

Artigo original

Efeitos do laser de baixa intensidade HeNe sobre a atividade eletrográfica do músculo gastrocnêmio de ratos *Wistar* submetidos à lesão do nervo ciático

The effects of low-power HeNe laser on the eletrographic activity of the gastrocnemius muscle in Wistar rats submitted to sciatic nerve injury

Alexandre Ademar Hoeller*, Edison Sanfelice André, D.Sc.**

.....
*Ft, Curso de Fisioterapia da Universidade Regional de Blumenau - Bolsista PIBIC/CNPq; 2004/2005, Laboratório de Fisioterapia Neurológica Experimental - LFNE, **Ft, Departamento de Fisioterapia da Universidade Regional de Blumenau, Laboratório de Fisioterapia Neurológica Experimental - LFNE

Resumo

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do laser de baixa intensidade HeNe sobre a regeneração nervosa periférica em ratos *Wistar*, submetidos à lesão por esmagamento do nervo ciático, utilizando como instrumento de investigação a eletromiografia (EMG) do músculo gastrocnêmio. Foram utilizados 8 ratos, divididos em um grupo controle (não irradiado pelo laser) e um grupo irradiado diariamente, durante 28 dias. Os registros do EMG foram efetuados no período pré-operatório, e no 1º, 7º, 14º, 21º, e 28º dia pós-operatório. As aplicações diárias de laser (28 dias consecutivos) foram iniciadas no 1º dia pós-operatório, através da técnica pontual com uma dose de 9 J/cm². Como resultado, observou-se que as médias espectrais das potências das frequências do EMG do grupo irradiado mostraram-se menores se comparadas ao grupo controle, além de apresentar maior organização e homogeneidade dos potenciais musculares analisados, indicando maior capacidade de regeneração nervosa periférica. Resultados significantes também foram observados na comparação das potências, segmentadas por bandas de frequência, entre o período pré-lesão e os dias pós-lesão do grupo controle e do grupo irradiado, quando o animal encontrava-se andando. Os resultados obtidos sugerem que o laser de baixa intensidade favoreceu o processo de regeneração nervosa periférica, comprovando que, juntamente aos dados histológicos e funcionais da marcha obtidos previamente, o laser de baixa intensidade é capaz de acelerar o processo de regeneração do nervo ciático após axonotmese em ratos *Wistar*.

Palavras-chave: sistema nervoso periférico, eletromiografia, laser de baixa intensidade, regeneração nervosa periférica, nervo ciático.

Abstract

The aim of the present study was to evaluate the process of peripheral nerve regeneration in rats submitted to a crush lesion of the sciatic nerve under the effects of the low-power laser (HeNe), using the gastrocnemius's electromyography as an instrument of investigation. Eight male Wistar rats were used, divided in two groups: a group control (not irradiated with laser) and a group irradiated everyday with the laser HeNe, during 28 days. The EMG acquisitions were made in the pre-operative period, in the first postoperative day after the crush injury, and in the 7th, 14th, 21st and 28th day after surgery. The daily laser applications were initiated on first postoperative day, using the punctual technique (5 points), with a dose of 9 J/cm². Was observed that the averages of the power spectrum of the laser group was lower in relation to the control group, presenting organized and homogeneity muscle potentials, indicating an important capacity of peripheral nerve regeneration. Significant results was observed too in the comparison of potentials segmented for frequency bands, between the pre-crush period and in the postoperative days after crush injury, on the control and laser group, while the animal was walking. These results suggest that the low-power laser favored the sciatic regenerative process, proving that, together with previous histological and functional data, the low-power laser is able to accelerate the sciatic nerve regeneration after axonotmesis in Wistar rats.

Key-words: Peripheral nervous system, electromyography, low-level laser, nerve regeneration, sciatic nerve.

.....
Recebido 21 outubro 2005; aceito 15 de dezembro de 2006.

Endereço para correspondência: Prof. Dr. Edison Sanfelice André, Universidade Regional de Blumenau – FURB, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Fisioterapia, Laboratório de Fisioterapia Neurológica Experimental – LFNE, Rua Antônio da Veiga, 140, 89010-971 Blumenau SC, Tel: (47) 3321-0287, E-mail: sanfelice@furb.br, homepage: <http://home.furb.br/sanfelice>

Introdução

Freqüentemente o homem é exposto a situações traumáticas ou patológicas que ocasionam lesões no sistema nervoso periférico. Há anos cientistas do mundo inteiro buscam ampliar o entendimento sobre o processo de regeneração nervosa, tentando encontrar, através de diversos recursos terapêuticos, a forma ideal para que um nervo lesionado possa voltar a apresentar sua total funcionalidade [1].

Após a lesão nervosa periférica, a capacidade de regeneração e do retorno funcional das conexões dos vários axônios é dependente do local, do tipo de lesão e da distância para transpor a lesão e alcançar seus alvos [2]. Pelo fato dos neurônios periféricos terem axônios longos e corpos celulares pequenos, a maioria das lesões do sistema nervoso periférico envolve danos axonais. A transecção de um axônio, ou agudamente por uma incisão ou mais lentamente por compressão, é chamada de axotomia e suas conseqüências deletérias são inúmeras [3].

Segundo Stoll e Muller [4], após a lesão por esmagamento, ocorre degeneração walleriana dos segmentos distais dos axônios, que envolve a remoção de debris axonais e mielínicos. O esmagamento do nervo rompe o axônio, mas a membrana basal da célula de Schwann que cerca a fibra nervosa fica intacta, fornecendo as pistas para guiar os axônios em regeneração. Após o estabelecimento do contato com a periferia, as células de Schwann iniciam a mielinização das fibras em regeneração e a reinervação é finalizada. Existem várias diferenças na estrutura da fibra nervosa remielinizada se comparada aos axônios intactos, e uma completa remielinização é essencial para a completa restauração das funções do sistema nervoso periférico [5].

O nervo ciático de ratos é comumente utilizado como modelo de estudos sobre a regeneração nervosa periférica por ser um tronco nervoso com comprimento e espaço adequado para a manipulação cirúrgica e a introdução de enxertos ou outro material. O nervo ciático divide-se acima da fossa poplítea em três ramificações: ramo tibial, ramo fibular e ramo sural. Cada ramificação conduz diferentes proporções de axônios motores, sensoriais e autonômicos para os músculos, receptores da pele e vasos sanguíneos ou glândulas, localizados em territórios específicos da pata posterior do roedor [2,6], permitindo estudos neurofisiológicos em diferentes níveis.

Métodos que visem aumentar ou a acelerar a regeneração nervosa são necessários, sendo que a degeneração é inevitável nas várias lesões nervosas periféricas [7]. Nesse contexto, inúmeras pesquisas foram realizadas com intuito de analisar os efeitos da laserterapia de baixa intensidade sobre o sistema nervoso periférico de animais, obtendo uma série robusta de resultados favoráveis (para revisão recente, *vide*: [8]). Numa série elegante de experimentos, Rochkind *et al.* [9] demonstraram que aplicações transcutâneas de laser HeNe favoreciam a regeneração axonal e preveniam o desaparecimento dos pericários de neurônios motores no corno anterior da medula espinhal e de neurônios sensoriais no gânglio da raiz dorsal.

