

RAFAEL CORRÊA GOBBATO

**DIODO EMISSOR DE LUZ (*LED*) λ
850nm NO REPARO DO TENDÃO DO
CALCÂNEO, EM RATOS.**

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

SÃO PAULO

2010

RAFAEL CORRÊA GOBBATO

**DIODO EMISSOR DE LUZ (*LED*) λ
850nm NO REPARO DO TENDÃO DO
CALCÂNEO, EM RATOS.**

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

ORIENTADOR: Prof^a. Dr^a LYDIA MASAKO FERREIRA

CO-ORIENTADORES: Prof. BERNARDO HOCHMAN

Prof. CARLOS EDUARDO PINFILDI

SÃO PAULO

2010

Gobbato, Rafael Corrêa.

Diodo Emissor de Luz (*LED*) λ 850nm no reparo do tendão do calcâneo, em ratos./ Rafael Corrêa Gobbato. — São Paulo, 2010.

xxii, 101f.

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

Título em inglês: Light emitting diode λ 850nm on repair of calcaneus tendon in rats.

1.Fototerapia. 2.Birrefringência. 3.Tendão Calcâneo. 4.Colágeno. 5.Cicatrização. 6.Ratos.

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

COORDENAÇÃO: Prof. Dr. MIGUEL SABINO NETO

DEDICATÓRIA

À Deus

Agradeço-te:

*pela coragem de facear as dificuldades criadas por
mim mesmo,*

*pelas provas que me aperfeiçoam o raciocínio que
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)

*Aos meus queridos pais, **MARIA DE LOURDES**, chamada carinhosamente de “Pequeninha” (a pessoa mais doce que já conheci em toda minha vida) e **PAULINHO** (um lutador a quem tenho orgulho de chamar de pai), meus ídolos, exemplo de vida, por terem dado os melhores presentes que poderiam me dar: a educação, o respeito, a possibilidade de crescimento como homem e principalmente o amor incondicional.*

*Ao meu irmão **GLAUBER**, por todo amor e amizade, por ser este guri com força e garra que com muita perseverança corre atrás dos seus objetivos.*

Enfim o meu muito obrigado aos três, por abdicarem de muitas coisas financeiras e de lindos momentos familiares, para que a realização deste sonho pudesse tornar-se possível.

*Às minhas queridas e lindas gurias,
minhas avós: avó **ELBA** (in memorian)
pelos ensinamentos dados a minha mãe.
Sinto em não ter lhe conhecido;*

*Avó **CARMEM** (minha querida avó
emprestada) por ter guiado e conduzido
minha mãe e por todo amor que sempre
teve por mim;*

*E minha **NONNA INÊS** pela
simplicidade, carinho, amor e
principalmente por seu sorriso que
encanta a todos.*

*Aos meus avôs: avô **ADELINO**, um
exemplo de juventude e sabedoria que aos
77 anos tornou-se bacharel em Direito,
obrigado pelo exemplo;*

*E **NONNO SANTO** (in memorian)
meu maior incentivador a escolher esta
linda profissão de fisioterapeuta. Sei que
você, onde quer que esteja, está sempre
guiando meus passos nos parreirais da
vida.*

Un bacione e grazie a tutti.

*À minha força, companheira, melhor
amiga, ao meu amor, minha noiva
SIMONE. Obrigado por fazer parte da
minha vida e pela benção de me fazer
feliz todos os dias.*

Te amo

*“... Everytime you walk out that door
I just love you more
Won't you just stay here with me
Everytime you walk out that door
I just love you more Baby
Won't you stay here with me Stay with
me...”*

(Everytime – Donavon Frankenreiter)

AGRADECIMENTOS

À 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 e orientadora deste trabalho, por ter me orientado durante esses dois anos que passamos juntos. Um exemplo a ser seguido. Uma mulher visionária, com uma capacidade incrível de gerir diversas pessoas com nível de excelência nunca visto antes. Meu muito obrigado pela oportunidade de conviver e dividir pensamentos com a senhora. Seus ensinamentos serão guardados para sempre.

Ao 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, pelos ensinamentos dados.

Ao 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 sorriso, simpatia, amizade e principalmente pelos

ensinamentos de vida passados. O senhor tem a capacidade de cativar as pessoas como ninguém e sua dedicação, aliada ao grandioso conhecimento que o senhor adquire, são estimulantes a qualquer aluno.

Ao PROF. **CARLOS EDUARDO PINFILDI**, Professor Adjunto do Curso de Fisioterapia da Universidade Federal de São Paulo Campus Baixada Santista – UNIFESP/SANTOS 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 irmão, um exemplo. A sua trajetória é um exemplo a todos os fisioterapeutas do Brasil. Obrigado por me guiar tanto academicamente como pessoalmente.

Ao PROF. **RICHARD ELOIN LIEBANO**, Professor da Universidade Cidade de São Paulo e co-orientador do Programa de Pós- Graduação em Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, pela parceria, respeito e incentivo.

Ao PROF. DR. **NIVALDO A. PARIZOTTO** Professor orientador do Programa de Pós- Graduação da Universidade Federal de São Carlos – UFSCAR na linha de pesquisa de processos de avaliação e intervenção em

fisioterapia do sistema músculo-esquelético, pela co-orientação informal e por me receber com muito carinho e respeito acreditando sempre em mim.

À PROF^a. **STELLA PECCIN**, Professora do Curso de Fisioterapia da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, Pesquisadora Colaboradora do Centro Cochrane do Brasil, por ter confiado neste aluno ao fazer o convite de vir para São Paulo quando eu era apenas um estagiário de fisioterapia. Meu muito obrigado pelos ensinamentos, conselhos e acima de tudo pelo carinho demonstrado durante estes quatro anos. Sem a sua presença na minha vida nada teria acontecido.

Aos demais **DOCENTES** da Disciplina de Cirurgia Plástica e do Programa de Pós- Graduação em Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, pelas críticas e questionamentos nas aulas. Suas contribuições foram de grande importância para o meu aprimoramento acadêmico e crescimento profissional.

À minha grande amiga **VIVIANE TIMM WOOD**, egressa do Programa de Pós- Graduação em Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP e Professora do Curso de Fisioterapia da Universidade Mario Schenberg, colega desde os tempos de estágio no

Hospital Moinhos de Vento em Porto Alegre, pela incomparável contribuição e ajuda no presente trabalho. O meu muito obrigado pela companhia nas intermináveis horas de laboratório e cansativas e onerosas viagens até São Carlos. Com certeza a sua contribuição foi essencial para a realização deste trabalho.

Ao meu grande amigo e irmão **MARCO AURÉLIO INVALIDI NEVES** e a sua família, pelo apoio e ajuda neste trabalho e pelos momentos de grande alegria aos quais passamos nestes últimos quatro anos. Existem pessoas que mesmo com a distância permanecem conosco para o resto da vida.

A PROF^a. **MARIA IGNÊS**, Professora de Estatística da Universidade do Triângulo Mineiro - MG, pelo auxílio nas análises estatísticas dos resultados. Sou muito grata pela disponibilidade e paciência

Aos meus queridos colegas fisioterapeutas **FABIANNE FURTADO, MAIRA SILVA DA COSTA, MICHELE AKEMI NISHIOKA, PASCALE MUTTI TACANI, TIAGO SANTOS SILVEIRA, SILVELENA BONATO**, 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.

Aos demais colegas **PÓS-GRADUANDOS** do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, pelas dicas, críticas, comentários e exemplos.

À 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, pelo imenso carinho dado desde os tempos de Aperfeiçoamento.

Ao meu querido e simpático **TONINHO**, Bioterista da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, por toda ajuda dada, facilitando nosso trabalho de logística da parte experimental e pela ética e respeito aos animais.

A nutricionista **MSC. ÂNGELA B. FERREIRA**, egressa do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, por ter aceitado e encarado juntamente comigo

este grande desafio do mestrado. Suas palavras de incentivo e de carinho foram importantíssimas para o bom convívio destes dois anos.

Aos Fisioterapeutas **PAULO SÉRGIO BOSSINI E RENAN FANGEL** alunos do Programa de Pós- Graduação em fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos – UFSCAR, pela receptividade e acolhimento em São Carlos.

Ao **PROF. OSCAR PEITL FILHO**, Professor Titular da Universidade Federal de São Carlos – UFSCAR do Departamento de Engenharia de Materiais, por abrir as portas de seu laboratório e pela acessibilidade.

À UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO (UNIFESP), por me propiciar os melhores ensinamentos acadêmicos e profissionais possíveis, por ter me acolhido nestes quatro anos em São Paulo de uma forma inexplicável, tornando-se a minha segunda casa.

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

(UNIFESP) um programa de reconhecimento internacional com a expressiva **nota 6** nos dois últimos triênios da CAPES. Meu muito obrigado

*“Alcei a perna no pingo e saí sem rumo certo,
olhei o pampa deserto e o céu fincado no chão.
Troquei as rédeas de mão, mudei o pala de braço
e vi a lua no espaço clareando todo o rincão...”*

*...E a trotezito no mais fui aumentando a
distância, deixar o rancho da infância coberto
pela neblina. Nunca pensei que minha sina
fosse andar longe do pago e trago na boca o
amargo dum doce beijo de china...*

*...Como é linda a liberdade sobre o lombo do
cavalo e ouvir o canto do galo anunciando a
madrugada. Dormir na beira da estrada num
sono largo e sereno e ver que o mundo é pequeno
e que a vida não vale nada...*

*...Falam muito no destino, até nem sei se
acredito. Eu fui criado solito, mas sempre bem
prevenido. Índio do queixo torcido, que se
amansou na experiência. Eu vou voltar pra
querência, lugar onde fui parido.”*

(Deixando o pago – Vitor Ramil)

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	iv
AGRADECIMENTOS.....	viii
EPÍGRAFE.....	xv
LISTA DE FIGURAS.....	xvii
LISTA DE TABELAS.....	xviii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xix
RESUMO.....	xxii
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVO.....	06
3. LITERATURA.....	08
4. MÉTODOS.....	21
5. RESULTADOS.....	35
6. DISCUSSÃO.....	48
7. CONCLUSÃO.....	71
8. REFERÊNCIAS.....	73
NORMAS ADOTADAS.....	88
ABSTRACT.....	91
APÊNDICES.....	93
ANEXOS.....	98
FONTES CONSULTADAS.....	100

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição dos grupos.....	24
Figura 2. Equipamento desenvolvido para lesionar o tendão do animal, vista frontal e peso na posição inicial.....	25
Figura 3. Posicionamento da pata do animal antes da queda do peso para a produção da lesão.....	26
Figura 4. Vista superior do peso sobre o tendão no momento da lesão	26
Figura 5. Equipamento <i>LED</i>	27
Figura 6. O tendão calcâneo fixado com dois alfinetes na placa de petri e coberto com formol tamponado à 10%.....	30
Figura 7. Distribuição dos valores dos grupos referente ao alinhamento das fibras de colágeno.....	39
Figura 8. Alinhamento das fibras de colágeno do Grupo 1 (simulação), média de retardo óptico de $35,22 \pm 4,27$ nm.....	39
Figura 9. Alinhamento das fibras de colágeno do Grupo II ($10\text{J}/\text{cm}^2$)....	40
Figura 10. Alinhamento das fibras de colágeno do Grupo III ($20\text{J}/\text{cm}^2$).	40
Figura 11. Distribuição dos valores dos grupos referente à porcentagem de colágeno tipo III.....	45
Figura 12. Distribuição dos valores dos grupos referente à porcentagem de colágeno tipo I.....	45
Figura 13. Análise de picrossirius do Grupo I (simulação).....	46
Figura 14. Análise de picrossirius do Grupo II ($10\text{J}/\text{cm}^2$).....	46
Figura 15. Análise de picrossirius do Grupo III ($20\text{J}/\text{cm}^2$).....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Medidas descritivas do retardo óptico correspondente ao alinhamento das fibras de colágeno.....	36
Tabela 2. Valores de F e das probabilidades a eles associados, obtidos quando da aplicação do teste de Levene aos resultados obtidos com os três grupos.....	37
Tabela 3. Comparação entre os grupos, dois a dois, em relação ao alinhamento de fibras de colágeno.....	38
Tabela 4. Medidas descritivas relativas ao efeito do <i>LED</i> na reparação do tendão calcâneo de ratos, obtidas com o Colágeno Tipo III (picrossirius).....	41
Tabela 5. Medidas descritivas relativas ao efeito do <i>LED</i> na reparação do tendão calcâneo de ratos, obtidas com o Colágeno Tipo I (picrossirius).....	41
Tabela 6. Valores de F e das probabilidades a eles associados, obtidos quando da aplicação do teste de Levene aos resultados obtidos com os três grupos, considerando-se os valores obtidos com o Colágeno Tipo III (%) e com o Colágeno Tipo I (%).....	42
Tabela 7. Resultado da comparação entre os grupos, dois a dois, em relação ao colágeno Tipo III	43
Tabela 8. Resultado da comparação entre os grupos, dois a dois, em relação ao 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
As-Ga	= arseneto de gálio
ATP	= adenosina trifosfato
BNR	= <i>beam non-uniformity ratio</i>
Ca ²⁺	= cálcio
°C	= graus Celsius
CEDEME	= Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais - UNIFESP
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	= Hematoxilina-Eosina
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)
<i>LED</i>	= <i>Light emitting diode</i> (diodo emissor de luz)
LEDLLT	= terapia <i>LED</i> de baixa intensidade
LLLT	= <i>Low-level laser therapy</i> (terapia <i>laser</i> de baixa intensidade)
mg/kg	= miligrama por quilograma de massa corporal
mg	= miligrama
MHz	= mega Hertz
min	= minutos
mJ	= miliJoule
ml	= mililitro
mm	= milímetro
m/min	= metros por minuto
mW	= miliWatts
mW/cm ²	= miliWatts por centímetro ao quadrado
n ^o	= número da amostra
nm	= nanômetro
NS	= não significante
OR	= <i>optical retardations</i> (retardo óptico)
P	= potência
PCNA	= <i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PO	= pós-operatório

RNA	= <i>ribonucleic acid</i>
seg.	= segundos
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
*	= <i>significante</i>
λ	= comprimento de onda
α	= alfa
μm	= micrômetro
μm ²	= micrômetro ao quadrado
%	= porcentagem
°	= graus

RESUMO

Introdução: A ruptura do tendão calcâneo é considerada uma lesão grave devido ao seu escasso suprimento sanguíneo, podendo levar semanas ou meses para completar sua cicatrização. O *LED* (*Light Emitting Diode*) vem sendo uma alternativa em relação à luz *laser* na aceleração da cicatrização.

Objetivo: Avaliar o efeito do *LED* λ 850nm na reparação do tendão calcâneo de ratos. **Métodos:** Trinta ratos machos Wistar tiveram seus tendões calcâneos parcialmente lesionados por um trauma direto e foram distribuídos aleatoriamente em 3 grupos: Grupos 1-simulação; 2- *LED* com densidade de energia $10\text{J}/\text{cm}^2$ e 3- *LED* com densidade de energia de $20\text{J}/\text{cm}^2$. Foram tratados por 6 dias consecutivos e no 7º dia após lesão os tendões foram removidos e avaliados quanto ao alinhamento das fibras (birrefringência) e quantidade de colágeno tipos I e III (picosirius).

Resultados: Grupo 2 ($10\text{J}/\text{cm}^2$) apresentou melhor alinhamento das fibras de colágeno, seguido pelo Grupo 3 ($20\text{J}/\text{cm}^2$) quando comparados ao Grupo 1 (simulação) ($p=0^*$). Os Grupos 2 e 3 apresentaram maior quantidade de colágeno tipo I que o Grupo 1 ($p=0^*$). Não houve diferença entre os grupos tratamento entre si para esta avaliação. Os Grupos 2 e 3 apresentaram menor quantidade de colágeno tipo III que o simulação ($p=0^*$). Não houve diferença entre os grupos 2 e 3 entre si para esta avaliação. **Conclusão:** O *LED* foi eficaz no processo de reparo de lesão parcial do tendão calcâneo em ratos, promovendo maior alinhamento das fibras de colágeno e aumento na quantidade de colágeno tipo I na região da lesão.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O tendão calcâneo é o tendão mais volumoso e resistente do corpo humano (MAHAN & CARTER, 1992; NERY *et al.*, 1997), sendo imprescindível para o funcionamento do mecanismo articular do tornozelo. Tem como principais funções a transmissão da força produzida pelo músculo para o osso e a resistência de cargas significantes de força tênsil (MAFFULLI *et al.*, 2000; VIDAL *et al.*, 2003; MOLLOY *et al.*, 2004; WANG, 2006; ELWAKIL, 2007).

