

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA



EFEITO DO ENVELHECIMENTO E DA DOSE ENERGÉTICA
NA FOTOBIMODULAÇÃO LASER DE BAIXA
INTENSIDADE NA REGENERAÇÃO TENDÍNEA

CHARLES TACIRO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

“EFEITO DO ENVELHECIMENTO E DA DOSE ENERGÉTICA
NA FOTOBIMODULAÇÃO LASER DE BAIXA
INTENSIDADE NA REGENERAÇÃO TENDÍNEA”

Aluno: Charles Taciro

Dissertação de Mestrado apresentada à
Coordenação do programa de Pós-
Graduação em Fisioterapia da
Universidade Federal de São Carlos –
PPG/ UFSCar como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Mestre em Fisioterapia

Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto
ORIENTADOR

Apoio financeiro: CAPES

São Carlos
2006

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

T118ae

Taciro, Charles.

Efeito do envelhecimento e da dose energética na fotobiomodulação laser de baixa intensidade na regeneração tendínea / Charles Taciro. -- São Carlos : UFSCar, 2007.
74 f.

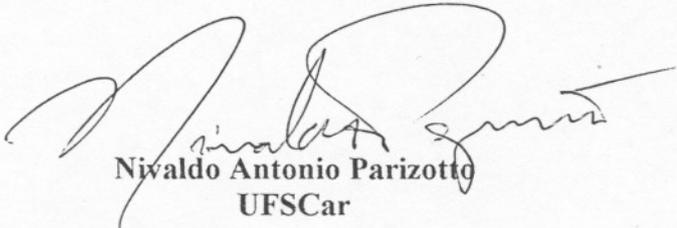
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2007.

1. Fisioterapia. 2. Laserterapia. 3. Envelhecimento. 4. Tendão de Aquiles. 5. Reparo tecidual. I. Título.

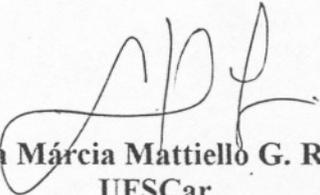
CDD: 615.82 (20ª)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA PARA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Mestrado DE CHARLES TACIRO, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 27 DE FEVEREIRO DE 2007.

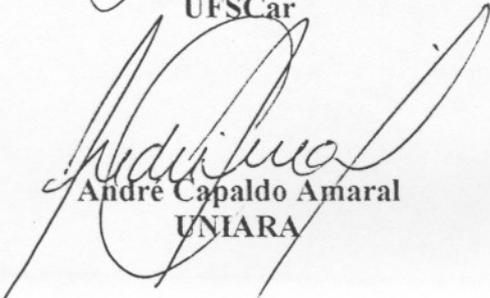
BANCA EXAMINADORA:



Nivaldo Antonio Parizotto
UFSCar



Stela Márcia Mattiello G. Rosa
UFSCar



André Capaldo Amaral
UNIARA

Dedico este trabalho...

... à minha mãe Kazue, pelo eterno amor e dedicação incondicionais e exemplo de garra, perseverança e humanidade;

... ao meu pai Motomu (*in memoriam*), por tudo que você foi e representa para mim.

... meus irmão, William e Alexis pelo companheirismo, compreensão e paciência

... à Roberta, por estar presente na minha vida e compartilhar de meus sonhos e realizações.

Agradecimento especial ao meu orientador, Professor Nivaldo Antonio Parizotto, por acreditar em mim desde o início, confiando sua amizade, incentivando e aguçando minha vontade de aprender cada vez mais. Pela paciência, generosidade e interesse em ouvir e responder minhas questões. Pelo exemplo de profissionalismo e competência.

Agradecimentos:

Complexa não é a compreensão dos mecanismos que envolvem a vida, mas sim as leis que regem a humanidade: amizade, paz, educação, companheirismo e o amor. É somente a partir delas que as verdadeiras realizações são possíveis. Sendo assim, gostaria de agradecer imensamente àqueles que me acompanharam e apoiaram durante este período:

À minha família que sempre me apoiou e se esforçou para que eu conseguisse vencer os meus obstáculos

À minha namorada, Roberta, pelo amor, carinho e paciência nesta interminável jornada.

Aos professores da UFSCar em especial às Profas. Aparecida Maria Catai, Tânia de Fátima Salvini pelo exemplo de profissionalismo, incentivo, paciência e amizade.

À Rodrigo L. Carregaro, pessoa inestimável cuja solidariedade e amizade são intermináveis.

Meus amigos e colegas de laboratório, Patrícia, Paulo, Wouber, Ana Cláudia, Davilene, Olga, Livia, Marcel, Natália, Daniel, Thiago, Sabrina, Dório, Jamacy, Miagui, Sakabe, Pozzi, Ruth, Teresa. Meu muito obrigado pelos ganhos quebrados, pela ajuda, amizade e companhia.

Meus irmãos de escolha Paula e Tarcísio, minha eterna amizade e admiração.

Ao Professores do laboratório de Anatomia da UFSCar Marcelo, Maíra e Salete cuja ajuda foi extremamente importante para a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Histologia da Unesp da Faculdade de Odontologia da Unesp – Araraquara, em especial, à Profa. Liseti Toledo Ramalho e seu aluno Hermes Pretel.

Ao amigo Dr. Rubens Bernardes Filho, pela ajuda na Microscopia de Força Atômica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado.

LISTA DE ABREVIATURAS

A10J: Subgrupo adulto 10J/cm²
A3J: Subgrupo adulto 3J/cm²
ACL: Subgrupo adulto controle lesado
APL: Subgrupo adulto placebo
AsGaAl: arseneto de gálio alumínio
ATP: trifosfato de adenosina
DNA: ácido desoxirribonucléico
DP: desvio padrão
FGF: fator de crescimento do fibroblasto
HE: Hematoxilina e eosina
He-Ne: hélio-neônio
J10J: Subgrupo jovem 10J/cm²
J3J: Subgrupo jovem 3J/cm²
JCL: Subgrupo jovem controle lesado
JPL: Subgrupo jovem placebo
KCl: cloreto de potássio
LLLT: terapia laser de baixa intensidade
MFA: microscopia de força atômica
nm: nanômetro
O₂: oxigênio
P.O.: pós-operatório
PDGF: fator de crescimento derivado das plaquetas
PGE1: prostaglandinas E-1
PGE2: prostaglandinas E-2
RNA: ácido ribonucléico
RNAm: ácido ribonucléico mensageiro
TGF- α : fator de crescimento transformador
TGF- β -I: fator de crescimento transformador
VEGF: fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE FIGURAS

Parte I

Figura 1. Procedimento cirúrgico, exposição do tendão calcâneo para a tenotomia sem posterior tenorrafia.

Figura 2. Equipamento laser utilizado.

Figura 3. Tratamento: procedimento de radiação laser de baixa intensidade.

Figura 4. Esquema de funcionamento do microscópio de força atômica.

Figura 5. Tela de análise do software *Image Processing and Data Analysis*.

Figura 6. Tela de análise do software *Imagetool 3.0*.

Parte II

Artigo 1

Figura 1. Gráfico referente à quantificação de capilares sanguíneos.

Figura 2. Gráfico referente à quantificação de fibroblastos.

Figura 3. Gráfico referente à quantificação de células do processo inflamatório.

Artigo 2

Figura 1. Gráfico referente à mensuração da espessura dos feixes de colágeno.

Figura 2. Gráfico referente à quantificação de fibroblastos.

Figura 3. Prancha de imagens de MFA do tendão obtida para o grupo de ratos de 4 semanas.

Figura 3. Prancha de imagens de MFA do tendão obtida para o grupo de ratos de 27 semanas.

ANEXOS:

1. Parecer do comitê de Ética em pesquisa com animais
2. Dados relativos às medidas das espessuras dos feixes de colágeno por MFA
3. Dados relativos à histomorfometria (contagem de vasos e células)
4. Pranchas de fotomicrografias

Esta dissertação foi elaborada no modo de artigos, sendo dividida em 3 partes. A primeira parte é constituída de um resumo, justificativa, objetivo e detalhamento da metodologia empregada.

A segunda parte compreende os artigos elaborados com base na primeira parte. Foram redigidos dois artigos, o primeiro aborda principalmente os aspectos celulares e vasculares da regeneração tendínea sob efeito da laserterapia e da idade, e o segundo, os aspectos estruturais do tecido sob as mesmas condições. Foram realizados dessa forma, pois entendemos que a estrutura do tecido é decorrente das células que o compõe, são elas que constituem e formam a arquitetura e desta se derivam as propriedades mecânicas do material e sua função no organismo.

A terceira parte constitui-se das conclusões gerais obtidas a partir dos resultados experimentais, considerações finais, a bibliografia utilizada e lista de anexos.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	6
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE ANEXOS.....	8
PARTE I.....	11
1 RESUMO/ABSTRACT.....	12
2 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	14
3 OBJETIVOS.....	17
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1 Animais experimentais.....	17
4.2 Modelo experimental.....	18
4.3 Grupos experimentais.....	18
4.4 Procedimento operatório.....	19
4.5 Tratamento.....	20
4.6 Preparação das amostras.....	21
4.7 Análise por Microscopia de força atômica (MFA).....	22
4.8 Análise de luz comum – histologia.....	25
4.9 Análise dos dados.....	26
PARTE II.....	27
Artigo 1: Ação idade-dependente da fotobiomodulação laser de baixa intensidade na angiogênese e proliferação de fibroblastos na regeneração tendínea.....	28
Artigo 2: Aspectos estruturais da matriz extracelular no processo de regeneração tendínea estimulada por laser de baixa intensidade.....	43
PARTE III.....	61
5 CONCLUSÕES GERAIS.....	62
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	62
7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
8 ANEXOS.....	70

