

VIVIANE TIMM WOOD

**ULTRA-SOM E *LASER* DE BAIXA INTENSIDADE
NO REPARO DE LESÃO PARCIAL DO TENDÃO
CALCÂNEO EM RATOS.**

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

São Paulo

2009

VIVIANE TIMM WOOD

**ULTRA-SOM E *LASER* DE BAIXA INTENSIDADE
NO REPARO DE LESÃO PARCIAL DO TENDÃO
CALCÂNEO 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. Dr. NIVALDO A. PARIZOTTO

São Paulo

2009

Wood, Viviane Timm.

Ultra-som e Laser de baixa intensidade no reparo de lesão parcial do tendão calcâneo em ratos./ Viviane Timm Wood. — São Paulo, 2009.

xxii, 90f.

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

Título em inglês: Ultrasound and low-level laser therapy on repair of calcaneus tendon partial lesion in rats.

1. Ultra-som. 2. Terapia laser de baixa intensidade. 3. Tendão do calcâneo. 4. Birrefringência. 5. Colágeno.

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

COORDENAÇÃO: Prof. Dr. MIGUEL SABINO NETO
Profa. Dra. LYDIA MASAKO FERREIRA

DEDICATÓRIA

Dedicar é oferecer com afeto, é reconhecer que não se faz nada sozinho. É agradecer o apoio, o incentivo, a ajuda e o conselho sempre constantes e completamente necessários.

A todos que serão citados nas próximas páginas, dedico este trabalho com muito carinho.

À Deus

Te agradeço:

pela coragem de facear as dificuldades criadas por mim

mesma,

pelas provas que me aperfeiçoam o raciocínio e me

abrandam o coração;

pela fé na imortalidade;

pelo privilégio de servir;

pelo dom de saber que sou responsável pelas minhas

próprias ações;

pelo reconforto de reconhecer que a minha felicidade

tem o tamanho da felicidade que faço para os outros;

pelo discernimento que me permite diferenciar aquilo que

me é útil daquilo que não me serve;

pelo amparo da afeição no qual minha vida se alimenta

em permuta constante;

pela bênção da oração que me faculta apoio interior

para a solução de meus problemas

pela tranqüilidade de consciência que ninguém me pode

subtrair...

Por tudo isso, e por todos os demais tesouros de

esperança e amor, alegria e paz de que me enriqueces a

existência sê bendito, Senhor.

(autor desconhecido)

Do meu apoio e minha força,

ao meu amor,

meu noivo Hoff

“... a vida é mesmo

Coisa muito frágil

Uma bobagem

Uma irrelevância

Diante da eternidade

Do amor de quem se ama...”

(Por onde andei – Nando Reis)

Aos meus exemplos de vida,
pessoas que me instigaram a
procurar o melhor, me
incentivaram e fizeram de mim
o que sou hoje, aos melhores:

aos meus Pais e a minha
Irmã, sempre participativos

“Para estar junto não é preciso estar
perto, e sim do lado de dentro.”

(Leonardo da Vinci)

Camila, boa caminhada para ti
também.

*Minha família: minha Dindinha, a
melhor do mundo; ao meu dindo,
meus tios e tias, primos e primas,
avôs e avós.*

*A minha família escolhida: sogra,
cunhadas, e Vô Lilia; Tia
Marina, Tio Fábio, Daniel,
Melina e Vinícius*

*“... os melhores amigos
São aqueles que estão
Em casa esperando por ti
Acreditam nos momentos mais difíceis da vida
Eles sempre estarão por perto
Pois só sabem te amar...”*

(Tua Família – Anjos de Resgate)

*As minhas queridas colegas de
residência, maravilhosas Amigas,
torcedoras de nossos sucessos, irmãs
escolhidas, só tenho a dizer:*

“... Valeu a pena

Êh Êh

Valeu a pena

Êh Êh...”

(Pescador de ilusões – O Rappa)

*Os grandes amigos que fiz
durante esta e outras tantas
jornadas. Os mestres que me
estimularam, colegas que me
acolheram, amigos que me
ajudaram de tantas formas.
Pessoas especiais que estão
guardadas no coração.*

*“...Foi pouco tempo
mas valeu
vivi cada segundo
quero o tempo que passou...”*

(Os Segundos – Cidadão Quem)

AGRADECIMENTOS

PROF^a. DR^a **LYDIA MASAKO FERREIRA**, TITULAR DA DISCIPLINA DE CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO (UNIFESP) E CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIRURGIA, uma visionária, por sua incrível capacidade de estimular, instigar, ensinar, liderar...

PROF. DR. **MIGUEL SABINO NETO**, LIVRE DOCENTE, PROFESSOR ADJUNTO DA DISCIPLINA DE CIRURGIA PLÁSTICA E COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO (UNIFESP), pela oportunidade de fazer parte deste programa de Pós-Graduação.

PROF. **BERNARDO HOCHMAN**, PROFESSOR AFILIADO DA DISCIPLINA DE CIRURGIA PLÁSTICA E ORIENTADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO (UNIFESP), pelo apoio e dedicação intensa a ciência, pelo companheirismo, amizade, ensinamentos de vida... E A SUA ESPOSA **SILVIA REGINA PINTO**, por dividir seu marido com a ciência e com os alunos, sempre receptiva, com um sorriso no rosto, e disposta a ajudar.

PROF. **CARLOS EDUARDO PINFILDI**, PROFESSOR DA PÓS GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA DA UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA (UNIMEP) E CO-ORIENTADOR DO PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO (UNIFESP), muito mais

que um co-orientador, um mestre, um amigo, um exemplo. Obrigada por me mostrar o caminho.

PROF. HEITOR FRANCISCO CARVALHO GOMES, PROFESSOR AFILIADO DA DISCIPLINA DE CIRURGIA PLÁSTICA E CO-ORIENTADOR DO PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO (UNIFESP), pela alegria, pela parceria, pelos ensinamentos.

DEMAIS DOCENTES DA DISCIPLINA DE CIRURGIA PLÁSTICA E DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO (UNIFESP), pelos questionamentos que aprimoraram e engrandeceram este trabalho.

AOS FISIOTERAPEUTAS MAIRA SILVA DA COSTA, MARCO AURÉLIO INVALIDI NEVES, PASCALE MUTTI TACANI, RAFAEL CORRÊA GOBBATO E TIAGO SANTOS SILVEIRA, AMIGOS E COLEGAS DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO (UNIFESP), pela experiência somada, pelos momentos de descontração, pela parceria no laboratório, pela grande amizade, por tudo.

DEMAIS COLEGAS PÓS-GRADUANDOS DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO (UNIFESP), pelas dicas, críticas, comentários, exemplos...

A SILVANA DE ASSIS, MARTA DOS REIS E SANDRA DA SILVA, SECRETÁRIAS DA DISCIPLINA DE CIRURGIA PLÁSTICA E DO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO (UNIFESP), por facilitar nosso caminho.

A **CLAUDETE SILVA**, ASSISTENTE ADMINISTRATIVA, **ELENA DA SILVA**, TÉCNICA EM ENFERMAGEM E **CLARISSE PEREIRA**, AUXILIAR DE ENFERMAGEM; INTEGRANTES DA CASA DE CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO (UNIFESP), por todo auxílio e paciência.

AO **TONINHO**, BIOTERISTA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO (UNIFESP), pela dedicação e respeito aos animais.

PROF^a. **ÂNGELA TAVARES PAES**, PROFESSORA DO CURSO DE ANÁLISE ESTATÍSTICA, DO SETOR DE ESTATÍSTICA APLICADA, DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO (UNIFESP), pelos ensinamentos.

PROF. **NIVALDO ANTÔNIO PARIZOTTO**, PROFESSOR TITULAR DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS (UFSCAR), DEPARTAMENTO DE FISIOTERAPIA, pela parceria com este programa de pós-graduação que engrandece nosso conhecimento.

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), pela troca de conhecimentos, pelo auxílio durante este jornada.

PROF. **OSCAR PEITL FILHO**, PROFESSOR TITULAR DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS (UFSCAR), DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE MATERIAS, por abrir as portas de seu laboratório, pelas explicações e acessibilidade.

PROF. **GUILHERME PARENTE SOUZA**, PÓS-DOCTORANDO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E ENGENHARIA DE MATERIAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS (UFSCAR), pelas explicações, por facilitar o entendimento de todo o processo de análise...

DEMAIS **FUNCIONÁRIOS** DO LABORATÓRIO DE MATERIAIS VITREOS, DO DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS, DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS (UFSCAR), pela receptividade.

A **CAMILA TIMM WOOD**, BIOLOGA ALUNA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *ERASMUS MUNUS MASTER COURSE – EUROPEAN MASTER IN APPLIED ECOLOGY, DA UNIVERSITÉ DE POITIERS*, minha querida irmã, pelo auxílio na correção da tradução deste trabalho.

A **CAMILA RONDON DO PRADO GUIMARÃES**, FISIOTERAPEUTA ALUNA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE CIÊNCIAS EM CINÉSILOGIA, DA *CALIFORNIA STATE UNIVERSITY FULLERTON*, pela grande amizade e disposição na correção da tradução deste trabalho.

*“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao tamanho original”*

(Albert Einstein)

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	iv
AGRADECIMENTOS.....	xi
EPÍGRAFE.....	xv
LISTA DE FIGURAS.....	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xix
RESUMO.....	xxii
1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVO.....	05
3. LITERATURA.....	07
4. MÉTODOS.....	22
5. RESULTADOS.....	35
6. DISCUSSÃO.....	45
7. CONCLUSÃO.....	64
8. REFERÊNCIAS.....	66
NORMAS ADOTADAS.....	75
ABSTRACT.....	78
APÊNDICES.....	80
ANEXOS.....	84
FONTES CONSULTADAS.....	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. (A) Equipamento lesionador desenvolvido pela oficina mecânica da UFSCar. (B) Posicionamento do animal para realização do procedimento de lesão. (C) Pata do animal levemente tracionada em dorsiflexão, com o dorso da pata em contato com a base do lesionador.....	25
Figura 2. Equipamento de ultra-som.....	26
Figura 3. Equipamento de <i>laser</i>	27
Figura 4. Técnica de aplicação utilizada para o tratamento com ultra-som.....	28
Figura 5. Técnica de aplicação utilizada para o tratamento com <i>laser</i>	29
Figura 6. Distribuição dos valores dos grupos referentes ao alinhamento das fibras de colágeno.....	37
Figura 7. Alinhamento das fibras de colágeno do Grupo 1 (controle), média de retardo óptico de $33,5 \pm 2,7$ nm.....	38
Figura 8. Alinhamento das fibras de colágeno do Grupo 2 (US), média de retardo óptico de $42,2 \pm 7,1$ nm.....	38
Figura 9. Alinhamento das fibras de colágeno do Grupo 3 (Laser), média de retardo óptico de $44,0 \pm 12,3$ nm.....	38
Figura 10. Alinhamento das fibras de colágeno do Grupo 4 (US+Laser), média de retardo óptico de $40,4 \pm 6,4$ nm.....	39
Figura 11. Alinhamento das fibras de colágeno do Grupo 5 (Laser+US), média de retardo óptico de $42,7 \pm 8,3$ nm.....	39
Figura 12. Distribuição dos valores dos grupos referentes à porcentagem de colágeno tipo I.....	41
Figura 13. Distribuição dos grupos referentes à porcentagem de colágeno tipo III.....	42

Figura 14. Análise de picrosirius do Grupo 1 (controle), com predominância de polarização em verde (indicativa de colágeno tipo III).....	42
Figura 15. Análise de picrosirius do Grupo 2 (US), com predominância de polarização em amarelo (indicativa de colágeno tipo I).....	43
Figura 16. Análise de picrosirius do Grupo 3 (Laser), com predominância de polarização em amarelo (indicativa de colágeno tipo I).....	43
Figura 17. Análise de picrosirius do Grupo 4 (US+Laser), com polarização em vermelho e verde (indicativa de colágeno tipo I e III).....	44
Figura 18. Análise de picrosirius do Grupo 5 (Laser+US), com predominância de polarização em amarelo (indicativa de colágeno tipo I).....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACLAM	= <i>American College of Laboratory Animal Medicine</i>
ANOVA	= análise de variância
As-Ga-Al	= arseneto de gálio e alumínio
ATP	= adenosina trifosfato
BNR	= <i>beam non-uniformity ratio</i>
Ca ²⁺	= cálcio
°C	= graus Celsius
CEDEME	= Biotério Central do Centro de Desenvolvimento
CEP	= Comitê de Ética em Pesquisa
cm	= centímetro
cm ²	= centímetro ao quadrado
cm/s	= centímetro por segundo
COBEA	= Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DE	= densidade de energia
DNA	= <i>DeoxyriboNucleic Acid</i>
DP	= densidade de potência
ERA	= <i>effective radiation area</i>
<i>et al.</i>	= e colaboradores
F	= frequência
G	= grupo
g	= gramas
He-Ne	= hélio-neônio
H ₂ O	= água
Hz	= Hertz
J	= Joule
J/cm ²	= joule por centímetro ao quadrado
Kg	= quilograma

<i>Laser</i>	= <i>light amplification of stimulated emissions of radiation</i> (amplificação da luz por emissão estimulada de radiação)
LBI	= <i>laser</i> de baixa intensidade
mg/Kg	= miligrama por quilograma de massa corporal
mg	= miligrama
MHz	= mega Hertz
mJ	= miliJoule
ml	= mililitro
mm	= milímetro
m/min	= metros por minuto
mW	= miliWatts
mW/cm ²	= miliWatts por centímetro ao quadrado
n°	= número da amostra
nm	= nanômetro
NS	= não significante
OR	= retardo óptico
P	= potência
PCNA	= <i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PO	= pós operatório
RNA	= <i>ribonucleic acid</i>
SATA	= <i>spatial averege, temporal average</i>
SATP	= <i>spatial averege, temporal peak</i>
TGFβ	= <i>transforming growth factor beta</i>
UFSCar	= Universidade Federal de São Carlos
UNIFESP	= Universidade Federal de São Paulo
US	= Ultra-som
W/cm ²	= Watts por centímetro ao quadrado
<	= menor

>	= maior
*	= significante
λ	= comprimento de onda
α	= alfa
μm	= micrômetro
μm^2	= micrômetro ao quadrado
%	= porcentagem
°	= graus

RESUMO

Introdução: O tratamento das lesões de tendão calcâneo requer longos períodos de reabilitação. O ultra-som (US) e o *laser* são os recursos mais utilizados e estudados para tratar estas lesões; porém, é escasso o estudo da utilização desses agentes de forma combinada. **Objetivo:** Avaliar o ultra-som e o *laser* de baixa intensidade, no reparo de lesão parcial do tendão calcâneo em ratos. **Métodos:** Os 50 ratos machos Wistar tiveram seus tendões calcâneos parcialmente lesionados por um trauma direto e foram distribuídos aleatoriamente em 5 grupos: Grupo 1-Controle, 2-US, 3-*laser*, 4-US+ *laser* e 5- *laser* +US. Foram tratados por 5 dias consecutivos e no 6º dia pós lesão os tendões foram removidos e avaliados quanto ao alinhamento das fibras (birrefringência) e quantidade de colágeno tipo I e III (picosirius). **Resultados:** o grupo US apresentou melhor alinhamento das fibras de colágenos que o grupo controle ($p=0,03$). Os grupos US, *laser* e *laser* +US apresentaram maior quantidade de colágeno tipo I que o controle ($p<0,01$, $p=0,01$ e $p<0,01$ respectivamente). Não houve diferença entre os grupos tratamento entre si para nenhuma das avaliações. A avaliação para colágenos tipo III não apresentou diferença para nenhum dos grupos. **Conclusão:** O ultra-som terapêutico e a terapia *laser* de baixa intensidade foram eficazes no processo de reparo de lesão parcial do tendão calcâneo em ratos. O ultra-som promoveu maior alinhamento das fibras de colágeno. O ultra-som, o *laser*, e a combinação *laser*+ultra-som aumentaram a quantidade de colágeno tipo I na região da lesão.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O tendão calcâneo é um dos mais lesionados em humanos e acredita-se que sua cicatrização primária ocorra em torno de seis semanas (GUM *et al.*, 1997; SALATE *et al.*, 2005; RILEY, 2008). Sua ruptura, diferentemente dos demais tendões, geralmente ocorre entre dois a seis centímetros de sua inserção calcanear (ZANTOP, TILLMANN, PETERSEN, 2003). Este fato pode ser explicado pela submissão deste tendão a estresses repetitivos, além do baixo suprimento sanguíneo dessa região (ZANTOP, TILLMANN, PETERSEN, 2003; RILEY, 2008).