Este é um dos tendões mais comumente lesados e isso se deve a microtraumas repetitivos, excesso de uso e ao aumento da participação em atividades esportivas pela sociedade (WREN *et al.*, 2001; DEMIR *et al.*, 2004; NAIM *et al.*, 2005; TUMILTY *et al.*, 2008; POSTHUMUS *et al.*, 2010).

A ruptura desse tendão é considerada uma lesão grave devido ao seu escasso suprimento sanguíneo, podendo levar semanas ou até meses para completar sua cicatrização (BAXTER, 1994; BATTEGAY, 1995; AGAIBY *et al.*, 2000; BIDDER *et al.*, 2000). Esta lesão geralmente ocorre entre 2 a 6cm de sua inserção no osso calcâneo (ZANTOP, TILLMANN, PETERSEN, 2003).

Durante esse período, frequentemente o paciente é imobilizado para evitar rupturas, o que acarreta complicações funcionais (MURRELL, 1994), além de mudanças ultraestruturais (ENWEMEKA, 1991), bioquímicas (KANUS *et al.*, 1992; FILLIPIN *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2008) e biomecânicas do tendão (AN *et al.*, 1990; ENWEMEKA, 1992).

Com isso, estudos vêm sendo desenvolvidos na busca de um melhor entendimento dos processos de reparo tecidual e da diminuição do tempo de cicatrização (ENWEMEKA, 1989; ENWEMEKA, RODRIGUEZ, MENDOSA, 1990; DEMIR *et al.*, 2004) com a utilização de agentes físicos, tais como estimulação elétrica (CHAN, FUNG, NG, 2007), ultrassom terapêutico (ENWEMEKA, RODRIGUEZ, MENDOSA, 1990; GUM *et al.*, 1997; CUNHA, PARIZOTTO, VIDAL, 2001; DEMIR *et al.*, 2004) e terapia *laser* (*Light Amplification by Stimulated Emission Radiation*) de baixa intensidade (*Low-level laser therapy* ou LLLT) (PUGLIESE *et al.*, 2003; ÖZKAN *et al.*, 2004; ENWEMEKA *et al.*, 2004; SALATE *et al.*, 2005; CARRINHO *et al.*, 2006; RIZZI *et al.*, 2006; ELWAKIL, 2007; ARRUDA *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2008; TUMILTY *et al.*, 2008) demonstrando resultados positivos.

Atualmente, a terapia *laser* de baixa intensidade tem merecido destaque devido a alguns efeitos bioquímicos e celulares importantes, que contribuem para melhor resolução do processo cicatricial (PUGLIESE *et al.*, 2003). Alguns estudos têm demonstrado resultados importantes (SCHMITT *et al.*, 1993; REDDY *et al.*, 1998; ÖZKAN *et al.*, 2004; SALATE *et al.*, 2005) como o aumento na proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno (ALMEIDA-LOPES *et al.*, 2001; HAWKINS & ABRAHAMSE, 2006), neovascularização, reparação transcutânea de tendões (DYSON, YOUNG, 1982; BIHARI & MESTER, 1989; ENWEMEKA *et al.*, 1990; PARIZOTTO & BARANAUSKAS, 1998a; ALMEIDA-LOPES *et al.*, 1999; PINFILDI *et al.*, 2005; PRADO *et al.*, 2006), efeitos anti-oxidantes e bactericidas (RIZZI *et al.*, 2006; AVNI *et al.*, 2005) e aumento do metabolismo mitocondrial, estimulando a síntese de DNA e a proliferação celular (BASFORD, 1995; PARIZOTTO, 1998b).

No entanto, a terapia *laser* de baixa intensidade apresenta algumas características inerentes que a torna divergente no aspecto clínico, incluindo limitações como comprimento de onda, área de secção transversal do feixe e densidade de energia (EELLS *et al.*, 2004). Atualmente há divergências quanto às variáveis da luz, como coerência e colimação. Isso vem ocorrendo devido à introdução de algumas pesquisas utilizando a luz *LED* (*Light Emitting Diode*) como alternativa à luz *laser* (CORAZZA *et al.*, 2007).

A luz *LED* ou terapia *LED* de baixa intensidade (LEDLLT) vem tornando-se uma alternativa promissora em relação à luz *laser*, apresentando resultados associados à aceleração do processo cicatricial (VINCK *et al.*, 2003; TRELLES, ALLONES, MAYO, 2006) e baixo custo (CASTRO-SILVA *et al.*, 2002; CORAZZA *et al.*, 2007), além de atuar de modo eficiente em outras condições fisiológicas e patológicas (WONG-RILEY *et al.*, 2001; WEISS *et al.*, 2005).

As fontes *laser* e *LED* são muito semelhantes, sendo que ambas produzem uma faixa espectral relativamente estreita com o *LED* tendo o espectro mais largo. O que difere essas fontes é que a luz emergente do *LED* não é colimada e nem coerente (WHELAN, 2003; AL-WATBAN, 2003; CORAZZA, 2007).

VINCK *et al.* (2003) estudaram a influência da luz *LED* policromática com diferentes comprimentos de onda em culturas de fibroblastos, verificando aumento dessas células em ambos os tratamentos. CASALECHI *et al.* (2009) estudaram a influência da luz *LED* com comprimento de onda de $640\pm 20\text{nm}$ e densidade de energia de $20\text{J}/\text{cm}^2$ em ratos submetidos a ruptura total do tendão calcâneo por tenotomia mecânica, verificando melhora da qualidade do reparo tendíneo. Embora os

estudos citados acima tenham apresentado resultados satisfatórios com a utilização da luz *LED*, outros estudos mostram a ineficiência dessa fonte de luz ausente de coerência (BIHARI *et al.*, 1989; BERTOLONI *et al.*, 1993; PONTINEN *et al.*, 1996).

Por isso, torna-se necessária a realização de novos estudos com a luz *LED* em lesões do tendão calcâneo de ratos para verificar qual o tipo de luz que mais se aproxima do ideal.

OBJETIVO

2. OBJETIVO

Avaliar o efeito do *LED* com comprimento de onda λ 850nm na reparação da lesão parcial do tendão calcâneo, em ratos.

LITERATURA

3. LITERATURA

SCHMITT *et al.* (1993) estudaram os efeitos do *laser* de arseneto de gálio (As-Ga) no reparo tendíneo de 30 cães, distribuídos em três grupos, para avaliar o processo cicatricial. Os animais foram submetidos à tenotomia e tenorrafia do tendão calcâneo direito e esquerdo, com técnica atraumática, na região média entre as porções músculo-tendínea e ósseo tendínea, sendo que no membro esquerdo foi efetuada a aplicação de *laser* As-Ga ($4\text{J}/\text{cm}^2$). Posteriormente, as articulações do tarso foram imobilizadas durante 11 dias nos animais do grupo 1 (sacrificados nesta data) e durante 21 dias no grupo 2 (sacrificados no 22º dia) e no grupo 3 (sacrificados no 40º dia de pós-operatório). Os cães do grupo 3 foram submetidos a caminhadas diárias de 30 minutos nas duas semanas seguintes para estimular a mobilidade do tendão. A avaliação clínica dos efeitos da terapia *laser* de baixa intensidade na funcionalidade dos membros foi feita por meio de exame físico. Os tendões foram avaliados após necropsia realizada em todos os segmentos no 11º dia (grupo 1), 22º dia (grupo 2) e 40º dia (grupo 3) de evolução pós-operatória. O desempenho funcional do membro submetido à irradiação nos animais do grupo 3 mostrou-se melhor do que o do membro não submetido à irradiação. Macroscopicamente, os tendões submetidos à irradiação apresentaram melhor vascularização, menos aderência e cicatrização com melhor aparência do que o membro não submetido à irradiação. Os estudos histológicos revelaram que o *laser* não interferiu significativamente na produção de fibroblastos e na síntese de fibras colágenas.

LECH *et al.* (1996) investigaram o efeito do corticóide associado xilocaína em tecidos previamente traumatizados. A lesão foi realizada no peritendão da unidade músculo-tendínea do tríceps sural. Foram utilizados 20 ratos machos distribuídos em quatro grupos com cinco animais cada. O primeiro grupo foi o controle-padrão. Os grupos 2, 3 e 4 foram traumatizados bilateralmente por um aparelho lesionador. No grupo 2 os animais foram lesionados e isolados. No grupo 3 os animais foram lesionados e submetidos à infiltração de xilocaína em três séries, após trauma, na 1^o e 2^o semana. No grupo 4 os animais foram lesionados e submetidos à infiltração de xilocaína a 2% e corticóide, de acetato de metilprednisolona 40mg/ml em 3 séries, após trauma, na 1^o e 2^o semana. Os animais foram sacrificados em cinco tempos diferentes: 24h, 1^o, 2^o, 3^o e 4^o semanas, um animal para cada tempo. Os autores observaram efeito deletério nos aspectos anatomopatológicos e biomecânicos na unidade músculo-tendão dos animais experimentais em que foi utilizada associação de infiltração de xilocaína e corticóide.

GUM *et al.* (1997) estudaram o processo de reparação tendínea utilizando um protocolo de terapia combinada com estimulação elétrica transcutânea (corrente galvânica), *laser* de As-Ga 904nm, 1J/cm² e ultrassom (US). O tendão calcâneo de 63 coelhos foi submetido à tenotomia, sutura e imobilização e estes foram submetidos a um protocolo de terapia combinada por cinco dias. Após a retirada dos imobilizadores, a terapia foi continuada por mais nove 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 *laser* de baixa intensidade e sobrecarga mecânica deveria, futuramente, acelerar a cicatrização em tenotomias experimentais e na reparação do tendão calcâneo em coelhos. Após tenotomia e sutura tendínea, os coelhos do grupo experimental e controle foram imobilizados por cinco dias. Os tendões reparados do grupo experimental receberam sobrecarga mecânica via estimulação elétrica pela indução da contração do músculo tríceps sural por cinco dias. Os tendões do grupo experimental foram tratados diariamente, com dose de $1\text{J}/\text{cm}^2$ com *laser* de Hélio Neônio (He-Ne) ao longo de 14 dias no período experimental. Observou-se que a combinação do *laser* com sobrecarga mecânica aumenta o estresse máximo, tensão máxima e o módulo de imaturidade da elasticidade dos tendões em 30, 13 e em 33%, respectivamente. Entretanto, não houve diferença nos índices biomecânicos de reparação entre os tendões controle e experimental. Contudo, os achados indicaram que a combinação da terapia *laser* de baixa intensidade com a sobrecarga mecânica precoce nos tendões aumenta a síntese de fibras colágenas, com efeitos biomecânicos nas margens do reparo tendíneo.

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

tendinopatia. Os tendões fetais foram retirados de quatro fetos abortados na idade gestacional de três semanas e colocados em um recipiente estéril contendo 20ml de *phosphate-buffered* salina estéril (PBS). Os tendões sem ruptura foram retirados de sete pacientes que tiveram sua perna amputada, em condições estéreis e transferidos para um recipiente estéril contendo meio de cultura. Os autores verificaram que os tendões com tendinopatia e ruptura parcial apresentavam maior quantidade de colágeno tipo III quando comparados com tendões fetais e sem rupturas. Já os tendões fetais apresentavam predominância de colágeno tipo I e III, enquanto os tendões sem ruptura apresentavam predominância de colágeno tipo I.

BJORDAL (2000) realizou uma revisão bibliográfica de estudos *in vivo* e *in vitro* sobre o efeito da terapia *laser* de baixa intensidade na cicatrização tendínea. Foram pesquisados na literatura artigos publicados após 1980 usando terapia *laser* de baixa intensidade (LLLT) nas bases de dados *Medline*, *Embase* e *Cochrane Library*, além de pesquisa manual nos jornais de fisioterapia na língua Inglesa e Escandinava. Foram selecionados parâmetros ideais de tratamento como estimativa de tempo, frequência de tratamento, densidade de energia (DE) e densidade de potência (DP). O autor constatou que um intervalo de densidade de energia e densidade de potência para inibição de prostaglandinas PGE2 e produção de Interleucina Beta-1 foram de $3,2 - 6,3\text{J}/\text{cm}^2$ e $5,3\text{W}/\text{cm}^2$ mensurados pela estimulação de células fibroblásticas após cinco dias de irradiação. Para a síntese de fibras colágenas, o intervalo de densidade de energia e densidade de potência foram $0,2 - 2,0\text{J}/\text{cm}^2$ e $2 - 20\text{W}/\text{cm}^2$, respectivamente. Demonstrou-se, também, que tratamentos diários por duas semanas com parâmetros ideais produzem um aumento máximo de 37% na produção de

colágeno. Contudo, densidade de energia acima de $4,5\text{J}/\text{cm}^2$ e densidade de potência maior do que $30\text{W}/\text{cm}^2$ inibem o metabolismo de fibroblastos e diminuem a síntese de colágeno. DEMIR *et al.* (2004) realizaram um estudo experimental comparando os efeitos do *laser*, ultra-som (US), e a combinação do *laser* com ultra-som na cicatrização tendínea. Foram utilizados 84 ratos machos distribuídos em seis grupos: Grupo 1 tratamento com US (contínuo, intensidade de $0,5\text{W}/\text{cm}^2$, frequência de 1MHz, 5 minutos), Grupo 2 controle do US, Grupo 3 tratamento com *laser* (As-Ga, $\lambda = 904\text{nm}$, frequência 16Hz, potência média de 6mW e densidade de energia de $1\text{J}/\text{cm}^2$), Grupo 4 controle do *laser*, Grupo 5 tratamento combinado (*laser* + US contínuo) e Grupo 6 controle combinado (*laser* + US contínuo). O tendão calcâneo esquerdo foi usado como controle e o direito foi usado para tratamento; os dois tendões foram lesados longitudinalmente. O tratamento começou no 1º dia de pós-operatório e durou nove dias (sessões). Embora o *laser*, o ultra-som e a combinação dos dois agentes tenham aumentado a reparação bioquímica e biomecânica do tendão mais do que o grupo controle, nenhuma diferença significativa foi encontrada entre eles.

TAVARES, MAZZER, PASTORELLO (2005) estudaram as alterações causadas pela irradiação 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 no 15º dias do pós-operatório. Houve diferença significativa ($p < 0,05$)

entre o grupo controle e o grupo tratado na deposição de colágeno e presença de células inflamatórias, sugerindo que a terapia *laser* de baixa intensidade proporciona aceleração da cicatrização na tenotomia calcânea em ratos, pelo aumento da deposição de colágeno tanto na fase inicial quanto na fase tardia do tratamento.

SALATE *et al.* (2005) estudaram os efeitos do *laser* 660nm, com potência de 10mW e 40mW, no processo de angiogênese e qualidade do reparo após lesão parcial do tendão calcâneo em ratos machos, sendo que 96 foram submetidos à lesão com queda de um peso de 186 gramas, de uma altura de 20cm, sobre o tendão direito. Estes foram distribuídos aleatoriamente em três grupos, tratados em 3, 5 e 7 dias. Os grupos foram redistribuídos em 4 subgrupos submetidos ao tratamento com *laser* com potência de 10 e 40mW, grupo controle (placebo) e grupo simulação da aplicação *laser* (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 ($p < 0,01$). Os autores concluíram que a terapia *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 após três 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 à 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 35seg e aplicação diária. Todos os animais tiveram seus tendões removidos no 21^oPO 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.

CARRINHO *et al.* (2006) realizaram um estudo comparando dois tipos de *laser* de baixa intensidade (685nm e 830nm), diferentes densidades de energia e uma potência fixa de 15mW, no reparo tendíneo do tendão calcâneo de ratos. Esses animais foram lesionados por uma tenotomia total unilateral realizada 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 dois subgrupos: o grupo 1 em subgrupo A que recebeu *laser* 685nm, 3J/cm² e subgrupo B que recebeu tratamento com *laser* 685nm, 10J/cm²; o grupo 2 foi distribuído em subgrupo C que recebeu tratamento com *laser* de 830nm, 3J/cm² e subgrupo D que recebeu tratamento com *laser* de

830nm e $10\text{J}/\text{cm}^2$; e o grupo 3 foi distribuído em subgrupo E, controle lesado/simulação (CL/*Sham*) e subgrupo F, controle padrão (CP). Os achados mostraram que o reparo tendíneo do subgrupo A tratado com *laser* de 685nm e $3\text{J}/\text{cm}^2$ apresentou melhores resultados, considerando o nível de organização e orientação das fibras colágenas no local da lesão, diferindo estatisticamente dos demais subgrupos.

