aplicada em cicatrização de úlceras (LUCAS et al., 2002).

Os resultados conflitantes sobre o uso da laserterapia podem ser resultantes de inúmeras variáveis técnicas (em particular o comprimento de onda, doses e tipos de radiação) os quais se não forem adequadamente ajustados poderão reduzir o eventual sucesso do procedimento. Além disso, os “resultados negativos” em alguns estudos os quais investigaram os efeitos da fototerapia de baixa intensidade sobre células e tecidos normais impediram claramente considerações óbvias da fototerapia, pois é difícil compreender como é possível transformar células e tecidos normais em “células e tecidos mais normais”. Estudos sobre os efeitos da laserterapia na eletrofisiologia nos nervos normais é um clássico exemplo de confusão (GREATHOUSE, CURRIER & GILMORE, 1985; WALKER & AKHANJEE, 1985; WU et al., 1987; SNYDER-MACKLER & BORK, 1988; BALABAN et al., 1992; BAXTER et al., 1994; WALSH, BAXTER & ALLEN, 2000; BAGIS et al., 2002; COMELEKOGLU et al., 2002; FUNG et al., 2002; LUCAS et al., 2002). Considerando a complexidade desse assunto, essa revisão da literatura teve a intenção de focar os estudos que usaram a regeneração nervosa (pós-traumática e pós-cirúrgica), que trouxeram algo verdadeiro para melhorar a regeneração nervosa e deste modo ajudar a esboçar um protocolo clínico ainda não testado.

2.1.2. Efeito da Laserterapia na Regeneração do Nervo Periférico

O primeiro estudo sistemático sobre os efeitos da laserterapia na regeneração do nervo periférico, foi publicado na década de 80 e foi baseado no uso do modelo de axionotmese (ROCHKIND et al., 1988; ROCHKIND & OUAKNINE, 1992). Baseado nas análises morfológicas, eletrofisiológicas e funcionais para avaliar a recuperação do nervo ciático

esmagado do rato, esse estudo concluiu que a laserterapia foi efetiva na recuperação nervosa. Os efeitos desta laserterapia foram medidos em um curto espaço de tempo, ou seja, dentro de dias e minutos assim como em longo prazo por vários dias e meses (ROCHKIND et al., 1986; ROCHKIND et al., 1987; ROCHKIND & OUAKNINE, 1992). No modelo experimental em curto prazo, foi aplicado o laser diretamente no nervo ainda exposto e o potencial de ação foi mensurado por meio de um eletrodo de gancho fixado diretamente no nervo (ROCHKIND, BARR-NEA & VOLGER, 1990; ROCHKIND & OUAKNINE, 1992). Os comprimentos de onda 540 nm, 632nm e 780nm foram os que produziram os melhores efeitos. Já no modelo a longo prazo, o nervo ciático foi estimulado diretamente e o potencial de ação foi mensurado através de eletrodos de agulha fixado no músculo gastrocnêmio. Os autores encontraram segundo a atividade eletrofisiológica, uma redução da atividade após a lesão de esmagamento nos nervos não irradiados, mas o uso da laserterapia (comprimento de onda de 632.8 nm, densidade de energia de 10 J/cm²) melhorou o potencial de ação após a lesão por esmagamento no período a longo prazo (ROCHKIND et al., 1987a ; ROCHKIND et al., 1987b; ROCHKIND & OUAKNINE, 1992). Além disso, quando a laserterapia foi aplicada diretamente no nervo esmagado e também no segmento correspondente na medula espinhal, o tempo e a qualidade da recuperação do nervo melhoram em comparação com a irradiação somente no nervo (ROCHKIND et al., 2001; SHAMIR et al., 2001; LEUNG et al., 2002; LUCAS et al., 2002). A aplicação da laserterapia após lesão por esmagamento, aumentou o crescimento axonal, acelerando a recuperação do nervo ciático(ROCHKIND et al., 1987a ; ROCHKIND et al., 1987b; ROCHKIND & OUAKNINE, 1992). O efeito benéfico da laserterapia foi encontrado não somente no nervo lesionado, mas também nos segmentos da medula espinhal onde o tratamento com o laser foi significativo para a indução de proliferação de astrócitos e oligodendrócitos, com isso, ocorreu uma diminuição das mudanças degenerativas no nervo periférico. Isto sugere um

aumento do metabolismo nos neurônios, quando submetidos à influência do tratamento a laser, melhorando habilidade de produção de mielina (ROCHKIND, BARR-NEA & VOLGER, 1990).

Estudos experimentais subseqüentes usaram a laserterapia após lesão de esmagamento (de acordo com os estudos acima descritos), demonstraram que a laserterapia promove a regeneração nervosa após a lesão de esmagamento no nervo ciático, (KHULLAR et al., 1995; SHIN et al., 2003), nervo fibular (HAMILTON, KEVEN & RAY, 1992), e facial (ANDERS et al., 1993) . Khullar (1995) e seus autores aplicaram transcutaneamente o laser infravermelho (48 J/cm^2) com comprimento de onda de 820 nm , por 28 dias, iniciado a partir do primeiro dia do pós-operatório, mostraram que, ocorreu uma aceleração na recuperação funcional (mensurados com o *walking track analysis*) nos animais tratados em comparação aos não tratados. Um resultado similar (da aceleração do processo de regeneração), foi obtido num estudo mais recente, o qual utilizou o laser de comprimento de onda de 630 nm , emissão de radiação contínua, aplicação transcutânea na lesão de axoniotmese no nervo ciático, a partir do primeiro dia do pós-operatório, num período de somente cinco dias (SHIN et al., 2003). Sugerindo que a laserterapia é mais efetiva quando aplicada logo após o período pós-traumático. Um estudo conduzido por Hamilton Keven e Ray (1992) os quais aplicaram no coelho (esta espécie animal em comparação com o rato tem um potencial de regeneração menor), o laser de comprimento de onda de 632.8 nm com aplicação transcutânea de 15 dias de aplicação ($3,52 \text{ J/cm}^2$) no nervo fibular esmagado, iniciaram o tratamento a partir do primeiro dia do pós-operatório, o qual demonstrou uma melhora significativa na recuperação do potencial de ação em comparação com o grupo não tratado.

Anders et al. (1993) realizou um o estudo mais completo porque comparou os diferentes comprimentos de onda do laser no nervo facial (361 nm , 470 nm , 514 nm , 632.8 nm , 1061 nm). Os resultados desse estudo confirmaram todos os estudos anteriores que demonstraram que a fototerapia aplicada transcutaneamente, diariamente, a partir do primeiro dia do pós-operatório, levou a um significativo aumento da velocidade de regeneração dos axônios nos nervos faciais

em comparação aos animais não tratados. Esse aumento da velocidade de regeneração foi constatado pelo maior número de neurônios motores retrógrados na medula no lado da peroxidase de rábano silvestre (*horseradish peroxidase*) e também pela aceleração do retorno da acetilcolintransferase no núcleo motor facial (ANDERS et al., 1993; ANDERS, GEUNA & ROCHKIND, 2004). Neste estudo apenas mencionado, todos os comprimentos de onda demonstraram efetivos na estimulação da regeneração após lesão nervosa, mas o melhor resultado foi obtido pelo laser de comprimento de onda de 632,8 nm.

Um recente estudo (BAGIS et al., 2003) não encontrou nenhum efeito da laserterapia na recuperação nervosa periférica. Os nervos ciáticos dos ratos receberam esmagamento bilateral, um dos lados foram estimulados com laser de comprimento de onda de 904 nm, com diferentes doses (0,31 J/cm² e 19 J/cm²) os quais foram avaliados com eletrofisiologia e morfologia; porém, todas as análises não revelaram diferenças significativas entre os grupos. Entretanto, é difícil dizer que o resultado desse estudo seja fortemente confiável, pois é difícil considerar resultado negativo usando o lado contralateral “não tratado” como controle. Principalmente se considerarmos que a laserterapia exerce efeitos sistêmicos, além da ação da regeneração nervosa, (ROCHKIND et al., 1989), contudo o uso do lado contralateral é inapropriado nesse contexto.

Quatro estudos experimentais contribuíram com novas e importantes informações no que diz respeito aos resultados obtidos sobre modelo de lesão de neurotmesa e tratamento com o laser. No primeiro estudo a laserterapia no pós-operatório demonstrou ser efetiva na promoção da regeneração nervosa periférica no caso de transecção completa e reparação termino-terminal (SHAMIR et al., 2001). Este estudo em duplo cego avaliou a regeneração do nervo ciático após a aplicação do laser no pós-operatório. Aplicação transcutânea do laser, com comprimento de onda de 780 nm, por 30 minutos, foi diária, durante 21 dias consecutivos na região da cirurgia do nervo ciático, assim como na medula espinhal. A resposta somatossensorial positiva foi encontrada em 69% dos ratos irradiados em comparação com os 18 % dos ratos não irradiados.

Na avaliação com imunistoquímica do grupo tratado com laser, mostrou maior intensidade de crescimento axonal e melhor qualidade de regeneração, pois ocorreu um aumento do número de fibras nervosas de médio e longo diâmetro. Esta descoberta sugere que a laserterapia aumenta o processo regenerativo após a lesão completa de sutura termino-lateral no nervo periférico.

O segundo estudo (MILORO et al., 2002) investigou os efeitos da laserterapia do pós-operatório no nervo alveolar inferior reparados com tubulização (tubo= Gore-tex) em coelhos. O resultado demonstrou que a laserterapia promoveu a regeneração nervosa ao longo do enxerto sintético que serviu como uma ponte para a junção dos dois cotos. No local onde o nervo alveolar inferior foi reparado, foi aplicado o laser de 820-830 nm, transcutaneamente, com 29 J/cm², em um ponto, por quatro dias consecutivos, iniciado a partir do primeiro dia do pós-operatório, seguido de seis sessões adicionais, uma vez por semana por seis semanas. A investigação morfológica sobre a regeneração nervosa demonstrou que ocorreu uma melhora no diâmetro das fibras nervosas em comparação com o não tratado.

No terceiro estudo (GEUNA et al., 2003; GIGO-BENATO et al., 2004) foi sobre o efeito positivo da laserterapia na regeneração do nervo mediano de rato reparado com a neurorrafia termino-lateral no nervo ulnar intacto como doador. Após os ratos serem operados eles receberam a laserterapia por três semanas, três dias alternados, iniciado a partir do primeiro dia do pós-operatório e comparado com o grupo operado com aplicação simulada (sham). Os lasers (808nm e 905 nm) foram utilizados transcutaneamente, pontual no local da cirurgia, com densidade de energia 29 J/cm² e 40 J/cm² respectivamente. O resultado do estudo em duplo cego randomizado mostrou que a laserterapia induziu a uma significativa, rápida mielinização e regeneração das fibras nervosas, assim como uma recuperação da massa muscular, resultando num significativo rápido aumento da função, em comparação com o grupo controle.

O uso do termo duplo cego foi utilizado em dois dos três estudos mencionados (SHAMIR et al., 2001; GIGO-BENATO et al., 2004), e merece uma explanação a respeito do termo

tradicionalmente usado para referir o controle do efeito placebo e da imparcialidade do investigador durante os estudos clínicos. Nestes estudos experimentais duplo cego refere-se a 1) ao cirurgião o qual executou uma intervenção cirúrgica do animal e o distribuiu aleatoriamente entre os grupos e 2) o avaliador que conduziu toda as avaliações pós-operatórias dos animais e amostras de tecidos, assim como introduziu um código para denominações, excluindo a discriminação por grupo animal que muitas vezes pode levar a induções das análises das amostras.

O mais recente estudo foi o quarto Chen et al.(2005) o qual relatou a ocorrência de um efeito inibidor sobre a emissão do laser pulsado no comprimento de onda de 904nm (densidade de energia aplicada 2.33 a 15.5 J/cm²), no nervo ciático do rato. Esse efeito inibidor pode ser devido à utilização de um tubo de silicone de 10 milímetro de comprimento entre os cotos distais e proximais para a união dos cotos. O resultado negativo é de difícil interpretação, visto que foi obtido de um modelo experimental diferente dos outros em vários aspectos como o: 1) Uso de um tubo guia de silicone (o qual poderia interferir com a luz); 2) Uso de radiação pulsada em alta frequência (5-20 KHz); 3) Iniciaram a laserterapia após a primeira semana da cirurgia; 4) Estimulação prolongada (por 2 meses). Portanto, neste resultado protocolo de estimulação a laser não só foi ineficaz quanto impediu a recuperação nervosa, com isso, revelou impróprio o seu uso.

2.1.3. Hipóteses dos Possíveis Mecanismos de Ação da Laserterapia no Tecido Nervoso

Durante a última década grandes avanços ocorreram para a compreensão dos efeitos celular e molecular na presença da aplicação do laser nas estruturas biológicas. No entanto, o mecanismo de ação da laserterapia no ser vivo ainda não foi totalmente elucidado (TURNER & HODE, 2003). Com base nos resultados obtidos até hoje, principalmente estudos in vitro, várias

teorias foram desenvolvidas para explicar as alterações que a laserterapia exerce, como por exemplo mudanças nas estruturas biológicas, tais como o aumento de síntese de ATP ou (GAGLIARDI, ATLANTE & PASSARELLA, 1997) proliferação celular (KREISLER et al., 2003). Qualquer discussão mais detalhada está além do propósito desta revisão bibliográfica, portanto, foi restrita apenas a certos estudos que proporcionaram interessantes informações concernentes a interação da laserterapia nos tecidos nervosos, em especial com os nervos periféricos.

O foco principal a respeito da regeneração nervosa periférica foram os estudos *in vitro*, os quais mostraram que a laserterapia induz ao crescimento massivo de neurito em neurônios em cultura. (WU et al., 1987; WOLLMAN & ROCHKIND, 1998). Com embasamento *in vitro*, pode-se responder a hipótese que a estimulação da radiação direta na terminação do crescimento axonal *in vivo* pode estimular diretamente o crescimento do axônio tanto transversal (no caso de reparação cirúrgica termino-terminal), quanto colateral (termino-lateral), dependendo da cirurgia ou lesão empregada (GIGO-BENATO et al., 2004).

Um recente artigo demonstrou uma possível explicação para os efeitos da fototerapia por meio da biologia molecular. Foi observado um aumento da expressão da proteína associada ao crescimento-43 (growth-associated protein-43 = GAP 43) em estágios iniciais de regeneração do nervo ciático de rato após a fototerapia (SHIN et al., 2003). Outro estudo mostrou que a aplicação do laser aumenta a expressão de mRNA gene do peptídeo relacionado a calcitonina (*calcitonin gene-related peptide* - CGRP) no núcleo facial motor, após axoniotmese. Ao alterar a intensidade ou padrão temporal da expressão de CGRP na lesão, a fototerapia pode otimizar a taxa de regeneração, de inervação alvo e também a sobrevivência neuronal em neurônios axoniotomizados (SNYDER et al., 2002).

A possível ação da fototerapia em nervos periféricos lesionados está em reduzir as mudanças degenerativas nos neurônios correspondentes da medula espinhal sendo sugerida em

um estudo em nervo ciático esmagado de rato, o qual mostrou que a cromatólise e atrofia neuronal são menos extensos em animais tratados que nos controles (ROCHKIND, BARR-NEA & VOLGER, 1990).

Outro possível mecanismo de ação do laser no tecido nervoso é a ação neuroprotetora, que facilita o processo de regeneração das fibras nervosas. Na verdade a aplicação da laserterapia após lesão do nervo, inibe a atividade do óxido nítrico (um agente neurotóxico) e aumenta a expressão do fator de crescimento transformador $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) (LEUNG et al., 2003). Uma fascinante hipótese é que a laserterapia possa guiar os cones de crescimento neuronal *in vitro*, talvez devido à sua interação com a proteína citoplasmática, e particularmente, a um aumento da polimerização em direção a margem do axônio (EHRLICHER et al., 2002). Além disso, há demonstração experimental que a irradiação a laser seja capaz de estimular a proliferação das células de Schwann de ratas *in vitro*, apontando para outro mecanismo de efeito direto no crescimento do axônio, essa evidência comprova que a laserterapia exerce um efeito de regeneração nervosa periférica (VAN BREUGEL & BAR, 1993). Considerando a presença de um número adequado de células de Schwann como sendo um fator importante no sucesso da regeneração nervosa; a laserterapia desempenha uma ação gliotrófica que representa uma forte indicação a favor de seu uso no pós-traumático ou pós-cirurgia na reparação nervosa periférica (GEUNA et al., 2003). Com base na literatura acima mencionada, podemos concluir que os efeitos da laserterapia nos nervos periféricos existem múltiplos mecanismos de ação envolvidos e não é somente centralizado nos axônios. Futuros estudos conduzidos com objetivo de elucidar os efeitos biológicos da laserterapia na regeneração nervosa periférica deverão ser focalizados também nos elementos não neuronais, tais como, células de Schwann, células perineurais, macrófagos, mastócito.

2.1.4.A Laserterapia na Aplicação Clínica

Embora nem todos os autores concordem com a eficácia da laserterapia, existe (BROSSEAU et al., 2003a; BROSSEAU et al., 2003b; TURNER & HODE, 2003) um consenso geral em relação à segurança nesse tipo de tratamento, no qual efeitos colaterais ocorrem raramente (NAVRATIL & KYMPLOVA, 2002; BROSSEAU et al., 2003a; BROSSEAU et al., 2003b; TURNER & HODE, 2003), mas, poucas contra-indicações foram estabelecidas.

Uma das mais importantes indicações clínicas para o uso do laser é para analgesia. Na verdade esta é somente uma indicação da bioestimulação a laser que foi aprovada pela agência norte americana de controle de drogas e alimentos para o mercado (*Food and Drug Administration - FDA*) com notificação/510(k) e após essa aprovação, vários estudos demonstraram a eficácia do laser em várias síndromes dolorosas (TURNER & HODE, 2003). Os mecanismos pelos quais a laserterapia induz analgesia não são amplamente conhecidos, porém bons resultados são freqüentemente obtidos quando os nervos periféricos são irradiados, sugerindo tanto efeitos analgésicos quanto efeitos diretos na função da fibra nervosa (WALKER, 1983).

O primeiro estudo aleatorizado, duplo cego, placebo controlado, conduziu a um trabalho clínico o qual aplicou o laser de comprimento de onda de 780 nm em pacientes que sofreram por um longo período lesão nervosa periférica severa e incompleta, promovendo um resultado positivo. Dezoito pacientes foram divididos em placebo (luz desligada) e irradiados com laser de comprimento de onda de 780nm, potência 250 mW, por 21 dias consecutivos, por três horas consecutivas, transcutaneamente na área afetada do nervo periférico e por duas horas no segmento correspondente ao nervo na medula espinhal. As avaliações clínicas e eletrofisiológicas foram realizadas no 21º dia de tratamento e no 3º e 6º mês após o tratamento. Os resultados mostraram significativa melhora da função motora no membro previamente paralisado no grupo tratado com laser ($p=0.001$), comparado com o grupo placebo. A análise eletrofisiológica demonstrou uma melhora estatisticamente significativa no recrutamento da

atividade muscular voluntária ($p=0.0006$) do grupo irradiado com o laser, quando comparado com o placebo (Rockind et al, em preparação).

2.1.5. Estudos Futuros

Para facilitar a avaliação dos estudos experimentais a respeito dos efeitos da laserterapia na regeneração nervosa periférica, foi feita uma Tabela (1) que lista e resume todos os detalhes de cada estudo. Dentre os 11 estudos avaliados em diferentes laboratórios (9) ao redor do mundo, sete foram apresentados com lesão por esmagamento do nervo periférico e quatro por lesão severa (com transecção completa necessitando de reparação cirúrgica), nos mais diversos nervos (exemplo: mediano, ciático, alveolar inferior).

A maioria desses estudos revelou que a laserterapia promove a recuperação nervosa em pelo menos um dos parâmetros investigados, com exceção de dois estudos. (BAGIS et al., 2003; CHEN et al., 2005). Na avaliação foi encontrado um consenso sobre os estudos experimentais tenderem a publicar resultados positivos mais que os negativos (WAGNER et al., 2003).

Com base nessa revisão da literatura, certas recomendações serão feitas em relação a escolha do protocolo de tratamento para os estudos experimentais futuros e para aplicação clínica da laserterapia, com a intenção de melhorar a regeneração pós-traumática do nervo.

Autor (País)	ano	Tipo de nervo lesão/reparação	Modelo Experimental	Tipo de laser	Comprimento de Onda	Tempo de Emissão	Protocolo de tratamento	Formas de mensuração	Resultados-Efeitos
Rochkind et al. (Israel)	1987b	esmagamento	n. ciático do rato	HeNe (contínuo)	632.8 nm	14 min	1º dia pós-op., por 20 dias consec.(tot. = 20)	eletrofisiológica morfológica	positivo
Rochkind et al. Israel	1987b	esmagamento	n. ciático do rato	HeNe (contínuo)	632.8 nm	7 min	1º dia pós-op., por 20 dias consec.(tot. = 20)	eletrofisiológica morfológica	positivo
Hamilton et al. (USA)	1992	esmagamento	n. fibularl do coelho	HeNe	632.8 nm	9 min	1º dia pós-op., por 15 dias consec.(tot. = 15)	eletrofisiológica	positivo
Anders et al. (USA)	1993	esmagamento	n. facial do rato	HeNe (contínuo)	632.8	90 min	1º dia pós-op., por 7-9 dias consec.(tot. = 7-9)	morfológica	positivo
Khullar et al. (Noruega)	1995	esmagamento	n. ciático do rato	GaAlAs	820 nm	85 S	1º dia pós-op., por 28 dias consec.(tot. = 28)	funcional eletrofisiológica morfológica	positivo
Shin et al. (Coréia)	2003	esmagamento	n. ciático do rato	Semicondutor (contínuo)	650 nm	5min	1º dia pós-op., por 5 dias consec.(tot. = 5)	funcional morfológica	positivo
Bagis et al. (Turquia)	2003	esmagamento	n. ciático do rato	GaAs (pulsado)	904 nm	15 min	1º dia pós-op., por 7 dias consec.(tot. = 7)	eletrofisiológica morfológica	nenhum
Shamir et al. (Israel)	2001	Neurorafia termino-terminal	n. ciático do rato	AsGaAl(contínuo)	780 nm	30 min	1º dia pós-op., por 20 dias consec.(tot. = 21)	eletrofisiológica morfológica	positivo
Miloro et al. (USA)	2002	Tubulização com Gore-Tex (8mm)	n. alveolar inferior do coelho	GaAlAs (contínuo)	820-830 nm	90 s	1º dia pós-op., por 4 dias consec. mais 1 dia por semana por 6 semanas (tot. = 10)	morfológica	positivo
Gigo-Benato et al. (Brasil-Itália)	2003	Neurorafia termino-lateral no nervo Ulnar	n. mediano do rato	InGa(Al)As (contínuo) InGaAs (pulsado)	808nm 905 nm	39s	1º dia pós-op., 3 dias por semana por 3 semanas (tot. = 9)	funcional morfológica	positivo
Che net al.	2005	Tubulização tubo-silicone (10 mm)	Nervo ciático do rato	As GaAl (pulsado) GaAs (pulsado)	905 nm 904 nm	72 s 2min	Início 2ºsem pós-op por 7 sem dias alternados	eletrofisiológica morfológica	negativo

Tabela 1. “Positivo” significa que a laserterapia induziu uma melhora estatisticamente significativa sobre o reparo nervoso em pelo menos um dos parâmetros avaliados em relação aos controles não tratados. “Nenhum” significa nenhuma diferença significativa observada. “Negativo” significa que o reparo nervoso nos animais tratados foi significativamente pior que os controles em pelo menos uma das variáveis avaliadas.

2.1.6. Tipos de Lasers e Comprimento de Onda

Estudos prévios utilizaram o laser HeNe (Hélio-Neônio) para produção de uma luz visível (632,8nm) recentemente foi utilizado um laser semi-condutor para produzir um comprimento de onda próximo ao infravermelho (780-830nm) (ROCHKIND et al.; 1987a ; ROCHKIND et al.; 1987b; HAMILTON, KEVEN & RAY, 1992; ANDERS et al., 1993). Somente um artigo comparou diretamente os comprimentos de onda visível e infravermelho e concluiu que a emissão visível do comprimento de onda de 632,8 nm foi mais efetiva na estimulação da regeneração nervosa, em comparação ao infravermelho com emissão de comprimento de onda de 1061nm (ANDERS et al., 1993). Existe um aumento no uso dos aparelhos laser infravermelho, mas isso é justificado, pela sua maior penetração através da pele (TURNER & HODE , 1993). Efeitos positivos em estudos experimentais foram obtidos com comprimento de onda visível e próximo ao infravermelho. Parece que ambos os tipos de laser podem ser utilizados para promover a regeneração nervosa pós-trauma. O pior resultado deste estudo foi obtido com o comprimento de onda mais longo (>904nm), portanto o seu uso deveria ser desencorajado.

2.1.6.1. Densidade de Energia e Tempo de Emissão

As análises dos resultados publicados mostraram que a laserterapia em diferentes níveis de densidade de energia com menos de 10 J/cm² até 150 J/cm² são eficientes na regeneração nervosa. O mesmo pode ser aplicado nos tempos de tratamento os quais oscilam de menos de 1 minuto até 90 minutos. Portanto, essas observações sugerem que a luz exerce um efeito positivo na regeneração nervosa, com uma grande variação de intervalos tanto de densidade de energia quanto tempo de emissão.

2.1.6.2. Tipos de Emissão da Luz

A emissão da luz do laser pode ser contínua ou pulsada. Oito dos onze estudos presentes na tabela 1 empregaram emissão contínua porém, resultados nulos ou negativos foram encontrados

em apenas dois deles, os quais utilizaram a emissão pulsada (BAGIS et al., 2003; CHEN et al., 2005). Finalmente, o estudo que utilizou ambos os tipos de emissão, mostrou melhores resultados com a emissão contínua (GIGO-BENATO et al., 2004). Todos os estudos publicados, que utilizaram laser de emissão contínua levaram a resultados positivos. Portanto, esse tipo de emissão de laser deverá ser a primeira escolha na intervenção clínica para a recuperação do nervo periférico.

2.1.7. Protocolo de Tratamento

Com somente uma exceção (CHEN et al, 2005) todos os estudos seguiram um tratamento similar baseado na utilização da laserterapia iniciada a partir do primeiro dia do pós-operatório, seguido por aplicações regulares usualmente diárias, por um período de cinco dias a um mês. O único estudo no qual o início do tratamento foi iniciado na segunda semana do pós-operatório, levou a um resultado negativo (CHEN et al, 2005). Estudos futuros deverão investigar mais extensivamente os efeitos da laserterapia iniciada em um período tardio do pós-operatório. Porém, os resultados dos estudos acima mencionados, sugerem que tentativas clínicas deverão basear-se inicialmente em tratamentos imediatos pós-traumáticos ou pós-operatórios.

2.1.8. Tipo e Local de Aplicação

Na maioria dos estudos, a laserterapia foi aplicada transcutaneamente, superficialmente no local correspondente no ponto da lesão. Este procedimento levou as pesquisas a ótimos resultados. A aplicação transcutânea no local do nervo lesionado ou reparado é um procedimento muito menos invasivo, em comparação a irradiação direta do nervo, sendo então, a melhor escolha de aplicação de laser nos tratamentos clínicos futuros.

Em conclusão, a eficiência real da laserterapia na reabilitação continua sob debate (BASFORD, 1995; LUCAS et al., 2002 ;BROSSEAU et al., 2003a; BROSSEAU et al., 2003b;

TURNER & HODE, 2003). De fato, a despeito do número de estudos publicados existem muitas opiniões variáveis que poderiam influenciar no desenvolvimento da laserterapia, (especialmente em relação ao modelo e qualidade do instrumento usado), tornando muito difícil a comparação dos resultados. É necessário que se realize pesquisas mais rigorosas tanto básicas, quanto clínicas, para definir a eficácia da laserterapia em vários contextos clínicos.

Em relação à reparação do nervo periférico essa revisão bibliográfica mostrou que a maioria dos estudos experimentais exceto dois, demonstraram que a laserterapia promove a recuperação da lesão do nervo no pós-traumático e pós-cirúrgico. Embora inúmeras técnicas microcirúrgicas existam para o reparo do nervo periférico, é necessário buscar técnicas mais efetivas de reabilitação pós-operatória, para aumentar o grau de recuperação funcional após cirurgia (LUNDBORG, 2002). Recentes estudos experimentais mostraram que a laserterapia é efetiva e influencia a regeneração nervosa periférica, não apenas nos casos de axoniotmese, mas também nas lesões mais severas de neurotmeses, as quais foram corrigidas por meios de técnicas microcirúrgicas, tais como neurorrafias (SHAMIR et al., 2001) termino-terminal e termino-lateral (GEUNA et al., 2003; GIGO-BENATO et al., 2004).

Além de confirmar a eficácia da laserterapia para promoção da recuperação pós-traumática e pós-cirúrgica, tentativas clínicas no futuro precisarão definir os protocolos mais indicados de terapia para várias situações clínicas, em particular, a respeito das características do aparelho a laser, o local da irradiação, extensão do tratamento. Levando-se em conta que os tratamentos com protocolos inadequados de estimulação poderão além de ser ineficientes poderão exercer também, um efeito supressivo na regeneração nervosa (CHEN et al., 2005).

2.4. BIBLIOGRAFIA

ALAM M, DOVER JS. Nonablative Laser And Light Therapy: An Approach To Patient And Device Selection. **Skin Therapy Lett.** 8:4 –7,2003.

AMARAL AC, PARIZOTTO NA, SALVINI TF. Dose-Dependency Of Low-Energy HeNe Laser Effect In Regeneration Of Skeletal Muscle In Mice. **Lasers Med Sci.**16:44 –51, 2001.

ANDERS JJ, BORKE RC, WOOLERY SK, VAN DE MERWE WP. Low Power Laser Irradiation Alters The Rate Of Regeneration Of The Rat Facial Nerve. **Lasers Surg Med.** 13:72–82,1993.

ANDERS JJ, GEUNA S, ROCHKIND S. Phototherapy Promotes Regeneration and Functional Recovery Of Injured Peripheral nerve. **Neurol Res.** 26:233–239, 2004.

BAGIS S, COMELEKOGLU U, SAHIN G, BUYUKAKILLI B, ERDOGAN C, KANIK A. Acute Electrophysiologic Effect Of Pulsed Galliumarsenide Low Energy Laser Irradiation On Configuration Of Compound Nerve Action Potential And Nerve Excitability. **Lasers Surg Méd.**30:376 –380, 2002.

BAGIS S, COMELEKOGLU U, COSKUN B, MILCAN A, BUYUKAKILLI B, SAHIN G, et al. No Effect Of GA-AS (904 nm) Laser Irradiation On The Intact Skin Of The Injured Rat Sciatic Nerve. **Lasers Med Sci.**18:83– 88, 2003.

BALABAN P, ESENALIEV R, KARU T, KUTOMKINA E, LETOKHOV V, ORAEVSKY A, et al. He-Ne Laser Irradiation Of Single Identified Neurons. **Lasers Surg Med.** 12:329 –337, 1992.

BARTELS KE. Lasers In Veterinary Medicine—Where Have We Been, And Where Are We Going? **Vet Clin North Am Small Anim Pract.** 32:495–515, 2002.