Os meios de mensuração da regeneração nervosa são vastos, podendo-se citar além de índices funcionais [10] e estudos histomorfológicos [11], a eletromiografia (EMG). Este método envolve a detecção, a amplificação e a apresentação das flutuações elétricas correspondentes à atividade muscular. Esses sinais são diminutos, mas se amplificados, podem ser visualizados em um osciloscópio ou tela de computador, ouvidos por intermédio de um alto-falante ou, ainda, registrados em gráficos [12]. Em sentido restrito, o termo eletromiografia envolve tanto o registro dos potenciais de ação de fibras musculares sob as condições do movimento voluntário quanto à observação de potenciais de ação espontâneos, caso estes estejam presentes, registrando as fibras musculares em repouso [13].

Pelo fato de as agressões aos nervos provocarem diferentes comprometimentos na interação nervo-músculo, a eletromiografia torna-se um método importante para análise da regeneração nervosa periférica. Comumente, no período pós-lesão, ao exame eletromiográfico, observa-se que a amplitude do potencial evocado fica diminuída, e isso se deve ao fato de os axônios perderem sua capacidade de conduzir potenciais funcionais através da zona lesionada. Por outro lado, se a membrana de um músculo está instável devido a uma desnervação, suas fibras se tornam hipersensíveis à acetilcolina, e sobrevém a fibrilação e o aumento da amplitude dos potenciais musculares por atividade espontânea. Se o músculo for reinervado, são registrados potenciais musculares de amplitude maior que a normal, devido aos axônios inervarem um número maior do que o normal de fibras musculares. Com o passar do tempo, esses potenciais tendem a ser refinados e somente a atividade resultante da interação nervo-músculo pode ser captada pelo EMG [14].

Estudos anteriores do nosso laboratório [15] e de outras fontes mostraram que aplicações de laser de baixa intensidade podem ocupar uma importante posição na lista de recursos terapêuticos empregados na regeneração nervosa periférica. Apesar disso, esses estudos se ocuparam, principalmente, em avaliar aspectos morfológicos e comportamentais de tal condição e não os eletrofisiológicos. Assim, tendo como base os registros eletromiográficos do músculo gastrocnêmio, buscou-se avaliar as repercussões do laser HeNe na regeneração do ciático esmagado mecanicamente ao longo de 28 dias de experimentação.

Material e métodos

Foram utilizados 8 ratos adultos (300 g) machos da linhagem *Wistar* fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Regional de Blumenau. Os animais foram alojados no biotério setorial do Laboratório de Fisioterapia Neurológica Experimental (LFNE), sendo acondicionados em gaiolas individuais, em temperatura ambiente controlada (-22° C), com ciclo claro-escuro de 12h (07h00-19h00 – claro sob luz artificial) e recebendo água e ração *ad libitum*. Após duas semanas de

ambientação, os animais foram aleatoriamente divididos em dois grupos distintos: Grupo HeNe ($n = 4$) submetido à lesão nervosa periférica seguida de irradiação diária, durante 28 dias, de laser HeNe; Grupo Controle ($n = 4$) submetido à lesão nervosa por esmagamento e não irradiado com laser HeNe. Os dois grupos sofreram, também, a implantação crônica de eletrodos bipolares no músculo gastrocnêmio direito para a coleta dos potenciais eletromiográficos. Durante os procedimentos cirúrgicos todos os animais receberam uma dose de 0,3 ml/100g de cloridrato de cetamina em associação a uma dose fixa de 0,1 ml de xilazina via intraperitoneal. Todos os procedimentos aqui descritos foram realizados mediante aprovação do Comitê de Ética na Experimentação com Animais da Universidade Regional de Blumenau (CEEAFURB) sob o número 014/04.

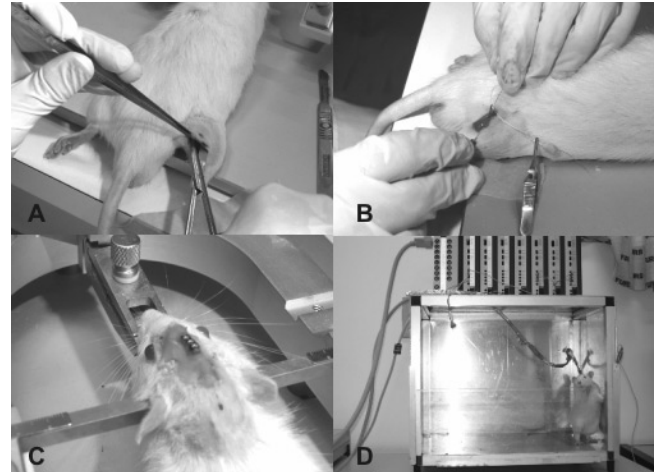
Implantação dos eletrodos

Após a constatação da profundidade desejada de anestesia (ausência de reflexos de retirada da pata frente ao pinçamento das pregas interdigitais) executou-se a tricotomia do escalo e de todo o membro posterior direito. Após, executaram-se duas incisões nas mesmas regiões, permitindo a exposição da calota craniana e do músculo gastrocnêmio. Na seqüência, foram implantados eletrodos bipolares confeccionados com fio isolado de liga de níquel-cromo (0,06 mm de diâmetro) nos ventres do músculo gastrocnêmio. Os eletrodos foram soldados em uma das extremidades de um fio flexível que percorria subcutaneamente o dorso do animal até o limite da incisão da pele do crânio onde, por sua vez, era soldado a um conector. Para que os eletrodos pudessem ser implantados no gastrocnêmio, foi utilizada uma agulha hipodérmica que, depois de inserida no ventre, servia como guia de passagem para o eletrodo. Após a fixação dos eletrodos no músculo, procederam-se três trepanações nas quais foram fixados três microparafusos que serviram de âncora para o conector elétrico. Depois de posicionados, os microparafusos e o conector foram colados com acrílico autopolimerizante de uso odontológico, permitindo a fixação definitiva do conector ao crânio do animal. Ao final desses procedimentos, os animais receberam aplicação tópica de antiflogístico e antibiótico nos dois campos cirúrgicos, e foram mantidos em ambiente aquecido até a recuperação completa da anestesia.

Lesão do ciático

Dois dias após a implantação dos eletrodos, foram coletados 20 minutos contínuos de EMG contendo diferentes estados comportamentais, incluindo momentos de relaxamento (animal imóvel e em vigília relaxada) e de deambulação dentro da gaiola de registro. Depois da coleta, os animais foram anestesiados e o nervo ciático direito foi estrangulado por 30 segundos com o auxílio de uma pinça hemostática (para detalhes dessa cirurgia, *vide* [15]).