ARRUDA *et al.* (2007) estudaram diferentes comprimentos de onda da terapia *laser* de baixa intensidade na regeneração tendínea após tenotomia. Os animais foram distribuídos em 5 grupos, submetidos à tenotomia total por meio de cisalhamento transversal do tendão na porção média entre a inserção calcânea e a junção miotendínea, com exceção do grupo padrão em que não houve lesão. O grupo A foi submetido à irradiação *laser* 904nm, diodo de Ga-As, emissão pulsada, duração do pulso de 180ns, frequência de pulso de 2000Hz, potência de pico 15mW e densidade de energia de $3\text{J}/\text{cm}^2$. O grupo B foi submetido à irradiação *laser* 670nm, diodo de Al-Ga-In-P, emissão contínua, potência 30mW e densidade de energia de $3\text{J}/\text{cm}^2$. O grupo AB recebeu irradiação de ambos os *laser* 670nm e 904nm associados. O grupo *sham* foi submetido à simulação do tratamento. A análise estatística mostrou que todos os grupos irradiados apresentaram valores de retardo óptico maiores quando comparados ao grupo *sham*, indicando melhor organização das fibras colágenas ao longo do eixo longitudinal do tendão. O grupo AB foi o que apresentou melhores resultados quando comparado aos demais grupos.

CASALECHI *et al.* (2009) estudaram o efeito da terapia com diodo emissor de luz (*LED*) na faixa espectral do vermelho visível, com comprimento de onda λ $640\pm 20\text{nm}$ (AsGaAl), potência de 100mw, densidade de energia de $20\text{J}/\text{cm}^2$ e área de secção transversal do feixe de $0,5\text{cm}^2$ durante 120 segundos na regeneração tecidual do tendão calcâneo de ratos submetidos à lesão total através de tenotomia total. Neste estudo, foram utilizados 30 ratos machos Wistar, com 12 semanas de idade, pesando aproximadamente $350\pm 20\text{g}$. Estes foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos (cinco ratos em cada), sendo três grupos controles (C1, C2 e C3), sacrificados respectivamente, no sétimo, 14º dia e no 21º dia após procedimento cirúrgico, não recebendo tratamento com *LED* e três grupos tratamentos (L1, L2 e L3), também sacrificados respectivamente no sétimo, 14º dia e no 21º dia após procedimento cirúrgico, mas estes submetidos ao tratamento com *LED* realizado através da técnica pontual com contato na pata direita de todos os animais. Após avaliação histológica por microscopia de luz onde foi verificada a qualidade de reparação destes tendões, os animais sacrificados no sétimo dia após procedimento cirúrgico do grupo tratamento (L1) apresentavam resultados muito similar ao grupo controle sacrificado no 14º dia (C2). O mesmo achado foi encontrado na comparação entre o grupo tratamento, sacrificado no 14º dia (L2) com o grupo controle sacrificado no 21º dia (C3). O grupo tratamento sacrificado no 21º dia (L3) apresentou a máxima graduação de remodelamento em relação a todos os demais grupos. Os resultados sugerem que a qualidade da remodelação dos grupos tratados com *LED* seja atingida mais rapidamente que a dos grupos que não passaram por tratamento. Em suma, em todos os grupos tratados com *LED* a qualidade do tecido reparado foi superior ao grupo controle em todos os tempos experimentais, com celularidade significativamente menor em sete

dias para o grupo irradiado. Este dado aponta para aumento da atividade de síntese de colágeno, provavelmente relacionada à redução do processo inflamatório nos primeiros momentos da reparação, atestado pela superioridade da qualidade de remodelação nos grupos tratados.

OLIVEIRA *et al.* (2009) estudaram o efeito da terapia *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. O Grupo 1 (controle padrão) sem lesão, Grupo 2 (controle) com lesão e sem tratamento, e os Grupos 3, 4 e 5 em que os animais sofreram lesão e foram submetidos ao tratamento com *laser* durante três, cinco e sete dias, respectivamente. Os animais dos grupos 2, 3, 4 e 5 foram submetidos à eutanásia no 8º dia após a lesão e avaliados por microscopia de polarização para analisar o grau de organização das fibras de colágeno. Os grupos experimentais e o grupo controle padrão mostraram valores maiores em relação ao alinhamento das fibras de colágeno comparados ao grupo controle e não houve diferença significativa quando comparados os Grupos 1 e 4, o mesmo acontecendo entre os Grupos 3 e 5. A terapia *laser* de baixa intensidade foi efetiva na melhora da organização das fibras colágenas do tendão calcâneo submetido à lesão parcial.

WOOD *et al.* (2010) realizaram um estudo experimental comparando os efeitos do *laser*, ultra-som (US) e a combinação do *laser* com ultra-som na reparação do tendão calcâneo submetido à lesão parcial. Foram utilizados 50 ratos machos, distribuídos aleatoriamente em cinco grupos com dez animais cada, sendo que todos os animais foram submetidos à lesão com queda de um peso de 186 gramas de uma altura de 20cm. No grupo 1 (controle), os animais não receberam nenhum tratamento. No grupo 2, foi aplicado ultra-som (pulsado à 20%, frequência 3MHz, intensidade 1W/cm², 5 minutos) durante 5 dias consecutivos. Já no grupo 3, foi aplicado *laser* (As-Al-Ga-830nm, potência de 40mw, densidade de energia de 4J/cm², energia total de 0,12J, área de secção transversal do feixe de 0,028cm² com feixe contínuo), durante 5 dias consecutivos. No 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. Já para o 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. Todos os animais do estudo foram mortos no 6º dia após a lesão e avaliados por microscopia de polarização para analisar o grau de organização das fibras de colágeno e avaliação de picrosirius por microscopia de luz polarizada para analisar a presença de fibras colágenas finas (Tipo III) e espessas (Tipo I). Para análise do grau de organização das fibras de colágeno, apenas o grupo 2 (US) apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo controle, assim não havendo diferenças entre os demais grupos. Na avaliação de picrosirius para as fibras espessas (Tipo I), os grupos 2 (US), 3 (*laser*) e 5 (*laser* + US) apresentaram diferença

estatística em relação ao grupo controle, porém não ocorrendo entre os grupos tratamento. Já para avaliação das fibras finas (Tipo III), não houve diferença entre os grupos. Assim, concluíram que o US, *laser* e a combinação do *laser* e US resultaram no aumento da quantidade de colágeno tipo I na região da lesão e que o US promoveu maior alinhamento das fibras de colágeno.

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 0983/08 (Anexo I).

4.2 AMOSTRA

Para a realização deste estudo foram utilizados 30 ratos machos (*Rattus norvegicus*: var. albinus, Rodentia, Mammalia, da linhagem Wistar EPM), adultos, pesando entre 250 e 320 gramas (3 meses de idade), oriundos do Biotério Central do centro de desenvolvimento de modelos experimentais (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

Os procedimentos experimentais foram realizados no 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 e após 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 Figura 1):

Grupo 1 (simulação): os animais foram submetidos ao procedimento de lesão do tendão calcâneo, por meio de lesão direta. Após 1 minuto receberam simulação do tratamento com o aparelho *LED* desligado durante 67 segundos.

Grupo 2: os animais foram submetidos ao procedimento de lesão do tendão calcâneo. Após 1 minuto receberam o tratamento com luz *LED* (λ) 850nm, potência 150mW , densidade de energia 10J/cm² e energia total de 5J durante 6 dias consecutivos.

Grupo 3: os animais foram submetidos ao procedimento de lesão do tendão calcâneo. Após 1 minuto receberam o tratamento com luz *LED* (λ) 850nm, potência 150mW , densidade de energia 20J/cm² e energia total de 10J durante 6 dias consecutivos.

Os animais de todos os grupos experimentais foram submetidos à eutanásia por hiperdosagem anestésica no 7º dia após a lesão. Os animais

dos grupos experimentais (grupos 2 e 3) foram submetidos ao tratamento com luz *LED* e a técnica utilizada foi a pontual com contato em apenas um ponto no local da lesão. Nesta técnica, a caneta da luz *LED* permaneceu, durante o procedimento de irradiação, a 90° perpendicular ao tendão.

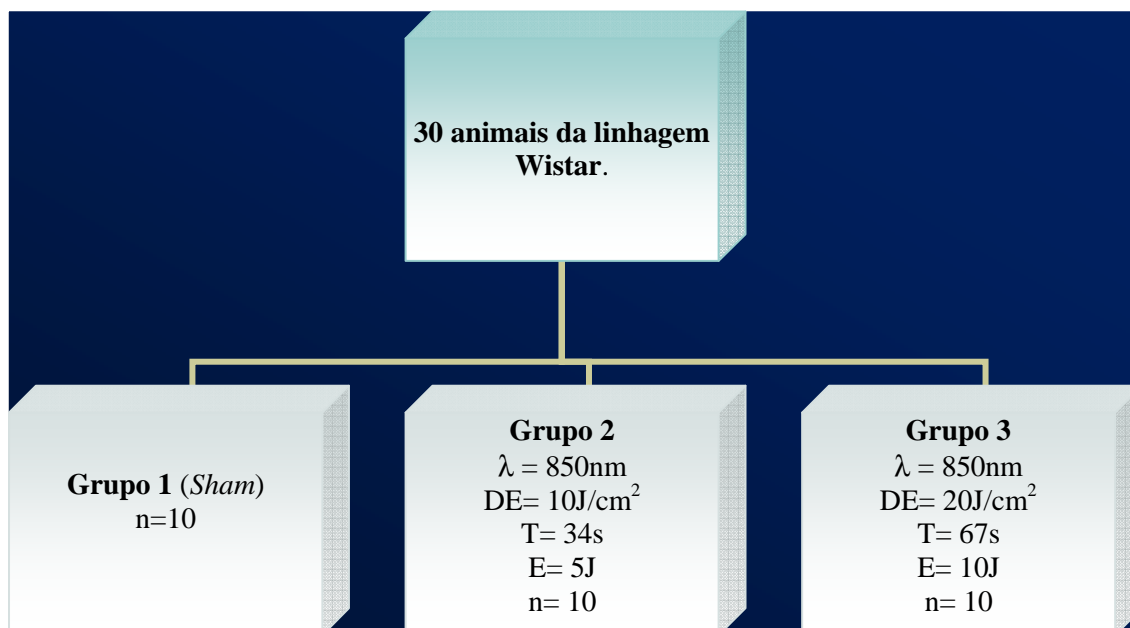


Figura 1: distribuição dos grupos

4.4 PROCEDIMENTO DA LESÃO

Os animais foram pesados e anestesiados proporcionalmente à massa corporal, com uma injeção intraperitoneal de cloridrato de quetamina 100ml/Kg e cloridrato de xilasina 50ml/Kg, através de uma injeção de insulina. Após a indução anestésica, os animais foram posicionados em decúbito ventral sobre a prancha cirúrgica para realização da epilação digital por tração do pêlo (na região ao redor do tendão calcâneo) da pata direita ou esquerda, sendo apenas uma delas posicionada no equipamento

de lesão, previamente esterilizado, desenvolvido pela Oficina Mecânica da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar (Figura 2). A lateralidade da pata posicionada no lesionador foi definida pelo programa Bioestat[®] 5.0 para aleatorizá-la.

O animal foi posicionado de forma que se realizasse uma tração na pata caudal direita ou esquerda, conforme randomização prévia das patas, onde o tornozelo era mantido em dorsiflexão, formando um ângulo de 90° com o tendão calcâneo, até o momento em que o dorso da pata do animal entrasse em contato com o aparelho de lesão (Figuras 3 e 4). 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.

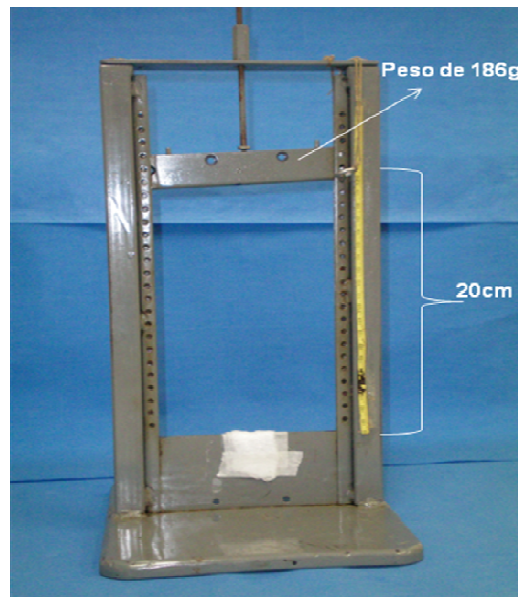


Figura 2: Equipamento desenvolvido para lesionar o tendão do animal, vista frontal e peso na posição inicial.



Figura 3: Posicionamento da pata do animal antes da queda do peso para a produção da lesão.

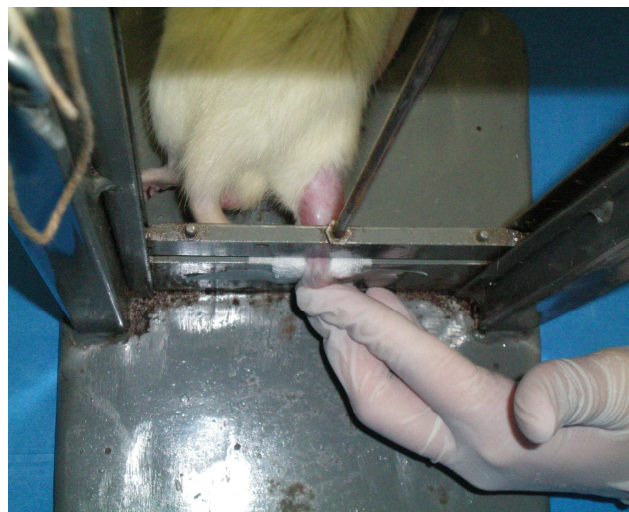


Figura 4: Vista superior do peso sobre o tendão no momento da lesão.

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 dermográfica para a realização das aplicações pontuais com a luz *LED*. Um minuto após a lesão foi realizada a aplicação do tratamento no 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 sempre pelo mesmo pesquisador (CARRINHO *et al.*, 2004; SALATE *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2009; WOOD *et al.*, 2010).

4.5 EQUIPAMENTO

Para o presente estudo foi utilizado o aparelho de luz *LED* de baixa potência de diodo infravermelho, com comprimento de onda de (λ) 850nm (AsGaAl), potência de 150mW, com densidades de energia de 10J/cm² e 20J/cm², com área de secção transversal do feixe de 0,5cm², com feixe contínuo e pulsado. Porém, foi utilizada no presente estudo a forma de feixe contínuo, da marca MMOptics[®]. (Figura 5)



Figura 5. Equipamento *LED*

4.6 PROTOCOLO DE TRATAMENTO

As aplicações da luz *LED* foram realizadas consecutivas e ininterruptamente durante 6 dias (PO1-PO6), iniciando-se no mesmo dia, 1min após a lesão para cada grupo. Este procedimento foi repetido nos demais dias, sempre no mesmo período e hora da primeira aplicação.

Para o tratamento, os animais foram colocados em mesa operatória para facilitar a aplicação do *LED*. A irradiação do grupo 1 (grupo simulação) foi realizada com o aparelho desligado por 67 segundos (maior tempo de aplicação dos demais grupos). Para o grupo 2 foi de 34 segundos e para o grupo 3 foi de 67 segundos. A potência de saída foi de 150mW, com densidades de energia de $10\text{J}/\text{cm}^2$ e $20\text{J}/\text{cm}^2$ com energia total de 5J para o grupo 2 e 10J para o grupo 3. Já a densidade de potência foi de $0,3\text{mW}/\text{cm}^2$ para todos os grupos.

4.7 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

4.7.1 Excisão do tendão e fixação da amostra.

No 7º dia de experimento (7ºPO), os animais foram anestesiados, seus tendões direitos ou esquerdos retirados cirurgicamente por duas incisões com bisturi de lâmina 15, por dissecção desde a inserção calcanear até a junção musculotendínea. Após este procedimento, foram mortos por meio de hiperdosagem anestésica e secção dos vasos cervicais. Os tendões foram imediatamente lavados em solução salina a 0,9% e cinco segundos após a retirada do tendão calcâneo, o mesmo foi fixado em uma superfície de parafina modelada na placa de petri. A fixação foi realizada por dois

alfinetes, o primeiro colocado na base do tendão (junção ósseo tendíneo) e o segundo na junção músculo-tendínea. Em seguida, foi adicionado formol tamponado à 10% sobre o tendão até o mesmo estar completamente coberto. O tendão calcâneo foi mantido submerso inicialmente por 40 minutos e, após esse período, o formol foi retirado e foi realizada uma incisão de 2mm abaixo da junção músculo-tendínea e outra a 2mm acima da junção ósseo tendínea, utilizando uma lâmina de barbear (Figura 6).