Em consequência, um longo período de reabilitação se faz necessário (cerca de seis meses), sendo frequente o uso de imobilizadores por quatro a seis semanas, o que pode levar a diversas complicações como aderências, hipotrofia muscular, infecções, necrose de pele, osteoartrites e tromboflebitas (ENWEMEKA, 1989; GUM *et al.*, 1997; CUNHA, PARIZOTTO, VIDAL, 2001; DEMIR *et al.* 2004).

Nos casos de ruptura espontânea, estudos sugerem a existência de uma degeneração prévia com mudanças na celularidade da região, demonstrando um aumento do colágeno tipo III (fino), redução do colágeno tipo I (espesso) e redução da organização da matriz extracelular, com alterações no grau de agregação molecular das fibras de colágeno (DAVIDSSON & SALO, 1969; COOMBS *et al.*, 1980; MAFFULLI *et al.*, 2000).

Alguns recursos físicos, incluindo tratamento com ultra-som (ENWEMEKA, 1989; CUNHA, PARIZOTTO, VIDAL, 2001; YEUNG,

GUO, NG, 2006; NG & FUNG, 2007), estimulação elétrica (NESSLER & MASS, 1987), campos eletromagnéticos (OWOEYE *et al.*, 1987; GREENOUGH, 1996) e terapia a *laser* de baixa intensidade (SCHMITT *et al.*, 1993; ÖZKAN *et al.*, 2004; BOSSINI *et al.*, 2009; PINFILDI *et al.*, 2009) podem acelerar o reparo da lesão. Deste modo o tempo de cicatrização pode ser reduzido, minimizando os efeitos deletérios da imobilização.

O tratamento com ultra-som (US) tem demonstrado efeitos benéficos na redução do edema, melhora do metabolismo celular e da força tênsil do tendão. Também apresenta aumento na síntese de colágeno tipos I e III e melhora no alinhamento e no grau de agregação desta fibras, acelerando o processo do reparo tendíneo (ENWEMEKA, 1989; CUNHA, PARIZOTTO, VIDAL, 2001; KOEKE *et al.*, 2005; NG & FUNG, 2007).

Os efeitos do *laser* foram avaliados em uma revisão sistemática que apresentou resultados positivos, como aumento da proliferação de fibroblastos, formação de colágeno e degranulação de mastócitos, assim como aumento da força tênsil e redução da dor (ENWEMEKA *et al.*, 2004). Estudos recentes tem demonstrado também efeitos importantes como o aumento da angiogênese (SALATE *et al.*, 2005), alinhamento das fibras de colágeno (ARRUDA *et al.*, 2007; CARRINHO & PARIZOTTO, 2006), prevenção do estresse oxidativo e redução de fibrose (FILLIPIN *et al.*, 2005), melhora da viabilidade cutânea e do reparo de tendões (PINFILDI *et al.*, 2005; BOSSINI *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Estes dois recursos físicos, o ultra-som e o *laser* de baixa intensidade (LBI), têm sido frequentemente empregados por fisioterapeutas. Entretanto, apenas dois estudos foram encontrados combinando estes agentes físicos com objetivo de associar ambos no tratamento de lesão do

tendão calcâneo e seus resultados foram controversos. DEMIR *et al.* (2004) mostraram que não houve vantagens na combinação destas terapias, sendo que todos os grupos tratados com US e *laser*, empregados de forma individual ou combinada, apresentaram melhora significativa. Em contra partida, GUM *et al.* (1997) não observaram melhora nas características bioquímicas do tecido tendíneo na combinação de tratamento, sugerindo um efeito concorrente destes aparelhos quando utilizados em conjunto.

Atualmente, não há um consenso sobre qual seria o tratamento padrão ouro para as lesões tendíneas. A diversidade de tipos de estudos e métodos, a não uniformidade dos parâmetros utilizados (CUNHA, PARIZOTTO, VIDAL, 2001; ENWEMEKA *et al.*, 2004) e os resultados controversos (BASFOR, 1989; ENWEMEKA *et al.*, 2004), tanto para o ultra-som como para o *laser* de baixa intensidade, geram dificuldades para se comparar os resultados dos estudos, assim como para determinar o melhor tipo de tratamento ou combinação de tratamentos, ou a dose mais eficaz dos recursos empregados.

Este embate motivou a realização deste estudo, na busca de esclarecimentos sobre qual a melhor opção, a utilização individual ou combinada de equipamentos, no tratamento das primeiras fases de cicatrização das lesões tendíneas.

OBJETIVO

2. OBJETIVO

Avaliar o efeito do Ultra-som e do *Laser* de baixa intensidade, no reparo de lesão parcial do tendão calcâneo em ratos.

LITERATURA

3. LITERATURA

ENWEMEKA (1989) estudou os efeitos do ultra-som (US) na cicatrização tendínea em coelhos, buscando avaliar a força tênsil e capacidade de absorção de energia. Vinte e seis coelhos foram submetidos a tenotomia total com sutura e a pata dos animais foi imobilizada. Doze animais receberam tratamento com US de 1MHz, ERA (*effective radiation area*) 5cm², modo contínuo, intensidade SATA (*spatial average, temporal average*) de 1W/cm², com aplicação subaquática, por 5 min, diariamente. Os demais animais receberam tratamento simulado de US. Todos os animais tiveram seus tendões removidos do 10°PO e posteriormente analisados.

O autor observou que os tendões submetidos a tenotomia apresentavam-se mais largos que os tendões íntegros da pata contralateral. O grupo tratado com US apresentou maior força tênsil ($p < 0,025$) e maior capacidade de absorção de energia ($p < 0,001$) na comparação com o controle. Os achados deste estudo sugerem que tendões calcâneos reparados cirurgicamente podem ter sua cicatrização acelerada com o uso de US, nas fases iniciais de reparo.

SCHMITT *et al.* (1993) estudaram os efeitos do *laser* de arseneto de gálio (As-Ga) sobre a regeneração de tendões em 30 cães distribuídos em 3 grupos e submetidos à tenotomia e tenorrafia do tendão calcâneo direito e esquerdo, no terço médio do tendão, sendo que no membro esquerdo foi

efetuada a aplicação de *laser* As-Ga ($4\text{J}/\text{cm}^2$) para avaliar o processo cicatricial dos mesmos.

Os animais foram mantidos com as patas imobilizadas durante 11 dias nos animais do grupo I (sacrificados nesta data), 21 dias no grupo II (sacrificados ao 22º dia) e grupo III (sacrificados ao 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. Foi realizada avaliação funcional por meio de exame físico, além de observação da celularidade a vascularização da região.

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

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, $1\text{J}/\text{cm}^2$ e ultrassom (US). O tendão calcâneo de 63 coelhos foi submetido a tenotomia, tenorráfia e imobilização 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 5 dias. Os tendões reparados do grupo experimental receberam sobrecarga mecânica via estimulação elétrica pela indução da contração do músculo tríceps sural por 5 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, porém sem diferença significativa nos índices 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 “laserterapia de baixa intensidade” nas bases de dados da Medline, Embase, Cochrane Library, além de pesquisa manual nos jornais de fisioterapia na língua Inglesa e Escandinava. Foram sintetizados parâmetros ideais de tratamento como estimativa de tempo, frequência de tratamento, densidade de energia e densidade de potência.

O autor constatou que os intervalos 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 5 dias de irradiação. Já para a síntese de fibras colágenas, os intervalos 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 2 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 a predominância do tipo de colágeno no tendão calcâneo em humanos, estudo *in vitro* dos tendões com ruptura, com tendinopatia, tendões fetais e tendões sem lesão. Foram utilizados 22 tendões de pessoas com ruptura do tendão calcâneo, 7 tendões íntegros de pessoas que tiveram seu membro amputado, 12 tendões com tendinopatia e 4 tendões de fetos abortados. A cultura de célula foi realizada em triplicata e os tendões avaliados também após a realização de uma lesão na cultura.

Como resultados, os tendões normais apresentaram maior quantidade de colágeno tipo I e menos colágeno tipo III que os tendões rompidos e com tendinopatia. Após a realização da lesão em cultura todos os tendões apresentaram maior quantidade de colágeno tipo III. Os autores concluíram que tendões normais e com tendinopatia tem um aumento do colágeno tipo III quando sofrem lesão. Tendões com tendinopatia e/ou ruptura apresentam maior quantidade de colágeno tipo III que tendões normais e fetais.

CUNHA, PARIZOTTO, VIDAL (2001) avaliaram os efeitos do US pulsado e contínuo na cicatrização tendínea de 60 ratos, distribuídos em 4 grupos. Os animais do G1 não foram submetidos a lesão nem a tratamento, os do G2, G3 e G4 foram submetidos aos procedimento de lesão por tenotomia total, sem sutura. Os animais do G3 e G4 foram tratados com US de 1MHz, intensidade SATA de $0,5\text{W}/\text{cm}^2$, ERA de $0,5\text{cm}^2$ sendo o G3 contínuo e G4 pulsado a 20%.

Os animais foram mortos no 15°PO e os tendões foram analisados por birrefringência para avaliação do alinhamento das fibras de colágeno. Na comparação entre os grupos observou-se diferenças significantes entre os grupos tratados e o grupo controle lesão. Como conclusão: o US pulsado melhora o grau de agregação das fibras de colágeno nos primeiros 14 dias de tratamento das lesões tendíneas em ratos, sendo melhor alternativa de tratamento ao modo contínuo.

NG *et al.* (2003) avaliaram o US terapêutico na performance

biomecânica e funcional de ratos com lesão parcial do tendão calcâneo. Foram utilizados 30 ratos, distribuídos em 3 grupos, sendo G1 controle, G2 US com intensidade SATA de $2\text{W}/\text{cm}^2$ e G3 US com SATA de $1\text{W}/\text{cm}^2$. Todos os animais foram submetidos a tenotomia parcial e o US utilizado foi de 1MHz, contínuo, com ERA de $0,5\text{cm}^2$, com aplicação subaquática. O início do tratamento se deu no 5º PO, sendo realizadas 22 sessões não consecutivas.

Os animais foram avaliados de forma funcional por exame físico no 3º, 10º e 30º PO e quanto à força tênsil. Na avaliação funcional não houve diferença entre os 3 grupos. Na avaliação da força tênsil, o grupo US em ambas as doses apresentou melhores resultados que o controle, com $p=0,05$. Os autores concluíram que o US pode aumentar a força tênsil dos tendões submetidos a tenotomia parcial, indicando melhora na cicatrização.

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 distribuídos em 6 grupos: Grupo I tratamento com US (contínuo, intensidade de $0,5\text{W}/\text{cm}^2$, frequência de 1MHz, 5 min), Grupo II controle do US, Grupo III tratamento com *laser* (As-Ga, λ 904nm, potência média de 6mW, densidade de energia de $1\text{J}/\text{cm}^2$), Grupo IV controle do *laser*, Grupo V tratamento combinado (*laser* + US) e Grupo VI controle combinado (*laser* + US).

O tendão calcâneo esquerdo foi usado como controle e o direito para tratamento; os dois tendões foram lesados longitudinalmente. O tratamento começou no primeiro dia PO e durou nove dias (sessões). Embora o *laser*,

o US 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.

NG, NG, SEE (2004) com o objetivo de avaliar o efeito da corrida, natação e diferentes doses de US nas propriedades funcionais e biomecânicas do tendão lesado, utilizaram 49 ratos distribuídos em 5 grupos. Os animais foram submetidos a lesão por tenotomia parcial e tratados com: G1 controle; G2 US 1W/cm² e G3 US 2W/cm² (ambos os tratamentos com US de 1MHz, ERA de 0,5cm², modo contínuo, tempo de aplicação subaquática de 4 minutos); G4 corrida de 15, 17 e 19 minutos na 1^o, 2^o e 3^o semanas respectivamente, com velocidade de 4m/min aumentando diariamente até 12m/min; G5 natação em piscina de água aquecida 25°C sem encostar a pata no chão. Todos tiveram início do tratamento no 5^oPO, sendo tratados 6 vezes por semana, até 30^oPO.

Foi realizada avaliação funcional com teste físico no 3^o, 10^o e 30^oPO e avaliação da força tênsil dos tendões. Todos os grupos apresentaram melhora gradual na avaliação funcional, G3 e G4 apresentaram maior força tênsil que o controle. Concluíram, então, que o US 2W/cm² e a corrida podem aumentar a força tênsil dos tendões de ratos submetidos à tenotomia parcial, sendo benéficos na cicatrização tendínea.

TAVARES, MAZZER, PASTORELLO (2005) estudaram as alterações causadas pela radiação de *laser* com comprimento de onda de 904nm, no tendão calcâneo de 30 ratos, distribuídos em 2 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 15º dias pós-operatórios.

Houve diferença significativa ($p < 0,05$), entre o grupo controle e 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.

KOEKE *et al.* (2005) observaram o reparo tendíneo de ratos tratados com US, com aplicação tópica de hidrocortisona e com fonoforese. Foram avaliados 40 animais, distribuídos em 5 grupos. G1 controle sem lesão, e os demais grupos submetidos a lesão por tenotomia parcial, sendo G2 simulação de US, G3 aplicação de hidrocortisona mais simulação do US, G4 tratamento de US e G5 aplicação de hidrocortisona mais tratamento com US (fonoforese). Os animais foram tratados com US de 1MHz, intensidade SATA de $0,5\text{ W}/\text{cm}^2$, pulsado à 25%, ERA $0,5\text{cm}^2$, com um tempo de 5 min, por 10 dias.

Os animais foram mortos no 13ºPO e seus tendões foram avaliados quanto ao alinhamento das fibras de colágeno, por análise de birrefringência. Eles observaram que o G1 apresentou melhores resultados que todos os grupos, sendo seguido por G5 (fonoforese) e G4 (US). O G3 (aplicação de hidrocortisona) não apresentou diferença quando comparado com o G2 (simulação). Concluíram que a fonoforese é eficiente no

tratamento das lesões tendíneas e que o US acelera o processo de reparo em ratos submetidos e tenotomia parcial.

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 20 cm, sobre o tendão direito. Estes foram distribuídos aleatoriamente em 3 grupos, tratados em 3, 5 e 7 dias. Os grupos foram divididos em 4 subgrupos submetidos ao tratamento com *laser* (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 3 dias de irradiação ($p < 0,01$). 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 3 dias de aplicação.

FILLIPIN *et al.* (2005) investigaram o *laser* no estresse oxidativo e super regulação da concentração de colágeno no tendão calcâneo em ratos submetidos a lesão parcial por trauma direto. Trinta e dois ratos foram distribuídos em quatro grupos sendo G1 controle (sem lesão), G2 trauma, G3 trauma mais tratamento com *laser* por 14 dias, G4 trauma mais tratamento com *laser* por 21 dias. O *laser* utilizado foi de arseneto de

gálio, λ 904nm, potência média 45mW, densidade de energia 5J/cm², contínuo, por 35 seg e aplicação diária.

Todos os animais tiveram seus tendões removidos no 21°PO e avaliados quanto a aspectos biomecânicos, histológicos e quantificação de colágeno. Como resultado, observou-se uma redução de anormalidades celulares, estresse oxidativo e concentração de colágeno no grupo tratamento com *laser*, sem diferença entre os diferentes períodos de aplicação. Sugeriu-se que o *laser* seja uma alternativa de tratamento para a cicatrização tendínea, acelerando o processo de cicatrização e remodelamento de colágeno.

CARVALHO *et al.* (2006) com objetivo de investigar a eficácia do ultra-som terapêutico pulsado no reparo tendíneo em animais desnutridos, realizaram um estudo com 36 ratos, submetidos a lesão tendínea por esmagamento e distribuídos em 3 grupos. Os animais do G1 e G2 foram submetidos a restrição de energia proteica, G2 e G3 receberam tratamento com US de 3MHz, pulsado a 20%, 100Hz, intensidade SATA de 0,5W/cm², por 6 min.

