

Efeito do laser de baixa intensidade no trauma agudo medular – Estudo Piloto

Effect of low Power laser in acute spinal cord trauma – Pilot study

Lorraine Maria Abreu¹; Luzianna Valiati Batista¹; Graziella Cristiane Lopes Pereira¹; Leticia Alves Fonseca²; Ivo Ilvan Kerppers³; Claudia Santos Oliveira⁴

¹Graduando em Fisioterapia- Universidade Estadual do Centro Oeste. Guarapuava, PR – Brasil.

²Mestranda em Ciências da Reabilitação-Uninove. São Paulo, SP – Brasil.

³Professor do Departamento de Fisioterapia da Universidade Estadual do Centro Oeste – Unicentro. Guarapuava, PR – Brasil.

⁴Professora doutora do Mestrado em Ciências da Reabilitação-Uninove. São Paulo, SP – Brasil.

Endereço para correspondência

Leticia Alves Fonseca
Rua Domingos de Moraes, 2818 ap. 61, Vila Mariana
04036-100 – São Paulo- SP [Brasil]
Leticiaf_alves@hotmail.com

Resumo

Objetivo: Analisar os efeitos do laser de baixa intensidade sobre a regeneração de células do sistema nervoso central, após lesão medular traumática. **Métodos:** Foram utilizados 20 ratos wistars, divididos em cinco grupos. Foi lesionada, por meio de cirurgia, a região de T8, expondo as meninges e ocasionando um trauma medular compressivo com a queda de um peso de 39 g que comprimiu a medula espinhal. A laserterapia foi aplicada sobre a dimensão da ferida suturada, por um período de 21 dias, em dois animais por grupo, sendo X1 o grupo controle; X2 aplicação de 4J/cm²; X3 aplicação de 10 J/cm²; X4 aplicação de 15 J/cm² e X5 aplicação de 20 J/cm².. **Resultados:** Na análise de células observou-se que todas apresentavam 75% de linfócitos na fase aguda, a presença de neutrófilos em 75% nos grupos X1 e X5, enquanto nos grupos X2 e X3, 25% de células inflamatórias. **Conclusão:** Constatou-se que a aplicação de laserterapia é um método não invasivo que pode auxiliar na resolução do processo inflamatório e edematoso na lesão medular, prevenindo sequelas maiores decorrentes do trauma.

Descritores: Medula espinhal; Laser; Regeneração.

Abstract

Objective: To analyze the effects of low intensity laser on the regeneration of cells in the central nervous system after spinal cord injury. **Methods:** 20 rats Wistars divided into five groups. Was damaged through surgery, the region of T8, exposing the meninges and causing a compressive spinal cord trauma with the fall of a weight of 39 g which compressed the spinal cord. The laser therapy was applied on the size of the wound sutured, for a period of 21 days in two animals per group and the control group X1, X2 4J/cm² application, application of 10 J/cm² X3, X4 application of 15 J / cm² and X5 application of 20 J/cm² .. **Results:** Analysis of cells showed that all had 75% of lymphocytes in the acute phase, neutrophils in 75% in the groups X1 and X5, while groups X2 and X3, 25% of inflammatory cells. **Conclusion:** We found that the application of laser therapy is a noninvasive method that can assist in the resolution of the inflammatory and edematous in spinal cord, preventing major sequelae caused by trauma.

Key words: Laser; Regeneration; Spinal cord.

Introdução

A lesão medular (LM) consiste em qualquer tipo de lesão que ocorra nos elementos neurais do canal medular, que resulta em déficits neurológicos graves e de longa duração^{1,2}.

O surgimento da lesão medular é abrupto, em decorrência de fraturas, luxações ou ferimentos na medula espinhal, e resulta em secção ou dilaceração, parcial ou completa, dos feixes nervosos, responsáveis pela regulação das funções respiratória, circulatória, excretora, sexual, térmica e é a via condutora de estímulos motores e sensitivos aferentes e eferentes entre a periferia e o encéfalo³.