Todos os tendões foram padronizados com comprimento de 0,8cm para realização da avaliação. Após a padronização do tendão, o mesmo foi envolto em um papel de filtro qualitativo com dimensão de 3x2cm e colocado dentro de uma caixa (cassete) (Apêndice 1), que foi mantida submersa em formol tamponado 10% por 24 horas. Após, os tendões foram submersos em álcool 70% durante 48 horas iniciando o preparo das lâminas histológicas, para serem analisadas junto ao microscópio de polarização. A proposta deste procedimento foi de que a amostra não obtivesse contração do tecido, assim dificultado a realização das lâminas histológicas.

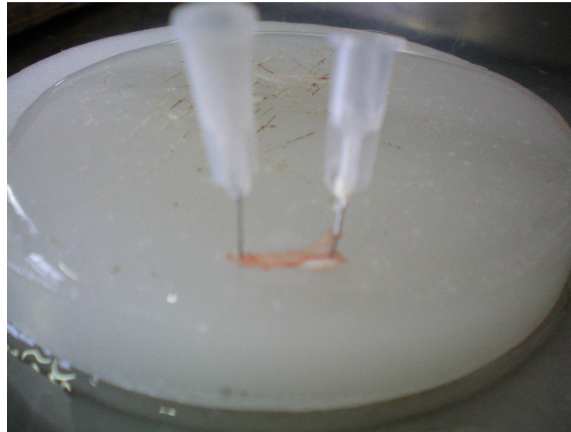


Figura 6: O tendão calcâneo fixado com dois alfinetes na placa de petri e coberto com formol tamponado à 10%.

4.7.2 Preparo das lâminas histológicas

Para uma avaliação qualitativa e quantitativa da concentração, estado de agregação e orientação das fibras de colágeno, os tendões foram submetidos à 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 seis banhos de uma hora cada na solução de álcool absoluto.

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

Os tendões foram retirados do xilol e passaram por dois banhos de parafina líquida (60°C) de uma 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 ficavam 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 picrosírius, 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 picrosírius, 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 picrosírius 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.

4.7.3 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 1,33 (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. Para realização das medidas, o eixo longo do tendão foi mantido a aproximadamente 45° em relação aos polarizadores do microscópio.

Foram obtidos valores de seis diferentes pontos da área central de cada um dos dois cortes de cada tendão. Os valores obtidos em graus foram

multiplicados por 3,03 (índice de refração da água) para se obter o resultado em nanômetros (nm).

4.7.4 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, 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.

4.8 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 e teste t de student seguidos pelo método de comparações múltiplas de Tukey para localizar as diferenças. A hipótese de distribuição Normal requerida pela ANOVA e teste t-de student foram verificadas 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.

O nível de significância adotado foi 0,05. O programa estatístico para efetuar os cálculos foi o SPSS for Windows, versão 12.0.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

Os dados obtidos, segundo os procedimentos já acima descritos, estão organizados nas tabelas abaixo (tabela 1), onde quanto maior for o valor numérico observado de retardo óptico em nm, melhor é o resultado do tratamento.

Tabela 1. Medidas descritivas do retardo óptico correspondente ao alinhamento das fibras de colágeno em nm.

<i>Grupo</i>	<i>Média</i>	<i>DP</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>Assimetria</i>	<i>Curtose</i>
<i>Grupo 1</i> <i>(simulação)</i>	35,22	4,27	26,87	41,01	-0,0651	0,075
<i>Grupo 2</i> <i>(10J/cm²)</i>	58,18	8,63	49,89	78,48	1,217	1,761
<i>Grupo 3</i> <i>(20J/cm²)</i>	49,59	7,78	36,36	64,19	0,255	0,0499
<i>Total</i>	47,99	12,16	26,87	78,48	0,373	-0,204

Com o intuito de verificar a existência de homogeneidade entre as variâncias, foi aplicado o teste de Levene (GRANER, 1966). O nível de significância foi estabelecido em 0,05, em um teste bilateral e os resultados estão demonstrados na tabela 2.

De acordo com os resultados demonstrados na tabela 2, não houve diferenças estatisticamente significantes entre as variâncias, relativas aos valores dos três grupos.

Tabela 2 – Valores de F e das probabilidades a eles associadas, obtidos quando da aplicação do teste de Levene aos resultados obtidos com os três grupos.

Grupos	Valores de F	Probabilidades
Grupo 1 x Grupo 2	3,081	0,096
Grupo 1 x Grupo 3	2,676	0,119
Grupo 2 x Grupo 3	0,060	0,810

Com o objetivo de verificar a existência ou não de diferenças, estatisticamente significantes entre os resultados dos três grupos, foi aplicada a Análise de Variância (ANOVA) (GRANER, 1966) aos dados em questão.

O nível de significância foi estabelecido em 0,05 em um teste bilateral.

O valor de F encontrado foi = 28,436 e a probabilidade a ele associada foi $p = 0^*$, indicando que houve diferenças estatisticamente significantes entre os resultados dos três grupos.

A seguir, foi aplicado o teste de Tukey para localizar as diferenças. De acordo com os resultados demonstrados no Apêndice 2, o Grupo 2 apresentou média mais elevada do que as dos outros dois Grupos. O Grupo 3 apresentou média mais elevada do que a do Grupo 1.

Com interesse em verificar a existência ou não de diferenças, estatisticamente significantes entre os resultados obtidos com os três grupos, foi aplicado o teste t de Student (GRANER, 1966) aos valores comparados dois a dois.

O nível de significância foi estabelecido em 0,05 em um teste bilateral.

Os resultados estão demonstrados na tabela 3.

Tabela 3. Comparação entre os grupos, dois a dois, em relação ao alinhamento de fibras de colágeno.

Comparação dos grupos		Médias	Nível Descritivo
G1 (simulação) x	G2(10J/cm ²)	35,22 x 59,18	0*
G1 (simulação) x	G3 (20J/cm ²)	35,22 x 49,59	0*
G2 (10J/cm ²) x	G3 (20J/cm ²)	59,18 x 49,59	0,018*

* diferenças significantes – teste t de Student

De acordo com os resultados demonstrados na tabela 3, houve diferenças estatisticamente significantes entre os valores das variáveis analisadas, sendo que o Grupo 2 apresentou média mais elevada do que as dos outros dois Grupos. O Grupo 3 apresentou média mais elevada do que a do Grupo 1. A distribuição dos valores dos grupos está representada na Figura 7 e a representação das imagens avaliadas de cada grupo analisado está demonstrada nas Figuras 8, 9 e 10.

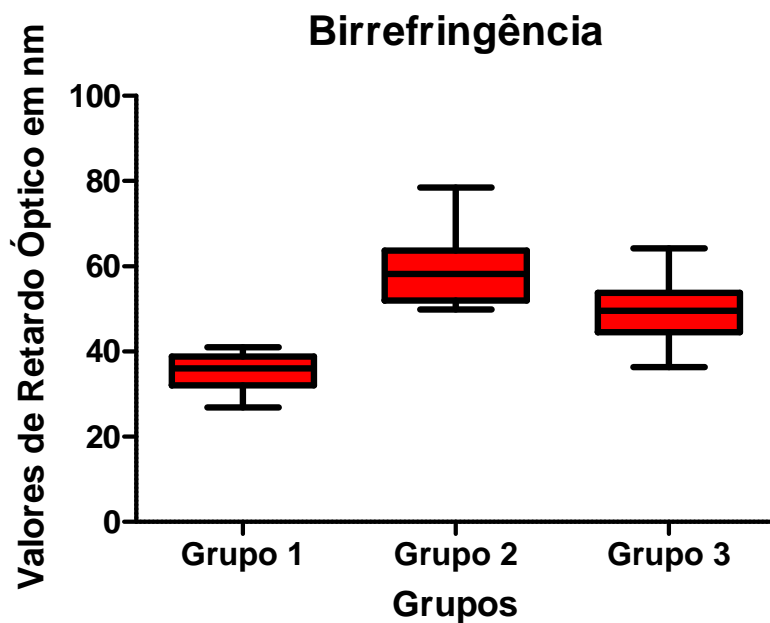


Figura 7. Distribuição dos valores dos grupos referentes ao alinhamento das fibras de colágeno.

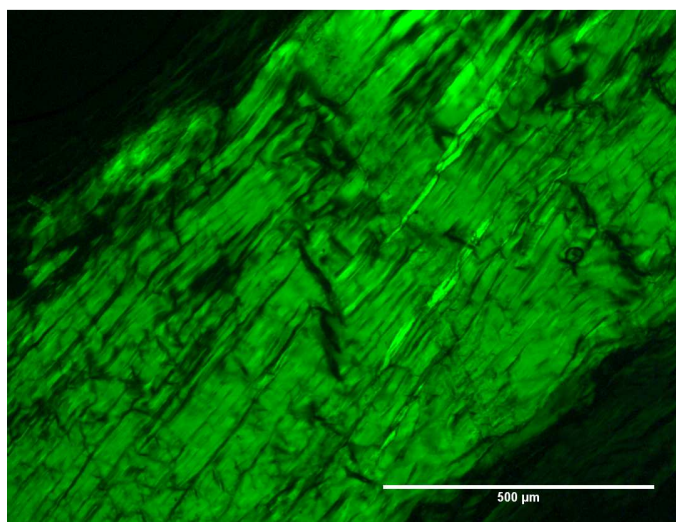


Figura 8. Alinhamento das fibras de colágeno do Grupo 1 (simulação), média de retardo óptico de $35,22 \pm 4,27$ nm.

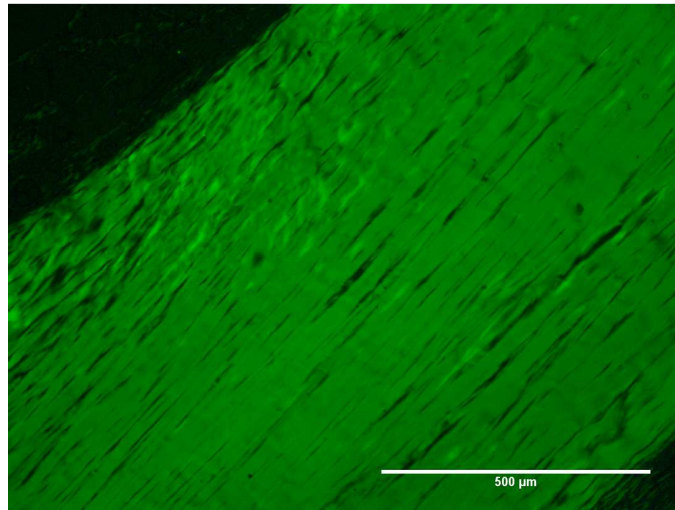


Figura 9. Alinhamento das fibras de colágeno do Grupo 2 ($10\text{J}/\text{cm}^2$), média de retardo óptico de $58,18 \pm 8,63\text{nm}$.

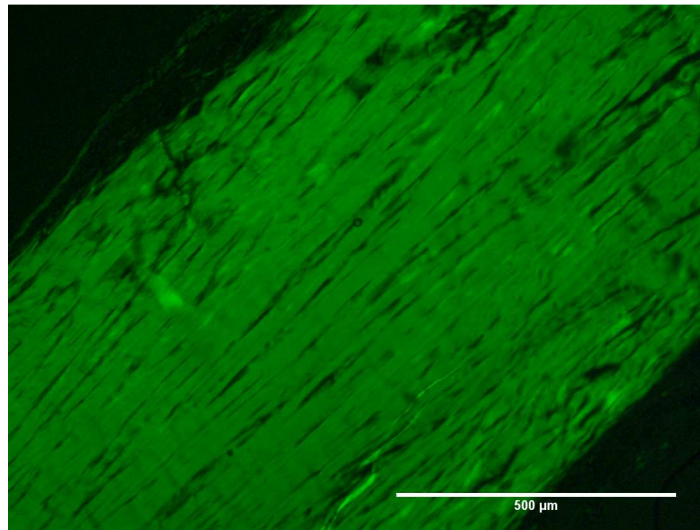


Figura 10. Alinhamento das fibras de colágeno do Grupo 3 ($20\text{J}/\text{cm}^2$), média de retardo óptico de $49,59 \pm 7,78\text{nm}$.

Nas tabelas 4 e 5 estão demonstrados os valores de média, desvio padrão, mínimo, máximo, assimetria e curtose relativos ao efeito do *LED* na reparação do tendão calcâneo de ratos, através da avaliação pricosirius, obtido com o Colágeno Tipo III (%) e com o Colágeno Tipo I (%), respectivamente.

Tabela 4. Medidas descritivas relativos ao efeito do *LED*, na reparação do tendão calcâneo de ratos, obtidas com o Colágeno Tipo III (pricosirius).

Grupos	Médias	DP	Mínimo	Máximo	Assimetria	Curtose
Grupo 1	80,19	5,99	70,21	89,14	0,071	-0,135
Grupo 2	66,63	6,33	55,97	74,09	-0,894	-0,162
Grupo 3	66,52	4,97	58,72	75,11	0,098	-0,384
Total	71,12	8,59	55,97	89,14	0,294	-0,180

Colágeno Tipo III (%)

Tabela 5. Medidas descritivas relativos ao efeito do *LED*, na reparação do tendão calcâneo de ratos, obtidas com o Colágeno Tipo I (pricosirius).

Grupos	Médias	DP	Mínimo	Máximo	Assimetria	Curtose
Grupo 1	19,81	5,99	10,86	29,79	0,071	-0,135
Grupo 2	33,36	6,33	25,91	44,03	-0,894	-0,162
Grupo 3	33,48	4,97	24,89	41,28	0,098	-0,384
Total	71,12	8,59	55,97	89,14	0,294	-0,180

Colágeno Tipo I (%)

Com o intuito de verificar a existência de homogeneidade entre as variâncias das três séries de dados, foi aplicado o teste de Levene (GRANER, 1966), considerando-se os valores obtidos com o Colágeno Tipo III (%) e com o Colágeno Tipo I (%).

O nível de significância foi estabelecido em 0,05 em um teste bilateral.

Os resultados estão demonstrados na tabela 6.

Tabela 6 – Valores de F e das probabilidades a eles associadas, obtidos quando da aplicação do teste de Levene aos resultados obtidos com os três grupos, considerando-se os valores obtidos com o Colágeno Tipo III (%) e com o Colágeno Tipo I (%).

Grupos	Valores de F	Probabilidades (p)
Grupo 1 x Grupo 2	0,043	0,839
Grupo 1 x Grupo 3	0,083	0,776
Grupo 2 x Grupo 3	0,271	0,609

De acordo com os resultados demonstrados na tabela 6, não houve diferenças estatisticamente significantes entre as variâncias relativas aos valores dos três grupos.

Com o objetivo de verificar a existência ou não de diferenças estatisticamente significantes entre os resultados dos três grupos foi aplicada a Análise de Variância (ANOVA) (GRANER, 1966) aos dados obtidos com o Colágeno Tipo III (%) e com o Colágeno Tipo I (%).

O nível de significância foi estabelecido em 0,05 em um teste bilateral.

O valor de F encontrado foi = 18,420 e a probabilidade a ele associada foi $p = 0^*$, indicando que houve diferenças estatisticamente significantes, entre os resultados dos três grupos, tanto para o Colágeno Tipo III (%) quanto para o Colágeno Tipo I (%) pois os valores de F e de p foram iguais para as duas séries de valores.

A seguir foi aplicado o teste de Tukey para localizar as diferenças. De acordo com os resultados demonstrados no Apêndice 3, o Grupo 1 apresentou média mais elevada do que as dos outros dois Grupos.

Entre os Grupos 2 e 3, não houve diferenças estatisticamente significantes.

De acordo com os resultados demonstrados no Apêndice 4, não houve diferenças significativamente entre os valores do Grupo 2 e do Grupo 3, que foram estatisticamente mais elevados do que os valores do Grupo 1.

Com interesse em verificar a existência ou não de diferenças, estatisticamente significantes, entre os resultados obtidos com os três grupos, foi aplicado o teste t de Student (GRANER, 1966), aos valores comparados dois a dois, considerando-se os dados obtidos com o Colágeno Tipo III (%) e com o Colágeno Tipo I (%).

O nível de significância foi estabelecido em 0,05, em um teste bilateral.

Os resultados estão demonstrados na tabela 7 e 8.