PARTE I

Resumo
Introdução
Objetivo
Metodologia

1. RESUMO

O envelhecimento biológico é uma das principais causas para a predisposição do tendão aos processos degenerativos, patológicos e retardo da reparação tecidual. Várias modalidades terapêuticas são utilizadas para promover a aceleração e melhora do reparo tendíneo, dentre elas a terapia laser de baixa intensidade (LLLT). Porém são pouco conhecidos os reais efeitos desta terapia quando se associa um fator potencialmente decisivo na resposta celular como o envelhecimento. Este estudo avaliou através de técnicas de microscopia de luz comum e de força atômica os efeitos da LLLT, aplicada na reparação do tendão calcâneo em duas fases maturacionais. Um grupo de ratos jovens (4 semanas de idade, $n = 40$, massa = $111,3 \pm 8,3$ g), subdividido aleatoriamente em 4 subgrupos contendo cada um 10 animais: J3J (dose $3\text{J}/\text{cm}^2$, energia total = $101,7\text{mJ}$), J10J ($10\text{J}/\text{cm}^2$, energia total = $339,6\text{mJ}$), placebo - JPL (dose $0\text{J}/\text{cm}^2$), controle - JCL (nenhum tratamento); e um grupo adulto (27 semanas de idade, $n = 40$, massa = $385,4 \pm 34,3$ g), subdividido aleatoriamente em 4 subgrupos: A3J (dose $3\text{J}/\text{cm}^2$, energia total = $101,7\text{mJ}$), A10J (dose $10\text{J}/\text{cm}^2$, energia total = $339,6\text{mJ}$), placebo - APL (dose $0\text{J}/\text{cm}^2$), controle - ACL (sem tratamento). Todos os animais foram submetidos ao procedimento de tenotomia radical do tendão direito, entre a inserção calcâneo e a transição miotendínea, sem posterior tenorrafia. O laser utilizado (685nm , $5,4\text{W}/\text{cm}^2$) foi aplicado em 12 sessões, uma vez ao dia, em um único ponto sobre a região da lesão. No 13º dia pós-operatório os animais foram sacrificados e seus tendões removidos, processados e analisados qualitativa e quantitativamente, por meio de microscopia de força atômica (MFA) e análise histológica por morfometria. A análise dos dados mostrou significativa alteração ($p < 0,05$) da resposta do tecido à irradiação laser, tanto de forma idade-dependente como dose-dependente, sendo que, os resultados demonstram maior relevância para o grupo adulto que para o jovem. Comparativamente, o grupo adulto apresentou qualitativamente maior resposta biológica na agregação, organização, alinhamento do colágeno. Quantitativamente, o grupo adulto apresentou melhor resposta para a dose de $10\text{J}/\text{cm}^2$ principalmente em relação à angiogênese, contagem de fibroblastos e espessura dos feixes de colágeno. Esses resultados possivelmente podem ter uma relação com o maior estresse oxidativo característico ao incremento da idade.

Palavras chave: Laserterapia, reparo tendíneo, fibroblasto, capilar sanguíneo, envelhecimento, colágeno

ABSTRACT

There is a rapid increase in the size of the elderly population due to a complex interaction of medical and epidemiological factors. Also, there is a parallel increase in morbidity associated with age-related delayed tendinopathy healing, and treatment of such acute and chronic condition costs the Health Services over 1 Billion dollars per year. Despite the obvious clinical impact, the basic cellular and molecular mechanisms underlying impaired human tendon healing are largely unknown. However, recent reports have showed the action mechanism of low level laser therapy (LLLT) in producing accelerated tendon healing, but the real effects of this therapy associated with aging effects are not yet known. This study evaluated the effects of the LLLT on repair process of rat calcaneal tendon in two different ages. Eighty male Wistar rats were divided in 2 experimental groups with 40 rats at each one: young group (4 weeks old, body mass = 111.3 ± 34.3 g) and mature adult group (27 weeks old, body mass = 385.4 ± 34.3 g). The young group was subdivided in subgroup Y3J (12 session, total energy = 101.7mJ, laser 685nm, 5.4W/cm^2 , 3J/cm^2), subgroup Y10J (12 session, total energy = 339.6mJ, laser 685nm, 5.4W/cm^2 , 10J/cm^2); subgroup YPL (placebo treatment) and subgroup YCL (no treatment). The mature adult group was subdivided in subgroup A3J (12 session, total energy = 101.7mJ, laser 685nm, 5.4W/cm^2 , 3J/cm^2), subgroup A10J (12 session, total energy = 339.6mJ, laser 685nm, 5.4W/cm^2 , 10J/cm^2); subgroup APL (placebo treatment) and subgroup ACL (no treatment). All animals had the medial region of right calcaneal tendon totally tenotomized. They were sacrificed on the 13th post-operate day and their tendons were surgically removed for a quantitative and qualitative analysis. The Atomic Force Microscopy analysis showed better organization quality (alignment, thickness and aggregation) of collagen bounds in mature irradiated groups. However, it was found differences ($p < 0.05$) in thickness of collagen bundles (TCBs) for several intersections among subgroups. The subgroup A10J presented greatest TCBs (5.69 ± 0.69), and the ACL subgroup presented smallest TCBs (4.51 ± 0.6) in the mature group. The dimensional data showed higher differences in the irradiated subgroup in mature group when compared to the same subgroup in young group. Histological analysis showed increase ($p < 0.05$) in the number of capillar vessels and fibroblast cell proliferation after LLLT in both young and mature groups, however the higher modulation was observed in the mature group. Minor influence of laser radiation in the young group may be justified by divergence on chemistry, physics and metabolic age-related. Maybe the accumulated oxidative stress resulting from a gradual shift in the redox status of tissues should be a key mechanism underlying the aging process and the higher laser effect noted in the mature group. Age should be considered an important parameter to LLLT.

Key words: Laser therapy, tendon repair, fibroblast, blood vessel, aging, collagen.

2. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O avanço da ciência e a melhoria das condições gerais de vida têm contribuído para controlar e tratar muitas doenças responsáveis pela morbidade e mortalidade da população, tanto dos países desenvolvidos bem como aqueles em desenvolvimento, aumentando dessa forma, a expectativa e a qualidade de vida.

Essa tendência global tem focado a atenção de diversos pesquisadores e da população na busca por soluções que minimizem os possíveis efeitos negativos do avanço da idade no organismo. Cada vez mais se pesquisam formas de deter ou retardar o processo do envelhecimento ou estratégias que garantam uma manutenção da capacidade funcional e da autonomia, nas últimas décadas da vida.

O envelhecimento é um processo gradual e espontâneo de mudanças que resultam na maturação através da infância, puberdade, adolescência e que passa por um declínio no período seguinte de meia idade até a idade avançada. Correlaciona-se a esse declínio, a senescência, que pode ser entendida como a perda progressiva da capacidade de homeostase (BIRREN, SCHAIE & SCHROOTS, 1996; JAZWINSKI, 2000).

Assim o processo de envelhecimento é uma cadeia de eventos dinâmicos e progressivos no qual há modificações morfológicas, fisiológicas, bioquímicas, psicológicas e funcionais, que determinam em grande parte, a capacidade de adaptação do indivíduo ao meio ambiente, que pode, conseqüentemente ser relacionados às incidências de processos patológicos (HARMAN, 1981).

As alterações no organismo em função do tempo incluem desde erros na transcrição e tradução do DNA, variação da concentração de proteínas, minerais e hormônios, redução do metabolismo de determinadas células, diminuição do aporte vascular, capacidade imunológica e propriedades físicas dos materiais como a

resistência mecânica. Podemos correlacionar à essas alterações as lesões que ocorrem com uma maior incidência na fase avançada do desenvolvimento e a sua lentidão de recuperação, culminando em desconforto e a dor causados pela injúria e ainda o elevado custo para a previdência social (LEEUWENBURGH, 2003; MERRY, 2004; POUSSON & VALOUR, 2003; NESTORSON et al, 2000).

Dentre os efeitos mais preocupantes do envelhecimento, o retardo da regeneração tecidual e os agravos decorrentes deste processo lentificado são aqueles que geram maiores prejuízos no envelhecimento, tanto financeiros como psicológicos. Em virtude disso, diversos pesquisadores têm procurado compreender como se dá o processo de regeneração tecidual, desde os mecanismos de lesão até a recuperação total da função e assim desenvolver meios que possam interferir positivamente nesta cadeia de eventos para um retorno mais rápido e eficaz do indivíduo acometido pela lesão às suas funções normais (BAILEY, PAUL & KNOTT, 1998; BIZOT-FOULON, BOUCHARD & HORNEBECK, 1995, HARMAN, 1981).

Alguns processos de regeneração tecidual induzido por diversos recursos utilizados na fisioterapia têm como base aspectos biomodulatórios que envolvem componentes moleculares, celulares e teciduais os quais podem ser modificados pelo envelhecimento.

O que justifica a teoria no qual, as abordagens terapêuticas cuja ação é baseada nos processos biológicos alterados pelo envelhecimento devem ser aplicadas de forma a serem específicos não só para o tipo de patologia e período da lesão, mas também específicos para cada idade fisiológica/ cronológica do organismo.

Contudo pouco se conhece sobre as particularidades das modalidades terapêuticas utilizadas nos processos de regeneração tecidual do idoso, como o ultra-som

terapêutico, ondas curtas, microondas, correntes elétricas e a laserterapia de baixa intensidade (LLLT).

Apesar de escassos os estudos que relacionam especificamente LLLT ao envelhecimento, resultados positivos desta modalidade de tratamento são encontrados em processos envolvidos na senescência, como apoptose celular, concentração de radicais livres e citocinas, produção da superóxido-dismutase (enzima que atenua o dano causado por radicais livres) (KARU, ANDREICHUK & RYABYKH, 1993; VLADIMIROV, OSIPOV & KLEBANOV, 2004), atividade de fibroblastos, neoangiogênese e fluxo sanguíneo. Tais efeitos da irradiação laser sobre tecidos biológicos podem promover uma aceleração do processo de reparo tecidual e melhoria das suas propriedades físicas e funcionais (PARIZOTTO & BARANAUSKAS, 1998; ENWEMEKA, 1992; ENWEMEKA & REDDY, 2000).

Tendinopatias são complicações freqüentes provocadas pelo processo de envelhecimento e senescência. A redução da capacidade de reparação e resistência tecidual no envelhecimento é verificada no fato da maioria das rupturas totais do tendão de Aquiles ocorre em indivíduos acima de 35 anos de idade (JÒZNA, KVIST & BALINT, 1989; LEPPILAHTI, PURANEN & ORAYA, 1996; NESTORSON et al, 2000). Essa lesão pode estar relacionada à elementos influenciados pela radiação laser como suprimento sanguíneo (HÅSTAD, LARSSON & LINDHOLM, 1958/59; ÅSTRÖN & RAUSING, 1995) e nutricional, redução do volume colágeno, água e glicosaminoglicanas (IPPOLITO *et al.* 1980).