BASFORD JR. Low Intensity Laser Therapy: Still Not An Established Clinical Tool. **Lasers Surg Med** 16:331–342,1995.

BAXTER GD, WALSH DM, ALLEN JM, LOWE AS, BELL AJ. Effects OF Low Intensity Infrared Laser Irradiation Upon Conduction In The Human Median Nerve In Vivo. **Exp Physiol.** 79:227–234, 1994.

BROSSEAU L, WELCH V, WELLS G, DEBIE R, GAM A, HARMAN K, et al. Low Level Laser Therapy (Classes I, II And III) For Treating Osteoarthritis. **Cochrane Database Syst Rev**, CD002046, 2003a.

BROSSEAU L, WELCH V, WELLS G, DEBIE R, GAM A, HARMAN K, et al. Low Level Laser Therapy (classes I, II and III) For Treating Rheumatoid Arthritis. **Cochrane Database Syst Rev**, CDAB002049, 2003b.

CHEN YS, HSU SF, CHIU CW, LIN JG, CHEN CT, YAO CH. Effect Of Low-Power Pulsed Laser On Peripheral Nerve Regeneration In Rats. **Microsurgery.** 25:83– 89, 2005.

COMELEKOGLU U, BAGIS S, BUYUKAKILLI B, SAHIN G, ERDOGAN C, KANIK A. Acute Electrophysiological Effect Of Pulsed Galliumarsenide Low-Energy Laser Irradiation On Isolated Frog Sciatic Nerve. **Lasers Med Sci.**17:62– 67, 2002.

DVALI L, MACKINNON S. Nerve Repair, Grafting, and Nerve Transfers. **Clin Plast Surg.**30:203–221, 2003.

EHRLICHER A, BETZ T, STUHRMANN B, KOCH D, MILNER V, RAIZEN MG, et al. Guiding Neuronal Growth With Light. **Proc Natl Acad Sci USA.** 99:16024–16028, 2002.

ENWEMEKA CS. Quantum Biology of Laser Photostimulation. **Laser Ther .** 11:52–44,1999.

EVANS GR. Challenges to Nerve Regeneration. **Semin Surg Oncol.**19:312–318, 2000.

FUNG DT, NG GY, LEUNG MC, TAY DK. Therapeutic Low Energy Laser Improves The Mechanical Strength Of Repairing Medial Collateral Ligament. **Lasers Surg Med.** 31:91–96, 2002.

GAGLIARDI S, ATLANTE A, PASSARELLA S. A Novel Property Of Adenine Nucleotides: Sensitivity To Helium-Neon Laser In Mitochondrial Reactions. **Biochem Mol Biol Int.**41:449–460, 1997.

GEUNA S, GIGO-BENATO D, TOS P, FORNARO M, BATTISTON B, GIACOBINI-ROBECCHI MG. Nerve Regeneration After End-To-Side Neurorrhaphy Is Enhanced By Post-Operative Low-Power Laser Biostimulation: An Experimental **Study. Proceedings of the Second Congress of the World Society of Reconstructive Microsurgery** Heidelberg (Germany); p 34, 2003.

GEUNA S, RAIMONDO S, NICOLINO S, BOUX E, FORNARO M, TOS P, et al. Schwann-Cell Proliferation In Muscle-Vein Combined Conduits For Bridging Rat Sciatic Nerve Defects. **J Reconstr Microsurg**19:119 –123, 2003.

GIGO-BENATO D, GEUNA S, DE CASTRO RODRIGUES A, TOS P, FORNARO M, BOUX E, et al. Low-Power Laser Biostimulation Enhances Nerve Repair After End-To-Side Neurorrhaphy: A Double-Blind Randomized Study In The Rat Median Nerve Model. **Laser Med Sci.** 19:57– 65, 2004.

GREATHOUSE DG, CURRIER DP, GILMORE RL. Effects Of Clinical Infrared Laser On Superficial Radial Nerve Conduction. **Phys Ther.**65:1184 –1187, 1985.

GUZZARDELLA GA, FINI M, TORRICELLI P, GIAVARESI G, GIARDINO R. Laser Stimulation On Bone Defect Healing: An In Vitro Study. **Lasers Med Sci.** 17:216 –220, 2002.

HAMILTON GF, KEVEN ROBINSON T, RAY RH. The Effects Of Helium-Neon Laser Upon Regeneration Of The crushed Peroneal Nerve. **J Orthop Sports Phys Therapy.**15:209 –214, 1992.

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.**103:299 –305, 1995.

KLINE DG, KIM D, MIDHA R, HARSH C, TIEL R. Management and Results of Sciatic Nerve Injuries: a 24-Year Experience. **J Neurosurg.**89:13–23, 1998

KREISLER M, CHRISTOFFERS AB, WILLERSHAUSEN B, D'HOEDT B. Effect Of Low-Level GaAlAs Laser Irradiation On The Proliferation Rate Of Human Periodontal Ligament Fibroblasts: An In Vitro Study. **J Clin Periodontol.** 30:353–358, 2003.

LEUNG MC, LO SC, SIU FK, SO KF. Treatment Of Experimentally Induced Transient Cerebral Ischemia With Low Energy Laser Inhibits Nitric Oxide Synthase Activity And Up-Regulates The Expression Of Transforming Growth Factor-Beta1. **Lasers Surg Med.** 31:283–288, 2002.

LUCAS C, CRIENS-POUBLON LJ, COCKRELL CT, DE HAAN RJ. Wound Healing in Cell Studies and Animal Model Experiments by Low Level Laser Therapy; Were Clinical Studies Justified? A Systematic Review. **Lasers Med Sci.** 17:110 –134, 2002.

LUNDBORG G. A 25-Year Perspective of Peripheral Nerve Surgery: Evolving Neuroscientific Concepts and Clinical Significance. **J Hand Surg.** 25:391– 414,2000.

LUNDBORG G. Enhancing Posttraumatic Nerve Regeneration. **J Periph Nerv Syst.**7:139 –140, 2002.

MEEK MF, COERT JH. Clinical Use of Nerve Conduits in Peripheral Nerve Repair: Review of the Literature. **J Reconstr Microsurg.**18:97–109, 2002.

MILLESINI H. Techniques for Nerve Grafting. **Hand Clin.** 16: 73–91, 2000.

MILORO M, HALKIAS LE, MALLERY S, TRAVERS S, RASHID RG. Low Level Laser Effect On Neural Regeneration In Gore-Tex Tubes.**Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 93: 27–34, 2002.

MORRONE G, GUZZARDELLA GA, TIGANI D, TORRICELLI P, FINI M, GIARDINO R. Biostimulation Of Human Chondrocytes With Ga-Al-As Diode Laser: 'In Vitro' Research. **Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.**28:193–201, 2000.

NAVRATIL L, KYMPLOVA J. Contraindications In Noninvasive Laser Therapy: Truth And Fiction. **J Clin Laser Med Surg .** 20:341–343, 2002.

REDDY GK, STEHNO-BITTEL L, ENWEMEKA CS. Laser Photostimulation Of Collagen Production In Healing Rabbit Achilles Tendons. **Lasers Surg Med.** 22:281–287,1998.

ROCHKIND S. Stimulation Effect of Laser Energy on The Regeneration of Traumatically Injured Peripheral Nerves. **Morphogen Regen.**83:25–27, 1978.

ROCHKIND S, ALON M. Microsurgical Management of Old Injuries of the Peripheral Nerve and Brachial Plexus. **J Reconstr Microsurg .**16:541–546, 2000.

ROCHKIND S, NISSAN M, RAZON N, SCHWARTZ M, BARTAL A. Electrophysiological Effect of HeNe Laser On Normal And Injured Sciatic Nerve in The Rat. **Acta Neurochir.** 83:125–30, 1986.

ROCHKIND S, BARR-NEA L, RAZON N, BARTAL A, SCHWARTZ M. Stimulatory Effect Of He-Ne Low Dose Laser On Injured Sciatic Nerves of Rats. **Neurosurgery.** 20:843– 847, 1987a.

ROCHKIND S, NISSAN M, BARR-NEA L, RAZON N, SCHWARTZ M, BARTAL A. Response of Peripheral Nerve To He-Ne Laser: Experimental Studies. **Lasers Surg Med.**7:441– 443, 1987b.

ROCHKIND S, NISSAN M, LUBART R, AVRAM J, BARTAL A. The In-Vivo Nerve Response to Direct Low-Energy-Laser Irradiation. **Acta Neurochir** .94:74 –77, 1988.

ROCHKIND S, ROUSSO M, NISSAN M, VILLARREAL M, BARR-NEA L, REES DG. Systemic Effects Of Low-Power Laser Irradiation on The Peripheral and Central Nervous System, Cutaneous Wounds, and Burns. **LasersSurgMed.** 9:174–182, 1989.

ROCHKIND S, BARR-NEA L, VOLGER I. Spinal Cord Response to Laser Treatment of Injured Peripheral Nerve. **Spine.** 15:6–10, 1990.

ROCHKIND S, OUAKNINE GE. New Trend In Neuroscience: Low Power Laser Effect on Peripheral and Central Nervous System. **Neurol Res.**14:2–11.1992.

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 Surg Med.** 28: 216–219, 2001.

ROVAK JM, CEDERNA PS, KUZON WM JR. Terminolateral Neurorhaphy: a Review of the Literature. **J Reconstr Microsurg** .17:615–624, 2001.

SAMII M, CARVALHO GA, NIKKHAH G, PENKERT G. Surgical Reconstruction Of The Musculocutaneous Nerve in Traumatic Brachial Plexus Injuries. **J Neurosurg.** 87:881– 886, 1997.

SHAMIR MH, 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. **J Reconstr Microsurg.**17:133– 137, 2001.

SHIN DH, LEE E, HYUN JK, LEE SJ, CHANG YP, KIM JW, et al. Growth-Associated Protein-43 Is Elevated in the Injured Rat Sciatic Nerve After Low Power Laser Irradiation. **Neurosci Lett.** 344:71–74, 2003.

SNYDER SK, BYRNES KR, BORKE RC, SANCHEZ A, ANDERS JJ. Quantification of Calcitonin Gene-Related Peptide mRNA and Neuronal Cell Death in Facial Motor Nuclei Following Axotomy and 633 nm Low Power Laser Treatment. **Lasers Surg Med.** 31: 216 – 222, 2002.

SNYDER-MACKLER L, BORK CE. Effect of Helium-Neon Laser Irradiation on Peripheral Sensory Nerve Latency. **Phys Ther.** 68:223–225, 1988.

STRAUCH B. Use of Nerve Conduits in Peripheral Nerve Repair. **Hand Clin.**16:123–130, 2000.

TURNER J, HODE L. Laser Therapy: Clinical Practice and Scientific Background. **Prima Books** Grängesberg, Sweden;; p380–434, 2003.

VAN BREUGEL HH, BAR PR. He-Ne Laser Irradiation Affects Proliferation of Cultured Rat Schwann Cells in a Dose-Dependent Manner. **J Neurocytol** .22:185–190, 1993.

WAGNER AK, BONINGER ML, LEVY C, CHAN L, GATER D, KIRBY RL. Peer Review: Issues in Physical Medicine and Rehabilitation. **Am J Phys Med Rehabil** 82:790–802, 2003.

WALKER J. Relief from Chronic Pain by Low Power Laser Irradiation. **Neurosci Lett.** 43:339–344, 1983.

WALKER JB, AKHANJEE LK. Laser-Induced Somatosensory Evoked Potentials: Evidence of Photosensitivity in Peripheral Nerves. **Brain Res.** 344:281–285, 1985.

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.** 26:485–490, 2000.

WOLLMAN Y, ROCHKIND S. In Vitro Cellular Processes Sprouting in Cortex Microexplants of Adult Rat Brains Induced by Low Power Laser Irradiation. **Neurol Res.**20:470–472, 1998.

WOLLMAN Y, ROCHKIND S, SIMANTOV R. Low Power Laser Irradiation Enhances Migration and Neurite Sprouting of Cultured Rat Embryonic Brain Cells. **Neurol Res.**18:467–470, 1996.

WU WH, PONNUDURAI R, KATZ J, POTT CB, CHILCOAT R, UNCINI A, et al. Failure To Confirm Report Of Light-Evoked Response Of Peripheral Nerve To Low Power Helium-Neon Laser Light Stimulus. **Brain Res.** 401:407– 408,1987.

PARTE II

ARTIGO : 2

AÇÃO DA LASERTERAPIA NA RECUPERAÇÃO INICIAL DO NERVO CIÁTICO DO RATO APÓS LESÃO POR ESMAGAMENTO

RESUMO:

O uso da laserterapia apresenta bons resultados na melhora da regeneração nervosa pós-traumática. O objetivo desse estudo foi investigar as mudanças iniciais induzida pela aplicação do laser de baixa intensidade após lesão por esmagamento no nervo ciático do rato. Os nervos ciáticos dos direitos dos ratos foram irradiados transcutaneamente com laser de GaAlAs (830nm), contínuo, com potência de 60 mW e fluência de 40 J.cm², com tempo de irradiação de 19 segundos, por cinco dias consecutivos, além do primeiro dia do pós-operatório, também a partir da segunda semana do pós-operatório e sacrificados no 14º dia após lesão. A recuperação da função motora foi avaliada por meio da análise da marcha em pista (*Walking Track Analysis*) e calculada pelo Índice Funcional do Ciático (SFI). A área de secção transversa das fibras do músculo tibial anterior foi avaliada para verificar o grau da atrofia muscular. A recuperação do nervo ciático foi analisada por meio de microscópio de luz e confocal, após reação imunistoquímica nos cortes de tecidos nervosos com anti-neurofilamento-200Kd e anti- S100. Os resultados mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os animais tratados e o controle simulado (*sham*) em todos parâmetros investigados para analisar a recuperação do nervo ciático, tanto morfológicos quanto funcionais, bem como sobre a atrofia muscular, sugerindo que a laserterapia não foi eficaz na fase inicial da recuperação da lesão nervosa. Investigações anteriores comparativas sobre mudanças iniciais na recuperação nervosa não conseguiram evidências suficientes nas lesões por esmagamento do nervo. Entretanto, é possível que a ausência dos efeitos positivos da laserterapia na regeneração nervosa seja devido tanto à inadequação da escolha do laser e do protocolo de irradiação, quanto ao modelo empregado de lesão.

Palavras chaves: Laserterapia, Regeneração Nervosa Periférica, Nervo Ciático, Índice Funcional do Ciático, Lesão por Esmagamento, Análise da Marcha em Pista, *Walking Track Analysis*.

2.2.1. INTRODUÇÃO

As lesões do nervo periférico são comuns nas ocorrências clínicas (EVANS, 2000). O sistema nervoso periférico possui habilidade de regeneração (LUNDBORG, 2005); apesar de haver essa capacidade, o grau de recuperação funcional é geralmente parcial (SAMII et al., 1987; LUNDBORG, 2002). Conseqüentemente a recuperação funcional é freqüentemente insatisfatória, e muitas vezes é necessário encontrar instrumentos efetivos para estimular a regeneração nervosa periférica pós-traumática (LUNDBORG, 2002).

Vários recursos foram experimentalmente testados com objetivo de melhorar a regeneração nervosa pós-traumática, tais como: drogas (GOLD et al., 2004), hormônios (GUDEMEZ et al., 2002, ROGÉRIO et al., 2005), exercícios (SARIKCIOGLU & OGUZ, 2001) e agentes físicos (LAZAR et al., 2001). Dentre esse último grupo (dos agentes físicos) a estimulação a laser de baixa intensidade na regeneração do nervo periférico, recebeu uma crescente atenção por volta de 20 anos atrás (ROCHKIND & OUAKNINE, 1992; ANDERS et al., 2004).

Numa recente revisão crítica da literatura, mostrou-se que mais de 80 % dos estudos experimentais conduzidos até hoje sobre o uso da laserterapia para a promoção da regeneração nervosa periférica levaram a uma positiva recuperação nervosa pós-lesão e pós-operatória (GIGO-BENATO et al., 2005). Deste modo, esse instrumento fisioterapêutico promissor pode ser clinicamente indicado para pacientes que sofreram lesão nervosa periférica.

Baseado nos resultados promissores obtidos até o presente momento, o objetivo desse estudo foi investigar os efeitos da laserterapia durante estágios iniciais da regeneração nervosa periférica. Neste estudo foi utilizado o modelo experimental para a produção da lesão por esmagamento (*crush*) com uma pinça especial, que foi recentemente padronizada (BEER, STEURER & MEYER, 2001; VAREJÃO et al., 2004) para o uso no nervo ciático do rato. Este modelo experimental foi caracterizado pela recuperação funcional detectável no início, já na segunda semana após a lesão, por meio do teste de caminhada em pista (*walking track analysis*)

e do cálculo obtido pelo índice funcional do ciático, sendo este modelo de análise adequado para investigação de tempos iniciais da recuperação.

2.2.2. MATERIAIS E MÉTODOS

Ratos albinos (*Rattus norvegicus*) do tipo Wistar foram utilizados nesse estudo. Uma boa prática laboratorial animal foi observada de acordo com os padrões internacionais e nacionais para experimentação animal e aprovados pelo comitê de ética e de cuidados animais da Universidade Federal de São Carlos. Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal com solução contendo Ketamina (95 mg/kg) e Xilasina (12 mg/Kg). A pele foi tricotomizada e foi realizada a assepsia com solução de iodo 10% (povidine). Uma incisão de 2 cm foi feita na pele sobre a porção média da coxa, até a exposição do nervo ciático direito. Para pinçar o nervo foi utilizado uma pinça não serrilhada, com força padronizada de 54 N (BEER, STEURER & MEYER, 2001) pressionada por 30 segundos, para criar uma lesão de 3 milímetros de extensão. Essa lesão foi feita 10 mm acima da bifurcação do nervo ciático direito a fim de obter uma boa reprodução da lesão de axoniotmese (VAREJÃO et. al, 2004). O diâmetro inicial normal do nervo ciático é de 1 mm, durante o achatamento do nervo o diâmetro passou para 2mm, resultando uma pressão de 9 mPa. Os nervos ficaram hidratados em solução estéril 37° C de soro fisiológico ao longo da intervenção cirúrgica. Após a cirurgia os animais foram colocados isoladamente em gaiolas e alimentados com comida e água *ad libitum*. Por quatro dias foi adicionado à água o Paracetamol (13,5 mg/100 ml) para a redução da dor.

Os animais foram divididos em 4 grupos (n= 9): *Grupo 1* (G1) : normal (não operado), *Grupo 2* (G2): 1° semana de laserterapia (recebeu 5 dias laserterapia iniciado a partir do 1° dia do pós-esmagamento e 5 dias de estimulação simulada com aparelho desligado a partir do 7° dia do pós-esmagamento), *Grupo 3* (G3): 2° semana de laserterapia (recebeu 5 dias de laserterapia simulada iniciada no 1° dia do pós-esmagamento e 5 sessões de laserterapia a partir do 7° dia do pós-esmagamento), *Grupo 4* (G4): Placebo (sham) controle (recebeu somente 10 estimulações simuladas durante a 1° e 2° semana).

Para o tratamento foi aplicado o laser Arseneto de Gálio-Alumínio (AsGaAl), modo contínuo, comprimento de onda de 830nm, potência de 60 mW, irradiados por 19 segundos, área do feixe 0,0275 cm², densidade de energia por ponto 40 J/cm². Após tricotomia, a irradiação foi aplicada transcutaneamente em três pontos de 1 cm de distância entre eles, no local da cirurgia (reconhecível pela presença da cicatriz da cirurgia) acompanhando o trajeto do nervo ciático. A aplicação nos ratos foi realizada com um manuseio suave dos animais. A laserterapia não produz qualquer sensação de desconforto e nem estresse aos animais.

A avaliação da recuperação nervosa foi calculada pelo índice funcional do ciático (SFI) que foi descrito por Bain, Mackinnon & Hunter (1989). Os animais foram treinados a caminhar em um corredor que mede 42 cm de comprimento e 8.2 cm de largura e com uma caixa escura ao fundo do corredor. Um papel branco foi colocado cobrindo o assoalho do corredor para que o rato pudesse caminhar sobre ele. As patas posteriores dos ratos foram pressionadas sobre uma plataforma lisa encharcada de tinta de impressão digital, assim as impressões destas patas traseiras puderam ser marcadas no papel quando o rato realizava a travessia ao longo do corredor.

Três medidas foram obtidas a partir das impressões destas patas (1) PL= impressão do comprimento, ou seja, a distância do 3º dedo ao calcâneo; (2) TS = afastamento dos dedos, ou seja: a distância do 1º ao 5º dedo; (3) ITS = afastamento intermediário dos dedos, ou seja, distância do 2º ao 4º dedo. Após todas as medidas serem feitas tanto na pata experimental (E) quanto na normal (N) o índice funcional do ciático foi calculado de acordo com a equação proposta por Bain, Mackinnon & Hunter (1989) :

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

Após 14 dias os animais foram submetidos a eutanásia e tanto o nervo ciático quanto o músculo tibial anterior direito foram cuidadosamente dissecados, evitando lesões mecânicas. Para obter uma primeira indicação sobre as variações tróficas do músculo, os mesmos foram imediatamente pesados ainda úmidos com uma balança de precisão (Denner Instruments, Denver, CO, USA).

Os músculos tibiais anteriores foram congelados em isopentano previamente resfriado em nitrogênio líquido. As amostras de músculo dissecadas foram armazenadas em tubos plásticos e estocadas no freezer a -80°C . Foram feitos cortes histológicos seriados ($10\mu\text{m}$) no 1/3 médio do ventre do músculo transversalmente ao eixo principal de suas fibras no criostato (Mícron HM 505 E, Walldorf, Alemanha). Os cortes foram corados com Azul de Toluidina para a análise morfológica e foram analisados em microscópio de luz (Axioplan 2, Carl Zeiss, Jena, Alemanha). Para a morfometria da fibra muscular, 200 fibras foram aleatoriamente selecionadas e mensuradas em um corte transversal no 1/3 médio do ventre do m. tibial anterior (TA). Um procedimento as cegas foi usado para a definição do local a ser analisado.

O nervo ciático foi fixado em formol a 10% por 3 horas e lavado em solução salina tamponada com fosfato (PBS). As amostras foram desidratadas, incluídas em parafina de tal forma a ficar perpendicular ao eixo principal do nervo. Após a inclusão, foram cortados em $7\mu\text{m}$. Para análise de microscopia de luz, os cortes foram corados com Hematoxilina-Eosina e Papanicolau, e após, foram observados ao microscópio Leica (DM 400) equipado com uma câmera digital Leica (DFC 320).

Para análise imunistoquímica ao microscópio confocal a laser, os cortes foram incubados por uma noite em solução contendo anticorpo anti-neurofilamento (α -NF)-200 KD (monoclonal produzido em camundongo, com locus de reconhecimento para a subunidade de neurofilamento 200 KD do porco, na diluição 1:200, Sigma, St. Louis, MO, USA) e anticorpo anti-S100 (policlonal produzido em coelho, com locus de reconhecimento da unidade monomérica para S-

100 cálcio-englobando a proteína 21 KD bovina, diluição 1:800, Sigma, St Louis, MO, USA). Após lavagem em PBS, os cortes foram encubados por uma hora contendo dois diferentes anticorpos secundário TRITC-conjugado IgG anti-coelho (diluição de 1:200, Dako, Milão, Itália) e Alexa-Fluor-488-conjugado IgG anti-camundongo (diluição 1:200, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). Os cortes foram mantados para (Dako) e análise no microscópio confocal a laser. As imagens obtidas no sistema confocal para imunofluorescência foram capturadas a 20x com objetiva Plan-NEOFLUAR, com abertura numérica (NA) 0.50 e uma a 40x com objetiva Plan-NEOFLUAR com (NA) 0.75. Um zoom eletrônico com uma magnitude de 1 à 8 foi empregado para obter as ampliações indicadas nas figuras. Para a visualização fluorescente da Alexa-Fluor-488 utilizamos uma excitação da linha do laser de Argônio (488 nm) e a emissão passa através de filtros passa-banda que deixa passar o comprimento de onda de 505nm a 530 nm. Para visualizar o TRITC foi usado exitação pelo laser HeNe na sua linha de emissão de 543 nm, passando através de um filtro passa-alta que permite passar comprimentos de onda superiores a 560 nm no detector. As imagens criadas com BP 505-530 foram digitalmente coloridas em cinza. As imagens que foram criadas com LP 560 com filtro digital foram coradas em branco. A especificidade dos anticorpos foram confirmadas por meio da técnica de *Western Blotting*.

Todos os dados numéricos foram submetidos à análise estatística feita pelo teste de análise de variância (RM-ANOVA) de medidas repetidas de uma via (*one-way*). Na presença de diferenças significativas, foi utilizado o teste *post-hoc* de *Student-Neuman-Keuls* (SNK) de múltiplas comparações pareadas para detecção das diferenças específicas. A significância estatística foi estabelecida em $p < 0,05$.

2.2.3. RESULTADOS

A massa corporal dos ratos no dia do sacrifício foi de: G1: 315±33 g; G2: 296±25 g; G3: 299±25 g; G4:302±23g. Na aplicação do teste RM-ANOVA não se encontrou diferenças estatísticas entre todos os grupos.

A figura 2.1 mostra os resultados da avaliação funcional e da recuperação pós-traumática do nervo ciático, calculada por meio do índice funcional do ciático. A análise estatística ANOVA mostrou somente diferença estatística referente ao índice funcional do ciático entre as pegadas normais (pré-cirurgia) e pré-eutanásia, sendo que a avaliação estatística foi significativa ($p<0,05$) em todos os 3 grupos. Por outro lado, na comparação entre os grupos, não foi encontrada diferença estatística ($p>0,05$) tanto na avaliação do normal quanto na pré-eutanásia.

A média das massas dos músculos tibiais anteriores foram de: Grupo 1=0,67±0,08g; Grupo 2= 0,35±0,04g; Grupo 3=0,41±0,06; Grupo 4=0,42±0,09g. O teste RM-ANOVA discriminou todas as diferenças estatisticamente significantes ($p<0,05$). A múltipla comparação (*post-hoc*) pelo teste SNK mostrou que a massa do músculo foi significativamente menor ($p<0,05$) em todos os grupos desnervados, em comparação com os músculos tibiais anteriores normais. No entanto, não mostrou nenhuma diferença estatística entre os grupos dos músculos desnervados($p> 0,05$).

A figura 2.2 mostra a histologia do músculo normal (A) e dos músculos desnervados (B, C, D) que ilustram claramente a atrofia muscular que ocorre nos grupos experimentais.

A figura 2.3 mostra os resultados da avaliação morfométrica da área das fibras dos músculos realizada sobre os cortes histológicos transversais. O teste RM-ANOVA mostrou diferenças estatísticas ($p< 0,05$) entre os grupos. No teste *post-hoc* SNK se demonstrou que as fibras musculares foram significativamente ($p<0,05$) menores em todos os grupos desnervados, em comparação com os músculos normais. Ao contrário, nenhuma diferença estatística significativa ($p> 0,05$) na média do diâmetro das fibras nos grupos de músculos desnervados foi observada.

A análise de microscopia de luz nos nervos normais e esmagados (figs. 2.4 e 2.5) mostrou que a organização histológica nos nervos regenerados foi similar em todos os grupos referentes aos axônios regenerados (fig 2.4 B-D) e também relacionado ao tecido conectivo (fig 2.5 B-D).

A figura 2.6 mostra a imagem dos cortes transversais dos nervos regenerados dos grupos experimentais (fig. 2.6 B, C, D) e normal (fig 2.6 A) após imunomarcção com anti-neurofilamento evidenciando o axônio em verde e o anticorpo S-100 marcando a glia em vermelho. Como esperado, as diferenças entre o normal e os grupos lesionados foram evidentes. Por outro lado, em comparação entre os grupos dos nervos regenerados tratados e não tratados, não foram observadas diferenças entre eles, tanto nos seus axônios, quanto na glia.

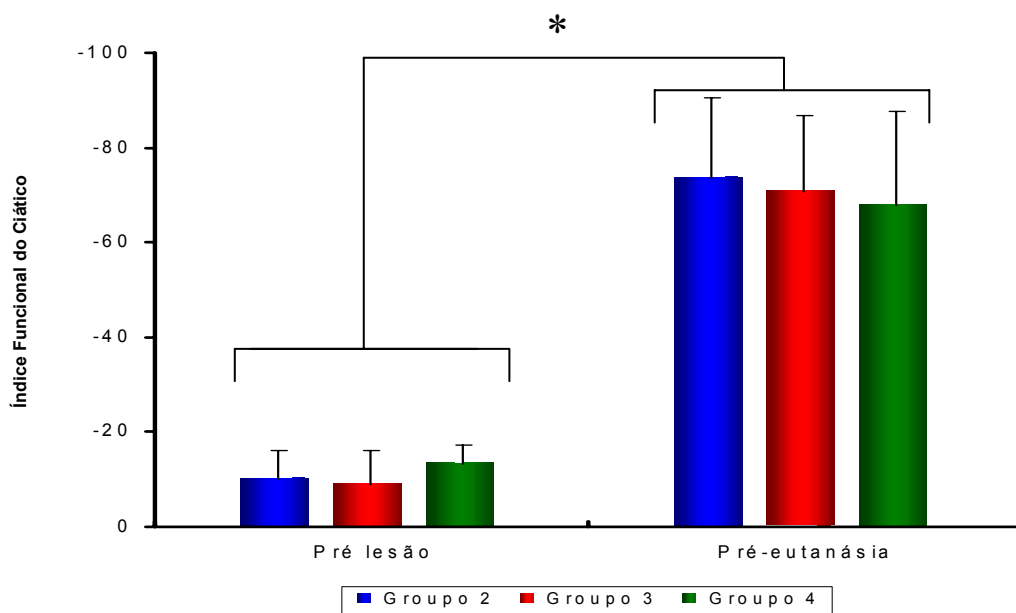


Figura 2.1. Resultados da avaliação do índice funcional do n.ciático. A avaliação do cálculo do índice funcional do ciático mostrou um déficit dos 3 grupos experimentais. Grupo 2: 1º semana de laserterapia; Grupo 3: 2º semana de laserterapia; Grupo 4: não tratado-simulado. Na pré-lesão a função estava normal -20 para todos os grupos, na 1º semana após lesão o valor desceu para -80 e não demonstraram diferenças estatísticas entre eles ($p > 0,05$). Até a segunda semana os grupos tratados e o simulado continuaram próximos á -100. (*) Apresenta diferença estatística.

