

MARCO AURÉLIO INVALIDI NEVES

**DIFERENTES POTÊNCIAS DA TERAPIA A
LASER DE BAIXA INTENSIDADE NO REPARO
TENDÍNEO, EM RATOS.**

**Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo,
para obtenção do Título de Mestre em Ciências.**

**SÃO PAULO
2009**

MARCO AURÉLIO INVALIDI NEVES

**DIFERENTES POTÊNCIAS DA TERAPIA A
LASER DE BAIXA INTENSIDADE NO REPARO
TENDÍNEO, EM RATOS.**

**Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo,
para obtenção do Título de Mestre em Ciências.**

ORIENTADOR: Prof. Bernardo Hochman
CO-ORIENTADORES: Prof. Carlos Eduardo Pinfildi
Prof. Nivaldo Antonio Parizoto

SÃO PAULO
2009

Neves, Marco Aurélio Invaldi.

Diferentes potências da terapia a *laser* de baixa intensidade no reparo tendíneo, em ratos./ Marco Aurélio Invaldi Neves. -- São Paulo, 2009.
xix, 86f.

(Dissertação de Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica.

Título em inglês: Influence of different output power of low-level laser therapy in the tendon repair, in rats

1. Terapia a *laser* de baixa potência. 2. Terapia a *laser*. 3. Tendão calcâneo. 4. Birrefringência. 5. Colágeno.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIRURGIA PLÁSTICA

COORDENAÇÃO: Prof. Dr. MIGUEL SABINO NETO
Prof^a. Dr^a. LYDIA MASAKO FERREIRA

DEDICATÓRIA

A Deus

Que sempre me acompanha fazendo de minha jornada um lugar iluminado, cheio de amor, proteção e muita saúde. Agradeço pela vida, saúde e inteligência. Concedei-me, Senhor, serenidade necessária para aceitar as coisas que não posso mudar, coragem para mudar aquelas que posso, sabedoria para distinguir umas das outras.

Aos meus queridos pais: Ademir e Nilma

Mistura mágica de sabedoria e afeto, que me abençoaram com o Dom da vida, que ainda hoje me dão as mãos e me ensinam a caminhar, que se desdobram por meus sonhos, que vibram comigo a cada momento da minha história.

As palavras tornam-se incapazes de registrar o amor que eu sinto por vocês... é algo singular!

Obrigado por tanto carinho, tanto companheirismo e por serem exemplos de seres humanos tão grandiosos.

Vocês foram e sempre serão os maiores presentes que Deus me deu nesta vida.

A minha namorada Nathália

*Falar que bom quando é pra ti
Sonhar faz a vida mais feliz
E a estrelas que não posso tocar
Estão tão perto estão no teu olhar
Cantar que bom quando é pra ti
Ver teu sorriso também me faz sorrir
Ó estrela não deixe de brilhar
Mesmo que tão longe sei que ela está lá.*

(CHIMARRUTS)

AGRADECIMENTOS

À PROF^a. DR^a **LYDIA MASAKO FERREIRA**, PROFESSORA TITULAR DA DISCIPLINA DE CIRURGIA PLÁSTICA E CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIRURGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO (UNIFESP), PELA OPORTUNIDADE DE PARTICIPAR DESTE PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO, ONDE REALIZA UM BELÍSSIMO TRABALHO NO CAMPO DA PESQUISA CIENTÍFICA. É UMA VENCEDORA E UM EXEMPLO A SER SEGUIDO.

AO PROF. DR. **MIGUEL SABINO NETO**, COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA PLÁSTICA E PROFESSOR ADJUNTO DA DISCIPLINA DE CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO (UNIFESP), PELA OPORTUNIDADE DE PARTICIPAR DESTE PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO.

AO PROF. **BERNARDO HOCHMAN**, ORIENTADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA PLÁSTICA E PROFESSOR AFILIADO DA DISCIPLINA DE CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO (UNIFESP), POR TER ME GUIADO E ORIENTADO NESSE BELÍSSIMO CAMPO DE PESQUISA CIENTÍFICA, PELO TEMPO DE GENEROSIDADE QUE ME FOI CONCEDIDO, TRANSMITINDO-ME OS MELHORES E MAIS ÚTEIS ENSINAMENTOS, COM PACIÊNCIA, LUCIDEZ E CONFIANÇA, PELO

ACESSO A UMA PESQUISA MAIS AMPLA E ENRIQUECEDORA, PELA SUA CRÍTICA SEMPRE EFICAZ E CONSTRUTIVA, E, ACIMA DE TUDO, PELA AMIZADE E COMPANHERISMO CONSTRUÍDOS DURANTE ESSE PERÍODO DE CONVIVÊNCIA.

AO PROF. **CARLOS EDUARDO PINFILDI**, PROFESSOR COLABORADOR CO-ORIENTADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO - UNIFESP E PROFESSOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA DA UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA - UNIMEP, UM AGRADECIMENTO ESPECIAL POR SER O COMPANHEIRO DE TODAS AS HORAS, POR ACREDITAR EM MIM. HOJE O CONSIDERO UM MESTRE, POIS SER MESTRE É SER INSTRUTOR, AMIGO, GUIA E COMPANHEIRO, É CAMINHAR COM O ALUNO, PASSO A PASSO, É TRANSMITIR A ESTE OS SEGREDOS DA CAMINHADA. AGRADEÇO A AMIZADE, CARINHO, ATENÇÃO E OS CONSELHOS SEMPRE MUITO SÁBIOS; SEMPRE ORIENTANDO E GUIANDO MEU CRESCIMENTO CIENTÍFICO E PESSOAL.

AO PROF. **NIVALDO ANTÔNIO PARIZOTTO**, PROFESSOR TITULAR DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS (UFSCAR), DEPARTAMENTO DE FISIOTERAPIA, POR ABRIR AS PORTAS DO SEU LABORATÓRIO PARA O DESENVOLVIMENTO DE UMA PARCERIA DE TRABALHO MUITO BONITA.

AOS DEMAIS **DOCENTES** DA DISCIPLINA DE CIRURGIA PLÁSTICA E DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO (UNIFESP), PELOS EXEMPLOS E ENSINAMENTOS RECEBIDOS.

AOS FISIOTERAPEUTAS **MAÍRA SILVA DA COSTA, PASCALE MUTTI TACANI, RAFAEL CORRÊA GOBBATO, TIAGO SANTOS SILVEIRA E VIVIANE TIMM WOOD**, AMIGOS E COLEGAS DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO (UNIFESP), PELO APOIO, COMPANHEIRISMO E PELOS MOMENTOS DE GRANDE DESCONTRAÇÃO.

ÀS BIÓLOGAS **VANINA MONIQUE E SILVANA GAÍBA**, AMIGAS E COLEGAS DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO (UNIFESP), POR COMPARTILHAR SEUS CONHECIMENTOS E MOMENTOS DE DESCONTRAÇÃO.

AOS DEMAIS COLEGAS **PÓS-GRADUANDOS** DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO (UNIFESP), PELO COMPANHEIRISMO NAS REUNIÕES CIENTÍFICAS.

AOS ACADÊMICOS **FÁBIO MENDES DA SILVA, FREDERICO POLLACK E PAULO ANDRADE**, DO CURSO DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO (UNIFESP), PELO APOIO E PELOS MOMENTOS DE GRANDE DESCONTRAÇÃO.

ÀS SECRETÁRIAS **SILVANA DE ASSIS, MARTA DOS REIS E SANDRA DA SILVA**, DA DISCIPLINA DE CIRURGIA PLÁSTICA E DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO (UNIFESP), PELA IMENSA DEDICAÇÃO, CARINHO E RESPEITO COM QUE ME AJUDARAM DURANTE TODOS OS MOMENTOS.

A TODOS OS **FUNCIONÁRIOS** DO LABORATÓRIO EXPERIMENTAL DA CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO (UNIFESP), QUE CONTRIBUÍRAM PARA A REALIZAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS. AGRADEÇO A COLABORAÇÃO.

AOS FISIOTERAPEUTAS **PAULO SÉRGIO BOSSINI, RENAN FANGEL E VIVIAN CURY**, ALUNOS DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS (UFSCAR), POR COLABORAR EM TODOS OS MOMENTOS QUE PRECISEI E POR MOMENTOS MUITOS AGRADÁVEIS DE DESCONTRAÇÃO.

AO PROF. **OSCAR PEITL FILHO**, PROFESSOR TITULAR DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS (UFSCAR), DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE MATERIAS, QUE CONTRIBUIU PARA A REALIZAÇÃO DAS ANÁLISES HISTOLÓGICAS. AGRADEÇO A COLABORAÇÃO.

AOS DEMAIS **FUNCIÓNÁRIOS** DO LABORATÓRIO DE MATERIAIS VÍTREOS, DO DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS, DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS (UFSCAR), POR DISPONIBILIZAREM O LABORATÓRIO PARA A REALIZAÇÃO DAS ANÁLISES HISTOLÓGICAS. AGRADEÇO A COLABORAÇÃO.

Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.

Leonardo da Vinci

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	III
AGRADECIMENTOS.....	VI
EPÍGRAFE.....	XI
LISTA DE FIGURAS.....	XV
LISTA DE TABELAS.....	XV
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	XVI
RESUMO.....	XIX
1. INTRODUÇÃO	02
2. OBJETIVO.....	06
3. LITERATURA.....	08
4. MÉTODOS.....	18
5. RESULTADOS.....	32
6. DISCUSSÃO.....	43
7. CONCLUSÃO.....	56
8. REFERÊNCIAS.....	58
NORMAS ADOTADAS.....	74
ABSTRACT.....	76
APÊNDICES.....	78
FONTES CONSULTADAS.....	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Distribuição dos grupos.....	19
Figura 2- Equipamento emissor de radiação <i>laser</i> de AsGaAl (830 nm).....	20
Figura 3 Equipamento desenvolvido para lesar o tendão calcâneo do animal: vista anterior e peso na posição inicial.....	21
Figura 4- Posicionamento da pata do animal antes da queda do peso para lesar o tendão calcâneo.....	22
Figura 5- Vista superior do peso sobre o tendão calcâneo no momento da lesão.....	22
Figura 6- Aplicação do <i>laser</i> na região tendínea.....	23
Figura 7- Tendão calcâneo fixado com dois alfinetes na placa de petri e coberto com formol tamponado a 10%.....	26
Figura 8 - Distribuição dos valores de birrefringência (retardo óptico).....	33
Figura 9- Alinhamento das fibras de colágeno do tendão calcâneo do grupo <i>sham</i>	33
Figura 10- Alinhamento das fibras de colágeno do tendão calcâneo do grupo 40mW.....	34
Figura 11- Alinhamento das fibras de colágeno do tendão calcâneo do grupo 60mW.....	34
Figura 12- Alinhamento das fibras de colágeno do tendão calcâneo do grupo 80mW.....	35

Figura 13- Alinhamento das fibras de colágeno do tendão calcâneo do grupo 100mW.....	35
Figura 14 - Distribuição dos valores para colágeno tipo III (picrosirius).....	37
Figura 15- Análise de picrosirius para observação das fibras de colágeno finas com polarização em verde, e espessas com polarização em vermelho do grupo <i>sham</i>	37
Figura 16- Análise de picrosirius para observação das fibras de colágeno finas com polarização em verde, e espessas com polarização em vermelho do grupo 40mW.....	38
Figura 17- Análise de picrosirius para observação das fibras de colágeno finas com polarização em verde, e espessas com polarização em vermelho do grupo 60mW.....	38
Figura 18- Análise de picrosirius para observação das fibras de colágeno finas com polarização em verde, e espessas com polarização em vermelho do grupo 80mW.....	39
Figura 19- Análise de picrosirius para observação das fibras de colágeno finas com polarização em verde, e espessas com polarização em vermelho do grupo 100mW.....	39
Figura 20 - Distribuição dos valores para colágeno tipo I (picrosirius).....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Resultados da comparação entre os grupos, dois a dois, em relação ao alinhamento das fibras de colágeno.....	32
Tabela 2- Resultados da comparação entre os grupos, dois a dois, em relação a predominância de colágeno tipo III.....	36
Tabela 3- Resultados da comparação entre os grupos, dois a dois, em relação a predominância de colágeno tipo I.....	40
Tabela 4- Medidas descritivas do retardo óptico correspondente ao alinhamento das fibras de colágeno.....	82
Tabela 5- Medidas descritivas da análise de picrosirius correspondente ao colágeno tipo III.....	83
Tabela 6- Medidas descritivas da análise de picrosirius correspondente ao colágeno tipo I.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Al-Ga-In-P	= alumínio-gálio-índio-fósforo
AMP	= adenosina monofosfato
ANOVA	= análise de variância
As-Ga	= arseneto de gálio
As-Ga-Al	= arseneto de gálio e alumínio
°C	= graus Celsius
CEDEME	= Centro de desenvolvimento de modelos experimentais
CEP	= Comitê de Ética em Pesquisa
CL	= controle lesão
cm	= centímetro
cm ²	= centímetro quadrado
COBEA	= Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CP	= controle padrão
DE	= densidade de energia
DNA	= ácido desoxirribonucléico
DP	= densidade de potência
F	= frequência
G	= grupo
g	= gramas
h	= hora
He-Ne	= hélio-neônio

H ₂ O	= água
J	= Joule
J/cm ²	= Joule por centímetro quadrado
<i>Laser</i>	= amplificação da luz por emissão estimulada de radiação
LED	= diodo emissor de luz
LLLT	= low level laser therapy
mg/kg	= miligrama por quilograma de massa corporal
mg	= miligrama
mJ	= milijoule
ml	= mililitro
mm	= milímetro
mW	= miliWatts
mW/cm ²	= miliWatts por centímetro quadrado
N	= total da amostra
n	= número da amostra
nm	= nanômetro
P	= potência
PGE	= prostaglandina-E
PBS	= phosphato-buffered saline
TLBI	= terapia a laser de baixa intensidade
UFSCar	= Universidade Federal de São Carlos
UNIFESP	= Universidade Federal de São Paulo
US	= ultra-som

W/cm^2	= Watts por centímetro quadrado
<	= menor
>	= maior
*	= significante
λ	= comprimento de onda
μm	= micrômetro
%	=porcentagem

RESUMO

Introdução: O tendão calcâneo é um dos tendões mais lesados e a sua cicatrização total pode levar semanas, ou até meses. Na busca de acelerar o reparo tendíneo, a terapia a *laser* de baixa intensidade (TLBI), vem demonstrando efeitos satisfatórios. **Objetivo:** Avaliar a ação das diferentes potências da terapia a *laser* de baixa intensidade no reparo tendíneo, em ratos. **Métodos:** O *laser* utilizado foi (AsGaAl) 830nm, densidade de energia 30J/cm² e potências de 40mW, 60mW, 80mW e 100mW, por um período de 5 dias consecutivos para todos os grupos. Todos os animais foram submetidos à lesão parcial do tendão calcâneo. No 6º dia após lesão, os tendões foram retirados e analisados por microscópio de polarização. Foi mensurada a organização das fibras de colágeno por meio da análise de birrefringência e verificada a predominância do tipo de colágeno no tendão calcâneo através da análise de picrossirius. **Resultados:** Os grupos tratados com TLBI mostraram uma melhora significativa no realinhamento das fibras de colágeno, mas não apresentaram diferença significativa entre si ($p=0,139$). Quanto à avaliação da quantidade de colágeno tipo III, foi observado que houve um aumento do percentual de colágeno, conforme o aumento da potência do *laser* (60 a 100mW) ($p<0,01$). Em relação ao colágeno tipo I, o grupo 80mW apresentou maior quantidade do que o grupo *sham* ($p=0,05$). **Conclusão:** A terapia a *laser* de baixa intensidade não apresentou diferença no realinhamento das fibras de colágenos entre diferentes potências. Potências a partir de 60mW aumentaram a quantidade de colágeno tipo III. Potência de 80mW aumentou a quantidade de colágeno tipo I e III.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A incidência da ruptura do tendão do calcâneo tornou-se crescente em humanos devido ao aumento da prática esportiva. Esses tendões tornaram-se um dos tecidos mais comumente lesados, assim como dos flexores digitais. (WREN *et al.*, 2001; DEMIR *et al.*, 2004; ÖZKAN *et al.*, 2004; NAIM *et al.*, 2005; SALATE *et al.*, 2005; TUMILTY *et al.*, 2008).

CARR & NORRIS (1989) verificaram que o número de vasos sanguíneos do tendão varia ao longo do seu comprimento, sendo a maioria localizada até 4cm acima da inserção calcanear. Devido ao escasso suprimento sanguíneo, o tendão calcâneo é uma estrutura que leva semanas, ou até meses, para completar sua cicatrização (HUDLICKA & TILLER, 1986; BAXTER, 1994; BATTEGAY, 1995; AGAIBY *et al.*, 2000; BIDDER *et al.*, 2000). Essa característica promove uma recuperação lenta do tendão lesionado, ocasionando um retardo na cicatrização e dificultando a aderência do paciente ao tratamento. (STEHNO-BITTEL *et al.*, 1998; REDDY *et al.*, 1998).