Devido ao sustentável corpo de evidências científicas dos efeitos da LLLT sobre a regeneração do tendão e à elevada incidência das tendinopatias no adulto e do idoso e considerando a possibilidade da influência da idade nas vias da fotobiomodulação, o

modelo experimental deste estudo se baseia no tratamento da tenotomia transversa radical do tendão calcâneo de ratos em duas fases maturacionais.

Enfatizamos que a definição de parâmetros ideais e dos reais efeitos da LLLT sobre tecidos biológicos seja essencial para a eficácia máxima da regeneração principalmente quando se trata de envelhecimento, cujas conseqüências de um reparo mais lento pode trazer mais prejuízos quando comparado a uma lesão do mesmo porte num equivalente jovem.

3. OBJETIVO

O objetivo principal deste estudo foi investigar, por meio de microscopia de força atômica e por análise histológica, os efeitos biomodulatórios da LLLT em doses previamente estabelecidas sobre o processo de regeneração após a tenotomia total do tendão calcâneo de ratos em 2 idades maturacionais, visando correlacionar o envelhecimento à fotobiomodulação do processo regenerativo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais Experimentais

Foram utilizados 80 animais (*Rattus norvegicus albinus*), da raça Wistar, machos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos, com idade e massa corpórea variando conforme a faixa etária de cada grupo.

Os animais permaneceram no Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos até a idade apropriada para o experimento, sendo então transferidos para o Biotério do Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, onde

foram mantidos em gaiolas de polipropileno padrão, contendo cada uma quatro animais. Estes receberam água e ração balanceada granulada (PRÓ-BIOTÉRIO / MP-77) - *ad libitum* e foram mantidos em ambiente higienizado, com iluminação em ciclo claro/escuro de 12 horas.

4.2 Modelo Experimental

O modelo utilizado neste estudo foi baseado nos experimentos de CARRINHO et al. (2006); ENWEMEKA et al. (2000); GUM et al. (1997); STEHNO-BITTEL, (1998); ENWEMEKA et al. (1990); ENWEMEKA, (1989); PARIZOTTO (1998) ao promoverem uma tenotomia na porção média do tendão calcâneo de roedores através de uma incisão transversal do tendão dissecado.

4.3 Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em 2 grupos, conforme a faixa etária correspondente a um grupo jovem (4 semanas, massa corpórea = $111,3 \pm 8,3$ g), adulto maduro (27 semanas, massa corpórea = $385,4 \pm 34,3$ g) contendo cada um 40 animais, subdivididos em 4 subgrupos de 10 elementos cada, que receberão tratamento específico conforme a tabela a seguir, sendo apenas o grupo controle padrão de todas as idades mantido sem lesão:

	Sub-grupos	Idade (semanas)	Dose	Potência	Energia (por ponto)
Grupo Jovem	J3J – 3 joules	4	3J/cm ²	15mW	8,5mJ
	J10J – 10 joules	4	10J/cm ²	15mW	8,5mJ
	JPL – placebo	4	0J/cm ²	0mW	8,5mJ
	JCL – controle lesado	4	-----	-----	8,5mJ
Grupo adulto	A3J – 3 joules	27	3J/cm ²	15mW	28,3mJ
	A10J – 10 joules	27	10J/cm ²	15mW	28,3mJ
	APL – placebo	27	0J/cm ²	15mW	28,3mJ
	ACL – controle lesado	27	-----	-----	28,3mJ

4.4 Procedimento Operatório

Os animais foram inicialmente pesados e submetidos a uma anestesia geral por via intraperitoneal utilizando-se uma combinação de anestésicos (KETAMINA - 95mg/kg e XILAZINA 2% -12mg/kg), previamente estabelecida, em doses correspondentes à massa corporal de cada animal.

A pele sobre a região posterior da tíbia do membro posterior direito na região correspondente ao tendão calcâneo foi tricotomizada com um barbeador elétrico. Após assepsia local (com álcool iodado), foi realizada uma incisão longitudinal de aproximadamente 7,0mm de comprimento sobre a pele no local correspondente ao terço médio do tendão calcâneo, entre a inserção calcâneo e a junção miotendínea onde foi efetuada a tenotomia no sentido transversal do eixo do tendão (figura 1A).

A seguir a pele foi suturada com fio absorvível (CATGUT – 4.0) e submetida à limpeza local (álcool iodado), não havendo posteriormente nenhum tipo de imobilização do segmento (figura 1B).

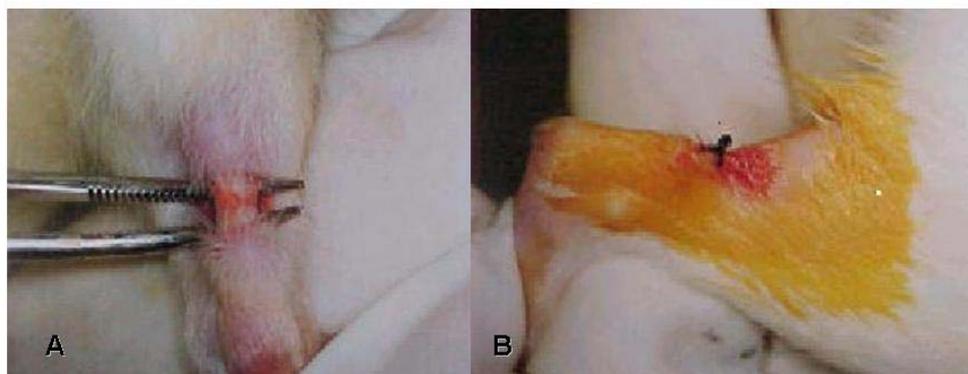


Fig.1 – “A” Exposição do tendão calcâneo para o procedimento de tenotomia radical e em “B” sutura do acesso cirúrgico.

4.5 Tratamento

Para o tratamento dos animais foi utilizado um laser (DMC[®] - São Carlos, Brasil – figura 2) classe 3B, diodo AsGaAl, com comprimento de onda 685nm, potência de saída de 15mW, área da fibra de 0.0028cm², diâmetro do feixe de 0,6mm, divergência de 1.5°, emissão contínua e densidade de potência de 5,4W/cm², em doses de 3J/cm² (8,5J por ponto) e 10J/cm² (28.3J por ponto).



Fig. 2 – Equipamento emissor de radiação laser utilizado no estudo

Inicialmente o equipamento laser foi aferido no Grupo de Óptica da Universidade de São Paulo (USP) - Campus de São Carlos, para se obter uma alta confiabilidade na intensidade efetiva da emissão laser. Também foi verificada a potência de emissão do laser no início e fim de cada sessão através de um *Lasercheck (Hand held laser power meter – COHERENT[®])*.

Para a realização das aplicações laser, os animais foram imobilizados através de preensão manual e irradiando-se por fotoestimulação transcutânea a região da lesão com a técnica de contato a um ângulo de 90° em relação à superfície da área lesada (figura 3), sendo a primeira irradiação 24h após a lesão. O tratamento constituiu-se de 12 sessões consecutivas, intervaladas por 24h. No 13° dia após a tenotomia (24h pós a última sessão) os animais foram submetidos à eutanásia (anestesia e sedação por ketamina e xilazina seguida de injeção intracardíaca de KCl) e imediatamente seus tendões direitos foram retirados cirurgicamente por dissecação desde a inserção

calcanear até a junção miotendínea, seguindo-se então o procedimento de preparação das lâminas histológicas.

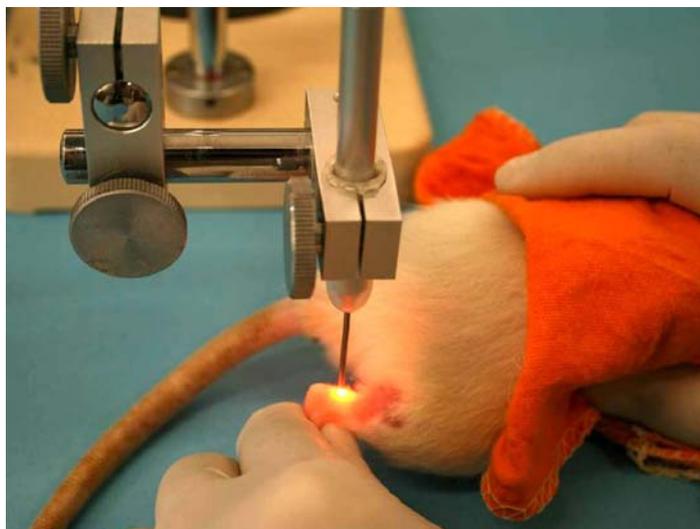


Fig. 3 – Procedimento de radiação laser de baixa intensidade transcutânea sobre o local da tenotomia do calcâneo esquerdo

4.6 Preparação das Amostras

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

Posteriormente os tendões foram desidratados em soluções crescentes de álcool etílico, a 70%, 90%, 95% por uma hora em cada solução e a 100% por 3 horas. Então os tendões foram diafanizados inicialmente em solução de álcool/xilol 1:1 por uma hora e a seguir em 3 banhos de xilol de 1 hora de duração cada, seguidos de 3 banhos de parafina líquida com duração de 1 hora/ banho para a inclusão em blocos de parafina, para o procedimento do corte das peças.

Os tendões, inclusos nos blocos de parafina, foram cortados no sentido longitudinal por meio de um micrótomo rotativo numérico (Ancap®, modelo 297 com espessura padronizada de 7,0 μ m. Os cortes de tendão destinados à análise por microscopia de força atômica foram montados em lâminas de vidro padrão e sem cobertura por lamínulas e coloração. Os cortes destinados à análise por microscopia de luz comum seguiram o processo convencional de coloração por Hematoxilina e Eosina (HE)

4.7 Microscopia de Força Atômica (MFA)

Esta é uma técnica de microscopia na qual a interação atômica entre uma ponta de prova situada na extremidade de uma alavanca e a superfície da amostra é usada para mapear a topografia.

Quando a ponta está próxima da superfície da amostra as forças de interação defletem a alavanca. A deflexão da alavanca é medida por um sistema de detecção de posição que envia este sinal para o circuito de realimentação do microscópio. Durante a varredura da amostra o circuito realiza mudanças na direção de varredura da ponta-amostra do *scanner* através de um sistema piezelétrico, formando assim um mapa da topografia da superfície.