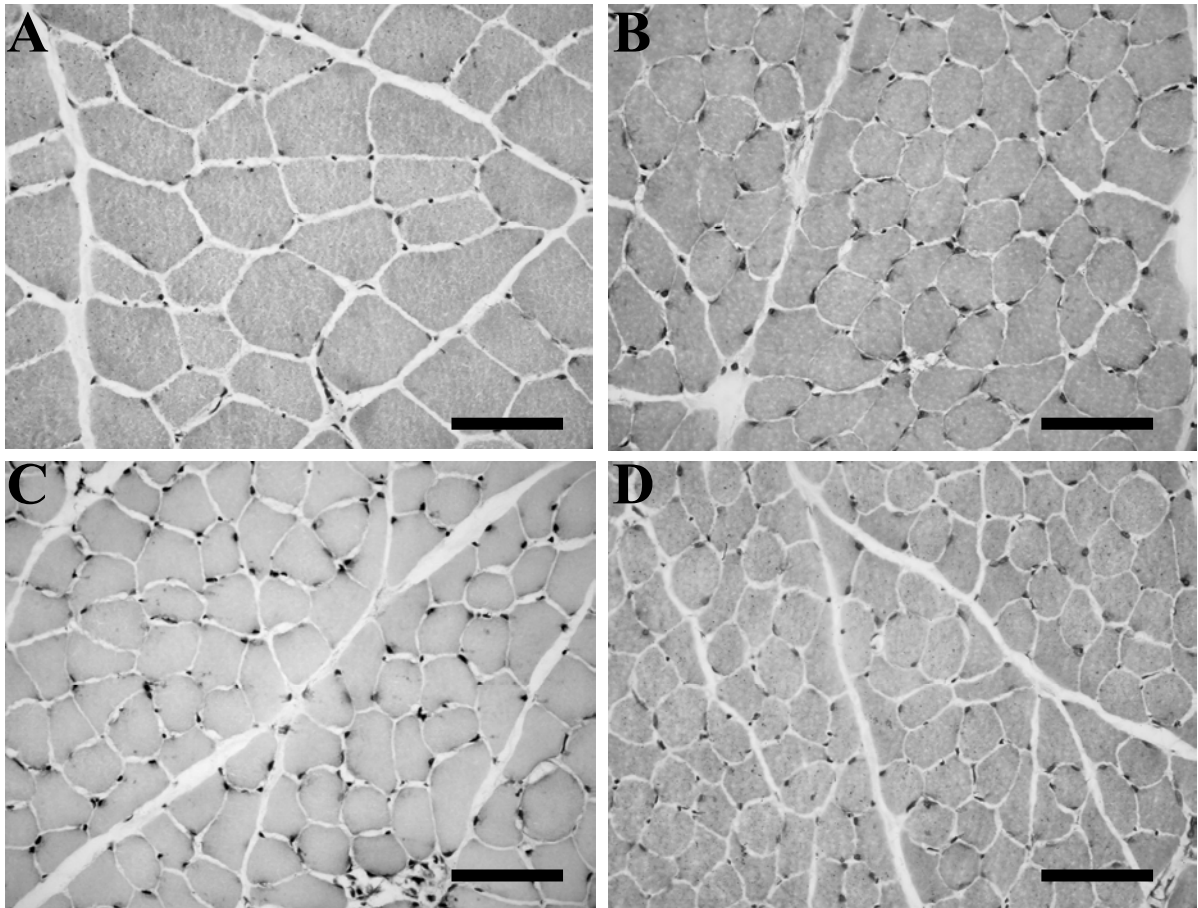


Figura 2.2. Corte histológico após a coloração do corte transversal do músculo tibial anterior com azul de toluidina. A) Grupo 1: músculo normal; B) Grupo 2: 1^o semana de laserterapia; C) Grupo 3: 2^o semana de laserterapia; D) Grupo 4: não tratado-simulado. Escala da barra = 40 μ m. Os grupos desnervados não apresentaram diferença de diâmetro entre eles, mas todos os grupos lesionados foram diferentes em comparação com o grupo normal.

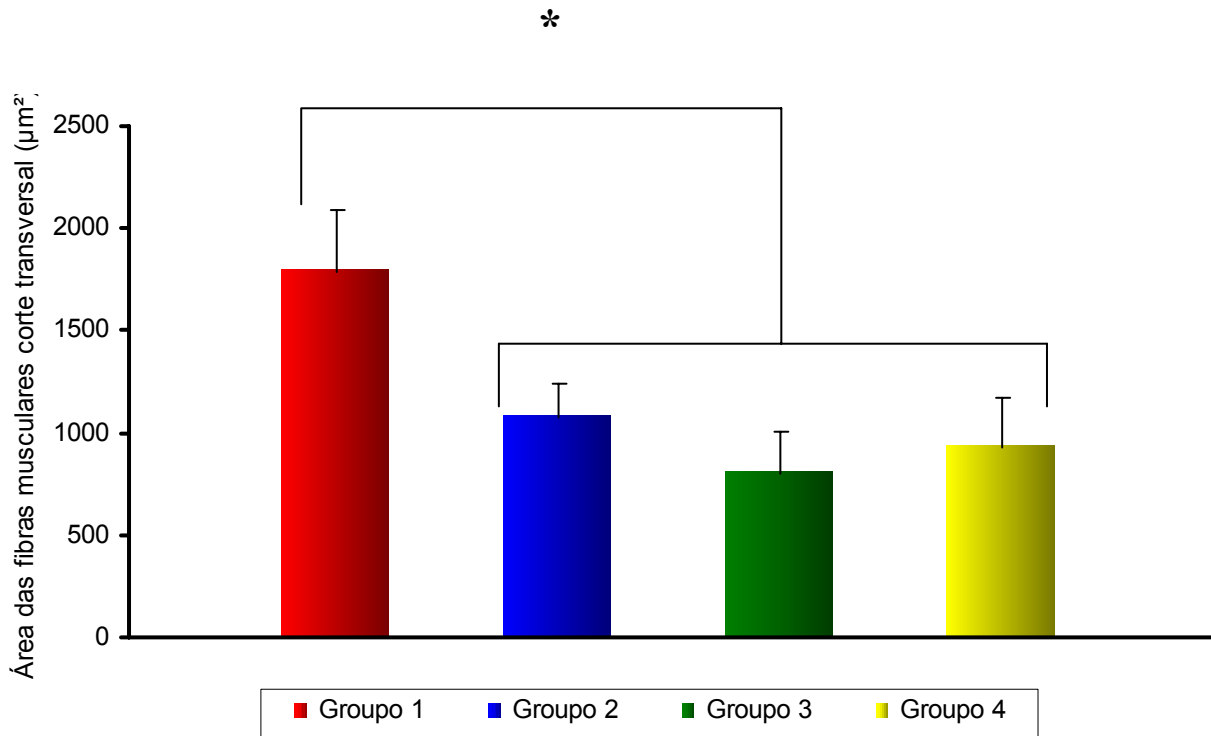


Figura 2.3. Média das áreas das fibras musculares do músculo tibial anterior em corte transversal. Grupo 1: músculo normal; Grupo 2: 1º semana de laserterapia; Grupo 3: 2º semana de laserterapia; Grupo 4: não tratado-simulado. Os grupos desnervados não apresentaram diferenças estatísticas ($p > 0,05$) de diâmetro entre eles, mas todos os grupos desnervados tiveram diferença estatística quando foram comparados com o grupo normal ($p < 0,05$). (*) Apresenta diferença estatística.

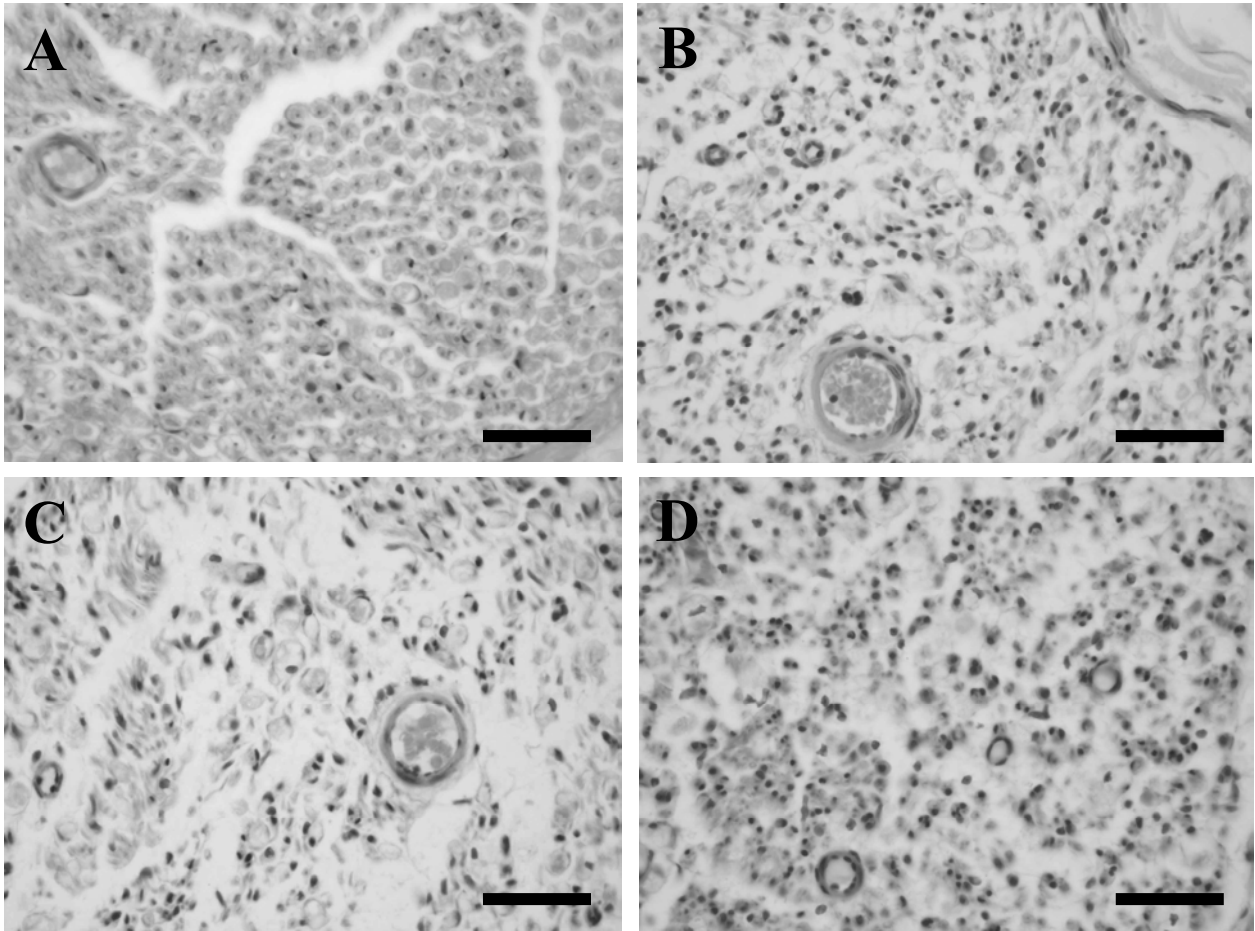


Figura 2.4. Corte transversal do nervo ciático corado com hematoxilina e eosina. A) Grupo 1: nervo normal; B) Grupo 2: 1^o semana de laserterapia; C) Grupo 3: 2^o semana de laserterapia; D) Grupo 4: não tratado-simulado. Escala da barra = 50 μ m. Os grupos lesionados não apresentaram diferenças morfológicas de diâmetro dos axônios e estrutura entre eles, mas todos os grupos lesionados foram diferentes quando comparados ao grupo normal.

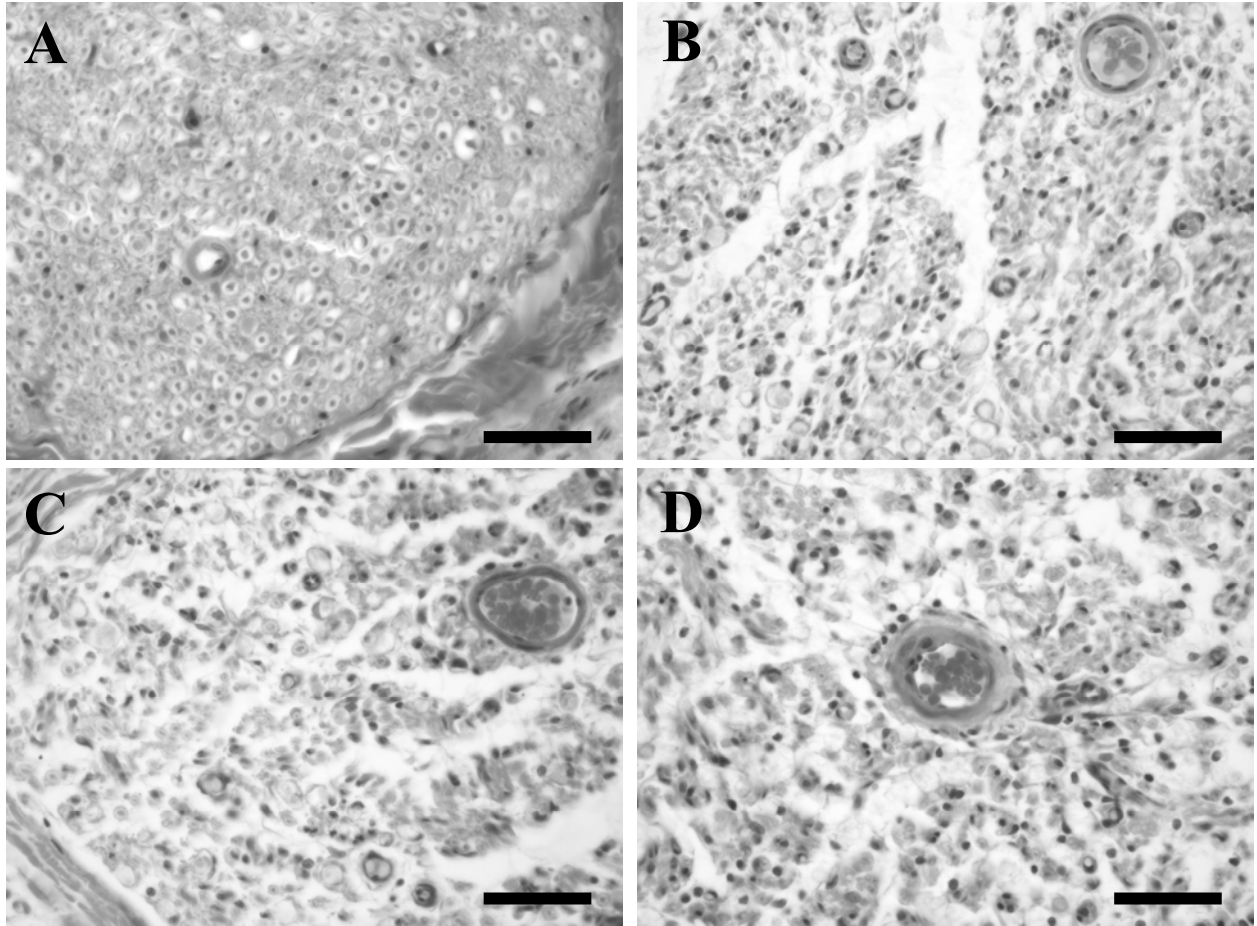


Figura 2.5. Corte transversal do nervo ciático corado com Papanicolau. A) Grupo 1: nervo normal; B) Grupo 2: 1^o semana de laserterapia; C) Grupo 3: 2^o semana de laserterapia; D) Grupo 4: não tratado-simulado. Escala da barra = 50 μm . Os grupos lesionados não apresentaram diferenças morfológicas de diâmetro e estrutura entre eles, mas todos os grupos lesionados foram diferentes em relação ao grupo normal.

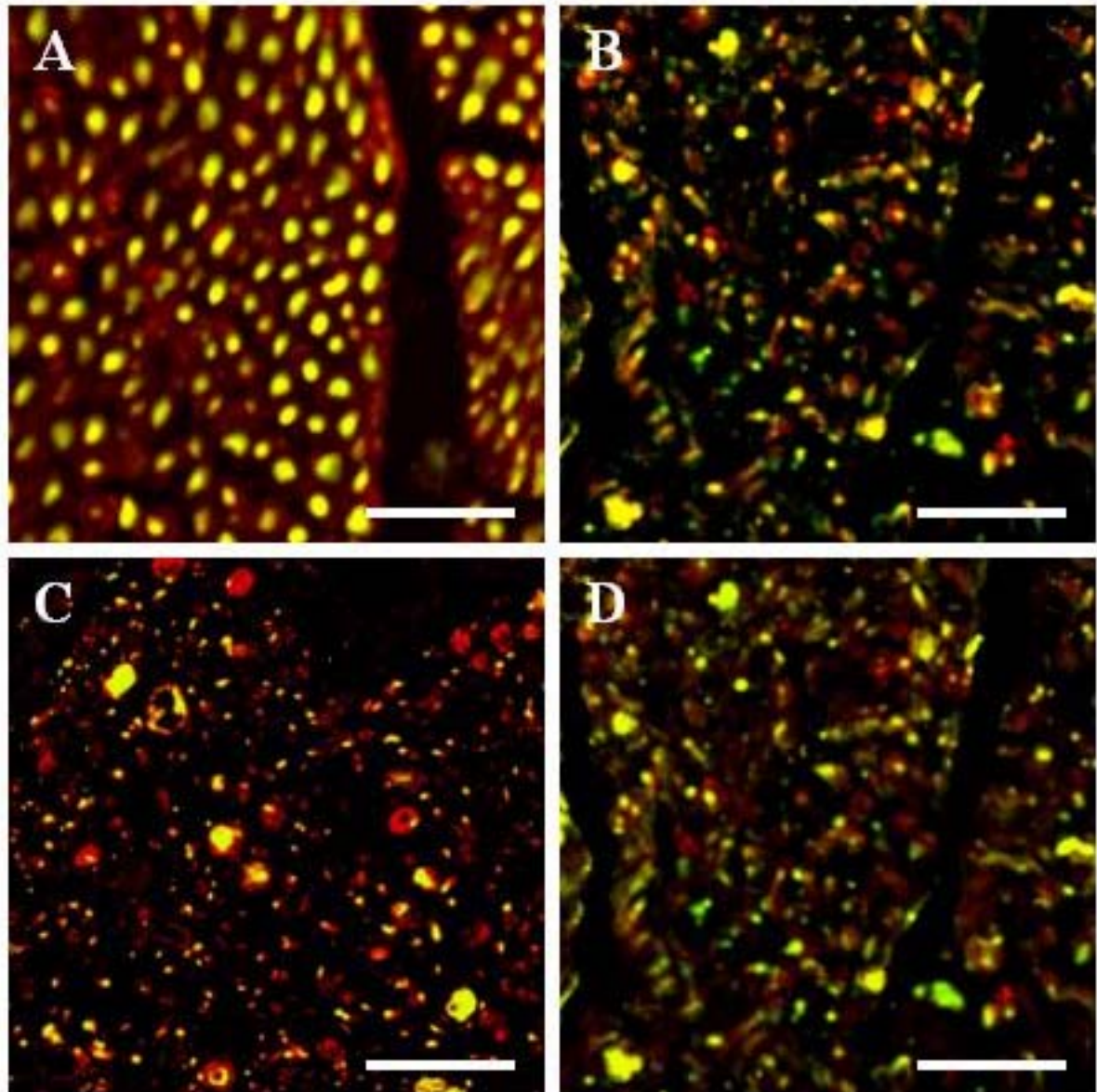


Figura 1.6. Imagem da microscopia confocal das fibras nervosas após a imunoreação com anticorpos anti neurofilamento – 200 KD (verde) e Anti-S 100 (vermelho). A) Grupo 1: nervo normal; B) Grupo 2: 1º semana de laserterapia; C) Grupo 3: 2º semana de laserterapia; D) Grupo 4: não tratado-simulado. Escala da barra = 50 μ m. Os grupos lesionados não apresentaram diferenças morfológicas estruturais entre eles, mas os grupos dos nervos lesionados tiveram diferença com o grupo normal.

2.2.4. DISCUSSÃO

Vários estudos experimentais mostraram que a laserterapia exerce um efeito estimulante na regeneração nervosa pós-traumática (GIGO-BENATO, GEUNA & ROCHKIND, 2005; ANDERS et al., 2004). Os mecanismos pelos quais a laserterapia interage com estruturas biológicas especialmente em tecido nervoso, até agora, não são muito bem compreendidos (GIGO-BENATO, GEUNA & ROCHKIND, 2005). Dentre as diferentes hipóteses sobre a ação do laser na regeneração nervo, nosso ponto de vista é que a laserterapia seja capaz de acelerar a regeneração das fibras nervosas durante as fases iniciais de regeneração, 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 & BAR, 1993). Para investigar essa hipótese, nós utilizamos neste estudo os efeitos precoces da laserterapia na recuperação do nervo ciático após aplicação padronizada da lesão por esmagamento do nervo ciático do rato (BEER, STEURER & MEYER, 2001; VAREJÃO et al., 2004). Porém nossos resultados, falharam em detectar diferenças em cada um dos parâmetros investigados, sugerindo que a bioestimulação pelo laser não exerceu nenhum efeito sob a recuperação do nervo ciático ao longo das 2 primeiras semanas após a lesão.

Embora a irradiação pelo laser pareça não acelerar no período inicial da recuperação das fibras nervosas, assim como modificar a perda da função do nervo, não é possível excluir a idéia que o laser exerça uma ação neuro-protetora, principalmente durante estágios pós-traumáticos iniciais, os quais seus benefícios são observados nos estágios tardios da regeneração. Para demonstrar essa ação neuroprotetora, um estudo no cérebro do rato mostrou que a laserterapia regulou a expressão de agentes neuroprotetores do fator de crescimento transformador β 1 (TGF- β 1) (LEUNG et al., 2002).

Ao interpretar os resultados deste estudo, é necessário levar em consideração diferentes variáveis utilizadas que influenciaram na capacidade de regeneração tecidual, por exemplo, no caso do uso de um protocolo ineficiente para estimulação, relacionado em particular com o comprimento de onda, densidade de energia e tempo de irradiação. Com relação ao comprimento de onda, na maioria dos estudos conhecidos até hoje, foi utilizado comprimento de onda visível HeNe 632,8 nm (ROCHKIND et al., 1987; HAMILTON, ROBINSON & RAY, 1992; ANDERS et al., 1993). Já em outras recentes evidências experimentais, foi demonstrado que a irradiação próxima ao infravermelho (SHAMIR et al., 2001; MILORO et al., 2002; GIGO-BENATO et al., 2004) foi efetiva. A ausência dos efeitos do laser na faixa do infravermelho (830 nm) provavelmente possa ser imputável à aplicação de um comprimento de onda não eficiente.

Densidade de energia (dose ou fluência) é um outro parâmetro que está fortemente envolvido com a efetividade da laserterapia. Ela é usualmente variável entre 4 e 10 J/cm² como as mais efetivas para a promoção de regeneração tecidual (TURNER & HODE, 2003). Entretanto, para os nervos periféricos, assim como para o sistema nervoso central, até agora a maioria dos estudos sugerem que as doses mais efetivas são as mais altas (ANDERS et al., 2004; BYRNES et al., 2005; GIGO-BENATO et al., 2005) e para ir de acordo com tais indicações, no presente estudo foi utilizado uma dose de 40 J/cm². Parece ser improvável que a ausência de efeitos da irradiação esteja relacionado com uma dose inapropriada.

Finalmente o outro importante parâmetro que influenciou nos efeitos da laserterapia foi o tempo de irradiação (TURNER & HODE, 2003). De fato, a mesma dose pode ser conseguida ao se administrar uma potência de irradiação relativamente alta (centenas de mW) por um curto período de tempo (segundos), ou uma potência menor por um período de tempo maior. Embora a atenção dos pesquisadores ainda não se focalizou sobre esse item, é esperado que a mesma dose concentrada num breve período de tempo ou distribuída num período mais longo, possa interagir diferentemente com o tecido alvo (TURNER & HODE, 2003). Com relação à irradiação nos

nervos periféricos, a análise da literatura mostra que existe grande variação nos tempos de tratamento, os quais variam de menos de um minuto (GIGO-BENATO et al., 2004) á 90 minutos (ANDERS et al., 1993). Neste estudo foi concentrado a dose total ao longo de um relativo curto período de tempo (19 segundos), o qual representa um tempo menor em comparação à estudos prévios. Isto pode ser um dos motivos pelo qual esse protocolo não teve efeito positivo na regeneração nervosa periférica. Pode ser que o aparelho e o tipo do protocolo de irradiação do laser usado neste estudo possa ter sido inapropriado, pois não exerceu efeitos biológicos e nenhuma alteração na massa corpórea dos animais, discordando dos estudos anteriores que mostraram que o laser exerce efeitos sistêmicos, incluindo aumento significativo da massa corpórea dos animais (OLIVEIRA, PARIZOTTO & SALVINI, 1999). Essas considerações sugerem que o tempo de aplicação seja um item que mereça mais atenção dos pesquisadores futuramente.

Uma explicação alternativa para reforçar a razão da ausência de qualquer efeito significativo da estimulação pelo laser sobre a recuperação nervosa nos estágios iniciais pós-lesão, pode estar relacionado ao uso do modelo experimental da lesão de esmagamento do nervo ciático para a investigação comparativa de mudanças precoces na regeneração nervosa após a irradiação. Na verdade, os resultados de diferentes estudos experimentais sobre regeneração nervosa devem ser comparados com cautela, devido às dificuldades de reprodução padronizada de uma lesão por esmagamento do nervo (VAREJÃO et al., 2004). Para evitar esse problema, neste estudo foi utilizado um instrumento específico para a indução reproduzível da lesão do nervo ciático do rato recentemente publicado (BEER, STEURER & MEYER, 2001) e padronizado (VAREJÃO et al., 2004). Entretanto, se até mesmo com os resultados reproduzíveis, a regeneração nervosa após a lesão por esmagamento apresenta uma recuperação muito rápida sem qualquer tipo de tratamento, por exemplo, na quarta semana após lesão por esmagamento ocorre cerca de 80% recuperação da função sem nenhuma intervenção terapêutica

(VAREJÃO et al., 2004), isto pode ocultar o potencial de efetividade do protocolo de tratamento proposto. Portanto, pode-se sugerir que o modelo de esmagamento do nervo é um bom modelo de investigação da regeneração nervosa para avaliar efeitos precoces inibitórios de qualquer condição clínica, mas não é o mais indicado para observar efeitos de tratamento de estimulação. Com o interesse de observar os efeitos iniciais da laserterapia após a lesão de axoniotmese no presente estudo foi estudado apenas as duas primeiras semanas após a lesão de esmagamento e neste período, não foram encontradas diferenças morfológicas, nem funcionais entre os grupos tratados e não tratado. Contudo, os efeitos da laserterapia não podem ser totalmente descartados, uma análise molecular seria importante para verificar alterações mais sensíveis e que possivelmente não foram percebidas com as análises empregadas no presente estudo. Deste modo, sugerimos que futuros estudos avaliem a resposta molecular dos tecidos envolvidos na regeneração do nervo após axoniotmese.

Paralelamente aos resultados do presente estudo, chamam a atenção para a necessidade de mais pesquisas sobre os efeitos da laserterapia na regeneração nervosa periférica objetivando uma definição mais clara sobre a parametrização e protocolos de irradiação do laser que sejam mais efetivos na promoção da recuperação nervosa pós-traumática.

2.2.5. BIBLIOGRAFIA

ANDERS JJ, BORKE RC, WOOLERY SK, VAN DE MERWE WP. Low Power Laser Irradiation Alters the Rate of Regeneration of the Rat Facial Nerve. **Lasers Surg Med.** 13:72-82, 1993.

ANDERS JJ, GEUNA S, ROCHKIND S. Phototherapy Promotes Regeneration and Functional Recovery of Injured Peripheral Nerve. **Neurol Res.** 26:233-239, 2004.

BAIN JR, MACKINNON SE, HUNTER DA. Functional Evaluation of Complete Sciatic, Peroneal, and Posterior Tibial Nerve Lesions in the Rat. **Plast Reconstr Surg** 83:129-138, 1989.

BEER GM, STEURER J, MEYER VE. Standardizing Nerve Crushes with a Non-Serrated Clamp. **J Reconstr Microsurg** .17:531-534, 2001.

BYRNES KR, WAYNANT RW, ILEV IK, WU X, BARNA L, SMITH K, HECKERT R, GERST H, ANDERS JJ. Light Promotes Regeneration and Functional Recovery and Alters the Immune Response after Spinal Cord Injury. **Lasers Surg Med.** 36:171-85, 2005.

EHRLICHER A, BETZ T, STUHRMANN B, KOCH D, MILNER V, RAIZEN MG, KAS J. Guiding Neuronal Growth with Light. **Proc Natl Acad Sci USA.** 99:16024-16028, 2002.

EVANS G R. Challenges to Nerve Regeneration. **Semin Surg Oncol.** 19:312-318, 2000.

GIGO-BENATO D, GEUNA S, DE CASTRO RODRIGUES A, TOS P, FORNARO M, BOUX E, BATTISTON B, GIACOBINI-ROBECCHI MG. Low-Power Laser Biostimulation Enhances Nerve Repair after End-To-Side Neuroorrhaphy: A Double-Blind Randomized Study in the Rat Median Nerve Model. **Lasers Med Sci.** 19:57-65, 2004.

GIGO-BENATO D, GEUNA S, ROCHKIND S. Phototherapy for Enhancing Peripheral Nerve Repair: A Review of the Literature. **Muscle Nerve** 31:694-701, 2005.

GOLD BG, UDINA E, BOURDETTE D, NAVARRO X Neuroregenerative and Neuroprotective Actions of Neuroimmunophilin Compounds in Traumatic and Inflammatory Neuropathies. **Neurol Res.** 26:371-380, 2004.

GUDEMEZ E, OZER K, CUNNINGHAM B, SIEMIONOW K, BROWNE E, SIEMIONOW M. Dehydroepiandrosterone As an Enhancer of Functional Recovery Following Crush Injury to Rat Sciatic Nerve. **Microsurgery.**22:234-241, 2002.

HAMILTON GF, KEVEN ROBINSON T, RAY RH. The Effects of Helium-Neon Laser Upon Regeneration of the Crushed Peroneal Nerve. **J Orthop Sports Phys Therapy.** 15:209-214, 1992.

LAZAR DA, CURRA FP, MOHR B, MCNUTT LD, KLIOT M, MOURAD PD. Acceleration of Recovery after Injury to the Peripheral Nervous System Using Ultrasound and other Therapeutic Modalities. **Neurosurg Clin N Am.**12:353-357, 2001.

LEUNG MC, LO SC, SIU FK, SO KF. Treatment of Experimentally Induced Transient Cerebral Ischemia with Low Energy Laser Inhibits Nitric Oxide Synthase Activity and Up-Regulates the Expression of Transforming Growth Factor-Beta1. **Las Surg Med.** 31:283-288, 2002.

LUNDBORG G. Enhancing post-traumatic Nerve Regeneration. **J Peripher Nerv Syst** 7:139-140, 2002.

LUNDBORG G. **Nerve Injury And Repair**, 2nd Edition, Churchill Livingstone Edinburgh, 2005.

MILORO M, HALKIAS LE, MALLERY S, TRAVERS S, RASHID RG. Low-Level Laser Effect on Neural Regeneration in Gore-Tex Tubes. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**93:27-34, 2002.

OLIVEIRA NM, PARIZOTTO NA, SALVINI TF. GaAs (904-nm) Laser Radiation Does Not Affect Muscle Regeneration in Mouse Skeletal Muscle. **Lasers Surg Med.** 25:13-21, 1999.

ROCHKIND S, NISSAN M, BARR-NEA L, RAZON N, SCHWARTZ M, BARTAL A. Response of Peripheral Nerve to He-Ne Laser: Experimental Studies. **Lasers Surg Med.** 7:441-443, 1987.

ROCHKIND S, OUAKNINE GE. New Trend in Neuroscience: Low-Power Laser Effect on Peripheral and Central Nervous System (Basic Science, Preclinical and Clinical Studies). **Neurol Res.** 14:2-11, 1992.