Santos et al (2003)⁴ descreveram que das lesões traumáticas da coluna vertebral, aproximadamente 55% ocorrem na coluna cervical, 15% na torácica, 15% na toracolombar e 15% na lombosacral. Nos Estados Unidos cerca de 10 mil pessoas por ano, principalmente jovens e adultos saudáveis, tornam-se tetraplégicas ou paraplégicas em consequência de lesão da medula espinhal.

As alterações significativas da LM de motricidade e sensibilidade danificam uma rede neural complexa que implica na dependência de terceiros para o desempenho de atividades, antes tidas como corriqueiras, e outras mais íntimas⁵.

A lesão pode ser completa, quando atinge todas as vias motoras e sensitivas, e incompleta quando compromete somente algumas vias motoras e/ou sensitivas. Podem ser também classificadas didaticamente como lesões traumáticas, quando alguns neurônios são mortos e axônios rompidos, em razão do grau do trauma, ou não traumáticas, que englobam doenças congênitas, degenerativas, tumorais, infecciosas, neurológicas, sistêmicas e vasculares⁵.

Trabalhos na área epidemiológica são de grande relevância na lesão medular, em razão da multiplicidade etiológica que varia, no espaço e no tempo, como em situações de paz e guerra. A identificação das causas que originam o trauma medular desempenha um importante papel na separação das ações preventivas, tais como o mergulho em águas rasas ou em piscinas, daquelas que não permitem a profilaxia⁶.

O aumento do contingente de deficientes físicos, especialmente o dos portadores de lesão raquimedular, é um fato alarmante no mundo atual. Na maioria dos casos, essas lesões têm origem traumática, sendo as causas externas mais frequentes no Brasil, o ferimento por arma de fogo, acidente automobilístico e a queda. Constitui fatalidade de grande proporção ao ser humano, pois, além do problema físico, acarreta perda da independência, em vários aspectos, e destruição da autoestima^{4,5,7}.

A maioria dos pacientes apresenta melhora a partir da primeira semana e vai até o 6º mês do trauma. A possibilidade de melhora espontânea, no entanto, diminui após o 6º mês. Estratégias de reabilitação instituídas precocemente podem minimizar a incapacidade de longo prazo. Os sintomas dependem do nível da lesão, da extensão e do tempo do acometimento, sendo classificadas como completa, quando as funções motoras e sensitivas encontram-se interrompidas abaixo do nível do trauma, e incompleta quando existe função motora e/ou sensitiva preservada abaixo da lesão⁸.

A lesão ao tecido medular provoca dois efeitos distintos: primário ou mecânico, decorrentes da lesão traumática mecânica aguda que lesa e comprime os elementos neurais e independe dos mecanismos celulares, e secundário ou isquêmico, em razão de lesões adicionais, resultantes de uma cascata de eventos que envolvem o edema, alteração da perfusão e do fluxo sanguíneo, fatores de crescimento, influxo celular de cálcio, peroxidação lipídica e, por fim, necrose tecidual, que são eventos biológicos desencadeados em decorrência do trauma inicial^{9,10,11,12,13,14}.

A aplicação de laser de baixa potência tem sido utilizada para uso terapêutico na produção e/ou inibição de mediadores envolvidos nos processos inflamatórios e para promover a maturação neural e regeneração, após nervo lesado¹⁵.

Os efeitos não térmicos produzidos pela radiação de baixa potência são amplamente discutidos, pois, de certo modo, não são conhecidos todos os mecanismos nem todos os elementos que

participam da conversão da energia luminosa em energia bioquímica, capaz de gerar processos tão discutidos como o analgésico ou o regenerativo¹⁶.

A terapia com raios laser de baixa potência é uma técnica capaz de acelerar o processo de reparação de tecidos biológicos traumatizados. Os mecanismos que envolvem o processo de bioestimulação ocorrem em nível molecular. A luz laser penetra o interior do tecido, sendo absorvida por determinados cromóforos, o que resulta no aumento do metabolismo celular, em decorrência do aumento da síntese de ATP pelas mitocôndrias¹⁷.

A aplicação do laser de baixa potência em determinadas patologias cutâneas possui a capacidade de estimular a proliferação de fibroblastos, além de diminuir o edema local, favorecendo a neovascularização o que poderá também contribuir para a regeneração neural^{18,19}.