Dependendo do regime de forças de interação escolhido existem três modos de operação para a MFA. No modo contato a força entre ponta-amostra é repulsiva, no modo não-contato o regime é de forças atrativas e no modo contato-intermitente ocorre uma inversão no tempo entre forças atrativas e repulsivas. A seguir apresentaremos somente os detalhes do modo contato, que foi utilizado neste trabalho.

Neste modo de operação, a ponta do MFA exerce um contato físico com a superfície da amostra. A intensidade da força envolvida é suficientemente baixa para que não ocorram deformações permanentes na amostra ou na ponta o que impediria a reprodutibilidade e prejudicaria a qualidade dos resultados.

A detecção da deflexão da alavanca pode ser feita por vários métodos, sendo que os mais utilizados são os sistemas de deflexão ótica. Neste sistema a medida da deflexão da alavanca é realizada conforme mostra a figura 4. Um feixe *laser* que incide sobre a alavanca, na parte oposta onde está montada a ponta, e atinge um fotodetector sensível à posição. Quando a alavanca sofre uma deflexão ocorre a mudança da posição do feixe de *laser*, refletido pela alavanca, no fotodetector. Variações menores que 1\AA podem ser obtidas dependendo do fator de amplificação do sistema ótico, que é proporcional à razão do caminho ótico entre a alavanca e o detector e o comprimento da alavanca.

O sistema de movimentação tridimensional, *scanner* na figura 1 permite que a amostra realize as varreduras horizontais nas direções x e y . Durante as varreduras horizontais, a topografia da amostra é medida adquirindo as variações z (direção vertical) do *scanner*, produzidas pelo sistema de realimentação para manter a força constante.

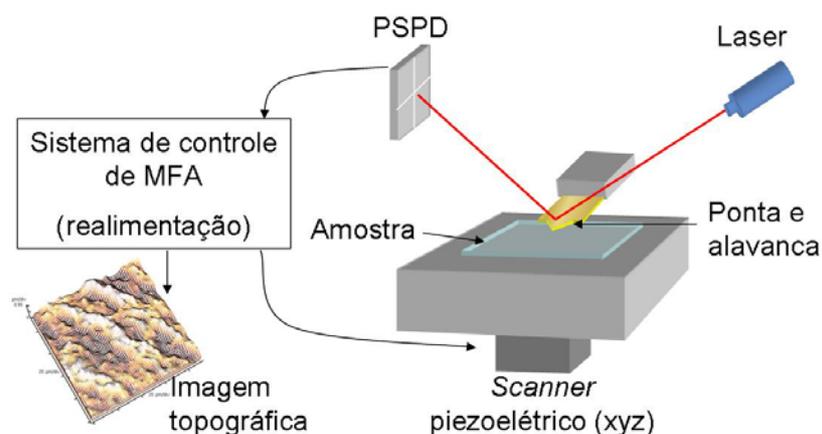


Figura 4. Esquema geral da montagem e funcionamento da microscopia por força atômica em modo contato. O feixe de laser incide sobre a alavanca, sua reflexão é detectada por um fotodetector sensível à posição (PSPD), onde é obtida a deflexão da alavanca devido às forças de interação entre ponta-amostra.

No nosso trabalho a topografia das amostras foi adquirida através de um microscópio de força atômica (modelo *BioProbe* da *Park Scientific Instruments*®, atualmente a *Thermo Microscopes – Veeco*®), situado no laboratório de eletrotermofototerapia, departamento de Fisioterapia da UFSCar, operando no modo de contato no meio aéreo.

As lâminas foram hidratadas por cerca de 30 minutos em água destilada. Logo em seguida, foram obtidas cerca de 4 capturas de MFA para cada animal respeitando uma disposição aleatória na área correspondente à lesão, a uma frequência de varredura de 0,8Hz por linha, gerando 256 linhas, num campo de análise de 100X100µm, permitindo uma visão detalhada da topografia da matriz extracelular da área lesada do tendão.

Com a finalidade de caracterizarmos estatisticamente a topografia da matriz extracelular dos tendões e investigarmos as suas características dimensionais e organizacionais, foi utilizado o software *Image Processing and Data Analysis – Version 2.0.0* (*ThermoMicroscopes – Veeco*®), no qual foi mensurada a espessura dos feixes de colágeno (figura 5).

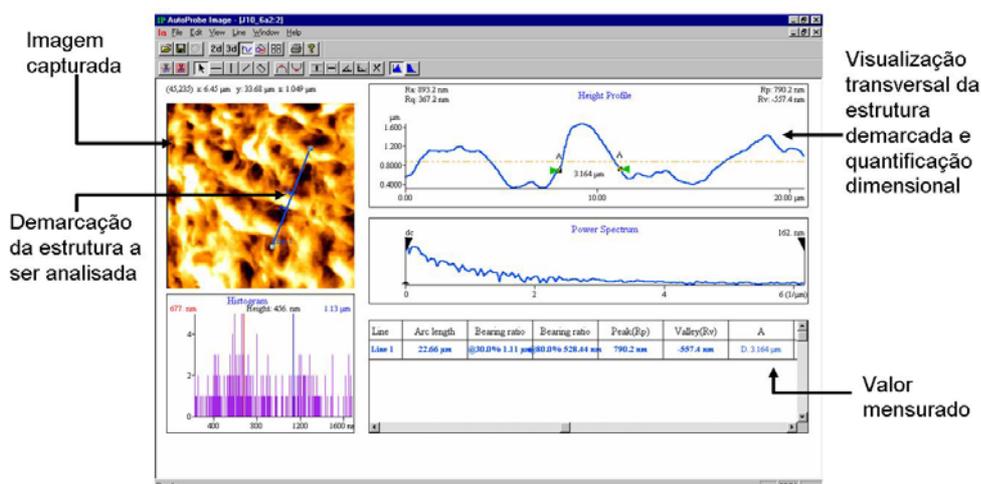


Figura 5. Tela de análise do software *Image Processing and Data Analysis – Version 2.0.0 (TermoMicroscopes – Veeco®)*, durante mensuração de feixe de colágeno.

Também foram analisados qualitativamente os aspectos gerais da superfície considerando alinhamento, homogeneidade da distribuição das fibras, organização das fibras e a dimensão dos feixes de colágeno através das imagens bidimensionais e tridimensionais do corte histológico conforme os estudos de Parizotto (1998).

4.8 Microscopia de luz comum - histologia

Os cortes de tendão corados foram fotografados em 3 campos aleatórios da área de lesão, num aumento de 40 vezes de objetiva, através de uma câmera digital acoplada a um microscópio de luz (Axiolab 2 – Carl Zeiss®, Jena, Alemanha).

As imagens obtidas foram analisadas no software ImageTool 3.0 (University of Texas Health Science Center in San Antonio), no qual foram contabilizadas as quantidades de fibroblastos, capilares sanguíneos e células do processo inflamatório (leucócitos) presentes na fotomicrografia, possibilitando obter uma medida comparativa dos efeitos da radiação laser de baixa intensidade no reparo tendíneo (figura 6).

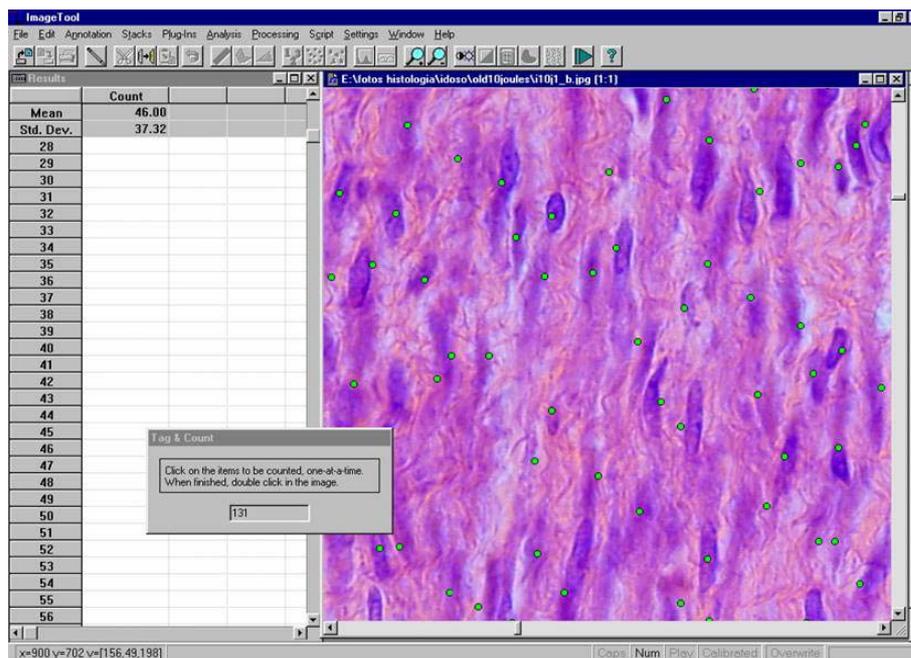


Figura 6. Tela de análise do software *Imagetool 3.0* (University of Texas Health Science Center in San Antonio), durante quantificação de fibroblastos em fotomicrografia do tendão calcâneo

4.9 Análise dos Dados

Os dados de espessura do colágeno gerados através da microscopia de força atômica e análise histológica por microscopia de luz (contabilização de células inflamatórias, fibroblastos e capilares sanguíneos) foram submetidos à análise de variância (ANOVA – *One way*) dos subgrupos dentro de cada faixa etária e entre as faixas etárias. Na presença de diferenças significativas ($p < 0,05$) foi aplicado o teste *post hoc* de *Bonferroni* para a detecção das diferenças específicas encontradas.

PARTE II

Artigo 1:

AÇÃO IDADE-DEPENDENTE DA FOTBIOMODULAÇÃO DE BAIXA
INTENSIDADE NA ANGIOGÊNESE E PROLIFERAÇÃO DE FIBROBLASTOS EM
LESÃO TENDÍNEA

Artigo 2:

ASPECTOS ESTRUTURAIS DA MATRIZ EXTRACELULAR NO PROCESSO
DE REGENERAÇÃO TENDÍNEA ESTIMULADA POR LASER DE BAIXA
INTENSIDADE

ACÇÃO IDADE-DEPENDENTE DA FOTOBIMODULAÇÃO DE BAIXA
INTENSIDADE NA ANGIOGÊNESE E PROLIFERAÇÃO DE FIBROBLASTOS NA
REGENERAÇÃO TENDÍNEA

C. Taciro¹, M.A. Serikawa¹, N.A. Parizotto¹

¹Laboratório de Eletrotermofototerapia, Universidade Federal de São Carlos,
Departamento de Fisioterapia – Brasil – SP

charlestaciro@yahoo.com.br

Endereço: Rodovia Washington Luís, Km 235 – C.P. 676 – CEP. 13565-905 – São
Carlos – SP – Brasil.