Tabela 7. Resultado da comparação entre os grupos, dois a dois, em relação ao colágeno Tipo III.

Comparação dos grupos		Médias		Nível Descritivo
G1 (simulação)	x G2(10J/cm²)	80,18	x 66,63	0*
G1 (simulação)	x G3 (20J/cm²)	80,18	x 66,52	0*
G2 (10J/cm²)	x G3 (20J/cm²)	66,63	x 66,52	0,966

* diferença significativa – teste t de Student

Tabela 8. Resultado da comparação entre os grupos, dois a dois, em relação ao colágeno Tipo I.

Comparação dos grupos		Médias		Nível Descritivo
G1 (simulação)	x G2(10J/cm ²)	19,81	x 33,36	0*
G1 (simulação)	x G3 (20J/cm ²)	19,81	x 33,47	0*
G2 (10J/cm ²)	x G3 (20J/cm ²)	33,36	x 33,47	0,966

* diferença significativa – teste t de Student

Com relação ao Colágeno Tipo III (%), de acordo com os resultados demonstrados na tabela 7, houve diferenças, estatisticamente significantes, entre os valores do Grupo 1 e do Grupo 2, e entre os valores do Grupo 1 e do Grupo 3, sendo que os valores mais elevados foram obtidos pelo Grupo 1, nos dois casos.

Com relação ao Colágeno Tipo I (%), de acordo com os resultados demonstrados na tabela 8, houve diferenças estatisticamente significantes entre os valores do Grupo 1 e do Grupo 2 e entre os valores do Grupo 1 e do Grupo 3, sendo que os valores menos elevados foram obtidos pelo Grupo 1, nos dois casos. A distribuição dos valores dos grupos para colágenos Tipo III e colágeno Tipo I estão representadas respectivamente nas figuras 11 e 12 e a representação das imagens avaliadas de cada grupo analisado está demonstrada nas Figuras 13, 14 e 15 onde pode-se observar a polarização em verde (indicativa de colágeno tipo III) e em amarelo e vermelho (indicativa de colágeno tipo I).

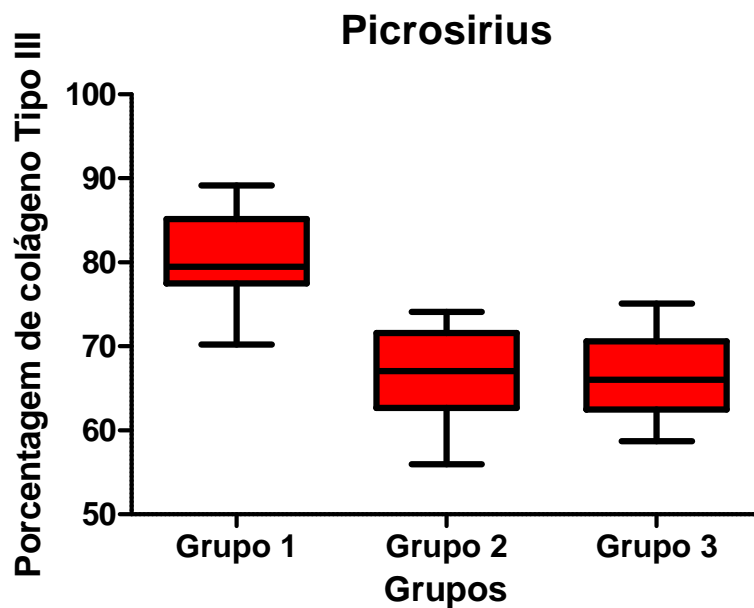


Figura 11. Distribuição dos valores dos grupos referentes à porcentagem de colágeno tipo III.

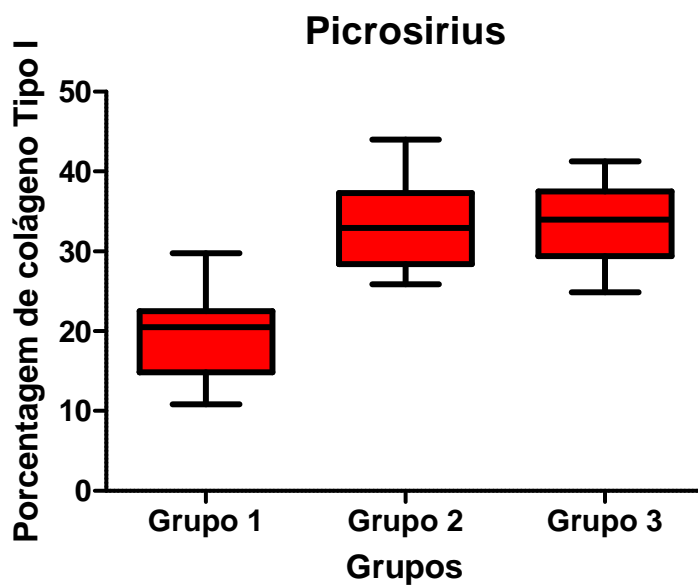


Figura 12. Distribuição dos valores dos grupos referentes à porcentagem de colágeno tipo I.

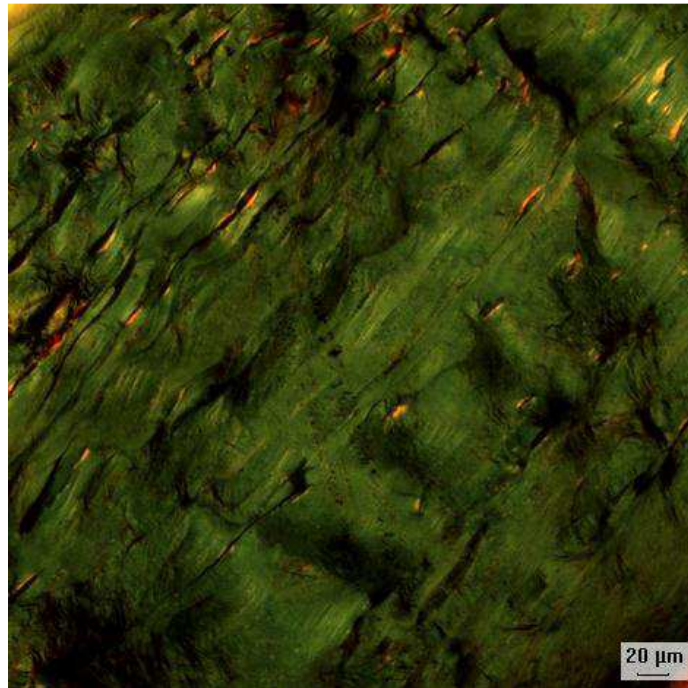


Figura 13. Análise de picrosirius do Grupo 1 (simulação), com predominância de polarização em verde (indicativa de colágeno tipo III).

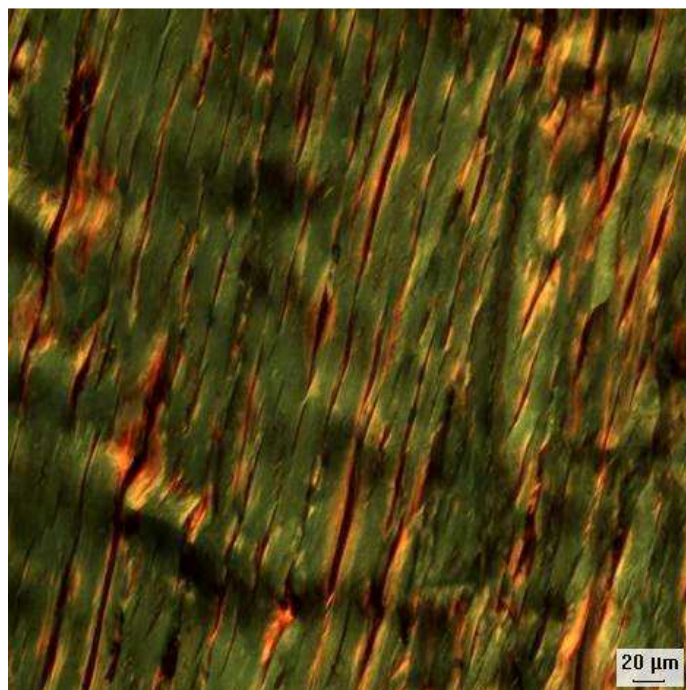


Figura 14. Análise de picrosirius do Grupo 2 ($10\text{J}/\text{cm}^2$), com predominância de polarização em amarelo (indicativa de colágeno tipo I).

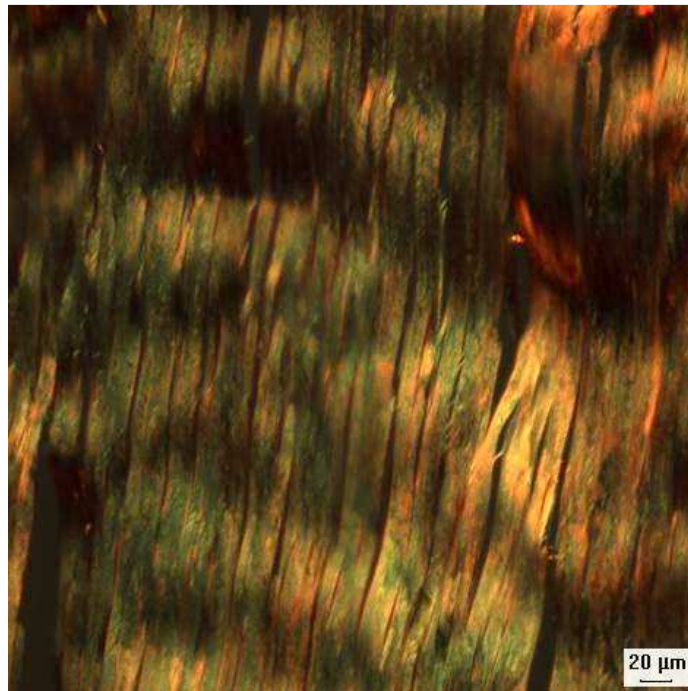


Figura 15. Análise de picosirius do Grupo 3 ($20\text{J}/\text{cm}^2$), com predominância de polarização em amarelo (indicativa de colágeno tipo I).

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Mais de 100 milhões de lesões músculo esqueléticas (tendão, músculo e osso) ocorrem anualmente em todo mundo. Destas, 30% a 50% são lesões tendíneas e acarretam lesões ligamentares, que levam à significativa perda do desempenho em praticantes de esportes, diminuição da capacidade funcional dos indivíduos no seu ambiente de trabalho, além de afetar negativamente a capacidade de realização de atividades físicas pela população em geral (LJUNGQVIST *et al.*, 2008).

Grande parte destas lesões músculo esqueléticas, principalmente as lesões tendíneas, continuam sendo de difícil tratamento e levam as pessoas acometidas a terem dor e desconforto durante anos. Segundo dados publicados por LEPPILAHTI *et al.* (1996), tais lesões apresentam prevalência de aproximadamente 18 para 100.000 lesões por ano na Finlândia (KHAN *et al.*, 2005).

As tendinopatias do tendão calcâneo são condições comuns de origem e patogênese ainda não esclarecidas (KNOBLOCH *et al.*, 2006). A taxa de consumo de oxigênio apresentada pelos tendões é sete vezes e meia mais lenta que a apresentada 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).

O tendão calcâneo foi utilizado neste estudo em decorrência da grande incidência de lesões nessa região e pelo fato de facilitar a execução da

técnica experimental em função da ampla forma anatômica, despertando interesse do meio científico em avaliar a qualidade do reparo tendíneo (OWOEYE *et al.*, 1987; ENWEMEKA, 1989; CUNHA, PARIZOTTO, VIDAL, 2001).

As lesões tendíneas podem ser agudas ou crônicas, parciais ou totais e são causadas por fatores intrínsecos ou extrínsecos e isolados ou combinados (SHARMA & MAFFULLI, 2005; SHARMA & MAFFULLI, 2006; ZAFAR *et al.*, 2009). Devido a estes aspectos, o processo de reparação dos tendões vem sendo estudado experimentalmente por diversos modelos, 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), excesso de uso (HUANG, PERRY, SOSLOWSKY, 2004), trauma direto (SALATE *et al.*, 2005; FILLIPIN *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2009; WOOD *et al.*, 2010) e tenotomia parcial (NG *et al.*, 2003; SEE *et al.*, 2004; NG, NG, SEE, 2004; 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 tornando-se 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, com presença de degeneração prévia do tendão e alterações no alinhamento e predominância dos tipos de fibras colágenas da região (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 modelo experimental de lesão. Entretanto, em seu estudo, os animais submetidos a estresse repetitivo não apresentaram alterações degenerativas de seus tendões calcâneos. Houve somente 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 à 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 cisalhamento 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 modelo 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, mostrando-se, assim, um modelo

padronizado para esta lesão.

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). Portanto, 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.

No presente estudo, utilizou-se o rato (Wistar) como animal de experimentação devido à facilidade de obtenção e de manuseio laboratorial, baixo custo, acelerado metabolismo em relação a outros animais de experimentação (o que propicia a possibilidade de resultados em curtos períodos de tempo) e pela facilidade de retirada de amostras para avaliações histológicas (DEMIR *et al.*, 2004; KOEKE *et al.*, 2005). Além disso, a existência na literatura de um grande número de trabalhos com este modelo animal possibilita comparações entre os resultados (CUNHA, PARIZOTTO, VIDAL, 2001; FILIPPIN *et al.*, 2005; KOEKE *et al.*, 2005; SALATE *et al.*, 2005; CARRINHO *et al.*, 2006; ARRUDA *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2009; WOOD *et al.* 2010).

A seleção de ratos do gênero macho deu-se em virtude das variações do ciclo estral das fêmeas, à maior incidência das lesões do tendão calcâneo no gênero masculino e também à predominância dos machos na literatura pesquisada.

Todo o procedimento experimental foi realizado sob constante supervisão e aplicação correta das técnicas de manejo zootécnico, garantindo condições sanitárias e monitoramento das 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 analgesia completa e intensa no sistema muscular esquelético e sono superficial, associado ao 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; WOOD *et al.*, 2010).

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

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 4 a 15 animais por grupo. Portanto, optou-se pela utilização de dez animais por grupo.

O reparo de tendões é similar a outros processos de reparo que ocorrem em tecidos biológicos. Na sequência do reparo, há proliferação e migração

de vários tipos de células, síntese de colágeno e angiogênese para a formação do tecido de granulação, e, por fim, orientação das células do tendão e fibras de colágeno de maneira altamente organizada, na tentativa de restaurar a estrutura e função do tendão lesado (CHAN, FUNG, NG, 2007).

Com metodologia de execução similar à proposta no presente estudo, diversos estudos foram e estão sendo realizados nesta última década, com intuito de melhorar o entendimento dos processos que envolvem a cicatrização do tendão calcâneo (ENWEMEKA *et al.*, 1990; ENWEMEKA *et al.*, 1991; REDDY *et al.*, 1998; GUM *et al.*, 1997; SALATE *et al.*, 2005; CARRINHO *et al.*, 2006;). A utilização de recursos físicos, tais como alongamento e exercícios terapêuticos, influenciam no processo de reparação tendínea e também são bastante pesquisados, mostrando resultados satisfatórios. Entretanto, são mais indicados nas fases mais avançadas de reabilitação (SEE *et al.*, 2004; LANGBERG *et al.*, 2009; KNOBLOCH *et al.*, 2010).

Especial atenção tem sido dada a estudos com a utilização de agentes físicos, como eletro-estimulação (HEINEMEIER *et al.*, 2007), ultra-som terapêutico (NG *et al.*, 2003), correntes elétricas (CHAN *et al.*, 2007) e terapia *laser* de baixa intensidade (FILLIPIN *et al.*, 2005), cujos resultados obtidos nas publicações evidenciam o bom emprego destes recursos físicos sobre o processo de reparação tecidual em tendões calcâneos de ratos.

Embora exista razoável número de trabalhos na literatura pesquisada, ainda não estão bem esclarecidos os mecanismos pelos quais os recursos físicos, como 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).

A terapia *laser* de baixa intensidade 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, dificultam a comparação dos seus resultados.

Atualmente nos deparamos com uma ampla diversidade de recursos para o tratamento das enfermidades do tendão calcâneo (LONGO *et al.*, 2009; ZAFAR *et al.*, 2009). Diversidade esta que se torna cada vez mais encorpada com o crescente aumento do interesse de pesquisadores em desvendar os meandros desta tão complexa patologia (RILEY, 2008). No entanto, a cada dia colocam-se no mercado mais equipamentos sem aprovação e fiscalização de órgãos reguladores, cujas expectativas ao tratamento de algumas patologias não se confirmam na prática clínica, colocando em risco a saúde da população em geral. Com isso, torna-se necessária melhor fiscalização de órgãos competentes, bem como a manutenção periódica dos equipamentos pelos profissionais da saúde que utilizam terapias físicas, como citado no estudo de GUIRRO & WEIS, 2009.