Os efeitos benéficos da terapia por raios de baixa potência sobre o tecido cutâneo já são conhecidos de longa data. De fato, a irradiação laser, principalmente do laser derivado dos gases Hélio e Neônio (HeNe), tem sido usada em diferentes disciplinas médicas para promover a regeneração epitelial^{20,21}.

Esse trabalho teve como objetivo verificar a influência do laser de baixa potência na fase aguda pós-lesão medular por meio da análise histológica do tecido lesionado.

Materiais e métodos

Animais de experimentação

A amostra foi composta de 20 ratos machos adultos (de linhagem albina), Wistar, com peso corporal variando entre 200 a 300 gramas, provenientes do Biotério da Pontifícia Universidade Católica do Paraná- PUCPR.

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Nove de Julho-UNINOVE com o número de protocolo: AN0014/2009, seguindo a resolução 196/96.

Procedimento cirúrgico

Os animais foram anestesiados com 80 mg/kg de xilasina e 50 mg/kg de cetamina, intraperitoneal, cinco minutos antes dos experimentos. Confirmado o efeito da anestesia, por meio da compressão da cauda sem resposta motora do animal, o dorso foi submetido à tricotomia ampla e antissepsi.

O ato cirúrgico constituiu-se de uma incisão na linha média dorsal, tendo como referência os processos espinhosos da oitava à décima terceira vertebral, em cerca de 5 cm de pele e tecido celular subcutâneo, seguida do afastamento subperiosteal da musculatura paravertebral, com uso de lâmina de bisturi nº 11. Após essa exposição, a nona e décima vértebra torácica (T9 e T10), foram identificadas por meio de contagem dos arcos costais e os elementos posteriores dessas duas vértebras removidos (laminectomia), sem lesionar o saco dural.

Para a lesão da medula foi utilizado um peso compressivo de 39 gramas, liberado de uma altura de 5 cm, sobre a medula exposta, durante 5 minutos, comprimindo a medula espinhal. Após a produção da lesão, o animal foi removido do local onde ocorreu a lesão, e a ferida suturada com fio de mononáilon 5.0, em um único plano, com pontos separados.

Aplicação do laser

A aplicação da laserterapia foi iniciada após a sutura da ferida, sendo dividida a pesquisa em cinco grupos, tendo dois animais por grupo, o X1, X2, X3, X4 e X5, consistindo o X1 o grupo controle; X2 na aplicação de 4J/cm²; X3 na aplicação de 10 J/cm²; X4 na aplicação de 15 J/cm² e X5 na aplicação de 20 J/cm², sobre a dimensão da ferida suturada, por um período de 21 dias, de laser de marca Ibrate, com comprimento de onda 904 Nm, potência do aparelho de 40 mW, Spot de 0,7 mm de diâmetro.

Os cuidados pós-operatórios incluíram inspeção da ferida e expressão vesical a cada oito horas, pelo método de Credé, que consiste

em uma massagem sobre a bexiga do animal, facilmente palpável quando distendida.

Os animais receberam 42 mg/kg de morfina, 500mg/kg de cefalotina por via subcutânea para prevenir o quadro séptico pós-cirúrgico e infeccioso, e limpeza diária da ferida com povidone, sendo coberta com gaze e prendida por esparadrapo.

Eutanásia

Os animais foram submetidos à eutanásia com dose letal de Thiopental sódico (100 mg/kg de peso), administrada por via intraperitoneal e, em seguida, retirou-se a parte da medula espinhal para análise histológica.

Procedimentos histológicos

Para análise histológica, as peças foram colocadas em formol a 10%, para fixação do material, por um período de 24 horas, seguidos, posteriormente, de banho de álcool a 50%, 70%, 90% e 100%, durante 30 minutos cada, sendo, em seguida, colocados em Alcool-Xilol e Xilol. Depois as peças foram incluídas em parafina e, a seguir, cortadas em micrótomo marca Leica em 20 microns.