Os animais foram mortos com 3, 7 e 14 dias pós lesão, e foram quantificados fibrose, leucocitos, novos vasos, fibroblastos e colágeno. Os achados sugerem não haver diferença geral das médias dos grupos, mas haver diferença para os diferentes dias de tratamento. Conclui-se que o US é efetivo no reparo tendíneo, tendo resposta mais satisfatória em ratos hígidos.

CARRINHO & PARIZOTTO (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 3 grupos experimentais homogêneos (1, 2, 3), sendo que cada grupo foi distribuído em 2 subgrupos; o grupo 1 foi dividido em subgrupo A, que recebeu *laser* 685nm, 3J/cm², e subgrupo B, que recebeu tratamento com *laser* 685nm, 10J/cm²; o grupo 2 foi dividido em subgrupo C, que recebeu tratamento com *laser* de 830nm, 3J/cm² e subgrupo D, cujo tratamento foi com *laser* de 830nm e 10J/cm²; e o grupo 3, que também foi dividido em subgrupo E, controle lesado/simulação (CL/*Sham*), e F, controle padrão (CP). Os achados mostraram que a reparo tendíneo do subgrupo A, tratado com *laser* de 685nm e 3J/cm², apresentou melhores resultados, considerando o nível de organização e orientação das fibras colágenas no local da lesão, diferindo-se estatisticamente dos demais subgrupos.

YEUNG, GUO, NG (2006) buscaram determinar os efeitos do US no reparo da lesão parcial do tendão calcâneo em ratos. Foram utilizados 48 ratos machos distribuídos em dois grupos, G1 controle, G2 tratamento com US pulsado. Uma metade dos animais de cada grupo foi morta com 14 dias e a outra com 28 dias.

Foi utilizado o US de 1MHz, pulsado à 20%, intensidade SATP (*spatial average, temporal peak*) 2,5W/cm², SATA 0,5W/cm², ERA de 0,8cm², por 5 min, de forma subaquática, 3 vezes por semana, com início do tratamento no 1ºPO. Após a morte dos animais os tendões foram avaliados quanto a biomecânica e histomorfologia, e concluiu-se que o US

acelera a cicatrização, tanto com 2 como com 4 semanas de pós operatório.

ARRUDA *et al.* (2007) estudaram diferentes comprimentos de onda do *laser* de baixa intensidade na regeneração tendínea após tenotomia. Os animais foram distribuídos em 5 grupos, submetidos a tenotomia total por meio de cisalhamento transversal do tendão na porção média, entre a inserção calcânea e a junção miotendínea, com excessão 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 3J/cm². O grupo B foi submetido à irradiação *laser* 670nm, diodo de Al-Ga-In-P, emissão contínua, potência 30mW e densidade de energia de 3J/cm². O grupo AB recebeu irradiação de ambos os *laser* 670nm e 904nm associados. O grupo *sham* foi submetido a 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.

NG & FUNG (2007) testaram os efeitos do US com diferentes intensidades na morfologia ultraestrutural do reparo tendíneo. Foram utilizados 20 ratos, distribuídos em 4 grupos. Os animais foram submetidos a tenotomia parcial e tratados com US de 1MHz, contínuo, com 4 minutos de aplicação, de forma subaquática, sendo a intensidade do G1 0,5W/cm², G2 1,2W/cm², G3 2W/cm² e G4 simulação. O início do tratamento se deu

no 5°PO, sendo realizadas 22 sessões, e foram mortos no 30°PO.

Os tendões dos animais foram avaliados por microscópio eletrônico de transmissão, para observar o diâmetro das fibras de colágeno. Houve diferença significativa dos grupos tratamento quando comparados com o controle, mas sem diferença dos grupos tratamento entre si. Concluiu-se que o US tem um papel significativo no remodelamento do colágeno no reparo tendíneo, mas sem relação dose dependente.

NG & FUNG (2008) examinaram os efeitos de diferentes doses de *laser* e diferentes tempos de exercício nas propriedades biomecânicas de tendões de ratos submetidos à tenotomia parcial. Foram utilizados 36 ratos, distribuídos em 9 grupos que combinavam aplicação de *laser* com densidades de energia de 0, 1 e 4J/cm² e corrida com duração de 0, 15 e 30 minutos.

O *laser* utilizado foi de arseneto de gálio aluminizado, λ 660nm, potência média 8,8mW, pulsado 10KHz e tempo de aplicação 15 ou 60 segundos, área de secção transversa do feixe 0,13cm², densidade de potência 68mW/cm², densidade de energia 1 ou 4J/cm² e energia total 0,13J ou 0,51J. O exercício realizado teve velocidade inicial de 4m/min nas 2 primeiras sessões e 12m/min nas demais.

Os animais foram mortos no 30°PO. O *laser* com 4J/cm² apresentou diferença significativa na propriedade viscoelástica do tendão comparado com o controle. A corrida de 30 minutos apresentou melhora significativa quanto a rigidez e força tênsil dos tendões, concluindo que o *laser* com densidade de energia de 4J/cm² e a corrida de 30 minutos são benéficas para as propriedades biomecânicas do tendão.

OLIVEIRA *et al.* (2009) estudaram o efeito do *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 5 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.

Organizou-se em Grupo 1 (controle padrão), onde não houve lesão, Grupo 2 (controle), com lesão e sem tratamento, e Grupos 3, 4 e 5, lesão mais tratamento com *laser* (830nm, P=40mW, F= 4J/cm²) durante 3, 5 e 7 dias, respectivamente. Os animais tiveram seus tendões removidos 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. O *laser* de baixa intensidade é efetivo na melhora da organização das fibras colágenas do tendão calcâneo submetido à lesão parcial.

MÉTODOS

4. MÉTODOS

4.1 DESENHO DE PESQUISA

O presente estudo é primário, intervencional, experimental, prospectivo, longitudinal, analítico, controlado, aleatorizado, simples cego, realizado em centro único. Aprovado no Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) sob o número 127/07 (Anexo I).

4.2 AMOSTRA

Para a realização deste estudo foram utilizados 50 ratos machos (*Rattus norvegicus*: var. albinus, Rodentia, Mammalia, da linhagem Wistar EPM), adultos, pesando entre 270 e 320 gramas (3 meses de idade), oriundos do Biotério Central da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Os procedimentos experimentais foram realizados no Biotério da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP (Titular Prof^a Dr^a Lydia M. Ferreira), onde os animais permaneceram aclimatando-se ao ambiente por 15 dias antes do início do experimento, sendo mantidos individualmente em gaiolas de polipropileno, com ciclo claro – escuro de 12 horas, com temperatura controlada em 22°C, recebendo ração própria comum e água *ad libitum*, durante todo o período de aclimação e experimentação, conforme o preconizado pelo 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, por meio de um impacto direto.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente por sorteio computadorizado (Bio Stat[®] 5.0) em 5 grupos de 10 animais cada, a saber:

Grupo 1 (controle): após a lesão, os animais não receberam nenhum tratamento.

Grupo 2: após a lesão, os animais receberam o tratamento com ultra-som durante 5 dias consecutivos.

Grupo 3: após a lesão, os animais receberam o tratamento com *laser* durante 5 dias consecutivos.

Grupo 4: após a lesão, os animais receberam o tratamento com ultra-som e *laser* durante 5 dias consecutivos.

Grupo 5: após a lesão, os animais receberam o tratamento com *laser* e ultra-som durante 5 dias consecutivos.

4.4 PROCEDIMENTO DA LESÃO

Os animais foram pesados e anestesiados com injeção intramuscular de cloridrato de quetamina 100mg/Kg e cloridrato de xilazina 20mg/Kg na pata caudal esquerda. Na pata caudal direita do animal (na região ao redor do tendão calcâneo) foi realizada epilação digital por arrancamento de pelo, sendo a mesma posicionada no equipamento de lesão, previamente

esterilizado, desenvolvido pela oficina mecânica da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) (Figura 1A).

O animal foi posicionado de forma que se realizasse uma leve tração na pata caudal direita, com o tornozelo em dorsiflexão, formando um ângulo de 90° com o tendão calcâneo, sendo que dorso da pata do animal mantinha contato com a base do aparelho de lesão (Figura 1B e C). Após o posicionamento do animal, um peso de 186g era solto perpendicularmente, a uma altura de 20cm sobre o tendão do animal. A energia potencial de queda sobre o tendão foi de 364,9 mJ.

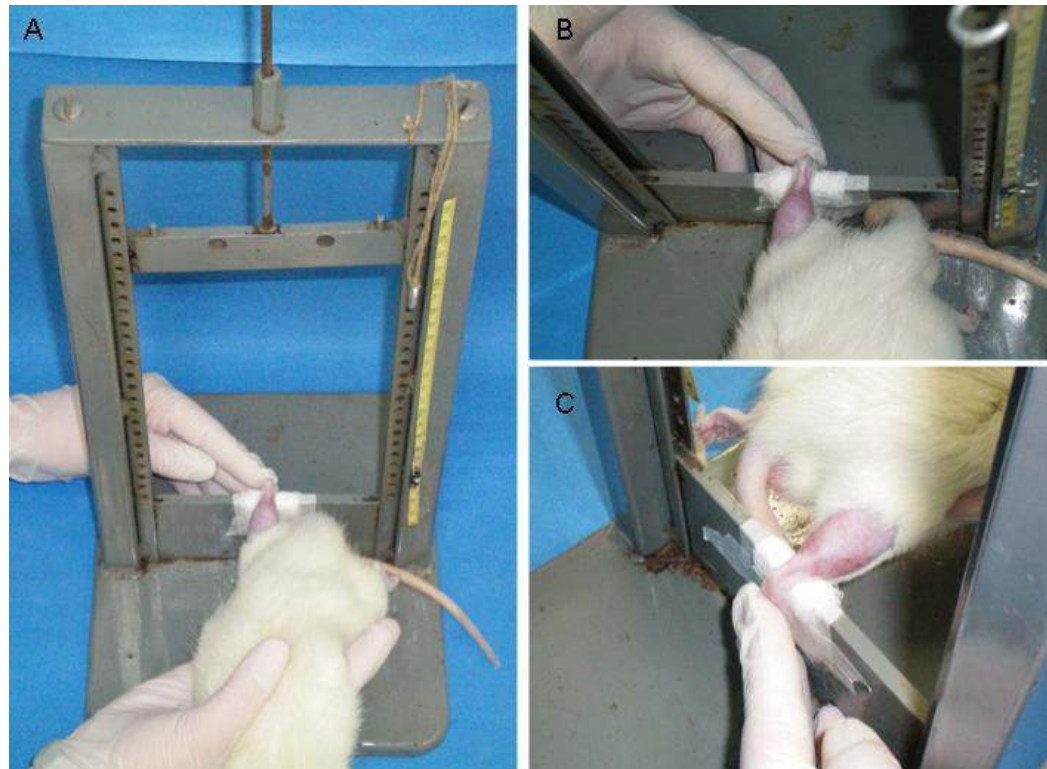


Figura 1. (A) Equipamento lesionador desenvolvido pela oficina mecânica da UFSCar. (B) Posicionamento do animal para realização do procedimento de lesão. (C) Pata do animal levemente tracionada em dorsiflexão, com o dorso da pata em contato com a base do lesionador.

Cinco segundos após a queda, o peso foi retirado e o local da lesão foi demarcado com um círculo ao seu redor por meio de uma caneta dermatográfica. Um minuto após a lesão foi realizada a aplicação do tratamento ao qual o animal estava destinado e, ao término, o animal foi recolocado em sua gaiola e observado até o término do efeito anestésico.

Todos os procedimentos foram realizados durante o mesmo período e turno e pelos mesmos examinadores.

4.5 EQUIPAMENTOS DE TRATAMENTO

Foi utilizado nesta pesquisa equipamento de ultra-som (S. 1070 SONACEL Expert[®]) (Figura 2), 3MHz (nº de série 0403001), Bioset[®] Indústria de Tecnologia Eletrônica Ltda. O transdutor desse equipamento possui área de radiação efetiva (*Effective Radiation Area, E.R.A*) de 0,5 cm², (Anexo 2) e taxa de não-uniformidade (*Beam Non-uniformity Ratio, B.N.R.*) de 6:1.



Figura 2. Equipamento de ultra-som.

O aparelho *laser* de baixa intensidade utilizado foi de diodo infravermelho com comprimento de onda de 830nm de arseneto de gálio aluminizado (AsGaAl), com área de secção transversal do feixe de 0,028cm² com feixe contínuo, da marca DMC[®] (Figura 3).

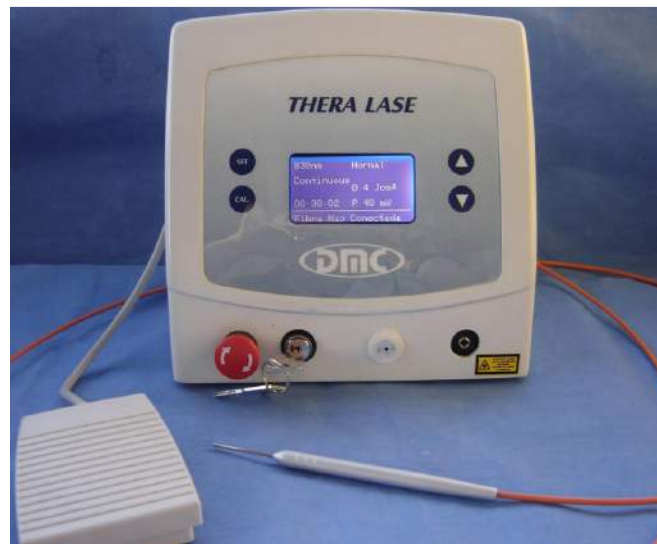


Figura 3. Equipamento de *laser*

Ambos os equipamentos foram aferidos antes do início da pesquisa e após o seu término.

4.6 PROTOCOLO DE TRATAMENTO

Os animais de todos os grupos receberam suas respectivas aplicações 1 minutos após a lesão, durante 5 dias consecutivos (POI-PO4), no mesmo horário da primeira aplicação.

Grupo 1 (controle): os animais não foram submetidos a nenhum tratamento após o procedimento de lesão.

Grupo 2: os animais foram submetidos ao tratamento com aplicações de ultra-som de frequência 3MHz, intensidade SATP (*spatial average temporal peak*) de $1\text{W}/\text{cm}^2$ e SATA (*spatial average, temporal average*) de $0,2\text{W}/\text{cm}^2$, frequência de pulso de 100Hz, com o modo pulsado à 20%, ERA do transdutor $0,5\text{ cm}^2$, e taxa de não-uniformidade do feixe de 6:1.

O cabeçote do ultra-som permaneceu com contato direto, mantendo o perfeito contato entre transdutor, o meio acoplante (3 ml de gel Carbogel[®]) e a pele do animal, de forma longitudinal e lenta ($1\text{cm}/\text{s}$) no local da lesão (Figura 4) por um período de 5 minutos.



Figura 4. Técnica de aplicação utilizada para o tratamento com ultra-som.

Grupo 3: os animais foram submetidos ao tratamento com aplicações de *laser* diodo infravermelho, com comprimento de onda (λ) de 830 nm de arseneto de gálio aluminizado, potência de 40mW, densidade de potência de $1,4\text{ W}/\text{cm}^2$, com densidade de energia de $4\text{J}/\text{cm}^2$, área de

secção transversal do feixe de $0,028 \text{ cm}^2$, com feixe contínuo, densidade de energia de $4\text{J}/\text{cm}^2$, energia total de $0,12\text{J}$. A técnica de aplicação utilizada foi a pontual com contato.

A caneta do *laser* permaneceu perpendicular ao tendão, em apenas um ponto no local da lesão (Figura 5) com duração da aplicação de 3 segundos.

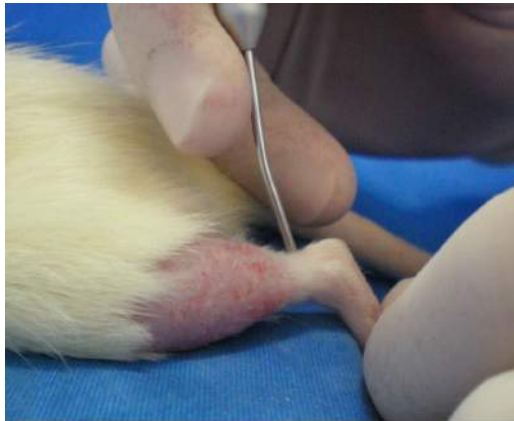


Figura 5. Técnica de Aplicação utilizada para tratamento com *laser*

Grupo 4: os animais foram submetidos ao tratamento com aplicações de ultra-som com os mesmos parâmetros e técnica de aplicação do grupo 2. Um minuto após, foi aplicado o *laser* com os mesmos parâmetros e técnica de aplicação dos animais do grupo 3.