Durante esse período, habitualmente, o membro acometido é imobilizado por 45 dias para evitar nova ruptura. Como o colágeno é a principal estrutura protéica e o maior componente da matriz extracelular do tendão, algumas complicações funcionais (NAIM *et al.*, 2005), além de alterações ultraestruturais (ENWEMEKA, 1991; MATSUMOTO *et al.*, 2003), bioquímicas (KANNUS *et al.*, 1992; PLOUG, ONKUWA, HANDBERG, 1995; FILLIPIN *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2008) e biomecânicas do tendão (AN *et al.*, 1990; ENWEMEKA, 1992; MURREL *et al.*, 1994) podem ocorrer. Essas complicações causadas pela

imobilização são minimizadas se a duração do reparo tendíneo for diminuída (ENWEMEKA, 1989b; ENWEMEKA, RODRIGUEZ, MENDOSA, 1990; DEMIR *et al.*, 2004).

Devido a isto, buscam-se métodos que acelerem a cicatrização do tecido lesado (FRUENSGAARD *et al.*, 1992; JONES & KJELLSTRAND, 1996; STEHNO-BITEL *et al.*, 1998; REDDY *et al.*, 1998; ENWEMEKA & REDDY, 2000; ÖZKAN *et al.*, 2004). Dentre esses métodos, podem-se destacar diversos agentes físicos como o ultra-som (ENWEMEKA, 1989a; GUM *et al.*, 1997; CUNHA, PARIZOTTO, VIDAL, 2001; DEMIR *et al.*, 2004), estimulação elétrica (NESSLER & MASS, 1987; CHAN, FUNG, NG, 2007), campos eletromagnéticos (OWOEYE *et al.*, 1987; GREENOUGH, 1996) e terapia a *laser* de baixa intensidade (PUGLIESE *et al.*, 2003; ÖZKAN *et al.*, 2004; ENWEMEKA *et al.*, 2004; SALATE *et al.*, 2005; CARRINHO *et al.*, 2006; RIZZI *et al.*, 2006; ELWAKIL, 2007; ARRUDA *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2008; TUMILTY *et al.*, 2008) que têm mostrado resultados satisfatórios (OLIVEIRA *et al.*, 2009) na reparação tendínea.

A terapia a *laser* de baixa intensidade vem sendo utilizada há mais de 20 anos e tem mostrado efeitos importantes (GIBSON & KERNOHAN, 1993; REDDY *et al.*, 1998; ÖZKAN *et al.*, 2004; SALATE *et al.*, 2005) como o aumento na proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno (ALMEIDA-LOPES *et al.*, 2001; HAWKINS & ABRAHAMSE, 2006), neovascularização, reparação de tendões (DYSON & YOUNG, 1982; BIHARI & MESTER, 1989; MESTER & MESTER, 1989; ENWEMEKA *et al.*, 1990; PARIZOTTO & BARANAUSKAS, 1998a; ALMEIDA-LOPES *et al.*, 1999; PINFILDI *et al.*, 2005; SALATE *et al.*, 2005; PRADO

et al., 2006; OLIVEIRA *et al.*,2009), e o aumento do metabolismo mitocondrial estimulando a síntese de DNA e a proliferação celular (BASFORD, 1995; PARIZOTTO, BARANAUSKAS, 1998b).

Porém, há divergências na literatura no que se refere aos diferentes parâmetros utilizados: comprimento de onda (λ); densidade de energia (DE) e potência (P). Salate *et al.* (2005) pesquisaram diferentes potências de *laser* na reparação tendínea e puderam perceber que potências mais elevadas (40mW) apresentavam melhores resultados no realinhamento de fibras de colágeno.

Arruda *et al.* (2007) compararam potências de 15 e 30mW para dois tipos de *laser* diferentes e puderam observar que a associação dos dois tipos de *laser* com potências diferentes obteve melhores resultados. A potência é um parâmetro pouco pesquisado na literatura. Devido a este fator, não há um consenso sobre qual deveria ser a potência de saída ideal para terapia a *laser*, principalmente nas potências mais elevadas. Esse fato motivou a realização do presente estudo.

OBJETIVO

2. OBJETIVO

Avaliar a ação das diferentes potências da terapia a *laser* de baixa intensidade no reparo tendíneo, em ratos.

LITERATURA

3. LITERATURA

SCHMITT *et al.* (1993) estudaram os efeitos do *laser* de arseneto de gálio (As-Ga) no reparo tendíneo de 30 cães distribuídos em 3 grupos e submetidos a tenotomia e tenorrafia do tendão calcâneo direito e esquerdo, com técnica atraumática, na região média entre as porções tenomuscular e tenoóssea, sendo que no membro esquerdo foi efetuada a aplicação de *laser* As-Ga ($4\text{J}/\text{cm}^2$) para avaliar o processo cicatricial.

Posteriormente, as articulações do tarso foram imobilizadas durante 11 dias nos animais do grupo I (sacrificados nesta data) e durante 21 dias no grupo II (sacrificados no 22º dia) e no grupo III (sacrificados no 40º dia de pós-operatório). Os cães do grupo III foram submetidos a caminhadas diárias de 30 minutos nas duas semanas seguintes para estimular a mobilidade do tendão. A avaliação clínica dos efeitos da terapia a *laser* na funcionalidade dos membros foi feita por meio de exame físico. Os tendões foram avaliados por necropsia realizada em todos os segmentos no 11º dia (grupo I), 22º dia (grupo II) e 40º dia (grupo III) de evolução pós-operatória.

O desempenho funcional do membro submetido à irradiação nos animais do grupo III mostrou-se melhor do que o do membro não submetido à irradiação. À macroscopia, os tendões submetidos à irradiação apresentaram melhor vascularização, menor aderência e cicatrização com melhor aparência do que o membro não submetido à irradiação. Os estudos histológicos revelaram que o *laser* não interferiu significativamente na produção de fibroblastos e na síntese de fibras colágenas.

LECH *et al.* (1996) investigaram o efeito do corticóide mais xilocaína em tecidos previamente traumatizados. A lesão foi realizada no peritendão da unidade musculotendínea do triceps sural. Foram utilizados 20 ratos machos divididos em 4 grupos com 5 animais cada. O primeiro grupo foi o controle-padrão. Os grupos 2, 3 e 4 foram traumatizados bilateralmente por um lesionador. No grupo 2 os animais foram lesionados e isolados. Grupo 3 os animais foram lesionados e submetidos à infiltração de xilocaína em três séries, após trauma, 1 e 2 semanas. Grupo 4 os animais foram lesionados e submetidos à infiltração de xilocaína a 2% e corticóide 40mg/ml em 3 séries, após trauma, 1 e 2 semanas.

Os animais foram sacrificados em cinco tempos diferentes: 24h, 1, 2, 3 e quatro semanas, um animal para cada tempo.

Os autores observaram efeito deletério nos aspectos anatopatológicos e biomecânicos na unidade músculo-tendão dos animais experimentais em que foi utilizada associação de infiltração de xilocaína e corticóide.

GUM *et al.* (1997) estudaram o processo de reparação tendínea utilizando um protocolo de terapia combinada com estimulação elétrica transcutânea (corrente galvânica), *laser* de As-Ga 904nm, 1J/cm² e ultrassom (US). O tendão calcâneo de 63 coelhos foi submetido à tenotomia, sutura, imobilizado e submetido a um protocolo de terapia combinada por 5 dias. Após a retirada dos imobilizadores, a terapia foi continuada por mais 9 dias, sem estimulação elétrica.

Os resultados demonstraram um aumento na síntese de colágeno, porém, sem diferenças significantes no desempenho funcional dos tendões tratados, em relação ao grupo controle, sugerindo que as terapias

combinadas podem não influenciar de forma positiva sobre o processo de cicatrização tendínea.

REDDY *et al.* (1998) testaram a hipótese de que a combinação de terapia a *laser* e sobrecarga mecânica deveria, futuramente, acelerar a cicatrização em tenotomias experimentais e na reparação do tendão calcâneo em coelhos. Após tenotomia e sutura tendínea, os coelhos do grupo experimental e controle foram imobilizados por cinco dias. Os tendões reparados do grupo experimental receberam sobrecarga mecânica via estimulação elétrica pela indução da contração do músculo tríceps sural por cinco dias. Além disso, os tendões do grupo experimental foram tratados diariamente, com dose de $1\text{J}/\text{cm}^2$ com *laser* de Hélio Neônio (He-Ne) ao longo de 14 dias no período experimental.

Observou-se que a combinação do *laser* com sobrecarga mecânica aumenta o estresse máximo, tensão máxima e o módulo de imaturidade da elasticidade dos tendões em 30, 13 e em 33%, respectivamente. Entretanto, não houve diferença significativa nos índices biomecânicos de reparação entre os tendões controle e experimental.

Contudo, realizadas todas as análises, os achados indicaram que a combinação da terapia a *laser* com a sobrecarga mecânica precoce nos tendões aumenta a síntese de fibras colágenas, com efeitos biomecânicos marginais no reparo tendíneo.

BJORDAL (2000) realizou uma revisão bibliográfica de estudos “*in vivo*” e “*in vitro*” sobre o efeito do *laser* de baixa intensidade na cicatrização tendínea. Foram pesquisados na literatura artigos publicados

após 1980 usando terapia a *laser* de baixa intensidade (TLBI) nas bases de dados da Medline, Embase, Cochrane Library, além de pesquisa manual nos jornais de fisioterapia na língua Inglesa e Escandinavian. Foram sintetizados parâmetros ideais de tratamento como estimativa de tempo, frequência de tratamento, densidade de energia (DE) e densidade de potência (DP).

O autor constatou que um intervalo de densidades de energia e densidade de potência para inibição de prostaglandinas PGE2 e produção de Interleucina Beta-1 foram de $3,2 - 6,3\text{J}/\text{cm}^2$ e $5,3\text{W}/\text{cm}^2$ mensurados pela estimulação de células fibroblásticas após cinco dias de irradiação. Já para a síntese de fibras colágenas, o intervalo de densidade de energia e densidade de potência foram $0,2 - 2,0\text{J}/\text{cm}^2$ e $2 - 20\text{W}/\text{cm}^2$, respectivamente. Demonstrou-se, também, que tratamentos diários por duas semanas com parâmetros ideais produzem um aumento máximo de 37% na produção de colágeno. Contudo, densidades de energia acima de $4,5\text{J}/\text{cm}^2$ e densidade de potência maiores do que $30\text{W}/\text{cm}^2$ inibem o metabolismo de fibroblastos e diminuem a síntese de colágeno.

MAFFULLI *et al.* (2000) verificaram “*in vitro*” a predominância do tipo de colágeno no tendão de Aquiles em humanos com: ruptura parcial, tendinopatia, tendão sem lesão e tendão fetal. Foram retiradas cirurgicamente duas amostras de $3 \times 3 \times 3\text{mm}$, colocadas em 20ml de solução salina estéril e transportadas para o laboratório. Foram utilizados 22 pacientes com diagnóstico de ruptura parcial e 12 pacientes com tendinopatia.

Os tendões fetais foram retirados de quatro fetos abortados na idade gestacional de três semanas e colocados em um recipiente estéril contendo 20ml de phosphate-buffered salina estéril (PBS).

Os tendões sem ruptura foram retirados de sete pacientes que tiveram sua perna amputada, em condições estéreis e transferidos para um recipiente estéril contendo meio de cultura.

Os autores verificaram que os tendões com tendinopatia e ruptura parcial apresentavam maior quantidade de colágeno tipo III quando comparados com tendões fetais e sem rupturas. Já os tendões fetais, apresentavam predominância de colágeno tipo I e III, enquanto os tendões sem ruptura, predominância de colágeno tipo I.

DEMIR *et al.* (2004) realizaram um estudo experimental comparando os efeitos do *laser*, ultra-som, e a combinação do *laser* com ultra-som na cicatrização tendínea.

Foram utilizados 84 ratos machos divididos em seis grupos: Grupo I tratamento com ultra-som (ultra-som contínuo, $P= 0,5W/cm^2$, frequência (F) de 1MHz, 5 minutos (min)), Grupo II controle do ultra-som, Grupo III tratamento com *laser* As-Ga, $\lambda= 904nm$, $F= 16Hz$, potência média de 6mW, $DE= 1J/cm^2$), Grupo IV controle do *laser*, Grupo V tratamento combinado (*laser* + ultra-som) e Grupo VI controle combinado (*laser* + ultra-som).

O tendão calcâneo esquerdo foi usado como controle e o direito foi usado para tratamento; os dois tendões foram lesados longitudinalmente. O tratamento começou no primeiro dia de pós-operatório e durou nove dias (sessões).

Embora o *laser*, o ultra-som e a combinação dos dois agentes tenham aumentado a reparação bioquímica e biomecânica do tendão mais do que o grupo controle, nenhuma diferença significativa foi encontrada entre eles.

TAVARES *et al.* (2005) estudaram as alterações causadas pela irradiação de *laser* com comprimento de onda de 904nm, no tendão calcâneo de 30 ratos, distribuídos em dois grupos, controle e tratamento.

Todos os animais foram submetidos à tenotomia do tendão calcâneo direito, sendo iniciado o tratamento com *laser* 24 horas após a operação com densidade de energia de $4\text{J}/\text{cm}^2$. Os grupos foram distribuídos em subgrupos e os animais sacrificados em dias distintos, no 8º e no 15º dias do pós-operatório.

Houve diferença significativa ($p < 0,05$), entre o grupo controle e o grupo tratado na deposição de colágeno e presença de células inflamatórias, sugerindo que a terapia a *laser* proporciona a aceleração da cicatrização na tenotomia calcânea em ratos, pelo aumento da deposição de colágeno tanto na fase inicial, quanto na fase tardia do tratamento.

SALATE *et al.* (2005) estudaram os efeitos do *laser* 660nm, e potência de 10mW e 40mW, no processo de angiogênese e qualidade do reparo após lesão parcial do tendão calcâneo em ratos machos, sendo que 96 foram submetidos à lesão com queda de um peso de 186 gramas, de uma altura de 20cm, sobre o tendão direito.

Estes foram divididos aleatoriamente em três grupos, tratados em 3, 5 e 7 dias. Os grupos foram divididos em quatro subgrupos submetidos ao tratamento com *laser* com potência de 10 e 40mW, grupo placebo e grupo

sem tratamento. Um quarto grupo foi estabelecido como controle padrão sem lesão.

A comparação dos grupos evidenciou que os animais irradiados mostraram maior número de vasos sanguíneos do que os grupos controle ($p < 0,05$) e que o subgrupo de 40mW apresentou melhor vascularização do que os demais, após três dias de irradiação ($p < 0,01$). Os autores concluíram que a terapia a *laser* de baixa intensidade, com comprimento de onda de 660nm, promoveu aumento na neovascularização e melhora na qualidade do reparo tendíneo e a potência de 40mW iniciou a neovascularização precocemente, mostrando diferença significativa após três dias de aplicação.

CARRINHO *et al.* (2006) realizaram um estudo comparando dois tipos de *laser* de baixa intensidade (685nm e 830nm), diferentes densidades de energia e uma potência fixa de 15mW, no reparo tendíneo do tendão calcâneo de ratos. Esses animais foram lesados por uma tenotomia total unilateral feita por cisalhamento na porção média do tendão calcâneo direito. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais homogêneos (1, 2, 3), sendo que cada grupo foi distribuído em dois subgrupos: o grupo 1 foi dividido em subgrupo A que recebeu *laser* 685nm, $3\text{J}/\text{cm}^2$ e subgrupo B que recebeu tratamento com *laser* 685nm, $10\text{J}/\text{cm}^2$; o grupo 2 foi dividido em subgrupo C que recebeu tratamento com *laser* de 830nm, $3\text{J}/\text{cm}^2$ e subgrupo D que recebeu tratamento com *laser* de 830nm e $10\text{J}/\text{cm}^2$; e, por fim, o grupo 3 foi dividido em subgrupo E, controle lesado/simulação (CL/*Sham*) e subgrupo F, controle padrão (CP). Os achados mostraram que o reparo tendíneo do

subgrupo A tratado com *laser* de 685nm e $3\text{J}/\text{cm}^2$ apresentou melhores resultados, considerando o nível de organização, orientação das fibras colágenas no local da lesão, diferindo estatisticamente dos demais subgrupos.