Palavras-chave: laserterapia, angiogênese, fibroblastos, proliferação celular.

Resumo: O processo de envelhecimento inclui alteração em diversos componentes e vias bioquímicas da regeneração tecidual e interação fotoquímica da radiação laser, influenciando dessa forma a abordagem no tratamento de injúrias teciduais, em particular na lesão tendínea, porém os reais efeitos desta modalidade terapêutica são desconhecidos quando se relacionam lesão e envelhecimento tecidual. Este estudo avaliou os efeitos da laserterapia de baixa intensidade (LLLT), aplicado na reparação tendínea do tendão calcâneo pós tenotomia radical em ratos de diferentes fases maturacionais. Um grupo de ratos jovens (4 semanas, n=40, 111,3g±8,3), subdividido aleatoriamente em 4 subgrupos contendo cada 10 animais: J3J (dose 3J/cm², energia por ponto 8,5mJ), J10J (10J/cm², energia por ponto 28,3mJ), placebo - JPL (dose 0J/cm²), controle JCL (sem tratamento); e um grupo adulto (27 semanas de idade, n=40, 385,4g±34.3), subdividido aleatoriamente em 4 subgrupos: A3J (dose 3J/cm², energia por ponto 8,5mJ), A10J (dose 10J/cm², energia por ponto 28,3mJ), placebo - APL (dose 0J/cm²), controle ACL (sem tratamento). A terapia laser (diodo AsGaAl, 685nm, 5,4W/cm²) foi aplicado em 12 sessões, uma vez ao dia, em um único ponto sobre a região da lesão. No 13º dia pós-operatório os animais foram sacrificados e seus tendões removidos cirurgicamente, processados e analisados por meio de estudo histológico (coloração e morfometria), quantificando-se o número de capilares sanguíneos, fibroblastos e células do processo inflamatório (leucócitos). A análise dos dados mostrou significativa alteração da resposta do tecido à irradiação laser, tanto de forma idade-dependente como dose-dependente, sendo que, os resultados indicam maior resposta biológica para o grupo adulto que para o jovem, principalmente com relação à angiogênese no A10J. Os ganhos obtidos para a contagem de fibroblastos foram também estatisticamente mais significativo (p< 0.05) para o grupo adulto que para o grupo jovem.

INTRODUÇÃO

O processo de reparação tecidual é multifatorial, dependente de diversos componentes como fatores de crescimento, proliferação de fibroblastos, ação angiogênica, aporte sanguíneo, estímulo mecânico, matriz celular e quimiotaxia. Esses componentes são fortemente influenciados pelo processo de envelhecimento, portanto, é compreensível que a velocidade de regeneração tecidual diminua com o avanço da idade¹.

Recentes pesquisas têm demonstrado alterações importantes decorrentes do avanço da idade no metabolismo e atividade celular do tecido tendíneo. Tais alterações são responsáveis pelos índices relativamente elevados de tendinopatias no adulto e idoso, os quais são associados como causas a redução da densidade vascular, diminuição de FGFs, PDGFs, VEGF, TGF- β 1, capacidade imunológica^{2,3}, alterações enzimáticas^{4,5} e componentes colagenosos e estrutura do tecido^{2,6,7}.

Diversos efeitos biomodulatórios da radiação laser de baixa intensidade tem sido reportados envolvendo a reparação de feridas cutâneas, proliferação condral, síntese de colágeno, efeitos antiinflamatórios e regeneração nervosa^{8,9}.

Estudos demonstram crescimento celular, síntese de proteínas e regeneração organizadas do tendão organizado quando estimulado pela terapia laser de baixa intensidade (do inglês, LLLT)^{10,11,12,13}. Além disso, eventos relacionados à aceleração resolução de lesões também são reportados sendo resultado do aumento da proliferação de diversas células como fibroblastos, aumento da produção de colágeno, atividade fagocítica de macrófagos, liberação de diversas citocinas relacionadas à resolução de processos inflamatórios e aceleração da regeneração tecidual propriamente dita^{14,15}.

Diversos efeitos biomodulatórios da laserterapia tem sido descritos, porém o mecanismo preciso e suas bases moleculares ainda não são totalmente claros, assim como o tratamento de lesões tendíneas com LLLT associado às modificações decorrentes da progressão da idade também não foram pesquisadas e pouco se sabe sobre os reais efeitos desta modalidade terapêutica nesses casos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da laserterapia no processo de reparação tendínea de ratos verificando assim se há uma relação idade-dependente e dose-dependente da fotobiomodulação laser, utilizando para isto técnicas histológicas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 80 animais (*Rattus norvegicus albinus*), da raça Wistar, machos, com idade e peso corporal variando conforme a faixa etária de cada grupo. Estes receberam água e ração balanceada peletizada (*ad libitum*) e foram mantidos em ambiente higienizado, com iluminação em ciclo claro/ escuro de 12 horas.

Os animais foram divididos aleatoriamente em 2 grupos:

Grupo Jovem contendo 40 animais (4 semanas de idade, massa = $111,3g \pm 8,3$), subdivididos aleatoriamente em 4 subgrupos contendo cada 10 animais: J3J (dose $3J/cm^2$, energia por ponto $8,5mJ$), J10J (dose $10J/cm^2$, energia por ponto $28,3mJ$), placebo - JPL (dose $0J/cm^2$) e JCL (lesado sem tratamento).

Grupo Adulto contendo 40 animais (27 semanas de idade, massa = $385,4g \pm 34,3$), subdivididos aleatoriamente em 4 subgrupos: A3J (dose $3J/cm^2$, energia por ponto $8,5mJ$), A10J (dose $10J/cm^2$, energia por ponto $28,3mJ$), placebo - APL (dose $0J/cm^2$) e ACL (lesado sem tratamento).

Para o procedimento cirúrgico, os animais foram pesados e posteriormente anestesiados utilizando-se uma combinação de anestésicos (ketamina - 95mg/kg e xilazina 2% -12mg/kg), previamente estabelecida, por aplicação intraperitoneal em doses correspondentes à massa de cada animal.

Em seguida todos os animais foram submetidos ao procedimento de tenotomia total do tendão calcâneo da pata posterior direita, entre a inserção calcanear e a junçãomiotendínea, na região média do tendão, sem posterior tenorrafia.

A seguir a pele foi suturada com fio não absorvível e submetida à limpeza local (álcool iodado), não havendo posteriormente nenhum tipo de imobilização do segmento. Como profilaxia antimicrobiana foi administrada em dose única Cefalotina (20mg/100g de peso corpóreo).

Os subgrupos placebo (JPL e APL) receberam tratamento com o equipamento desligado enquanto os subgrupos lesados sem tratamento (JCL e ACL) permaneceram durante o período experimental em suas gaiolas no biotério.

TRATAMENTO

O equipamento utilizado foi um laser (DMC[®] - São Carlos, Brasil), classe 3B, diodo AsGaAl, com comprimento de onda 685nm, potência de saída de 15mW, área da fibra de 0,0028cm², diâmetro do feixe de 0,6mm, divergência de 1.5°, emissão contínua e densidade de potência de 5,4W/cm², em doses de 3J/cm² (energia por ponto 8,5mJ) e 10J/cm² (energia por ponto 28,3mJ), sendo os parâmetros de emissão conferidos ao final de cada sessão através de um medidor de potência (*Lasercheck – Coherent*[®])

A terapia laser iniciou-se 24h após a tenotomia, compondo-se de 12 sessões consecutivas intervaladas por 24h, realizadas num mesmo período circadiano, através de radiação transcutânea na região de lesão pela técnica de contato a um ângulo de 90° em

relação à superfície da área lesada. No 13º dia após a tenotomia (24 horas pós a última sessão) os animais sofreram eutanásia (anestesia com ketamina - 95mg/kg e xilazina 2% -12mg/kg, seguida de injeção intracardíaca de KCl) e seus tendões direitos foram retirados para a preparação das lâminas histológicas.

PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS E ANÁLISE DE DADOS

Para uma avaliação do reparo tendíneo, os tendões foram removidos e submetidos à fixação em solução de formalina 10% durante 24 horas, desidratados em banhos sucessivos de álcool (70, 90, 95 e 100%) e imersão de xilol por 1 hora. Cortes semi-seriados de 7µm de espessura foram realizados para então submeter as lâminas de histologia à coloração de hematoxilina e eosina (HE) os quais foram fotografados em 3 campos da área de lesão, num aumento de 40 vezes de objetiva, através de um microscópio de luz (*Axiolab – Carl Zeiss®*, Alemanha).

As imagens obtidas foram analisadas no software ImageTool 3.0 (*University of Texas Health Science Center in San Antonio*), no qual foram contabilizados a quantidade de fibroblastos, capilares sanguíneos e leucócitos (macrófagos, linfócitos, neutrófilos e monócitos) presentes na fotomicrografia, permitindo-se então obter uma medida comparativa dos efeitos da radiação laser de baixa intensidade no reparo tendíneo.

ANÁLISE DOS DADOS

Os dados obtidos das análises quantitativas foram analisados através do teste ANOVA, sendo aplicado o teste *post hoc* de Bonferroni, considerando significativas as diferenças onde $p < 0.05$.