Análise estatística

Para análise estatística foi utilizada uma análise descritiva com o *software Origin 7.0 for Windows*, utilizando-se $p < 0,05$.

Resultados

Na análise histológica, observamos o estado do tecido lesionado, quanto a sua morfologia e estruturas. Foi verificado, quanto ao exsudato Protéico, que o grupo controle (X1), o grupo aplicado 4 J/cm² (X2) e o grupo de 20J/cm² (X5) obtiveram resultado de edema severo, enquanto o grupo X2 de 4J e grupo X3 de 10J obtiveram como moderado. E por fim o grupo X4 de 15J teve como resultado o exsudato protéico intenso.

Quanto à distribuição das fibras (Fibrocartilagem/Elástica), o grupo X1 e o X4 obtiveram resultado intenso e irregular, enquanto os grupos restantes apresentaram resultados diferentes – X2, moderado e regular; X3, intenso e regular e X5, severo e irregular. Ou seja, apenas nos grupos X2 e X3 as fibras foram distribuídas regularmente.

Os resultados quanto à hiperemia foi marcada pela quantidade de fluxo sanguíneo de maneira intensa nos grupos X1, X2 e X4, enquanto nos grupos X3 e X5 a quantidade mostrou como sendo severa. Portanto, não obteve resultado de hiperemia moderada.

Conforme analisadas as células inflamatórias, os grupos X1, X3 e X5 mostraram como sendo polimorfonucleares do tipo moderada, enquanto os grupos X2 e X4 apresentaram como resultado as células polimorfonucleares do tipo intensa. Entretanto não obtiveram resultados, sendo denominadas as células do tipo severas.

Quanto à necrose tecidual, foi considerada difusa e intensa em três grupos, sendo eles X1, X4 e X5. Já nos grupos restantes obteve resultados diferentes, como no grupo X2, que foi considerada focal e intensa, e no grupo X3, como focal e moderada.

As fibras ganglionares ou células nervosas obtiveram diversos resultados, tais como no grupo X1, onde foram consideradas como moderada, nos grupos X2 e X5, como severa, e, por fim, nos grupos X3 e X4, como resultado de forma intensa.

E, por último, a neovascularização no grupo X1 e X5 foram consideradas severas, enquanto nos grupos X2 e X4 moderada e, finalmente, no grupo X3 a neovascularização foi considerada intensa.

Na análise histológica, mostrada na figura 1, foi observada a presença de linfócitos em todos os grupos em porcentagem de 75%. Verificou-se a presença de plasmócitos em 25% nos grupos X1, X2, X3 e X5, enquanto o grupo X4 apresentou 75%. Os macrófagos estiveram presentes nos grupos X1, X2, X3 e X5 em 25%, e no grupo X4 em 50%. Os neutrófilos nos grupos X1 e X5 em 75%, nos grupos X2 e X3 em 25% e no grupo X4 em 50%.

Na figura 2 e tabela 1 estão dispostos os valores da média e erro-padrão da amostra estudada – linfócitos, 75 ± 0.0 ; plasmócitos, 40 ± 10.0 ; de macrófagos, 30 ± 5.0 ; neutrófilos, 50 ± 11.18 ; eosinófilos, 15 ± 10.0 e basófilos, 25 ± 11.18 . Na estatística houve uma significância $p < 0,0001$, $F = 8.807$.

Discussão

Conforme os dados coletados [10](#), realização dessa pesquisa, necrose e edema foram os únicos achados encontrados em todos os ratos e em todos os grupos. Na zona de lesão, a necrose esteve presente em 11 (91,6%), ratos e o edema em 10 (83,3%) ratos, o que corroborou com os resultados encontrados por Tebet et al 2003²². Em seu estudo, a necrose foi intensa em apenas quatro grupos, enquanto em os outros grupos foi moderada. O edema foi intenso em apenas um grupo de estudo.

Foram raros os casos de infecção nas 48 horas após o experimento e após 48 horas do trauma. No segmento medular imediatamente distal à lesão, mostra-se que o tecido está absolutamente normal, enquanto apenas os grupos X2 e X3, respectivamente com valores de 4J e 10J, obtiveram as fibras distribuídas regularmente, sendo alguns animais mais acometidos do que outros.