Figura 1 - Alguns passos da cirurgia de implante do sistema de EMG no músculo gastrocnêmio do rato. **A)** Liberação de fâscias da região da coxa e dorso do animal. **B)** Inserção de uma agulha no músculo gastrocnêmio utilizada para transpassar o eletrodo de EMG no ventre lateral, e posteriormente medial, do músculo do rato. **C)** Final da cirurgia, fixação do conector cefálico através de sutura e adição de acrílico autopolimerizante. **D)** Situação de registro com o animal conectado ao sistema de aquisição.



Aplicações de laser

Vinte e quatro horas após a lesão do ciático, os animais do grupo HeNe foram irradiados diariamente com o laser HeNe (632,8 nm, vermelho visível, emissão contínua, 3mW de potência nominal, marca KLD, série LHN 879) com uma dose de 9 J/cm² com técnica pontual de 5 pontos longitudinais de acordo com o trajeto do nervo, de proximal para distal, durante 28 dias consecutivos. O grupo controle foi submetido aos mesmos procedimentos de irradiação, mas com o aparelho desligado.

Registro do EMG

Tanto no período pré-estrangulamento quanto nos dias 1, 7, 14, 21 e 28 após o estrangulamento do ciático, os animais foram acondicionados em uma gaiola metálica e conectados, por meio de um cabo flexível, a um sistema digital de aquisição e análise de sinais biológicos (MP-100/WSW, Biopac, Inc.). Esse sistema foi configurado para obter um ganho de sinal de 1000x, com filtro *Butterworth* de 2ª ordem para atenuar a interferência provocada pela frequência da rede comercial (60 Hz), e taxa de amostragem de 200 Hz. Então, durante um período de 20 minutos, registrou-se o EMG acompanhado de anotações dos comportamentos do animal dentro da gaiola.

Ao final dos experimentos, todos os traçados eletromiográficos foram submetidos à averiguação minuciosa para a separação de trechos de 20 segundos referentes aos comportamentos de máxima e de mínima atividade comportamental, que deveriam ser submetidos à transformada rápida

de Fourier, e à demodulação complexa para a obtenção da frequência e da amplitude instantâneas. Após esse processo, os dados da análise espectral (Fourier) foram segregados em bandas de potência de 10 em 10 Hz, desde zero até 50 Hz. Os dados dessas bandas de frequência, então, foram inseridos em planilha eletrônica para análise estatística.

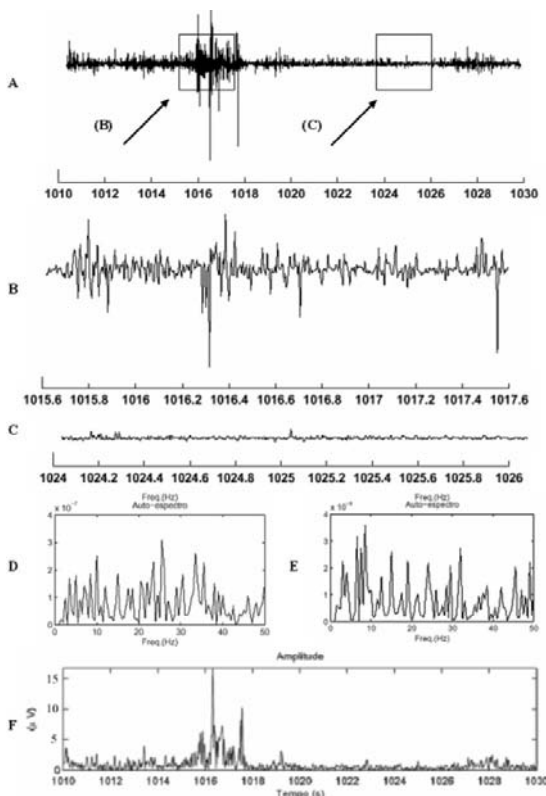
Análise estatística

Visando comparar as possíveis diferenças existentes entre as bandas de frequências do EMG dos dois grupos experimentais, utilizou-se a análise de variância (ANOVA de uma via). Além disso, comparações intra-grupo entre os dias pós-estrangulamento e o momento pré-lesão foram realizadas de maneira pareada, através do teste *t* de Student. Como nível de significância optou-se por $p < 0,05$.

Resultados

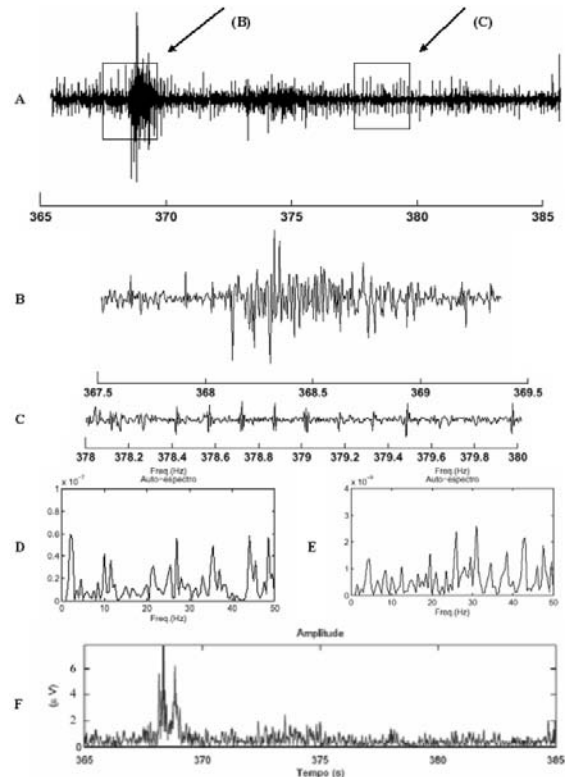
Apesar de terem sido feitos registros em diferentes dias, serão apresentados, apenas, os resultados referentes ao 21º e ao 28º dia, pois foram nesses em que encontramos diferenças marcantes.

Figura 2 - Registro eletromiográfico coletado antes da lesão do ciático. A) Trecho de 20 segundos contendo atividade muscular intensa e diminuta (destaques). B) Segmento de 2 segundos destacado do trecho A, caracterizado por ser um período onde animal está caminhando. C) Segmento de 2 segundos destacado retirado do trecho A, onde o animal encontra-se em repouso. D) Espectro de frequência referente ao trecho B. E) Espectro de frequência referente ao trecho C. F) Amplitudes instantâneas do segmento A.