RESULTADOS

QUANTIFICAÇÃO DE CAPILARES SANGÜÍNEOS:

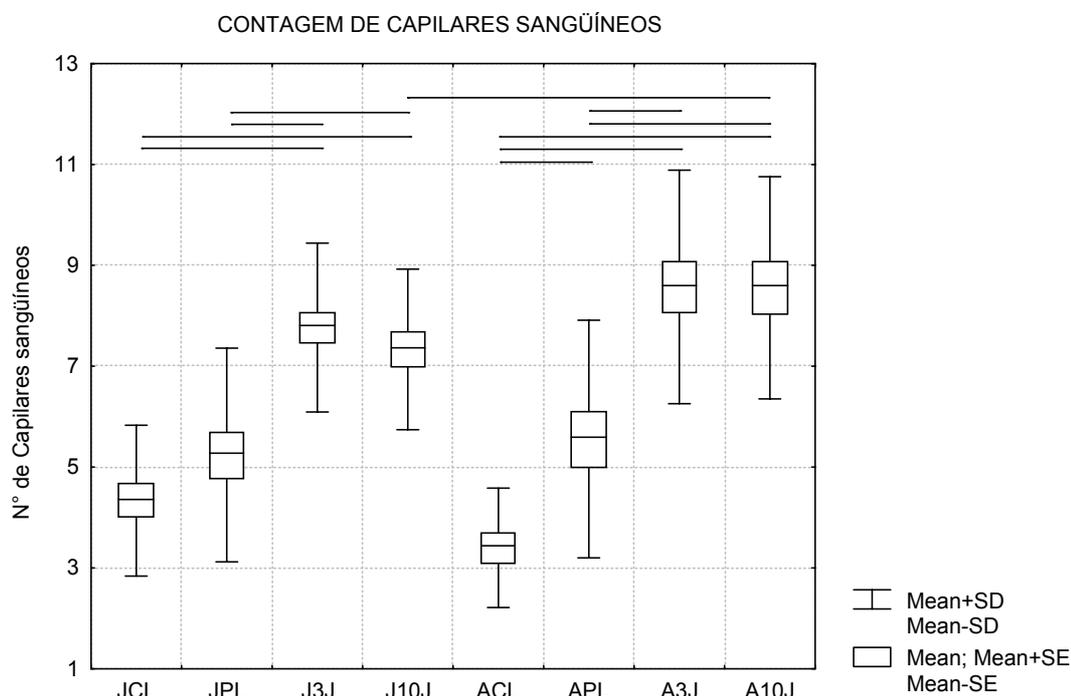


Figura 1: Contagem de capilares sanguíneos através de microscopia de luz obtidas nas fotomicrografias dos subgrupos JCL (jovem controle lesado), JPL (jovem placebo), J3J (jovem 3J/cm²), J10J (jovem 10J/cm²), ACL (adulto controle lesado), APL (adulto placebo), A3J (adulto 3J/cm²) e A10J (adulto 10J/cm²). As barras horizontais na porção superior da figura indicam as comparações entre os subgrupos que apresentaram diferenças estatisticamente significativas (P < 0,05). Este gráfico aponta uma resposta dose-dependente e também idade-dependente da radiação luminosa.

O resultado da contagem de capilares sanguíneos em nosso estudo indicou aumento da quantidade de capilares sanguíneos em ambos os grupos irradiados sendo que no grupo adulto, esse aumento foi mais marcante. Na análise intragrupo, não houve diferença estatisticamente significativa entre as doses de 3J/cm² e 10J/cm², tanto no grupo adulto e no grupo jovem. Interessante observar que também ocorreu aumento significativo de capilares sanguíneos por efeito placebo, no grupo adulto, porém não houve correspondência do mesmo estímulo no grupo jovem.

QUANTIFICAÇÃO DE FIBROBLASTOS

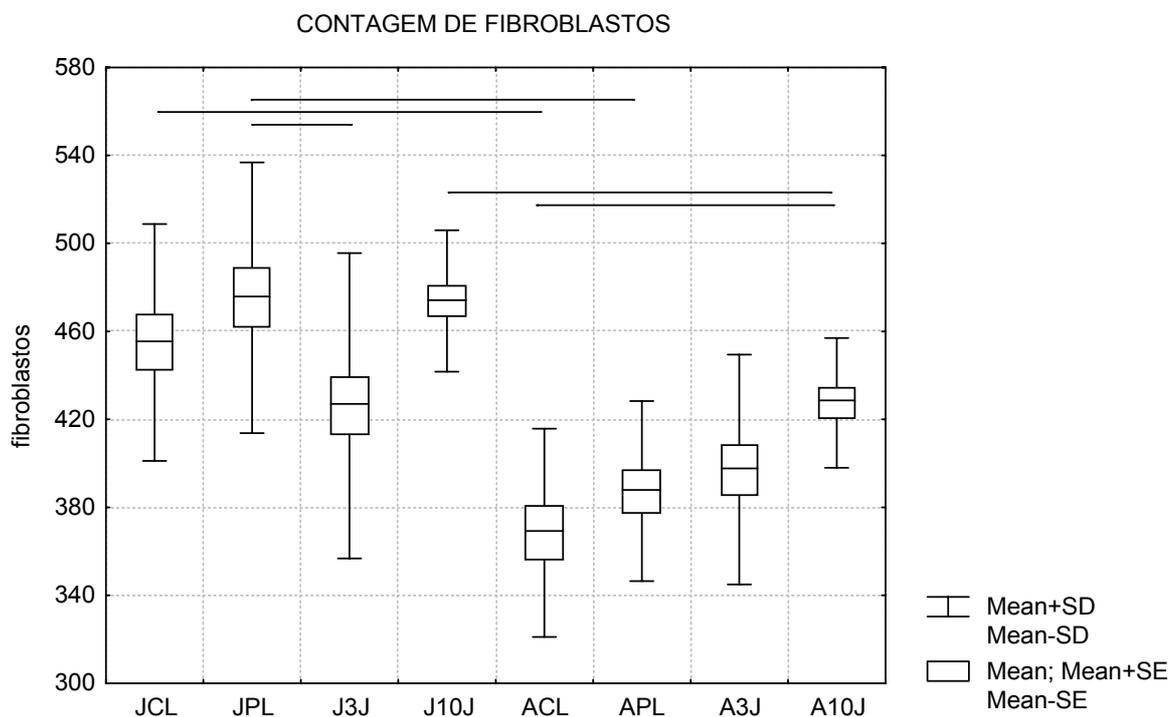


Figura 2: Contagem de fibroblastos através de microscopia de luz obtidas nas fotomicrografias dos subgrupos JCL (jovem controle lesado), JPL (jovem placebo), J3J (jovem 3J/cm²), J10J (jovem 10J/cm²), ACL (adulto controle lesado), APL (adulto placebo), A3J (adulto 3J/cm²) e A10J (adulto 10J/cm²). As barras horizontais na porção superior do gráfico indicam as comparações entre os subgrupos que apresentaram diferenças estatisticamente significativas (P < 0,05).

A análise das lâminas mostrou que o número de fibroblastos contados apresenta-se em menor quantidade no grupo adulto. Somente no subgrupo A10J houve aumento estatisticamente significativo quando comparado com o subgrupo ACL. Já no grupo jovem, a dose de 3J/cm² mostrou um efeito de redução do número células fibroblásticas significante quando comparado ao JPL e ao J10J, sugerindo inibição, equiparando o número de fibroblastos ao grupo A10J.

QUANTIFICAÇÃO DE LEUCÓCITOS

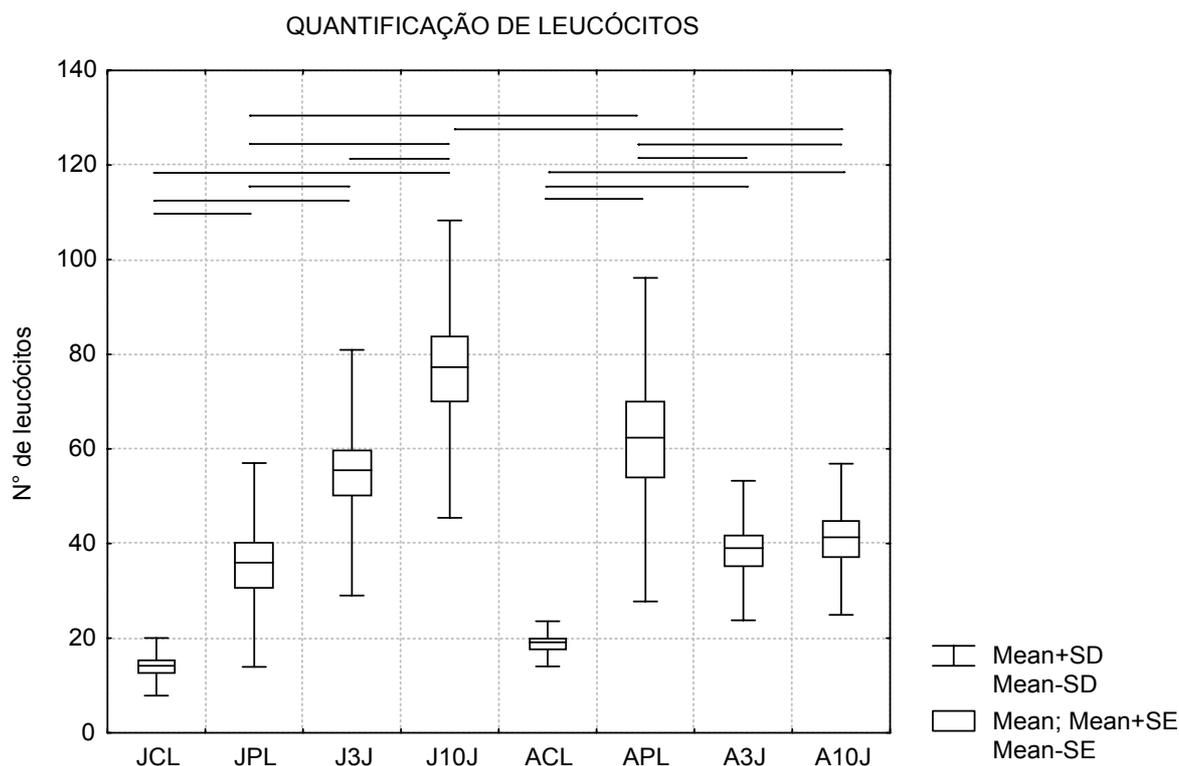


Figura 3: Contagem de células do processo inflamatório (leucócitos) através de microscopia de luz obtidas nas fotomicrografias dos subgrupos JCL (jovem controle lesado), JPL (jovem placebo), J3J (jovem 3J/cm²), J10J (jovem 10J/cm²), ACL (adulto controle lesado), APL (adulto placebo), A3J (adulto 3J/cm²) e A10J (adulto 10J/cm²). As barras horizontais na porção superior da figura indicam as comparações entre os subgrupos que apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$). Observamos uma importante relação entre dose-resposta e idade-resposta neste gráfico, os quais são significativamente diferentes entre o grupo jovem e o adulto.