ARRUDA *et al.* (2007) estudou diferentes comprimentos de onda da terapia a *laser* de baixa intensidade na regeneração tendínea após tenotomia. Os animais foram distribuídos em cinco grupos, submetidos à tenotomia total por meio de cisalhamento transversal do tendão na porção média entre a inserção calcânea e a junção miotendínea, com exceção do grupo padrão em que não houve lesão. O grupo A foi submetido à irradiação *laser* 904nm, diodo de Ga-As, emissão pulsada, duração do pulso de 180ns, frequência de pulso de 2000Hz e potência de pico 15mW e densidade de energia de $3\text{J}/\text{cm}^2$. O grupo B foi submetido à irradiação *laser* 670nm, diodo de Al-Ga-In-P, emissão contínua, potência 30mW e densidade de energia de $3\text{J}/\text{cm}^2$. O grupo AB recebeu irradiação de ambos os *lasers* 670nm e 904nm associados. O grupo *sham* foi submetido à simulação do tratamento. A análise estatística mostrou que todos os grupos irradiados apresentaram valores de retardo óptico maiores quando comparados ao grupo *sham*, indicando melhor organização das fibras colágenas ao longo do eixo longitudinal do tendão. O grupo AB foi o que apresentou melhores resultados quando comparado aos demais grupos.

OLIVEIRA *et al.* (2009) estudaram o efeito da terapia a *laser* de baixa intensidade com comprimento de onda de 830nm de arseneto de gálio aluminizado (As-Al-Ga), potência de 40mw, densidade de energia de

4J/cm², área de secção transversal do feixe de 0,028cm² com feixe contínuo, na reparação do tendão calcâneo submetido à lesão parcial, em 60 ratos machos, distribuídos aleatoriamente em cinco grupos com 12 animais cada, sendo que 42 foram submetidos à lesão com queda de um peso de 186 gramas de uma altura de 20cm.

O Grupo 1 (controle padrão) sem lesão, Grupo 2 (controle) animais lesionados e sem tratamento, e os Grupos 3, 4 e 5 em que os animais sofreram lesão e foram submetidos ao tratamento com *laser* durante 3, 5 e 7 dias, respectivamente. Os animais dos grupos 2, 3, 4 e 5 foram submetidos a eutanásia no 8º dia após a lesão e avaliados por microscopia de polarização para analisar o grau de organização das fibras de colágeno. Os grupos experimentais e o grupo controle padrão mostraram valores significativamente maiores em relação ao alinhamento das fibras de colágeno, comparados ao grupo controle, e não houve diferença significativa quando comparados os Grupos 1 e 4, o mesmo acontecendo entre os Grupos 3 e 5.

A terapia a *laser* de baixa intensidade é efetiva na melhora da organização das fibras colágenas do tendão calcâneo submetido à lesão parcial.

MÉTODOS

4. MÉTODOS

4.1 DESENHO DE PESQUISA

Este é um estudo primário, experimental, controlado, randomizado e simples cego. Obteve a aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa da UNIFESP- CEP nº 1254/07 (Apêndice 1).

4.2 AMOSTRA

Para a realização deste estudo foram utilizados 50 ratos *Wistar EPM-1* (*Rattus norvegicus: var. albinus, Rodentia, Mammalia*), machos, adultos, com 12 semanas de idade, peso de 270 à 320 gramas (g), oriundos do Biotério Central do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Os procedimentos experimentais foram realizados no laboratório de microcirurgia da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP. Os animais foram mantidos individualmente, em gaiolas de polipropileno recebendo ração e água *ad libitum* durante todo período experimental e expostos a um ciclo claro/escuro de 12 horas, com temperatura constante de 22°C. [segundo as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) Lei 6638 - de 8 de Maio de 1979].

4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os ratos tiveram seu peso aferido, foram submetidos à anestesia e à lesão parcial do tendão calcâneo direito ou esquerdo, por meio de um trauma direto, recebendo tratamento por cinco dias consecutivos.

Os animais foram aleatorizados pelo programa Bioestat[®] 5.0, e distribuídos em cinco grupos com 10 animais em cada (fig.1).

Grupo 1 (Sham): 10 animais receberam tratamento com *laser* desligado por 21s.

Grupo 2 (P= 40mW): 10 animais receberam tratamento com *laser* 830nm, potência 40mW, densidade de potência $1,4\text{W}/\text{cm}^2$ e tempo de 21s.

Grupo 3 (P= 60mW) 10 animais receberam tratamento com *laser* 830nm, potência 60mW, densidade de potência $2,14\text{W}/\text{cm}^2$ e tempo de 14s.

Grupo 4 (P= 80mW): 10 animais receberam tratamento com *laser* 830nm, potência 80mW, densidade de potência $2,8\text{W}/\text{cm}^2$ e tempo de 10,5s.

Grupo 5 (P= 100mW) 10 animais receberam tratamento com *laser* 830nm, potência 100mW, densidade de potência $3,5\text{W}/\text{cm}^2$ e tempo de 8,4s.

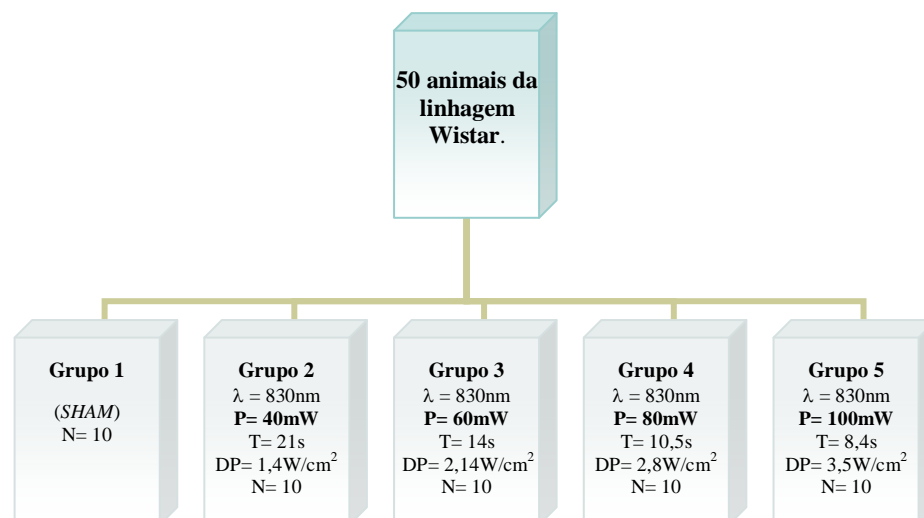


Figura 1- Distribuição dos grupos

4.4 EQUIPAMENTO

Foi utilizado um aparelho de *laser* de baixa intensidade da marca DMC[®] de diodo infravermelho, com comprimento de onda de 830nm (As-Ga-Al), com potências pré ajustadas de 40mW, 60mW, 80mW e 100mW, densidade de energia de 30J/cm², energia total de 0,84J, área de secção transversal do feixe de 0,028cm² com feixe contínuo (fig.2).

O equipamento foi aferido antes do início da pesquisa e após o término da mesma.

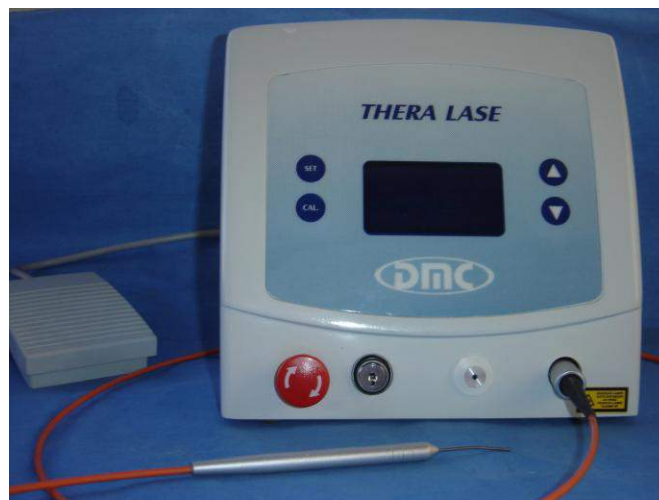


Figura 2- Equipamento emissor de radiação *laser* de As-Ga-Al (830nm).

Foi utilizado um lesionador desenvolvido pela Oficina Mecânica da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, com peso de 186g, altura de 20cm e uma energia potencial de queda de 364,9mJ (fig.3).

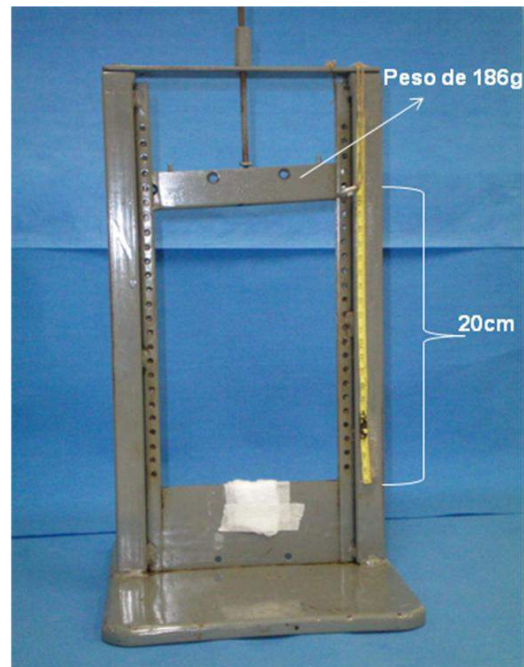


Figura 3- Equipamento desenvolvido para lesionar o tendão calcâneo do animal: vista anterior e peso na posição inicial.

4.5 PROCEDIMENTOS

4.5.1 LESÃO

Os animais foram pesados e anestesiados com injeção intraperitoneal de cloridrato de Ketamina (100mg/kg) associado a cloridrato de Xilazina (50mg/kg), e, após a sedação, foram posicionados em decúbito ventral sobre a prancha cirúrgica para realização da depilação digital da região do tendão calcâneo das patas direita e esquerda, sendo apenas uma delas posicionada no equipamento desenvolvido pela Oficina Mecânica da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar. A lateralidade da pata posicionada no lesionador foi definida pelo programa Bioestat[®] 5.0 para aleatorizá-la.

Foi realizada uma leve tração na região calcanear direita ou esquerda, onde o tornozelo era mantido em dorsiflexão até o momento em que o dorso da pata do animal entrasse em contato com o aparelho de lesão; após 1 segundo, o peso de 186g foi solto perpendicularmente, de uma altura de 20cm sobre o tendão calcâneo do animal. A energia potencial de queda sobre o tendão foi de 364,9mJ (fig. 4 e 5).



Figura 4- Posicionamento da pata do animal antes da queda do peso para lesar o tendão calcâneo.



Figura 5- Vista superior do peso sobre o tendão calcâneo no momento da lesão.

Três segundos após esse procedimento, o peso foi retirado e o local da lesão foi demarcado com um círculo ao seu redor, por meio de uma caneta dermatográfica, para a realização das aplicações pontuais com o *laser*. A seguir, os animais foram recolocados em suas gaiolas e observados até o término do efeito anestésico. Todo esse procedimento foi realizado durante o mesmo período e turno e sempre pelo mesmo pesquisador.

4.6 TÉCNICA

Os animais dos grupos experimentais (Grupos 2, 3, 4 e 5) foram submetidos ao tratamento com *laser* após 1 minuto da lesão e nos quatro dias consecutivos (5 dias de tratamento). A técnica utilizada foi pontual com contato com apenas um ponto no local da lesão. Nessa técnica, a caneta do *laser* permanece a 90° em relação à superfície do tendão calcâneo (fig.6).



Figura 6- Aplicação do *laser* na região tendínea.

4.7 PROCEDIMENTO DO PROTOCOLO DE TRATAMENTO

Os animais do grupo 1 (sham) foram submetidos a simulação do tratamento com aplicação do *laser* desligado, durante 21 segundos. Tempo equivalente ao maior estresse sofrido pelo animal.

Os animais do grupo 2 (40mW) foram submetidos ao tratamento com aplicações de *laser* diodo de 830nm (As-Ga-Al), com densidade de energia de $30\text{J}/\text{cm}^2$, potência de 40mW, energia total de 0,84J, densidade de potência de $1,4\text{W}/\text{cm}^2$, durante 21 segundos.

Os animais do grupo 3 (60mW) foram submetidos ao tratamento com aplicações de *laser* diodo de 830nm (As-Ga-Al), com densidade de energia de $30\text{J}/\text{cm}^2$, potência de 60mW, energia total de 0,84J, densidade de potência de $2,14\text{W}/\text{cm}^2$, durante 14 segundos.

Os animais do grupo 4 (80mW) foram submetidos ao tratamento com aplicações de *laser* diodo de 830nm (As-Ga-Al), com densidade de energia de $30\text{J}/\text{cm}^2$, potência de 80mW, energia total de 0,84J, densidade de potência de $2,8\text{W}/\text{cm}^2$, durante 10,5 segundos.

Os animais do grupo 5 (100mW) foram submetidos ao tratamento com aplicações de *laser* diodo de 830nm (AsGaAl), com densidade de energia de $30\text{J}/\text{cm}^2$, potência de 100mW, energia total de 0,84J, densidade de potência de $3,5\text{W}/\text{cm}^2$, durante 8,4 segundos.

O início do tratamento foi realizado após um minutos de lesão, durante cinco dias consecutivos (POI-PO4 no mesmo horário da primeira aplicação). A técnica de aplicação de *laser* utilizada foi pontual com contato em apenas um ponto no local da lesão. Nesta técnica, a caneta do *laser* permanece a 90° do tendão calcâneo.

4.8 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS E ANÁLISE DE DADOS

4.8.1 Excisão do tendão e método de fixação da amostra

No 6º dia após a lesão, os animais foram anestesiados, seus tendões direitos ou esquerdos foram retirados por duas incisões cirúrgicas com bisturi de lâmina 15, uma à junção musculotendínea e outra sobre a inserção calcâneo. Cada animal foi sacrificado por meio de hiperdosagem anestésica seguido de secção dos vasos cervicais.

Cinco segundos após a retirada do tendão calcâneo, o mesmo foi fixado em uma superfície de parafina modelada na placa de petri. A fixação foi realizada por dois alfinetes, o primeiro colocado na base do tendão (junção osseotendínea) e o segundo na junção musculotendínea. Em seguida, foi adicionado formol tamponado a 10% sobre o tendão até o mesmo estar completamente coberto. O tendão calcâneo foi mantido submerso inicialmente por 40 minutos e, após esse período, o formol foi retirado e foi realizada uma incisão de 2mm abaixo da junção musculotendínea e outra a 2mm acima da junção osseotendínea, utilizando uma lâmina de barbear (fig.7).

Todos os tendões foram padronizados com comprimento de 0,8cm para realização da avaliação. Após a padronização do tendão, o mesmo foi envolto em um papel de filtro qualitativo com dimensão de 3x2cm e colocado dentro de uma caixa (K7) (Apêndice 2), que foi mantida submersa em formol tamponado 10% por 24 horas. Após, isso, os tendões foram submersos em álcool 70% durante 48 horas iniciando o preparo das lâminas histológicas, para serem analisadas junto ao microscópio de polarização. A proposta deste procedimento foi analisar a organização, estado de agregação e ordem molecular das fibras de colágeno no tendão calcâneo através da mensuração da

birrefringência e verificação da predominância do tipo de colágeno no tendão calcâneo através da análise por picrosirius.

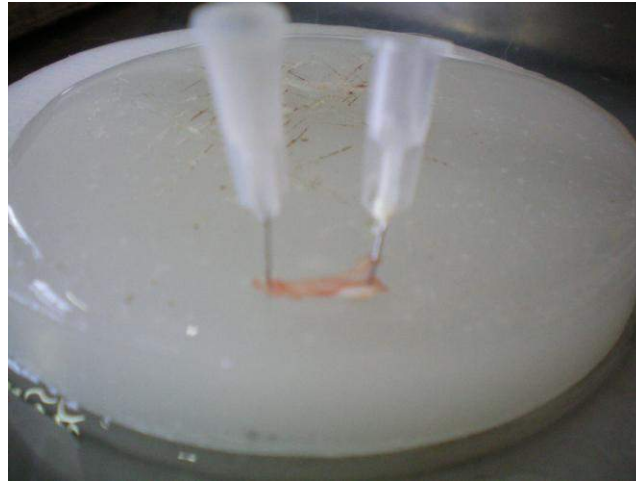


Figura 7- Tendão calcâneo fixado com dois alfinetes na placa de petri e coberto com formol tamponado a 10%.

4.8.2 Preparo das lâminas histológicas

Após os tendões serem lavados em água corrente, foram desidratados em soluções de concentrações crescentes de álcool etílico a 70% e 90%; uma hora em cada solução. Em seguida, passaram por seis banhos, de uma hora cada, na solução de álcool a 100%.