Conforme Moore (1992)²³ e Thomas (2000)²⁴, após a lesão medular experimental, todos os animais apresentaram déficit proprioceptivo, e nenhum recuperou totalmente essa função; além disso afirmaram que a propriocepção é o primeiro parâmetro neurológico a ser afetado, logo no início das doenças neurológicas, e que, na recuperação, é o último a retornar à normalidade.

Dusart e Schwab (1994)²⁵ afirmaram que, durante o desenvolvimento da resposta inflamatória, há um influxo de neutrófilos que atingem níveis máximos em poucas horas, o que pôde ser esclarecido em nosso estudo pelo grupo de 15J.

No estudo proposto de Schnell et al (1999)²⁶ obteve-se diferentes padrões de intensidade da

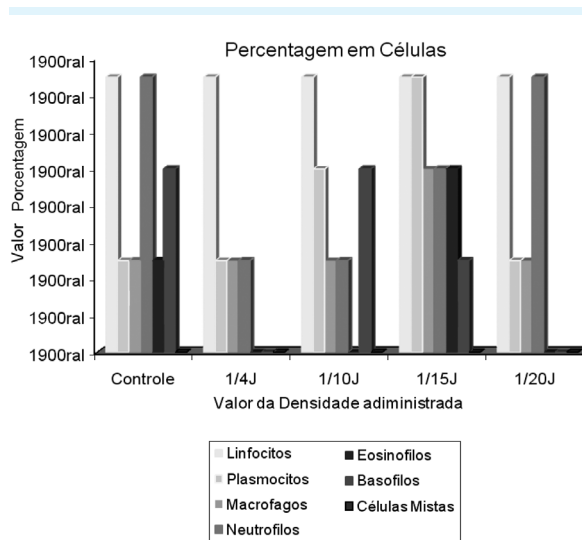


Figura 1: Análise histológica dos grupos estudados

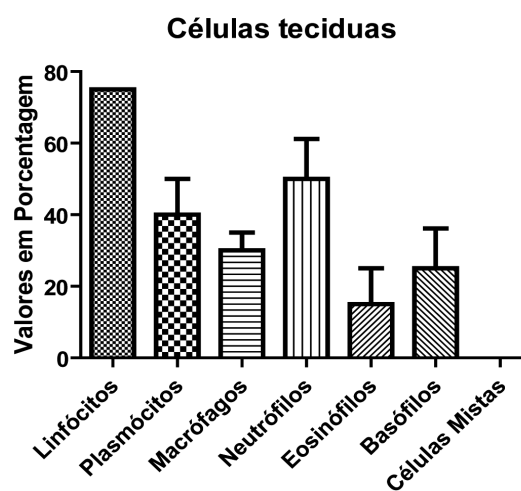


Figura 2: Porcentagem da análise histológica

Tabela 1: Valores de média e erro-padrão, encontrados no estudo

	Média	Desvio-padrão	Erro-padrão	Máx	Mín
Linfócitos	75	0	0	75	75
Plasmócitos	40	2,236	10	25	75
Macrófagos	30	1,118	5	25	50
Neutrófilos	50	25	1,118	25	75
Eosinófilos	15	2,236	10	0	50
Basófilos	25	25	1,118	0	50
Células mistas	0	0	0	0	0

inflamação, com lesão mecânica no encéfalo e na medula espinhal de ratos mostraram uma marcada diferença no número e distribuição de neutrófilos recrutados na área da lesão após um dia, enquanto no encéfalo, essas células estavam restritas às margens da lesão e, em pequena quantidade, na medula espinhal houve intensa infiltração no parênquima medular.

Conclusão

Pode-se concluir que a aplicação de laserterapia é um método não invasivo que pode auxiliar na resolução do processo inflamatório e edematoso na lesão medular podendo, dessa maneira, prevenir sequelas maiores decorrente do trauma.