Grupo 5: os animais foram submetidos ao tratamento com aplicações de *laser* com os mesmos parâmetros e técnica de aplicação dos animais do grupo 3. Um minuto após, foi aplicado o ultra-som com os mesmos parâmetros e técnica de aplicação do grupo 2.

4.7 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS E ANÁLISE DE DADOS

No 6º dia de experimento (5ºPO), os animais foram anestesiados, seus tendões direitos foram retirados cirurgicamente por dissecação desde a inserção calcâneo até a junção musculotendínea. Após este procedimento, foram sacrificados por meio de hiperdosagem anestésica e secção dos vasos cervicais. Os tendões foram imediatamente lavados em solução salina a 0,9% e preparados para os demais procedimentos histológicos.

Para uma avaliação qualitativa e quantitativa da concentração, estado de agregação e orientação das fibras de colágeno, os tendões foram submetidos a uma fixação em formol a 10% por 24 horas, a fim de iniciar o preparo das lâminas histológicas.

Após a fixação, os tendões foram lavados em água corrente para, em seguida, serem desidratados em soluções crescentes de álcool etílico a 70% e 90%, por uma hora em cada solução. Em seguida, passaram por 6 banhos de 1 hora cada na solução de álcool absoluto.

Após os banhos em álcool absoluto, os tendões foram diafanizados passando por 2 imersões de xilol puro, sendo a duração de cada imersão de 1 hora cada.

Os tendões foram retirados do xilol e passaram por dois banhos de parafina líquida (60°C) de 1 hora cada. Durante a segunda imersão de parafina, as peças foram levadas para a central de inclusão para o material ser incluído em parafina. Após a inclusão, os blocos estavam prontos para os cortes histológicos.

Os tendões inclusos nos blocos de parafina foram cortados

longitudinalmente em cortes semi-seriados, três micrometros (μm) para as lâminas de picrosirius, e sete micrometros (μm) para as lâminas de birrefringência, por meio de um micrótomo semi-eletrônico.

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 para cada tipo de análise, montadas com seus respectivos tendões.

Os cortes foram montados em lâminas histológicas sem cobertura por lamínulas e/ou coloração. Após serem montadas, todas as lâminas foram desparafinizadas e hidratadas novamente.

As lâminas de birrefringência foram mantidas desta maneira. Por sua vez, as lâminas com coloração de picrosirius após a hidratação foram colocadas em ácido pícrico saturado por 15 min, sendo lavadas em água corrente e recebendo 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.

4.8 MEDIDAS DE BIRREFRINGÊNCIA

Para serem analisadas, as lâminas histológicas foram tomadas ao acaso, sendo classificadas por código, de modo a não se identificar, no momento das medidas, a que grupo o animal pertencia (análise histológica

cega).

A análise das fibras de colágeno foi realizada utilizando a birrefringência de forma ou textural, por meio da microscopia de polarização.

Para a efetivação da análise de birrefringência total as lâminas histológicas de cada grupo foram imersas por 30 minutos em água destilada, cujo índice de refração é de 1,333 (VIDAL, 1987). As medidas dos retardos ópticos (OR) 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 (responsável Prof. Dr. Nivaldo Parizotto). Para realização das medidas, o eixo longo do tendão foi mantido a aproximadamente 45° em relação aos polarizadores do microscópio (Figura 6).

Foram obtidos valores de 6 diferentes pontos da área central de cada um dos 2 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).

4.9 MEDIDAS DE PICROSIRIUS

O tecido corado em picrosirius foi analisado em microscopia de luz polarizada (microscópio Nikon E-800[®]) quanto à presença de fibras colágenas tipo III (finas), polarização em verde, e tipo I (espessas), polarização em vermelho e amarelo (Figura 7), conforme descrito por CAMARGO *et al.*, (2003).

Foi quantificada área igual em todas as lâminas, obtida pela digitalização da imagem de 10 campos de área 185.136,8 μm^2 , totalizando 1.851.368 μm^2 por lâmina. As áreas correspondentes a cada polarização foram somadas por lâmina e 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 em porcentagem média dos dois diferentes tipos de fibras colágenas.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados quantitativos foram resumidos em médias, medianas, desvios padrão, quartis e 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 pela ANOVA foi verificada por 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 foram diferentes utilizou-se a correção de Brown-Forsythe e o método de comparações múltiplas de Dunnett.

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

Na avaliação estatística dos dados obtidos todos os grupos apresentaram distribuição normal, tanto na avaliação de birrefringência como na de picrosirius. A média dos valores de retardo óptico, obtidos por meio da análise de birrefringência, assim como a comparação entre os grupos, dois a dois, estão apresentadas na Tabela 1, onde quanto maior for o valor numérico observado de retardo óptico em nm, melhor é o resultado do tratamento.

Tabela 1. Comparação entre os grupos, dois a dois, em relação ao alinhamento de fibras de colágeno.

Comparação dos grupos		Médias	Nível Descritivo
G1 (controle)	<i>x</i> G2(US)	33,5 <i>x</i> 42,2	0,033*
G1 (controle)	<i>x</i> G3 (Laser)	33,5 <i>x</i> 44,0	0,232
G1 (controle)	<i>x</i> G4 (US+Laser)	33,5 <i>x</i> 40,4	0,100
G1 (controle)	<i>x</i> G5 (Laser+US)	33,5 <i>x</i> 42,7	0,057
G2(US)	<i>x</i> G3 (Laser)	42,2 <i>x</i> 44,0	1,000
G2(US)	<i>x</i> G4 (US+Laser)	42,2 <i>x</i> 40,4	0,999
G2(US)	<i>x</i> G5 (Laser+US)	42,2 <i>x</i> 42,7	1,000
G3 (Laser)	<i>x</i> G4 (US+Laser)	44,0 <i>x</i> 40,4	0,993
G3 (Laser)	<i>x</i> G5 (Laser+US)	44,0 <i>x</i> 42,7	1,000
G4 (US+Laser)	<i>x</i> G5 (Laser+US)	40,4 <i>x</i> 42,7	0,998

* diferença significativa. Teste de Análise de Variância (ANOVA)

A comparação dos valores entre o grupo 1 (controle) e o grupo 2 (US) demonstrou diferença significativa ($p=0,03$). A comparação do grupo 1 e o grupo 5 (Laser+US) não apresentou diferença significativa ($p=0,057$). Também não houve diferença estatística na comparação dos grupos 3 e 4

(Laser e US+Laser) com o controle, nem dos grupos tratamento entre si. As medidas descritivas obtidas com a análise de birrefringência estão representados no Apêndice 1. A distribuição dos valores dos grupos está representada na Figura 6 e a representação das imagens avaliadas de cada grupo analisado esta demonstrada nas Figuras 7, 8, 9, 10 e 11.

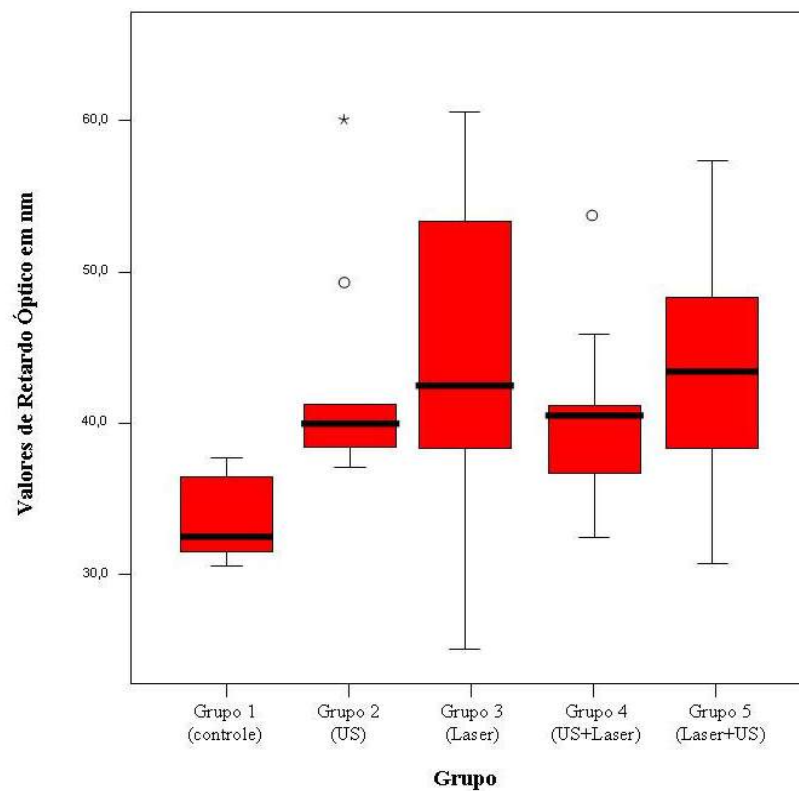


Figura 6. Distribuição dos valores dos grupos referentes ao alinhamento das fibras de colágeno.

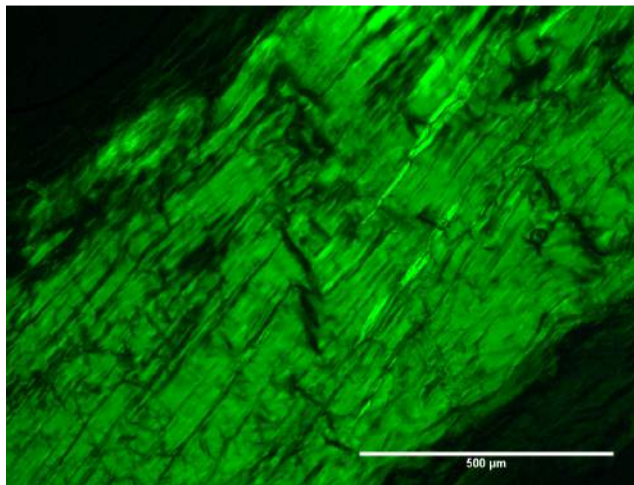


Figura 7. Alinhamento das fibras de colágeno do Grupo 1 (controle), média de retardo óptico de $33,5 \pm 2,7$ nm.

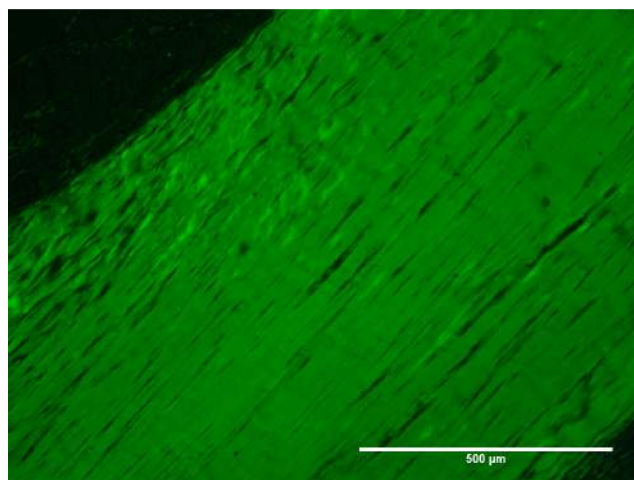


Figura 8. Alinhamento das fibras de colágeno do Grupo 2 (US), média de retardo óptico de $42,2 \pm 7,1$ nm.

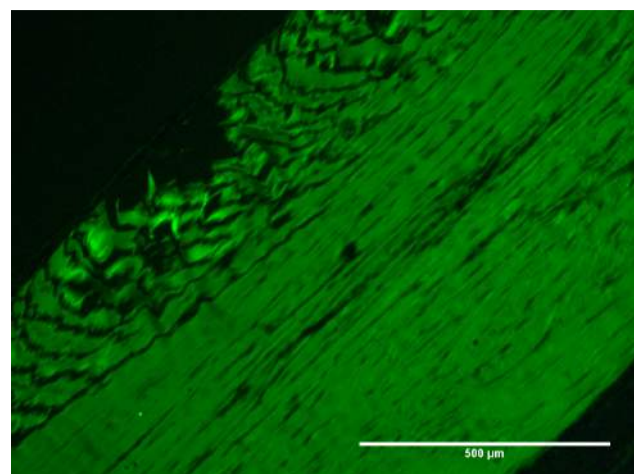


Figura 9. Alinhamento das fibras de colágeno do Grupo 3 (Laser), média de retardo óptico de $44,0 \pm 12,3$ nm.

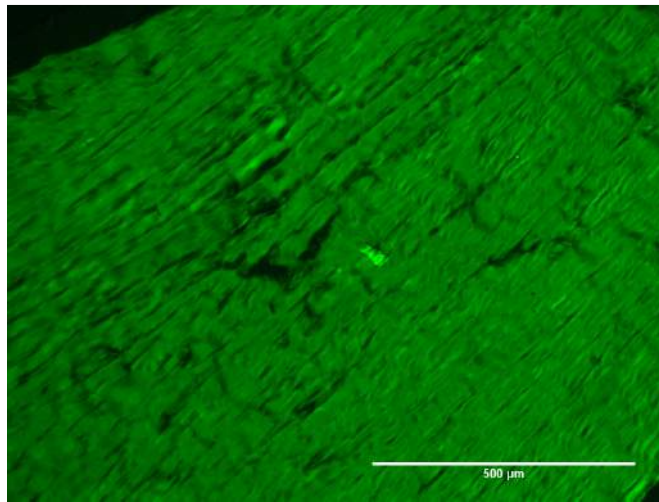


Figura 10. Alinhamento das fibras de colágeno do Grupo 4 (US+Laser), média de retardo óptico de $40,4 \pm 6,4\text{nm}$.

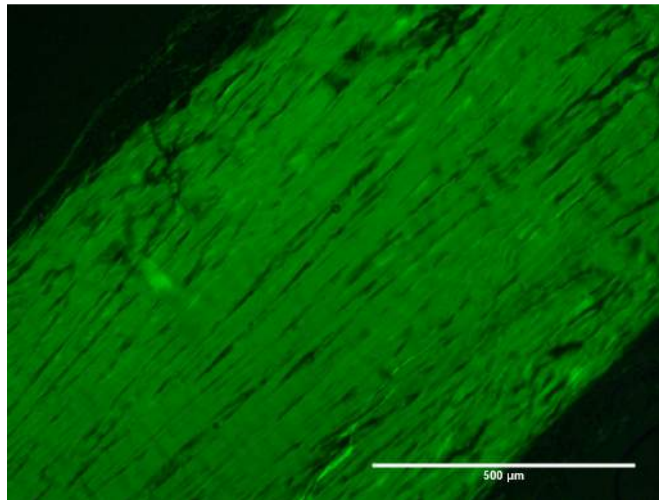


Figura 11. Alinhamento das fibras de colágeno do Grupo 5 (Laser+US), média de retardo óptico de $42,7 \pm 8,3\text{nm}$.

Os dados obtidos pela análise de picosirius, na avaliação de colágeno tipo I (espesso), assim como a comparação entre os grupos, dois a dois, estão organizados na Tabela 2, onde quanto maior for a porcentagem de colágeno por campo, melhor é o resultado do tratamento.

Tabela 2. Resultado da comparação entre os grupos, dois a dois, em relação ao colágeno Tipo I.

Comparação dos grupos		Médias		Nível Descritivo
G1 (controle)	<i>x</i> G2(US)	4,40	<i>x</i> 12,51	0,005*
G1 (controle)	<i>x</i> G3 (Laser)	4,40	<i>x</i> 12,32	0,015*
G1 (controle)	<i>x</i> G4 (US+Laser)	4,40	<i>x</i> 12,67	0,140
G1 (controle)	<i>x</i> G5 (Laser+US)	4,40	<i>x</i> 15,17	0,002*
G2(US)	<i>x</i> G3 (Laser)	12,51	<i>x</i> 12,32	1,000
G2(US)	<i>x</i> G4 (US+Laser)	12,51	<i>x</i> 12,67	1,000
G2(US)	<i>x</i> G5 (Laser+US)	12,51	<i>x</i> 15,17	0,939
G3 (Laser)	<i>x</i> G4 (US+Laser)	12,32	<i>x</i> 12,67	1,000
G3 (Laser)	<i>x</i> G5 (Laser+US)	12,32	<i>x</i> 15,17	0,939
G4 (US+Laser)	<i>x</i> G5 (Laser+US)	12,67	<i>x</i> 15,17	0,994

* diferença significativa. Teste de Análise de Variância (ANOVA)

A avaliação do colágeno tipo I apresentou diferença significativa na comparação do grupo 1 (controle) com os grupos 2 (US), 3 (Laser) e 5 (Laser+US) ($p < 0,01$, $p = 0,01$ e $p < 0,01$ respectivamente). Não houve diferença entre o grupo 1 e o grupo 4 (US+Laser), tampouco dos grupos tratamento entre si. A distribuição dos valores dos grupos esta representada na Figura 12 e as medidas descritivas obtidas com a análise de picrossirius para avaliação de colágeno tipo I representados no Apêndice 2.