O equipamento *LED* utilizado no presente estudo foi aferido antes do início dos experimentos e após a finalização do mesmo, não apresentando problemas de calibragem em ambas as aferições, dando, assim, confiabilidade aos resultados deste manuscrito.

Estudos apontam avanços tecnológicos promissores na área de fototerapia com fontes luminosas, coerentes ou não (CASALECHI *et al.*, 2009). Porém, essa área é controversa devido aos resultados conflitantes encontrados em alguns estudos, justificando a necessidade de identificar os melhores parâmetros a serem utilizados na prática clínica (STADLER *et al.*, 2001; NISSAN *et al.*, 2006).

Com a introdução dos diodos emissores de luz (*LED*) no mercado, muitos trabalhos surgiram em importantes bases de dados, demonstrando

resultados promissores desta nova modalidade terapêutica (YEH, WU, CHENG, 2010). Resultados estes que suscitaram interesse para a realização do presente estudo utilizando o *LED* como recurso físico.

Alguns estudos demonstram resultados satisfatórios do uso do *LED* em experimentação animal, tais como na cicatrização de feridas (WHELAN *et al.*, 2001), modulação da dor (WHELAN *et al.*, 2003) e neovascularização (CORAZZA *et al.*, 2007). Resultados positivos também são encontrados em humanos, tais como no rejuvenescimento de pele (LEE *et al.*, 2007; TRELLES *et al.*, 2006), alívio de distúrbios do sono e estresse (GLICKMAN *et al.*, 2006), tratamento de acne (PAPAGEORGIU, KATSAMBAS, CHU, 2000) e mucosites (LANG-BICUDO *et al.*, 2008).

Na tentativa de comparar os efeitos da luz coerente e não coerente, VINCK *et al.* (2003) estudaram a influência da luz *LED* policromática com comprimento de onda de 950nm, 660nm e 570nm e do *laser* diodo infravermelho com comprimento de onda de 830nm em culturas de fibroblastos derivados de embriões de galinha. Estes autores observaram aumento dessas células em ambos os tratamentos, principalmente nos grupos tratados com a luz não coerente (*LED*) com os comprimentos de onda 570nm com emissão de luz verde e 660nm com emissão de luz vermelha. Portanto, segundo os autores, este estudo sugere efeitos benéficos de ambas as luzes, coerente e não coerente, em cultura de células, assumindo um potencial benefício clínico destes resultados.

O comprimento de onda pode variar, sendo possível a aplicação da fototerapia com espectros de luz entre 600nm e 1000nm, ou seja, os espectros do vermelho visível e do infravermelho (HUANG *et al.*, 2009). 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

laser 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. Esses achados correspondem com os resultados de ENWEMEKA *et al.* (2004) em uma revisão sistemática, onde também observaram que a irradiação com este comprimento de onda (λ) tem melhor resultado para o tratamento da dor.

Não há na literatura pesquisada estudos com tendão calcâneo submetido à lesão parcial e terapia *LED* de baixa intensidade na faixa espectral do infravermelho. Há somente um estudo realizado por CASALECHI *et al.* (2009) com a utilização de *LED* na faixa espectral do vermelho visível e tendão calcâneo submetido à tenotomia total em ratos. Neste estudo, os pesquisadores encontraram melhora da qualidade da reparação do tendão calcâneo dos ratos, pós avaliação histológica com HE e a utilização do *LED* 640±20nm (AsGaAl), com apenas um ponto sobre o tendão calcâneo direito. Com isso, pode-se observar a falta de estudos relacionados à lesão do tendão calcâneo com terapia *LED* de baixa intensidade.

No presente trabalho, foi utilizado o *LED* com comprimento de onda de 850nm, seguindo a teoria de que os equipamentos de fototerapia na faixa espectral do infravermelho são mais bem absorvidos por tecidos que contenham água, tendo em vista que o colágeno é o maior componente da matriz extracelular do tendão, abrangendo 80% do seu peso úmido (MAFFULLI *et al.*, 2000; ARRUDA *et al.*, 2007).

Outro parâmetro que apresenta controvérsia é a potência dos equipamentos. Assim como os demais parâmetros, este pode variar e interferir na administração de uma fototerapia eficaz. SALATE *et al.* (2005) demonstraram que o reparo tendíneo com diferentes potências

(10mW e 40mW) apresenta neovascularização precoce e maior número de vasos no grupo irradiado com a potência mais elevada (40mW), quando comparado aos demais grupos.

NEVES *et al.* (2009), aplicaram diferentes potências (40, 60, 80 e 100mW) de radiação *laser* na reparação da lesão parcial do tendão calcâneo em ratos e também observaram resultados significantes no aumento da produção de colágeno tipo III para os grupos 60, 80 e 100mW e colágeno tipo I para o grupo de 80mW.

Segundo TUNER & 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 *laser* com potências mais elevadas podem ser mais eficazes na promoção de respostas biológicas.

Se levarmos em conta os resultados de LEVI-SCHAFFER & KUPIETZKY (1990) que demonstraram *in vitro* que os mastócitos auxiliam na fase reparatória da inflamação e de RILEY (2004) que relatou que os mastócitos estimulam a migração e proliferação de fibroblastos através da ação da histamina liberada nos receptores H2 fibroblásticos e que esta unidade funcional seria importante para o estabelecimento da homeostase no tendão hígido, bem como para adaptação de sua matriz extra-celular frente a maiores esforços, a utilização de potências mais elevadas seria de extremo valor nas fases iniciais do tratamento das tendinopatias.

Esses resultados estão de acordo com o estudo realizado por CASALECHI *et al.* (2009), sobre os efeitos do *LED* no reparo tendíneo, evidenciando que o tratamento com potências mais elevadas (100mW), apresentam resultados efetivos na otimização da qualidade de remodelamento do tecido tendíneo.

Utilizou-se no presente estudo, uma potência de 150mW com o tempo de 34 e 66 segundos, baseados em estudos que utilizam potências mais elevadas e apresentaram resultados positivos na proliferação celular com a dose sendo entregue ao tecido com um menor tempo (VAN BREUGEL & BAR, 1992; PEREIRA *et al.*, 2002). Porém, não existem dados conclusivos com relação à potência ideal a ser usada, o que gera muitas dúvidas e especulações a seu respeito.

Outro parâmetro discutido quanto aos efeitos bioestimulatórios da fototerapia 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).

Este fator (densidade de energia) foi determinante para o presente estudo. A literatura diverge em relação a este parâmetro, relatando densidades de energia que vão desde 1J/cm² (DEMIR *et al.*, 2004) a 30J/cm² (NEVES *et al.*, 2009), dificultando a convergência entre as energias depositadas no tecido. No presente estudo, as densidades de energia utilizadas foram de 10 e 20J/cm². 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 prótons à mitocôndria, seguida 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 à 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).

No entanto, CASALECHI *et al.* (2009) verificaram diminuição no número de fibroblastos na primeira fase de cicatrização do tendão calcâneo

(animais sacrificados no 7º dia após a lesão), atribuindo este resultado à elevada dose utilizada no estudo (20J/cm²). Os autores sugerem ainda que os efeitos da irradiação com o *LED* otimizam o processo de cicatrização do tecido tendinoso.

Assim como *CASALECHI et al.* (2009), optou-se no presente estudo pela utilização de densidades de energia mais elevadas (10 e 20J/cm²) do que as habituais utilizadas em trabalhos com o emprego da terapia *laser* de baixa intensidade apresentando resultados positivos no alinhamento e deposição de fibras de colágeno.

Os achados encontrados no presente estudo não corroboram com os encontrados por *NG & FUNG* (2008) que observaram melhores resultados no grupo de ratos com lesão parcial de tendão calcâneo tratado com 4J/cm², associado a exercício de corrida por 30 minutos, quando comparado com o grupo tratado com 1J/cm².

No Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica da Universidade federal de São Paulo, no qual este estudo foi realizado, *OLIVEIRA et al.* (2009) e *WOOD et al.* (2010) também apresentaram aumento do alinhamento das fibras de colágeno em ratos submetidos à lesão parcial, utilizando densidade de energia mais baixa (4J/cm²). Entretanto, nossos resultados corroboram com o estudo de *NEVES et al.* (2009), também desenvolvido no presente Programa de Pós-Graduação, que utilizaram densidade de energia mais elevada (30J/cm²), observando melhores resultados no alinhamento das fibras de colágeno, avaliadas por birrefringência. Pode-se observar que não existe concordância para a utilização da melhor densidade de energia a ser empregada em estudos utilizando fototerapia e lesões do tendão calcâneo, dificultando a uniformidade deste parâmetro.

Um fator que contribui para convergência e concordância da quantidade

de energia empregada ao tecido é o parâmetro energia total (E), que atualmente é discutida e analisada nos estudos com fototerapia de baixa intensidade, mesmo que pouco relatada e muitas vezes não sendo mencionada nos estudos encontrados. Quando se discute energia total ou energia (E), deve-se pensar que $E = P$ (potência de saída em W) X Tempo de aplicação (densidade de energia), o que determina toda a irradiância entregue ao tecido. No presente estudo, as energias utilizadas foram 5 e 10J, valores estes que se encontram dentro dos propostos pela Associação Mundial de *laser* Terapia (1-10J), onde preconizam valores mais elevados quando comparados às fluências ou densidades de energia (J/cm^2) hoje empregadas (WALT 2010).

OLIVEIRA *et al.* (2009) utilizaram terapia *laser* de baixa intensidade com densidade de energia de $4J/cm^2$, porém com energia total de 0,12J o que difere do presente estudo que chegou a utilizar densidade de energia de $20J/cm^2$ com energia total de 10J (grupo 3) concentrada somente em um ponto de aplicação. Os resultados do presente estudo vão de encontro aos estudos de FILLIPIN *et al.* (2005) com utilização de terapia *laser* de baixa intensidade que utilizaram energia total de 1,5J, encontrando resultados significantes. Também corrobora com o estudo de CASALECHI *et al.* (2009), que utilizou a terapia *LED* de baixa intensidade a 10J, apresentando bons resultados com energias totais mais elevadas, porém em outros modelos de lesões experimentais do tendão calcâneo.

A energia total (E) atualmente é um parâmetro muito discutido na literatura, já que as potências utilizadas nos equipamentos de fototerapia estão relacionadas à energia total e estes parâmetros não são padronizados para cada equipamento. A energia total facilita o cálculo para o conhecimento da quantidade de energia entre aos tecidos nos estudos encontrados na literatura, uma vez que a maioria dos estudos não apresenta

todos os dados necessários para calcular a densidade de energia e outros parâmetros relacionados ao tratamento (PINFILDI *et al.*, 2009).

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 e proliferação celular, com síntese de elementos da matriz extracelular (PUGLIESE *et al.*, 2003), como por exemplo o 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.

Não há na literatura pesquisada estudos que avaliem a ordem molecular e o grau de agregação ordenada das fibras de colágeno no reparo de lesões do tendão calcâneo utilizando terapia com *LED* na faixa espectral do infravermelho. Há apenas estudos que demonstram a importância desta avaliação em trabalhos com a utilização de terapia *laser* de baixa intensidade e reparação do tendão calcâneo (OLIVEIRA *et al.*, 2009; WOOD *et al.*, 2010).

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 o 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; WOOD *et al.*, 2010).

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 melhor organização e estado de agregação macromolecular. A birrefringência textural (forma) é dependente do volume (concentração), estado de agregação e orientação dos feixes de colágeno, sendo que sua mensuração possibilita o melhor método para estudar a ordem molecular e o grau de agregação ordenada das fibras de colágeno (VIDAL, 1986; VIDAL, 2003; VIDAL, 2010).

Na observação dos dados descritivos da análise de birrefringência do presente estudo, pode-se observar uma proximidade nos valores de média entre os grupos 2 e 3 (grupos tratamento) e uma média inferior no grupo 1-simulação (*sham*) ($35,22 \pm 4,27$). O grupo 2 (*LED* $10\text{J}/\text{cm}^2$) apresentou a maior média ($58,18 \pm 8,63$) de todos os grupos, seguido pelo grupo 3 (*LED* $20\text{J}/\text{cm}^2$) com média de $49,59 \pm 7,78$. Assim, ambos apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados ao grupo simulação (*sham*) ($p=0^*$). Na comparação entre os grupos tratamento, o grupo com menor densidade de energia ($G2=10\text{J}/\text{cm}^2$) e energia total ($G2=5\text{J}$) apresentou diferença estatisticamente significativa entre os valores das variáveis analisadas ($p=0,018^*$).

A diferença entre o grupos 2 e 3 (grupos tratamento) em relação ao grupo 1 (grupo *sham*) é importante na tentativa de mostrar que a terapia *LED* de baixa intensidade na lesão parcial do tendão calcâneo é eficaz, uma vez que esta modalidade terapêutica apresenta baixo custo relativo comparado à terapia *laser* de baixa intensidade.

Esse resultado corrobora com os achados de CUNHA, PARIZOTTO, VIDAL (2001) e KOEKE *et al.* (2005) após tratamento com ultra-som pulsado em ratos submetidos à tenotomia e CARRINHO & PARIZOTTO,

(2006); OLIVEIRA *et al.* (2009); WOOD *et al.* (2010) e NEVES *et al.* (2009) após tratamento com terapia *laser* de baixa intensidade, que observaram em seus estudos aumento do alinhamento das fibras de colágeno, pela análise de birrefringência, após os respectivos tratamentos.

Outro fator importante a se destacar no presente estudo diz respeito à diferença estaticamente significativa entre o aumento da média do grupo 2, com menor densidade de energia e energia total, em relação a média do grupo 3, com a mais elevada densidade de energia e energia total empregadas neste trabalho. Estudos com metodologias similares demonstraram resultados numéricos dos valores de média inferiores aos encontrados no grupo tratamento com pior valor no presente estudo, na avaliação de birrefringência, ratificando a eficácia desta modalidade.

CARRINHO & PARIZOTTO, (2006) apresentaram média de $37,67 \pm 6,13$ para os valores de birrefringência do melhor grupo tratamento (grupo A, 685nm e $3\text{J}/\text{cm}^2$) de seu estudo. Já WOOD *et al.* (2010), em um estudo de experimentação animal e avaliação histológica idêntica ao presente trabalho, demonstraram valor de média de $44,1 \pm 12,3$ para melhor grupo (grupo 3, LLLT e $4\text{J}/\text{cm}^2$) do seu experimento. No presente estudo, o grupo 3 ($20\text{J}/\text{cm}^2$) apresenta média de $49,59 \pm 7,78$ na avaliação de birrefringência, demonstrando resultados superiores aos relatados pelos autores citados anteriormente, o que mostra o bom emprego desta terapia nas lesões do tendão calcâneo.

Seguindo os relatos de estudos publicados com outros meios físicos (ENWEMEKA, 1989; NG *et al.*, 2003; NG, NG, SEE, 2004), o presente estudo sugere que a terapia *LED* de baixa intensidade aumenta a força tênsil do tendão, uma vez que o alto grau de alinhamento das fibras de colágeno é que confere ao tendão uma grande capacidade de resistência às forças de tração, o que diminui em alto grau a incidência muito de novas re-rupturas

(NG & FUNG, 2008; WOOD *et al.*, 2010). Quanto maior o paralelismo das fibras, maior a força tênsil do tendão (FILLIPIN *et al.*, 2005).

Potencial efeito da fototerapia em lesões tendíneas foi relatado em um estudo de revisão sistemática com metanálise realizado por TUMILTY *et al.* (2010). Neste estudo, os autores apresentam 12 trabalhos com efeitos benéficos da fototerapia, demonstrando forte evidência de que estes resultados positivos estão associados ao uso de doses recomendadas.

Os resultados dos trabalhos analisados na literatura e também do presente estudo, não demonstraram efeito inibitório do *LED* nas densidades de energia utilizadas. Porém, no presente estudo, observou-se a existência de um efeito dose-dependente, de acordo com o proposto pela Lei de Arndt-Schultz. Essa lei prediz que as células alteram suas atividades biológicas em função da quantidade de estímulo aplicado, ou seja, na medida em que se utilizaram densidades de energia maiores houve um aumento do alinhamento das fibras de colágeno, pela análise de birrefringência.