Referências

1. Tator CH, Fehlings MG. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J. Neurosurg.*1991;75:15-26.
2. Araújo IS. Presence of free radicals in spinal cord injury. *Experimental evidence in rats. Rev. Bras. Neurol.*2005.41:23-29.
3. Baker ER, Cardenas DD. Pregnancy in spinal cord injured women. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation.*1996.77:501-7.
4. Santos LCR. Lesão traumática da medula espinhal: estudo retrospectivo de pacientes internados no Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo [Dissertação]. Escola de Enfermagem. São Paulo: Universidade de São Paulo;1989.
5. Faro ACMV. Percepção das esposas de pacientes portadores de lesão traumática de medula espinhal sobre a lesão medular. *Revista Saúde Distrito Federal.*1992.3(3):77-81.
6. Filho T, Rossi J. Prevenção de fraturas da coluna vertebral. *Revista Méd.*1992. São Paulo.71(6):87-9.
7. Spósito MM M et al. Paraplegia por lesão medular: estudo epidemiológico em pacientes atendidos para reabilitação. *Rev. Paul. Méd.*1986;104(4):196-202.
8. Suaid et al. Abordagem do lesado raquimedular. *Acta Cirurgia Brasileira.*São Paulo.2002;17(3):1-4.
9. Ducker TB, Kindt GW, Kempe LC .Pathological findings in acute experimental spinal cord trauma. *J Neurosurg.*2002;35:700-8.
10. Sandler AN, Tator CH. *J Neurosurg.*45:-.
11. Anderson DK, Means ED , Waters TR .Effect of methylprednisolone in compression trauma the feline spinal cord. *J Neurosurg.*1981;55:200-8.
12. Hall ED, Wolf DL, Braughler JM .Effects of a single large dose of methylprednisolone sodium succinate on experimental post traumatic spinal cord ischemia: dose response and time-action analysis. *J Neurosurg.*2008;61:124-130.
13. Noble LJ, Wrathall JR . Blood–Central Nervous System Barriers: the gateway to neurodegeneration, neuroprotection and neuroregeneration. *Journal of Neurotrauma.*2007:125-40.
14. Young ME. Alcohol and marijuana use in a community-based sample of persons with spinal cord injury. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation.*1995;76:525-31.
15. Walsh L. Dental lasers: some basic principles. *Postgrad Dent.*1994;4:26-9.
16. Carvalho et al . Os efeitos do laser de baixa intensidade em feridas cutâneas induzidas em ratos com diabetes mellitus experimental. *Fisioterapia Brasil.*2001; 2(4):241-46.
17. Karu TI . Effect of irradiation with monochromatic visible light on camp content in Chinese hamster fibroblasts. *II Nuovo Cimento D.*1997; 9:1245-51.
18. Rendell MS et al. The skin blood flow response in wound healing. *Microvasc.* 1997;53:222-34.
19. Gupta AK et al. The influence of photodynamic therapy on the wound healing process in rats. *J. Biomat. Appl.*2001;15:176-86.
20. Nissan M. HeNe laser irradiation delivered transcutaneously: its effect on the sciatic of rats. *Laser Surg. Med.*1986;6:435-38.
21. Reddy GK, Stehno-Bittel L, Enwemeka CS . Laser photostimulation accelerates wound healing in diabetics rats. *Wound Rep. Regen.*2001;9(3):248-55.
22. Tebet et AL, Efeito da metilprednisolona na lesão medular em ratos: análise funcional e histológica. *Acta Ortopédica Brasileira.*São Paulo.2003;11(2):102-8.
23. Moore MP. Approach to the patient with spinal disease. *Vet. Clin. N. Am.: Small A. Prac.*1992;22:751-81.
24. Thomas WB. Initial assessment of patients with neurologic dysfunction. *Vet. Clin. N. Am.: Small A.*2000;30:1-23.
25. Dusart I , Schwab ME. Secondary cell death and the inflammatory reaction after dorsal hemisection of the rat spinal cord. *European Journal Of Neuroscience.*1994;6:712-24.
26. Schnell L et al .Acute inflammatory responses to mechanical lesions in the Cns: Differences between brain and spinal cord. *European Journal of Neuroscience.*1999;11:3648-58.