Após a imersão em álcool a 100%, os tendões foram diafanizados em solução de álcool/xilol 1:1 por uma hora, seguido por dois banhos de xilol puro, sendo que a duração de cada banho foi de uma hora.

Os tendões foram retirados do xilol e colocados imediatamente em parafina líquida (60°C). Após uma hora, essa parafina foi submetida a uma segunda parafina (Paraplast®) por mais uma hora. Durante o segundo banho

de parafina, as peças foram levadas a uma estufa a vácuo onde permaneceram por um período de duas horas; posteriormente, foram realizados os blocos para obtenção de blocos histológicos. Os tendões inclusos nos blocos de parafina foram cortados longitudinalmente em cortes semi-seriados por um micrótomo rotativo. Os cortes foram montados em lâminas histológicas, sem cobertura por lamínulas e/ou coloração para avaliação de birrefringência e por coloração de sirius-red para avaliação de picrosirius .

Cada lâmina histológica foi montada com uma série de dois cortes consecutivos de cada tendão, e cada grupo de animais foi representado por dez lâminas histológicas montadas com seus respectivos tendões. Após serem montadas, todas as lâminas foram desparafinizadas e hidratadas novamente.

As lâminas de birrefringência foram mantidas desta maneira, e as lâminas com coloração de picrosirius, após a hidratação, foram colocadas em ácido pícrico saturado por 15 min. As lâminas foram lavadas em água corrente e receberam um banho de água destilada. Na sequência deste processo, foram imersas em solução de picrosirius por um período de uma hora.

Novamente hidratadas, as lâminas passaram por quatro banhos de álcool e quatro banhos de xilol. Após este processo, foram colocadas as lamínulas em meio de montagem interlan.

4.9 MEDIDAS DE BIRREFRINGÊNCIA

As lâminas histológicas foram tomadas ao acaso, sendo classificadas por código, de modo a não se identificar, no momento das medidas, a qual lâmina os animal correspondiam (análise histológica cega). A análise das lâminas foi realizada pelo pesquisador principal do estudo.

A análise das fibras de colágeno foi realizada utilizando a propriedade anisotrópica óptica de birrefringência de forma ou textural, por microscopia de polarização.

Antes de cada avaliação, as lâminas histológicas de cada grupo foram imersas por 30 minutos em água destilada, cujo índice de refração é de ($n = 1,33$), (VIDAL, 1986; VIDAL, 2003). As medidas dos retardos ópticos (RO em nm) em H₂O representaram a soma das birrefringências intrínseca e textural dos feixes de colágeno.

Após o período de imersão, as lâminas foram cobertas por lamínulas, contendo água destilada nas interfaces.

As medidas dos retardos ópticos foram obtidas pela microscopia de luz polarizada no microscópio Leica[®], com uma objetiva Pol 10x/0,22, condensador 0,9, compensador de Sénarmont $1/4\lambda$, luz monocromática $\lambda=546\text{nm}$, obtidas por meio de um filtro de interferência Leica[®]; no Laboratório de Materiais Vítreos da Universidade Federal de São Carlos UFSCar (orientação do Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto).

Para realização das medidas, o eixo longo do tendão foi mantido a aproximadamente 45° em relação aos polarizadores do microscópio. Nesta angulação, as fibras de colágeno apresentam um maior retardo óptico (brilho).

Foram obtidos valores de seis diferentes pontos da área central de cada um dos dois cortes de cada tendão. Os valores obtidos em graus foram multiplicados por 1,33 (índice de refração da água) para se obter o resultado em nanômetros (nm).

4.10 MEDIDAS DE PICROSIRIUS

O tecido corado em sirius red foi analisado em microscopia de luz polarizada (microscópio Nikon[®] E-800) quanto à presença de fibras colágenas finas (tipo III), polarização em verde e espessas (tipo I), polarização em vermelho e amarelo.

Foi quantificada área igual em todas as lâminas, obtida pela digitalização da imagem de dez campos de área $303.598,2 \mu\text{m}^2$, totalizando $3.035.982 \mu\text{m}^2$ por lâmina. As áreas correspondentes a cada polarização foram somadas por lâmina e foi calculada a porcentagem de cada tipo de polarização em relação à área total analisada. A análise foi realizada com auxílio de sistema de análise de imagens Image Pro-Plus[®] (versão 4.5) e os resultados foram expressos na porcentagem média dos dois diferentes tipos de fibras colágenas.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A confiabilidade das medidas entre os dois observadores foi avaliada por coeficientes de correlação intra-classe (ICC), gráficos de dispersão, gráficos de Bland-Altman, teste T pareado e teste do sinal.

Os dados quantitativos foram resumidos em médias, medianas, desvios padrão, quartis, valores mínimos e máximos. Para ilustrar os resultados, foram apresentados gráficos com intervalos de confiança de 95% para as médias.

Para a comparação entre os grupos, foram utilizados modelos de Análise de Variância (ANOVA) com um fator seguido pelo método de comparações múltiplas de Tukey para localizar as diferenças. A hipótese de distribuição normal requerida pelo teste de ANOVA foi verificada por ferramentas

estatísticas descritivas, coeficientes de assimetria e curtose, box-plots e gráficos normais de probabilidade (normal-plot). A hipótese de igualdade de variâncias foi verificada pelo teste de Levene. Quando as variâncias eram diferentes utilizou-se a correção de Brown-Forsythe e o método de comparações múltiplas de Dunnet.

O nível de significância adotado foi 0,05. O programa estatístico para efetuar os cálculos foi o SPSS[®] for Windows (versão 16.0).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

Os maiores valores de birrefringência pertencem ao grupo que recebeu tratamento com potência de 100mW (tabela 1). Pode-se observar que a média dos grupos 40, 60, 80 e 100mW está próxima e superior à do grupo *sham* que recebeu a simulação do tratamento, mostrando um realinhamento das fibras, como se pode observar nas figuras 9-13. Porém, não houve diferença significativa entre os cinco grupos ($p=0,139$) (Apendice 3) (fig.8).

Tabela 1 - Resultados da comparação entre os grupos, dois a dois, em relação ao alinhamento das fibras de colágeno.

Comparação dos grupos	Médias	Nível Descritivo
G1 (<i>Sham</i>) x G2(40mW)	52,10 x 59,42	0,603
G1 (<i>Sham</i>) x G3(60mW)	52,10 x 61,82	0,292
G1 (<i>Sham</i>) x G4(80mW)	52,10 x 61,59	0,318
G1 (<i>Sham</i>) x G5(100mW)	52,10 x 63,52	0,145
G2 (40mW) x G3(60mW)	59,42 x 61,82	0,995
G2 (40mW) x G4(80mW)	59,42 x 61,59	0,997
G2 (40mW) x G5(100mW)	59,42 x 63,52	0,946
G3 (60mW) x G4(80mW)	61,82 x 61,59	1,000
G3 (60mW) x G5(100mW)	61,82 x 63,52	0,999
G4 (80mW) x G5(100mW)	61,59 x 63,52	0,998

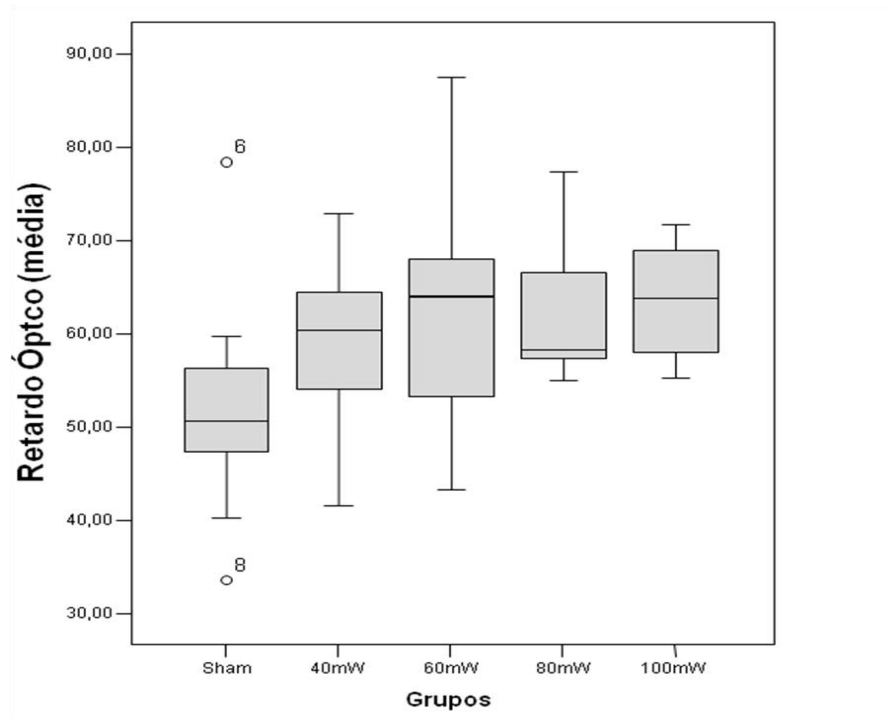


Figura 8- Distribuição dos valores de birrefringência (retardo óptico).

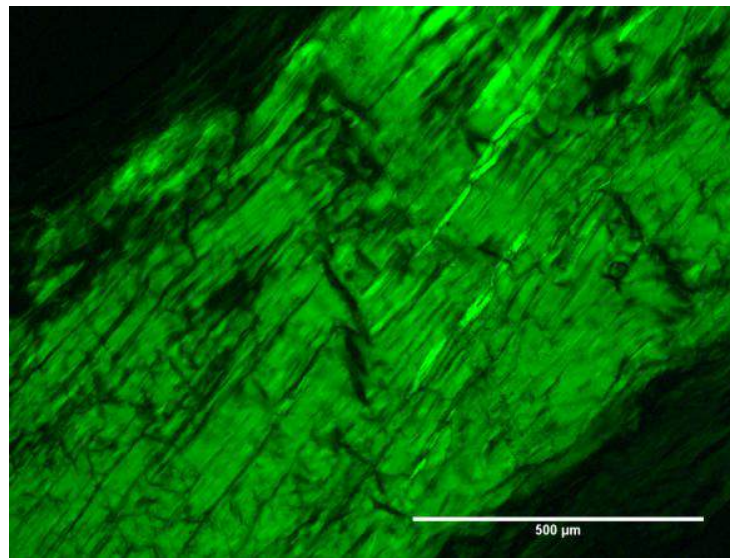


Figura 9- Alinhamento das fibras de colágeno do tendão calcâneo do grupo *sham*.

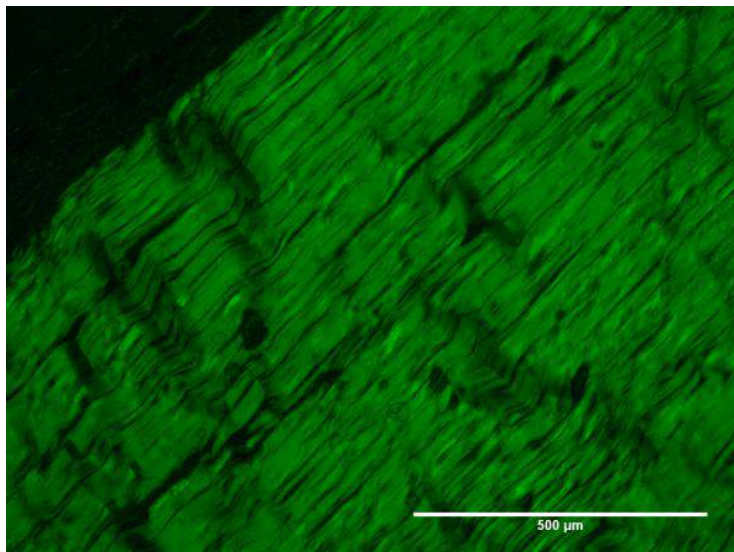


Figura 10- Alinhamento das fibras de colágeno do tendão calcâneo do grupo 40mW.

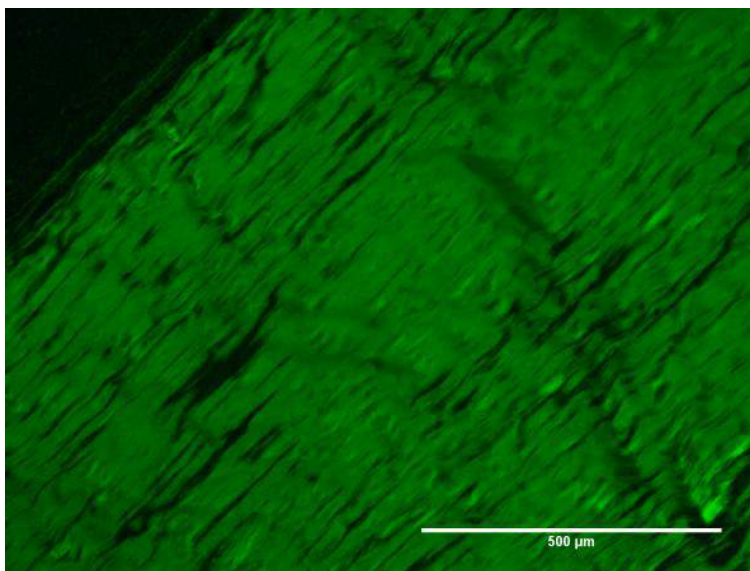


Figura 11- Alinhamento das fibras de colágeno do tendão calcâneo do grupo 60mW.

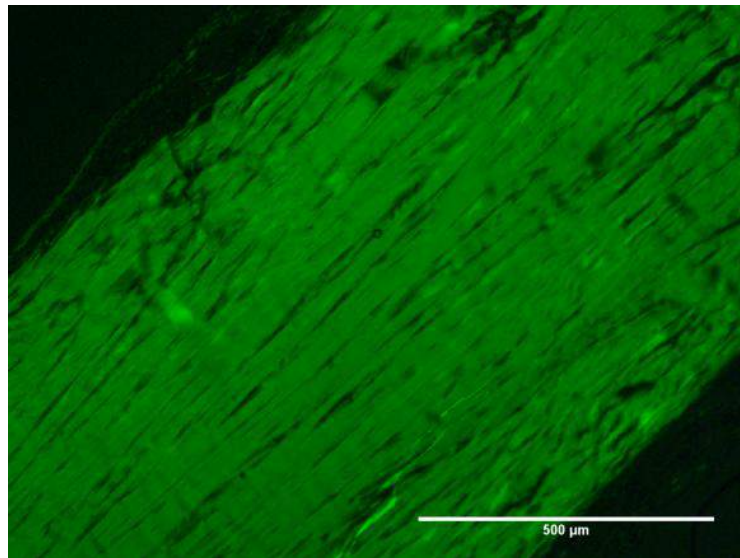


Figura 12- Alinhamento das fibras de colágeno do tendão calcâneo do grupo 80mW.

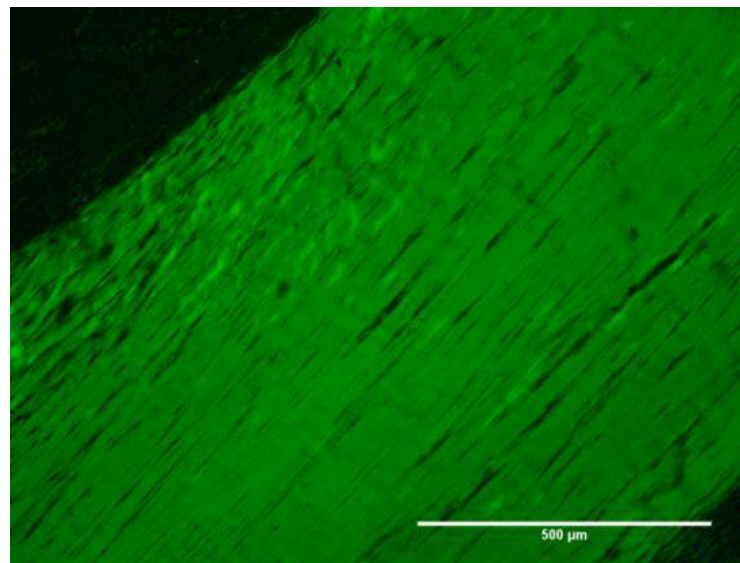


Figura 13- Alinhamento das fibras de colágeno do tendão calcâneo do grupo 100mW.

Com relação à quantidade de colágeno tipo III, foi observado um aumento do percentual, conforme o aumento da potência do *laser* (60 a 100mW). Foram encontradas diferenças entre o grupo *sham* quando

comparado com o grupo 60mW ($p=0,02$), o grupo 80mW ($p<0,01$) e o grupo 100mW ($p<0,01$) (fig.14). As demais diferenças não foram significantes, obtendo-se um nível de significância de $p>0,05$. (tabela 2)

Tabela 2 - Resultados da comparação entre os grupos, dois a dois, em relação à predominância de colágeno tipo III.