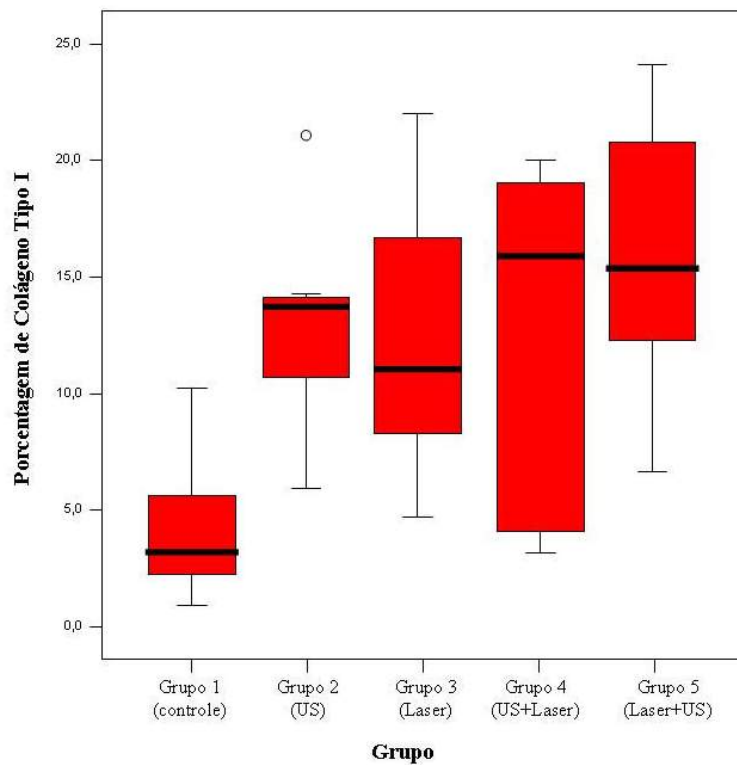


Figura 12. Distribuição dos valores dos grupos referentes à porcentagem de colágeno tipo I.

A avaliação para fibra de colágeno tipo III, por meio da análise de picosirius, não apresentou diferença significativa para nenhum dos grupos ($p=0,34$). A distribuição dos valores dos grupos esta representada na Figura 13. As medidas descritivas referentes a cada grupo encontram-se no Apêndice 3. A representação das imagens avaliadas de cada grupo analisado está demonstrada nas Figuras 14, 15, 16, 17 e 18, onde pode-se observar a polarização em verde (indicativa de colágeno tipo III) e em amarelo e vermelho (indicativa de colágeno tipo I).

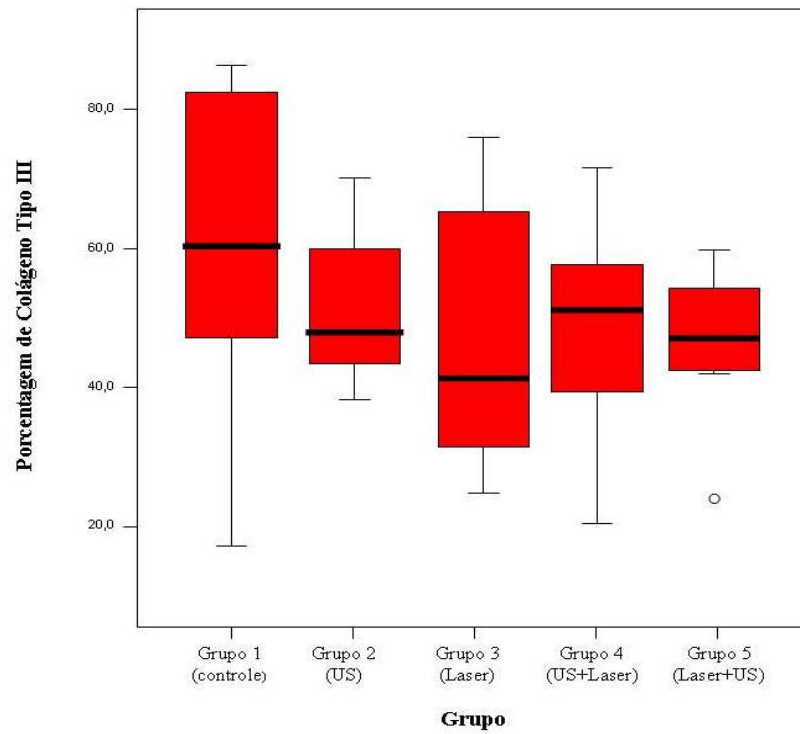


Figura 13. Distribuição dos grupos referentes à porcentagem de colágeno tipo III.

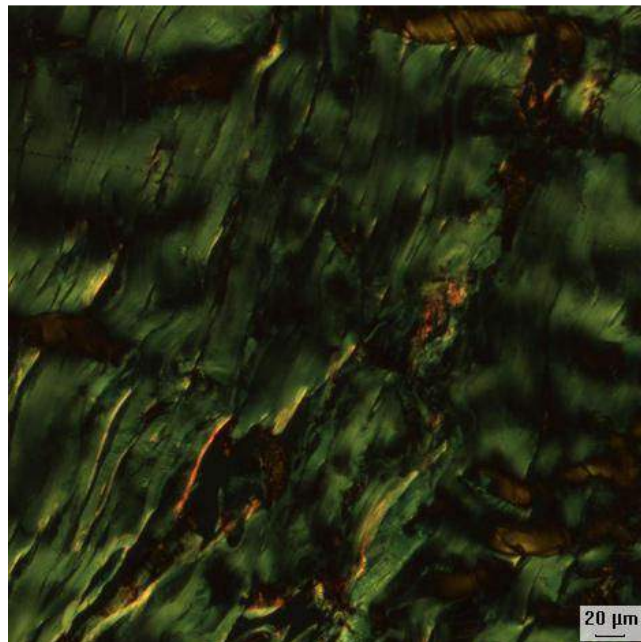


Figura 14. Análise de picrosirius do Grupo 1 (controle), com predominância de polarização em verde (indicativa de colágeno tipo III).

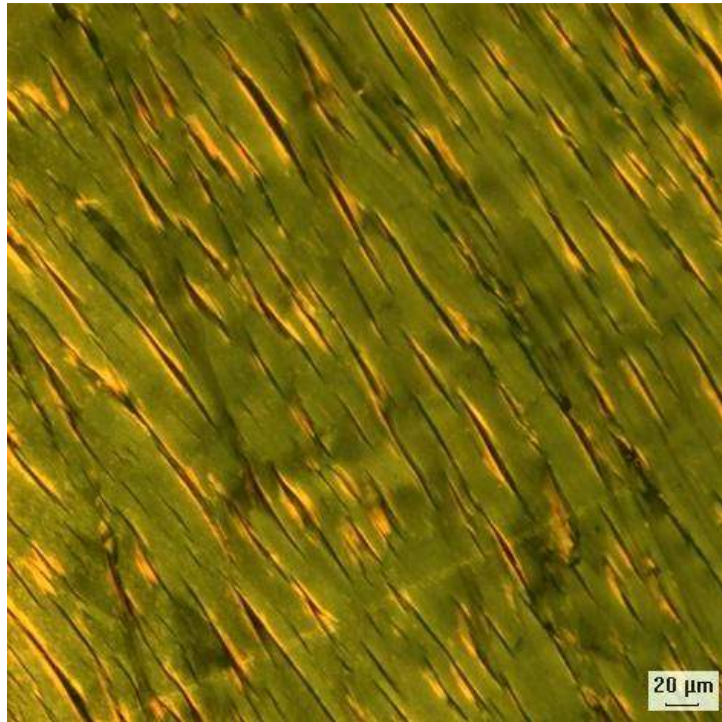


Figura 15. Análise de picrosirius do Grupo 2 (US), com predominância de polarização em amarelo (indicativa de colágeno tipo I).

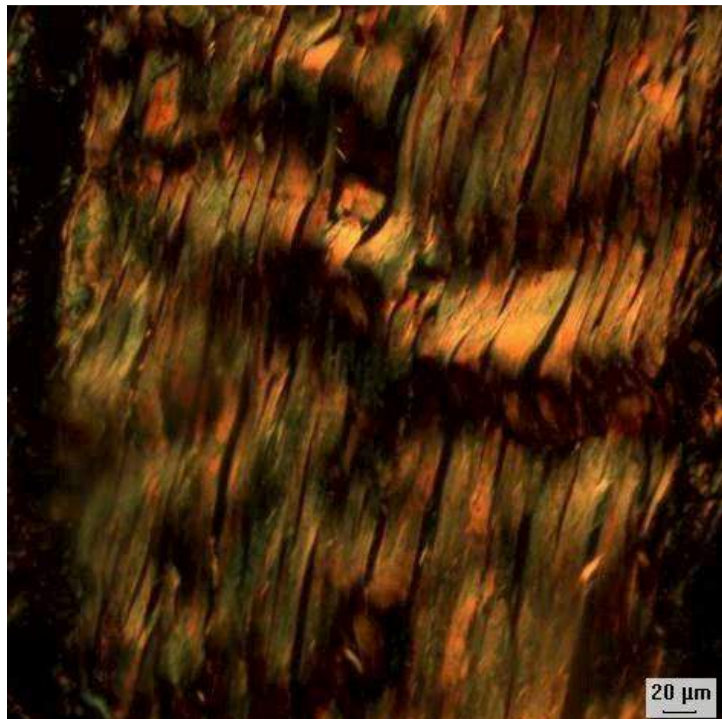


Figura 16. Análise de picrosirius do Grupo 3 (Laser), com predominância de polarização em vermelho (indicativa de colágeno tipo I).

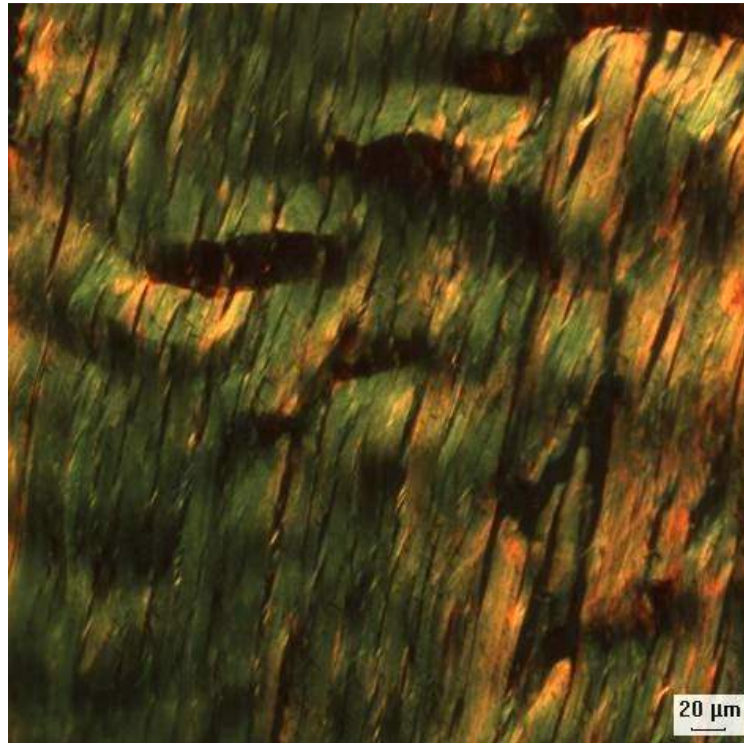


Figura 17. Análise de picosirius do Grupo 4 (US+Laser), com polarização em vermelho e verde (indicativa de colágeno tipo I e III).

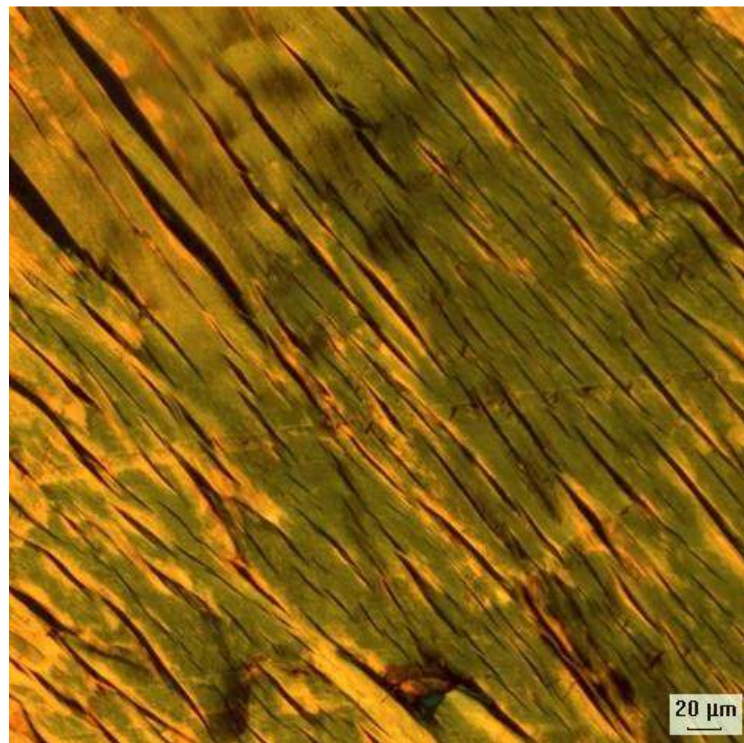


Figura 18. Análise de picosirius do Grupo 5 (Laser+US) com predominância de polarização em amarelo (indicativa de colágeno tipo I).

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

As tendinopatias do tendão calcâneo são condições comuns de origem e patogênese ainda não esclarecidos (KNOBLOCH *et al.*, 2006). O consumo de oxigênio pelos tendões é 7 vezes e meia mais lento que pelo músculo esquelético. Este baixo consumo aeróbio, além da possibilidade de gerar energia anaeróbia, confere ao tendão a capacidade de suportar altas cargas e manter tensões por longos períodos, evitando o risco de isquemias. Entretanto, este lento metabolismo resulta em lenta cicatrização do tecido lesado (SHARMA & MAFFULLI, 2006).

As lesões tendíneas podem ser agudas ou crônicas, parciais ou totais (SHARMA & MAFFULLI, 2005; SHARMA & MAFFULLI, 2006). Devido aos vários fatores que causam a lesão, o processo de reparação dos tendões vem sendo estudado por diversos modelos experimentais, como tenotomia total com sutura (ENWEMEKA, 1989; GUM *et al.*, 1997; STEHNO-BITTEL *et al.*, 1998; RANTANEN, HURME, KALIMO, 1999; ARRUDA *et al.*, 2007) e sem sutura (CUNHA, PARIZOTTO, VIDAL, 2001; KOEKE *et al.*, 2005; CARRINHO & PARIZOTTO, 2006, 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), trauma direto (SALATE *et al.*, 2005; FILLIPIN *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2009) e tenotomia parcial (NG *et al.*, 2003; SEE *et al.*, 2004; NG, NG, SEE, 2004; NG & FUNG, 2007; NG & FUNG, 2008).

Neste estudo, optou-se por realizar uma lesão parcial por trauma direto, na tentativa de simular a ruptura parcial, que em geral precede a ruptura total. Este tipo de lesão ocorre principalmente em indivíduos sedentários que realizam atividade física extenuante de forma intermitente, “atletas de fim de semana”, e vem se tornando comum, uma vez que a participação da população em atividades esportivas e recreativas vem crescendo (WREN *et al.*, 2001; TUMILTY *et al.*, 2008).