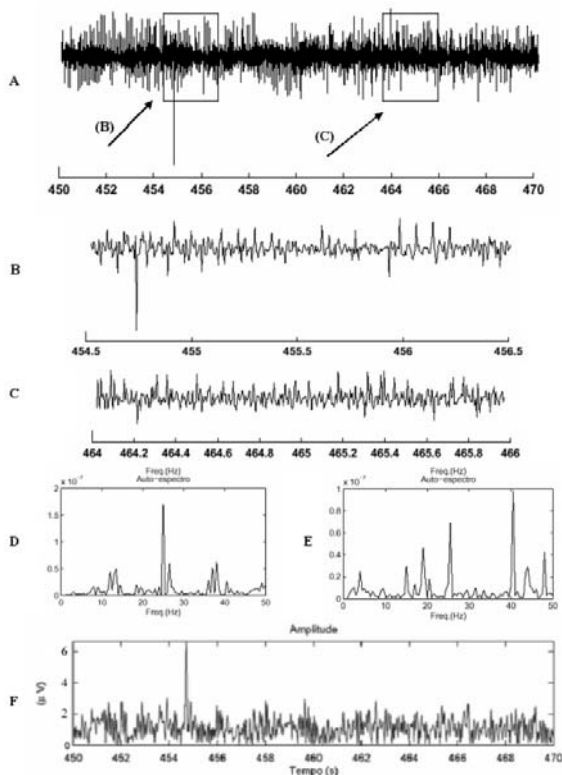
A Figura 2 caracteriza-se por apresentar um sinal eletromiográfico típico de um animal sadio, demonstrando amplitudes e frequências compatíveis com a integridade do binômio nervo-músculo. Na Figura 2A observam-se, num trecho de 20 segundos, os potenciais de ativação relacionados ao caminhar do animal, seguidos de potenciais em repouso. Em 2B nota-se uma atividade elétrica intensa, com ondas monofásicas, trifásicas e polifásicas de grande amplitude, positivas e negativas. Em 2C o sinal caracteriza-se por apresentar uma atividade elétrica diminuída, sendo que as ondas apresentam amplitudes visivelmente menores. Na análise espectral (2D e 2E) observa-se uma homogeneidade das amplitudes das espículas nas frequências de 0 a 50 Hz, nos períodos de atividade e repouso, salientando o fato de que no período em atividade destaca-se um pico de maior potência ($-3,2 \times 10^{-7} \mu V^2/Hz$) na frequência de 25 Hz, enquanto no período em repouso, as amplitudes são menores, com picos de $-3,6 \times 10^{-9} \mu V^2/Hz$ nas frequências aproximadas de 5 a 10 Hz e picos homogêneos nas frequências de 10 a 30 Hz.. Em ambos os espectros de frequência (2D e 2E) observam-se diminuições das espículas entre as frequências de 40 a 50 Hz. Em 2F Observam-se amplitudes de até 15 μV compatíveis com alta atividade muscular durante a deambulação.

Figura 3 - Registro eletromiográfico de um animal do grupo controle, no 21o dia após a lesão do nervo ciático. A) Trecho pré-selecionado com 20 segundos de um registro de EMG com duração de 20 minutos. B) Segmento de 2 segundos retirado do trecho A, onde o animal encontra-se caminhando. C) Segmento de 2 segundos retirado do trecho A, onde o animal encontra-se em repouso. D) Espectro de frequência referente ao trecho B. E) Espectro de frequência referente ao trecho C. F) Amplitudes instantâneas do segmento A.



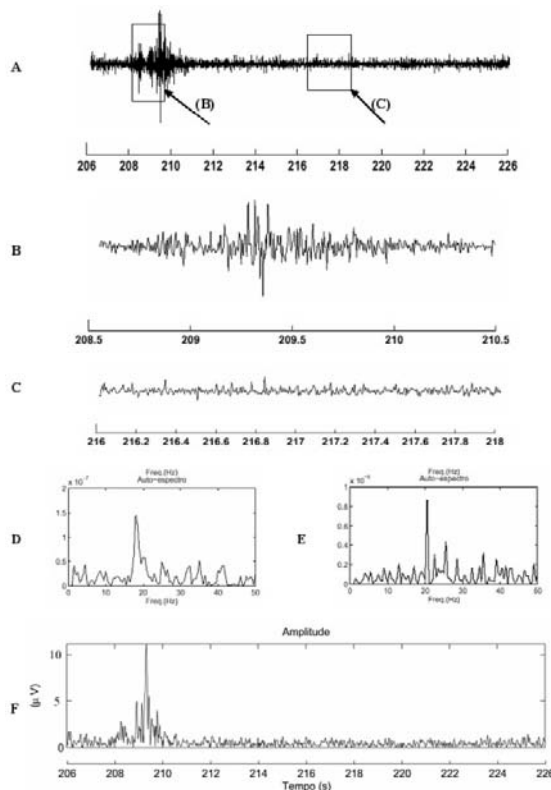
Na Figura 3, são expostas as características eletromiográficas de um animal com lesão nervosa periférica após 21 dias, referentes ao grupo não irradiado pelo laser HeNe. É possível constatar um posicionamento diferente da atividade mioelétrica, notando que os potenciais musculares encontram-se alterados em relação à Figura 2. Em 3A o traçado é composto de um sinal heterogêneo, com variação das amplitudes inclusive no período em repouso. Em 3B observa-se maior atividade eletromiográfica, com a presença de espículas bifásicas agudas. Em 3C o trecho apresenta uma atividade elétrica diminuída em relação ao trecho de ativação, apesar de encontra-se aumentada em relação ao registro de repouso do período pré-lesão de animais do mesmo grupo (Figura 2). Em 3D observa-se uma homogeneidade maior dos picos de frequência em relação ao gráfico 3E, sendo que as maiores espículas permanecem no valor aproximado de $0,6 \times 10^{-7} \mu V^2/Hz$, indicando maior organização das unidades motoras no período de ativação da fibra muscular. Em 3E observa-se grande variação dos picos de frequência indicando desorganização dos potenciais de ação pelas unidades motoras no período em que o animal encontra-se em repouso. Em 3F observam-se amplitudes de até $9 \mu V$ nos momentos de intensa atividade muscular.

Figura 4 - Registro eletromiográfico de um animal do grupo controle, no 28o dia após a lesão do nervo ciático. A) Trecho pré-selecionado com 20 segundos de um registro de EMG com duração 20 minutos. B) Segmento de 2 segundos retirado do trecho A, onde o animal encontra-se em atividade. C) Segmento de 2 segundos retirado do trecho A, onde o animal encontra-se em repouso. D) Espectro de frequência referente ao trecho B. E) Espectro de frequência referente ao trecho C. F) Amplitudes instantâneas do segmento A.