ROGÉRIO F, TEIXEIRA S A, REZENDE A C S, COFIÑO de SÁ R, QUEIROZ L S, NUCCI G, MUSCARÁ M, LANGONE F. Superoxide Dismutase Isoform 1 and 2 in Lumbar Spinal Cord of Neonatal Rats After Sciatic Nerve Transection and Melatonin Treatment. **Developmental Brain Research**, 2005

SAMII M, CARVALHO GA, NIKKHAH G, PENKERT G. Surgical Reconstruction of the Musculocutaneous Nerve in Traumatic Brachial Plexus Injuries. **J Neurosurg.**87:881-886, 1997.

SAPER CB, SAWCHENKO PE. Magic Peptides, Magic Antibodies: Guidelines for Appropriate Controls for Immunohistochemistry. **J Comp Neurol.** 465:161-163, 2003.

SARIKCIOGLU L, OGUZ N. Exercise Training and Axonal Regeneration after Sciatic Nerve Injury. **Int J Neurosci.** 109:173-177, 2001.

SHAMIR MH, 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. **J Reconstr Microsurg.**17:133-137, 2001.

TUNER J, HODE L. **Laser Therapy - Clinical Practice and Scientific Background**, Prima Books Grängesberg , 2003.

VAN BREUGEL HH, BAR PR. He-Ne Laser Irradiation Affects Proliferation of Cultured Rat Schwann Cells in a Dose-Dependent Manner. **J Neurocytol.** 22:185-190,1993.

VAREJÃO AS, CABRITA AM, MEEK MF, BULAS-CRUZ J, MELO-PINTO P, RAIMONDO S, GEUNA S, GIACOBINI-ROBECCHI MG. Functional and Morphological Assessment of a Standardized Rat Sciatic Nerve Crush Injury with a Non-Serrated Clamp. **J Neurotrauma**. 21:1652-1670, 2004.

WOLLMAN Y, ROCHKIND S, SIMANTOV R. Low Power Laser Irradiation Enhances Migration and Neurite Sprouting of Cultured Rat Embryonic Brain Cells. **Neurol Res**. 18:467-470, 1996.

PARTE II

ARTIGO: 3

ELETROESTIMULAÇÃO DIFÍCULTA A RECUPERAÇÃO PRECOCE DO NERVO CIÁTICO DO RATO APÓS LESÃO POR ESMAGAMENTO

RESUMO:

A recuperação neuromuscular após lesão nervosa periférica depende da regeneração dos axônios lesionados os quais restabelecem suas funções de conexão com o músculo desnervado. No modelo experimental de esmagamento do nervo ciático do rato, a regeneração do axônio é muito rápida e a recuperação funcional começa a ser detectada através do teste de caminhada na pista (*walking track*) logo após a primeira semana pós-lesão. Esse modelo experimental foi usado para investigar os efeitos precoces da estimulação elétrica na recuperação neuromuscular. No presente estudo a eletroestimulação foi “guiada” pelo eletrodiagnóstico do músculo tibial anterior após a lesão no nervo ciático do rato. Um total de cinco sessões de eletroestimulação foram administradas em dias alternados, iniciado no terceiro dia após a lesão até o final do experimento (14 dias). A recuperação funcional foi determinada pela análise do teste de caminhada na pista no 7º e 14º dia e o índice funcional do ciático foi calculado. Os músculos tibiais anteriores foram pesados e analisados morfometricamente. O nervo ciático foi analisado no microscópio de luz e confocal. Os resultados não mostraram diferenças estatísticas significativas na massa dos músculos e diâmetro das fibras musculares entre os animais tratados e não tratados. Também, na análise de microscopia de luz e confocal dos nervos regenerados relacionados com os músculos eletroestimulados, não houve diferenças morfológicas. Por outro lado, os testes funcionais, cujos resultados demonstraram uma recuperação funcional no 14º dia após lesão, foram significativamente menores nos ratos eletroestimulados quando comparados aos animais não tratados. Os resultados do presente estudo sugerem que, diferente da estimulação elétrica direta do nervo, a eletroestimulação muscular nas fases precoces após o trauma devem ser usadas com cuidado, uma vez que poderá inibir a recuperação neuromuscular funcional.

Palavras chaves: Eletroterapia, Regeneração Nervosa Periférica, Nervo Ciático, Índice Funcional do Ciático, Lesão por Esmagamento, Análise da Marcha em Pista, *Walking Track Analysis*.

4.1. INTRODUÇÃO

As lesões nervosas representam um alto custo para a sociedade (EVANS, 2001). Em vários casos de lesão do nervo ocorrem traumas e varia desde uma simples compressão de fibras nervosas a uma completa transecção (SUNDERLAND, 1978, 1991). Quando a continuidade da fibra nervosa é interrompida ocorre um dano no coto distal que é classificada por uma série de mudanças teciduais denominada degeneração walleriana (LUNDBORG, 2005). O coto proximal do axônio é capaz de regenerar ao longo do trato distal da lesão, alcançando o alvo na periferia (fibras musculares e receptores sensoriais) direcionando a recuperação da função perdida (LUNDBORG, 2005). Entretanto, o grau de recuperação pode ser elevadamente variável (SAMII et al., 1997; LUNDBORG, 2002) e deste modo é importante buscar protocolos fisioterapêuticos efetivos pós-traumático e pós- cirúrgicos para melhorar o grau final da recuperação em pacientes que sofreram uma lesão nervosa periférica (EVANS, 2000; LUNDBORG, 2002). Uma das técnicas terapêuticas com o propósito de melhorar a recuperação pós-traumática neuromuscular é a eletroestimulação, aplicada tanto no nervo (BRUSHART et al., 2002; 2005) quanto no músculo desnervado (MARQUESTE et al., 2002; 2004). A respeito desses últimos estudos experimentais, eles contribuiriam até o presente momento, na produção de resultados contraditórios. Enquanto alguns autores mostram que a eletroestimulação no músculo aumenta a regeneração nervosa (MCDEVITT, FORTNER & POMERANZ, 1987; KERNS & LUCCHINETTI, 1992; CHENG & LIN, 2004; MARQUESTE et al., 2002, 2004), outros não encontraram diferenças na regeneração entre os grupos tratados e não tratados (MCGINNIS & MURPHY, 1992).

Para aprofundar mais sobre esses resultados, o presente estudo teve o objetivo de investigar os efeitos precoces sob aspectos funcionais e morfológicos das mudanças induzidas pela eletroestimulação no músculo, guiado pelo eletrodiagnóstico, após a lesão padronizada por esmagamento no nervo ciático do rato (VAREJÃO et al., 2004). Esse tipo de lesão é

caracterizado pela recuperação funcional, detectável pela análise funcional da marcha em pista já na segunda semana do pós-trauma e, deste modo, é particularmente indicado para investigar a recuperação precoce do nervo.

4.2. Materiais e Métodos

Ratos albinos (*Rattus norvegicus*) do tipo Wistar foram utilizados nesse estudo em número de 18. Uma boa prática laboratorial animal foi observada de acordo com os padrões internacionais e nacionais para experimentação animal e aprovados pelo comitê de ética e de cuidados animais da Universidade Federal de São Carlos. Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal com solução contendo Ketamina (95 mg/kg) e Xilasina (12 mg/Kg). A pele foi tricotomizada e foi realizada a assepsia com solução de iodo 10% (povidine). Uma incisão de 2 cm foi feita na pele sobre o terço médio da coxa, até a exposição do nervo ciático direito. Para pinçar o nervo foi utilizado uma pinça não serrilhada, com força padronizada de 54 N (BEER, STEURER & MEYER, 2001) pressionada por 30 segundos, para criar uma lesão de 3 milímetros de extensão. Essa lesão foi feita 10 mm acima da bifurcação do nervo ciático direito a fim de obter uma boa reprodução da lesão de axoniotmese (VAREJÃO et al., 2004). O diâmetro inicial normal do nervo ciático é de 1 mm, durante o achatamento do nervo o diâmetro passou para 2mm, resultando uma pressão de 9 mPa. Os nervos ficaram hidratados em solução estéril 37° C de soro fisiológico ao longo da intervenção cirúrgica. Após a cirurgia os animais foram colocados isoladamente em gaiolas e alimentados com comida e água *ad libitum*. Por quatro dias foi adicionado à água o Paracetamol (13,5 mg/100 ml) para a redução da dor.

O grupo tratado recebeu cinco sessões de eletroestimulação por corrente farádica guiado pelo eletrodiagnóstico, administrado a cada dia do tratamento, iniciado no 3° dia pós-lesão até o último dia do experimento (14). Sob anestesia, a pele da região lombar e do tibial anterior foi tricotomizada e limpa. Um eletrodo de 3 cm de diâmetro de forma arredondada foi colocado na região lombar e outro eletrodo foi colocado no músculo tibial anterior. Antes da eletroestimulação, o eletrodiagnóstico foi empregado para determinar a cronaxia de cada músculo. A estimulação elétrica com corrente farádica foi empregada por meio de bases obtidas de dados de acordo com a cronaxia: (a) quando a cronaxia era menor que 1 milissegundo (<1ms),

foi usado uma corrente com duração do pulso (T) por 1 ms e intervalo do pulso (R) de 20 ms; (b) quando a cronaxia era maior que 1 ms (>1ms), foi utilizado uma corrente com T com o dobro do valor da cronaxia e R de 50 ms. Em ambos os protocolos de tratamento, 20 contrações musculares de 3 s de duração (separado por 6 s de repouso) foram aplicadas a cada músculo, produzindo sempre uma dorsiflexão máxima do tornozelo.

A avaliação da recuperação nervosa foi calculada pelo índice funcional do ciático (SFI) que foi descrito por Bain, Mackinnon & Hunter (1989). Os animais foram treinados a caminhar em um corredor que mede 42 cm de comprimento e 8.2 cm de largura e com uma caixa escura ao fundo do corredor. Um papel branco foi colocado cobrindo o assoalho do corredor para que o rato pudesse caminhar sobre ele. As patas posteriores dos ratos foram pressionadas sobre uma plataforma lisa encharcada de tinta de impressão digital, assim as impressões destas patas traseiras puderam ser marcadas no papel quando o rato realizava a travessia ao longo do corredor.

Três medidas foram obtidas a partir das impressões destas patas (1) PL= impressão do comprimento, ou seja, a distância do 3º dedo ao calcâneo; (2) TS = afastamento dos dedos, ou seja: a distância do 1º ao 5º dedo; (3) ITS = afastamento intermediário dos dedos, ou seja, distância do 2º ao 4º dedo. Após todas as medidas serem feitas tanto na pata experimental (E) quanto na normal (N) o índice funcional do ciático foi calculado de acordo com a equação proposta por Bain, Mackinnon & Hunter. (1989):

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

Após 14 dias os animais foram submetidos à eutanásia e tanto o nervo ciático quanto o músculo tibial anterior foram cuidadosamente dissecados, evitando lesões mecânicas. Para obter

uma primeira indicação sobre as variações tróficas do músculo, os mesmos foram imediatamente pesados ainda úmidos com uma balança de precisão (Denner Instruments, Denver, CO, USA).

Os músculos tibiais anteriores foram congelados em isopentano previamente resfriado em nitrogênio líquido. As amostras de músculo dissecadas foram armazenadas em tubos plásticos e estocados no freezer a -80°C . Foram feitos cortes histológicos seriados ($10\mu\text{m}$) com o criostato (Mícron HM 505 E, Walldorf, Alemanha) no 1/3 médio do ventre do músculo tibial anterior transversalmente ao eixo principal das fibras. Os cortes foram corados com Azul de Toluidina para a análise morfológica e foram analisados em microscópio de luz (Axioplan 2, Carl Zeiss, Jena, Alemanha). Para a morfometria da fibra muscular, 200 fibras foram aleatoriamente selecionadas e mensuradas em um corte transversal no 1/3 médio do ventre do musculo tibial anterior (TA). Um procedimento as cegas foi usado para a definição do local a ser analisado.

O nervo ciático foi fixado em formol a 10% por 3 horas e lavado em solução salina tamponada com fosfato (PBS). As amostras foram desidratadas, incluídas em parafina de tal forma a ficar perpendicular ao eixo principal do nervo e após a inclusão, foram cortados em $7\mu\text{m}$. Para análise de microscopia de luz, os cortes dos nervos foram corados com Hematoxilina-Eosina e Papanicolau, para serem observados ao microscópio Leica (DM 400) equipado com uma câmera digital Leica (DFC 320).

Para análise imunoistoquímica ao microscópio confocal a laser, os cortes ficaram em encubação por uma noite em solução contendo anti-neurofilamento (a-NF)-200 KD (anticorpo monoclonal feito em camundongo, com lócus de reconhecimento para a subunidade de neurofilamento 200 KD do porco, na diluição 1:200, Sigma, St. Louis, MO, USA). Após lavagem em PBS, os cortes foram levados para encubação por uma hora contendo um anticorpo secundário: Alexa-Fluor-488-conjugado IgG (cabra, anti-camundongo, diluição 1:200, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). Os cortes foram montados e analisados ao microscópio confocal a laser LSM 510 (Zeiss, Jena, Alemanha). As imagens obtidas no sistema

confocal para imunofluorescência foram capturadas a 20x com objetiva Plan-NEOFLUAR com abertura numérica (NA) 0.50 e uma a 40x com objetiva Plan-NEOFLUAR com (NA) 0.75. Um zoom eletrônico com uma magnitude de 1 à 8 foi empregado para obter as ampliações indicadas nas figuras. Para a visualização fluorescente da Alexa-Fluor-488 utilizamos uma excitação da linha do laser de Argônio (488 nm) e uma emissão que passa através de filtros passa-banda que deixa passar o comprimento de onda de 505nm a 530 nm.

Todos os dados numéricos foram submetidos à análise estatística feita pelo teste de análise de variância (RM-ANOVA) de medidas repetidas de uma via (*one-way*). Na presença de diferenças significativas, foi utilizado o teste *post-hoc* de *Student-Neuman-Keuls* (SNK) de múltiplas comparações pareadas para detecção das diferenças específicas. A significância estatística foi estabelecida em $p < 0.05$.

4.3. RESULTADOS

A figura 2.1 mostra a avaliação funcional da recuperação do nervo ciático após trauma. A análise estatística mostra diferença do índice funcional do ciático entre pré-lesão (marcha normal) e ambos os grupos lesionados, sendo que houve diferença estatística significativa ($p < 0.05$) em ambos os grupos experimentais. A comparação estatística entre os dois grupos experimentais não foi significativa ($p > 0.05$) entre a linha de base na avaliação pré-lesão e avaliação feita ao 7º dia após o esmagamento (valores de índice funcional do ciático em torno de -90 indicam completa ausência da função nervosa). Ao contrário, não houve uma diferença estatística significativa ($p < 0.05$) entre os animais tratados e não tratados no 14º dia pós lesão, enquanto os animais do grupo controle (não tratados) mostraram, como esperado, um início de recuperação funcional medida pelo índice funcional do ciático de -67.4 ± 16.5 , o que foi significativamente ($p < 0.05$) diferente do 7º dia. Ainda os animais eletroestimulados apresentaram uma média do índice funcional do ciático de -88.9 ± 1.31 , o qual não foi diferente significativamente ($p < 0.05$) do 7º dia, demonstrando deste modo, a persistência da debilidade da função do nervo ciático no grupo eletroestimulado.

Na figura 2.2 pode-se comparar a morfologia microscópica dos músculos tibiais anteriores normais (A), não tratados (B) e tratados (C). A atrofia nas fibras musculares foi evidente nos dois grupos lesionados (B C).

Na figura 2.3 que trás as imagens de microscopia de luz (figuras 2.3 A, C, E) e confocal a laser (figura 2.3 B, D, F) do nervo normal (figura 2.3 A, B), não tratado (C, D) e tratado (E, F). Como era esperado, foi encontrada diferença evidente entre os nervos normais e lesionados. Por outro lado, a comparação entre o grupo tratado e não tratado não demonstrou nenhuma diferença tanto em relação a organização histológica do nervo (figura 2.3 C, E), quanto a morfologia dos axônios regenerados, que foram marcados por meio do anti-meurofilamento 200 KD (figura 2.2 D, F).

A Figura 2.4 mostra os resultados quantitativos da avaliação da massa muscular e a figura 2.5 mostra os resultados quantitativos (morfometria) por meio da avaliação do diâmetro das fibras musculares cortadas transversalmente. A diferença entre o grupo normal e os grupos experimentais foi significativa ($p < 0.05$), confirmando a ocorrência da atrofia muscular devido a desnervação. Por outro lado, não houve uma diferença estatisticamente significativa ($p > 0.05$) entre os grupos tanto no momento pré como no momento de pós-lesão.

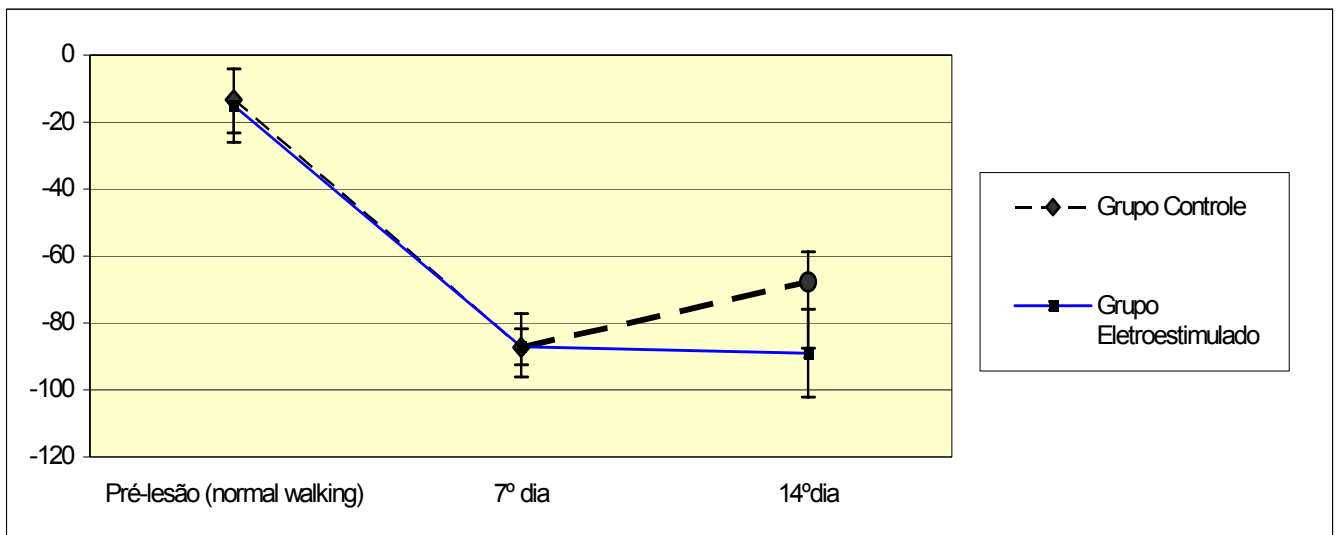


Figura 3.1. O índice funcional do ciático mostrou um déficit dos grupos tratados eletroestimulados e não tratados quando comparados com a pré-lesão. Na pré-lesão a função estava normal -20 para todos os grupos. Na 1ª semana após lesão o valor do índice funcional do ciático de todos os grupos desceu para -80. Até a segunda semana o grupo tratado eletroestimulado continuou próximo a -100 enquanto que o não tratado ficou próximo a -60.

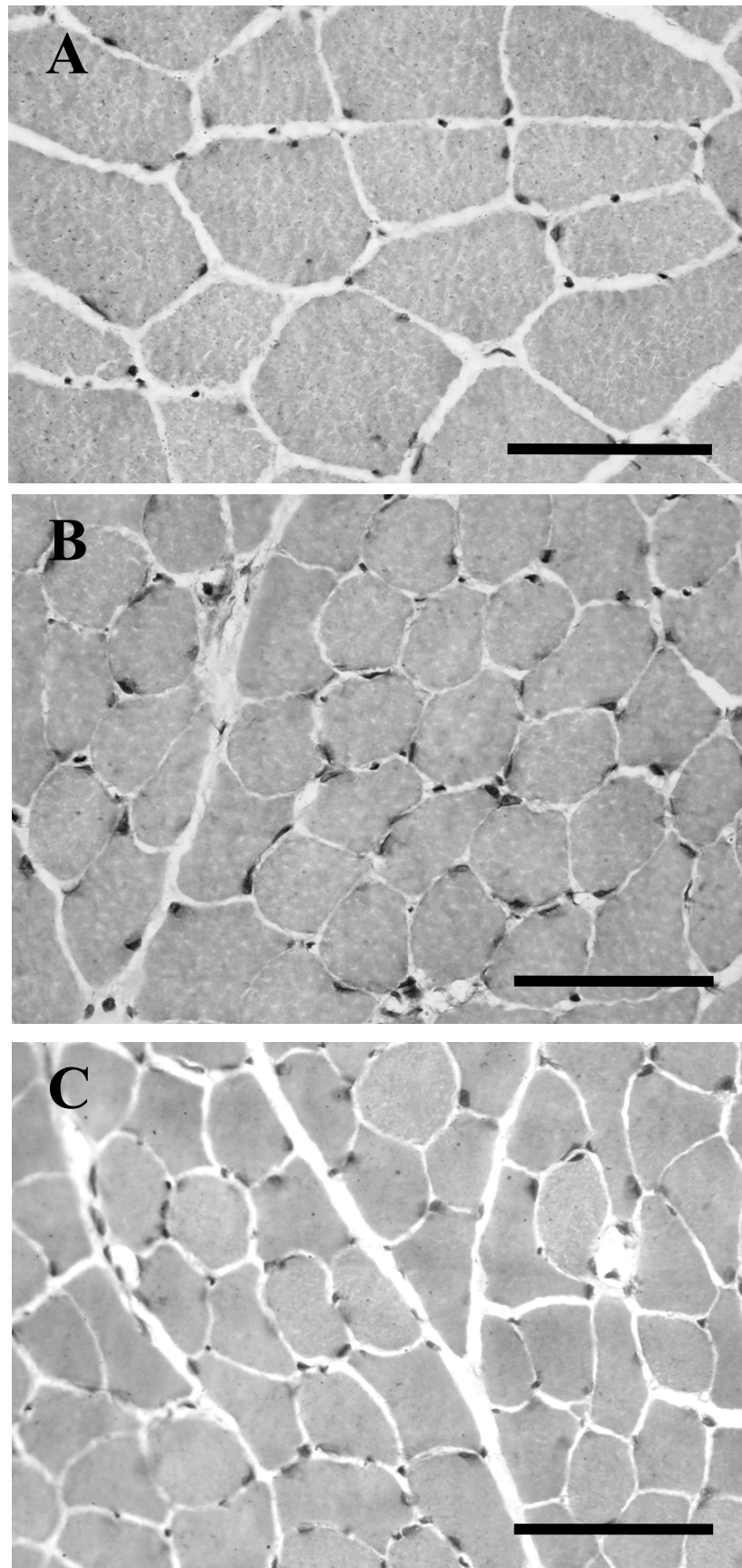


Figura 3.2. Avaliação morfológica após a coloração do corte transversal do músculo tibial anterior com Azul de Toluidina. A) Grupo 1: músculo normal; B) Grupo 3: não tratados pela eletroestimulação; C) Grupo 2: músculo tratado com eletroestimulação. Escala da barra = 40 μ m. Os grupos desnervados tratado e não tratado não apresentaram diferença de diâmetro entre eles, mas ambos tiveram diferença em relação ao grupo normal.

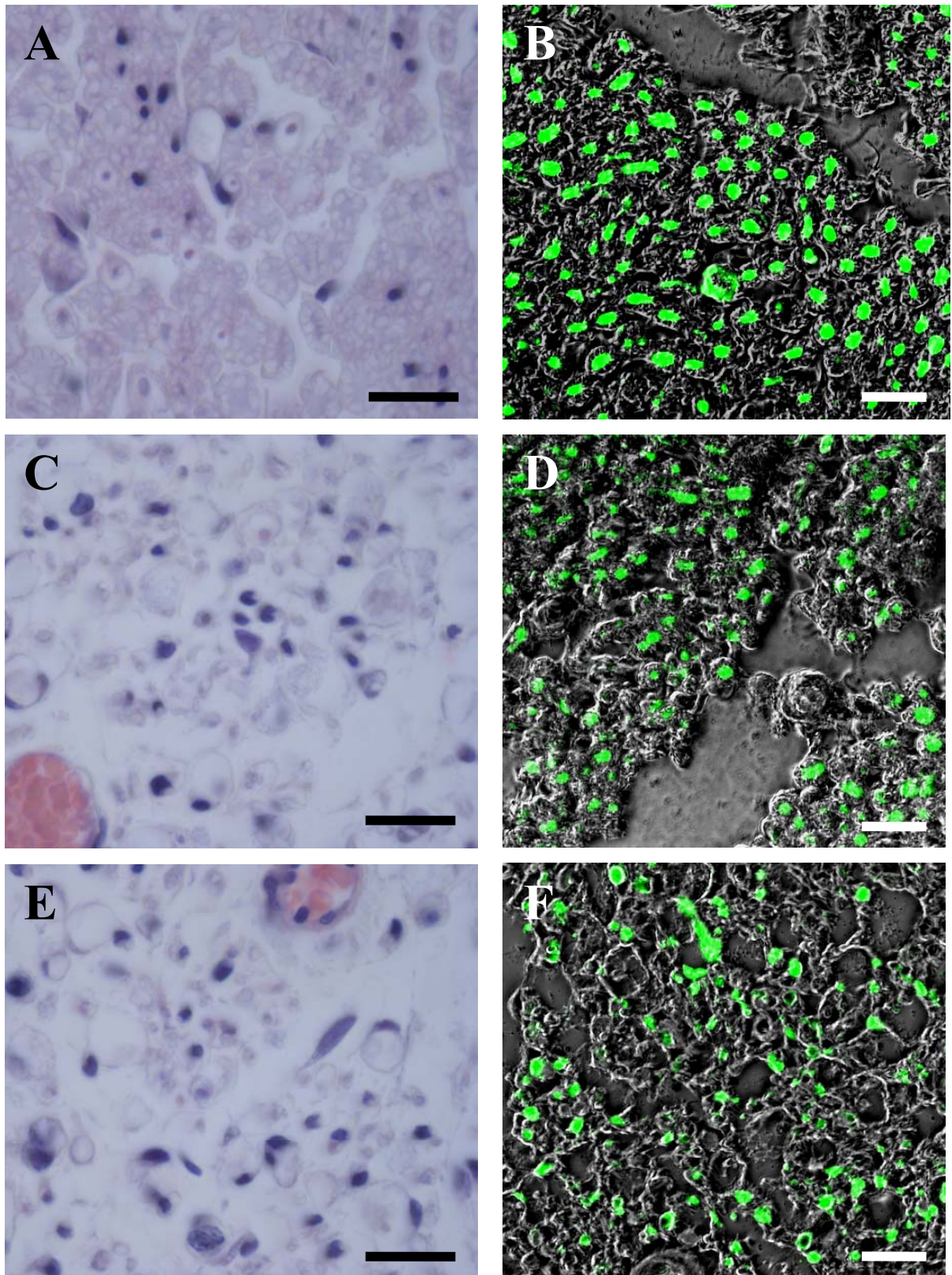


Figura 3.3. Microscopia de Luz a esquerda (hematoxilina e eosina) e Confocal a direita (Imunoreação com anti-neurofilamento- 200 KD) imagens de nervos ciáticos normais (A-B), não tratados com eletroestimulação (C-D) e tratados com eletroestimulação (E-F). Escala da barra = 20 μ m. Tanto os nervos tratados e não tratados não demonstraram diferenças morfológicas e estruturais entre eles, mas ambos foram diferentes quando comparados ao grupo normal.

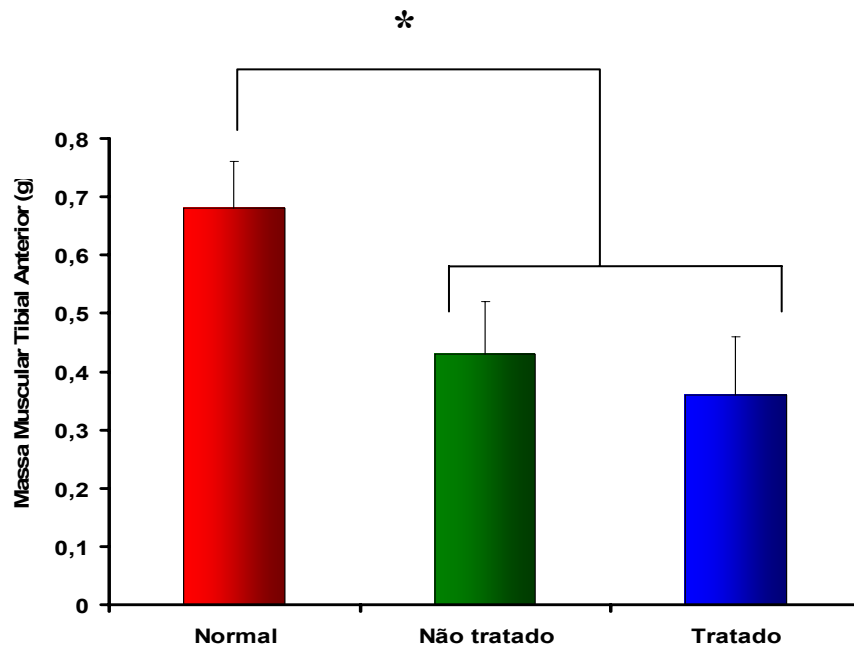


Figura 3.4. Média da massa dos músculos tibiais anteriores dos músculos normais, não tratados com eletroestimulação e tratados com eletroestimulação. Os nervos tratados e não tratados não tiveram diferenças estatísticas significativas no massa dos músculos entre si ($p > 0.05$), porém ambos os grupos a massa do músculo deles foram menores em comparação com a média da massa muscular dos normais ($p < 0.05$). (*) Apresenta diferença estatística.

