

## EFEITO NA FUNÇÃO MOTORA DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE EM RATOS SUBMETIDOS À NEUROTMESE

G. B. N. Mendonça\*, J. F. Araújo\*, D. F. Rodrigues\*, I. S. Avelar\*\*, L. A. B. Brito\* e M. F. Vieira\*\*

\*Escola de Veterinária e Zootecnia/UFG, Goiânia-GO, Brasil

\*\*Laboratório de Biomecânica e Bioengenharia/FEF/UFG, Goiânia-GO, Brasil  
e-mail: gisellebonemen@gmail.com

**Resumo:** Este trabalho tem o objetivo de relatar os efeitos funcionais da aplicação do laser de baixa intensidade a 830 nm em nervo isquiático de ratos submetidos à neurotmeose utilizando o Índice Funcional do Ciático (IFC) e o Ângulo do Tarso (AT). Usaram-se dois grupos, controle (GC) e laser (GL), com seis animais em cada um. Todos os animais foram submetidos à neurotmeose do nervo isquiático esquerdo seguido de tubulização com câmara de silicone. Os animais do GL receberam radiação com comprimento de onda de 830nm, densidade de energia de 4,13J/cm<sup>2</sup>, em oito pontos, desde a região da medula espinhal até o local de lesão do nervo, totalizando 40 dias de irradiação divididos em dois momentos distintos. A mensuração do IFC foi realizada em oito momentos iniciando-se no pré-operatório, um dia após a cirurgia e a cada 21 dias até o final do experimento no 126º dia de pós-operatório. Para a aferição do AT realizaram-se três coletas em tempos diferentes: pré-operatório, primeiro dia pós-operatório e 126º dia do pós-operatório, utilizando captura de movimento e análise pelo software *Visual 3D*. Ao final do experimento, os animais do GC e GL apresentaram valor de IFC respectivamente de -83,4 e -92,1 e de AT de 21,2º e 13,2º, sem diferença significativa entre os grupos ( $p>0,05$ ). Concluiu-se que não houve melhora funcional motora do nervo isquiático dos ratos submetidos à neurotmeose e tratados com laser a 830 nm.

**Palavras-chave:** Ângulo do tarso, biomecânica, índice funcional do ciático, fototerapia, motion capture

**Abstract:** This study aimed to report the functional effects of the application of low intensity laser at 830 nm on rat's sciatic nerves submitted to neurotmesis using the Sciatic Functional Index (SFI) and the Ankle Angle (AA). We used two groups, control (GC) and laser (GL), with six animals in each. All animals underwent left sciatic nerve neurotmesis followed by tubing with silicone chamber. Animals in GL received radiation with a wavelength of 830 nm, energy density of 4.13 J/cm<sup>2</sup>, on eight points from the spinal cord to nerve injury site, totaling 40 days of irradiation divided into two distinct periods. The SFI measurement was performed in eight days starting preoperatively, one day after surgery and every 21 days until the end of the experiment at 126 days postoperatively. We measured the AA at three different times: preoperative, first postoperative day and

126 days postoperatively, using motion capture and Visual 3D software. At the end of this study, the animals showed SFI values, in GC and GL, respectively, of -83.4 and -92.1 and AA of 21.2º and 13.2º, with no significant difference between groups ( $p>0,05$ ). We concluded that there was no functional motor improvement in sciatic nerve of rats submitted to neurotmesis and treated with laser at 830 nm.

**Keywords:** Ankle Angle, biomechanics, phototherapy, sciatic functional index, motion capture

### Introdução

A regeneração e a recuperação funcional de nervos periféricos dependem da severidade da injúria. Entre os vários métodos propostos para melhorar a reparação nervosa, o laser de baixa intensidade começou a ser empregado no processo de regeneração e na recuperação funcional de lesões nervosas periféricas a partir de 1980, havendo vários relatos positivos e negativos sobre seus efeitos [1-3].