Esta análise mostrou, no grupo jovem, que o número de leucócitos aumentou significativamente conforme o incremento do estímulo, seguindo a seqüência, JPL, J3J e J10J. Porém, no grupo adulto, esse efeito foi menos marcante, mostrando-se significativamente mais intenso no subgrupo APL que nos demais animais deste grupo, o subgrupos A3J e A10J não mostraram diferenças significativas entre si, porém foram significativamente maiores as suas contagens para leucócitos quando comparados ao ACL e menores ao APL.

DISCUSSÃO

Como observado neste estudo, a LLLT promoveu aumento da contagem de capilares de forma muito significativa, principalmente no grupo de ratos adultos tanto para a dose de 3J/cm² como para 10J/cm².

O efeito verificado no grupo adulto representa um resultado muito positivo. Estudos mostram que a disfunção endotelial relacionada com a idade e a reduzida expressão de fatores angiogênicos/ mitogênicos (VEGF) são possíveis mecanismos de redução da angiogênese de modo idade-dependente^{6,16} levando a um retardo na formação de capilares sanguíneos no idoso.

Estudos sugerem que o efeito pró-angiogênico da LLLT se dá através da elevação da expressão de fatores relacionados à reparação tecidual^{17,18,19} como VEGF (vascular endothelial growth factor), cuja importância é fundamental nesses eventos. Além disso, a modulação óxido nítrico, FGF, PDGF, superóxido dismutase^{20,21,22}, estado redox²³, receptores de superfície celular e sinalização para a dinâmica vascular através da LLLT parece ter um papel importante na angiogênese.

O estresse oxidativo deve ser considerado como fator fundamental para compreendermos os resultados observados na angiogênese e proliferação celular principalmente no A3J e A10J. É bem conhecido que o processo de envelhecimento gera estresse oxidativo celular^{24,25}, sendo esta característica aumentada em lesões teciduais.

Uma das teorias mais importantes da LLLT, a teoria fotoquímica, postula que a interação da radiação eletromagnética com os cromóforos da membrana interna da mitocôndria e a cascata bioquímica subsequente da fotoestimulação se dá principalmente num meio onde há um estado REDOX instável^{26,27}. Considerando isso, é

bem provável que a radiação laser encontre um meio de interação mais propício no adulto que no jovem.

Além disso, é possível que essas modificações decorrentes do aumento da idade possam ser modulados pela laserterapia, já que, efeitos contrários ao envelhecimento como aumento de divisão celular e liberação de citocinas^{18,19}, provimento de ATP^{20,26}, angiogênese^{8,19,27}, produção de colágeno²⁸, atividade citotóxica, aumento da comunicação intra e intercelular²⁰ são descritos como sendo modulados pela LLLT, de tal maneira a provocar efeitos mais significativos em populações mais velhas do que nas jovens.

Na contagem de fibroblastos observa-se nos subgrupos controle lesados (JCL e ACL) menor contagem no adulto com relação ao jovem. Fato este em conformidade com a literatura que mostra reduzida concentração de células com o avanço da idade relacionado a um déficit funcional celular⁴. Estudos comparando fibroblastos fetais com fibroblastos adultos apontam diferenças importantes com o envelhecimento, como diminuição da capacidade migratória, menor sensibilidade a elementos do soro²⁹, desequilíbrio na expressão de colágeno e colagenase⁵, formação consistente de inflamação e maior susceptibilidade à apoptose celular^{3,4,30}.

O aumento da produção e liberação de fatores de crescimento (FGF, PDGF, VEGF, TNF)^{17,18,19}, bem como aumentos da sinalização e receptores de superfície²⁰, são tidos como mecanismo possível para a maior contagem de fibroblastos nos animais irradiados do grupo adulto.

Além disso, como o leito vascular é uma das vias de acesso de diversas células ao sítio de lesão³¹, o aumento da concentração de capilares sanguíneos é um fato que deve ser considerado com extrema relevância quando se observa os resultados da contagem de células fibroblásticas.

Não podemos deixar de considerar o fato das massas corpóreas dos animais do grupo jovem e do grupo adulto serem significativamente diferentes. Sabe-se que o colágeno é um material considerado como piezoelétrico³² (capacidade de conversão de deformação mecânica em potencial elétrico). Esse evento bioelétrico é interpretado como sinalização para processos celulares como angiogênese³¹, mitose celular, alinhamento e agregação tecidual³³. Como os animais adultos apresentam massa significativamente maior que os ratos jovens, a carga mecânica sobre os tendões adultos é maior, gerando mais deformação tecidual e, conseqüentemente, maior efeito piezoelétrico.

É bem provável que o acréscimo de estresse mecânico causado pela manipulação dos animais, tanto no grupo jovem bem como no adulto possam ter gerado um efeito piezoelétrico adicional sobre o colágeno do tendão lesionado, explicando assim o fato dos resultados entre o grupo placebo e controle lesado serem estatisticamente diferentes na contagem de células do processo inflamatório e no grupo adulto para a contagem de capilares sangüíneos.

O aumento na contagem de leucócitos observado no grupo jovem pode ter uma relação com a responsividade celular característica das células jovens. Como estas células possuem maior capacidade proliferativa e migratória além de uma maior quantidade de receptores de superfície para citocinas, é possível que a resposta à liberação de substâncias estimuladas pela laserterapia tenha provocado um efeito potencializador na densidade dessas células no sítio de lesão. O mesmo efeito no grupo adulto, porém numa intensidade menor foi observado nos nossos resultados, provavelmente devido ao processo de envelhecimento que pode influenciar os mesmos aspectos celulares anteriormente descritos.

É possível que a manipulação dos animais do subgrupo APL possa ter provocado uma atividade inflamatória aumentada, o que explica o seu valor elevado. A aplicação da laserterapia, por sua vez, pode ter produzido um efeito antiinflamatório, diminuição de edema, associado a um aumento do fluxo sanguíneo e normalização da homeostase através de ação semelhante a corticoesteróides⁹ no grupo adulto, reduzindo a quantidade de células do processo inflamatório.

Uma outra possibilidade para as diferenças observadas na quantificação das células inflamatórias possa ser relacionada aos tipos de células contadas. Devido ao método utilizado, não foi possível mensurar diferencialmente as células do processo inflamatório no campo de lesão. É descrito na literatura, que existem diferentes tipos celulares (mastócitos, neutrófilos, macrófagos, monócitos, eosinófilos, basófilos) durante as fases da inflamação, no qual, a predominância de uma população associado à determinadas características do meio pode sugerir a fase da inflamação no qual se situa o tecido lesado.

Importante observar que a alteração foi dose-dependente e idade-dependente, porém não é possível determinar se o efeito nesse caso foi positivo ou negativo.

Como resultado, talvez a laserterapia tenha restaurado algumas funções ou características debilitadas pelo envelhecimento, permitindo assim uma receptividade aumentada a algumas citocinas, gerando uma proliferação celular e vascular mais eficiente e conseqüentemente uma reparação tecidual mais efetiva.

REFERÊNCIAS

1. Swift, M.E., Burns, A.L., Gray K.L. and DiPietro, L.A. (2001) Age-Related Alterations in the Inflammatory Response to Dermal Injury. *J. Invest. Dermatol.* 117, 1027-1035.

2. Sunderkotter, C., Kalden, H., Luger, T.A. (1997) Aging and the skin immune system. *Arch. Dermatol.* 133, 1256±1262.
3. Chakravarti, B., Abraham, G.N. (1999) Aging and T-cell-mediated immunity. *Mech. Ageing. Dev.* 108, 183-206.
4. Bizot-Foulon, V., Bouchard, B., Hornebeck, W., Dubertret, L., Bertaux, B. (1995) Uncoordinate expressions of type I and III collagens, collagenase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase I along in vitro proliferative life span of human fibroblasts. Regulation by all-trans retinoic acid. *Cell. Biol. Intl.* 19, 129–135.
5. Khorramizadeh, M.R., Tredget, E.E., Telasky, C., Shen, q. and Ghahary, A. (1999) Aging differentially modulates the expression of collagen and collagenase in dermal fibroblasts. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 194, 99–108.
6. Feng Y., Visovatti, S., Johnson, C.S., Chen, M., Slama, J., Wenger, A., Eriksson, E. (2001) Age and Growth factors in porcine full thickness wound healing. *Wound Rep. Reg.* 9, 371-77.
7. Roubenoff, R., Harris, T.B., Abad, L.W. (1998) Monocyte cytokine production in an elderly population: effect of age and inflammation. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 53, 20-26.
8. Mohammed Ihsan, F.R., (2005) Low-Level Laser Therapy Accelerates Collateral Circulation and Enhances Microcirculation. *Photomedicine and Laser Surgery.* 23, (3), 289–294.
9. Shibata, Y., Ogura, N., Yamachiro, K., Takashiba, S., Kondoh. T., Miyazawa, K., Matsui, M., Abiko, Y. (2005) Anti-inflammatory effect of linear polarized infrared irradiation on interleukin-1b-induced chemokine production in MH7A rheumatoid synovial cells, *Lasers in Medical Science.* 20, 109–113.
10. Enwemeka, C. S. (1989) Inflammation, cellularity, and fibrillogenesis in regenerating tendon: implications for tendon rehabilitation. *Physical Therapy.* 69 (10) 816-825.
11. Enwemeka, C.S.; Rodriguez, O.O.; Gall, N.G.; Walsh, N.E. (1990) Morphometrics of collagen fibril populations in HeNe laser photostimulated tendons. *Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery.* 47-62.
12. Vinck, E.M., Cagnie, B., Cornelissen, M.J., Declercq, H.A., Cambier, D.C. (2003) Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. *Lasers Med. Sci.* 18, 95–99.
13. Azevedo, L.H., et al., (2006) Influence of different power densities of LILT on cultured human fibroblast growth: A pilot study. *Lasers Med. Sci.* 21, 86–89.