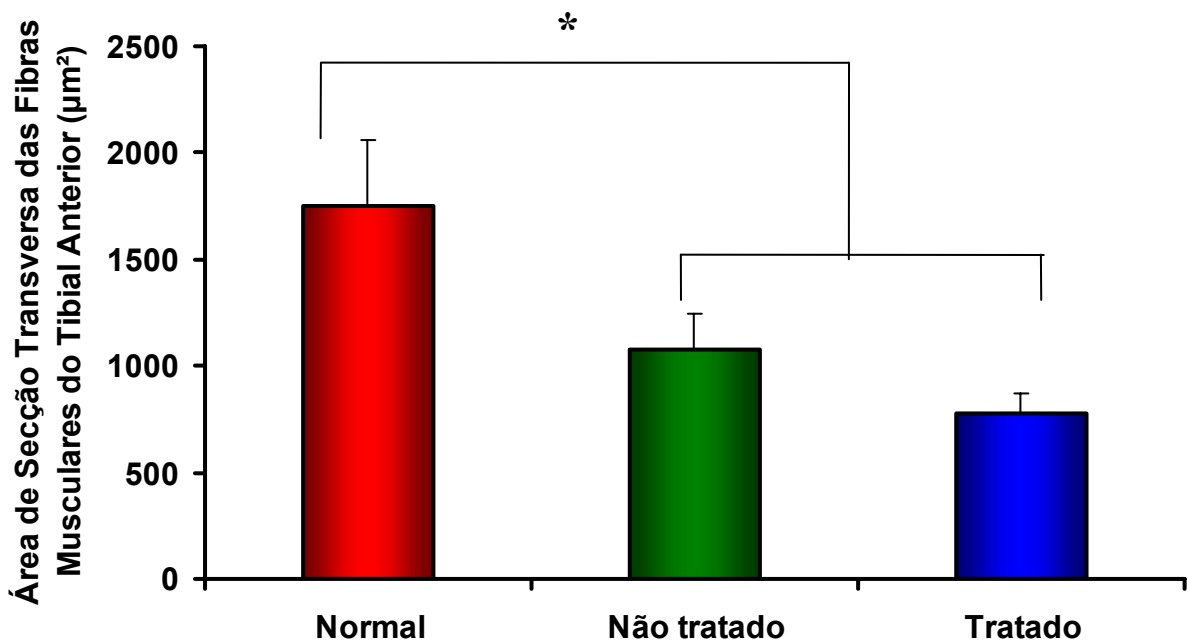


Figura 3.5. Média das áreas das fibras musculares num corte transversal dos músculos tibiais anteriores normais, não tratados pela eletroestimulação e tratados pela eletroestimulação. Entre os grupos tratados e não tratados não foi encontrado diferenças estatísticas ($p > 0.05$), porém ambos grupos desnervados foram menores quando comparado à média do diâmetro das fibras musculares normais ($p < 0.05$). (*) Apresenta diferença estatística.

4.4. DISCUSSÃO

O objetivo desse estudo foi investigar os efeitos precoces da eletroestimulação dos músculos sobre a recuperação do nervo ciático após a lesão padronizada por esmagamento. Os resultados mostraram que a eletroestimulação diminui a recuperação funcional do nervo ciático esmagado. Na verdade, enquanto a morfologia do músculo desnervado e as fibras nervosas regeneradas foram similares nos animais tratados e não tratados, os sinais precoces da recuperação funcional medida pelo índice funcional do ciático foram ausentes nos animais tratados.

Esses resultados contrastam com dados de estudos experimentais precedentes (MCDEVITT, 1987; KERNS & LUCCHINETTI, 1992; MARQUESTE et al., 2002, 2004) os quais demonstraram que a eletroestimulação melhora a regeneração nervosa. Entretanto, devemos destacar que Kerns & Lucchinetti (1992) encontraram uma melhora significativa na tensão de contração dos nervos esmagados, somente quando a eletroestimulação era aplicada durante o período intermediário (12-21 dias) e não foi encontrada diferenças tanto nos estágios precoces, quanto nos mais tardios da recuperação. Essa observação sugere que a eletroestimulação direta do músculo pode exercer efeitos estimulantes sobre a regeneração nervosa periférica em somente uma faixa de tempo específica durante o processo de regeneração, nem mais tarde e nem mais cedo ela deve ser realizada. Os dados deste trabalho sugerem que se a eletroestimulação do músculo for administrada muito cedo, isto é, imediatamente após lesão nervosa, quando os axônios estão ainda se regenerando ao longo do coto distal do nervo, em um período que ainda não alcançaram o músculo, desta forma a eletroestimulação poderia exercer um efeito inibitório sobre a recuperação da função neuromuscular.

Entretanto, a comparação entre os diferentes resultados de estudos experimentais utilizando terapia por eletroestimulação, deve ser tratada com cautela por duas razões. Primeira, o protocolo de eletroestimulação pode variar relativamente quanto a sua forma de um estudo para outro, em

relação a alguns parâmetros tal como a duração do pulso e do intervalo do pulso. Além disso, a atividade elétrica de base do músculo poderá influenciar o resultado da sessão de tratamento. Neste estudo, no sentido de se reduzir a interferência devido à variabilidade na linha de base da atividade elétrica do músculo, o protocolo de estimulação elétrica foi baseado na determinação prévia da cronaxia de cada músculo.

A segunda razão é que os resultados dos diferentes estudos experimentais sobre regeneração nervosa devem ser comparados com cautela, devido às dificuldades de reprodução padronizada de uma lesão por esmagamento do nervo (VAREJÃO et al., 2004). Para evitar esse problema, nesse estudo utilizamos um instrumento específico para a indução reprodutível da lesão do nervo ciático do rato recentemente construído (BEER, STEURER & MEYER, 2001) e padronizado (VAREJÃO et al., 2004).

Concluindo, nossos dados sugerem que a efetividade da estimulação elétrica sobre a recuperação nervosa pós-traumática permanece uma questão aberta, se não for apropriadamente utilizada em termos de parametrização correta nos equipamentos e tempo de aplicação, esse tipo de terapia física poderá não apenas ser ineficaz, mas poderá até inibir o processo de reparação. Portanto, os estudos futuros deverão definir exatamente as condições de seus protocolos clínicos e de tratamento, com os quais poderão de fato produzir melhora na condição clínica de pacientes que sofreram um trauma de nervo periférico.

4.5. BIBLIOGRAFIA

- BAIN JR, MACKINNON SE, HUNTER DA. Functional Evaluation of Complete Sciatic, Peroneal, and Posterior Tibial Nerve Lesions in the Rat. **Plast Reconstr Surg** .83:129-138, 1989.
- BEER GM, STEURER J, MEYER VE. Standardizing Nerve Crushes with a Non-Serrated Clamp. **J Reconstr Microsurg**. 17:531-534, 2001.
- BRUSHART TM, HOFFMAN PN, ROYALL RM, MURINSON BB, WITZEL C, GORDON T. Electrical Stimulation Promotes Motoneuron Regeneration without Increasing its Speed or Conditioning the Neuron. **J Neurosci**. 22:6631-6638, 2002.
- BRUSHART TM, JARI R, VERGE V, ROHDE C, GORDON T. Electrical Stimulation Restores the Specificity of Sensory Axon Regeneration. **Exp Neurol**. 194:221-229, 2005.
- CHENG WL, LIN CC. The Effects of Different Electrical Stimulation Protocols on Nerve Regeneration through Silicone Conduits. **J Trauma**. 56:1241-126, 2004.
- EVANS GR. Challenges to Nerve Regeneration. **Semin Surg Oncol**. 19:312-318, 2000.
- EVANS GR. Peripheral Nerve Injury: A Review and Approach to Tissue Engineered Constructs. **Anat Rec**.263:396-404, 2001.
- KERNS JM, LUCCHINETTI C. Electrical Field Effects on Crushed Nerve Regeneration. **Exp Neurol** .117:71-80, 1992.
- LUNDBORG G. Enhancing Post-traumatic Nerve Regeneration. **J Peripher Nerv Syst**. 7:139-140, 2002.
- LUNDBORG G. **Nerve Injury and Repair**, 2nd Edition. Edinburgh: Churchill Livingstone; p. 248, 2005
- MARQUESTE T, ALLIEZ JR, ALLUIN O, JAMMES Y, DECHERCHI P. Neuromuscular Rehabilitation by Treadmill Running or Electrical Stimulation after Peripheral Nerve Injury and Repair. **J Appl Physiol**. 96:1988-1995, 2004.
- MARQUESTE T, DECHERCHI P, DOUSSET E, BERTHELIN F, JAMMES Y. Effect of Muscle Electrostimulation on Afferent Activities from Tibialis Anterior Muscle after Nerve Repair by Self-Anastomosis. **Neuroscience**. 113:257-271, 2002.
- MCDEVITT L, FORTNER P, POMERANZ B. Application of Weak Electric Field to the Hindpaw Enhances Sciatic Motor Nerve Regeneration in the Adult Rat. **Brain Res**. 416:308-314, 1987.
- MCGINNIS ME, MURPHY DJ. The Lack of an Effect of Applied D.C. Electric Fields on Peripheral Nerve Regeneration in the Guinea Pig. **Neuroscience**. 51:231-244, 1992.

SAMII M, CARVALHO GA, NIKKHAH G, PENKERT G. Surgical Reconstruction of the Musculocutaneous Nerve in Traumatic Brachial Plexus Injuries. **J Neurosurg.**87:881-886, 1997

SUNDERLAND S. **Nerves and nerve injuries.** Churchill Livingstone, New York, 1978.

SUNDERLAND S. **Nerve Injuries and Their Repair—A Critical Appraisal.** Edinburgh: Churchill Livingstone. p.361, 1991.

VAREJÃO AS, CABRITA AM, MEEK MF, BULAS-CRUZ J, MELO-PINTO P, RAIMONDO S, GEUNA S, GIACOBINI-ROBECCHI MG. Functional and Morphological Assessment of a Standardized Rat Sciatic Nerve Crush Injury with a Non-Serrated Clamp. **J Neurotrauma.** 21:1652-1670, 2004.

PARTE III

CONCLUSÕES GERAIS

5. CONCLUSÕES GERAIS

Este estudo teve como objetivo criar condições para melhorar o prognóstico de recuperação no pós-operatório de lesões nervosas periféricas, e para isso foram utilizados agentes físicos como o laser e a eletroestimulação, no sentido de contribuir para estipular protocolos clínicos que sejam mais eficazes nestas lesões.

A eficácia do laser de baixa intensidade pode ser constatada na metanálise, cujos resultados mostraram que na maioria dos experimentos apresentados, foram positivos, comprovando sua ação terapêutica. Porém, ainda existem alguns experimentos que utilizaram a laserterapia e indicaram um efeito nulo ou mesmo negativo sobre a regeneração nervosa, podendo ser devido à variabilidade de técnicas de aplicações e de parâmetros de irradiação.

No primeiro estudo experimental, o protocolo proposto com laser de AsGaAl contínuo (830 nm) não apresentou diferenças morfológicas e funcionais entre os grupos tratados e não tratados com o laser após a lesão por esmagamento do nervo ciático do rato. Contudo, os efeitos da laserterapia não podem ser totalmente descartados, uma análise molecular seria importante para verificar alterações mais sensíveis e que possivelmente não foram percebidas com as análises empregadas neste estudo.

A eletroestimulação baseada no eletrodiagnóstico aplicada diretamente no músculo tibial anterior, por sua vez, além de não influenciar a morfologia dos nervos e a morfometria dos músculos tibiais anteriores, trouxe um prejuízo funcional detectado pela análise do índice funcional do ciático. Os resultados sugerem que se a eletroestimulação no músculo for administrada imediatamente após lesão nervosa, pode exercer um efeito inibitório sobre a recuperação da função neuromuscular.

Concluindo, os resultados dos dois estudos experimentais sugerem que a efetividade da utilização do laser e da eletroestimulação na regeneração nervosa periférica, requer mais estudos e se não for apropriadamente definida a parametrização dos equipamentos, protocolos, tempos de

aplicação, início do tratamento, eles poderão não só ser ineficazes, mas também, poderão inibir o processo de recuperação da função neuromuscular.

ARTIGOS PUBLICADOS E SUBMETIDOS

Lack of Lasertherapy Effects on Early Rat Sciatic Nerve Recovery
after Crush Injury

**D. Gigo-Benato, S. Geuna, T. L. Russo, G. Cillo, H Rodrigues, S. Raimondo,
T.F.Salvini, M.G. Giacobini-Robecchi, N.A. Parizzotto**

**D. Gigo-Benato (corresponding author) – N.A. Parizzotto, . L. Russo, G. Cillo, Helena,
T.F.Salvini**

**Department of Physiotherapy, Federal University of São Carlos, Via Washington Luís, Km
235 - C.P.676 - CEP. 13.565-905 – São Carlos- SP- Brazil**

S. Geuna – S. Raimondo - M.G. Giacobini-Robecchi

**Department of Clinical and Biological Sciences, University of Turin, San Luigi Hospital
Regione Gonzole 10- 10043. Orbassano- TO, Italy**

Communicating author: Davilene Gigo-Benato

Department of Physiotherapy

Federal University of São Carlos

Via Washington Luis km 235

C.P.676 - CEP. 13.565-905

São Carlos- SP- Brasil

E-mail: benatodavilene@yahoo.com .br

FAX: 00 55 16 3361-2081

Telephone: 00 55 16 33 51 86 30

Lack of Lasertherapy Effects on Early Rat Sciatic Nerve Recovery after Crush Injury

Abstract - Lasertherapy has been used with good results to enhance posttraumatic nerve regeneration. This study was aimed at investigating the early changes induced by low-level laser biostimulation after application of a standardized crush lesion in the rat sciatic nerve experimental model. Rats were irradiated transcutaneously at the lesion site for 5 consecutive days over either the 1st or 2nd post-injury week and then sacrificed fourteen days after injury. Assessment of nerve function recovery was made by walking track analysis and calculation of the sciatic functional index. Tibialis anterior muscle fiber morphometry was carried out to assess the degree of muscle atrophy. Sciatic nerves were analysed by light and confocal microscopy after anti-neurofilament-200kD and anti-S100 immunolabelling to assess nerve fiber regeneration. Results showed no significant difference between laser-treated animals and sham irradiated controls, for any of the functional and morphological parameters of sciatic nerve recovery investigated suggesting that laser biostimulation does not exert its effects on nerve recovery in early post-injury phases. However, the possibility that the failure to detect lasertherapy effects on nerve regeneration is due to the inappropriateness either of the laser set up and irradiation protocol employed in this study or of the sciatic nerve crush injury as an experimental model for the comparative investigation of early changes in nerve recovery cannot be ruled out.

Keywords: Low-power laser biostimulation - 830 nm – Nerve repair - Sciatic functional index – Crush lesion -Rat

Introduction

Peripheral nerve lesions are a common clinical occurrence (Evans, 2000). Although unlike central nervous system axons peripheral nerve axons can regenerate (Lundborg, 2005), the degree of regeneration is usually partial (Samii et al, 1987; Lundborg, 2002). Consequently, functional recovery is very often unsatisfactory and thus there is a need for finding out effective tools for stimulating posttraumatic regeneration of peripheral nerves (Lundborg, 2002).

Several tools aimed at improving posttraumatic nerve regeneration have been experimentally tested so far, including drugs (Gold et al., 2004), hormones (Gudemez et al., 2002), exercise (Sarikcioglu and Oguz, 2001), and physical agents (Lazar et al., 2001). Among the latter group, the stimulation of peripheral nerve regeneration with lasertherapy has received increasing attention over the last 20 years (Rochkind and Ouaknine, 1992; Anders et al., 2004).

A recent critical review of the literature (Gigo-Benato et al., 2005) showed that more than 80% of the experimental studies carried out so far on the use of lasertherapy for promoting peripheral nerve repair led to a positive outcome on posttraumatic/postoperative nerve recovery, thus pointing to this physiotherapy tool as a very promising clinical approach for patients who suffered a nerve lesion.

Based on the very promising results obtained so far, the present study was aimed at investigating the effects of lasertherapy during the early stages of peripheral nerve regeneration. The study was carried out using an experimental model for producing a crush lesion that has been recently standardized (Beer et al., 2001; Varejao et al, 2004) in the rat sciatic nerve model. This experimental model is characterised by the begin of functional recovery, detectable by walking track analysis and calculation of the sciatic functional index, already in the second posttraumatic week, and it is thus particularly suitable for investigating early nerve recovery.

Materials and Methods

Wistar adult (*Rattus norvegicus*) male rats were used in this study. Good laboratory animal practice was observed according to the international standards for animal experimentation and following approval by our local Institution's Animal Care and Ethics Committee. The animals were anaesthetised with an intraperitoneal injection of a premixed solution containing ketamine (95 mg/kg) and xylazine (12 mg/kg). The skin was shaved and cleaned with 10% povidone iodine. A 2-cm-long incision was made on the skin through a gluteal approach and the left sciatic nerve was exposed. A non-serrated clamp, exerting a force of 54 N (Beer et al., 2001), was used for a period of 30 seconds to create a 3-mm-long crush injury, 10 mm above the bifurcation, in order to get a good reproducibility of the axonotmetic lesion (Varejao et al., 2004). The starting diameter of the sciatic nerve was about 1 mm, during the crush the nerve flattens to a new diameter of 2 mm, giving a final pressure of $p = 9$ MPa. The nerves were kept moist with 37°C sterile saline solution throughout the surgical intervention. After surgery, animals were housed in single cages and fed rat chow and water ad libitum. For the first four days, acetaminophen (13,5 mg/100 ml) was added to water for pain reduction.

Animals were divided into four groups (n = 9). Group 1: normal (unoperated). Group 2: 1st-week lasertherapy (received a 5-day lasertherapy starting from day 1 post-crush and a 5-day simulated lasertherapy, i.e. with the laser device switched off, starting from day 7 post-crush). Group 3: 2nd-week lasertherapy (received a 5-day simulated lasertherapy starting from day 7 post-crush and a 5-day lasertherapy starting from day 7 post-crush). Group 4: placebo (received only simulated lasertherapy during both 1st and 2nd week).

Biostimulation was carried on using an *GaAlAs* laser (marca e produtor): continuous radiation, wavelength 830 nm, power 60mW, 19 sec, spot area 0,00028 cm², energy density at the point of entry 40 J/cm². The radiation was applied transcutaneously at skin contact, after

shaving the skin, on the site of surgery (recognizable for the presence of the surgical scar) at three points. Applications were made while gently handling the rats. Laser biostimulation did not produce any painful sensation and distress to the animals.

The assessment of nerve function recovery was carried out by calculating the sciatic functional index (SFI) as described by Bain et al. (1989). Animals were tested in a confined walkway measuring 42-cm-long and 8.2-cm-wide, with a dark shelter at the end. A white paper was placed on the floor of the rat walking corridor. The hind paws of the rats were pressed down onto a finger paint-soaked sponge *plataforma lisa com tinta digital*, and they were then allowed to walk down the corridor leaving its hind footprints on the paper. Three measurements were taken from the footprints: (1) the print length (PL), i.e. the distance from the heel to the third toe; (2) the toe spread (TS), i.e. distance from the first to the fifth toe; and (3) the intermediary toe spread (ITS), i.e. distance from the second to the fourth toe. All three measurements were taken from the experimental (E) and normal (N) sides. The SFI was calculated according to the following equation:

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

Fourteen days after surgery, all animals were euthanased and the sciatic nerve and the muscle tibialis anterior (TA) were carefully dissected from the operated right side avoiding mechanical injuries. To have a first indication on trophic variations, wet muscles were immediately weighted with a 100a precision balance (Denver Instruments, Denver, CO, USA)

TA muscles were then frozen in isopentane, previously frozen in liquid nitrogen. Muscle samples were then placed in plastic tubes and stored in freezer at -80°C . Histological serial cross-sections ($10\mu\text{m}$), cut transversely to the muscle main axis, were obtained with a HM 505E

cryostat (Microm, Walldorf, Germany) at a level corresponding to the middle belly of the muscle. Sections were stained with Toluidine Blue for morphological evaluation. For muscle fiber morphometry, the cross-sectional area of one hundred randomly selected fibers was measured in the middle belly of each TA muscle, using a light microscope (Axioplan 2, Carl Zeiss, Jena, Germany) equipped with a digital camera (marca e produtor) and the Axio Vision software (Carl Zeiss, Jena, Germany). A blind procedure was used for measurements.

The sciatic nerves were fixed in 10 % formalin for 3 h and then washed in phosphate buffer saline (PBS) until embedding. The specimens were dehydrated and embedded in paraffin and cut at 7 μm perpendicular to the main nerve axis. For light microscope analysis, sections were stained with hematoxylin and eosin and Papanicolaou stains and observed with a Leica DM400 microscope equipped with a Leica DFC320 digital camera. For immunohistochemistry and confocal laser microscopy, sections were incubated overnight in a solution containing the anti-neurofilament-200kD (a-NF) (monoclonal, mouse, which recognizes the pig 200 kD subunit of neurofilaments, dilution 1:200, Sigma, St. Louis, MO), and anti-S100 (polyclonal, rabbit, which recognizes the bovine 21 kD monomeric units of S-100 calcium-binding protein, dilution 1:800, Sigma, St. Louis, MO). After washing in PBS, double immunolabelling was carried out by incubating sections for 1h in a solution containing two different secondary antibodies: TRITC-conjugated anti-rabbit IgG (dilution 1:200, Dako, Milano, Italy) and a goat anti-mouse IgG Alexa-Fluor-488-conjugated (dilution 1:200, Molecular Probes, Eugene, Oregon). The sections were finally mounted with a Dako fluorescent mounting medium and analyzed by a LSM 510 confocal laser microscopy system (Zeiss, Jena, Germany), which incorporates two lasers (Argon and HeNe) and is equipped with an inverted Axiovert 100M microscope. Confocal fluorescence images were taken using a 20x Plan-NEOFLUAR objective with a numerical aperture (NA) of 0.50 and a 40x Plan-NEOFLUAR objective with a NA of 0.75. An electronic zoom with a magnification ranging from 1 to 8 was employed to obtain the magnifications

indicated in the figures. To visualize Alexa-Fluor-488 fluorescence, we used excitation from 488-nm Argon laser line and emission passing through a band-pass (BP) 505-530 filter which passes wavelengths 505 nm to 530 nm to the detector. To visualize TRITC we used excitation from 543-nm HeNe laser line and emission passing through a high-pass (LP) 560 filter which passes wavelengths superior to 560 nm to the detector. Images created with the BP 505-530 filter were digitally colored grey. Images created with the LP 560 filter were digitally colored white.

For specificity assessment (Saper and Sawchenko, 2003), the two antibodies were checked by Western blotting, which showed a single band of staining, and secondary antibody labelling with omission of the primary antibody which led to no immunopositivity. In addition, we have also carried out a "morphology-based specificity test", consisting of the same immunolabelling protocol to stain sections from normal peripheral nerve where the two proteins are known to be present with a clear localization easily detectable from a morphological viewpoint. This test supported the specificity of each reagent by demonstrating that it specifically labels only the tissue elements where the immunogen is known to be present.

All numerical data were subjected to statistical analysis by means one-way repeated measures analysis of variance (RM-ANOVA) test. When the presence of significant differences was observed, post-hoc multiple pairwise comparisons were carried out using the Student-Neuman-Keuls (SNK) test. Statistical significance was established as $p < 0.05$.

Results

Body weight of rats at the time of sacrifice was 315 ± 33 g for Group 1, 296 ± 25 for Group 2, 299 ± 25 for Group 3, 302 ± 23 for Group 4. The RM-ANOVA test discerned no overall statistically significant differences between groups.

Figure 1 shows the results of the functional assessment of posttraumatic sciatic nerve recovery by calculating the SFI. Statistical analysis by ANOVA test showed that, as expected, the differences in the SFI between the baseline (normal walking) and pre-sacrifice assessments were statistically significant ($p < 0.05$) for all the three groups. On the other hand, the comparison between the groups disclosed no statistically significant ($p > 0.05$) difference both in the baseline and pre-sacrifice assessments.

The mean TA muscle weight at the time of sacrifice was 0.67 ± 0.08 g for Group 1, 0.35 ± 0.04 g for Group 2, 0.41 ± 0.06 for Group 3, 0.42 ± 0.09 for Group 4. The RM-ANOVA test discerned overall statistically significant differences ($p < 0.05$). Post-hoc multiple comparisons by the SNK test showed that muscle weight was significantly ($p < 0.05$) smaller in all denervated groups in comparison to normal TA muscles. On the contrary, post-hoc multiple pairwise SNK test showed no significant ($p < 0.05$) difference between the denervated groups.

Figure 2 shows the histology of normal (A) and denervated muscles (B,C,D) which clearly illustrates muscle atrophy occurring in all experimental groups. Figure 3 shows the results of morphometrical assessment of cross-sectional area of muscle fibers. The RM-ANOVA test discerned overall statistically significant differences ($p < 0.05$). Post-hoc multiple comparisons by the multiple pairwise SNK test showed that muscle fibers were significantly ($p < 0.05$) smaller in all denervated groups in comparison to normal muscles. On the contrary, post-hoc multiple

pairwise SNK test showed no significant ($p < 0.05$) difference in mean fiber size between the denervated groups.

Light microscope analysis of normal and regenerated nerves (fig. 4,5) showed that the histological organization of the regenerated nerves was similar in all crush groups regarding both regenerated axons (fig. 4B-D) and the nerve connective (fig. 5B-D).

Figure 6 shows confocal imaging of normal (fig. 6A) and regenerated nerves from the three experimental groups (fig. 6B,C,D) after double immunolabelling with axonal (white) and a glial (gray) markers. As expected, the differences between normal and regenerated nerves were evident. On the other hand, the comparison between treated and untreated nerves disclosed no difference regarding both the regenerated axons and the glial tubes.

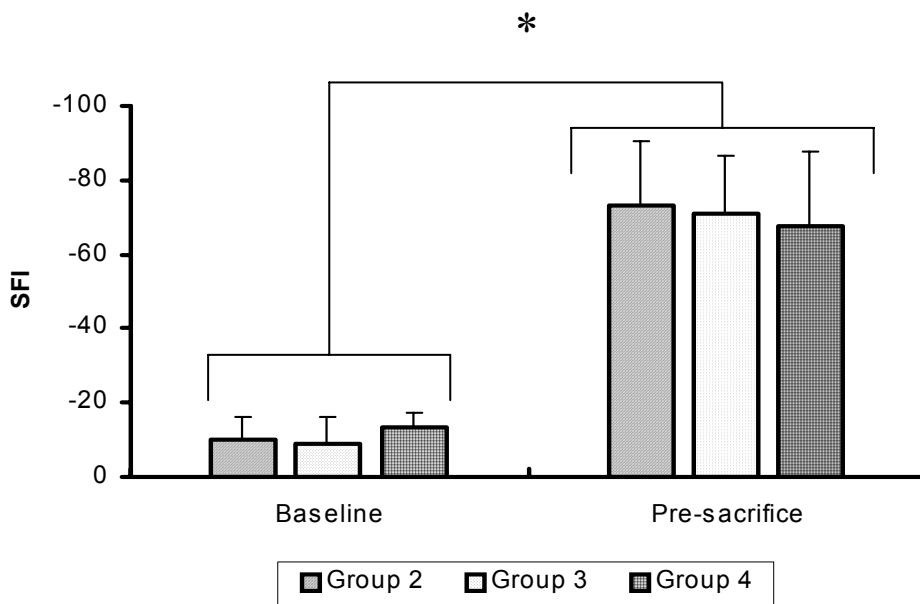


Figure 1. Functional deficit in the three experimental groups assessed by sciatic functional index calculation. Group 2: 1st week lasertherapy; Group 3: 2nd week lasertherapy; Group 4: sham-treated. At the pre-lesion state the function was absolutely normal in all groups. At the first weeks after injury, the values around -20 have lowered to -80; in the second week, the treated groups and sham-treated stayed close to -80.

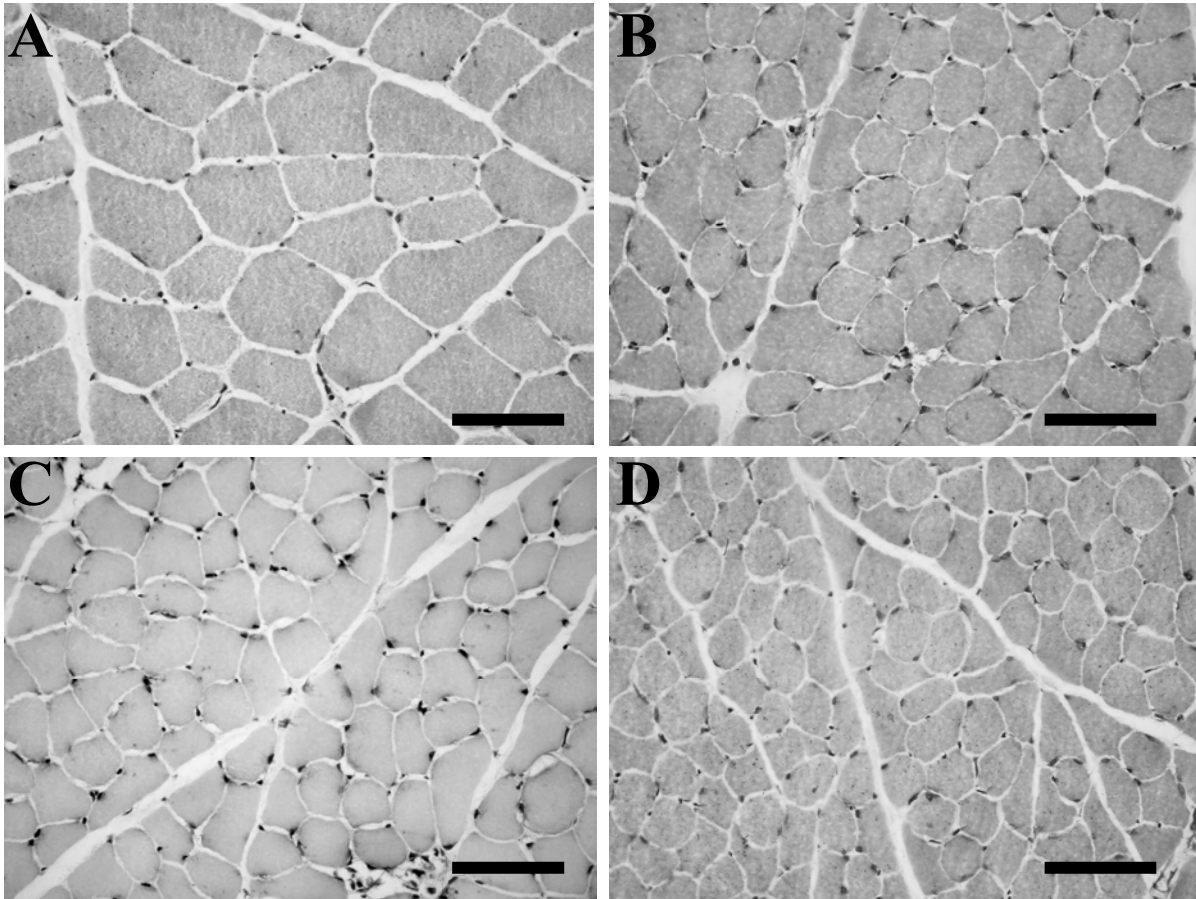


Figure 2. Histological appearance of tibialis anterior muscle after toluidine blue staining. A) Group 1: normal muscle; B) Group 2: 1st week lasertherapy; C) Group 3: 2nd week lasertherapy; D) Group 4: sham-treated. Scale bars = 40 μ m. The lasertherapy and sham-treated Groups did not have any difference of size and sharp between them, but the three experimental groups were different from the normal group.