Para analisar a funcionalidade dos músculos inervados pelo nervo isquiático de ratos, diversos autores [4-6] vêm utilizando o Índice Funcional do Ciático (IFC), proposto por De Medinaceli em 1982 [7] e modificado por Bain *et al.* em 1989 [8]. Já outros pesquisadores [9-10] propuseram a aferição do Ângulo do Tarso (AT), obtido durante a fase de apoio da marcha.

Este trabalho tem o objetivo de relatar os efeitos funcionais da aplicação do laser de baixa intensidade a 830 nm em nervo isquiático de ratos submetidos à neurotmeose seguida de tubulização com câmara de silicone, utilizando o IFC e o AT.

### Materiais e métodos

O experimento foi conduzido no Biotério Experimental da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (EVZ/UFG) e no Laboratório de Bioengenharia e Biomecânica da Faculdade de Educação Física da UFG (FEF/UFG), Goiânia-GO. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFG protocolado sob o nº 051/11.

Utilizaram-se 12 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, machos. Os animais foram alocados em dois grupos com seis animais cada, sendo um o

Grupo Controle (GC) submetido à técnica de tubulização com câmara de silicone associada à aplicação de laser de baixa intensidade (830 nm) com aparelho desligado; e o outro, Grupo Laser (GL) submetido à técnica de tubulização com câmara de silicone associada à aplicação de laser de baixa intensidade (830 nm).

**Procedimento cirúrgico** – Os ratos receberam aplicação pré-anestésica por via intraperitoneal de cloridrato de tramadol e cloridrato de xilazina. Foram mantidos em indução e manutenção anestésica com isoflurano (Vetflurano<sup>®</sup>, Virbac, São Paulo, Brasil). Os animais foram posicionados em decúbito lateral direito, promovendo-se o acesso ao nervo isquiático na face lateral da coxa esquerda, desde o trocânter maior até o joelho. Após divulsão entre os músculos semitendinoso e bíceps femoral, localizou-se o nervo isquiático. Procedeu-se, então, a neurotome com bisturi, seguida da aproximação dos cotos nervosos pela técnica de tubulização, com distância entre estes cotos dentro da câmara de 5 mm. Finalizado o procedimento cirúrgico, foi realizado o reposicionamento do tecido muscular e a sutura da pele. A analgesia pós-cirúrgica se deu pela aplicação de cloridrato de tramadol.

**Aplicação do laser de baixa intensidade** – Para as aplicações do laser de baixa intensidade, utilizou-se aparelho de laser (*Laserpulse*, Ibramed Equipamentos Médicos, Rio Grande do Sul, Brasil) com comprimento de onda de 830 nm, potência de saída de 30 mW, modo contínuo e área de radiação efetiva de 0,116 cm<sup>2</sup>. Foram irradiados quatro pontos sobre a medula espinhal, na região paravertebral esquerda, nos segmentos medulares de L3 até L6, e quatro pontos acompanhando o trajeto do nervo ao longo da face caudolateral do fêmur até articulação do joelho. Irradiaram-se estes pontos por 40 dias divididos em dois momentos distintos. O primeiro momento iniciou-se no pós-cirúrgico imediato em que foram realizadas 20 aplicações de laser, em dias alternados. O segundo momento ocorreu 40 dias antes de realizar a eutanásia dos animais, realizada no 126º dia de pós-operatório, com mais 20 dias de aplicações de laser, em dias alternados.