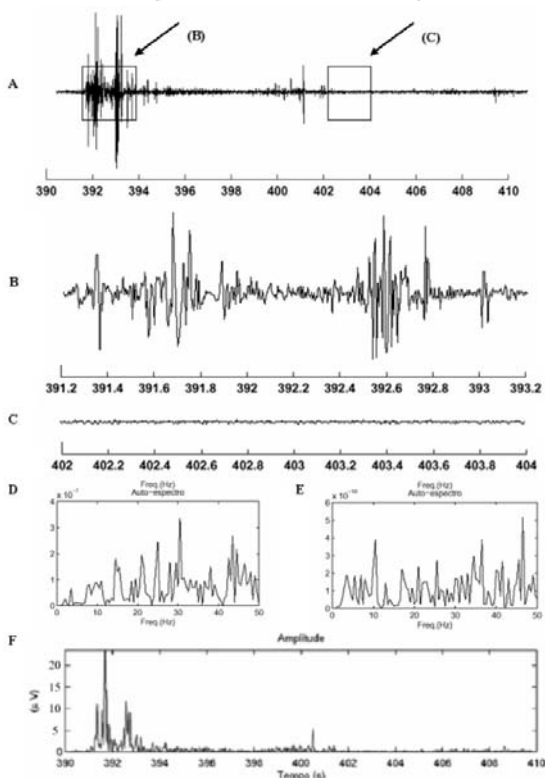
Na Figura 4 são apresentados os sinais eletromiográficos característicos produzidos após 28 dias da lesão do ciático do grupo não irradiado pelo laser. Torna-se nítida a desorganização do sinal, com potenciais emitidos espontaneamente, distribuídos ao longo do traçado, apresentando amplitudes de magnitudes variadas, positivas e negativas. Em 4B observa-se uma maior atividade do traçado, com a presença de espículas monofásicas agudas. Em 4C o traçado apresenta uma atividade elétrica diminuída em relação ao trecho de ativação, apesar de encontra-se aumentada em relação ao registro de repouso do período pré-lesão de animais do mesmo grupo. Em 4D observa-se uma maior homogeneidade dos picos de frequência em relação ao gráfico 4E, indicando uma maior organização das unidades motoras no período de ativação da fibra muscular. Nota-se a semelhança entre as Figuras 4D e 4E, caracterizadas por apresentarem frequências semelhantes. Em 4E observa-se grande variação dos picos de frequência indicando desorganização dos potenciais de ação pelas unidades motoras. Ressalta-se a presença de potenciais de amplitude considerável mesmo com o animal permanecendo em um período de repouso. Em 4F observam-se grandes amplitudes de até $7 \mu V$ e uma desorganização no restante do sinal mantendo uma amplitude média de $2 \mu V$.

Figura 5 - Registro eletromiográfico de um animal do grupo irradiado pelo laser HeNe, no 21o dia após a lesão do nervo ciático. A) Trecho pré-selecionado com 20 segundos de um registro de EMG com 20 minutos. B) Segmento de 2 segundos retirado do trecho A, onde o animal encontra-se em atividade. C) Segmento de 2 segundos retirado do trecho A, onde o animal encontra-se em repouso. D) Espectro de frequência referente ao trecho B. E) Espectro de frequência referente ao trecho C. F) Amplitudes instantâneas do segmento A.



É possível observar diferenças nítidas na Figura 5, correspondente aos sinais eletromiográficos obtidos 21 dias após a lesão nervosa de um animal do grupo irradiado pelo laser HeNe. Os sinais registrados encontram-se desorganizados em relação à Figura 2 porém, observa-se maior homogeneidade dos potenciais em relação às Figuras 3 e 4. Observa-se, também, que as amplitudes encontram-se mais homogêneas, limitadas ao período em que o animal estava andando. No período em repouso fica clara a maior organização dos potenciais, que se apresentam diminutos. Em 5B observa-se maior atividade deste traçado, com a presença de espículas monofásicas mais agudas. Em 5C o sinal apresenta uma atividade elétrica diminuída em relação ao trecho de ativação, encontrando-se aumentada em relação ao registro de repouso do período pré-lesão de animais do mesmo grupo. Em 5D observa-se homogeneidade dos picos de frequência, havendo destaque para a frequência de aproximadamente 20 Hz. As demais frequências participam menos na composição do EMG, indicando melhor organização dos potenciais musculares, dando indícios de regeneração nervosa. Em 5E observa-se homogeneidade semelhante ao trecho 5D, porém com picos de frequências menores, mantendo amplitudes de aproximadamente $0,3 \times 10^{-8}$ mV nas frequências de 0 a 50 Hz. Em F observa-se a maior amplitude de todo o trecho registrado, apontando para 10 μ V.

Figura 6 - Registro eletromiográfico de um animal do grupo irradiado por laser HeNe, no 28o dia após a lesão do ciático. A) Trecho de 20 segundos pré-selecionado de um registro de EMG de 20 minutos. B) segmento de 2 segundos do trecho A, caracterizado por ser um período onde animal está caminhando. C) segmento de 2 segundos do trecho A, onde o animal encontra-se em repouso. D) Espectro de frequência referente ao trecho B. E) Espectro de frequência referente ao trecho C. F) Amplitudes instantâneas do segmento A.



Na Figura 6 são expostos os sinais obtidos após 28 dias da lesão do nervo ciático do grupo irradiado pelo laser HeNe. De maneira geral observa-se maior organização do traçado em relação aos sinais correspondentes do grupo não irradiado pelo laser HeNe (Figura 4). É possível observar que os sinais da Figura 6 não se assemelham aos sinais obtidos no animal sadio, registrado anteriormente à lesão nervosa (Figura 2), indicando que a regeneração completa do nervo lesionado ocorre em um período maior que 28 dias. Mesmo assim, os dados obtidos no grupo submetido à laserterapia de baixa intensidade encontraram-se, significativamente diferentes em relação ao grupo não irradiado, denotando maior semelhança dos potenciais musculares captados antes da lesão do ciático. Em 6B observa-se atividade elétrica intensa, com ondas monofásicas, trifásicas e polifásicas de grande amplitude compatível com alta atividade comportamental. Em 6C o sinal se caracteriza por uma atividade elétrica marcadamente diminuída, compatível com inatividade comportamental. Em 6D observam-se picos de frequência heterogêneos, distintos, com amplitudes variando entre 10 e 20 mV. Observam-se maiores potências nas maiores frequências, 25, 30 e 45 Hz. Em 6E observa-se distribuição mais homogênea dos picos de frequência enquanto o animal encontrava-se em repouso. Em 6F observa-se uma amplitude de aproximadamente 20 μ V referente à somatória das espículas mais pronunciadas da Figura 6A (referente ao máximo de atividade comportamental daquele período).

Na Tabela I apresenta-se a comparação das potências, segmentadas por bandas de frequência, entre os períodos pré- e pós-lesão do grupo controle, durante a deambulação. Esta tabela deixa claro que, independentemente da banda de frequência, a situação da média das potências do período pré-lesão, em relação ao 1º dia após lesão do ciático, apresenta-se sempre superior, evidenciando presença marcante de potenciais que denunciam atividade eletromiográfica espontânea e espúria. Concomitantemente, na comparação entre os períodos pré-lesão e o 7º dia após a lesão, nota-se uma similaridade das médias de potências. Nos demais períodos, em todas as bandas de frequência, foi observado que as médias de potências encontravam-se menores no período pré-lesão em relação aos dias 14º, 21º e 28º após lesão, denotando estatisticamente que após a lesão nervosa, não foi verificada regeneração do nervo ciático dos animais do grupo controle, tendo em vista que as médias de potência do 28º dia, em todas as bandas de frequência, encontraram-se superiores às potências do período pré-lesão.