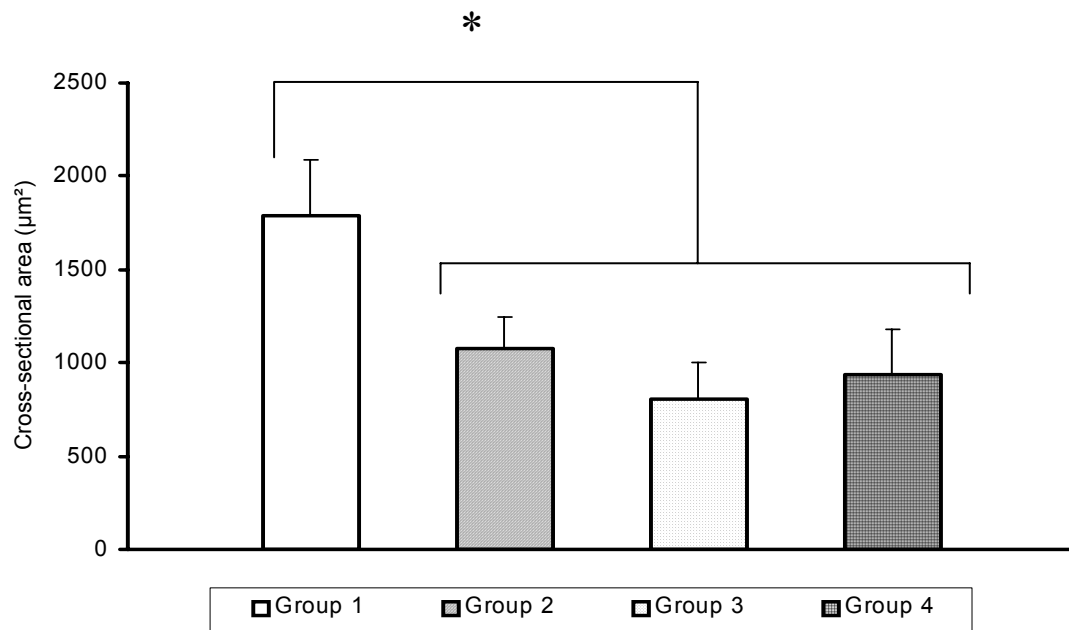


Figure 3. Mean cross-sectional area of tibialis anterior muscle fibers. Group 1: normal muscle; Group 2: 1st week lasertherapy; Group 3: 2nd week lasertherapy; Group 4: sham-treated. The three experimental groups did not show any statistically difference in their muscular weight, but the muscular weights in three experimental groups were smaller when compared to the normal group

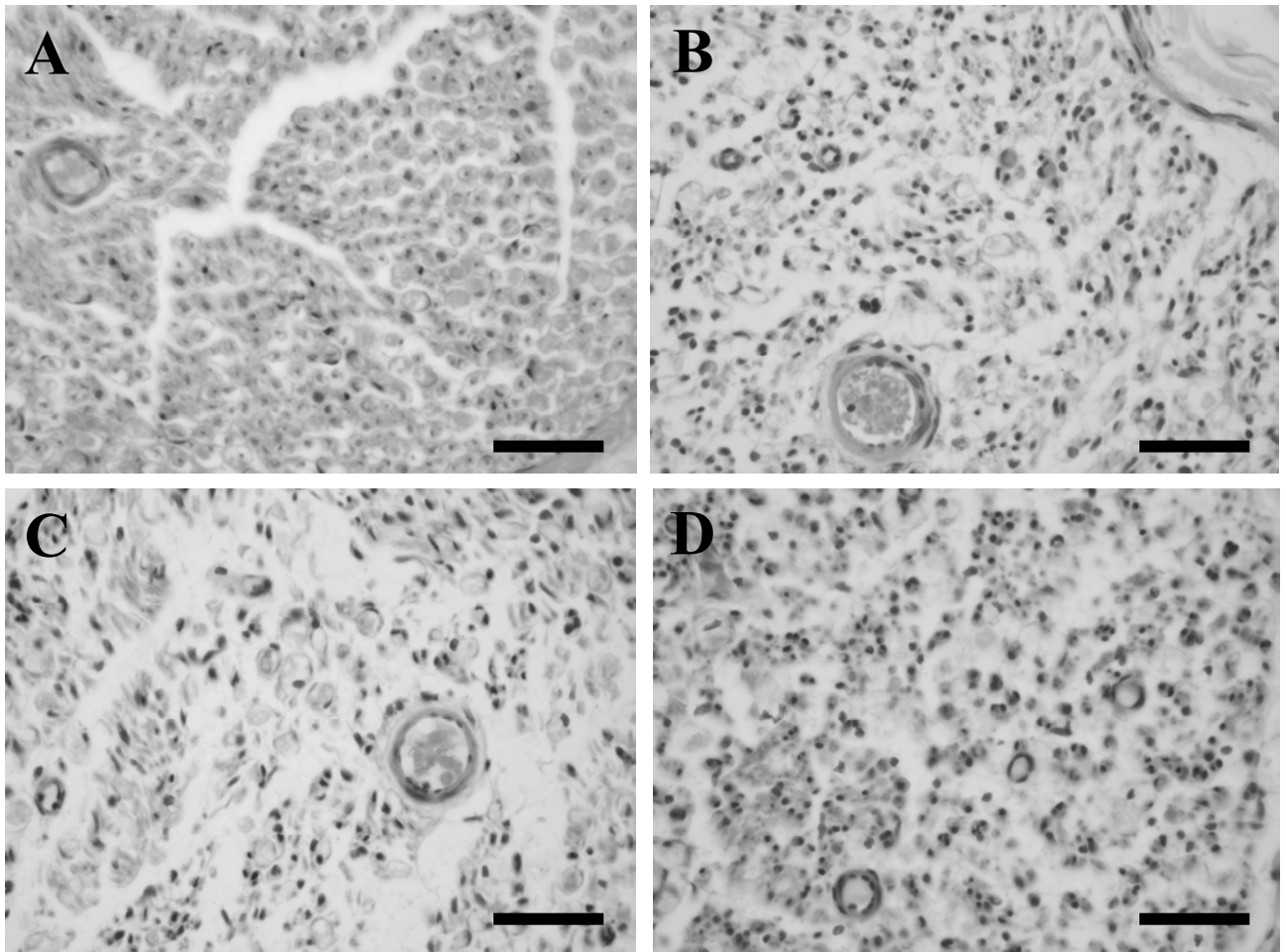


Figure 4. Nerve cross sections stained with hematoxylin and eosin. A) Group 1: normal nerve; B) Group 2: 1st week lasertherapy; C) Group 3: 2nd week lasertherapy; D) Group 4: sham-treated. Scale bars = 50 μ m. The three experimental groups did not show any difference between them, but they have showed a structural morphological difference when related to the normal group.

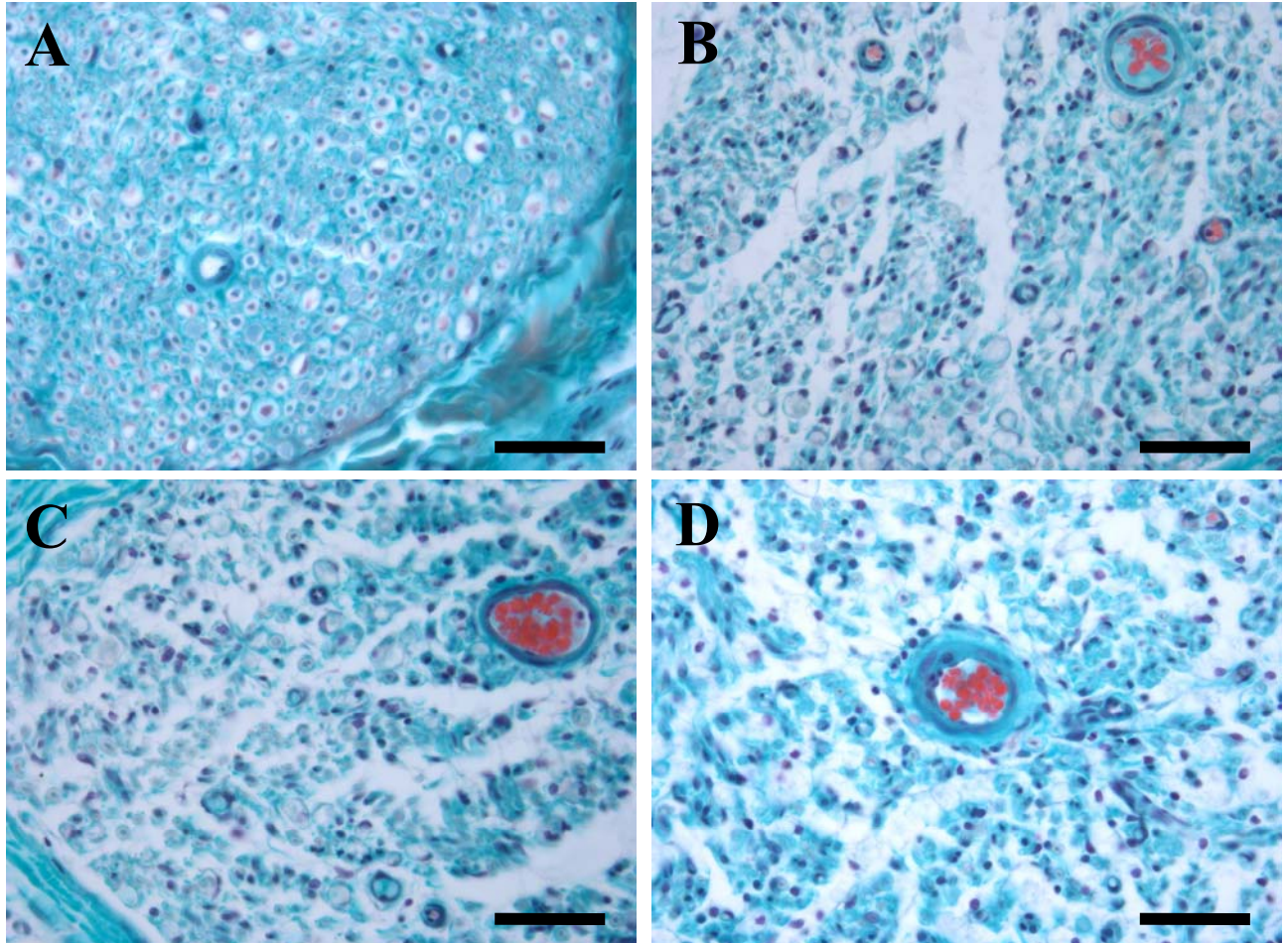


Figure 5. Nerve cross sections stained with Papanicolau stain. A,E) A) Group 1: normal nerve; B) Group 2: 1st week lasertherapy; C) Group 3: 2nd week lasertherapy; D) Group 4: sham-treated. Scale bars = 50 μ m. The three experimental groups did not show any difference between them, but they have showed a structural and morphological difference when related to the normal group.

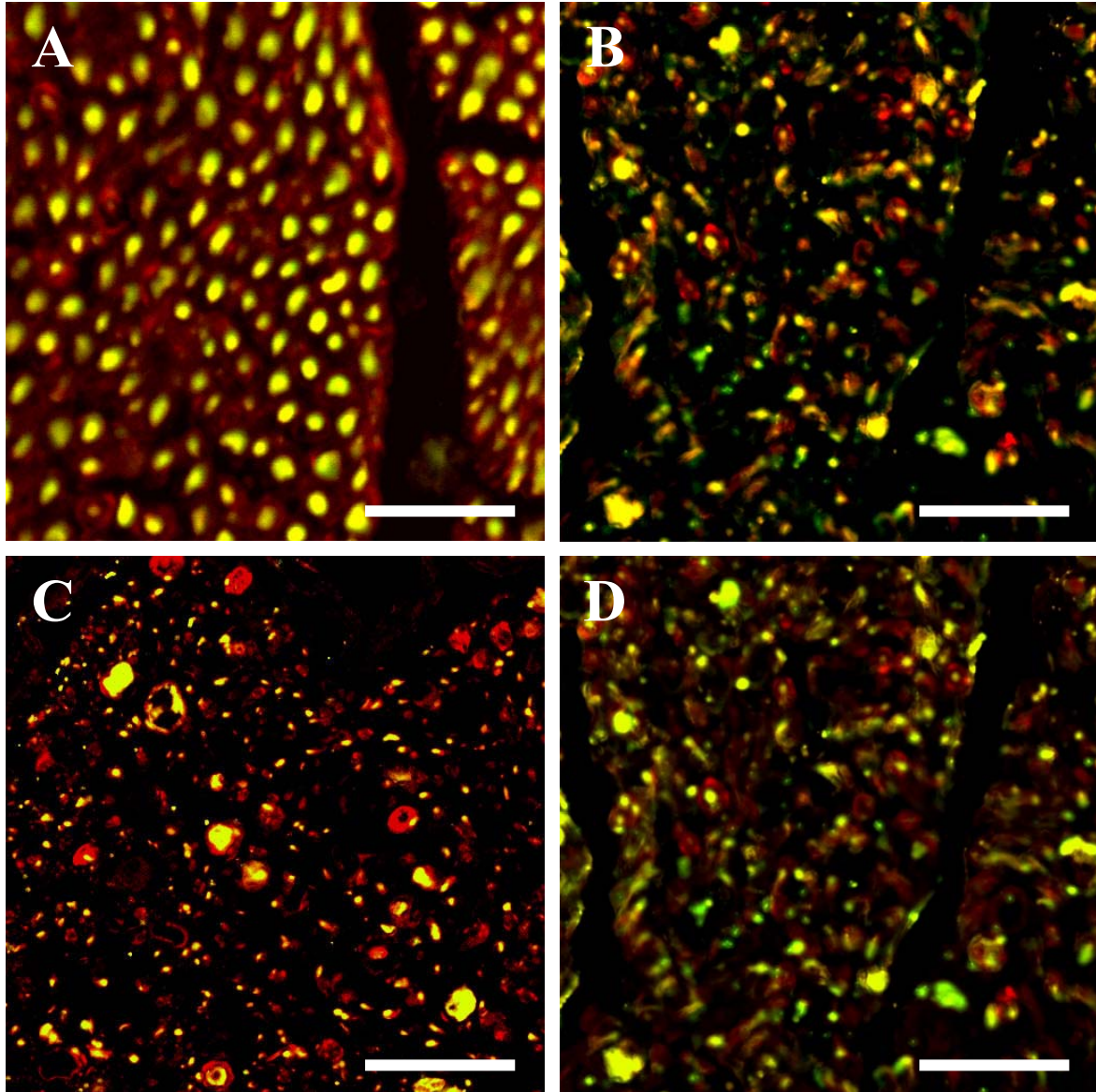


Figure 6. Confocal imaging of regenerated nerve fibres after immunolabelling with anti-neurofilament-200kD (white) and anti-S100 (grey) antibodies. A) Group 1: normal nerve; B) Group 2: 1st week lasertherapy; C) Group 3: 2nd week lasertherapy; D) Group 4: sham-treated. Scale bars = 50 μ m. The three experimental groups did not show any difference between them, but they have showed a structural and morphological difference when related to the normal group.

Discussion

Various experimental studies have shown that lasertherapy exerts a stimulatory effect on posttraumatic nerve regeneration (for references see: Gigo-Benato et al., 2004,2005; Anders et al., 2004). The mechanisms through which laser radiation interacts with biological structures, especially the nervous tissue, are still poorly understood (Gigo-Benato et al., 2005). Among the different hypotheses, the view that lasertherapy can accelerate nerve fiber regeneration during early regeneration phases have been supported by *in vitro* observations which showed that light directly stimulates both axon growth (Wollman et al., 1996; Ehrlicher et al., 2002) and Schwann cell proliferation (Van Breugel and Bar 1993). To verify this hypothesis, in this study we investigated the effects of lasertherapy on early sciatic nerve recovery after the application of a standardized crush lesion in the rat sciatic nerve model (Beer et al., 2001; Varejão et al., 2004). Results failed to detect differences for any of the parameters investigated suggesting that laser biostimulation exerts no effect on sciatic nerve recovery over the first two weeks after a crush lesion.

Whereas laser irradiation does not appear to accelerate early nerve fiber regeneration and thus accelerate the recovery of the lost function, it cannot be excluded that light mainly exerts, during early posttraumatic stages, a neuroprotective action which is suitable to give its results in later regeneration stages. In this view, it should be noted that, in rat brain, low-power lasertherapy has been shown to up-regulate the expression of the neuroprotective agent TGF- β 1 (transforming growth factor- β 1) (Leung et al., 2002).

The interpretation of our results should also take into consideration the possibility that we have used a ineffective stimulation protocol concerning one or more of the different variables that can influence the effectiveness of lasertherapy in tissue regeneration, in particular

wavelength, energy density and time of irradiation. As regards wavelength, although most of the studies carried out so far on crushed nerves used visible 632.8 nm wavelength HeNe device (Rochkind et al., 1987; Hamilton et al., 1992; Anders et al., 1993), more recently experimental evidence of the effectiveness of near infrared radiation on posttraumatic nerve regeneration has been provided (Shamir et al., 2001; Miloro et al., 2002; Gigo-Benato et al., 2004). Since we used a 830 near infrared wavelength in the present study, it does not seem suitable that the lack of laser effects that we observed was imputable to the employment of an ineffective wavelength.

Energy density (dose or fluence) is another parameter that is thought to play a major role in relation to the effectiveness of lasertherapy. It is usually thought a dose range from 4 to 10 J/cm² is the most effective for promoting tissue regeneration (Turner and Hode, 2003). However, for peripheral nerves as well as for the central nervous system, most studies used so far suggested that the effective dose range is higher (Anders et al., 2004; Gigo-Benato et al., 2005; Byrnes et al., 2005) and, in line with this indication, in this study we used a dose of 40 J/cm². It seems thus improbable that the lack of effects that we observed was due to an inappropriate dose.

Finally, the other important parameter that can influence the effect of lasertherapy is the time of irradiation (Turner and Hode, 2003). In fact, the same dose can be obtained by administering either a relatively high power (hundreds of mW) for a brief lapse of time (seconds) or a lower power for a longer irradiation time. Although the attention of researchers still did not focus much on this issue, it is expectable that the same dose concentrated in a brief lapse of time or diluted over a longer period can interact differently with the target tissue (Turner and Hode, 2003). As regards peripheral nerves, analysis of the literature shows that very variable treatment times, have been used so far, ranging from less than one minute (Gigo-Benato et al., 2004) up to 90 minutes (Anders et al., 1993). In this study, we concentrated the total dose over a relatively short lapse for time (19 sec) which represents the shortest in comparison to previous studies. This might be the reason why we failed to obtain a positive effect on nerve regeneration. In

support to the view that the laser set up and irradiation protocol used in this study was inappropriate for exerting biological effects was the failure to observe any change in the animal body weight, in disagreement with previous studies which shown that laser irradiation of rats exerts systemic effects including a significant increase in the weight of animals (Oliveira et al., 1999). These considerations suggest that the application time is definitely an issue that deserves much more attention from researchers in the future.

An alternative explanation for giving reason to the failure to detect any significant effect of laser biostimulation on nerve recovery in early post-injury phases can be related to the inappropriateness of the sciatic nerve crush injury as an experimental model for the comparative investigation of early changes in nerve regeneration. In fact, results from different experimental studies on nerve regeneration should be compared with caution because of the difficulties in reproducing a standardized nerve lesion (Varejão et al., 2004). To avoid this problem, in this study we have used a specific device for inducing a reproducible sciatic nerve crush injury that has been recently realized (Beer et al., 2001) and standardized (Varejão et al., 2004). However, even if results were reproducible, the occurrence of very fast nerve regeneration after a crush lesion in absence of any treatment might hide the potential effectiveness of a treatment protocol. It can be thus suggested that the nerve crush model is a good model for investigating the early inhibitory effects on nerve recovery of any treatment and or clinical condition but not the stimulating effects.

Taken together the results of the present study, call attention to the need for more research on the effects of lasertherapy on nerve regeneration aimed at defining more clearly the laser set up and irradiation protocols that are effective for promoting posttraumatic nerve recovery.

References

Anders JJ, Borke RC, Woolery SK, Van de Merwe WP (1993) Low power laser irradiation alters the rate of regeneration of the rat facial nerve. *Lasers Surg Med* 13:72-82

Anders JJ, Geuna S, Rochkind S (2004) Phototherapy promotes regeneration and functional recovery of injured peripheral nerve. *Neurol Res* 26:233-239

Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA (1989) Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg* 83:129-138

Beer GM, Steurer J, Meyer VE (2001) Standardizing nerve crushes with a non-serrated clamp. *J Reconstr Microsurg* 17:531-534

Byrnes KR, Waynant RW, Ilev IK, Wu X, Barna L, Smith K, Heckert R, Gerst H, Anders JJ (2005) Light promotes regeneration and functional recovery and alters the immune response after spinal cord injury. *Lasers Surg Med* 36:171-85

Ehrlicher A, Betz T, Stuhmann B, Koch D, Milner V, Raizen MG, Kas J (2002) Guiding neuronal growth with light. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:16024-16028

Evans GR (2000) Challenges to nerve regeneration. *Semin Surg Oncol* 19:312-318

Gigo-Benato D, Geuna S, de Castro Rodrigues A, Tos P, Fornaro M, Boux E, Battiston B, Giacobini-Robecchi MG (2004) Low-power laser biostimulation enhances nerve repair after end-to-side neurorrhaphy: a double-blind randomized study in the rat median nerve model. *Lasers Med Sci* 19:57-65

Gigo-Benato D, Geuna S, Rochkind S (2005) Phototherapy for enhancing peripheral nerve repair: a review of the literature. *Muscle Nerve* 31:694-701

Gold BG, Udina E, Bourdette D, Navarro X (2004) Neuroregenerative and neuroprotective actions of neuroimmunophilin compounds in traumatic and inflammatory neuropathies. *Neurol Res* 26:371-380

Gudemez E, Ozer K, Cunningham B, Siemionow K, Browne E, Siemionow M (2002) Dehydroepiandrosterone as an enhancer of functional recovery following crush injury to rat sciatic nerve. *Microsurgery* 22:234-241

Hamilton GF, Keven Robinson T, Ray RH (1992) The effects of helium-neon laser upon regeneration of the crushed peroneal nerve. *J Orthop Sports Phys Therapy* 15:209-214

Lazar DA, Curra FP, Mohr B, McNutt LD, Kliot M, Mourad PD (2001) Acceleration of recovery after injury to the peripheral nervous system using ultrasound and other therapeutic modalities. *Neurosurg Clin N Am* 12:353-357

- Leung MC, Lo SC, Siu FK, So KF (2002) Treatment of experimentally induced transient cerebral ischemia with low energy laser inhibits nitric oxide synthase activity and up-regulates the expression of transforming growth factor-beta1. *Las Surg Med* 31:283-288
- Lundborg G (2002) Enhancing posttraumatic nerve regeneration. *J Peripher Nerv Syst* 7:139-140
- Lundborg G (2005) *Nerve Injury and Repair*, 2nd Edition, Churchill Livingstone Edinburgh
- Miloro M, Halkias LE, Mallery S, Travers S, Rashid RG (2002) Low-level laser effect on neural regeneration in Gore-Tex tubes. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 93:27-34
- Oliveira NM, Parizzotto NA, Salvini TF (1999) GaAs (904-nm) laser radiation does not affect muscle regeneration in mouse skeletal muscle. *Lasers Surg Med* 25:13-21
- Rochkind S, Nissan M, Barr-Nea L, Razon N, Schwartz M, Bartal A (1987) Response of peripheral nerve to He-Ne laser: experimental studies. *Lasers Surg Med* 7:441-443
- Rochkind S, Ouaknine GE (1992) New trend in neuroscience: low-power laser effect on peripheral and central nervous system (basic science, preclinical and clinical studies). *Neurol Res* 14:2-11
- Samii M, Carvalho GA, Nikkhah G, Penkert G (1997) Surgical reconstruction of the musculocutaneous nerve in traumatic brachial plexus injuries. *J Neurosurg* 87:881-886
- Saper CB, Sawchenko PE (2003) Magic peptides, magic antibodies: guidelines for appropriate controls for immunohistochemistry. *J Comp Neurol* 465:161-163
- Sarikcioglu L, Oguz N (2001) Exercise training and axonal regeneration after sciatic nerve injury. *Int J Neurosci* 109:173-177
- Shamir MH, Rochkind S, Sandbank J, Alon M (2001) Double-blind randomized study evaluating regeneration of the rat transected sciatic nerve after suturing and postoperative low-power laser treatment. *J Reconstr Microsurg* 17:133-137
- Turner J, Hode L (2003) *Laser Therapy - Clinical Practice and Scientific Background*, Prima Books Grängesberg
- Van Breugel HH, Bar PR (1993) He-Ne laser irradiation affects proliferation of cultured rat Schwann cells in a dose-dependent manner. *J Neurocytol* 22:185-190
- Varejao AS, Cabrita AM, Meek MF, Bulas-Cruz J, Melo-Pinto P, Raimondo S, Geuna S, Giacobini-Robecchi MG (2004) Functional and morphological assessment of a standardized rat sciatic nerve crush injury with a non-serrated clamp. *J Neurotrauma* 21:1652-1670
- Wollman Y, Rochkind S, Simantov R (1996) Low power laser irradiation enhances migration and neurite sprouting of cultured rat embryonal brain cells. *Neurol Res* 18:467-470

Muscle Electrostimulation Impairs Early Rat Sciatic Nerve Functional Recovery after
Crush Injury

Davilene Gigo-Benato¹, Stefano Geuna², Thiago Luís de Russo¹, Natalia Rezende de S. R. Domingues¹, Nivaldo Antonio Parizotto¹

¹ *Department of Physiotherapy, Federal University of São Carlos, Via Washington Luís, Km 235 - C.P.676 - CEP. 13.565-905 – São Carlos- SP- Brasil*

² *Department of Clinical and Biological Sciences, University of Turin, San Luigi Hospital, Regione Gonzole 10, 10043 – Orbassano, TO, Italy*

Corresponding author: Davilene Gigo-Benato

Department of Physiotherapy

Federal University of Sao Carlos

Via Washington Luis km 235

C.P.676 - CEP. 13.565-905 –

São Carlos- SP- Brasil

E-mail: benatodavilene@yahoo.com .br

FAX: 00 55 16 3361-2081

Telephone: 00 55 16 33 51 86 30

Muscle Electrostimulation Impairs Early Rat Sciatic Nerve Functional Recovery after Crush Injury

Abstract

Neuromuscular recovery after peripheral nerve lesion depends on the regeneration of severed axons which re-establish their functional connection with the denervated muscle. In the rat sciatic nerve crush experimental model, axon regeneration is very fast and functional recovery begin to be detectable by means of walking track analysis already after two weeks after injury. Thus, this experimental model can be used to investigate the early effects of different types of stimulating protocols on neuromuscular recovery. In the present study we carried out electrostimulation guided by electrodiagnosis on the muscle tibialis anterior after sciatic nerve crush injury in the rat. A total of five electrostimulation sessions were administered every other day starting from day-3 postinjury until the end of the experiment (day-14). Functional recovery was recorded by means of walking track analysis at day-7 and day-14 and the sciatic functional index was calculated. Muscle tibialis anterioris were weighted and morphometry of muscle fibers was carried out. Regenerated sciatic nerves were analysed by light and confocal microscopy. Results showed no significant differences in muscle weight and muscle fiber cross-sectional size between treated and untreated animals. Also light and cofocal microscope analysis of regenerated nerves revealed no difference in relation to muscle electrostimulation. On the contrary, walking track analysis showed that functional recovery at day-14 post-injury was significantly lower in the electrostimulated rats in comparison to the untreated animals. Taken together the results of the present study suggest that, unlike direct nerve electrostimulation, muscle electrostimulation in early posttraumatic phases should be used with caution since it might hinder neuromuscular functional recovery.

INTRODUCTION

Nerve lesions represent a high cost for the society (Evans, 2001). In many cases, nerve lesions result from traumas that range from simple nerve fiber compression to complete transection (Sunderland, 1978). When nerve fiber continuity is interrupted, the distal stump undergoes a particular series of tissue changes that is named Wallerian degeneration (Lundborg, 2005). The proximal axon stump can then regenerate along the nerve tract distal to the lesion and reach the peripheral target (muscle fibers and sensory receptors) leading to the recovery of the function lost (Lundborg, 2005). However, the degree of recovery can be highly variable (Samii et al., 1997; Lundborg, 2002) and it is thus very important to seek effective posttraumatic physiotherapeutic protocols to improve the final degree of functional recovery in patients that suffered of a peripheral nerve lesion (Evans, 2000; Lundborg, 2002). One of the therapeutic approaches proposed to improve posttraumatic neuromuscular recovery is the electrical stimulation, applied either to the severed nerve (Brushart et al., 2002,2005) or to the denervated muscles (Marqueste et al., 2002, 2004). As regards the latter approach, experimental studies carried out so far have produced contradictory results. While some authors have shown that muscle electrostimulation improves nerve regeneration (McDevitt et al., 1987; Kerns and Lucchinetti, 1992; Marqueste et al., 2002,2004; Cheng and Lin, 2004), others found no difference in the extent of regeneration between treated and untreated groups (McGinnis and Murphy, 1992).

To further investigate this issue, the present study was aimed at investigating early functional and morphological changes induced by muscle electrostimulation, guided by electrodiagnosis, after the application of a standardized crush lesion in the rat sciatic nerve model (Varejao et al., 2004). This type of lesion is characterised by the begin of functional recovery detectable by walking track analysis already in the second posttraumatic week and thus is particularly suitable for investigating early nerve recovery.

MATERIAL AND METHODS

Twenty-seven Wistar adult male rats weighting were used in this study. Good laboratory animal practice was observed according to the international standards for animal experimentation and following approval by our local Institution's Animal Care and Ethics Committee. Animals were divided into three groups ($n = 9$). The first of which included normal (unoperated) rats, while the other two groups (experimental) included rats that were subjected to a standardized crush lesion.

For inducing the crush lesion, rats were anaesthetised with an intraperitoneal injection of a premixed solution containing ketamine (95 mg/kg) plus xylazine (12 mg/kg). The skin was shaved and cleaned with 10% povidone iodine. A 2-cm-long incision was made on the skin through a gluteal approach and the left sciatic nerve was exposed. A non-serrated clamp, exerting a force of 54 N (Beer et al., 2001), was used for a period of 30 seconds to create a 3-mm-long crush injury, 10 mm above the bifurcation, in order to get a good reproducibility of the axonometric lesion (Varejao et al., 2004). The starting diameter of the sciatic nerve was about 1 mm, during the crush the nerve flattens to a new diameter of 2 mm, giving a final pressure of $p=9$ MPa. The nerves were kept moist with 37°C sterile saline solution throughout the surgical intervention. After surgery, animals were housed in single cages and fed rat chow and water ad libitum. For the first four days, acetaminophen was added to water for pain reduction.

Rats from one of the two crushed groups (group 3) received a total of five faradic current electrostimulation sessions guided by electrodiagnosis administered every other day starting from day-3 postinjury and until the end of the experiment. Under anaesthesia with, the skin of the lumbar spine region and of the tibialis anterior muscle region was shaved and cleaned. A 5-cm-diameter round electrode was placed on the lumbar region while a needle electrode was

placed on the tibialis anterior muscle. Before electrostimulation, electrodiagnosis was carried out the chronaxie of each muscle was determined. Faradic current electrical stimulation was then carried out on the basis of the obtained chronaxie value as follows: (a) when chronaxie was < 1 ms, a current with a pulse period (T) of 1 ms, pulse interval (R) of 20 ms was used; (b) when was chronaxie > 1 ms, a current with a T double of the chronaxie value and a R of 50 ms was used. In both treatment protocols, twenty 3s-long muscle contractions (separated by 6s) leading to maximal dorsiflexion of the ankle were performed for each muscle.