A utilização de outro comprimento de onda na faixa espectral de $640\pm 20\text{nm}$ para a mesma técnica com densidades de energia altas é importante para estudar o efeito inibitório do *LED*, como no estudo de CASALECHI *et al.* (2009), que também utilizaram uma alta densidade de energia com $20\text{J}/\text{cm}^2$ e energia total de 10J para o seu estudo com lesão do tendão calcâneo, não encontrando efeito inibitório e sim, efeitos que estimularam a qualidade de remodelamento do tecido tendíneo.

A síntese de colágeno tem início logo após a lesão e estende-se até o final do processo cicatricial, quando o remodelamento do tecido ocorre (PUGLIESE *et al.*, 2003). Nos tendões, há presença de colágeno tipo I e III, sendo 95% de colágeno tipo I (MAFFULLI *et al.*, 2000; RILEY, 2008). A utilização da coloração em picrosirius, 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; WOOD *et al.*, 2010).

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). No presente estudo, a avaliação da quantidade de colágeno tipo I por campo apresentou médias próximas entre os grupos tratamento (2 e 3), com maior média no grupo 3 – *LED* com $20\text{J}/\text{cm}^2$ ($33,48 \pm 4,97$), seguido do grupo 2 – *LED* com $10\text{J}/\text{cm}^2$ ($33,36 \pm 6,33$) demonstrando grande paridade entre os valores encontrados. No grupo 1 – simulação (*sham*), observou-se a menor média dos grupos ($19,81 \pm 5,99$).

Houve diferença significativa dos grupos 2 (*LED* - $10\text{J}/\text{cm}^2$) e 3 (*LED* - $20\text{J}/\text{cm}^2$) quando comparados ao grupo simulação (*sham*) ($p=0^*$). No entanto, devido à proximidade das médias dos grupos tratamento 2 ($33,36 \pm 6,33$) e 3 ($33,48 \pm 4,97$), não houve diferença significativa na comparação entre si ($p= 0,966$). Este resultado provavelmente deve-se às duas energias totais utilizadas no presente estudo que se encontram dentro da janela terapêutica proposta pela WALT, a qual preconiza valores de energia total dentro da faixa terapêutica de 1-10J.

Estes resultados demonstram o benefício da utilização do *LED* na melhora da qualidade da cicatrização tendínea. Os achados também podem explicar a maior força tênsil e menor chance de re-ruptura observada em alguns trabalhos (ENWEMEKA, 1989; NEVES *et al.*, 2009; WOOD *et al.*, 2010).

Utilizando a análise de picrosirius, WOOD *et al.* (2010) verificaram aumento na porcentagem de colágeno tipo I nos ratos submetidos ao tratamento com US e terapia *laser* de baixa intensidade. Em contrapartida,

NEVES *et al.* (2009), com metodologia similar, não encontraram nesta análise resultados significantes no aumento do percentual de colágeno tipo I submetidos à terapia *laser* de baixa intensidade com diferentes potências.

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

Não há na literatura pesquisada estudos sobre *LED* com comprimento de onda na faixa do infravermelho em reparo tendíneo após lesão parcial por trauma direto, tampouco utilizando avaliação de colágeno. O estudo de CASALECHI *et al.* (2009) foi o único a utilizar essa terapia no reparo tendíneo, porém com comprimento de onda na faixa do vermelho visível e não quantificando o colágeno.

Os mecanismos de ação pelos quais a fototerapia estimula o processo de cicatrização ainda não estão bem compreendidos. OLIVEIRA *et al.* (2009) relatam que a maioria dos estudos encontrados na literatura sobre os efeitos da fototerapia sobre as células estão relacionados a alterações intracelulares específicas. Estas modificações apontam para o metabolismo do cálcio, que é presumivelmente afetado tanto em termos de concentração quanto de transporte intracitoplasmático. Isto gera um aumento do influxo de cálcio e conseqüentemente proliferação celular e síntese de colágeno.

O aumento na quantidade de colágeno tipo I nos grupos tratados com *LED* no presente estudo sugere que esta terapia, provavelmente, tenha aumentado a taxa de proliferação e atividade dos fibroblastos com conseqüente melhora na síntese das fibras colagenosas. Resultados estes que vão de encontro com os obtidos por CASALECHI *et al.* (2009) que verificaram aumento do número de fibroblastos nos grupos tratados com

LED 630nm com densidade de energia de $20\text{J}/\text{cm}^2$ nos primeiros sete dias do seu estudo. Este processo parece ter sido otimizado pela terapia *LED* de baixa intensidade, através da hipótese postulada no parágrafo anterior, verificando melhora da qualidade do processo de reparação do tecido tendíneo.

No presente estudo, observou-se também maior porcentagem de colágeno tipo III por campo que do tipo I, sendo a maior variação apresentada pelo grupo simulação (*sham*). Segundo TSAI *et al.* (2006), durante o processo de reparo tendíneo, primeiramente ocorre a deposição de colágeno tipo 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 de colágeno é o que confere força e resistência ao tendão. Tal observação 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.

No que diz respeito às medidas descritivas da quantificação do colágeno tipo III, o grupo simulação (*sham*) apresentou média e desvio padrão mais altos em relação aos demais grupos ($80,19 \pm 5,99$). Novamente, como visualizado na avaliação do colágeno tipo I, os grupos tratamentos apresentaram diferenças significantes dos grupos 2 (*LED* - $10\text{J}/\text{cm}^2$) e 3 (*LED* - $20\text{J}/\text{cm}^2$) quando comparados com o grupo simulação (*sham*) ($p=0^*$). Já na comparação entre os dois grupos tratamento, as duas médias (grupo 2 = $66,63 \pm 6,33$ / grupo 3 = $66,52 \pm 4,97$) foram próximas e não houve diferença significativa entre eles ($p=0,966$).

Em um estudo *in vitro*, onde foi utilizada cultura de células de tendões humanos, pôde-se observar que tendões de humanos que apresentavam rupturas e tendinopatia possuíam maior quantidade de colágeno tipo III que os tendões normais. Ambos, quando submetidos a lesões *in vitro*,

apresentavam aumento do colágeno tipo III (MAFFULLI *et al.*, 2000). Estes achados se relacionam com os observados neste estudo, demonstrando a efetividade da lesão proposta para o presente estudo.

Em um dos poucos estudos encontrados na literatura pesquisada utilizando a avaliação de picosirius e alguma terapia física para a melhora do reparo tendíneo, WOOD *et al.* (2010) verificaram um aumento na porcentagem do colágeno tipo III em todos os grupos submetidos à lesão parcial do tendão calcâneo em seu estudo, não apresentando diferença significativa entre os grupos tratamento em relação ao grupo controle. O presente estudo não corrobora com estes achados, pois verificou-se diminuição da porcentagem deste colágeno nos grupos tratados com a terapia *LED* de baixa intensidade.

Numerosos estudos clínicos e experimentais têm sido desenvolvidos com o objetivo de avaliar a real contribuição da terapia *LED* de baixa intensidade em diferentes áreas da medicina (YEH *et al.*, 2010). Porém, em reparação tendínea a terapia *laser* de baixa intensidade apresenta-se como a fototerapia mais utilizada para a resolução desta lesão.

Baseando-se nos resultados deste estudo, pode-se observar que a terapia *LED* de baixa intensidade demonstrou-se eficaz no aumento da síntese e alinhamento das fibras de colágeno sugerindo que a utilização deste recurso físico torna-se uma alternativa promissora em relação à utilização da terapia *laser* de baixa intensidade, além de menos onerosa, com resultados tão efetivos quanto à fototerapia *laser*.

Os resultados do presente estudo demonstraram lacunas importantes como perspectivas na utilização desta terapia no processo de reparo tecidual do tendão calcâneo, podendo avaliar em estudos futuros a associação desta terapia a outros agentes físicos, além de terapias medicamentosas. A realização de estudos *in vitro* e *in vivo* para avaliar o mecanismo de ação

pelo qual o *LED* estimula o processo de reparo com avaliações biomoleculares da matriz extracelular e utilização de imunohistoquímica é importante para o entendimento desta terapia.

Portanto, mais estudos são necessários com o objetivo de esclarecer dúvidas relacionadas aos parâmetros da terapia *LED* de baixa intensidade como densidade de energia, comprimento de onda e técnica de aplicação, sendo estes importantes fontes de pesquisas e de divergência entre os estudos.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

O Diodo emissor de luz (*LED*) infravermelho com comprimento de onda λ 850nm é eficaz no processo de reparo de lesão parcial do tendão calcâneo em ratos.

O Diodo emissor de luz (*LED*) infravermelho com comprimento de onda λ 850nm promove maior alinhamento das fibras de colágeno.

O Diodo emissor de luz (*LED*) infravermelho com comprimento de onda λ 850nm aumenta a quantidade de colágeno tipo I na região da lesão.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

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

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

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

Al-Watban FAH, Andres BL. Polychromatic LED therapy in burn healing of non-diabetic and diabetic rats. *Journal of clinical laser Medicine & Surgery.* 2003;21(5):249-58

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

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

Avni D, Levkovitz S, Maltz L, Oron U. Protection of skeletal muscles from ischemic injury: low-level laser therapy increases antioxidant activity. *Photomed Laser Surg.* 2005;23(3):273-7

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

- Battegay EJ. Angiogenesis: mechanistic insights, neovascular diseases, and therapeutic prospects. *J Mol Med.* 1995;73:333-46
- Baxter GD. Bionergetics and tissue optics. In: *Therapeutic Lasers: theory and practice.* Edinburg: Churchill Livingstone. 1994
- Bertoloni G, Sacchetto R, Baro E, Ceccherelli F, Jori G. Biochemical and morphological changes in *Escheichia coli* irradiated by coherent and non-coherent 632.8 nm light. *Journal of Photochemistry and Photobiology – B: biology, Lausanne.* 1993;18,(2-3):191-96
- Bihari J, Mester AR. The biostimulative effect of low level laser therapy on longstanding crural ulcers using helium-neon laser, helium-neon laser plus infrared lasers, and noncoherent light: preliminary report of a randomized double blind comparative study. *Laser Ther.* 1989;1:97
- Bidder M, Towler DA, Gelberman RH, Boyer MI. Expression of mRNA for Vascular Endothelial growth Factor at the Repair Site of Healing Canine Flexor Tendon. *J Orthop Res.* 2000;18(2):247-52
- Bjordal, JM. Level laser therapy in tendon injuries? – a review of in vitro and in vivo trials. [atualizado em 18 abril 2004; acesso em: 02 junho 2005] Disponível em: http://www.laser.nu/lllt/lllt_science6.htm#4.
- Carrinho PM, Renno ACM, Koeke P, Salate ACB, Parizotto NA, Vidal BC. Compative study Using 685-nm and 830-nm Lasers in the Tissue Repair of Tenotomized Tendons in the Mouse. *Photomed Laser Surg.* 2006;24(6):754-58
- 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
- Casalechi HL, Nicolau RA, Casalechi VL, Silveira-Júnior L, Paula AMB, Pacheco MTT. The effects of low level light emitting diode on the repair process of Achilles tendon therapy in rats. *Lasers Med Sci.* 2009;24(4):659-65

- Castro-Silva O, Castro-Silva T, Ramalho FS, Ramalho LNZ, Zucoloto S, Marcassa LG, Bagnato VS. Led enhancement in mitochondrial oxidative phosphorylation for hepatectomized rats. *Acta Cir. Bras.* 2002;17(3):92-5
- 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
- Corazza AV, Jorge J, Kurachi C, Bagnato VS. Photobiomodulation on the angiogenesis of skin wounds in rats using different light sources. *Photomed Laser Surg.* 2007;25(2):102-6
- Cunha A, Parizotto NA, Vidal BC. The effect of therapeutic ultrasound on repair of the Achilles tendon (tendon calcaneus) of the rat. *Ultrasound Med Biol.* 2001;27:1691-6
- Demir H, Menku P, Kirnap M, Calis M, Ikzceli I. Comparison of the effects of laser, ultrasound and combined laser + ultrasound treatments in experimental tendon healing. *Laser Surg Med.* 2004;35:84-9
- Dyson M, Young S. Effect of laser therapy on wound contraction and cellularity in mice. *Lasers Med Sci.* 1982;1:125-30
- Eells JT, Wong-Riley MTT, VerHoeve J, Henry M, Buchman EV, Kane MP, Gould LJ, Das R, Jett M, Hodgson BD, Margolis D, Whelan HT. Mitochondrial signal transduction in accelerated wound and retinal healing by near-infrared light therapy. *Mitochondrion.* 2004;4:559-67
- Elwakil TF. An in-vivo experimental evaluation of He-Ne laser photostimulation in healing Achilles tendons. *Lasers Med Sci.* 2007;22:53-9

- Enwemeka CS, Parker JC, Dowdy DS, Harkness EE, Sanford LE, Woodruff LD. The efficacy of Low-Power lasers in tissue repair and pain control: A Meta-Analysis Study. *Photomed Laser Surg.* 2004;22(4):323-29
- Enwemeka CS, Rodriguez O, Gall N, Walsh N. Morphometrics of collagen fibril populations in He-Ne laser photostimulated tendons. *J Clin Laser Med Surg.* 1990;47-52
- Enwemeka CS, Rodriguez O, Mendosa S. The biomechanical effects of lowintensity ultrasound on healing tendons. *Ultrasound Med Biol.* 1990;16:801-7
- Enwemeka CS, Spielholz NI. Modulation of tendon growth and regeneration by electrical fields and currents. In: Currier DP, Nelson RM. *Dynamics of human biologic tissue.* Philadelphia: FA. Davis Company;1992. p.231-54.
- Enwemeka CS. Inflammation, cellularity, and fibrillogenesis in regeneration tendon: implications for tendon rehabilitation. *Phys Ther.* 1989;69:816-25
- Enwemeka CS. Membrane – bound intracytoplasmic collagen fibrils in fibroblasts and myofibroblasts of regenerating rabbit calcaneal tendons. *Tissue Cell.* 1991;23:173-90
- 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

Glickman GBB, Pineda C, Hauck WW, Brainard GC. Light therapy for seasonal affective disorder with blue narrow-band light-emitting diodes (LEDs). *Biol Psychiatry*. 2006;59:502–7

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

Guirro RR, Weis LC. Radiant power determination of low-level laser therapy equipment and characterization of its clinical use procedures. *Photomed Laser Surg*. 2009;27(4):633-9

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

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

Heinemeier KM, Olesen JL, Haddad F, Kjaer M, Baldwin KM, Schjerling P. Expression of collagen and related growth factors in rat tendon and skeletal muscle in response to specific contraction types. *J Physiol*. 2007;1(158):1303-16

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

Huang YY, Chen ACH, Carroll JD, Hamblim MR. Biphasic Dose Response in Low Light Therapy. *Dose Response*. 2009;7(4):358-83

Kannus PL, Jozsa M, Kvist M, Letho M, Jarvinen M. The effect of immobilization on myotendinous junction: and ultrastructural, histochemical and immunohistochemical study. *Acta Physiol Study*. 1992;144:387-94

Karu T. Mechanism of interaction of monochromatic light with cells. In: Karu T, Young AR, eds. *Effects of low power light on biological systems*. Washington, DC: Proceedings of the European Society of photo-optical instrumentation engineers; 1996. p. 2-9.