Comparação dos grupos	Médias	Nível Descritivo
G1 (<i>Sham</i>) x G2(40mW)	31,96 x 48,02	0,09
G1 (<i>Sham</i>) x G3(60mW)	31,96 x 55,85	0,02*
G1 (<i>Sham</i>) x G4(80mW)	31,96 x 60,90	<0,01*
G1 (<i>Sham</i>) x G5(100mW)	31,96 x 61,55	<0,01*
G2 (40mW) x G3(60mW)	48,02 x 55,85	0,76
G2 (40mW) x G4(80mW)	48,02 x 60,90	0,26
G2 (40mW) x G5(100mW)	48,02 x 61,55	0,22
G3 (60mW) x G4(80mW)	55,85 x 60,90	0,94
G3 (60mW) x G5(100mW)	55,85 x 61,55	0,91
G4 (80mW) x G5(100mW)	60,90 x 61,55	>0,99

* diferença média significante

Não houve diferença significante quando comparados os grupos tratamento (Apêndice 4).

A predominância de colágeno tipo III (fibras verdes) e colágeno tipo I (fibras vermelhas) pode ser observada nas figuras 15-19.

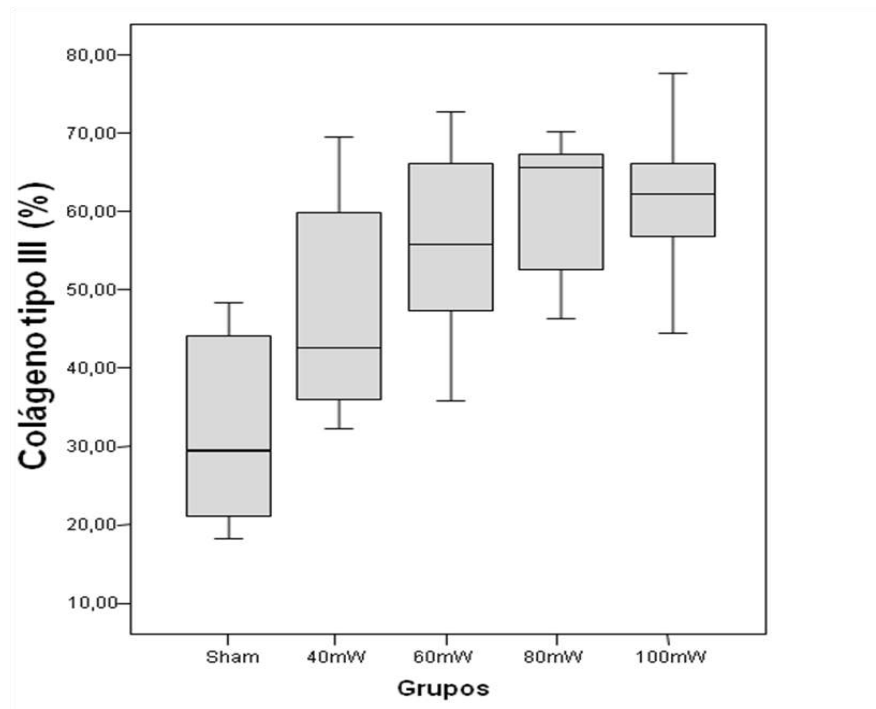


Figura 14 - Distribuição dos valores para colágeno tipo III (picosirius).

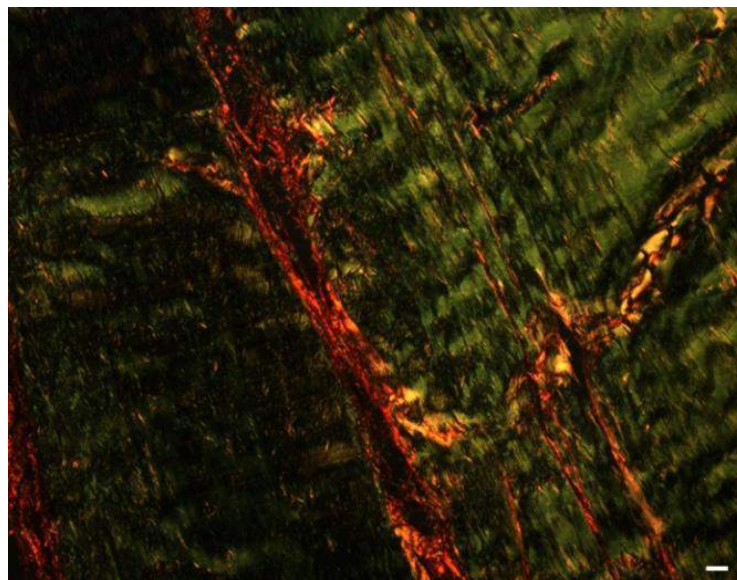


Figura 15- Análise de picosirius para observação das fibras de colágeno finas com polarização em verde e espessas com polarização em vermelho do grupo *sham*.

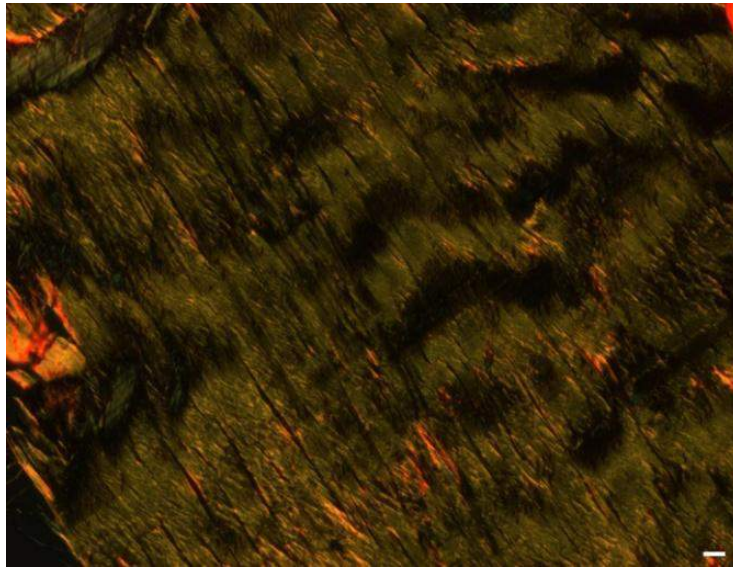


Figura 16- Análise de picosirius para observação das fibras de colágeno finas com polarização em verde e espessas com polarização em vermelho do grupo 40mW.

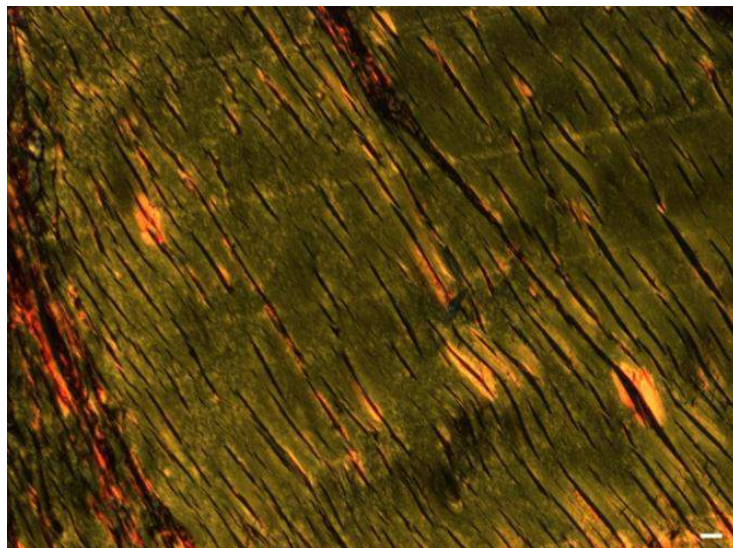


Figura 17- Análise de picosirius para observação das fibras de colágeno finas com polarização em verde e espessas com polarização em vermelho do grupo 60mW.

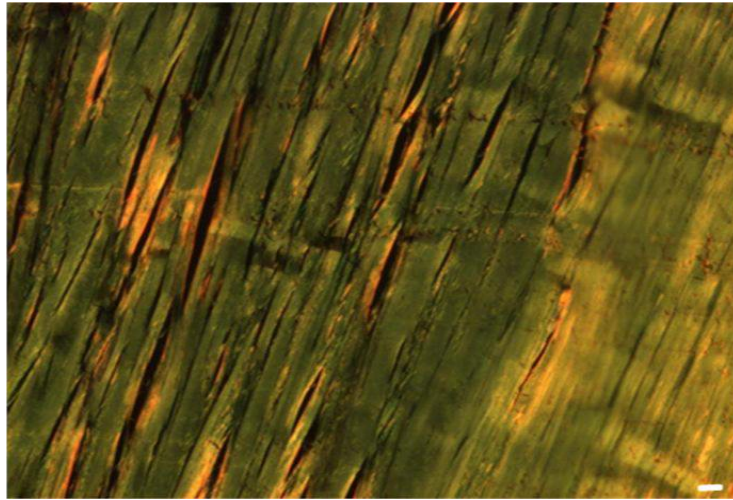


Figura 18- Análise de picrosirius para observação das fibras de colágeno finas com polarização em verde e espessas com polarização em vermelho do grupo 80mW.

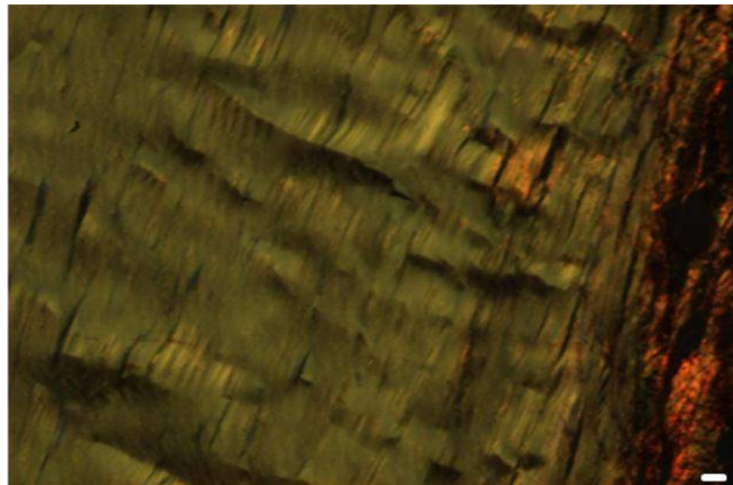


Figura 19- Análise de picrosirius para observação das fibras de colágeno finas com polarização em verde e espessas com polarização em vermelho do grupo 100mW.

Em relação ao colágeno tipo I, houve pouca variabilidade quando comparado o grupo *sham* com os grupos tratamento com *laser* (Apêndice 5). O grupo 80mW apresentou resultados significantes quando comparado com o grupo *sham* ($p=0,05$) (fig.20). As demais diferenças não foram significantes (tabela 3).

Tabela 3 - Resultados da comparação entre os grupos, dois a dois, em relação à predominância de colágeno tipo I.

Comparação dos grupos	Médias	Nível Descritivo
G1 (<i>Sham</i>) x G2(40mW)	2,60 x 9,12	0,16
G1 (<i>Sham</i>) x G3(60mW)	2,60 x 9,01	0,11
G1 (<i>Sham</i>) x G4(80mW)	2,60 x 15,40	0,05*
G1 (<i>Sham</i>) x G5(100mW)	2,60 x 6,50	0,50
G2 (40mW) x G3(60mW)	9,12 x 9,01	1,00
G2 (40mW) x G4(80mW)	9,12 x 15,40	0,47
G2 (40mW) x G5(100mW)	9,12 x 6,50	0,99
G3 (60mW) x G4(80mW)	9,01 x 15,40	0,40
G3 (60mW) x G5(100mW)	9,01 x 6,50	0,99
G4 (80mW) x G5(100mW)	15,40 x 6,50	0,08

* diferença média significante

Nos grupos tratamento não houve diferença significante.

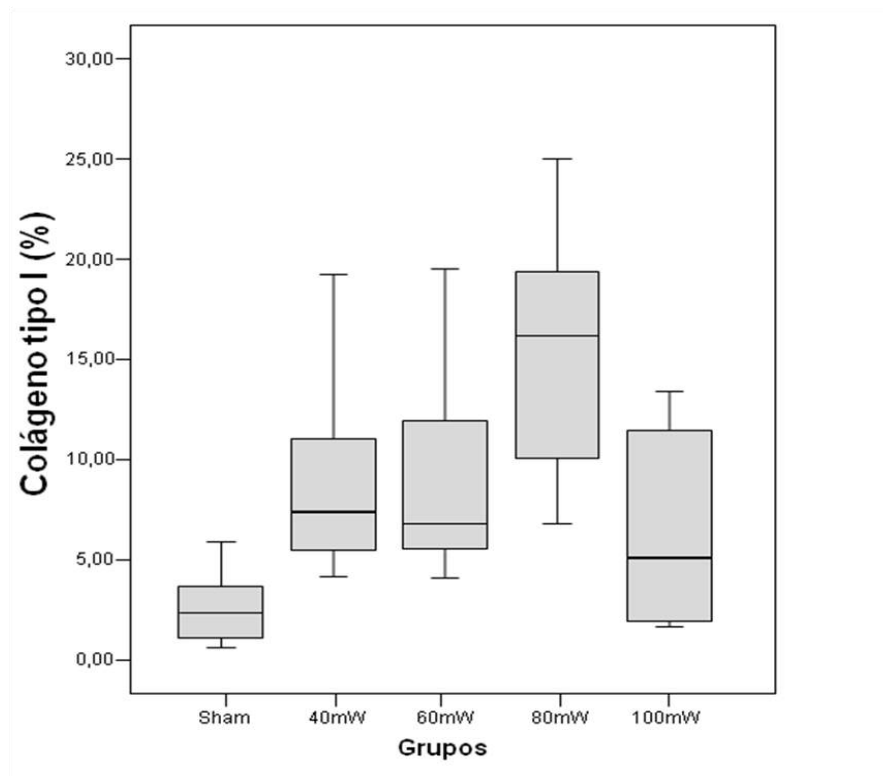


Figura 20 - Distribuição dos valores para colágeno tipo I (picrosirius)

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

A terapia a *laser* de baixa intensidade vem sendo cada vez mais estudada em laboratórios e cada vez mais utilizada na prática terapêutica, constituindo-se atualmente, em uma das modalidades bioestimulantes mais utilizadas na reabilitação, o que tem contribuído para o melhor entendimento de seus princípios e aplicabilidades. No entanto, as evidências científicas e clínicas ainda são escassas e, na maioria das vezes, contraditórias, fato que justifica a necessidade e a relevância da realização de pesquisas envolvendo esse recurso terapêutico.

A motivação principal para realização do presente estudo foi o fato de que a maioria dos estudos realizados com lesões tendíneas utilizando terapia a *laser* de baixa intensidade não abordam a ação da potência sobre o reparo tendíneo.

VAN BREUGEL & BAR (1992) verificaram que a maioria dos estudos considera a densidade de energia a principal variável com respeito aos efeitos da irradiação *laser* e poucos experimentos têm sido realizados para determinar o quanto a densidade de potência do *laser* pode influenciar nesse processo. Com isso, um dos principais questionamentos é se a otimização do tempo de tratamento acelera o reparo tendíneo, conseqüentemente diminuindo a permanência do paciente à frente do tratamento.

A sociedade moderna exige padrões de ética, restringindo a possibilidade de utilização de modelos humanos para realização de alguns tipos de pesquisas. Como conseqüência, modelos alternativos são necessários, levando à utilização de animais de experimentação. Dessa forma, o modelo

experimental é de suma importância para aquisição de modelos reprodutíveis (KOEKE, 2005).

Neste estudo, utilizou-se o rato como animal de experimentação, devido à facilidade de obtenção e de manuseio laboratorial, baixo custo e pela necessidade da retirada de amostras para avaliações histológicas. Além disso, pelo fato de existir na literatura um grande número de trabalhos com este modelo animal, possibilitando as comparações entre os resultados (OLIVEIRA, PARIZOTTO, SALVINI, 1999; CARRINHO *et al.*, 2006; KOEKE *et al.*, 2005; SALATE *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2009). Foram selecionados ratos machos em virtude das variações no ciclo estral das fêmeas e também pela predominância dos machos na literatura pesquisada.

O tendão calcâneo foi utilizado em decorrência da grande incidência de lesões nessa região e pelo fato de facilitar a execução da técnica experimental em função da ampla forma anatômica, despertando interesse de diversos pesquisadores em avaliar a qualidade do reparo tendíneo (OWOEYE *et al.*, 1987; ENWEMEKA, 1989b; CUNHA, PARIZOTTO, VIDAL, 2001).