The assessment of nerve function recovery was carried out by calculating the sciatic functional index (SFI) as described by Bain et al. (1989). Animals were tested in a confined walkway measuring 42-cm-long and 8.2-cm-wide, with a dark shelter at the end. A white paper was placed on the floor of the rat walking corridor. The hind paws of the rats were pressed down onto a finger paint-soaked sponge, and they were then allowed to walk down the corridor leaving its hind footprints on the paper. Three measurements were taken from the footprints: (1) the print length (PL), i.e. the distance from the heel to the third toe; (2) the toe spread (TS), i.e. distance from the first to the fifth toe; and (3) the intermediary toe spread (ITS), i.e. distance from the second to the fourth toe. All three measurements were taken from the experimental (E) and normal (N) sides. The SFI was calculated according to the following equation:

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

Two weeks after surgery, all animals were euthanased and the sciatic nerve and the muscle tibialis anterior (TA) were carefully dissected from the operated right side avoiding mechanical injuries. To have a first indication on trophic variations, wet muscles were immediately weighted with a 100a precision balance (Denver Instruments, Denver, CO, USA)

TA muscles were then frozen in isopentane, previously frozen in liquid nitrogen. Muscle samples were then placed in plastic tubes and stored in freezer at -80°C . Histological serial cross-sections ($10\mu\text{m}$), cut transversely to the muscle main axis, were obtained with a HM 505E cryostat (Microm, Walldorf, Germany) at a level corresponding to the middle belly of the muscle. Sections were stained with toluidine blue for morphological evaluation. For muscle fiber morphometry, the cross-sectional area of one hundred randomly selected fibers was measured in the middle belly of each TA muscle, using a light microscope (Axioplan 2, Carl Zeiss, Jena, Germany) equipped with a digital camera (marca e produtor) and the Axio Vision software (Carl Zeiss, Jena, Germany). A blind procedure was used for measurements.

The sciatic nerves were fixed in 10 % formalin for 3 h and then washed in phosphate buffer saline (PBS) until embedding. The specimens were dehydrated and embedded in paraffin and cut at $7\mu\text{m}$ perpendicular to the main nerve axis. For light microscope analysis, sections were stained with hematoxylin and eosin and Papanicolau stains and observed with a Leica DM400 microscope equipped with a Leica DFC320 digital camera. For immunohistochemistry and confocal laser microscopy, sections were incubated overnight with the anti-neurofilament-200kD (monoclonal, mouse, which recognizes the pig 200 kD subunit of neurofilaments, dilution 1:200, Sigma, St. Louis, MO). After washing in PBS, immunolabelling was carried out by incubating sections for 1h with goat anti-mouse IgG Alexa-Fluor-488-conjugated (dilution 1:200, Molecular Probes, Eugene, Oregon). The sections were finally mounted with a Dako fluorescent mounting medium and analyzed by a LSM 510 confocal laser microscopy system (Zeiss, Jena, Germany), which incorporates two lasers (Argon and HeNe) and is equipped with an inverted Axiovert 100M microscope. Confocal fluorescence images were taken using a 20x Plan-NEOFLUAR objective with a numerical aperture (NA) of 0.50 and a 40x Plan-NEOFLUAR objective with a NA of 0.75. An electronic zoom with a magnification ranging

from 1 to 8 was employed to obtain the magnifications indicated in the figures. To visualize Alexa-Fluor-488 fluorescence, we used excitation from 488-nm Argon laser line and emission passing through a band-pass (BP) 505-530 filter which passes wavelengths 505 nm to 530 nm to the detector.

All numerical data were subjected to statistical analysis by means of the one-way analysis of variance (ANOVA) followed by post-hoc multiple pair wise comparisons carried out using the Student-Newman-Keuls (SNK) tes. Statistical significance was established as $p < 0.05$.

RESULTS

Figure 1 shows the results of the functional assessment of posttraumatic sciatic nerve recovery. Statistical analysis showed that, as expected, the differences in the SFI between the pre-lesion (normal walking) and both post-lesion assessments were statistically significant ($p < 0.05$) for both experimental groups. The statistical comparison between the two experimental groups showed the presence of no significant ($p > 0.05$) difference in the pre-lesion baseline evaluation and in the assessment made at day-7 post-crush (SFI values around -90 indicate complete absence of sciatic nerve function). On the contrary, there was a significant ($p < 0.05$) difference between treated and untreated animals at day-14 post-crush: while control animals showed, as expected, the beginning of functional recovery, i.e. a mean SFI (-67.4 ± 16.5) significantly ($p < 0.05$) different than day-7, electrostimulated animals still showed a mean SFI of -88.9 ± 13.1 which is not significantly ($p < 0.05$) different from day-7, thus pointing to the persistence of the complete impairment of the sciatic nerve function.

Figure 2 compares the microscopic appearance of tibialis anterior muscles in normal (A), untreated (B) and treated (C) animals. Muscle fiber atrophy in both experimental groups was evident.

Figure 3 shows light (fig. 3A,C,E) and confocal (fig. 2B,D,F) imaging of normal (fig. 3A-B), untreated (C-D) and treated (E-F) animals. As expected, the differences between normal and regenerated nerves were evident. On the other hand, the comparison between treated and untreated nerves disclosed no major difference regarding both the histological organization (fig. 3C,E) of the nerve and the morphology of regenerating axons labelled by means of anti-neurofilament-200kD (fig. 2D,F).

Figure 4 shows the results of the quantitative assessment of muscle weight and figure 5 shows the results of the quantitative assessment of mean cross-sectional fiber size. As expected,

the difference between normal and experimental groups were significant ($p < 0.05$) confirming the occurrence of a muscle atrophy due to denervation. On the other hand, no statistically significant ($p > 0.05$) difference was detected between groups both in the pre- and post-lesion time.

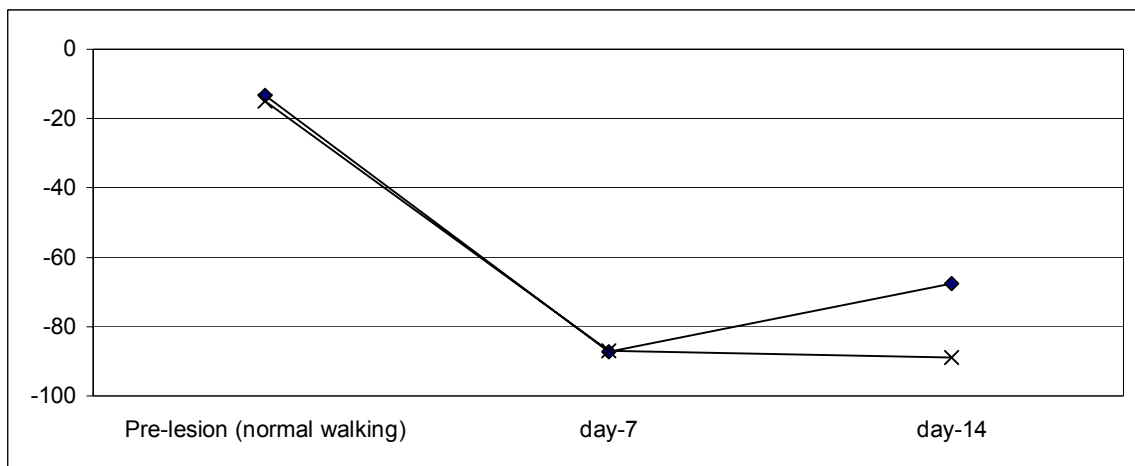


Figure 1. Functional deficit in the treated and untreated groups assessed by sciatic functional index calculation. At the lesion state the function was absolutely normal in all groups. At the first week after injury the values around -20 have lowered to -80; in the second week, the treated group stayed close to -80, while the untreated one, had reached around -60

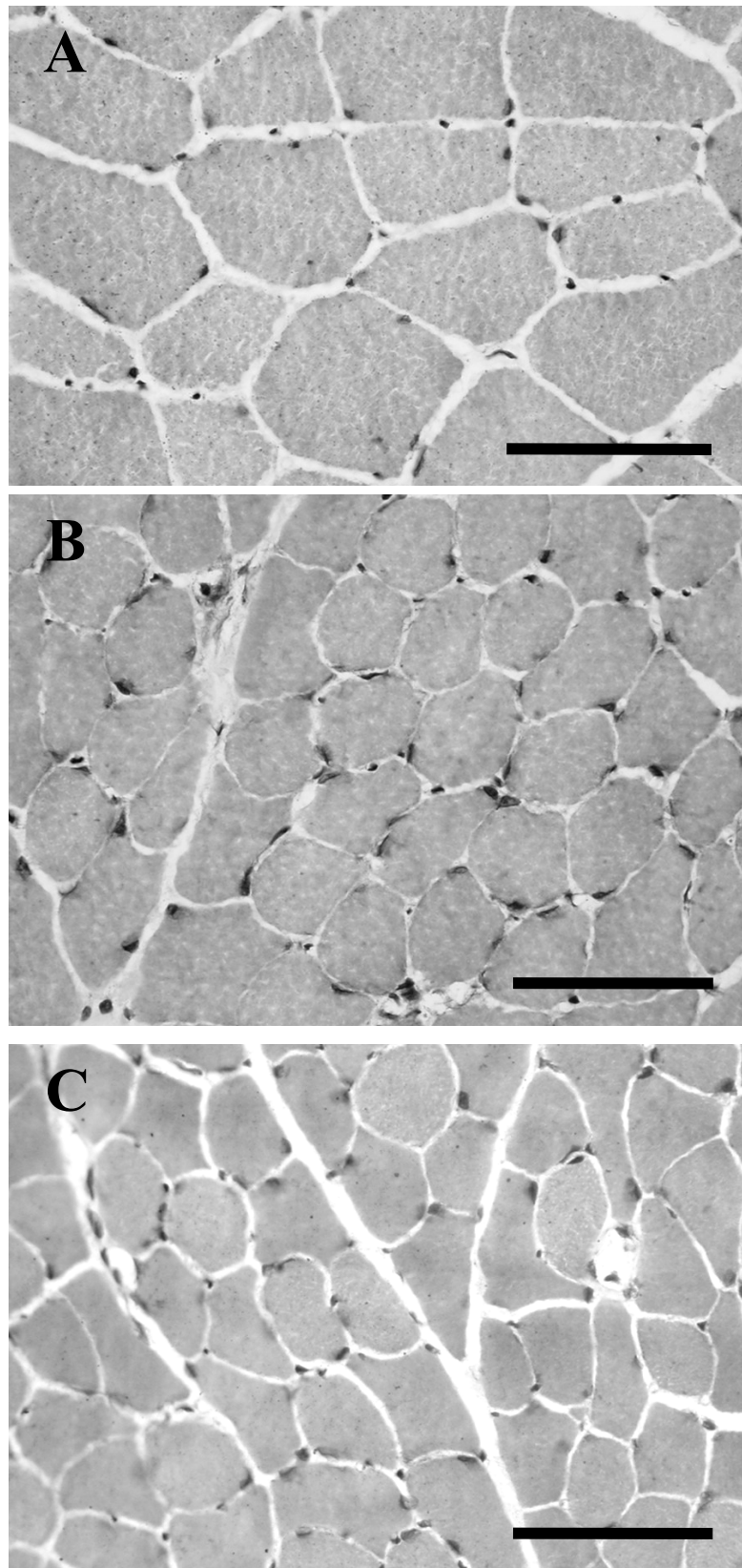


Figure 2. Histological cross-sections of tibialis anterior muscle fibers stained by toluidine blue. A. normal muscle; B. untreated denervated muscle; C. denervated muscle submitted to electrical stimulation. Scale bars = 40 μm. The treated e untreated groups, did not have any difference of sinze and shape between them, but both were different from the normal group.

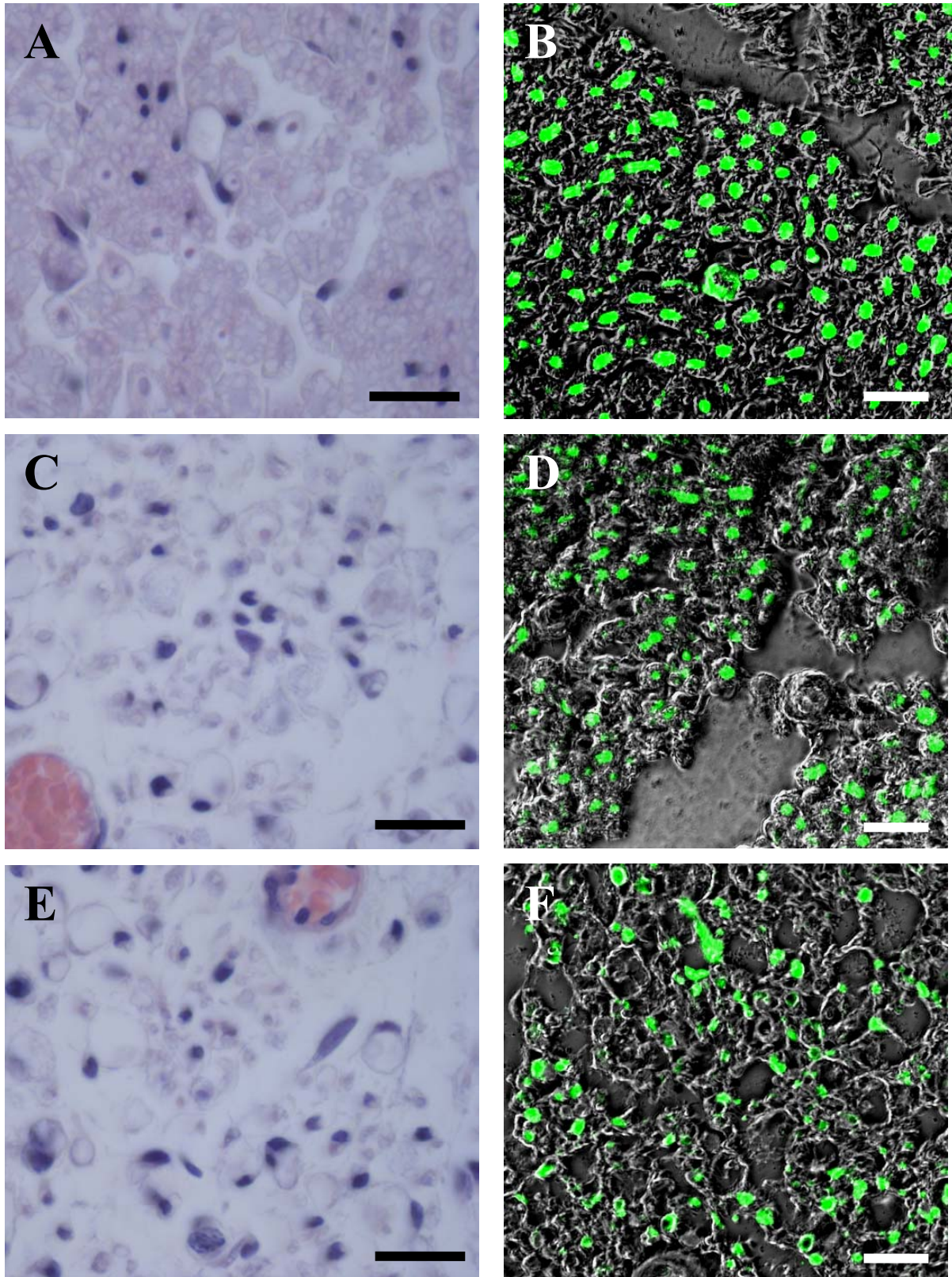


Figure 3. Light (hematoxylin and eosin) and confocal (anti-neurofilament-200kD immunostaining) imaging of sciatic nerve from normal (A-B) and untreated (C-D) and treated (E-F) animals. Scale bars = 20 μ m. The treated and the untreated nerves did not show any difference between them, but they have showed a structural and morphological difference, when related to the normal group.

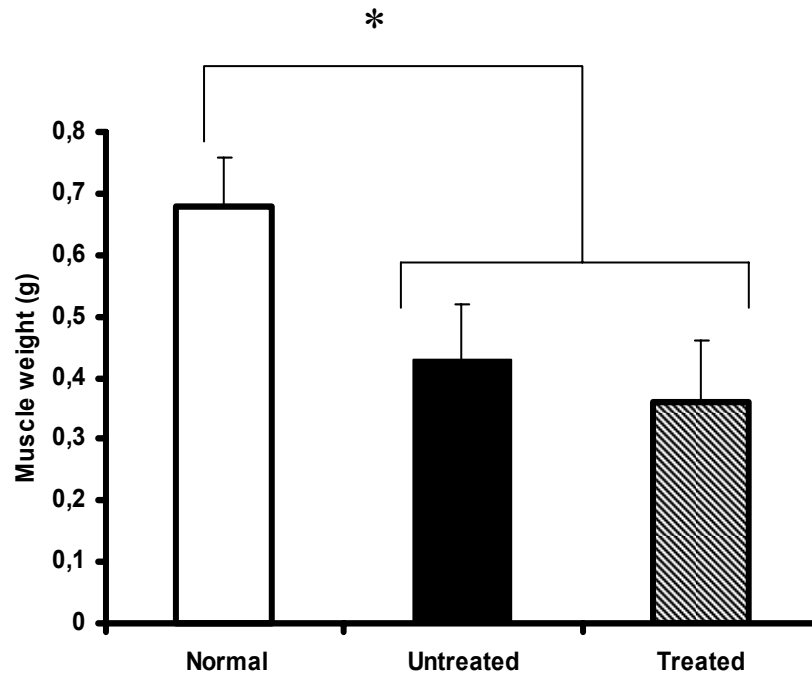


Figure 4. Mean weight of tibialis anterior muscles in normal muscle, untreated denervated muscle, and denervated muscle submitted to electrical stimulation. The treated and untreated muscle did not show any statistically differences ($p>0.05$) in their muscular weight, but the muscular weight in both groups were smaller when compared to the normal group ($p<0.05$).

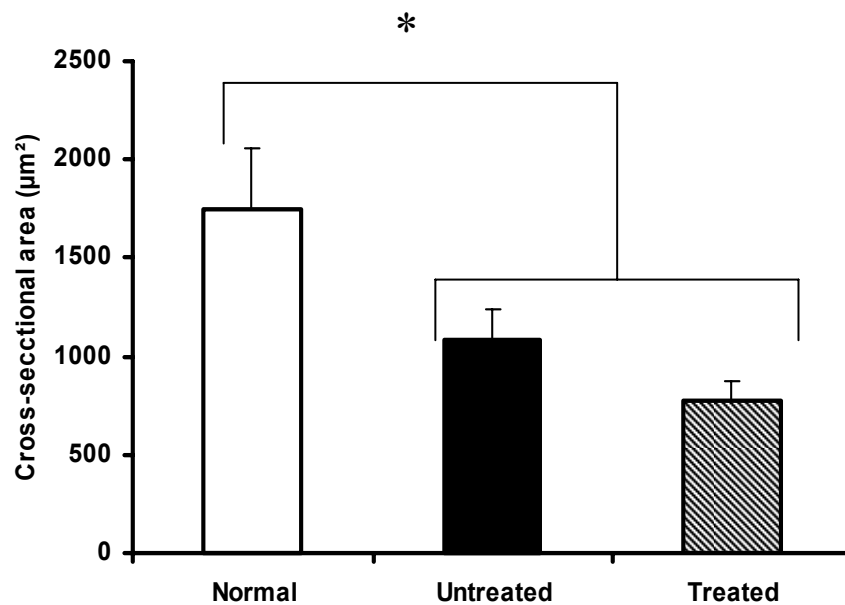


Figure 5. Mean cross-sectional area of tibialis anterior muscle fibers in normal muscle, untreated denervated muscle, and denervated muscle submitted to electrical stimulation. The treated and untreated muscle did not show any statistically differences ($p>0.05$) in their area of muscle fibers, but the muscular area in both groups were smaller when compared to the normal group ($p<0.05$).

DISCUSSION

The objective of this study was to investigate the early effects of muscle electrostimulation on nerve recovery after a standardized crush injury. Results showed that electrostimulation impaired functional recovery of crushed sciatic nerves. In fact, while the morphology of denervated muscle and regenerated nerve fibers was similar in treated and untreated animals, the early signs of functional recovery measured by the sciatic functional index was absent in treated animal.

These results are in contrast with data of previous experimental studies (McDevitt et al., 1987; Kerns and Lucchinetti, 1992; Marqueste et al., 2002,2004) which showed that electrostimulation improved nerve regeneration. However, it should be pointed out that Kerns and Lucchinetti (1992) found significant improvement in the twitch tension of crushed nerves only when the electrical stimulation was applied during the middle period (days 12– 21) and no differences were noted at either the early or later stages of recovery. These observation suggests that direct muscle electrostimulation might exert a stimulatory effect on nerve regeneration only in a specific window of time during the regeneration process and not earlier or later. Our data suggest that if muscle electrostimulation is administered very early, i.e. immediately after nerve lesion when axons are still regrowing along the distal nerve stump and have not reached the muscle, it might even exert an inhibitory effect on functional neuromuscular recovery.

However, the comparison between results obtained from different experimental studies on electrostimulation therapy should be dealt with caution for two reasons. First, electrostimulation protocols can vary relevantly from one study to the other regarding some key parameters such as pulse duration and pulse interval. Moreover, the baseline electrical activity of the muscle can influence the outcome of the treatment session. In this study, in order to reduce the interference

due to the variability in the baseline electrical activity of the muscle, electrical stimulation protocol was based on the preliminary determination of each muscle chronaxie.

The second reason while results from different experimental studies dealing with nerve regeneration should be compared with caution is the difficulty in reproducing a standardized nerve lesion (Varejão et al., 2004). To cope with this problem, in the present study we have employed a device for inducing a reproducible sciatic nerve crush injury has been recently realized (Beer et al., 2001) and standardized (Varejão et al., 2004). Results of the present study can thus represent a comparative baseline for future studies from our and other laboratories aimed at investigating the effects of electrostimulation (as well as of any other type of treatment) on posttraumatic nerve regeneration.

In conclusion, our data suggest that the effectiveness of electrical stimulation on posttraumatic nerve recovery remains open to question and, if not properly used in terms of the set up of the device and time of application, this type of physical therapy not only can be ineffective but can even inhibit the repair process. Therefore, future studies need to define exactly the clinical conditions and treatment protocols that can, in fact, improve the clinical outcome of patients that suffered for a peripheral nerve trauma.

REFERENCES

- Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg* 1989;83:129-138.
- Beer GM, Steurer J, Meyer VE. Standardizing nerve crushes with a non-serrated clamp. *J Reconstr Microsurg* 2001;17:531-534.
- Brushart TM, Jari R, Verge V, Rohde C, Gordon T. Electrical stimulation restores the specificity of sensory axon regeneration. *Exp Neurol* 2005;194:221-229.
- Brushart TM, Hoffman PN, Royall RM, Murinson BB, Witzel C, Gordon T. Electrical stimulation promotes motoneuron regeneration without increasing its speed or conditioning the neuron. *J Neurosci* 2002;22:6631-6638.
- Cheng WL, Lin CC. The effects of different electrical stimulation protocols on nerve regeneration through silicone conduits. *J Trauma* 2004;56:1241-126.
- Evans GR. Challenges to nerve regeneration. *Semin Surg Oncol* 2000;19:312-318.
- Evans GR. Peripheral nerve injury: a review and approach to tissue engineered constructs. *Anat Rec* 2001;263:396-404.
- Kerns JM, Lucchinetti C. Electrical field effects on crushed nerve regeneration. *Exp Neurol* 1992;117:71-80.
- Lundborg G. Enhancing posttraumatic nerve regeneration. *J Peripher Nerv Syst* 2002;7:139-140.
- Lundborg G. *Nerve Injury and Repair*, 2nd Edition. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2005. 248 p.
- Marqueste T, Decherchi P, Dousset E, Berthelin F, Jammes Y. Effect of muscle electrostimulation on afferent activities from tibialis anterior muscle after nerve repair by self-anastomosis. *Neuroscience* 2002;113:257-271.
- Marqueste T, Alliez JR, Alluin O, Jammes Y, Decherchi P. Neuromuscular rehabilitation by treadmill running or electrical stimulation after peripheral nerve injury and repair. *J Appl Physiol* 2004;96:1988-1995.
- McDevitt L, Fortner P, Pomeranz B. Application of weak electric field to the hindpaw enhances sciatic motor nerve regeneration in the adult rat. *Brain Res* 1987;416:308-314.
- McGinnis ME, Murphy DJ. The lack of an effect of applied d.c. electric fields on peripheral nerve regeneration in the guinea pig. *Neuroscience* 1992;51:231-244.
- Samii M, Carvalho GA, Nikkhah G, Penkert G. Surgical reconstruction of the musculocutaneous nerve in traumatic brachial plexus injuries. *J Neurosurg* 1997;87:881-886.

Sunderland S. *Nerve Injuries and their Repair—a Critical Appraisal*. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1991. 361 p.

Varejão AS, Cabrita AM, Meek MF, Bulas-Cruz J, Melo-Pinto P, Raimondo S, Geuna S, Giacobini-Robecchi MG. Functional and morphological assessment of a standardized rat sciatic nerve crush injury with a non-serrated clamp. *J Neurotrauma* 2004;21:1652-1670.

ABSTRACT: Posttraumatic nerve repair continues to be a major challenge of restorative medicine. Although enormous progress has been made in surgical techniques over the past three decades, functional recovery after a severe lesion of a major nerve trunk is often incomplete and sometimes unsatisfactory. It is thus particularly important to investigate clinical protocols to enhance nerve regeneration after surgical nerve repair. The present article reviews literature on one possible rehabilitation approach for enhancing nerve recovery, namely phototherapy. The number of experimental studies that have reported on the promoting action of phototherapy on peripheral nerve regeneration, together with the few known side effects related to the use of this type of physical therapy, make it possible to suggest that the time for broader clinical trials has come.

Muscle Nerve 31: 694–701, 2005

PHOTOTHERAPY FOR ENHANCING PERIPHERAL NERVE REPAIR: A REVIEW OF THE LITERATURE

DAVILENE GIGO-BENATO,¹ STEFANO GEUNA, MD,¹ and SHIMON ROCHKIND, MD²

¹Department of Clinical and Biological Sciences, University of Turin, San Luigi Hospital, Regione Gonzole 10, Orbassano, 10043 Italy

²Division of Peripheral Nerve Reconstruction, Department of Neurosurgery, Tel Aviv Sourasky Medical Center, Tel Aviv University, Tel Aviv, Israel

Accepted 30 December 2004

Recovery after a severe peripheral nerve injury depends on the regeneration of the transected fibers into the nerve segment distal to the lesion.³³ If nerve continuity is lost, surgery is necessary to reestablish continuity between the proximal and distal nerve stumps, either by direct suture if no nerve loss occurred,¹⁵ or by bridging the defect^{28,35,36,57} or inducing collateral sprouting from an adjacent nerve.⁵¹ Even in cases of old peripheral nerve injury, partial improvement is possible.⁴²

Although great advances in peripheral nerve surgery have occurred in the last 25 years,³³ no technique ensures total recovery and normalization of nerve function following repair³⁴ and, in general, the clinical results following proximally located nerve lesions have remained poor.⁵² Therefore, post-traumatic nerve repair still represents a major challenge of restorative medicine, and the need exists to find effective methods for enhancing nerve regeneration, especially after surgical nerve repair.^{15,18,34} Among the various proposed methods for enhanc-

ing nerve repair, phototherapy has received increasing attention over the last two decades. Although a pioneering report on the effects of laser phototherapy on the regeneration of traumatically injured peripheral nerves was published in the late 1970s,⁴¹ it is only since the late 1980s that scientific interest was kindled in this therapeutic approach for neural rehabilitation, leading to the publication of a number of studies that have shown positive effects of phototherapy on nerve regeneration.

The aim of the present article is to provide an overview of the literature that has accumulated over the last 15 years on the effects of phototherapy on peripheral nerve repair. The aim is to call attention to an issue that still requires much research to elucidate the biological mechanisms through which phototherapy exerts its effects on nerve tissue, and to provide clinicians with the basis for planning clinical trials on the use of phototherapy for enhancing posttraumatic nerve regeneration in patients.

THERAPEUTIC USE OF LIGHT (PHOTOTHERAPY)

The term phototherapy refers to the use of light for producing a therapeutic effect on living tissues. Although any source of light can be used to obtain a phototherapeutic effect, lasers represent the latest and most advanced light sources⁵⁸ and have become the most accepted technology for phototherapy. To dis-

Abbreviations: CGRP, calcitonin gene-related peptide; GAP-43, growth-associated protein-43; HeNe, helium neon

Key words: injury; nerve repair; neurorehabilitation; peripheral nerve; phototherapy; regeneration

Correspondence to: S. Geuna; e-mail: stefano.geuna@unito.it

© 2005 Wiley Periodicals, Inc.

Published online 1 March 2005 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI 10.1002/mus.20305

tinguish between the use of laser devices for phototherapy and their use in surgery, where the collimation of laser light leads to the emission of a narrow, intense beam of light and is used for precise tissue destruction (photothermal effect), the term "low-power laser therapy" is commonly used and is synonymous with phototherapy. In fact, light radiation intensities are so low that the resulting biological effects are ascribable to physical or chemical changes associated with the interaction of cells and tissues with the laser radiation, and not simply to a result of heating.⁵⁵ Although many scientists and clinicians find it difficult to believe that light energy can promote and upgrade metabolic processes that result in tissue repair,^{8,17} many experimental and clinical studies have reported the positive effects of phototherapy to promote the repair processes of various tissues and organs such as bones,²⁵ cartilage,³⁸ muscles,² tendons,⁴⁰ ligaments,¹⁹ and skin.¹ However, negative reports also have been published, for instance regarding the application of laser irradiation on ulcer healing.³²

The conflicting results from the use of phototherapy can be traced to several technical variables (in particular, wavelength, dose, and type of radiation) which, if not properly set, can undermine the eventual success of the procedure. In addition, the "negative" results of some studies that investigated light effects on "normal" cells and tissues were clearly hindered by the obvious consideration that phototherapy does not make normal cells and tissues "more normal"! Studies on the effects of phototherapy on the electrophysiology of normal nerves is a classic example of this confusion.^{5,7,10,14,24,31,43,56,62,63,66} Considering the complexity of this issue, this review of the literature will focus on studies in which phototherapy was used on posttraumatic or postsurgical peripheral nerve regeneration in order to determine whether the amount of data now available allows us to conclude that phototherapy should be considered as a truly promising therapeutic strategy for improving nerve regeneration and, if so, to delineate the most suitable protocols for its future clinical use.

EFFECTS OF PHOTOTHERAPY ON PERIPHERAL NERVE REPAIR

The first systematic studies on the effects of phototherapy on peripheral nerve regeneration were published in the late 1980s and were based on the use of the axonotmesis model.⁴³⁻⁴⁶ These studies, performed by assessing the effects of phototherapy on the crushed rat sciatic nerve with respect to various morphological, electrophysiological, and functional

parameters of posttraumatic nerve recovery, led to the conclusion that phototherapy is effective in promoting nerve recovery.⁴⁹ The phototherapy was delivered to the crushed nerve either transcutaneously or directly. The effects of this laser therapy were measured both in the short-term, i.e., within minutes,^{43,49} and in the long-term, i.e., over days and months.^{43-45,49}

In the short-term model, direct irradiation of the nerve was undertaken through the open wound.^{46,49} The rat sciatic nerve was stimulated via special hook electrodes directly attached to the nerve and the compound nerve action potential was measured. A variety of wavelengths were applied and 540 nm, 632.8 nm, and 780 nm were found to be most effective.