Da mesma forma, realizaram-se comparações das médias das potências das frequências no grupo irradiado com laser HeNe (Tabela II). A partir dos dados expostos, nota-se que nos dias 14 e 21 após a lesão as médias das potências encontraram-se superiores ao período pós-lesão assemelhando-se ao grupo controle. Por outro lado, quando comparados, os dias pré-lesão com o 28º dia após lesão apresentam semelhança entre as médias das potências, excetuando a banda de 0 a 10

Tabela I - Comparações intra-grupo (pré- versus pós-lesão) do grupo controle, realizadas pelo teste t de Student referentes às bandas de potências das frequências detectadas pela transformada rápida de Fourier da atividade eletromiográfica ao longo de 28 dias de experimentação. (*) Diferenças estatisticamente significantes, $p < 0,001$.

Banda (Hz)	Dia	Situação	Teste t
0 ~ 10	1	Pré- > Dia 1	t = 7,48*
	7	Pré- = Dia 7	t = -0,55
	14	Pré- < Dia 14	t = -8,97*
	21	Pré- < Dia 21	t = -4,87*
	28	Pré- < Dia 28	t = -3,28*
10 ~ 20	1	Pré- > Dia 1	t = 5,87*
	7	Pré- = Dia 7	t = -1,36
	14	Pré- < Dia 14	t = -8,77*
	21	Pré- < Dia 21	t = -5,37*
	28	Pré- < Dia 28	t = -4,72*
20 ~ 30	1	Pré- > Dia 1	t = 5,69*
	7	Pré- = Dia 7	t = -0,59
	14	Pré- < Dia 14	t = -8,26*
	21	Pré- < Dia 21	t = -8,31*
	28	Pré- < Dia 28	t = -3,72*
30 ~ 40	1	Pré- > Dia 1	t = 5,28*
	7	Pré- = Dia 7	t = -1,00
	14	Pré- < Dia 14	t = -6,05*
	21	Pré- < Dia 21	t = -8,47*
	28	Pré- < Dia 28	t = -3,22*
40 ~ 50	1	Pré- > Dia 1	t = 5,41*
	7	Pré- = Dia 7	t = 0,25
	14	Pré- < Dia 14	t = -5,10*
	21	Pré- < Dia 21	t = -8,82*
	28	Pré- < Dia 28	t = -2,35*

Tabela II - Comparações intra-grupo (pré- versus pós-lesão) do grupo irradiado com laser HeNe, realizadas pelo teste t de Student referentes às bandas de potências das frequências detectadas pela transformada rápida de Fourier da atividade eletromiográfica ao longo de 28 dias de experimentação. (*) Diferenças estatisticamente significantes, $p < 0,001$.

Banda (Hz)	Dia	Situação	Teste t
0 ~ 10	1	Pré- = Dia 1	t = -0,20
	7	Pré- = Dia 7	t = -1,27
	14	Pré- < Dia 14	t = -6,86*
	21	Pré- < Dia 21	t = -7,83*
	28	Pré- < Dia 28	t = -3,69*
10 ~ 20	1	Pré- = Dia 1	t = -0,31
	7	Pré- = Dia 7	t = 0,78
	14	Pré- < Dia 14	t = -8,97*
	21	Pré- < Dia 21	t = -6,74*
	28	Pré- = Dia 28	t = -1,20
20 ~ 30	1	Pré- = Dia 1	t = 0,18
	7	Pré- < Dia 7	t = -2,83*
	14	Pré- < Dia 14	t = -7,13*
	21	Pré- < Dia 21	t = -9,49*
	28	Pré- = Dia 28	t = -0,92
30 ~ 40	1	Pré- = Dia 1	t = -1,66
	7	Pré- = Dia 7	t = -0,78
	14	Pré- < Dia 14	t = -7,79*
	21	Pré- < Dia 21	t = -5,35*
	28	Pré- = Dia 28	t = -0,90
40 ~ 50	1	Pré- = Dia 1	t = -0,20
	7	Pré- < Dia 7	t = -2,76*
	14	Pré- < Dia 14	t = -7,03*
	21	Pré- < Dia 21	t = -8,82*
	28	Pré- = Dia 28	t = 1,16

Tabela III - Valores da ANOVA referentes às médias das potências das frequências obtidas em diferentes dias, pela transformada rápida de Fourier, durante estados de repouso dos animais. A coluna "Situação" foi obtida através do teste (post-hoc) das diferenças máximas significantes de Tukey.

Banda (Hz)	Dia	Situação	ANOVA
0 ~ 10	21	Controle > Laser	[F(1, 478) = 39,5, $p < 0,0001$]
	28	Controle > Laser	[F(1, 478) = 34,6, $p < 0,0001$]
10 ~ 20	7	Controle > Laser	[F(1, 478) = 9,34, $p < 0,002$]
	21	Controle > Laser	[F(1, 478) = 53,8, $p < 0,0001$]
	28	Controle > Laser	[F(1, 478) = 29,1, $p < 0,001$]
20 ~ 30	7	Controle > Laser	[F(1, 478) = 6,75, $p < 0,009$]
	21	Controle > Laser	[F(1, 478) = 96,8, $p < 0,0001$]
	28	Controle > Laser	[F(1, 478) = 23,8, $p < 0,0001$]
30 ~ 40	21	Controle > Laser	[F(1, 478) = 97,5, $p < 0,0001$]
	28	Controle > Laser	[F(1, 478) = 22,1, $p < 0,0001$]
40 ~ 50	21	Controle > Laser	[F(1, 478) = 102,9, $p < 0,0001$]
	28	Controle > Laser	[F(1, 478) = 10,1, $p < 0,001$]

Hz. Os dados obtidos no 28º dia após a lesão apontam para a ocorrência de regeneração nervosa periférica no grupo de animais irradiados com laser HeNe, tendo em vista que as médias de potências apresentaram-se semelhantes entre os períodos pré-lesão e o 28º dia após a lesão.

Foi realizada, também, a comparação das médias das potências do espectro de frequência de 0 a 50 Hz, entre os grupos controle e o grupo irradiado com laser HeNe. De acordo com os dados expostos na Tabela III, nota-se a superioridade das médias das potências das frequências do grupo controle em relação ao grupo irradiado com laser HeNe. Essas diferenças evidenciam que o grupo submetido à laserterapia de baixa intensidade apresentou melhor recuperação, pois a expressão da atividade eletromiográfica no grupo irradiado não revela potenciais espúrios. Apesar de a Tabela III não mostrar, nos demais dias não foi possível observar diferenças estatisticamente significantes entre os grupos estudados, apontando para o fato de ambos apresentarem o mesmo nível de comprometimento funcional nesses dias.