**Índice funcional do ciático** – A mensuração do IFC foi realizada no pré-operatório, um dia após a cirurgia e a cada 21 dias até o final do experimento. Desta forma, totalizaram-se oito coletas do IFC de cada rato em tempos diferentes: pré-operatório (T0), primeiro dia pós-operatório (T1), 21º dia (T2), 42º dia (T3), 63º dia (T4), 84º dia (T5), 105º dia (T6) e 126º dia (T7) do pós-operatório. Para realizar o IFC por meio de técnica digital, fez-se necessária a confecção de uma passarela de acrílico transparente, com 2 mm de espessura, 43 cm de comprimento e 9 cm de largura e altura. Sob a passarela, posicionado a 45º de inclinação, foi colocado um espelho com 43 cm de comprimento e 11 cm de largura. Em uma das extremidades da passarela foi acoplado um abrigo escuro de placa de fibra de madeira de média densidade (MDF). Do outro lado foi acoplada uma área sem cobertura, para preparar o animal antes de iniciar a marcha sobre o acrílico, também confeccionada

em MDF. Para realizar a filmagem dos animais ao caminharem pela passarela utilizou-se câmera digital (*Sony Cybershot - HX7*) posicionada em frente ao espelho, na mesma altura da passarela de acrílico, a 50 cm de distância. Após os filmes serem transferidos por meio de cabo USB para um computador e processados no *software* PMB (*Picture Motion Browser*), selecionaram-se os quadros correspondentes à melhor pegada, tanto do membro pélvico experimental (E) quanto do normal (N). As imagens obtidas foram recortadas no formato 400 X 280 pixels e transferidas para o *software* Paint em formato png.

Três medidas foram obtidas de cada um dos membros pélvicos: o comprimento da pegada (PL ou “*print length*”) que era aferida entre os dois pontos mais extremos da pegada no sentido longitudinal; o espalhar total dos dedos (TS ou “*total spread*”) que foi obtida pela distância entre o primeiro e o quinto dedo; e o espalhar dos dedos intermediários (IT ou “*intermediate toes*”) que era a distância entre o segundo e o quarto dedo.

A mensuração das distâncias foi realizada de forma automática, após selecionar os pontos, mediante o *software* IFC\_RATOS desenvolvido pelo Laboratório de Bioengenharia e Biomecânica da Faculdade de Educação Física da UFG (FEF/UFG). Inseriu-se neste *software* a fórmula matemática desenvolvida por Bain *et al.* em 1989 [8]. Após abrir as imagens correspondentes aos lados N e E e marcar todos os pontos, o valor do IFC era automaticamente calculado pelo programa. Os valores do IFC próximos a zero foram considerados resultados de marcha normal e -100 considerados com perda total da função do membro lesionado. Foi atribuído, também, valor de -100 nos casos de apoio do dorso do pé e presença de contratura intensa dos flexores digitais.

**Ângulo do Tarso** – Obteve-se o AT em três tempos diferentes: pré-operatório (T0), primeiro dia de pós-operatório (T1) e 126º dia de pós-operatório (T7). Para aferir o AT utilizou-se captura de movimento e o *software* Visual 3D e fez-se necessária a colocação de três marcadores retrorreflexivos, com 6 mm de diâmetro, em cada animal. Estes marcadores foram fixados, sempre pelo mesmo pesquisador, com fita dupla face nas seguintes regiões anatômicas do membro pélvico esquerdo, previamente tricotomizadas: côndilo lateral da tíbia, maléolo lateral e entre dorso das cabeças do quinto e quarto metatarsos.

Os animais foram colocados para caminhar na mesma passarela utilizada para o IFC, porém sem o espelho. A passarela foi instalada sobre uma mesa, com 67 cm de altura, e, frontalmente a 1,20 m de distância, foi posicionado o sistema *Optitrack®* (*Natural point, Optical Motion Capture Solutions*) composto por duas câmeras *Flex* (V100R2) fixadas em tripés, equidistantes 1,60 m, e formando ângulo 45º com a passarela para os procedimentos de captura de imagens dos marcadores retrorreflexivos fixados nos animais.

As câmeras operavam a 100 Hz com captura de imagem em tempo real e sinal sincronizado através de

cabo USB. Para a captura dos pontos previamente marcados com os marcadores retroflexivos foi empregado o *software Amass®* no qual também se processaram os dados. Em seguida, estes foram transferidos para o *software Visual 3D® (C-Motion®)*, para a construção do modelo biomecânico e a análise cinemática.