In the long-term model, the rat sciatic nerve was stimulated with needle electrodes and the compound muscle action potentials were recorded from the corresponding gastrocnemius muscle. The authors found that electrophysiological activity dropped as expected in the nonirradiated nerves following the crush injury, but the use of phototherapy (wavelength 632.8 nm, energy density 10 J/cm²) decreased this phenomenon after the crush and in the long term.^{44,45,49} Furthermore, when phototherapy was delivered to both the crushed nerve and the corresponding segments of the spinal cord, the recovery time and quality of regeneration of the nerve improved, compared to irradiation of the nerve alone.^{50,53} Phototherapy enhanced axonal sprouting in the crush-injured sciatic nerve,^{44,45,49} thus accelerating recovery. In addition, a beneficial effect of phototherapy was found not only in the laser-treated nerve, but in the corresponding segments of the spinal cord as well,⁴⁸ where laser treatment significantly decreased the degenerative changes in neurons and induced proliferation of both astrocytes and oligodendrocytes. This suggests a higher metabolism in neurons and a better ability to produce myelin under the influence of laser treatment.

Subsequent experimental studies using phototherapy after crush injuries were in agreement with the above-reported series of experiments, demonstrating that phototherapy promotes posttraumatic nerve regeneration of the sciatic,^{27,54} peroneal,²⁶ and facial nerves.³ Khullar et al.,²⁷ applying 820-nm infrared stimulation (48 J/cm²) transcutaneously for 28 days, starting from the first postoperative day, showed faster functional recovery in treated animals than untreated controls, as measured by walking track analysis. Very similar results were obtained in a more recent study in which 650-nm continuous laser radiation was applied transcutaneously to the

crushed rat sciatic nerve for the first 5 postoperative days only,⁵⁴ suggesting that phototherapy is most effective when applied during the early posttraumatic period. A study by Hamilton et al.²⁶ was performed on rabbits (a species that, in comparison to the rat, has a weaker nerve regeneration potential); 15 daily transcutaneous applications of 632.8-nm laser radiation (3.52 J/cm^2) on crushed peroneal nerves, starting from the first postoperative day, led to a significantly improved recovery than in untreated animals, as assessed by evoked motor potentials. A study by Anders et al.³ on the crushed facial nerve represents the most complete comparison of different wavelengths (361 nm, 457 nm, 514 nm, 632.8 nm, 1061 nm). The results were in agreement with all other previously cited studies and showed that transcutaneous phototherapy, carried out daily over the first postoperative week, led to a significant increase in the rate of regeneration of facial nerve axons in comparison to untreated animals, as demonstrated by the higher number of motor neurons retrogradely labeled with horseradish peroxidase³ and an earlier return of choline acetyltransferase immunoreactivity⁴ in the facial motor nucleus. All wavelengths used proved to exert a stimulatory effect on posttraumatic nerve regeneration, but better results were obtained using 632.8-nm biostimulation.

Only one recent study⁶ reported that phototherapy had no effect on nerve recovery. Rats received a bilateral sciatic nerve crush followed by 904-nm phototherapy with different doses (0.31 J/cm^2 , 2.48 J/cm^2 , and 19 J/cm^2) and were then assessed by means of electrophysiological and morphological analyses, which revealed no significant intergroup differences in any parameter. The results of this study are, however, biased by a main element that could account for the negative results obtained, namely the use of the contralateral “untreated” side as the control. In fact, since phototherapy also can exert effects on nerve regeneration systemically,⁴⁷ the use of the contralateral side as a control is inappropriate in this context.

Four recent experimental studies have added important new information to the results obtained using the crush injury model by reporting on the use of phototherapy on surgically repaired peripheral nerves. In the first study,⁵³ postoperative phototherapy was shown to be effective for promoting nerve regeneration in cases of complete nerve transection followed by direct surgical repair. This “double-blind” randomized study evaluated regeneration of the rat transected sciatic nerve after end-to-end suturing and postoperative phototherapy. A 780-nm laser wavelength was applied transcutaneously for 30

min daily for 21 consecutive days to corresponding segments of the spinal cord and to the injured sciatic nerve. Positive somatosensory evoked responses were found in 69% of the irradiated rats and in 18% of the nonirradiated rats. Immunohistochemical staining in the laser-treated group showed more intensive axonal growth and better quality of the regenerative process due to an increased number of large- and medium-diameter axons. These findings suggest that phototherapy enhances the regenerative processes of peripheral nerves after complete transection and surgical anastomosis and can be used as a complementary treatment.

The second study³⁷ investigated the effects of postoperative phototherapy on rabbit inferior alveolar nerves repaired by means of tubulization with Gore-Tex tubes. The results showed that phototherapy can promote neural regeneration along a synthetic tube used to bridge a nerve defect. Inferior alveolar nerves were lesioned and repaired bilaterally while only one side received transcutaneous 820–830-nm phototherapy (29 J/cm^2) for 4 consecutive days, starting from day 1 postoperatively, followed by six additional phototherapy sessions once per week. Results of the morphological investigation of repaired nerves showed an increase in nerve fiber density in the treated compared to the untreated side.

In the third study,^{21,23} prominent positive effects on nerve regeneration also were found by administering phototherapy on the rat median nerve repaired by termino-lateral (end-to-side) neurorrhaphy on the ulnar intact nerve. Operated animals receiving phototherapy three times per week for 3 weeks, starting from day 1 postoperatively, were compared to operated animals that received sham treatment (i.e., application from a switched-off laser device). The lasers (808 nm and 905 nm) used for transcutaneous biostimulation had an energy density at the point of entry of 29 J/cm^2 and 40 J/cm^2 , respectively. Results of this “double-blind” randomized study showed that phototherapy induced a significantly faster myelination of the regenerated nerve fibers and recovery of muscle mass, resulting in a significantly faster improvement of function in comparison to controls.

The use of the term “double-blind” for describing two of the three above-mentioned studies^{23,53} deserves an explanation since this term is traditionally used to refer to blindness of patient and investigator during clinical studies. In these experimental studies, double-blinding referred to (1) the surgeons, who performed all surgical interventions prior to the animals being randomly assigned to one

of the experimental groups and (2) the evaluators, who carried out all postoperative assessments on animals and tissue samples identified by encrypted code and not by animal group.

Most recently, in the fourth study, Chen et al.¹³ reported the occurrence of a suppressive effect of 904-nm pulsed laser emission (energy density ranging from 2.33 to 15.5 J/cm²) on rat sciatic nerve regeneration along silicone rubber tubes used to bridge a 10-mm-long gap. The negative results of this study are difficult to interpret since they were obtained in an experimental model that differs from all others in several aspects: (1) the use of silicone rubber nerve guides (which could have interfered with light); (2) the use of high-frequency (5–20 kHz) pulsed radiation; (3) the start of phototherapy 1 week after surgery; and (4) the prolonged stimulation (for 2 months). However, these results reveal that if improper stimulation protocols are used, phototherapy not only can be ineffective but also can preclude nerve recovery.

HYPOTHESES ON THE POSSIBLE MECHANISMS OF ACTION OF PHOTOTHERAPY ON THE NERVOUS TISSUE

During the last decade, great advances have occurred in understanding the cellular and molecular interactions of phototherapy with biological structures. However, the mechanisms of action of phototherapy on living organisms are still far from completely elucidated.⁵⁸ On the basis of results obtained to date, especially from *in vitro* studies, a number of theories have been advanced to explain the occurrence of phototherapy-related changes in biological structures, such as an increase of ATP synthesis²⁰ or of cell proliferation.²⁹ Any detailed discussion is beyond the scope of this article, so we refer only to certain studies that, in our opinion, have provided interesting information concerning the interactions of phototherapy with nervous tissue, and especially with peripheral nerves. The key observation, with respect to peripheral nerve regeneration, has been provided by the *in vitro* studies that showed that phototherapy induced massive neurite sprouting and outgrowth in cultured neuronal cells.^{64,65} It could thus be tentatively accepted that phototherapy directly stimulates terminal axonal sprouting *in vivo* as well, when axons are transected, or collateral sprouting in cases of a terminolateral suture.²³ A recent article⁵⁴ provided a possible molecular explanation by demonstrating an increase in growth-associated protein-43 (GAP-43) immunoreactivity in early stages of rat sciatic nerve regeneration after

phototherapy. Another study⁵⁵ showed that application of phototherapy upregulates calcitonin gene-related peptide (CGRP) mRNA expression in facial motor nuclei after axotomy. By altering the intensity or temporal pattern of injury-induced CGRP expression, phototherapy may thus optimize the rate of regeneration, target innervation, and neuronal survival of axotomized neurons.⁵⁵

The possibility that phototherapy of lesioned peripheral nerves exerts its action by reducing the degenerative changes in the corresponding spinal cord neurons was suggested in a study on rat crushed sciatic nerve, which showed that postoperative chromatolysis and neuronal atrophy are less extensive in treated animals than controls.⁴⁸ Another possible mechanism of action of phototherapy on nervous tissue is a neuroprotective action that might facilitate the regenerative process of nerve fibers. In fact, it has been shown that phototherapy suppresses nitric oxide activity (a neurotoxic agent) and upregulates the expression of transforming growth factor β 1 (TGF- β 1), a neuroprotective agent, after stroke in rats.³⁰

A particularly fascinating hypothesis is that phototherapy can guide neuronal growth cones *in vitro*, perhaps due to the interaction with cytoplasmic proteins and, particularly, to the enhancement of actin polymerization at the leading axon edge.¹⁶ Besides the direct effect on growing axons, the experimental demonstration that laser irradiation can stimulate the proliferation of rat Schwann cells *in vitro*⁵⁹ points to another possible mechanism through which phototherapy can exert an effect on peripheral nerve regeneration. Considering that the presence of an adequate number of lively Schwann cells is a key factor for the success of the nerve regeneration,²² the gliotrophic action of phototherapy could represent a strong indication in favor of its use for posttraumatic or postsurgical nerve repair.

On the basis of the above-reported literature overview, it can be concluded that the effects of phototherapy on peripheral nerves are likely to be mediated by multiple mechanisms of action exerted not only on axons. Future studies aimed at elucidating the biological effects of phototherapy on nerve regeneration should be focused also on nonneuronal elements of the nerve, such as Schwann cells, perineurial cells, macrophages, and mast cells.

CLINICAL APPLICATION OF PHOTOTHERAPY

Although not all authors agree on the efficacy of phototherapy, a general consensus exists concerning the relative safety of this type of treatment for which

side effects rarely occur^{11,12,58} and only a few contraindications^{39,58} have been established.

One of the most important clinical indications for phototherapy is for the relief of pain. In fact, it is only for this indication that biostimulation lasers have been approved for marketing by the U.S. Food and Drug Administration through the premarket notification/510(k), and many studies have demonstrated the efficacy of phototherapy in various pain syndromes.⁵⁸ Although the mechanisms through which laser-induced analgesia is mediated are largely unknown, the observation that the best results are frequently obtained when peripheral nerves are irradiated⁶¹ suggests that the analgesic action of phototherapy are due, at least in part, to a direct effect on nerve fiber function.

Besides its use for pain relief, the experimental studies mentioned earlier show that a promising field of application of phototherapy on peripheral nerves is for accelerating and improving the post-traumatic or postoperative regeneration process. The first randomized, double-blind, placebo-controlled trial carried out on the clinical use of 780-nm laser phototherapy in patients suffering from long-term, severe incomplete peripheral nerve injury led to promising positive results. Eighteen patients were randomly assigned placebo (nonactive light: diffused LED lamp) or low-power laser irradiation (wavelength 780 nm, power 250 mW). For 21 consecutive daily sessions, laser or placebo irradiation was applied transcutaneously for 3 h to the injured peripheral nerve area and for 2 h to the corresponding segments of the spinal cord. Clinical and electrophysiological assessments were done at baseline, at the end of the 21 days of treatment, and 3 and 6 months thereafter. The results showed statistically significant improvement in motor function in the previously paralyzed limbs of the laser-irradiated group ($P = 0.0001$) compared to the placebo group. Electrophysiological analysis also showed statistically significant improvement in recruitment of voluntary muscle activity in the laser-irradiated group ($P = 0.006$), compared to placebo (Rochkind et al., in preparation).

FUTURE STUDIES

To facilitate the overall evaluation of experimental studies carried out on the effects of phototherapy on peripheral nerve regeneration, Table 1 lists and summarizes the main features of each study. Among the 11 listed studies performed in nine different laboratories worldwide, 7 were carried out on the crush lesion model, whereas 4 were on more severe types

of nerve lesions (i.e., complete transections) that required surgical repair. Most of these experimental studies revealed that phototherapy promotes nerve recovery with respect to at least some of the assessment parameters investigated, with the exception of two studies.^{6,13}

In assessing the wide agreement reached by most experimental studies, the higher tendency for publishing positive rather than negative results in biomedicine, the so-called positive-findings publication bias,⁶⁰ should be considered; it can represent a bias towards an overestimation of the positive effects of phototherapy, as well as of any other therapeutic strategy.

On the basis of this literature overview, certain recommendations can be made concerning the choice of a treatment protocol for those planning future experimental studies and clinical trials of phototherapy for enhancing posttraumatic nerve regeneration.

Type of Laser and Wavelength. Earlier studies used HeNe (helium neon) lasers to produce a visible wavelength (632.8 nm),^{3,26,44,45} whereas more recent studies have used semiconductor lasers to produce near-infrared wavelengths (780–830 nm). Although the only article that directly compared visible and infrared wavelengths concluded that the visible 632.8-nm emission is more effective for stimulating nerve regeneration than infrared 1061-nm emission,³ the increase in use of infrared laser devices is justified by their higher skin penetration.⁵⁸ As significant positive effects in experimental studies were obtained with both visible and near-infrared wavelengths, it seems that both laser types can be used to promote posttraumatic nerve regeneration. The worse results were obtained using longer wavelengths (> 904 nm), so their use should be discouraged.

Energy Densities and Emission Time. Analysis of the published results showed that phototherapy at different levels of energy density (dose), from less than 10J/cm² to more than 150J/cm², can be effective in influencing nerve repair. The same is true for treatment times, which have ranged from less than 1 min up to 90 min. Thus, these observations suggest that light exerts a positive effect on regenerating nerves within large ranges of both energy density and emission time.

Type of Light Emission. Light emission can be continuous or pulsed. Eight of the 11 studies reviewed in Table 1 used continuous emission; the two that used

Table 1. Summary of experimental studies of phototherapy effects on peripheral nerve regeneration.

Reference no.	Type of nerve lesion/repair	Preparation	Laser type	Wavelength (nm)	Emission time	Treatment protocol	Outcome measure	Results/effects*
44	Crush injury	Rat sciatic nerve	HeNe (continuous)	632.8	14 min	Start on day 1 for 20 consecutive days	Electrophysiological, morphological	Positive
45	Crush injury	Rat sciatic nerve	HeNe (continuous)	632.8	7 min	Start on day 1 for 20 consecutive days	Electrophysiological, morphological	Positive
26	Crush injury	Rabbit peroneal nerve	HeNe (continuous)	632.8	3 min	Start on day 1 for 15 consecutive days	Electrophysiological	Positive
3	Crush injury	Rat facial nerve	HeNe (continuous)	632.8	90 min	Start on day 1 for 7–9 consecutive days	Morphological	Positive
27	Crush injury	Rat sciatic nerve	GaAIs	820	85 s	Start on day 1 for 28 consecutive days	Functional, electrophysiological, morphological	Positive
54	Crush injury	Rat sciatic nerve	Semiconductor (continuous)	650	5 min	Start on day 1 for 5 consecutive days	Functional, morphological	Positive
6	Crush injury	Rat sciatic nerve	GaAs (pulsed)	904	15 min	Start on day 1 for 7 consecutive days	Electrophysiological, morphological	Null
53	Termino-terminal neurorrhaphy	Rat sciatic nerve	GaAIs (continuous)	780	30 min	Start on day 1 for 21 consecutive days	Electrophysiological, morphological	Positive
37	Tubulization repair (Gore-Tex)	Rabbit inferior alveolar nerve	GaAIs (continuous)	820–830	90 s	Start on day 1 for 4 consecutive days, and then once a week for 6 weeks	Morphological	Positive
23	Termino-lateral neurorrhaphy	Rat median nerve	InGa(Al)As (continuous); InGaAs (pulsed)	808 905	39 s 72 s	Start on day 1 for 3 weeks, 3 days per week	Functional, morphological	Positive
13	Tubulization repair (silicone rubber)	Rat sciatic nerve	GaAs (pulsed)	904	2 min	Start on week 2 for 7 weeks, every other day	Electrophysiological, morphological	Negative

*"Positive" means that phototherapy induced a statistically significant improvement of nerve repair, for at least one of the outcome parameters measured, in comparison to untreated controls; "null" means no significant difference observed; "negative" means that nerve repair in treated animals was significantly worse than controls, for at least one of the outcome parameters.

only pulsed emission reported either null⁶ or negative results.¹³ Finally, the study²³ that used both types of emission showed better results with the continuous emission. Since, without exception, all the published studies that used continuous emission have led to positive results, this type of light emission should be the first choice for the promotion of peripheral nerve repair.

Treatment Protocol. With only one exception,¹³ all studies have adopted a similar treatment protocol based on the early use of phototherapy (on the first postoperative day) followed by regular (usually daily) treatments over a period ranging from 5 days to 1 month. The only study in which the commencement of treatment was delayed to the second postoperative week led to negative results.¹³ Future studies should investigate more extensively the effects of

delayed phototherapy on peripheral nerve regeneration, but the results of the available studies suggest that future clinical trials should be based initially on "immediate" posttraumatic or postoperative treatment.

Type and Site of Application. In most studies, phototherapy was applied transcutaneously at the site corresponding superficially to the point of nerve lesion or repair. Since this procedure has led to good outcome results, transcutaneous application at the lesioned or repaired nerve site (which is a much less invasive procedure than direct nerve irradiation) should be the preferred choice of light application for patients in future clinical trials.

In conclusion, the real effectiveness of phototherapy in physical therapy is still under debate.^{9,11,12,32,58} In fact, in spite of the number of

published studies, the many variables that could influence the outcome of phototherapy (especially regarding the type and set up of the instrument used), make it difficult to compare results. A need still clearly exists for more rigorous research, both basic and clinical, to define the efficacy of phototherapy in various clinical contexts.

As regards peripheral nerve repair, our review revealed that all experimental studies but two^{6,13} showed phototherapy to promote recovery from posttraumatic/postoperative nerve injury.^{3,4,23,26,27,37,44,45,53,54} Although several effective microsurgical techniques are available for peripheral nerve repair, the need exists to discover effective postoperative rehabilitation techniques to increase the degree of functional recovery after surgery.³⁴ Recent experimental studies have shown that phototherapy is effective in influencing nerve regeneration, not only in cases of axonotmesis, but also with the more severe neurotmesis lesions repaired by means of microsurgical techniques, such as end-to-end neurorrhaphy⁵³ and end-to-side neurorrhaphy.^{21,23}

Besides providing further confirmation of the effectiveness of phototherapy for promoting post-traumatic/postoperative nerve recovery, future clinical trials need also to define the most suitable therapeutic protocols for various clinical situations, in particular with respect to the characteristics of laser set up, site of irradiation, and length of treatment, keeping in mind that inadequate stimulation protocols may not only be ineffective but may also exert a suppressive effect on nerve regeneration.¹³

This work was supported by grants of the MIUR (Italian Ministry of Education, University and Research).

REFERENCES

- Alam M, Dover JS. Nonablative laser and light therapy: an approach to patient and device selection. *Skin Therapy Lett* 2003;8:4–7.
- Amaral AC, Parizotto NA, Salvini TF. Dose-dependency of low-energy HeNe laser effect in regeneration of skeletal muscle in mice. *Lasers Med Sci* 2001;16:44–51.
- Anders JJ, Borke RC, Woolery SK, Van de Merwe WP. Low power laser irradiation alters the rate of regeneration of the rat facial nerve. *Lasers Surg Med* 1993;13:72–82.
- Anders JJ, Geuna S, Rochkind S. Phototherapy promotes regeneration and functional recovery of injured peripheral nerve. *Neurol Res* 2004;26:233–239.
- Bagis S, Comelekoglu U, Sahin G, Buyukakilli B, Erdogan C, Kanik A. Acute electrophysiologic effect of pulsed gallium-arsenide low energy laser irradiation on configuration of compound nerve action potential and nerve excitability. *Lasers Surg Med* 2002;30:376–380.
- Bagis S, Comelekoglu U, Coskun B, Milcan A, Buyukakilli B, Sahin G, et al. No effect of GA-AS (904 nm) laser irradiation on the intact skin of the injured rat sciatic nerve. *Lasers Med Sci* 2003;18:83–88.
- Balaban P, Esenaliev R, Karu T, Kutomkina E, Letokhov V, Oraevsky A, et al. He-Ne laser irradiation of single identified neurons. *Lasers Surg Med* 1992;12:329–337.
- Bartels KE. Lasers in veterinary medicine—where have we been, and where are we going? *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2002;32:495–515.
- Basford JR. Low intensity laser therapy: still not an established clinical tool. *Lasers Surg Med* 1995;16:331–342.
- Baxter GD, Walsh DM, Allen JM, Lowe AS, Bell AJ. Effects of low intensity infrared laser irradiation upon conduction in the human median nerve in vivo. *Exp Physiol* 1994;79:227–234.
- Brosseau L, Welch V, Wells G, deBie R, Gam A, Harman K, et al. Low level laser therapy (classes I, II and III) for treating osteoarthritis. *Cochrane Database Syst Rev*, CD002046, 2003.
- Brosseau L, Welch V, Wells G, deBie R, Gam A, Harman K, et al. Low level laser therapy (classes I, II and III) for treating rheumatoid arthritis. *Cochrane Database Syst Rev*, CDAB002049, 2003.
- Chen YS, Hsu SF, Chiu CW, Lin JG, Chen CT, Yao CH. Effect of low-power pulsed laser on peripheral nerve regeneration in rats. *Microsurgery* 2005;25:83–89.
- Comelekoglu U, Bagis S, Buyukakilli B, Sahin G, Erdogan C, Kanik A. Acute electrophysiological effect of pulsed gallium-arsenide low-energy laser irradiation on isolated frog sciatic nerve. *Lasers Med Sci* 2002;17:62–67.
- Dvali L, Mackinnon S. Nerve repair, grafting, and nerve transfers. *Clin Plast Surg* 2003;30:203–221.
- Ehrlicher A, Betz T, Stuhmann B, Koch D, Milner V, Raizen MG, et al. Guiding neuronal growth with light. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:16024–16028.
- Enwemeka CS. Quantum biology of laser photostimulation. *Laser Ther* 1999;11:52–44.
- Evans GR. Challenges to nerve regeneration. *Semin Surg Oncol* 2000;19:312–318.
- Fung DT, Ng GY, Leung MC, Tay DK. Therapeutic low energy laser improves the mechanical strength of repairing medial collateral ligament. *Lasers Surg Med* 2002;31:91–96.
- Gagliardi S, Atlante A, Passarella S. A novel property of adenine nucleotides: sensitivity to helium-neon laser in mitochondrial reactions. *Biochem Mol Biol Int* 1997;41:449–460.
- Geuna S, Gigo-Benato D, Tos P, Fornaro M, Battiston B, Giacobini-Robecchi MG. Nerve regeneration after end-to-side neurorrhaphy is enhanced by post-operative low-power laser biostimulation: an experimental study. *Proceedings of the Second Congress of the World Society of Reconstructive Microsurgery, Heidelberg (Germany); 2003*, p 34.
- Geuna S, Raimondo S, Nicolino S, Boux E, Fornaro M, Tos P, et al. Schwann-cell proliferation in muscle-vein combined conduits for bridging rat sciatic nerve defects. *J Reconstr Microsurg* 2003;19:119–123.
- Gigo-Benato D, Geuna S, de Castro Rodrigues A, Tos P, Fornaro M, Boux E, et al. Low-power laser biostimulation enhances nerve repair after end-to-side neurorrhaphy: a double-blind randomized study in the rat median nerve model. *Laser Med Sci* 2004;19:57–65.
- Greathouse DG, Currier DP, Gilmore RL. Effects of clinical infrared laser on superficial radial nerve conduction. *Phys Ther* 1985;65:1184–1187.
- Guzzardella GA, Fini M, Torricelli P, Giavaresi G, Giardino R. Laser stimulation on bone defect healing: an in vitro study. *Lasers Med Sci* 2002;17:216–220.
- Hamilton GF, Keven Robinson T, Ray RH. The effects of helium-neon laser upon regeneration of the crushed peroneal nerve. *J Orthop Sports Phys Therapy* 1992;15:209–214.
- 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.
- Kline DG, Kim D, Midha R, Harsh C, Tiel R. Management and results of sciatic nerve injuries: a 24-year experience. *J Neurosurg* 1998;89:13–23.

29. Kreisler M, Christoffers AB, Willershausen B, d'Hoedt B. Effect of low-level GaAlAs laser irradiation on the proliferation rate of human periodontal ligament fibroblasts: an in vitro study. *J Clin Periodontol* 2003;30:353–358.
30. Leung MC, Lo SC, Siu FK, So KF. Treatment of experimentally induced transient cerebral ischemia with low energy laser inhibits nitric oxide synthase activity and up-regulates the expression of transforming growth factor-beta1. *Lasers Surg Med* 2002;31:283–288.
31. Lowe AS, Baxter GD, Walsh DM, Allen JM. Effect of low intensity laser (830 nm) irradiation on skin temperature and antidromic conduction latencies in the human median nerve: relevance of radiant exposure. *Lasers Surg Med* 1994;14:40–46.
32. Lucas C, Criens-Poublon LJ, Cockrell CT, de Haan RJ. Wound healing in cell studies and animal model experiments by low level laser therapy; were clinical studies justified? A systematic review. *Lasers Med Sci* 2002;17:110–134.
33. Lundborg G. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: evolving neuroscientific concepts and clinical significance. *J Hand Surg [Am]* 2000;25:391–414.
34. Lundborg G. Enhancing posttraumatic nerve regeneration. *J Periph Nerv Syst* 2002;7:139–140.
35. Meek MF, Coert JH. Clinical use of nerve conduits in peripheral-nerve repair: review of the literature. *J Reconstr Microsurg* 2002;18:97–109.
36. Millesi H. Techniques for nerve grafting. *Hand Clin* 2000;16:73–91.
37. Miloro M, Halkias LE, Mallery S, Travers S, Rashid RG. Low-level laser effect on neural regeneration in Gore-Tex tubes. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;93:27–34.
38. Morrone G, Guzzardella GA, Tigani D, Torricelli P, Fini M, Giardino R. Biostimulation of human chondrocytes with Ga-Al-As diode laser: 'in vitro' research. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2000;28:193–201.
39. Navratil L, Kyplova J. Contraindications in noninvasive laser therapy: truth and fiction. *J Clin Laser Med Surg* 2002;20:341–343.
40. Reddy GK, Stehno-Bittel L, Enwemeka CS. Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit Achilles tendons. *Lasers Surg Med* 1998;22:281–287.
41. Rochkind S. Stimulation effect of laser energy on the regeneration of traumatically injured peripheral nerves. *Morphogen Regen* 1978;83:25–27.
42. Rochkind S, Alon M. Microsurgical management of old injuries of the peripheral nerve and brachial plexus. *J Reconstr Microsurg* 2000;16:541–546.
43. Rochkind S, Nissan M, Razon N, Schwartz M, Bartal A. Electrophysiological effect of HeNe laser on normal and injured sciatic nerve in the rat. *Acta Neurochir* 1986;83:125–30.
44. Rochkind S, Barr-Nea L, Razon N, Bartal A, Schwartz M. Stimulatory effect of He-Ne low dose laser on injured sciatic nerves of rats. *Neurosurgery* 1987;20:843–847.
45. Rochkind S, Nissan M, Barr-Nea L, Razon N, Schwartz M, Bartal A. Response of peripheral nerve to He-Ne laser: experimental studies. *Lasers Surg Med* 1987;7:441–443.
46. Rochkind S, Nissan M, Lubart R, Avram J, Bartal A. The in-vivo-nerve response to direct low-energy-laser irradiation. *Acta Neurochir* 1988;94:74–77.
47. Rochkind S, Rousso M, Nissan M, Villarreal M, Barr-Nea L, Rees DG. Systemic effects of low-power laser irradiation on the peripheral and central nervous system, cutaneous wounds, and burns. *Lasers Surg Med* 1989;9:174–182.
48. Rochkind S, Barr-Nea L, Volger I. Spinal cord response to laser treatment of injured peripheral nerve. *Spine* 1990;15:6–10.
49. Rochkind S, Ouaknine GE. New trend in neuroscience: low-power laser effect on peripheral and central nervous system. *Neurol Res* 1992;14:2–11.
50. 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;28:216–219.
51. Rovak JM, Cederna PS, Kuzon WM Jr. Terminolateral neuro-rhaphy: a review of the literature. *J Reconstr Microsurg* 2001;17:615–624.
52. Samii M, Carvalho GA, Nikkiah G, Penkert G. Surgical reconstruction of the musculocutaneous nerve in traumatic brachial plexus injuries. *J Neurosurg* 1997;87:881–886.
53. Shamir MH, 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. *J Reconstr Microsurg* 2001;17:133–137.
54. Shin DH, Lee E, Hyun JK, Lee SJ, Chang YP, Kim JW, et al. Growth-associated protein-43 is elevated in the injured rat sciatic nerve after low power laser irradiation. *Neurosci Lett* 2003;344:71–74.
55. Snyder SK, Byrnes KR, Borke RC, Sanchez A, Anders JJ. Quantification of calcitonin gene-related peptide mRNA and neuronal cell death in facial motor nuclei following axotomy and 633 nm low power laser treatment. *Lasers Surg Med* 2002;31:216–222.
56. Snyder-Mackler L, Bork CE. Effect of helium-neon laser irradiation on peripheral sensory nerve latency. *Phys Ther* 1988;68:223–225.
57. Strauch B. Use of nerve conduits in peripheral nerve repair. *Hand Clin* 2000;16:123–130.
58. Turner J, Hode L. Laser therapy: clinical practice and scientific background. Grängesberg, Sweden: Prima Books; 2003. p 380–434.
59. Van Breugel HH, Bar PR. He-Ne laser irradiation affects proliferation of cultured rat Schwann cells in a dose-dependent manner. *J Neurocytol* 1993;22:185–190.
60. Wagner AK, Boninger ML, Levy C, Chan L, Gater D, Kirby RL. Peer review: issues in physical medicine and rehabilitation. *Am J Phys Med Rehabil* 2003;82:790–802.
61. Walker J. Relief from chronic pain by low power laser irradiation. *Neurosci Lett* 1983;43:339–344.
62. Walker JB, Akhanjee LK. Laser-induced somatosensory evoked potentials: evidence of photosensitivity in peripheral nerves. *Brain Res* 1985;344:281–285.
63. 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;26:485–490.
64. Wollman Y, Rochkind S. In vitro cellular processes sprouting in cortex microexplants of adult rat brains induced by low power laser irradiation. *Neurol Res* 1998;20:470–472.
65. Wollman Y, Rochkind S, Simantov R. Low power laser irradiation enhances migration and neurite sprouting of cultured rat embryonal brain cells. *Neurol Res* 1996;18:467–470.
66. Wu WH, Ponnudurai R, Katz J, Pott CB, Chilcoat R, Uncini A, et al. Failure to confirm report of light-evoked response of peripheral nerve to low power helium-neon laser light stimulus. *Brain Res* 1987;401:407–408.