Discussão

Apesar dos grandes avanços nas técnicas de cirurgia reconstrutora de nervos lesionados ocorridos nos últimos anos, não existe, até então, meios que assegurem um retorno funcional plausível após tal intervenção. Em face desse desafio, desde a década de 1970 tem se tentado desenvolver alternativas terapêuticas que visam a potencializar a recuperação funcional e a melhora clínica de indivíduos portadores de seqüelas decorrentes de lesões nervosas periféricas. Dentre essas alternativas destaca-se o emprego da laserterapia de baixa intensidade, e a comprovação da eficácia de tais alternativas se dá através de estudos morfológicos, funcionais, comportamentais e eletrofisiológicos. Pelo exposto até então, acredita-se que a irradiação de laser HeNe é capaz de promover regeneração acelerada do nervo ciático de ratos Wistar e, guardadas as devidas proporções, a sua indicação também pode servir à condição humana.

Os registros apresentados nas Figuras 2, 3, 4, 5 e 6 corroboram os dados de Ferreira [16], ressaltando que o músculo íntegro não apresenta atividade elétrica no repouso, exceto os chamados “potenciais de placa”, que são gerados na placa mioneural e que são fisiológicos. Quando ocorre uma lesão nervosa periférica, de magnitude tal que haja comprometimento axonal (axoniotmese e neurotmese), há o aparecimento de potenciais de fibrilação e ondas positivas. Estes potenciais representam a descarga espontânea de fibras musculares desnervadas em função de uma instabilidade da membrana celular muscular e indicam desnervação. O surgimento dos potenciais de fibrilação e de ondas positivas ocorre em torno de 2 a 5 semanas após a lesão, dependendo da distância entre o músculo examinado e a lesão. Quanto mais próximo estiverem, mais rapidamente aparecerão estes potenciais, uma vez que o tamanho do coto axonal que sofre degeneração é menor.

Após a desnervação, pode ocorrer um processo de reinervação, uma vez que se trate de uma lesão parcial (axoniotmese), por um processo de brotamento colateral de axônios de neurônios sobreviventes. Este processo de reinervação se manifesta eletromiograficamente sob a forma de potenciais polifásicos, que são um reflexo do aumento de dispersão temporal das fibras musculares que constituem o potencial de ação de unidade motora, que descarregam assincronicamente em função de uma maior variação da localização anatômica das placas mioneurais de cada uma delas, e da lentificação na condução nervosa dos colaterais nervosos imaturos [16].

Conforme Finsterer [17], na análise do espectro de potência ocorre a decomposição das ondas senoidais de diferentes fases, frequências e amplitudes, realizada através da transformada rápida de Fourier (FFT). A maior banda de frequência do espectro de potência é resultante da duração dos potenciais da unidade motora (PUM). Para Ferreira [16], altas frequências refletem um curto tempo de subida e curta duração dos PUMs, e ondas polifásicas. Baixas frequências refletem longa duração dos potenciais da unidade motora com um longo tempo de subida. Durante a tentativa de contração muscular máxima, em função de uma diminuição no número de unidades motoras e conseqüentemente de fibras musculares, há redução no número de potenciais de ação de unidades motoras recrutadas, tornando o traçado rarefeito. Normalmente, em uma contração muscular de esforço máximo, são recrutadas tantas unidades motoras que não é possível individualizá-las, caracterizando o chamado padrão interferencial. O simples recrutamento de alguns potenciais de ação de unidade motora é sinal de que, ao menos, existe continuidade parcial do nervo através da lesão e, portanto, melhor prognóstico.

De acordo com Navarro [18] e Gramsberger, Ijkema-Paarsen e Meek [19], a perda de continuidade entre um nervo e um músculo esquelético pode ser imediatamente identificada pela eletromiografia. A presença de potenciais de fibrilação em um músculo relaxado pode ser um sinal de desnervação, entretanto normalmente eles não aparecem antes de três semanas depois do surgimento da lesão. As neuropatias periféricas caracterizam-se pela redução da atividade das unidades motoras até o ponto de perder o padrão de interferência, inclusive durante esforço máximo. Os potenciais de ação são, geralmente, polifásicos devido provavelmente às alterações na velocidade de condução dos ramos que inervam as fibras da unidade motora. As amplitudes e durações são normais ou ligeiramente inferiores. Os potenciais polifásicos precedem a recuperação das fibras musculares desnervadas e são vistos durante a regeneração nervosa. Já os potenciais da unidade motora agrupados podem ser vistos em lesões pós-iscêmicas da porção do neurônio motor inferior e geralmente aparecem após regeneração nervosa. Os primeiros sinais de desnervação ativa ocorrem após aproximadamente 14 dias de injúria, com presença de ondas agudas positivas e fibrilações. Os potenciais de desnervação surgem primeiramente nos

músculos mais próximos da lesão e posteriormente nos músculos mais distais. Esses potenciais podem persistir nos músculos parcialmente desnervados por tempo indefinido. Já em lesões completas, onde o músculo é totalmente desnervado e atrófico, os potenciais de desnervação desaparecem em aproximadamente 1 ano.

Após duas semanas de lesão, os potenciais de desnervação (ondas agudas positivas e fibrilações) começam a surgir na axoniotmese e na neurotmesa. Teoricamente, quando a lesão for puramente neuropráxica, não há potenciais de desnervação no EMG. Entretanto, na prática, mesmo em lesões predominantemente neuropráxicas, algum grau de degeneração axonal secundária ocorre e potenciais de desnervação podem ser registrados [20].

Buerger *et al.* [15] estudaram o processo de regeneração nervosa periférica de ratos submetidos ao laser de baixa intensidade, através do diodo laser GaAlInP (658 nm) numa dose de 6 J/cm², por meio de análises histopatológicas, e observaram que as estruturas estudadas (músculos e nervo ciático) apresentavam sinais claros de recuperação morfológica no grupo irradiado.

Silva [21], utilizando o mesmo protocolo acima, realizou a avaliação funcional da marcha de ratos empregando o IFC (Índice Funcional do Ciático). Nesse estudo o autor observou que os animais que receberam irradiações diárias de laser apresentavam melhores resultados, sob o ponto de vista funcional, que aqueles que receberam laser em dias intercalados ou aqueles que não foram irradiados. Esses resultados apontam para a necessidade de uma rotina de irradiação imediata e contínua, pois o grupo irradiado intercaladamente por 21 dias não apresentou os mesmos resultados favoráveis.

Camargo *et al.* [22] realizaram um estudo comparativo entre o laser de AsGa (904 nm) com uma dose de 4 J/cm² e HeNe com uma dose de 9 J/cm² através da técnica pontual e de varredura sobre o nervo ciático de ratos lesionados por esmagamento, efetuando para isso a análise funcional da marcha dos animais através do IFC. Nesse estudo observaram que os animais irradiados com laser HeNe apresentaram evidente recuperação da marcha quando comparado aos animais controle ou irradiados com laser AsGa.