A ruptura espontânea parcial é associada ao excesso de uso (*overuse*), com presença de degeneração prévia do tendão e alterações no alinhamento e predominância dos tipos de fibras colágenas da região (DAVIDSSON & SALO, 1969; COOMBS *et al.*, 1980; MAFFULLI *et al.*, 2000; RILEY, 2008; TUMILTY *et al.*, 2008). Por este motivo, talvez a lesão parcial proposta por HUANG, PERRY, SOSLOWSKY (2004) fosse uma alternativa de método de lesão. Entretanto, em seu estudo os animais submetidos a estresse repetitivo não apresentaram alterações degenerativas de seus tendões calcâneos, apenas houve degeneração do tendão supraespinhoso, não sendo este o foco do estudo aqui apresentado.

A indução de lesão por aplicação de colagenase, outra alternativa para simular alterações degenerativas, não foi testada na literatura quanto a padronização e constância da área lesada (MARSOLAIS, CÔTÉ, FRENETTE, 2001; CHEN *et al.*, 2004; GODBOUT, ANG, FRENETTE, 2006), assim como a lesão por esmagamento citada por CARVALHO *et al.* (2006). A tenotomia parcial não promove o cizalhamento das fibras, além de ser realizado um procedimento por via aberta com necessidade de sutura cutânea, o que pode estimular a autofagia dos animais e predispor a complicações (SEE *et al.*, 2004 e NG & FUNG, 2008).

Desta forma o método de lesão por trauma direto apresentou-se reprodutível dentre as lesões parciais observadas na literatura, promovendo uma lesão por cisalhamento das fibras, sem necessidade de suturas. Este método foi descrito por SALATE *et al.* (2005), em um estudo piloto, a fim de padronizar o equipamento de lesão. Foi observado, por avaliação de ultrassonografia, que todos os animais com peso entre 270 e 370g, submetidos ao mecanismo de lesão já anteriormente descrito, apresentaram lesão parcial na região anterior do tendão, na altura do terço médio, com variação menor que 10% entre os animais.

Modelos de experimentação animal vêm sendo empregados como modelos alternativos, tendo em vista padrões éticos que restringem a possibilidade de utilização de modelos humanos e a dificuldade de se promover alguns procedimentos invasivos nestes (ARRUDA *et al.*, 2007). Dessa forma, diversos animais são utilizados em estudos experimentais, sendo imprescindíveis para o desenvolvimento das ciências biológicas e da saúde por fornecerem meios comparativos e por apresentarem similaridades fisiológicas e genéticas com os seres humanos (ACLAM 2004).

Dentre os animais utilizados para experimentação, optou-se por ratos, devido à facilidade de obtenção, manipulação laboratorial e baixo custo destes animais. O seu acelerado metabolismo também possibilita resultados em períodos de tempo mais curtos, em relação a outros animais de experimentação (DEMIR *et al.*, 2004; KOEKE *et al.*, 2005; CARVALHO *et al.*, 2006). Além disso, o fato de já existir uma vasta gama de informações, especificações e modelos experimentais em lesões tendíneas facilita a comparação de resultados (GUM *et al.*, 1997, CUNHA, PARIZOTTO, VIDAL, 2001; DEMIR *et al.*, 2004; NG, NG, SEE, 2004;

FILLIPIN *et al.*, 2005; KOEKE *et al.*, 2005; CARVALHO *et al.*, 2006; ARRUDA *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Foram selecionados ratos do gênero macho a fim de se evitar as variações no ciclo hormonal das fêmeas e também devido à incidência destas lesões ser maior em homens do que em mulheres, em uma relação de 3:1 (GIORDANO *et al.*, 2004; DEMIR *et al.*, 2004; ARRUDA *et al.*, 2007).

Todo o procedimento experimental foi realizado sob constante supervisão e aplicação correta das técnicas de manejo zootécnico, garantindo condições sanitárias e monitorando as condições ambientais recomendadas (fotoperíodo de 12 horas, temperatura em 22°C e umidade 55%), propiciando comodidade de forma a não interferir no equilíbrio fisiológico e comportamental dos animais. Por este motivo também, os animais foram mantidos aclimatando-se ao ambiente por 15 dias, conforme o recomendado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e pelo *American College of Laboratory Animal Medicine* (ACLAM).

A anestesia administrada foi o cloridrato de quetamina, um anestésico dissociativo que promove uma analgesia completa e intensa no sistema muscular esquelético e sono superficial, associado com cloridrato de xilazina, um agente alfa-2 agonista amplamente empregado em medicina veterinária como sedativo, analgésico e miorelaxante. A combinação destes anestésicos é recomendada por veterinários e vem sendo utilizada nas pesquisas com tendão calcâneo em ratos (NG *et al.*, 2003; NG, NG, SEE, 2004; SEE *et al.*, 2004; SALATE *et al.*, 2005; ARRUDA *et al.*, 2007; NG & FUNG, 2008).

O número de animais por grupos foi escolhido baseando-se no cálculo do número amostral, tendo em vista a variação dos resultados e os demais trabalhos realizados, que variam de quatro a quinze animais por grupo.

Ainda não estão bem esclarecidos os mecanismos pelos quais os recursos físicos, como US e o *laser*, estimulam o reparo tendíneo. Alguns autores preconizam que a resposta celular dependa da escolha dos recursos físicos e da combinação de seus parâmetros (REDDY *et al.*, 1998).

O ultra-som terapêutico é um recurso empregado no tratamento de diversas lesões há mais de 50 anos e os parâmetros utilizados apresentam grande variação na literatura encontrada (CUNHA, PARIZOTTO, VIDAL, 2001; NG *et al.*, 2003; KOEKE *et al.*, 2005; TSAI *et al.*, 2006).

A frequência do transdutor do US é parâmetro determinante na profundidade que se deseja atingir com o feixe ultrassônico e geralmente varia de 1 a 3 MHz (LOW & REED, 2000; McDIARMID & BURNS, 1987). A frequência mais observada nos tratamentos de lesão tendínea, em ratos, com US é de 1MHz (ENWEMEKA, 1989, TSAI *et al.*, 2005; NG & FUNG, 2007). Entretanto, a frequência indicada para lesões com menos de 2cm de profundidade, como o tendão calcâneo em ratos, é a mais alta, por ser absorvida mais superficialmente (DRAPER & RICARD, 1995; CARVALHO *et al.*, 2006). Por este motivo, selecionou-se a frequência de 3MHz para o tratamento da lesão parcial do tendão calcâneo no presente estudo.

O modo de aplicação da onda ultrassônica pode ser realizado de forma contínua e pulsada. A utilização do modo pulsado tem demonstrado resultados positivos no alinhamento das fibras de colágeno, sendo referido como melhor opção de tratamento na regeneração tecidual, nas primeiras

fases de cicatrização, do que o modo contínuo (CARRINHO & PARIZOTTO, 2006). TSAI *et al.* (2006), em estudo *in vitro*, apresentaram aumento da expressão de TGF β pelo RNA mensageiro, além de aumento na expressão de procolágeno α 1(I) e α 1(III), com a aplicação de ultra-som pulsado. Em seu estudo não houve aumento de temperatura da cultura durante a aplicação do ultra-som terapêutico, sendo os achados relacionados com os efeitos não térmicos do ultra-som (TSAI *et al.*, 2005; TSAI *et al.*, 2006). O presente estudo vai ao encontro dos dados encontrados, apresentando aumento da proliferação de colágeno e melhora em seu alinhamento após a aplicação do US pulsado nas fases iniciais de cicatrização, acelerando assim o processo de reparo.

A intensidade da irradiação ultrassônica é o parâmetro que mais varia nos estudos, tanto com relação à intensidade de escolha quanto aos resultados encontrados. Além disto, o fato de muitos autores não descreverem em seus artigos o tipo de intensidade SATA (*spatial average, temporal average*) ou SATP (*spatial average temporal peak*) dificulta a interpretação e comparação dos resultados (CUNHA, PARIZOTTO, VIDAL, 2001).

Estudos *in vitro* (TSAI *et al.*, 2005; TSAI *et al.*, 2006; TSAI & CHEN, 2008) e *in vivo* (NG *et al.*, 2003; NG & FUNG, 2007) demonstraram resultados significativos na aceleração do reparo de lesão tendínea em ratos com aplicação de ultra-som, sem diferenças entre as diversas intensidades aplicadas (variação de 0,1 à 2W/cm²). Entretanto, NG, NG, SEE (2004), apresentaram aumento da força tênsil do tendão na aplicação de US com intensidade SATA de 2W/cm² e não obtiveram resultado semelhante com aplicação de 1W/cm². Em contra partida diversos estudos vêm apresentando benefícios na aplicação do US com

intensidade mais baixa, de $0,5\text{W}/\text{cm}^2$, nas primeiras fases da cicatrização tendínea (CUNHA, PARIZOTTO, VIDAL, 2001; KOEKE *et al.*, 2005; CARVALHO *et al.*, 2006; YEUNG, GUO, NG, 2006).

Altas intensidades de US podem impedir a fibroplasia e síntese de colágeno, causando lise celular e danos na matriz, impedindo assim, o processo de reparo tendíneo (DEMIR *et al.*, 2004; TSAI & CHEN, 2008). DYSON *et al.* (1968) demonstraram em seu estudo que o estímulo à regeneração tendínea nas fases iniciais é maior com intensidades mais baixas, corroborando com os achados do presente estudo.

A laserterapia de baixa intensidade também é um recurso amplamente utilizado na literatura. Entretanto os parâmetros de aplicação do *laser* variam muito nos estudos encontrados o que, assim como a falta de informações relatadas nos artigos, dificulta a comparação dos resultados.

O comprimento de onda pode variar, sendo possível a aplicação de *laser* com espectros de luz entre 600nm e 1300nm, ou seja, os espectros do vermelho visível e do infravermelho (SCHINDL *et al.*, 2000). Segundo KARU (1996), os comprimentos de onda λ entre 760nm e 840nm (infravermelho) são os menos absorvidos pelos cromóforos superficiais, obtendo melhor penetração na pele. Postula-se também que os *lasers* infravermelhos como os de arseneto de gálio são fortemente absorvidos pela água (STOLIK *et al.*, 2000).

OLIVEIRA *et al.* (2009) apresentaram resultados positivos no alinhamento de fibras de colágeno, em ratos com lesão parcial, tratados com *laser* diodo com comprimento de onda de 830nm. ENWEMEKA *et al.* (2004) em uma revisão sistemática, também observaram que a irradiação com este comprimento de onda (λ) tem melhor resultado para o

tratamento da dor.

Neste estudo foi utilizado o comprimento de onda de 830nm, seguindo a teoria de que o *laser* infravermelho é mais bem absorvido por tecidos que contenham água, tendo em vista que o colágeno é o maior componente da matriz extracelular, abrangendo 80% do peso úmido do tendão (MAFFULLI *et al.*, 2000; ARRUDA *et al.*, 2007).

Outro parâmetro discutido quanto a seus efeitos bioestimulatórios é a densidade de energia ou fluência, uma vez que a existência de uma curva dose-dependente é relatada em diversos estudos (CARRINHO & PARIZOTTO, 2006; PUGLIESE *et al.*, 2003). Sugere-se que as densidades de energias de 1 a 4J/cm² sejam suficientes para promover efeitos terapêuticos significantes, intensificando a formação eletroquímica da transmembrana, levando próton à mitocôndria, seguido pela liberação de cálcio para o citoplasma, estimulando mitoses e proliferação celular (FRIEDMAN *et al.*, 1991). Já em doses mais elevadas mais cálcio é liberado, podendo levar a uma hiperatividade da adenosina trifosfato-cálcio (ATPase) e das bombas de cálcio, esgotando as reservas de ATP da célula e, deste modo, causando a inibição do metabolismo celular (CARRINHO & PARIZOTTO, 2006; PUGLIESE *et al.*, 2003; SALATE *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Devido a estes relatos alguns autores optam por doses mais baixas de densidade de energia (PUGLIESE *et al.*, 2003; ARRUDA *et al.*, 2007; FILLIPIN *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2009; NG & FUNG, 2008), assim como o presente estudo, que optou pela utilização de uma densidade de energia de 4J/cm², apresentando resultados positivos no alinhamento e deposição de fibras de colágeno. Este estudo vai ao encontro dos achados de NG & FUNG (2008) que observaram melhores resultados no grupo de

ratos com lesão parcial de tendão calcâneo, tratado com $4\text{J}/\text{cm}^2$, associado a exercício de corrida por 30 minutos, quando comparado com o grupo tratado com $1\text{J}/\text{cm}^2$.

OLIVEIRA *et al.* (2009) também apresentaram aumento do alinhamento de fibras de colágeno em ratos submetidos a lesão parcial, utilizando a densidade de energia de $4\text{J}/\text{cm}^2$. Assim como CARRINHO & PARIZOTTO (2006), que na comparação entre densidades de energia de 3 e $10\text{J}/\text{cm}^2$ observaram melhores resultados no alinhamento das fibras de colágeno, avaliadas por birrefringência, no grupo com a menor densidade de energia.

A energia total, especificada por ponto irradiado, ao contrário da densidade de energia, é pouco relatada, muitas vezes não sendo mencionada nos estudos encontrados. OLIVEIRA *et al.* (2009) utilizaram uma energia total de $0,12\text{J}$ apresentando melhora do alinhamento das fibras de colágeno no tratamento de lesões do tendão calcâneo, principalmente nos animais tratados por 5 dias imediatamente após a lesão. CARRINHO & PARIZOTTO (2006) observaram diferentes valores de energia totais ($0,09$ e $0,28\text{J}$) e obtiveram melhores resultados com a menor energia. Já FILLIPIN *et al.* (2005) apresentaram bons resultados com energia total mais elevada ($1,5\text{J}$), porém não estudaram os efeitos nos primeiros dias de cicatrização.

No presente estudo utilizou-se uma energia total de $0,12\text{J}$ com aplicação em um único ponto no local da lesão, sendo observadas as fibras de colágeno nos primeiros dias de cicatrização. Os resultados apresentados corroboram com os efeitos positivos encontrados na literatura em avaliações da mesma fase de cicatrização do presente estudo (SALATE *et al.*, 2005; CARRINHO & PARIZOTTO, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Outro parâmetro que pode variar na aplicação do *laser* é a potência que, assim como os demais parâmetros, apresenta controvérsias. SALATE *et al.* (2005) demonstraram que o reparo tendíneo com diferentes potências (10mW e 40mW) apresenta neovascularização precoce e um maior número de vasos no grupo irradiado com a potência de 40mW, quando comparado aos demais grupos. OSHIRO & CALDERHEAD (1991) observaram que potências inferiores a 60mW diminuíram a dor de maneira efetiva e que potências mais elevadas, como a de 100mW, apresentaram efeitos quase termais como exacerbação do quadro álgico, espasmo muscular involuntário e síncope nervosa.

Segundo TUNNER & HODE (1999), os efeitos do *laser* de HeNe sobre o recrutamento de mastócitos foram mais rápidos a 50mW do que a 4mW, irradiados com a mesma densidade de energia. Os autores concluíram portanto, que *lasers* com potências mais elevadas, podem ser mais eficazes na promoção de respostas biológicas. Esses resultados estão de acordo com o estudo realizado por VAN BREUGHEL & BAR (1992), sobre os efeitos do *laser* HeNe em culturas de fibroblastos humanos, evidenciando que o tratamento com 40mW por 10 segundos foi mais eficiente do que 10mW por 40 segundos, ambos com fluências de igual valor.

Utilizou-se, no presente estudo, uma potência de 40mW com tempo de aplicação de 3 segundos, baseado em estudos que, com a mesma potência, apresentaram resultados positivos na proliferação celular com a dose sendo entregue ao tecido com um menor tempo (VAN BREUGEL & BAR, 1992; SALATE *et al.*, 2005). Porém, não existem dados conclusivos a respeito da potência ideal a ser usada, o que gera muitas dúvidas e especulações a seu respeito.

Segundo CHAN *et al.* (2007), o reparo de tendões é similar ao processo de reparação que ocorre em outros tecidos biológicos. Este processo é um estado dinâmico que compreende a inflamação, proliferação celular, com síntese de elementos da matriz extracelular (PUGLIESE *et al.*, 2003), como colágeno, e angiogênese para a formação do tecido de granulação. A seguir, ocorre a orientação das células do tendão e fibras de colágeno de maneira altamente organizada na tentativa de restaurar a estrutura e função do tendão lesado.