Khan RJ, Fick D, Keogh A, Crawford J, Brammar T, Parker M. Treatment of acute achilles tendon ruptures. A meta-analysis of randomized, controlled trials. *J Bone Joint Surg Am*. 2005;87(10):2202-10

Knobloch K, Grasmann R, Jagodzinski M, Richter M, Zeichen J, Krettek C. Changes of Achilles midportion tendon microcirculation after repetitive simultaneous cryotherapy and compression using a Cryo/Cuff. *Am J Sports Med* 2006;34:1953-59

Knobloch K, Schreibmueller, Kraemer R, Jagodzinski M, Vogt PM, Redeker J. Gender and eccentric training in Achilles mid-portion tendinopathy. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2010;18:648-55

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

Lang-Bicudo L, Eduardo F de P, Eduardo C de P, Zezell DM. LED phototherapy to prevent mucositis: a case report. *Photomed Laser Surg*. 2008;26(6):609–13

Langberg MK, Heinemeier K, Bayer ML, Hansen M, Holm L, Doessing M, Kongsgaard M, Kongsgaard MR, Magnusson SP. From mechanical loading to collagen synthesis, structural changes and function in human tendon. 2009;19:500-10

- Lech O, Severo AL, Silva LHP, Marcolan AM, Lutkemeyer E, Kim JH. Efeito do uso de corticóide em tendões previamente traumatizados: estudo experimental. *Rev Bras Ortop.* 1996;31(3):187-92
- Lee SY, Park KH, Choi JW, Kwon JK, Lee DR, Shin MS, Lee JS, You CE, Park MY. A prospective, randomized, placebo-controlled, double-blinded, and split-face clinical study on LED phototherapy for skin rejuvenation: Clinical, profilometric, histologic, ultrastructural, and biochemical evaluations and comparison of three different treatment settings. *J Photochem Photobiol B. Biol.* 2007;88:51-67
- Leppilahti J, Puranen J, Orava S: Incidence of Achilles tendon rupture. *Acta Orthop Scand.* 1996;67:277-79
- Levi-Schaffer F, Kupietzky A. Mast cells enhance migration and proliferation of fibroblasts into an in vitro wound. *Exp Cell Res.* 1990;188(1):42-9
- Ljungqvist A, Schweltnus MP, Bachl N, Collins M, Cook J, Khan KM, Maffulli N, Pitsiladis Y, Riley G, Golspink G, CChem, Venter D, Derman EW, Engebretsen L, Volpi P. International Olympic Committee Consensus Statement: Molecular Basis of Connective Tissue and Muscle Injuries in Sport. *Clin Sports Med.* 2008;27:231-39
- Longo UG, Ronga M, Maffulli N. Achilles Tendinopathy. *Sports Med Arthrosc Rev.* 2009;17:112-26
- 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
- Mahan KT, Carter SR. Multiple ruptures of the tendon Achillis. *J Foot Surg.* 1992;31:548-59

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

Molloy T, Wang Y, Murrell AC. The Roles of Growth Factors in Tendon and Ligament Healing. *Sports Med.* 2003;33(5):381-94

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

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

Nery CA, Alloza JF, Laurino CF, Tanaka GS. Avaliação da força muscular isocinética do pé e tornozelo após tratamento cirúrgico das lesões do tendão de Aquiles, utilizando a transferência do tendão fibular curto. *Rev Bras Ortop.* 1997;32(7):503-12

Neves MAI. Ação de diferentes potências da terapia laser de baixa intensidade no reparo tendíneo, em ratos [dissertação]. [São Paulo]: Universidade Federal de São Paulo;2009.86p.

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

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 tendon healing in rats. *Ultrasound Med Biol.* 2004;30(11):1539-43

- Nissan J, Assif D, Gross MD, Yaffe A, Inderman I. Effect of low intensity laser irradiation on surgically created bony defects in rats. *J Oral Rehab.* 2006;33:619–24
- Oliveira RF, Oliveira DAAP, Monteiro W, Zangaro RA, Magini M, Soares CP. Comparison between the effects of low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasonic irradiation in vitro *Photmed Laser Surg.* 2008;26(1):6-9
- Oliveira FS, Pinfildi CE, Parizoto NA, Liebano RE, Bossini PS, Garcia EB, Ferreira LM. Effect of low level laser therapy (830nm) with different therapy regimes on the processo f tissue repair in partial lesion calcaneous tendon. *Lasers Surg Med.* 2009;41(4):271-76
- Owoeye I, Spielholz NI, Fetto J, Nelson AJ. Low - intensity pulsed galvanic current and the healing of tenotomized rat Achilles tendons: preliminary report using load-to-breaking measurements. *Arch Phys Med Rehabil.* 1987;68:415-18
- Özkan N, Altan L, Bingöl U, Akin S Yurtkuran M. Investigation of the supplementary effect of AsGa laser therapy on the rehabilitation of digital flexor tendons. *J Clin Laser Med Surg.* 2004;22(2):105-10
- Papageorgiou P, Katsambas A, Chu A. Phototherapy with blue (415 nm) and red (660 nm) light in the treatment of acne vulgaris. *Br J Dermatol* 2000;142:973–8
- Parizotto NA, Baranauskas V. Hydrogen bonding of collagen molecule stimulated by He-Ne laser in the regenerating of tendon. In: *Proceeding 2nd World Association of Laser Therapy.* Kansas City, Missouri, USA, September 2-5, p. 64-5, 1998a.
- Parizotto NA, Baranauskas V. Structural analysis of collagen fibrils after HeNe laser photostimulated regenerating rat tendon. In: *Proceeding 2nd World Association of Laser Therapy.* Kansas City, Missouri, USA; 1998b. p. 66-67.

Pereira NA, Eduardo CP, Matson E, Marques M. Effect of Low-Power Laser Irradiation on Cell Growth and Procollagen Synthesis os Cultured Fibroblasts. *Lasers Surg Med.* 2002;31:263–7

Pinfildi CE, Ferreira LM, Liebano RE, Hochaman B, Prado RP. Helium-neon Laser in Viability of Random Skin Flap in Rats. *Lasers Surg Med.* 2005;37:89-91

Pinfildi CE, Liebano RE, Hochaman B, Enokihara MMSS, Lippert R, Gobbato RC, Ferreira LM. Effect of Low-Level Laser Therapy on Mast Cells in Viability of the Transverse Rectus Abdominis Musculocutaneous Flap. *Photomed Laser Surg.* 2009;27(2):337-43

Pöntinen PJ, Aaltokallio T, Kolari PJ. Comparative effects of exposure to different light sources (He-Ne laser, InGaAl Diode laser, a specific type of noncoherent LED) on skin blood flow for the head. *Acunpuncture and Electro-Therapeutics Research, Elmsford* 1996;21(2):105-18

Posthumus M, Collins M, Cook J, Handley CJ, Ribbans WJ, Smith RKW, Schwellnus, Raleigh S. Components of the transforming growth factor- β family and the pathogenesis of human Achilles tendon pathology – a genetic association study. *Rheumatology.* 2010; 49(11):2090-7

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

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

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

- Reddy GK, Gum S, Stehno-Bitel L, Enwemeka CS. Biochemistry and biomechanics of healing tendon: Part II. effects of combined laser therapy and electrical stimulation. *Med Sci Sports Exerc.* 1998;30(6):794-800
- Riley G. The pathogenesis of tendinopathy. A molecular perspective. *Rheumatology.* 2004;43:131-42
- Riley G. Tendinopathy-from basic science to treatment. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2008;4(2):82-9.
- Rizzi CF, Mauriz JL, Corrêa DSF, Moreira AJ, Zettler CG, Fillipin LI, Marroni NP, González-Galego. Effects of low-level laser therapy (LLLT) on the nuclear factor (NF)κB signaling Pathway in traumatized muscle. *Lasers Surg Med.* 2006;38:704-13
- Salate ACB, Barbosa G, Gaspar P, Koeke PU, Parizotto NA, Benze BG, Foschiani D. Effect of In-Ga-Al-P diode laser irradiation on angiogenesis in partial ruptures of Achilles tendon in rats. *Photomed Laser Surg.* 2005;23(5):470-5
- 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

- Stadler I, Lanzafame RJ, Evans R, Narayan V, Dailey B, Buehner N, Naim JO. 830-nm Irradiation increases the wound tensile strength in a diabetic murine model. *Lasers Surg Med.* 2001;28(3):220-6
- 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
- Trelles MA, Allones I, Mayo E. Combined visible light and infrared light-emitting diode (LED) therapy enhances wound healing after laser ablative resurfacing of photodamaged facial skin. *Medical Laser Application.* 2006;21:165–75(a)
- Trelles MA, Allones I. Red light-emitting diode (LED) therapy accelerates wound healing post-blepharoplasty and periocular laser ablative resurfacing. *J Cosmet Laser Ther.* 2006;8:39–42(b)
- 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
- 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
- Tumilty S, Munn J, McDonough S, Hurley DA, Basford JR, Baxter D. Low-level Laser Treatment of tendinopathy: a systematic review with meta-analysis. *Photomed Laser Surg.* 2010;28(1):3-16

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

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

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

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

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, Mello ML. Optical anisotropy of collagen fibers of rat calcaneal tendons: An approach to spatially resolved supramolecular organization. *Acta histochemica.* 2010;112:53-61

Vink EM et al. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. *Lasers Med Sci.* 2003; 18(2):95-9

Wang JHC. Mechanobiology of tendon. *Journal of Biomechanics.* 2006;39:1563-82

Weiss RA, McDaniel DH, Geronemus RG, Weiss MA. Clinical trial of a novel non-thermal LED array for reversal of photoaging: clinical, histologic, and surface profilometric results. *Lasers Surg Med.* 2005;36:85-91

Whelan HT, Smits RL, Buchmann EV, Whelan NT, Turner SG, Margolis DA, Cevenini V, Stinson H, Ignatius R, Martin T, Cwiklinski J, Philippi AF, Graf WR, Hodgson B, Gould LJ, Kane M, Chen G, Caviness J. Effect of Nasa Light-Emitting Diode Irradiation on Wound Healing. *Journal of Clinical Laser medicine & Surgery*. 2001;19(6):305-14

Whelan HT, Buchmann EV, Dhokalia A, Kane MP, Whelan NT, Wong-Riley MT, Eells JT, Gould LJ, Hammamieh R, Das R, Jett M. Effect of NASA light-emitting diode irradiation on molecular changes for wound healing in diabetic mice. *Journal of Clinical Laser medicine & Surgery*. 2003;21(2):67-74

Wong-Riley MT, Bai X, Buchmann E, Whelan HT. Light-emitting diode treatment reverses the effect of TTX on cytochrome oxidase in neurons. *Neuroreport*. 2001;12(148):3033-37

Wood VT, Pinfildi CE, Neves MAI, Parizoto NA, Hochman B, Ferreira LM. Collagen Changes and Realignment Induced by Low-Level Laser Therapy and Low-Intensity Ultrasound in the Calcaneal Tendon. *Lasers Surg Med*. 2010;42(6):559-65

(WALT) World Association of Laser Therapy. Dosage Recommendations and Scientific Guidelines. Accessed 10th October 2010.<http://www.walt.nu>

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

Yeh NG, Wu CH, Cheng TC. Light-emitting diodes – Their potential in biomedical applications. *Renew Sustain Energy Rev*. 2010;14:2161-66

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

Zafar MS, Mahmood A, Maffulli N. Basic Science and Clinical Aspects of Achilles Tendinopathy. *Sports Med Arthrosc Rev*. 2009;17(3):190-97

NORMAS ADOTADAS

NORMAS ADOTADAS

ICMJE – International Committee of Medical Journals Editors. Uniform Requiriments for Manuscripts Submitted to Biomedical Journal. Disponível no endereço eletrônico: <http://www.icmje.org> .

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – Princípios Éticos da Experimentação Animal. Disponível no endereço eletrônico: <http://www.meusite.com.br/cobea/index.htm> .

ACLAM – *American College of Laboratory Animal Medicine* - Princípios Éticos da Experimentação Animal. Disponível no endereço eletrônico: <http://www.aclam.org>.

Terminologia Anatômica. Terminologia Anatômica Internacional. São Paulo: Manole; 2001.

Consulta ao DeCS – Descritores em Ciências da Saúde – Termilnologia em Saúde. Disponível no endereço eletrônico: <http://www.bireme.br>.

Hochman B, Nahas FX, Ferreira LM. Fotografia aplicada na pesquisa clínico-cirúrgica. Acta Cir Bras. 2005;20(supl.2):19-25.

International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature
– Nômina Anatômica Veterinária. 3.ed. New York:Ithaca. 1983.

Goldenberg S. Orientação Normativa para Elaboração e Difusão de
Trabalhos Científicos. São Paulo:2001. Disponível no endereço
eletrônico: <http://www.metodologia.org> .

Federative Committee on Anatomical Terminology. Terminologia
Anatômica Internacional. Tradução da Comissão de Terminologia
Anatômica da Sociedade Brasileira de Anatomia. São Paulo: Manole;
2001.

Ferreira LM, Goldenberg S, Nahas FX, Barbosa MVJ, Ely PB, Blanes
L, Bretos JLG. 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.

Graner EA. Estatística. São Paulo: Melhoramentos;1966. 187p.

ABSTRACT

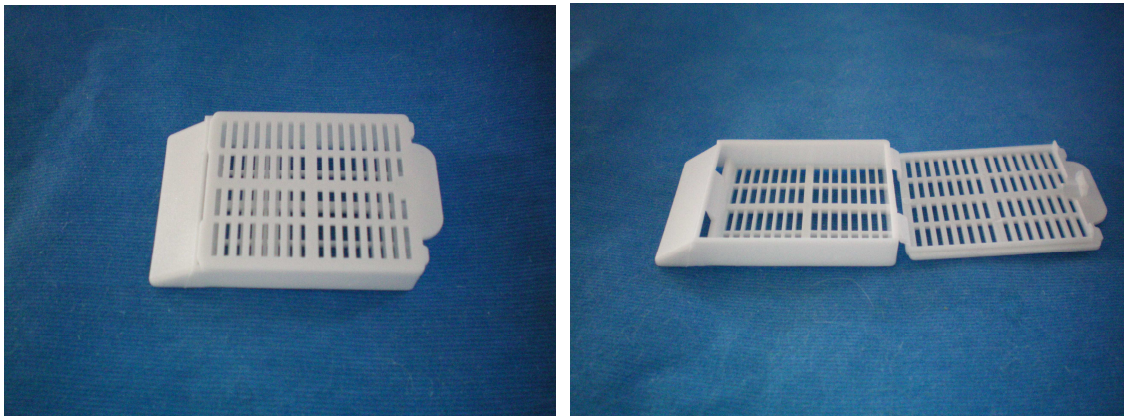
ABSTRACT

Background: Calcaneous tendon rupture is considered a severe lesion due to the poor blood supply that may take weeks or months to complete rehabilitation. LED (Light Emitting Diode) has been an alternative treatment towards laser because of the healing results. **Objective:** To assess the effect of LED (λ 850nm) on calcaneous tendon healing in rats. **Methods:** Were used 30 male Wistar rats with partial lesion on the calcaneous tendon performed with direct trauma. The animals were randomly divided into 3 groups: Group 1 Sham (LED); Group 2 (LED 850nm) with energy density $10\text{J}/\text{cm}^2$ and Group 3 (LED 850nm) with energy density $20\text{J}/\text{cm}^2$. The animals were treated for 6 consecutive days and on the 7th day after post lesion the tendons were removed and evaluated about collagen fibers realignment (birefringence) and collagen amount of type I and III (picrosirius). **Results:** Group 2 ($10\text{J}/\text{cm}^2$) and Group 3 ($20\text{J}/\text{cm}^2$) showed better results about fibers collagen realignment when compared with the sham group ($p < 0.001$). Groups 2 and 3 showed a great amount of collagen type I than the sham group ($p < 0.001$). There was no difference when compared the treatment groups between them. About collagen type III, both treatment groups (2 and 3) showed a lesser amount than the sham group with $p < 0.01$. **Conclusion:** LED therapy was efficient on the healing process of the partial lesion calcaneous tendon in rats, showing better fibers collagen realignment and increase of the collagen type I.

APÊNDICE

APÊNDICE 1

Apêndice 1. Imagem correspondente a caixa (cassete) onde foram colocados os tendões do calcâneo de cada animal.



APÊNDICE 2**Apêndice 2.** Resultados do teste de Tukey

Variáveis	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
1,00	10	35,2238		
3,00	10		49,5910	
2,00	10			59,1810
Sig.		1,000	1,000	1,000

APÊNDICE 3

Apêndice 3. Resultados do teste de Tukey, para o Colágeno Tipo III (%).

Etiqueta	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
3,00	10	66,5250	
2,00	10	66,6350	
1,00	10		80,1880

APÊNDICE 4

Apêndice 4. Resultados do teste de Tukey, para o Colágeno Tipo I (%).

Etiqueta	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
3,00	10	19,8120	
2,00	10		33,3650
1,00	10		33,4750

ANEXO

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



Universidade Federal de São Paulo

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

DETALHAMENTO FINANCEIRO: A apresentação do orçamento detalhado permitiu a análise econômica viabilizando assim, a realização do projeto..

CRONOGRAMA: 12 meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: Mestrado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: 3/8/2009 e 3/8/2010.

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

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

Atenciosamente,

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

FONTES CONSULTADAS

FONTES CONSULTADAS

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

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

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

Liebano RE, Dias SL, Ferreira LM. Number of objectives and conclusion in dissertations and thesis. *Acta Cir. Bras.* 2005;20(4):272-4

Nahas FX, Hochman B, Ferreira LM. Developing a study: initial strategy. *Acta Cir. Bras.* 2005;20(2):10-2

Haddad N. Metodologia de estudos em ciências da saúde: como planejar, analisar e apresentar um trabalho científico. São Paulo: Roca; 2004.

Spector N. Manual para a redação de teses, dissertações e projetos de pesquisa. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997.