A grande maioria dos estudos em reparo de lesões tendíneas é feita a partir de tenotomia total - com sutura (ENWEMEKA, SPIELHOLZ, NELSON, 1988; GUM *et al.*, 1997; STEHNO-BITTEL *et al.*, 1998; RANTANE, HURME, KALIMO, 1999) e sem sutura (KOEKE *et al.*, 2005; CARRINHO *et al.*, 2006; ARRUDA *et al.*, 2007); lesões parciais - com aplicação de colagenase (MARSOLAIS, CÔTÉ, FRENETTE, 2001; CHEN *et al.*, 2004; GODBOUT, ANG, FRENETTE, 2006), lesão por esmagamento (CARVALHO *et al.*, 2006), *overuse* (HUANG, PERRY, SOSLOWSKY, 2004), por trauma direto (SALATE *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2009) e

tenotomia parcial (SEE *et al.*, 2004; NG & FUNG, 2008), com objetivo de investigar melhor o processo de reparo tendíneo.

No presente estudo, foi realizada a lesão parcial do tendão calcâneo, com base nos estudos realizados por SALATE *et al.* (2005) e OLIVEIRA *et al.* (2009). Para constatar que houve ruptura parcial das fibras colágenas, SALATE *et al.* (2005) realizaram um estudo piloto para padronizar o equipamento que geraria ruptura parcial em tendões de ratos. As rupturas parciais foram constatadas por intermédio de ultra-som, com variações de tamanho menor que 10% entre os animais, ocorrendo no terço central e na região anterior do tendão.

A lesão parcial foi escolhida por ser constante nas atividades físicas que geram sobrecarga de trabalho sobre o tendão, sendo que na maioria dos casos ocorre antes da lesão total (SOMA & MANDLBAUM, 1995; STHENOBITEL *et al.*, 1998; ALMEKINDERS & DEOL, 1999). Como consequência da lesão, ocorre um processo inflamatório e alterações degenerativas, onde há uma redução do fluxo sanguíneo, resultando em hipóxia tecidual (ZHANG, 2003). Essa cascata fisiológica, segundo SALOMÃO *et al.* (1993) pode induzir à ruptura total do tendão calcâneo.

Por este motivo talvez a lesão parcial proposta por Huang, Perry, Soslowsky (2004) fosse uma alternativa de método de lesão. Entretanto, no estudo citado, os animais submetidos a estresse repetitivo não apresentaram alterações degenerativas nos tendões calcâneos, houve apenas degeneração do tendão do músculo supraespinhal, que não é o foco do presente estudo.

Outras alternativas seriam a indução de lesão por aplicação de collagenase para simular alterações degenerativas (MARSOLAIS, CÔTÉ, FRENETTE, 2001; CHEN *et al.*, 2004; GODBOUT, ANG, FRENETTE,

2006) e a indução de lesão por esmagamento (CARVALHO *et al.*, 2006), sendo que nenhuma dessas duas técnicas está padronizada. A tenotomia parcial não simula lesões degenerativas, uma vez que se realiza um corte transversal no tendão do gatrocnêmio medial, sem cizalhamento (SEE *et al.*, 2004 e NG & FUNG, 2008). Devido a estes motivos, não se optou por estes métodos de lesão.

O reparo de tendões é similar a outros processos de reparo que ocorrem em tecidos biológicos. Na sequência do reparo, há proliferação e migração de vários tipos de células, síntese de colágeno e angiogênese para a formação do tecido de granulação, e, por fim, orientação das células do tendão e fibras de colágeno de maneira altamente organizada, na tentativa de restaurar a estrutura e função do tendão lesado (CHAN, FUNG, NG, 2007).

Considerando a possibilidade de ocorrer algum efeito relacionado ao realinhamento das fibras de colágeno no processo de reparo tendíneo, devido à tração da perna do animal quando posicionado para o tratamento e o estresse sofrido durante o tratamento, foi acrescentado à pesquisa o grupo *sham* (simulação), substituindo o grupo controle, sendo que este sofreria a lesão e teria apenas a simulação do tratamento.

Os mecanismos reais pelos quais o *laser* estimula o reparo tendíneo ainda não estão totalmente esclarecidos. Acredita-se que as respostas celulares dependem da escolha e da combinação de seus parâmetros, tais como: o comprimento de onda, densidade de energia ou fluência, potência, densidade de potência ou irradiância, técnica de aplicação, tempo de irradiação e intervalos de tratamento (ALMEIDA-LOPES *et al.*, 2001; PEREIRA *et al.*, 2002; ENWEMEKA *et al.*, 2004; CARRINHO *et al.*, 2006; PINFILDI *et al.*, 2005; SALATE *et al.*, 2005).

Neste estudo foram feitas aplicações de *laser* utilizando a técnica pontual com contato, onde a fibra óptica permanecia perpendicular à pele, irradiando-se por fotoestimulação transcutânea, em um único ponto correspondente à área da lesão. Essa técnica foi escolhida devido ao fato de a penetração do feixe de luz no tecido sofrer o fenômeno de dispersão, atingindo toda a área lesada e também regiões circunvizinhas à lesão. Além disso, serviram de base para este trabalho os estudos de LONGO (1993) e BAXTER (1997), que relataram que, em tratamentos onde a fibra óptica não está em contato com o tecido, a área de irradiação será maior, determinando um número relativamente menor de fótons por unidade de área para a mesma potência, ou seja, a densidade de potência ou irradiância diminuirá com o aumento da distância entre o aplicador e o tecido alvo a ser irradiado.

Outros estudos também demonstraram ser este método o mais utilizado para tratamento de lesões tendíneas (SALATE *et al.*, 2005; CARRINHO *et al.*, 2006; ARRUDA *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2009).

O tamanho da área de secção transversal do feixe considerado relativamente pequeno ($0,028\text{cm}^2$) proporciona uma maior densidade de potência ou irradiância na área tratada, colaborando, desta forma, para a efetividade do tratamento (KITCHEN & PARTRIGE, 1991; LAAKSO, RICHARDSON, CRAMOND, 1993a; 1993b; KLOTH, 1997; LOW & REED, 2001). Os resultados positivos obtidos com a utilização dessa área de secção transversal do feixe estão de acordo com os encontrados por (CARRINHO *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2009) que utilizaram a mesma dimensão de área.

Sugere-se que a luz vermelha como a do He-Ne possa ser absorvida pelos citocromos nas mitocôndrias das células, aumentando a permeabilidade da membrana celular. Os *lasers* infravermelhos (invisíveis), como os de

diodos de Arseneto de Gálio, são fortemente absorvidos pela água, podendo alcançar níveis mais profundos (KOLARI, 1985; KITCHEN & PARTRIDGE, 1991; DIAMANTOPOULOS, 1994; STOLIK *et al.*, 2000).

Seguindo a teoria de que o *laser* infravermelho é absorvido melhor por tecidos que contenham água, acredita-se que este seria o *laser* mais adequado, pois os tendões são estruturas brancas e brilhantes e são formados por fibroblastos e matriz extracelular, sendo que, o colágeno é o maior componente da matriz, abrangendo 86% a 95% do peso úmido do tendão (BIRK & TRELSTAD, 1986; KLEIN & EEK, 1990; ENWEMEKA & SPIEHOLZ, 1992; STOLINSKI, 1995; MCNEILLY, 1996; KHAN *et al.*, 1999; ÖZKAN *et al.*, 2004).

No presente estudo, foi escolhido o *laser* de Arseneto de Gálio e Alumínio (AsGaAl) com comprimento de onda de 830nm. Segundo KOLARI (1985); TAVARES, MAZZER, PASTORELLO (2005), este comprimento de onda possui uma capacidade de penetração maior, sem causar aquecimento ou outros sinais físicos.

STOLIK *et al.* (2000) relataram que quanto maior o comprimento de onda, mais profunda será a penetração da luz. Além disso, a profundidade da penetração depende da espessura da pele e do local anatômico a ser irradiado (KOLAROVA, DITRICOVA, WAGNER, 1999; STOLIK *et al.*, 2000). Já STADLER *et al.* (2004) investigaram a mudança de temperatura em peles de ratos brancos e pretos, durante a irradiação de *laser* infravermelho de 830nm, observando um leve aumento na temperatura superficial da pele, chegando apenas a 1mm de profundidade, fato este não avaliado no presente estudo.

A hipótese mais descrita na literatura é que as irradiações visíveis são fortemente absorvidas pela hemoglobina e melanina, que são moléculas

chamadas cromóforos, ocorrendo uma bioestimulação nas células que absorveram essa radiação (BAXTER *et al.*, 1991; KITCHEN & PARTRIDGE, 1991; SCHINDL *et al.*, 2000; LOW & REED, 2001).

O comprimento de onda utilizado neste estudo está dentro da janela terapêutica de comprimentos de onda ideais encontrados por KARU (1998), os quais estão entre de 760nm a 840nm, pois nessas faixas de espectro eletromagnético, os cromóforos superficiais têm uma fraca absorção havendo, portanto, uma maior penetração no tecido.

ALMEIDA-LOPES *et al.* (2001) constataram que o *laser* infravermelho (780nm) induziu a um crescimento celular significativamente maior do que o *laser* visível (670nm) num estudo *in vitro* com células com *déficit* nutricional, o que difere do resultado de diversos autores que apontam o *laser* visível como o mais efetivo na indução da proliferação celular (YOUNG *et al.*, 1989; LUBART *et al.*, 1992; LOEVSCHALL & ARENHOLT-BINDSLEV, 1994; ALMEIDA-LOPES *et al.*, 1998).

Esses resultados despertaram o interesse deste estudo em observar melhor o comportamento do reparo tendíneo, quando utilizado o *laser* de 830nm na lesão parcial do tendão calcâneo.

OLIVEIRA *et al.* (2009) avaliaram os efeitos do *laser* de baixa intensidade após ruptura parcial do tendão calcâneo, utilizando um comprimento de onda de 830nm e demonstraram resultados positivos no reparo tendíneo para o nível de organização e orientação das fibras colágenas no local da lesão.

RENNO *et al.* (2007) demonstraram que tipos celulares diferentes respondem diferentemente a comprimentos de onda e combinações de densidades de energia específicos.

Assim, cada situação deverá ser analisada individualmente considerando-se a patologia e as células-alvo envolvidas. A partir dessa análise, poderão ser escolhidos, então, com maior precisão, o comprimento de onda, as combinações de densidades de energia e as potências adequadas para o tratamento da patologia em questão.

Outro parâmetro também discutido entre os pesquisadores é a densidade de energia. Neste estudo, foi utilizada a densidade de energia de $30\text{J}/\text{cm}^2$, sendo esta uma das densidades de energia mais elevadas encontrada na literatura pesquisada, apontando efeitos terapêuticos significantes (GOLDMAN *et al.*, 1980; NISSAN *et al.*, 1986; BLIDDAL *et al.*, 1987; SCHINDL *et al.*, 1999; PINFILDI *et al.*, 2009).

PARIZOTTO & BARANAUSKAS (1998^a) evidenciaram uma melhor evolução no reparo tendíneo em ratos nos grupos irradiados com *laser* 632,8nm, sendo que a dose de $5\text{J}/\text{cm}^2$ apresentou melhores respostas quando comparada à densidade de energia de $50\text{J}/\text{cm}^2$. Já CHAN *et al.* (2005) constataram em seus estudos que densidade de energia de $125\text{J}/\text{cm}^2$ promove efeitos benéficos no estágio inicial do reparo tendíneo, o que corrobora o presente estudo, que após utilizar densidade de energia de $30\text{J}/\text{cm}^2$ obteve efeitos benéficos no reparo tendíneo para colágeno tipo I e III.

As controvérsias entre os estudos prévios podem ser atribuídas às diferentes formas de tratamento, e não há um consenso de qual deveria ser a densidade de energia ideal a ser empregada no tratamento com *laser*.

Devido à inexistência de estudos comparando potências, foram escolhidas para este estudo quatro potências distintas, 40mW, 60mW, 80mW e 100mW, permitindo a verificação de qual destas promoveria melhor resultado no reparo tendíneo.

TUNÉR & HODE (1999) concluíram que *lasers* com potências mais elevadas, em que a densidade de energia pode ser aplicada em tempo mais curto, podem ser mais eficientes na promoção de condições biológicas favoráveis. Além disso, os autores consideram que com uma alta potência de saída é possível obter uma alta densidade de potência, favorecendo o reparo tecidual.

Diversos estudos utilizam potências de saída na faixa entre 10mW e 40mW (YOUNG *et al.*, 1989; WEBB, DYSON, LEWIS, 1998; SCHINDL *et al.*, 1999; KIPSHIDZE *et al.*, 2001; DEMIR *et al.*, 2004; CARINHO *et al.*, 2006; ARRUDA *et al.*, 2007), e existem poucos dados na literatura na faixa de 40mW a 100mW (OSHIRO, CALDERHEAD, 1991; SALATE *et al.*, 2005, OLIVEIRA *et al.*, 2009). Assim, tem-se a necessidade de verificar potências diferentes sem alteração de outros parâmetros do *laser*, facilitando a comparação de resultados. Observa-se que na literatura pesquisada, os estudos trazem parâmetros diversos, prejudicando suas comparações e o entendimento completo da importância de cada parâmetro na atuação celular. Acredita-se, portanto que há uma janela terapêutica para potência de saída do *laser*, como há para os demais parâmetros. O presente estudo, por sua vez, teve padronização de todos os parâmetros do *laser* com exceção da potência de saída, demonstrando aceleração do reparo tendíneo.

Este estudo analisou o grau de orientação das fibras de colágeno na fase inicial do processo inflamatório e o tipo de colágeno por uma análise de *picrosirius*.

Como método de avaliação proposto foi realizada a análise de birrefringência, com intuito de verificar o alinhamento das fibras de colágeno.

VIDAL (2003) considerou esse o método ideal para detectar e descrever a orientação das fibras colágenas do tendão.

Neste estudo, as imagens foram tomadas com o alinhamento do eixo longo do tendão orientado a 45° entre o polarizador e o analisador do microscópio, pois, segundo VIDAL (2003), nessa angulação consegue-se detectar um alto brilho de birrefringência.

As médias dos valores de birrefringência foram crescentes conforme os grupos, ou seja, grupo *sham* (52,1nm), grupo 40mW (59,42nm), grupo 60mW (61,82nm), grupo 80mW (61,59nm), grupo 100mW (63,52nm). No entanto, não houve diferença significativa entre os grupos tratamento e entre estes e o grupo *sham*. O mesmo não foi observado por OLIVEIRA *et al.* (2009), que demonstraram melhores resultados na organização das fibras colágenas no 5° dia, em comparação ao 7° dia, após lesão utilizando 40mW de potência. Arruda *et al.* (2007), após utilizarem *laser* de 15 e 30mW de potência, em tenotomia do tendão calcâneo, demonstraram melhores resultados na organização das fibras colágenas no 14° dia, quando utilizada a junção de ambas as potências. CARRINHO *et al.* (2006), após realizarem tenotomia, utilizando potência de 15mW, observaram melhores resultados na organização das fibras colágenas no 13° dia após lesão.

Uma das possíveis hipóteses é que, no presente estudo, o reparo tendíneo tenha ocorrido mais precocemente, em torno do 3° ao 5° dia, se fossem comparados entre si, e as avaliações de retardo óptico com potências mais elevadas poderiam ter sido feitas em períodos mais precoces. Talvez a falta de significância possa ser atribuída ao período da avaliação, sendo que houve um crescente aumento na organização das fibras colágenas conforme o aumento da potência. Segundo ALMEIDA-LOPES *et al.* (2001), os fibroblastos

humanos irradiados também assumem um aspecto ‘padrão’ polarizado, formando feixes em diferentes direções.

Na análise do colágeno tipo III, foram observadas diferenças significantes para os grupos de 60, 80 e 100mW $p < 0,01$ quando comparados com grupo *sham*, sendo o melhor deles o grupo 100mW. Já o colágeno tipo I apresentou resultado significativo apenas no grupo 80mW, quando comparado com o grupo *sham*, embora não haja correlação com a literatura pesquisada. Esses resultados vão de encontro aos obtidos por MAFFULLI *et al.* (2000) que estudaram *in vitro* a predominância do tipo de colágeno no tendão de Aquiles em humanos após ruptura parcial, tendinopatia, tendão sem ruptura e tendão fetal e verificaram maior predominância de colágeno tipo III no tendão com ruptura parcial e tendinopatia, colágeno misto tipo I e III em tendões fetais e colágeno tipo I em tendões sem ruptura. Essa predominância de colágeno tipo III em relação ao tipo I no tendão calcâneo nos grupos ruptura parcial e tendinopatia pode ser explicada pelo estado de evolução da lesão, principalmente por existir na literatura estudos que demonstram que a lesão do tendão calcâneo contém redução do colágeno tipo I e uma proporção significativamente maior do colágeno tipo III (COOMBS *et al.*, 1980; MAFFULLI *et al.*, 2000).