Para a construção do modelo biomecânico fez-se primeiramente a aquisição estática de um rato com os marcadores passivos fixados nos pontos anatômicos previamente descritos. Em seguida, criaram-se três marcas virtuais localizadas medialmente aos marcadores reais. Para isso, aferiu-se a medida do raio do joelho, tarso e pé que foi respectivamente: 30 mm, 15 mm e 20 mm. Com isso, criaram-se dois segmentos: perna esquerda e pé esquerdo, finalizando a construção do modelo biomecânico. Criado o modelo biomecânico, o *software Visual 3D®* processou os dados referentes aos animais em postura dinâmica, que foram interpolados e filtrados usando o filtro do tipo *low pass Butterworth* de quarta ordem. O sistema foi devidamente calibrado de acordo com as recomendações de calibração para análise de movimento.

A variável analisada foi o AT no plano sagital no instante da retirada do pé do solo, na fase final do apoio. Valores de ângulos positivos indicavam flexão dorsal e os ângulos negativos, flexão plantar.

**Análise Estatística** – Após obter-se a média dos valores mensurados de cada grupo em cada tempo analisado, tanto para o IFC quanto para o AT, aplicou-se o teste *Mann-Whitney* para verificar as diferenças entre os grupos. O nível de significância adotado foi de 5% ( $p < 0,05$ ) utilizando o *software IBM SPSS* versão 15.0.

## Resultados

O valor médio do IFC nos grupos experimentais, GC e GL, nos tempos T0 a T7 estão na Tabela 1. Verificou-se que não houve diferença significativa nos valores do IFC nos oito tempos de avaliação ( $p > 0,05$ ) ao comparar os dois grupos.

Tabela 1: Valor médio e desvio padrão do IFC e AT nos tempos experimentais de T0 a T7 e de T0, T1 e T7, respectivamente, de ratos do GC e GL  $p < 0,05$ .

IFC	GC	GL	p
T0	-9,58 ± 10,28	-7,95 ± 20,31	0,749
T1	-103,27 ± 20,20	-94,68 ± 12,78	0,197
T2	-112,77 ± 8,18	-105,70 ± 10,26	0,150
T3	-87,37 ± 27,70	-87,62 ± 20,79	1,000
T4	-69,33 ± 25,38	-85,97 ± 20,17	0,378
T5	-69,20 ± 27,38	-84,45 ± 13,80	0,420
T6	-67,88 ± 28,27	-83,93 ± 23,82	0,259
T7	-83,40 ± 34,20	-92,07 ± 14,38	0,732
AT	GC	GL	p
T0	6,5 ± 24,4	7,0 ± 31,2	0,818
T1	41,2 ± 22,5	38,6 ± 14,6	0,937
T7	21,2 ± 6,0	13,2 ± 9,1	0,065

Observou-se que após a neurotome, houve nítida alteração da marcha de todos os animais, de ambos os

grupos, devido à deservação dos músculos flexores plantares, apresentando adução dos dedos, discreta flexão das articulações interfalangeanas e intensa flexão dorsal com descarga de peso no calcâneo do membro lesionado. Os valores do IFC no T1 ficaram próximos a -100, sendo de -103,3 ( $\pm 20,2$ ) para o GC e -94,7 ( $\pm 12,8$ ) para o GL. Três ratos do GL arrastaram o dorso do pé no solo na fase de apoio, no T1, e atribuiu-se valor -100 ao IFC destes animais devido à impossibilidade de marcar os pontos necessários. Foi atribuído, também, o valor -100 ao IFC dos animais de ambos os grupos que apresentaram contratura dos flexores das articulações interfalangeanas.