A avaliação do colágeno é de fundamental importância em estudos sobre reparo tendíneo, uma vez que o colágeno é a principal estrutura protéica do corpo e maior componente da matriz extracelular. Entre as propriedades biológicas e biomecânicas das fibras de colágeno está a extensibilidade, determinada pela agregação das fibras (CARRINHO & PARIZOTTO, 2006).

A análise de birrefringência tem sido utilizada por diversos autores no estudo de agentes terapêuticos que influenciem o processo de reparação tendínea (CUNHA, PARIZOTTO, VIDAL, 2001; KOEKE *et al.*, 2005; CARRINHO & PARIZOTTO, 2006; ARRUDA *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2009). Segundo VIDAL (1987), durante o processo de reparo, as fibras de colágeno tornam-se progressivamente mais espessas e seu brilho de birrefringência aumenta (propriedade anisotrópica), indicando uma melhor organização e estado de agregação macromolecular. A birrefringência textual (forma) é dependente do volume (concentração), estado de agregação e orientação dos feixes de colágeno, sendo que sua mensuração possibilita o melhor método para se estudar a ordem molecular e o grau de agregação ordenada das fibras de colágeno (VIDAL, 1986; VIDAL, 2003).

Na observação dos dados descritivos da análise de birrefringência pode-se observar uma média próxima entre os grupos 2, 3, 4 e 5 (grupos tratamento) e uma média inferior no grupo controle ($33,5 \pm 2,7$). O grupo 3 (*laser*) apresentou a maior média, porém também o maior desvio padrão ($44,0 \pm 12,3$) de todos os grupos, não apresentando, por este motivo, diferença significativa quando comparado com o grupo controle ($p=0,235$). O grupo 4 (US+ *laser*) apresentou menor média entre os grupos tratados ($40,4 \pm 6,4$) e os grupos 2 e 5 apresentaram médias e desvios padrão muito semelhantes ($42,2 \pm 7,1$ e $42,7 \pm 8,3$ respectivamente).

Houve diferença significativa na comparação do grupo 2 (US) com o controle ($p=0,03$). Apesar da semelhança entre os resultados dos grupos 2 e 5 e da maior média do grupo 5, na comparação com o controle houve apenas uma tendência a significância ($p=0,057$) devido à maior variância apresentada por este grupo. Este resultado sugere que talvez um maior número de animais por grupo pudesse ser utilizado para confirmar a eficácia deste tipo de combinação de agentes físicos na cicatrização tendínea. Não houve diferença entre os demais grupos (G3 e G4) e o controle (G1) e nem entre os grupos tratamento (G2, G3, G4 e G5).

Estes resultados vão ao encontro dos achados de CUNHA, PARIZOTTO, VIDAL (2001) e KOEKE *et al.* (2005) que observaram em seus estudos um aumento do alinhamento das fibras de colágeno, pela análise de birrefringência, após o tratamento com ultra-som pulsado, nas lesões do tendão calcâneo, em ratos submetidos a tenotomia. Diversos estudos têm relatado um aumento da força tênsil do tendão após aplicação do ultra-som terapêutico (ENWEMEKA, 1989; NG *et al.*, 2003; NG, NG, SEE, 2004), o que vai ao encontro do relatado no presente estudo, uma vez que o alto grau de alinhamento das fibras de colágeno é que confere ao

tendão uma grande capacidade de resistência as forças de tração (ARRUDA *et al.*, 2007; NG & FUNG, 2008). Quanto maior o paralelismo das fibras, maior a força tênsil do tendão (FILLIPIN *et al.*, 2005).

Estudos com aplicação de *laser* em lesões tendíneas, ao contrário deste estudo, têm apresentado resultados positivos no alinhamento de colágeno (CARRINHO & PARIZOTTO, 2006; ARRUDA *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2009), entretanto NG & FUNG (2008) sugerem que o aumento da força tênsil esteja mais relacionado ao exercício e o *laser* à melhora da propriedade viscoelástica dos tendões calcâneo submetidos a lesão parcial.

A síntese de colágeno tem início logo após a lesão e se estende até o final do processo cicatricial, quando o remodelamento do tecido ocorre (PUGLIESE *et al.*, 2003). Nos tendões há presença de colágeno tipos I e III, sendo 95% de colágeno tipo I (MAFFULLI *et al.*, 2000; RILEY, 2008). A utilização da coloração em picrosírius, analisada em microscopia de luz polarizada, tem sido utilizada na literatura para quantificar os tipos de colágeno, espesso (tipo I) e fino (tipo III) (PUGLIESE *et al.*, 2003; GIORDANO *et al.*, 2004; GASQUE *et al.*, 2008).

O colágeno tipo I é considerado o responsável pela resistência às transmissões de forças mecânicas empregadas pelo músculo para o osso (MAFFULLI *et al.*, 2000; ERIKSEN *et al.*, 2002; RILEY, 2008). Neste estudo a avaliação da quantidade de colágeno tipo I por campo apresentou médias próximas entre os grupos tratamento (2, 3, 4 e 5) com uma maior média no grupo 5 – *laser* + US ($15,17 \pm 5,87$). No grupo 1- controle observou-se a menor média dos grupos ($4,40 \pm 3,26$).

Houve diferença significativa entre os grupos 2 (US), 3 (*laser*) e 5 (*laser* + US) quando comparados com o controle ($p < 0,01$, $p = 0,01$, $p < 0,01$

respectivamente). Apesar da proximidade das médias dos grupos tratamento, o grupo 4 (US+ *laser*) não apresentou diferença significativa na comparação com o controle ($p=0,14$), devendo-se este resultado provavelmente à grande variância encontrada neste grupo ($12,67 \pm 7,62$). A comparação dos grupos tratamento entre si não apresentou diferença significativa.

Estes resultados demonstram o benefício da utilização do US e do *laser* na melhora da qualidade da cicatrização tendínea. Estes achados também podem explicar a maior força tênsil e menor chance de re-ruptura observada em diversos trabalhos (ENWEMEKA, 1989; NG *et al.*, 2003; NG, NG, SEE, 2004).

Os resultados vão ao encontro dos estudos de diversos autores que observaram a síntese de colágeno após aplicação destes agentes físicos. CARVALHO *et al.* (2006), no estudo do uso do ultra-som terapêutico no reparo tendíneo de ratos submetidos a restrição de energia protéica, observaram que o US pode aumentar a deposição de colágeno na região lesada. NG & FUNG (2007) demonstraram que o US tem papel significativo no remodelamento do colágeno no reparo tendíneo. Já YEUNG, GUO, NG (2006) relataram uma aceleração no processo de cicatrização do tendão calcâneo em termos biomecânicos e histomorfológicos após o uso do US.

Segundo FILLIPPIN *et al.* (2005), a terapia a *laser* de baixa intensidade pode reduzir anormalidades histológicas, estresse oxidativo e a concentração de colágeno no reparo tendíneo de ratos submetidos a lesão por trauma direto. Este estudo sugere uma aceleração no processo de remodelamento do colágeno na região.

Os mecanismos de ação pelos quais o ultra-som e o *laser* estimulam o processo de cicatrização ainda não estão bem compreendidos. Diversos

autores relatam um aumento da permeabilidade da membrana dos fibroblastos e ativação dos canais de cálcio (Ca^{2+}), tanto por modificação fotofísica (OLIVEIRA *et al.*, 2009), quanto por efeitos mecânicos com micromassagem e cavitação (NG *et al.*, 2003; NG, NG, SEE, 2004; DEMIR *et al.*, 2004). Isto gera um aumento do influxo de cálcio e consequentemente proliferação celular e síntese de colágeno.

YEUNG, GUO, NG (2006) relataram também que os efeitos não térmicos do ultra-som podem estimular a degranulação de mastócitos, liberando histamina, responsável pela vasodilatação. Isto resultaria em um aumento da permeabilidade vascular e atração de células e elementos essenciais para o reparo do tecido durante a fase inflamatória.

Estudos *in vitro* também vêm sendo realizados na busca por respostas sobre quais seriam os mecanismos de ação pelos quais o US e o *laser* aceleram o reparo tendíneo. TSAI *et al.* (2005) observaram na cultura de células tendíneas um aumento do PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), uma proteína auxiliar fundamental para a replicação do DNA, sugerindo ser este um modulador dos efeitos estimulatórios do US.

O fator de crescimento TGF β (*Transforming Growth Factor* β) é referido como um dos pivôs do reparo tecidual. TSAI *et al.* (2006) observaram o efeito do ultra-som na síntese de colágeno e sua relação com a secreção de TGF β . Como resultado, foi observado um aumento da expressão de TGF β pelo RNA mensageiro, correlato aos efeitos estimulatórios da síntese de colágeno, com aumento da expressão de procolágeno α (I) e (III) de forma dose dependente. Estes mesmos autores em 2008 observaram estímulo da migração celular para o sítio da lesão e aumento da expressão de actina α -SM na cultura de tendões de ratos, sugerindo que este seja um dos possíveis mecanismos pelos quais o US

estimula o reparo de tendões.

Ainda *in vitro* DE OLIVEIRA *et al.*(2008) compararam o US terapêutico e a terapia a *laser* de baixa intensidade na cultura de fibroblastos e relataram que ambos tem efeito bioestimulatório na proliferação destas células. Entretanto, diferentemente do presente estudo, estes autores sugerem que o *laser* apresente melhores resultados que o US nas fases iniciais de cicatrização.

GUM *et al.*(1997) sugerem que a aplicação combinada de US e *laser* possa apresentar efeitos concorrentes, não apresentando diferenças ultra-estruturais, morfométricas ou biomecânicas dos tendões tratados em relação ao grupo controle. Já DEMIR *et al.* (2004), compararam as aplicações individual e combinada do ultra-som e do *laser* de baixa intensidade e todos os grupos tratados apresentaram melhores resultados que o controle na avaliação biomecânica e bioquímica dos tendões calcâneos de ratos, mas sem diferenças entre os grupos tratamento.

Entretanto, DEMIR *et al.* (2004) não observaram a influência entre os equipamentos, no que se refere à ordem de aplicação, fator importante na observação dos resultados, vez que não se sabe ao certo como estes agentes físicos agem no processo de cicatrização tendínea. Desta forma a ordem de aplicação dos equipamentos poderia influenciar nos resultados obtidos.

Outro fato relevante foi a densidade de energia utilizada por estes autores em suas aplicação com *laser* ($1\text{J}/\text{cm}^2$), uma vez que NG & FUNG (2008) apresentaram melhores resultados com aplicações de *laser* à $4\text{J}/\text{cm}^2$ em relação à $1\text{J}/\text{cm}^2$. A baixa densidade de energia utilizada pelos pesquisadores pode não ter apresentado resultados significativamente, não diferindo dos demais grupos tratados com US ou com combinação de

tratamentos. Entretanto o presente estudo corrobora com os achados de DEMIR *et al.* (2004), uma vez que não apresentou diferença entre os grupos com diferentes ordens de aplicação dos equipamentos de ultra-som e *laser* e tampouco diferença entre os demais grupos tratados somente com US ou *laser* com densidade de energia de $4\text{J}/\text{cm}^2$, tanto na avaliação do colágeno tipo I como na de birrefringência.

No presente estudo, observou-se também uma maior porcentagem de colágeno tipo III por campo que do tipo I, sendo a maior variação apresentada pelo grupo controle. Segundo TSAI *et al.* (2006) durante o processo de reparo tendíneo, primeiramente ocorre a deposição de colágeno III, posteriormente remodelado para tipo I. No restante do processo de reparo ocorre a deposição de colágeno tipo I, que se estende até o final do processo cicatricial. Este tipo é o que confere força e resistência ao tendão. Isto pode explicar os achados do presente estudo, uma vez que os tendões foram avaliados nas fases iniciais de cicatrização, período em que ocorre maior deposição de colágeno tipo III.

Quanto às medidas descritivas da quantificação do colágeno tipo III, o grupo controle apresentou média e desvio padrão mais altos ($60,52 \pm 22,61$). Nos grupos tratamento, todas as médias foram próximas e não houve diferença significativa entre nenhum dos grupos ($p=0,341$). Em um estudo *in vitro*, onde foi utilizada cultura de células de tendões humanos, pôde-se observar que tendões de pessoas que apresentavam tendinopatia possuíam maior quantidade de colágeno tipo III que os tendões normais. Ambos, quando submetidos a lesões *in vitro*, apresentava um aumento do colágeno tipo III (MAFFULLI *et al.*, 2000). Estes achados se relacionam com os observados neste estudo.

Baseando-se nos resultados deste estudo, pode-se observar que não

há influência na ordem de aplicação dos agentes físicos ultra-som e *laser* e, tampouco, vantagens na combinação destes recursos para aumentar a síntese e alinhamento das fibras de colágeno. Sugerindo que a utilização de recursos físicos de forma individual possa ser uma forma mais rápida e prática, além de menos onerosa, de tratamento, com resultados tão efetivos quanto a combinação de ambos.

Estudos futuros devem ser efetuados a fim de avaliar o mecanismo de ação pelo qual o ultra-som e o *laser* estimulam o processo de reparo, com avaliações biomoleculares da matriz extracelular e utilização de imunohistoquímica. A realização de estudos *in vitro* e *in vivo* com a observação de outros agentes físicos empregados na prática clínica, como as correntes elétricas e eletromagnéticas, os diodos emissores de luz (LED's) e os clusters, apresentam carência de informações na literatura, assim como os estímulos mecânicos com exercícios concêntricos, excêntricos e a combinação destes recursos deve ser investigada.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

O ultra-som terapêutico e a terapia *laser* de baixa intensidade foram eficazes no processo de reparo de lesão parcial do tendão calcâneo em ratos.

O ultra-som promoveu maior alinhamento das fibras de colágeno.

O ultra-som, o *laser*, e a combinação *laser*+ultra-som aumentaram a quantidade de colágeno tipo I na região da lesão.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

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):283-8.

Basford JR. Low-energy laser therapy: controversies and new research findings. *Lasers Surg Med.* 1989;9(1):1-5.

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/lilt/lilt_science6.htm#4.

Bossini PS, Fangel R, Habenschus RM, Renno AC, Benze B, Zuanon JA, Benatti Neto C, Parizotto NA. Low-level laser therapy (670 nm) on viability of random skin flap in rats. *Lasers Med Sci.* 2009;24(2):209-13.

Camargo MM, Battlehner CN, Goldman KZ, David CB, Caldini EG. Estudo histoquímico e quantitativo do colágeno dérmico facial: efeitos da aplicação tópica de estriol em mulheres menopausadas. [acesso em 1 abril 2009] Disponível em: http://www.sbme.org.br/portal/download/revista/13/07_Colageno_Dermico.pdf.

Carrinho PM, Parizotto NA. 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 Cir Bras.* 2006;21(4):13-7.

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. *J Orthop Res.* 2004;22(4):854-61.

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.

Davidsson L, Salo M. Pathogenesis of subcutaneous tendon ruptures. *Acta Cir Scand.* 1969;135:209-12.

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

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. *Lasers Surg Med.* 2004;35:84-9.

Draper DO, Ricard MD. Rate of temperature decay in human muscle following 3 MHz ultrasound: The stretching window revealed. *J Athl Train.* 1995;30(4):304-7.

Dyson M, Pond JB, Joseph J, Warwick R. The stimulation of tissue regeneration by means of ultrasound. *Clin Sci.* 1968;35:273-85.

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

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):323-9.

Eriksen HA, Pajala A, Leppilahti J, Risteli J. Increased content of type III collagen at the rupture site of human Achilles tendon. *J Orthop Res.* 2002;20:1352-7.

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.

Friedman H, Lubart R, Laulicht I, Rochkind S. A possible explanation of laser-induced stimulation and damage of cell cultures. *Photochem Photobiol.* 1991;11:87-91.

Gasque CS, Oliveira RC, Ceolin D, et al. Avaliação da biocompatibilidade de uma membrana de pericárdio bovino acelular e seu potencial como carreador de osteoblastos. *Cienc Odontol Bras.* 2008;11(1):58-66.

Giordano V, Pallottino AB, Almeida RN, Giordano M, Amaral NP, apfel MI, Bastos JS. Experimental, comparative study of two suture techniques for achilles tendon repair: biochemical, histological, and mechanical analysis. *Rev Bras Ortop.* 2004;39(10):590-600.