Essas propriedades parecem provir do fato de que a terapia a *laser* de baixa intensidade com potências altas causa um sinal na matriz extracelular, promovendo mudanças nas estruturas fibrilares. Isso ocorre após a energia eletromagnética interagir com as moléculas de colágeno. A organização e o alinhamento das fibras de colágeno no eixo longitudinal do tendão apresentam uma boa evidência das mudanças estruturais após serem irradiadas com *laser* (ARRUDA *et al.*, 2007). Os resultados deste estudo sugerem uma influência

benéfica do TLBI com potências de 60, 80 e 100mW no colágeno tipo I e III, sendo que, das potências apresentadas, somente a de 80mW demonstrou aumento de ambas as fibras colágenas.

Tais dados corroboram os resultados de outros estudos que utilizaram TLBI por um tempo mais elevado de tratamento do processo de reparo tecidual e verificaram resposta das células fibroblásticas e das moléculas de colágeno (ENWEMEKA, 1988; SKINNER *et al.*, 1996; VINCK *et al.*, 2003). VINCK *et al.* (2003), por exemplo, estudaram a influência do LLLT e LED e verificaram um aumento da proliferação de fibroblastos *in vitro* em comparação com o grupo controle.

Baseado nos resultados do presente estudo pode-se observar que a potência tem influência no reparo tecidual, porém ainda é precipitado dizer que a potência é fundamental para a melhora do reparo tendíneo. Estudos futuros devem ser efetuados a fim de avaliar a força tensil dos tendões para observar se o aumento da síntese de colágeno alteraria essa propriedade, assim como para entender melhor a influência da potência no reparo tecidual com TLBI para *lasers* infravermelhos.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

A terapia a *laser* de baixa intensidade não apresentou diferença no realinhamento das fibras de colágenos entre diferentes potências.

Potências de 60mW, 80mW e 100mW aumentaram significativamente a quantidade de colágeno tipo III.

Potência de 80mW aumentou significativamente a quantidade de colágeno tipo I.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

Agaiby AD, Ghali LR, Wilson R, Dyson M. Laser Modulation of Angiogenic Factor Production by T-Lymphocytes. *Lasers Surg Med.* 2000;26:357-63.

Almeida-Lopes L, Rigau J, Jaeger MMM, Brugnera Jr A, Vélez-González M. Acción del laser a baja densidad de potencia en la proliferación in vitro de fibroblastos de enca humana. *Bol Selmq.* 1998;14:14-18.

Almeida-Lopes L, Vélez-Gonzalez M, Brugnera Jr, Pinheiro AB. The use low level laser therapy for wound healing: clinical study. In: Annual Meeting-Lasers Surg Med. Proceedings. Florida, USA. 1999;16-8.

Almeida-Lopes L, Rigau J, Zãngaro RA, Guidugli-Neto J, Jaeger MMM. Comparasion of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers Surg Med.* 2001;29:179-84.

Almekinders LC, Deol G. The effects of aging, antiinflammatory drugs, and ultrasound on the in vitro response of tendon tissue. *Am J Sports Med.* 1999;27(4):417-21.

An KL, Berglund L, Cooney WP, Chao EY, Kovacevic N. Direct in vivo tendon force measurement system. *J Biomech.* 1990;23:1269-71.

Arruda ERB, Rodrigues NC, Tarciro C, Parizotto NA. Influência de diferentes comprimentos de onda da laserterapia de baixa intensidade na regeneração tendínea do rato após tenotomia. *Rev Bras fisioter.* 2007;11(4):283-88.

Azevedo LH, de Paula Eduardo F, Moreira MS, de Paula Eduardo C, Marques MM. Influence of different power densities of LILT on cultured human fibroblast growth : a pilot study. *Lasers Med Sci.* 2006;21(2):86-9.

Battegay EJ. Angiogenesis: mechanistic insights, neovascular diseases, and therapeutic prospects. *J Mol Med.* 1995;73:333-46.

Basford JR. Low intensity laser therapy: still not an established clinical tool. *Lasers Surg Med.* 1995;16:331-42.

Baxter, GD, Bell AJ, Allen JM, Ravey J. Low level laser therapy: current clinical practice in Northern Ireland *Physiotherapy.* 1991; 77: 171-8.

Baxter GD. Bionergetics and tissue optics. In: *Therapeutic Lasers: theory and practice.* Edinburg: Churchill Livingstone. 1994.

Baxter GD. *Therapeutic lasers: theory and practice.* United States of America: Ed. Churchill Livingstone. 1997.

Bjordal, JM. Level laser therapy in tendon injuries? – a review of in vitro and in vivo trials. [atualizado em 18 abril 2004; acesso em: 28 agosto 2009] Disponível em: http://www.laser.nu/llt/llt_science6.htm#4.

Bihari J, Mester AR. The biostimulative effect of low level laser therapy on longstanding crural ulcers using helium-neon laser, helium-neon laser plus infrared lasers, and noncoherent light: preliminary report of a randomized double blind comparative study. *Laser Ther.* 1989;1:97.

Bidder M, Towler DA, Gelberman RH, Boyer MI. Expression of mRNA for Vascular Endothelial growth Factor at the Repair Site of Healing Canine Flexor Tendon. *J Orthop Res.* 2000;18(2):247-52.

Birk DE, Trelstad RL. Extracellular compartments in tendon morphogenesis: collagen fibril, bundle, and macroaggregate formation. *J Cell Biol.* 1986;103:231-40.

Bliddal H, Hellensen C, Ditlevsen P, Asselberghs J, Lyager L. Soft laser therapy of rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol.* 1987;16:225-28.

Chan BP, Amann C, Yaroslavsky AN, Title C, Smink D, Zarins B, Kochevar IE, Redmond RW. Photochemical repair of Achilles tendon rupture in a rat model. *J Surg Res.* 2005;124(2):274-9.

Chan HKF, Fung DTC, Ng GYF. Effects of low-voltage microamperage stimulation on tendon healing in rats. *J Orthop Sports Phys Ther.* 2007;37(7):399-403.

Chen YJ, Wang CJ, Yang KD, Kuo YR, Huang HC, Huang YT, Sun YC, Wang FS. Extracorporeal shock waves promote healing of collagenase-induced Achilles tendinitis and increase TGF- β 1 and IGF-I expression. *Orthop Res.* 2004;22(4):854-61.

Carr AJ, Norris SH. The blood supply of the calcaneal tendon. *J Bone Joint Surg.* 1989;71-B:100-1.

Carrinho PM, Renno ACM, Koeke P, Salata ACB, Parizotto NA, Vidal BC. Comparative Study Using 685-nm and 830-nm Lasers in the Tissue Repair of Tenotomized Tendons in the Mouse. *Photomed Laser Surg.* 2006;24(6):754-8.

Carvalho PTC, Silva IS, Reis FA, Belchior ACG, Aydos RD, Facco GG, Dourado DM. Histological study of tendon healing in malnourished Wistar rats treated with ultrasound therapy. *Acta Cirúrgica Brasileira.* 2006; 21(4):13-7.

Coombs RRH, Klenerman L, Narcisi P, Nichols A, Pope FM. Collagen typing in Aquiles tendon rupture. *J Bone Joint Surg [BR]*. 1980;62-B:258.

Cunha A, Parizotto NA, Vidal BC. The effect of therapeutic ultrasound on repair of the Achilles tendon (tendon calcaneus) of the rat. *Ultrasound Med Biol*. 2001;27:1691-6.

Demir H, Menku P, Kirnap M, Calis M, Ikzceli I. Comparison of the effects of laser, ultrasound and combined laser + ultrasound treatments in experimental tendon healing. *Laser Surg Med*. 2004;35:84-9.

Diamantopoulos C. Bionergetics and tissue optics. In *Therapeutic Lasers: Theory and Practice* (Baxter GD) Edinburgh: Churchill Livingstone. 1994; p.67-88.

Dyson M, Young S. Effect of laser therapy on wound contraction and cellularity in mice. *Lasers Med Sci*. 1982;1:125-30.

Elwakil TF. An in-vivo experimental evaluation of He-Ne laser photostimulation in healing Achilles tendons. *Lasers Med Sci*. 2007;22:53-9

Enwemeka CS. Laser biostimulation of healing wounds: specific and mechanisms of action. *J Orthop Sports Phys Ther*. 1988;9(10):333-8.

Enwemeka CS, Spielholz NI, Nelson AJ. The effect of early functional activities on experimentally tenotomized Achilles tendons in rats. *Am J Physical Med Rehabil*. 1988;67(6):264-69.

Enwemeka CS. The effects of therapeutic ultrasound on tendon healing. A biomechanical study. *Am J Phys Med Rehabil*. 1989a;68:283-7.

Enwemeka CS. Inflammation, cellularity, and fibrillogenesis in regeneration tendon: implications for tendon rehabilitation. *Phys Ther*. 1989b;69:816-25.

Enwemeka CS, Rodriguez O, Mendosa S. The biomechanical effects of lowintensity ultrasound on healing tendons. *Ultrasound Med Biol.* 1990;16:801-7.

Enwemeka CS, Rodriguez O, Gall N, Walsh N. Morphometrics of collagen fibril populations in He-Ne laser photostimulated tendons. *J Clin Laser Med Surg.* 1990;47-52.

Enwemeka CS. Membrane-bound intracytoplasmic collagen fibrils in fibroblasts and myofibroblasts of regenerating rabbit calcaneal tendons. *Tissue Cell.* 1991;23:173-90.

Enwemeka CS. Functional loading augments the tensile strength and energy absorption capacity regenerating rabbit Achilles tendons. *Am J Physiol Med Rehabil.* 1992;71:31-8.

Enwemeka CS, Spielholz NI. Modulation of tendon growth and regeneration by electrical fields and currents. In: Currier DP, Nelson RM. *Dynamics of human biologic tissue.* Philadelphia: FA. Davis Company; 1992. p.231-54.

Enwemeka CS, Cohen-Kornberg E, Duswalt EP, et al. Biomechanical effects of three different periods of GaAs laser photostimulation on tenotomized tendons. *Laser Ther.* 1994;6:181-188.

Enwemeka CS, Reddy GK. The biological effects of laser therapy and other modalities on connective tissue repair processes. *Laser Therapy.* 2000;12:22-30.

Enwemeka CS, Parker JC, Dowdy DS, Harkness EE, Sanford LE, Woodruff LD. The efficacy of Low-Power lasers in tissue repair and pain control: A Meta-Analysis Study. *Photomed Laser Surg.* 2004;22(4):323-29.

Fillipin LI, Mauriz JL, Vedovelli K, Moreira AJ, Zettler CG, Lech O, Marroni NP, González-Gallego J. Low-level laser therapy (LLLT) prevents oxidative stress and reduces fibrosis in rat traumatized Achilles tendon. *Lasers Surg Med.* 2005;37:293-300.

Fruensgaard S, Helmig P, Riis J, Stovring JO. Conservative treatment for acute rupture of the Achilles tendon. *Int Orthop.* 1992;16:33-5.

Gibson KF, Kernohan WG. Lasers in Medicine – a review. *J Med Eng Technol.* 1993;17(2):51-7.

Godbout C, Ang O, Frenette J. Early voluntary exercise does not promote healing in a rat model of Achilles tendon injury. *J Appl Physiol.* 2006;101(6):1720-6.

Goldman JA, Chiapella J, Casey H, Bass N, Graham J, McClatchey W, Dronavalli RV, Brown R, Bennett WJ, Miller SB, Wilson CH, Pearson B, Haun C, Persinski L, Huey H, Muckerheide M. Laser therapy of rheumatoid arthritis. *Laser Surg Med.* 1980;1(1):93-101.

Greenough CG. The effect of electromagnetic fields on flexor tendon healing in the rabbit. *J Hand Surg.* 1996;21B:808-12.

Gum SL, Reddy GK, Stheno-Bittel L, Enwemeka CS. Combined Ultrasound, Electrical Stimulation, and Laser promote collagen synthesis with moderate changes in tendon biomechanics. *Am J Phys Med Rehabil.* 1997;76(4):188-96.

Hawkins D, Abrahamse H. Effect of multiple exposures of low-level laser therapy on the cellular responses of wounded human skin fibroblasts. *Photomed Laser Surg.* 2006;24(6):705-14.

Huang TF, Perry SM, Soslowky LJ. The effect of overuse activity on Achilles tendon in an animal model: a biomechanical study. *Ann Biomed Eng.* 2004;32(3):336-41.

Hudlicka O, Tiller KR. *Angiogenesis. The growth of the vascular system.* London Academic Press. 1986; 3.

Jones N, Kjellstrand CM. Spontaneous tendon rupture in patients on chronic dialysis. *Am J Kidney Dis.* 1996;28;861-6.

Khan KM, Cook JL, Bonar F, Harcourt P, Astrom M. Histopathology of common tendinopathies. Updates and implications for clinical management. *Sports Med.* 1999;27(6):393-408.

Kannus PL, Jozsa M, Kvist M, Letho M, Jarvinen M. The effect of immobilization on myotendinous junction: and ultrastructural, histochemical and immunohistochemical study. *Acta Physiol Study* 1992;144:387-394.

Karu T. *The science of low power laser therapy.* Australia: Gordon and Breach Science Publishers; 1998.

Kipshidze N, Nikolaychik V, Keelan MH, Shankar LR, Khanna A, Kornowski R, Leon M, Moses J. Low-power helium: neon laser irradiation enhances production of vascular endothelial growth factor and promotes growth of endothelial cells in vitro. *Lasers Surg Med.* 2001;28(4):355-64.

Kitchen SS, Partridge CJ. A review of low level laser therapy. Part I: background, physiological effects and hazards. *Physiother.* 1991;77(3):161-70.

Klein RG, Eek BC. Low-energy laser treatment and exercise for chronic low back pain: double-blind controlled trial. *Arch Phys Med Rehabil.* 1990;71:34-7.

Kloth L. Wound healing: alternatives in management. USA: Churchill Livingstone; 1997. p. 347-364.

Koeke PU, Parizotto NA, Carrinho PM, Salate ACB. Comparative study of the efficacy of the topical application of hydrocortisone, therapeutic ultrasound and phonophoresis on the tissue repair process in rat tendons. *Ultrasound Med Biol.* 2005;31(3):345-350.

Kolari PJ. Penetration of unfocused laser light into the skin. *Arch Dermatol Res.* 1985;277(4):342-344.

Kolarova H, Ditrichova D, Wagner J. Penetration of the laser light into the skin in vitro. *Laser Surg Med* 1999;24:231-35.

Laakso L, Richardson C, Cramond T. Quality of light – is laser necessary for effective photobiostimulation? *Australian J Physio.* 1993a;39(2):87-92.

Laakso L, Richardson C, Cramond T. Factors affecting low level laser therapy. *Australian J Physio.* 1993b;39(2):95-99.

Lech O, Severo AL, Silva LHP, Marcolan AM, Lutkemeyer E, Kim JH. Efeito do uso do corticóide em tendões previamente traumatizados: estudo experimental. *Rev Bras Ortop.* 1996;31(3):187-92.

Loevschall H, Arenholt-Bindslev D. Effect of low level diode laser irradiation of human oral mucosa fibroblasts in vitro. *Laser Surg Med.* 1994;14:347-54.

Longo L, Evangelista S, Tinacci G, Sesti AG. Effect of diodes-laser silver arsenide-aluminium (Ga-Al-As) 904 nm on healing of experimental wounds. *Lasers Surg Med.* 1987;7(5):444-7.

Longo GJ. Está correta a dosimetria laser em J/cm²?. *Fisio Movimento.* 1993;6(1):33-38.

Low L, Reed A. Eletroterapia explicada: princípios e prática. 3th ed. São Paulo: Manole; 2001.

Lubart R, Wollman Y, Friedmann H, Rochkind S, Laulicht I. Effects of visible and near-infrared lasers on cell cultures. *J Photochem Photobiol B*. 1992;12(3):305-10.

Maffulli N, Ewen SW, Waterston SW, Reaper J, Barrass V. Tenocytes from ruptured and tendinopathic achilles tendons produce greater quantities of type III collagen than tenocytes from normal achilles tendons. An in vitro model of human tendon healing. *Am J Sports Med*. 2000;28(4):499-505.

Matsumoto F, Trudel G, Uthoff HS, Backman DS. Mechanical effects of immobilization on the Achilles tendon. *Arch Phys Med Rehabil*. 2003;84:662- 67.

Marsolais D, Côté CH, Frenette J. Neutrophils and macrophages accumulate sequentially following Achilles tendon injury. *J Orthop Res*. 2001;19(6):1203- 9.

McNeilly CM. Tendon cells in vivo form a three dimension network of cell processes linked by gap junctions. *J Anat*. 1996;189(3):593-600.