Com relação ao AT, após o procedimento cirúrgico, tanto no GC quanto no GL, houve intensa flexão dorsal do membro operado em toda a fase de apoio, com suporte de peso sobre os metatarsos, tarso e calcâneo. Na fase final do apoio, no momento de saída do pé do solo, houve ausência de flexão plantar. Neste momento, as articulações do joelho e quadril fizeram extensão. Já na fase de balanço, ocorreu a tríplex flexão simultânea do quadril, joelho e tarso, evidenciando que os músculos flexores dorsais estavam intactos. Os valores angulares de AT obtidos para o GC e GL nos tempos T0, T1 e T7 estão demonstrados na Tabela 1.

## Discussão

A irradiação do laser proposta neste estudo tanto no segmento da medula espinhal correspondente ao nervo lesionado quanto no trajeto do nervo está de acordo com vários pesquisadores [11-13]. No entanto, Sousa *et al.* [3] relataram que não obtiveram melhora na regeneração nervosa periférica de ratos submetidos à axonotomese por meio da avaliação funcional da marcha no grupo tratado com laser de AsGaAl (830nm) em ambos os locais, no segmento da medula espinhal e no trajeto do nervo.

Observou-se que no 21º e no 42º dia de pós-cirúrgico os valores do IFC do GL foram melhores do que os do GC, porém sem diferença estatística, como observado também por Reis *et al.* [2] que obtiveram melhor resposta no grupo tratado com laser no 21º dia de pós-operatório, sem diferença significativa. Estes resultados são discordantes de Medalha *et al.* [14] cujos valores de IFC, após neurotome, em animais tratados com laser foram melhores estatisticamente. No entanto, estes autores não relataram a presença de contraturas como observado neste estudo.

A adoção do valor de -100 ao IFC dos animais que apresentaram contratura muscular ocorreu pela impossibilidade de marcação da região plantar dos dígitos destes animais que estavam apoiados sobre o dorso das falanges distais, impedindo uma mensuração equivalente aos animais que não apresentavam contratura do membro, interferindo no valor real do IFC. O fato dos animais terem apresentado contraturas dos músculos flexores permitiu concluir que houve perda da função motora, impossibilitando a aplicação do método do IFC proposto por De Medinacelli [7]. O

método de análise proposto por este autor tem o objetivo de investigar a medida da abdução dos dedos bem como o comprimento da pegada. Entretanto nesta pesquisa, em alguns animais as falanges distais se flexionaram havendo encurtamento do comprimento da pegada, quando da aferição da extremidade do terceiro dedo que estava flexionado até a região de maior apoio no calcâneo, constituindo-se assim em uma variação do método original.

Os dados obtidos indicaram que o IFC em lesões do tipo neurotmesa, com recuperação em longo prazo, não foi adequado para analisar a marcha de ratos devido às contraturas musculares desenvolvidas, confirmando os achados descritos por DINH *et al.* [15].

Em contraste ao IFC, o AT obtido no momento de retirada do pé do solo, no final da fase de apoio, revelou ser mais fidedigno como método de avaliação da funcionalidade da musculatura desnervada. Este método demonstrou que a medida do AT não sofreu influência das contraturas musculares desenvolvidas durante o experimento nos membros lesionados dos animais, estando de acordo com os postulados por diversos autores como JOÃO *et al.* [9] e AMADO *et al.* [10].

Embora o método de mensuração do AT tenha se revelado melhor do que o IFC, deve-se ressaltar que o AT sofreu influência do movimento da pele sobre a proeminência óssea na região proximal da tibia durante a marcha, como observado também por JOÃO *et al.* [9].

Concluiu-se que não foi possível observar melhora funcional motora do nervo isquiático dos ratos submetidos à neurotmesa e tratados com laser a 830 nm. Porém, o método de aferição pelo Ângulo do Tarso demonstrou ser mais adequado para detectar alterações motoras em longo prazo do nervo isquiático submetido à neurotmesa por não sofrer influência das contraturas musculares.