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.

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

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

Karu T. The science of low power laser therapy. Australia: Gordon and Breach Science Publishers. 1996.

Knobloch K, Kraemer R, Lichtenberg A, Jagodzinski M, Gossling T, Richter M, Zeichen J, Hufner T, Krettek C. Achilles Tendon and Paratendon Microcirculation in Midportion and Insertional Tendinopathy in Athletes. *Am J Sports Med.* 2006;34(1):92-7.

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):345-50.

Low J, Reed A. Therapeutic ultrasound. In: Low J, Reed A. *Electrotherapy explained: Principles and practice.* 3rd ed. Oxford, UK: Butterworth-Heinemann, 2000:172-211.

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.

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

McDiarmid T, Burns PN. Clinical applications of therapeutic ultrasound. *Physiotherapy.* 1987;73(4):155-62.

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

Ng COY, Ng GYF, See EKN, Leung MCP. Therapeutic ultrasound improves strength of Achilles tendon repair in rats. *Ultrasound Med Biol.* 2003;29(10):1501-6.

Ng GYF, Ng COY, See EKN. Comparison of therapeutic ultrasound and exercises for augmenting tendo healing in rats. *Ultrasound Med Biol.* 2004;30(11):1539-43.

Ng GYF, Fung DTC. The effect of therapeutic ultrasound intensity on the ultrastructural morphology of tendon repair. *Ultrasound Med Biol.* 2007;33(11):1750-4.

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

Oliveira FS, Pinfieldi CE, Parizoto NA, et al. 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;41:271-6

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;68:415-8.

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.

Pinfieldi CE, Ferreira LM, Liebano RE, Hochaman 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 MMMSS, 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;27:337-43.

Pugliese LS, Medrado AP, Reis SRA, Andrade ZA. The influence of low-level therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. *Pesqui Oodontol 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.

Riley G. Tendinopathy--from basic science to treatment. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2008;4(2):82-9.

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.

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

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.

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.

Sharma P, Maffulli N. Current Concepts Review - Tendon Injury and tendinopathy: Healing and repair. *J Bone Joint Surg Br.* 2005;87(1):187-202.

Sharma P, Maffulli N. Biology of tendon injury: healing, modeling and remodelling. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2006;6(2):181-90.

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.

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

Tsai WC, Hsu CC, Tang FT, Chou SW, Chen YJ, Pang JHS. Ultrasound stimulation of tendon cell proliferation and upregulation of proliferating cell nuclear antigen. *J Orthop Res.* 2005;23:970-6.

Tsai WC, Pang JH, Hsu CC, Chu NK, Lin MS, Hu CF. Ultrasound stimulation of types I and III collagen expression of tendon cell and upregulation of transforming growth factor beta. *J Orthop Res.* 2006;24(6):1310-6.

Tsai WC, Chen JYS. Therapeutic ultrasound stimulation of tendon cell Migration. *Connect Tissue Res.* 2008;49:367-73.

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. Métodos de biologia celular. In: Vidal BC, Mello MLS. *Biologia Celular*, Rio de Janeiro e São Paulo: Atheneu; 1987. p. 5-40.

Vidal BC. Image analysis of tendon helical superstructure using interference and polarized light microscopy. *Micron.* 2003;34(8):423-32.

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

Yeung CK, Guo X, Ng YF. Pulsed ultrasound treatment accelerates the repair of Achilles tendon rupture in rats. *J Orthop Res.* 2006;24(2):193-201.

Zantop Z, Tillmann B, Petersen W. Quantitative assessment of blood vessels of the human Achilles tendon: an immunohistochemical cadaver study. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2003;123:501-4.

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> .

A.C.L.A.M – *American College of Laboratory Animal Medicine* - Princípios éticos da experimentação animal. Disponível em: <http://www.aclam.org/>

Terminologia Anatômica. Terminologia anatômica Internacional. São Paulo: Ed. Manole Ltda; 2001.

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.

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

Goldenberg S. *et al.* Orientação Normativa para Elaboração e Apresentação de Teses. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica Reparadora UNIFESP-EPM. São Paulo: Livraria Médica Paulista Editora, 2008.

ABSTRACT

ABSTRACT

Background: The treatment of calcaneous tendons ruptures demands long-term rehabilitation. The ultrasound (US) and the low level laser therapy (LLLT) are the most applied and studied physical agents to treat this kind of injuries; however, only a few studies examined the combination of both physical agents. **Objective:** Evaluate the effects of the US and LLLT in the tendon healing in rats. **Methods:** Fifty male Wistar rats underwent lesion caused by direct trauma on their calcaneus tendon were randomly assigned into 5 groups: group 1 (control), group 2 (US), group 3 (LLLT), group 4 (US+LLLT) and group 5 (LLLT+US). Animals were treated for 5 consecutive days. On the 6th day after lesion, tendons were removed and assessed under polarized light microscopy. The organization of collagen fibers was detected and measured through birefringence. The collagen type predominance in the calcaneous tendons was assessed through the picrosirius analysis. **Results:** The group 2 (US) when compared with controls showed an increase in collagen organization ($p=0.03$). Groups 2 (US), 3 (LLLT) and 5 (LASER+US) revealed increase of the type I collagen synthesis when compared to control ($p<0.01$, $p=0.01$ and $p<0.01$, respectively). No differences were found among the treatment groups. The type III collagen did not show differences in any of the groups. **Conclusion:** The US and the LLLT are effective on tendon healing in rats. The US increase collagen organization. The US, the LLLT and the combination of LLLT+US increase type I collagen synthesis.

APÊNDICE

APÊNDICE 1

Apêndice 1. Medidas descritivas dos grupos, obtidas com a análise de birrefringência.

Grupos	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Grupo 1 (controle)	33,5	2,7	30,5	37,6
Grupo 2 (US)	42,2	7,1	37,0	60,0
Grupo 3 (Laser)	44,0	12,3	25,0	60,5
Grupo 4 (US+Laser)	40,4	6,4	32,4	53,7
Grupo 5 (Laser+US)	42,7	8,3	30,7	57,3
Total	40,5	8,4	25,0	60,5

APÊNDICE 2

Apêndice 2. Medidas descritivas dos grupos, obtidas com a análise de picosirius para avaliação de colágeno tipo I.

Grupos	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Grupo 1 (Controle)	4,40	3,26	0,96	10,25
Grupo 2 (US)	12,51	4,43	5,92	21,08
Grupo 3 (Laser)	12,32	5,52	4,69	22,03
Grupo 4 (US+Laser)	12,67	7,62	3,18	20,04
Grupo 5 (Laser+US)	15,17	5,87	6,65	24,12
Total	11,49	6,41	0,96	24,12

APÊNDICE 3

Apêndice 3. Medidas descritivas de cada grupo, obtidas com a análise de picosirius para avaliação de colágeno tipo III.

Grupos	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Grupo 1 (Controle)	60,52	22,61	17,19	86,35
Grupo 2 (US)	51,45	11,63	38,30	70,17
Grupo 3 (Laser)	47,01	18,93	24,84	75,91
Grupo 4 (US+Laser)	48,55	16,66	20,38	71,65
Grupo 5 (Laser+US)	46,71	9,98	24,00	59,76
Total	50,93	16,84	17,19	86,35

ANEXO

ANEXO 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, 28 de setembro de 2007
CEP 1272/07

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) VIVIANE TIMM WOOD
Co-Investigadores: Bernardo S Hochman (orientador), Carlos Eduardo Pinfieldi, Nivaldo A Parizotto, Lydia Masako Ferreira
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: **“Laser de baixa intensidade e ultra-som de baixa intensidade no reparo tendíneo em lesão parcial do tendão calcâneo em ratos”**.

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Experimental, categoria C - estudo crônico.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Não se aplica.

OBJETIVOS: Avaliar os efeitos do laser de baixa intensidade e do ultra-som de baixa intensidade, no reparo tendíneo em lesão parcial do tendão calcâneo em ratos..

RESUMO: estudo com 50 ratos Wistar EPM-1. Anestésico: cloridrato de tiletamina e cloridrato de zolazepan-zoletil 50. Eutanásia: hiperdosagem anestésica. Os animais serão submetidos à lesão parcial do tendão calcâneo direito, por meio de um trauma direto. Serão constituídos 5 grupos: 1- controle, 2- os animais receberão o tratamento com ultra-som durante 5 dias consecutivos; 3- os animais receberão o tratamento com laser durante 5 dias consecutivos; 4- receberão o tratamento simulado com os aparelhos de ultra-som e laser, desligados durante 5 dias consecutivos); 5- receberão o tratamento com ultra-som e laser durante 5 dias consecutivos. Os animais serão sacrificados no 6º dia após a lesão. Os tendões direitos serão retirados cirurgicamente por dissecação e encaminhados para procedimento histológico. Fibras colágenas serão analisadas por método de birrefringência em luz polarizada..

FUNDAMENTOS E RACIONAL: Alguns estudos mostram que recursos físicos, incluindo tratamento com ultra-som, estimulação elétrica, campos eletromagnéticos e terapia a laser de baixa intensidade, podem acelerar o reparo da lesão, melhorando a coloração e aspecto da cicatriz, trazendo efeitos benéficos para a cicatrização tendínea. Este estudo visa avaliar o efeito do laser de baixa intensidade e ultrassom no reparo tendíneo, em ratos, utilizando métodos histológicos.

MATERIAL E MÉTODO: Estão descritos os procedimentos a serem realizados..

DETALHAMENTO FINANCEIRO: sem financiamento externo - R\$ 11030,00.

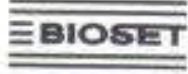



CRONOGRAMA: 12 meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: Mestrado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: 27/9/2008 e 27/9/2009.

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

Anexo 2 – Laudo de Conformidade do Produto (LCP) Bioset.

	Laudo de Conformidade do Produto	LCP
Declaração		
<p>Vimos por meio deste, declarar, de acordo com os Registros da Qualidade gerados durante o processo de fabricação, que o aparelho: <i>S.1070 - SONACEL Expert 3,0MHz</i>, n.º série: <i>0403001</i>, está em conformidade com os parâmetros exigidos pela norma NBR IEC 60601-1. Em especial, o aparelho possui uma Área Efetiva de Radiação (ERA) de 0,5cm² do cabeçote.</p>		
<p>Segue abaixo a relação de testes exigidos por norma:</p>		
<ul style="list-style-type: none"> - Funcionamento do aparelho; - Aterramento de proteção; - Corrente de fuga e correntes auxiliares através do paciente - Rigidez dielétrica 		
<p>Informamos também que o aparelho foi calibrado, utilizando-se dispositivos de medição e balança Ultrasound Power Meter – Model UPM-DT10, devidamente calibrados e rastreados.</p>		
<p>Sem mais para o momento, subscrevemo-nos.</p>		
<p>Atenciosamente,</p>		
		
		
Produção	Garantia da Qualidade	
<u>03 / 2007</u> Data (mm/aaaa)	<u>03 / 2007</u> Data (mm/aaaa)	

Anexo 3 – Tabela de calibração do equipamento de US BioSet.



RIO CLARO, 13 DE JUNHO DE 2007.

Tabela de calibração de cabeçote reduzido tipo cone com diâmetro de 0,8 cm.

$$A = \pi \cdot r^2 = 3,147 \cdot (0,4)^2 = 3,14 \cdot 0,16 = 0,5 \text{ cm}^2$$

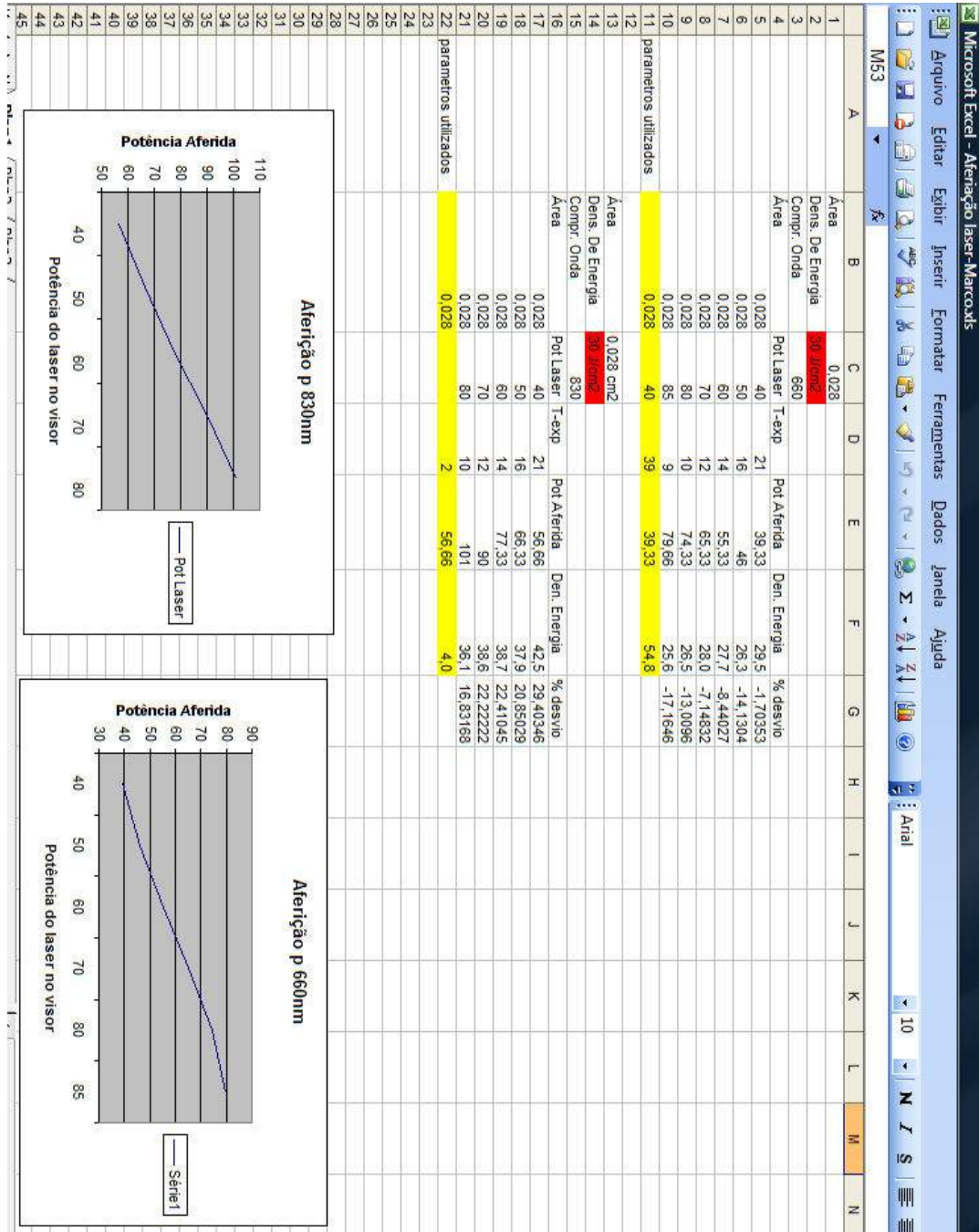
$$ERA = 0,5 \text{ cm}^2$$

Intens(W/cm ²)	ERA 3,5W	Reduzido Cabeçote 0,5W/cm ²
0,10	0,35	0,10
0,20	0,70	0,20
0,30	1,05	0,30
0,40	1,40	0,40
0,50	1,75	0,50
0,60	2,10	0,60
0,70	2,45	0,70
0,80	2,80	0,80
0,90	3,15	0,90
1,00	3,50	1,00
1,10	3,85	1,10
1,20	4,20	1,20
1,30	4,55	1,30
1,40	4,90	1,40
1,50	5,25	1,50
1,60	5,60	1,60
1,70	5,95	1,70
1,80	6,30	1,80
1,90	6,65	1,90
2,00	7,00	2,00

Lisvaldo Barros

BIOSET Indústria de Tecnologia Eletrônica Ltda. - Av. 55, n.º1212 - Jardim Kennedy - Rio Claro - SP
 Cx. Postal 95 - CEP 13501-540 - Fone/Fax: (0xx19) 3534-3693 e 3524-8119 Ramal 28
 Email:assistencia@bioset.com.br - hotmail: assistenciabioset@hotmail.com
 site: www.bioset.com.br

Anexo 4 - Laudo de Conformidade do Laser



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.