Mester AF, Mester A. Wound Healing. *Laser Ther*. 1989;1:7.

Murrel GA, Lilly EG, Goldman RD, Seaber AV, Best TM. Effects of immobilization on Achilles tendon healing in a rat model. *J Orthop Res*. 1994;12:582-91.

Naim F, Simsek A, Sipahioglu S, Esen E, Çakmak G. Evaluation of the surgical results of Achilles tendon ruptures by gait analysis and isokinetic muscle strength measurements. *Acta Orthop Traumatol Turc*. 2005;39(1):1-6.

Nessler JP, Mass DP. Direct - current electrical stimulation of tendon healing in vitro. *Clin Orthop*. 1987;217:303-12.

Ng GY, Fung DT. The combined treatment effects of therapeutic laser and exercise on tendon repair. *Photomed Laser Surg*. 2008;26(2):137-41.

Nissan M, Rochkind S, Razon N, Bartal A. He-Ne laser irradiation delivery transcutaneously: Its effects on the sciatic nerve of the rat. *Laser Surg Med*. 1986;6:435-38.

Oliveira NML, Parizzotto NA, Salvini TF. GaAs (904nm) laser radiation does not affect muscle regeneration in mouse skeletal muscle. *Lasers Surg Med*. 1999;25:13-21.

Oliveira RF, Oliveira DAAP, Monteiro W, Zangaro RA, Magini M, Soares CP. Comparison between the effects of low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasonic irradiation in vitro. *Photomed Laser Surg*. 2008;26(1):6-9.

Oliveira FS, Pinfildi CE, Parizoto NA, Liebano RE, Bossini PS, Garcia EB, Ferreira LM. Effect of low level laser therapy (830 nm) with different therapy regimes on the process of tissue repair in partial lesion calcaneus tendon. *Lasers Surg Med*. 2009;41(4):271-6.

Ohshiro T, Calderhead RG. Development of low reactive-level laser therapy and its present status. *J Clin Laser Med Surg*. 1991;9(4):267-75.

Owoeye I, Spielholz NI, Fetto J, Nelson AJ. Low - intensity pulsed galvanic current and the healing of tenotomized rat Achilles tendons: preliminary report using load-to-breaking measurements. *Arch Phys Med Rehabil*. 1987;68:415-18.

Özkan N, Altan L, Bingöl U, Akin S, Yurtkuran M. Investigation of the supplementary effect of AsGa laser therapy on the rehabilitation of digital flexor tendons. *J Clin Laser Med Surg*. 2004;22(2):105-10.

Parizotto NA, Baranauskas V. Hydrogen bonding of collagen molecule stimulated by He-Ne laser in the regenerating of tendon. In: Proceeding 2nd World Association of Laser Therapy. Kansas City, Missouri, USA. 1998a; 2-5: 64-5.

Parizotto NA, Baranauskas V. Structural analysis of collagen fibrils after HeNe laser photostimulated regenerating rat tendon. In: Proceeding 2nd World Association of Laser Therapy. Kansas City, Missouri, USA. 1998b:66-7.

Pereira AN, Eduardo CP, Matson E, Marques MM. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Laser Surg Med.* 2002;31(4):263-67.

Pinfildi CE, Ferreira LM, Liebano RE, Hochman B, Prado RP. Helium-neon Laser in viability of random skin flap in rats. *Photomed Laser Surg.* 2005;23(1):89-91.

Pinfildi CE, Liebano RE, Hochman BS, Enokihara MM, Lippert R, Gobbato RC, Ferreira LM. Effect of low-level laser therapy on mast cells in viability of the transverse rectus abdominis musculocutaneous flap. *Photomed Laser Surg.* 2009;27(2):337-43.

Ploug T, Onkuwa T, Handberg A. Effects of immobilization on glucose transport and glucose transporter expression in rat skeletal muscle. *Am J Physiol.* 1995;268(5Pt10):E980-6.

Prado RP, Liebano RE, Hochman B, Pinfildi CE, Ferreira LM. Experimental model for low level laser therapy on ischemic random skin flap in rats. *Acta Cir.* 2006;21(4):258-62.

Pugliese LS, Medrado AP, Reis SRA, Andrade ZA. The influence of low-level therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. *Pesqui Ondontol Bras.* 2003;17(4):307-13.

Rantanen J, Hurme T, Kalimo H. Calf muscle atrophy and Achilles tendon healing following experimental tendon division and surgery in rats. Comparison of postoperative immobilization of the muscle-tendon complex in relaxed and tensioned positions. *Scand J Med Sci Sports*. 1999;9(1):57-61

Reddy GK, Gum S, Stehno-Bitel L, Enwemeka CS. Biochemistry and biomechanics of healing tendon: Part II. effects of combined laser therapy and electrical stimulation. *Med Sci Sports Exerc*. 1998;30(6):794-800.

Renno AC, McDonnell PA, Parizotto NA, Laakso EL. The effects of laser irradiation on osteoblast and osteosarcoma cell proliferation and differentiation in vitro. *Photomed Laser Surg*. 2007;25(4):275-80.

Rizzi CF, Mauriz JL, Corrêa DSF, Moreira AJ, Zettler CG, Fillipin LI, Marroni NP, González-Galego. Effects of low-level laser therapy (LLLT) on the nuclear factor (NF)κB signaling Pathway in traumatized muscle. *Lasers Surg Med*. 2006;38:704-13.

Salate ACB, Barbosa G, Gaspar P, Koeke PU, Parizotto NA, Benze BG, Foschiani D. Effect of In-Ga-Al-P diode laser irradiation on angiogenesis in partial ruptures of Achilles tendon in rats. *Photomed Laser Surg*. 2005;23(5):470-5.

Salomão, O. Lesões tendíneas no pé e tornozelo do esportista. *Rev Bras Ortop*. 1993;28(10):731-36.

Schindl A, Schindl M, Schindl L, Jurecka W, Hönigsmann H, Breier F. Increased dermal angiogenesis after low-intensity laser therapy for a chronic radiation ulcer determined by a video measuring system. *J Am Acad Dermatol*. 1999;40(3):481-4.

Schindl A, Schindl M, Pernerstorfer-Schön H, Schindl L. Low-intensity laser therapy: a review. *J Investig Med*. 2000;48(5):312-26.

See EKN, Ng GYF, Ng COY, Fung DTC. Running exercises improve the strength of a partially ruptured Achilles tendon. *Br. J. Sports Med.* 2004;38;597-600.

Schmitt I, Raiser AG, Graça, DL, Castagna CD, Gehver C, Maiorka P. The effects of lasertherapy AsGa on canine tendon healing. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 1993;30(2):145-9.

Skinner SM, Gage JP, Wilce PA, Shaw RM. A preliminary study of the effects of laser radiation on collagen metabolism in cell culture. *Aust Dent J.* 1996;41(3):188-92.

Soma CA, Mandelbaum BR. Repair of acute Achilles tendon ruptures. *Orthop Clin North Am.* 1995;26(2):239-47.

Stadler I, Lanzafame RJ, Oskoui P, Zhang RY, Coleman J, Whittaker M. Alteration of skin temperature during low-level laser irradiation at 830 nm in a mouse model. *Photomed Laser Surg.* 2004;22(3):227-31.

Stehno-Bitel L, Reddy GK, Gum S, Enwemeka CS. Biochemistry and biomechanics of healing tendon: Part I. effects of rigid plaster casts and functional casts. *Med Sci Sports Exerc.* 1998;30(6):788-93.

Stolik S, Delgado JA, Perez A, Anasagasti L. Measurement of the penetration depths of red and near infrared light in human "ex vivo" tissues. *J Photochem Photobiol B.* 2000;57(2-3):90-3.

Stolinski C. Disposition of collagen fibrils in human tendons. *J Anat.* 1995;186(3):577-83.

Tavares MR, Mazzer N, Pastorello M. Efeito do laser terapêutico na cicatrização tendinosa: estudo experimental em ratos. *Fisio Bras.* 2005; 6(2):96-100.

Tumilty S, Munn J, Abbott JH, McDonough S, Hurley DA, Baxter D. Laser therapy in the treatment of Achilles tendinopathy: A Pilot Study. *Photomed Laser Surg.* 2008;26(1):25-30.

Tuner J, Hode L. Low level laser therapy. Clinical practice and scientific background. Sweden: Prima Books;1999.

Van Breugel HH, Bär PR. Power density and exposure time of He-Ne laser irradiation are more important than total energy dose in photo-biomodulation of human fibroblasts in vitro. *Lasers Surg Med.* 1992;12(5):528-37.

Vidal BC. Evaluation of the carbohydrate role in the molecular order of collagen bundles: microphotometric measurements of textural birefringence. *Cell Molec Biol.* 1986;32(5):527-35.

Vidal BC. Image analysis of tendon helical superstructure using interference and polarized light microscopy. *Micron.* 2003;34(8):423-432.

Vinck EM, Cagnie BJ, Cornelissen MJ, Declercq HA, Cambier DC. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. *Lasers Med Sci.* 2003;18(2):95-9.

Webb C, Dyson M, Lewis WHP. Stimulatory effect of 660 nm low level laser energy on hypertrophic scar-derived fibroblasts: Possible mechanisms for increase in cell counts. *Laser Surg Med.* 1998;22(5):294-301.

Wren TAL, Yerby AS, Beaupre GS, Carter DR. Mechanical properties of human Aquiles tendon. *Clin Biomech.* 2001;16:245-51.

Young S, Bolton P, Dyson M, Harvey W, Diamantopoulos C. Macrophage responsiveness to light therapy. *Laser Surg Med.* 1989;9(5):497-505.

Zhang F, Liu H, Stile F, Lei MP, Pang Y, Oswald TM, Beck J, Dorsett-Martin W, Lineaweaver WC. Effect of vascular endothelial growth factor on rat Achilles tendon healing. *Plastic Reconstruct Surg.* 2003;112(6):1613-19.

NORMAS ADOTADAS

NORMAS ADOTADAS

ICMJE – International Committee of Medical Journals Editors. Uniform Requerimentas for manuscripts submitted to biomedical journal. Disponível em: <http://www.icmje.org> .

C.O.B.E.A – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – Princípios éticos da experimentação animal. Disponível em: <http://www.meusite.com.br/cobea/index.htm> .

Terminologia Anatômica. Terminologia anatômica Internacional. São Paulo: Ed. Manole Ltda; 2001.248p.

Consulta ao DeCS – Descritores em Ciências da Saúde. Disponível em: <http://www.bireme.br> .

International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature – Nomina anatômica veterinária. 3.ed. New York, Ithaca. 1983.216p.

Goldenberg S. Orientação normativa para Elaboração e Difusão de Trabalhos Cinetíficos. São Paulo:2001. Disponível em: <http://www.metodologia.org> .

Ferreira LM, Goldenberg S, Nahas FX, Barbosa MVJ, Ely PB. Orientação Normativa para Elaboração e Apresentação de Teses. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica Reparadora UNIFESP-EPM. 2006.61p.

ABSTRACT

ABSTRACT

Introduction: Calcaneous tendon is one of the most damaged tendons, and its healing may last from weeks to months to be completed. In the search after speeding tendon repair, low intensity laser therapy has shown favorable effect. **Objective:** To assess the effect of 40, 60, 80 and 100mW powers of low level laser on the process of tissue repair in partial lesion calcaneous tendon in rats. **Methods:** The was used 830-nm GaAlAs diode laser operating at output powers of 40, 60, 80 and 100 mW and energy density of 30 J/cm² on the repair of partial calcaneal tendon ruptures in rats. A partial tendon rupture was induced in all animals, which were treated with laser irradiation for 5 consecutive days. Six days after injury, the injured tendons were removed and examined by polarized light microscopy. **Results:** Collagen fiber organization was evaluated by birefringence measurements, and collagen content was determined by picosirius red staining. It was observed that the higher the output power (60-100 mW) the greater was the amount of type III collagen ($P < 0.01$). The amount of type I collagen was significantly greater ($P = 0.05$) in the 80-mW group than in the control group (sham stimulation). A non-statistically significant improvement in the realignment of collagen fibers was observed in the irradiated groups. **Conclusion:** Low-level laser therapy resulted in significantly greater amounts of type III collagen (output powers of 60 mW or more) and type I collagen (output power of 80 mW), however no significant differences between groups were found in the realignment of collagen fibers.

APÊNDICE

APÊNDICE

APÊNDICE 1 – Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 1 de novembro de 2007
CEP 1254/07

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) MARCO AJRÉLIO INVALDI NEVES
Co-Investigadores: Carlos Eduardo Pinfildí, Nivaldo Antonio Parizzotto, Lyda Massako Ferreira e Bernardo Hochman
(Orientador)
Disciplina/Departamento: Cirurgia Plástica/Cirurgia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo
Patrocinador: Recursos Próprios.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: "Densidade de potência e comprimento de onda no reparo do tendão calcâneo submetidos a lesão parcial, em ratos".

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: EXPERIMENTAL - CATEGORIA B - CRÔNICO.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: NÃO SE APLICA.

OBJETIVOS: Avaliar o efeito da densidade de potência do laser de baixa intensidade no reparo de lesão parcial do tendão calcâneo em ratos..

RESUMO: Serão utilizados 50 animais distribuídos aleatoriamente em 5 grupos com 10 animais cada. Os animais serão provenientes do CEDENE da UNIFESP e serão mantidos e manipulados no Biotério da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP. Os animais serão submetidos à lesão do tendão calcâneo direito, por meio de lesão direta. Os seguintes grupos serão constituídos: GRUPO 1: controle; GRUPO 2: (laser 685nm) e GRUPO 3: (LASER 830NM). Os animais dos grupos experimentais serão submetidos ao tratamento com laser após 2 minutos da lesão e nos 4 dias consecutivos. Para o procedimento da lesão, os animais serão anestesiados com injeção IP de cloridrato de tiletamina e zolazepan. Será então realizada uma leve tração na região calcanear direita e um peso de 186g será solto de uma altura de 20cm sobre o tendão do animal. Um minuto após esse procedimento, o peso será retirado e o local da lesão será demarcado com caneta dermatográfica para a posterior aplicação com laser..

FUNDAMENTOS E RACIONAL: Estudo fundamentado, visto que a prática esportiva tem aumentado muito a incidência de ruptura do tendão do calcâneo..

MATERIAL E MÉTODO: Materiais e métodos adequadamente descritos.

DETALHAMENTO FINANCEIRO: PROJETO SEM FINANCIAMENTO ESPECÍFICO.

CRONOGRAMA: 12 meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: Mestrado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: 31/10/2008 e 31/10/2009.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo ANALISOU e APROVOU o projeto de pesquisa referenciado.





Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Omar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

C37.124/17

APÊNDICE 2 - Imagem correspondente a caixa (K7) onde foram colocados os tendões do calcâneo de cada animal.



APÊNDICE 3 - Medidas descritivas do retardo óptico correspondente ao alinhamento das fibras de colágeno.

Tabela 4- Medidas descritivas do retardo óptico correspondente ao alinhamento das fibras de colágeno.

Grupo	Média	DP	Min	Max
G1(Sham)	52,10	11,97	33,60	78,41
G2(40mW)	59,42	8,64	41,60	72,90
G3(60mW)	61,82	13,18	43,25	87,50
G4(80mW)	61,59	7,01	54,94	77,35
G5(100mW)	63,52	5,80	55,20	71,70

APÊNDICE 4 - Medidas descritivas da análise de picosirius correspondente ao colágeno tipo III

Tabela 5 - Medidas descritivas da análise de picosirius red correspondente ao colágeno tipo III

Grupo	Média	DP	Min	Max
G1(Sham)	31,96	12,10	18,18	48,28
G2(40mW)	48,02	15,40	32,22	69,51
G3(60mW)	55,85	12,58	35,90	72,69
G4(80mW)	60,90	9,24	46,27	70,13
G5(100mW)	61,55	9,57	44,50	77,62

APÊNDICE 5 - Medidas descritivas da análise de picosirius correspondente ao colágeno tipo I

Tabela 6 - Medidas descritivas da análise de picosirius correspondente ao colágeno tipo I

Grupo	Média	DP	Min	Max
G1(sham)	2,60	1,79	0,61	5,88
G2(40mW)	9,12	5,41	4,18	19,22
G3(60mW)	9,01	5,36	4,10	19,54
G4(80mW)	15,40	6,11	6,79	25,01
G5(100mW)	6,50	4,96	1,67	13,41

FONTES CONSULTADAS

FONTES CONSULTADAS

HOUAISS A. Dicionário eletrônico Houaiss da língua portuguesa. Versão 1.0.5a: Objetiva; 2002.

INMETRO. Sistema Internacional de Unidades – SI. 8ª ed. Rio de Janeiro, 2003.

MICHAELIS A. Dicionário inglês-português. 25ª ed. São Paulo: Melhoramentos; 1997.