#### Agradecimentos

Ao CNPq pelo auxílio financeiro concedido sob o processo número 482881/2011-9.

#### Referências

- [1] Bagis S, Comelekoglu U, Coskun B, Milcan A, Buyukakilli B. No effect of GA-AS (904 nm) laser irradiation on the intact skin of the injured rat sciatic nerve. *Lasers in Medical Science*. 2003; 18(1):83-88.
- [2] Reis FA, Belchior ACG, Carvalho PTC, Silva BAK, Pereira DM, Silva IS, Nicolau RA. Effect of laser therapy (660 nm) on recovery of the sciatic nerve in rats after injury through neurotmesis followed by epineural anastomosis. *Lasers in Medical Science*. 2009; 24(5):741-747
- [3] Sousa FFA, Ribeiro TL, Fazan VPS, Barbieri CH. Lack of effectiveness of laser therapy applied to the nerve course and the correspondent medullary roots. *Acta Ortopédica Brasileira*. 2013; 21(2):92-97.
- [4] Monte-Raso VV, Barbieri CH, Mazzer N, Yamasita AC, Barbieri G. Is the Sciatic Functional Index always reliable and reproducible? *Journal of Neuroscience Methods*. 2008; 170(2):255-261.
- [5] Jungnickel J, Haastert K, Grzybek M, Thau N, Lipokatic-Takacs E, Ratzka A, Nölle A, Claus P, Grothe C. Mice lacking basic fibroblast growth factor showed fast sensory recovery. *Experimental Neurology*. 2010; 223:166-172.
- [6] Marcolino AM, Barbosa RI, Neves LMS, Mazzer N, Guirro RRJ, Fonseca MCR. Assessment of functional recovery of sciatic nerve in rats submitted to low-level laser therapy with different fluences. An experimental study. *Journal of Hand and Microsurgery*. 2013; 5(2):49-53.
- [7] De Medinaceli L, Derenzo E, Wyatt RJ. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Experimental Neurology*. 1982; 77(3):634-643.
- [8] Bain JR, Mackinnon SE, Hunter RT. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 1989; 83(1):129-136.
- [9] João F, Amado S, Veloso A, Armada-da-Silva PAS, Mauricio AC. Anatomical reference frame versus planar analysis: implications for the kinematics of the rat hindlimb during locomotion. *Reviews in the Neurosciences*. 2010; 21:469-485.
- [10] Amado S, Armada-da-Silva PAS.; João F, Mauricio AC, Luís AL, Simões MJ, Veloso AP. The sensitivity of two-dimensional hindlimb joint kinematics analysis in assessing functional recovery in rats after sciatic nerve crush. *Behavioural Brain Research*. 2011; 225(2):562-573.
- [11] Anders JJ, Geuma S, Rochkind S. Phototherapy promotes regeneration and functional recovery of injured peripheral nerve. *Neurological Research*. 2004; 26:233-239.
- [12] 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. *Journal of Reconstructive Microsurgery*. 2001; 17(2):133-137.
- [13] Rochkind S, Leider-Trejo L, Nissan M, Shamir MH, Kharenko O, Alon M. Efficacy of 780-nm laser phototherapy on peripheral nerve regeneration after neurotube reconstruction procedure (double-blind randomized study). *Photomedicine and Laser Surgery*. 2007; 25(3):137-143.
- [14] Medalha CC, Di Gangi GC, Barbosa BC, Fernandes M, Aguiar O, Faloppa F, Leite VM, Renno ACM. Low-level laser therapy improves repair following complete resection of the sciatic nerve in rat. *Lasers in Medical Science*. 2012; 27:629-635.
- [15] Dinh P, Hazel A, Palispis W, Suryadevara S, Gupta R. Functional assessment after sciatic nerve injury In a rat model. *Microsurgery*. 2009; 29(8):644-649.