Rochkind e Ouaknine [23] propõem a hipótese de que a radiação laser é absorvida por sensibilizadores endógenos como as porfirinas, ou por fotorreceptores que são componentes da cadeia respiratória, como as flavinas, citocromos e enzimas mitocondriais (citocromo-oxidase). A estimulação laser aumenta a liberação de Ca²⁺ pela mitocôndria para o citoplasma juntamente ao aumento da produção de ATP na mitocôndria. Em células eucarióticas, o laser promove a proliferação celular, sendo que nos neurônios ocorre o mesmo efeito, potencializando o crescimento do nervo. Além disso, a mobilização de Ca²⁺ nos terminais axônicos gera liberação exocitótica de acetilcolina, neurotransmissor responsável pela transmissão sináptica dos potenciais de ação de uma célula nervosa ao músculo, explicando os potenciais eletro-

miográficos encontrados seletivamente após o 21º dia de experimentação aqui descritos. Adicionalmente, a mobilização estimulada de Ca²⁺ no cone de crescimento axonal promove a ativação de cinases intracelulares que atingindo o pericário, por transporte axonal retrógrado, promovem a transcrição de RNA mensageiro que sintetizam proteínas do citoesqueleto e que, por sua vez, promovem a expansão dos filopódios do cone em direção aos seus alvos originais, culminando em reinervação muscular [4,24,25].

Conclusão

Sustentados nos resultados obtidos é possível inferir que o laser de baixa intensidade HeNe é capaz de favorecer o processo de regeneração nervosa periférica após a lesão por axoniotmese. Nossos dados estão em consonância com os de outros autores que apontam para a possibilidade do emprego dessa técnica, também, em indivíduos humanos. Essa afirmação se apóia nas fortes evidências que indicam que modelos animais e seres humanos compartilham profundas semelhanças estruturais e funcionais no que tange o sistema nervoso periférico.

Agradecimentos

À Pró-reitoria de pesquisa e pós-graduação da FURB pelo apoio logístico e financeiro dado ao projeto. Ao departamento de Fisioterapia da FURB pelo empenho e incentivo aos projetos de pesquisa conduzidos sob a sua tutela. Ao CNPq pela bolsa de iniciação científica do então acadêmico Alexandre Ademar Hoeller.

Referências

1. Waldram M. Peripheral nerve injuries. *Trauma* 2003;5:79-96.
2. Rodríguez FJ, Valero-Cabré A, Navarro X. Regeneration and functional recovery following peripheral nerve injury. *Drug discovery today: disease models*; 2004. p.177-185.
3. Sanes JR, Jessel MT. A formação e a regeneração das sinapses. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM. *Princípios da neurociência*. 4a ed. São Paulo: Manole; 2000.
4. Muller BK. Growth cone guidance: first steps towards a deeper understanding. *Annu Rev Neurosci* 1999;22:351-88.
5. Mert T et al. Changes in electrophysiological properties of regenerating rat peripheral nerves after crush injury. *Neurosci Lett* 2004;363(3):212-7.
6. Bontioti EN, Kanje M, Dahlin LB. Regeneration and functional recovery in the upper extremity of rats after various types of nerve injuries. *J Peripher Nerv Syst* 2003;8:159-68.
7. Shamir MH et al. Double-blind randomized study evaluating regeneration of the rat transected sciatic nerve after suturing and postoperative low-power laser treatment. *J Reconstr Microsurg* 2001;2:133-7.
8. Gigo-Benato D, Geuna S, Rochkind S. Phototherapy for enhancing peripheral nerve repair: a review of literature. *Muscle Nerve* 2005;31:694-701.

9. Rochkind S et al. Effects of laser irradiation on the spinal cord for the regeneration of crushed peripheral nerve in rats. *Lasers in Surgery and Medicine* 2001;28:216-9.
 10. Varejão APS et al. Methods for the experimental functional assessment of rat sciatic nerve regeneration. *Neurological Research* 2004;26:186-194.
 11. Medinaceli L. Interpreting nerve morphometry data after experimental traumatic lesions. *J Neurosci Methods* 1995;58:29-37.
 12. Low J, Reed A. *Eletroterapia explicada: princípios e prática*. 3a ed. São Paulo: Manole; 2001.
 13. Nestor DE, Nelson RM. *Avaliação eletrofisiológica: uma revisão*. In: Currier DP, Hayes KW, Nelson RM. *Eletroterapia clínica*. 3a ed. São Paulo: Manole; 2003.
 14. Lundy-Ekman L. *Neuroscience: fundamentals for rehabilitation*. 2a ed. Elsevier; 2002.
 15. Buerger C et al. Efeitos da laserterapia de baixa potência sobre os processos de regeneração do tecido nervoso periférico. *Fisioter Mov* 2004;17(2): 67-74.
 16. Ferreira AS. *Lesões nervosas periféricas: diagnóstico e tratamento*. Santos; 1999.
 17. Finsterer J. EMG-interference pattern analysis. *J Electromyogr Kinesiol* 2001;11:231-46.
 18. Navarro RB. *Electromiografía. Instrumentación biomédica*. Departamento Electrónica. Universidad Alcalá. [citado 2005 jun 20]. Disponível em: <http://neurofisio.hn.org/archivos/electromiografia.pdf>.
 19. Gramsberger A, Ijkema-Paarsen J, Meek MF. Sciatic nerve transection in the adult rat: abnormal EMG patterns during locomotion by aberrant innervation of the hindleg muscles. *Exp Neurol* 2000;161:183-93.
 20. Almeida DF. Trauma de nervos. [citado 2005 jun 20]. Disponível em: http://www.emglab.com.br/html/trauma_de_nervos.html.
 21. Silva ES. *Avaliação funcional da marcha de ratos submetidos à laserterapia de baixa intensidade após a lesão do nervo ciático*. [Trabalho de Conclusão do Curso de Fisioterapia]. Blumenau: Universidade Regional de Blumenau; 2003.
 22. Camargo VM. *Estudo comparativo entre dois tipos de raios laser de baixa potência e seus respectivos efeitos sobre a regeneração nervosa periférica*. [Trabalho de Conclusão do Curso de Fisioterapia]. Blumenau: Universidade Regional de Blumenau; 2005.
 23. Rochkind S, Ouaknine E. New trend in neuroscience: low power laser effect on peripheral and central nervous system (basic science, preclinical and clinical studies). *Neurological Research* 1992;14(1):126-35.
 24. Skaper SD, Moore SE, Walsh SF. Cell signaling cascades regulating neuronal growth-promoting and inhibitory cues. *Prog Neurobiol* 2001;65:593-608.
 25. Yasuda H et al. Diabetic neuropathy and nerve regeneration. *Prog Neurobiol* 2003;69:229-85.
-