14. Hawkins, D.H. and Abrahamse, H. (2006) The Role of Laser Fluence in Cell Viability, Proliferation, and Membrane Integrity of Wounded Human Skin Fibroblasts Following Helium-Neon Laser Irradiation. *Lasers Surg. Med.* 38, 74–83.
15. Fillipin, L.I., Mauriz, J.L. Vedovelli, K., Moreira, A.J., Zettler C.G., Lech, O., Marroni, N.P., Gonzalález-Gallego, J. (2005) Low-Level Laser Therapy (LLLT) Prevents Oxidative Stress and Reduces Fibrosis in Rat Traumatized Achilles Tendon. *Lasers in Surgery and Medicine.* 37, 293–300.
16. A. Rivard, J.E. Fabre, M. Silver, et al., (1999) Age-dependent impairment of angiogenesis, *Circulation.* 99, 111–120.
17. Braverman, B., McCarthy, R.J., Ivankovich, A.D., et al. (1989).Effect of helium-neon and infrared laser irradiation on wound healing in rabbits. *Lasers Surg. Med.* 9:50–58.
18. Yu, W., Naim, J.O., Lanzafame, R.J. (1994) The effect of laser irradiation on the release of bFGF from 3T3 fibroblasts. *Photochem Photobiol;* 59, 167–170.
19. Tuby, H., Maltz, L., Oron, U. (2006) Modulations of VEGF and iNOS in the Rat Heart by Low Level Laser Therapy are Associated With Cardioprotection and Enhanced Angiogenesis. *Lasers Surg. Med., article In press*
20. Vladimirov, Y.A., Osipov, A.N. and Klebanov, G.I. (2004) Photobiological Principles of Therapeutic Applications of Laser Radiation. *Biochemistry (Moscow).* 69 (1), 81-90.
21. Mirsky, N., Krispel, Shoshany, Maltz, and Oron, U. (2002) Promotion of Angiogenesis by Low Energy Laser Irradiation. *Antioxidants & Redox Signaling.* 4 (5), 785-790.
22. Fujimaki, Y., Shimoyama, T., Liu, Q., Umeda, T., Nakaji, S., Sugawara, K. (2003) Low-Level Laser Irradiation Attenuates Production of Reactive Oxygen Species by Human Neutrophils. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery.* 21 (3), 165–170.
23. Lubart, R., Eichler, M., Lavi, R., Friedman, H. and Shainberg, A. (2005) Low-Energy Laser Irradiation Promotes Cellular Redox Activity. *Photomedicine and Laser Surgery.* 23 (1) 3–9.
24. Harman, D. (1983) Free radical theory of aging: consequences of mitochondrial aging. *Age.* 6, 86-94.
25. Ames, B.N., Shigenaga, M.K. (1992) Oxidants are a major contributor to aging. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 663, 85-96.
26. Passarella S. Casamassima, E., Molinari, S., Pastore, D., Quagliariello, E., Catalano, I.M., Cingolani, A. (1984) Increase of proton electromchemical

- potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by helium-neon laser. *FEBS Letter* 175, 95-99.
27. Karu, T.I., Pyatibrat, L.V. and Afanasyeva, N.I. (2005) Cellular Effects of Low Power Laser Therapy Can be Mediated by Nitric Oxide. *Lasers Surg. Med.* 36, 307–314.
 28. Yamamoto, Y., Kono, T., Kotani, H., Kasai, S., Mito, M. (1996) Effect of low-power laser irradiation on procollagen synthesis in human fibroblasts. *J. Clin. Laser. Med. Surg.* 14(3), 129–32.
 29. Brink, H.E., Miller, G.J., Beredjiklian, P.K., Nicoll, S.B. (2006) Serum-dependent effects on adult and fetal tendon fibroblast migration and collagen expression. *Wound Rep Reg* 14, 179–186.
 30. Ohshima, S. (2006) Apoptosis and Necrosis in Senescent Human Fibroblasts *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1067, 228–234.
 31. D`Amore, P.A. and Thompson, R.W. (1987) Mechanism of angiogenesis. *Ann. Rev. Physiol* 49, 453 – 64.
 32. Fukada E. (1982) Electrical phenomena in biorheology. *Biorheology.* 19 (1/2), 15-27.
 33. Palmes, D. et al., (2002) Achilles tendon healing: Long-term biomechanical effects of postoperative mobilization and immobilization in a new mouse model. *Journal of Orthopaedic Research.* 20, 939–946.

ASPECTOS ESTRUTURAIS DA MATRIZ EXTRACELULAR NO PROCESSO
DE REGENERAÇÃO TENDÍNEA ESTIMULADA POR LASER DE BAIXA
INTENSIDADE

C. Taciro¹, M. A. Serikawa¹, N.A. Parizotto¹

¹Laboratório de Eletrotermofototerapia, Universidade Federal de São Carlos,
Departamento de Fisioterapia – Brasil – SP

charlestaciro@yahoo.com.br

Endereço: Rodovia Washington Luís, Km 235 – C.P. 676 – CEP. 13565-905 – São
Carlos – SP – Brasil.

PALAVRAS CHAVE: Laser, Fotobiomodulação, Fibroblasto, MFA.

RESUMO:

O processo de maturação e senescência celular é uma das principais causas para a predisposição do tendão aos processos degenerativos e patológicos, além de provocar retardo na reparação tecidual. Diversas modalidades terapêuticas são utilizadas para promover a aceleração e melhora do processo de reparo tendíneo, dentre elas a terapia laser de baixa intensidade (LLLT). Porém são pouco conhecidos os reais efeitos desta terapia quando se associa um fator potencialmente decisivo na resposta celular como o envelhecimento. Este estudo avaliou os efeitos da LLLT, aplicado na reparação tendínea do tendão calcanear pós tenotomia radical em ratos de diferentes fases maturacionais. Um grupo de ratos jovens (4 semanas de idade, n=40, massa = 111,3g±8,3), subdivididos aleatoriamente em 4 subgrupos contendo cada um 10 animais: J3J (dose 3J/cm², energia por ponto 8,5mJ), J10J (10J/cm², energia por ponto 28,3mJ), placebo - JPL (dose 0J/cm²), controle - JCL (nenhum tratamento); e um grupo adulto (27 semanas de idade, n=40, massa = 385,4g±34,3), subdivididos aleatoriamente em 4 subgrupos: A3J (dose 3J/cm², energia por ponto 8,5mJ), A10J (dose 10J/cm², energia por ponto 28,3mJ), placebo - APL (dose 0J/cm²), controle - ACL (sem tratamento). O laser utilizado (685nm, 5,4W/cm²) foi aplicado em 12 sessões consecutivas, um vez ao dia, em um único ponto sobre a região da lesão. No 14º dia pós-operatório os animais foram sacrificados e seus tendões retirados, processados e analisados qualitativa e quantitativamente, por meio de microscopia de força atômica (MFA) e análise histológica. A análise dos dados mostra significativa alteração da resposta do tecido à irradiação laser, tanto de forma idade-dependente como dose-dependente, sendo que, os resultados indicam melhor resposta biológica tanto no aumento das características de agregação, organização, alinhamento, espessura do colágeno e contagem de fibroblastos para a dose de 10J/cm² nos ratos adultos quando comparado ao grupo jovem.

INTRODUÇÃO

Do ponto de vista estrutural, todos os tecidos conectivos são compósitos reforçados, formados de fibras imersas em uma matriz interfibrilar¹. Tendões e ligamentos são compostos principalmente de fibrilas de colágeno cuja orientação é a mesma das linhas de tensão, de forma a resistir e transmitir cargas de tensão axial sendo esta a sua principal função no organismo².

O colágeno é uma molécula presente em grande quantidade nos seres vivos superiores e representa um componente fundamental nas propriedades físicas de determinadas estruturas do organismo humano, como os ligamentos e tendões². Os conjuntos de fibrilas de colágeno formam feixes para formar fibras bem como uma grande variedade de estruturas encontrados nos tecidos conectivos. As fibrilas são eventualmente estabilizadas por ligações intermoleculares covalentes, cujo papel é chave na maturação e determinante das propriedades mecânicas dos tecidos conectivos³.

Nesse sentido, a forma como se organizam os feixes de colágeno no processo de regeneração é muito importante, pois são elas as grandes responsáveis pelas propriedades mecânicas deste tecido determinando o nível de resistência máxima, carga de ruptura do tendão, elasticidade do tecido, dissipação de impacto e por fim, no nível sistêmico, a possibilidade de reincidência de lesão^{4,5,6,7,8}.

Durante o envelhecimento modificações ocorrem na estrutura do colágeno⁸, os quais alteram as propriedades físicas das fibras e são refletidas em aumentos na rigidez da pele, tendão, osso e articulações na idade avançada. Características como aumentos da rigidez do tecido e fragilidade das fibras de colágeno são verificados, reduzindo a eficácia do sistema locomotor, elasticidade do sistema vascular e propriedades de infiltração de membranas basais. Grande importância tem sido dada às interações

célula-matriz, particularmente durante o desenvolvimento. Estudos preliminares indicam a redução da eficácia das interações célula-matriz durante o envelhecimento⁹.

As alterações nas pontes cruzadas e ligações intermoleculares decorrentes do envelhecimento são estreitamente relacionadas com as propriedades mecânicas do tecido colágeno, bem como as alterações na atividade e expressão de suas diferentes isoformas moleculares⁹.

A taxa de metabolismo do colágeno também varia substancialmente com a maturação e senescência, através do qual sua produção torna-se mais lenta. A síntese de colágeno diminui constantemente durante o envelhecimento podendo cair em até 10 vezes na maioria dos tecidos e também se verifica aumento da degradação do colágeno^{10,11}.

Outras características do tecido como sua composição (quantidades de água, minerais e proteínas)¹¹, organização (agregação, homogeneidade e distribuição de suas fibras), metabolismo (nível de atividade celular, taxa cicatrização, proliferação e remodelamento celular e tecidual, consumo e produção de energia)¹² e propriedades físicas⁸ são alteradas durante o envelhecimento, determinando o modo como esta estrutura se adapta e reage às condições ambientais e solicitações físicas do organismo.

Dessa forma, é compreensível que ocorram índices de lesão, etiologias e graus de morbidade em diferentes faixas etárias¹³.

Considerando os mecanismos envolvidos na lesão tendínea, propriedades físicas do meio e processo regenerativo, a modalidade terapêutica do laser de baixa intensidade tem sido utilizado com sucesso na regeneração de lesões do tendão^{5,6,7}, pois é uma ferramenta que atua sobre diversos mecanismos do processo de regeneração tecidual, como vias proliferativas e energéticas^{14,15,16}, transdução de sinais elétricos, bioquímicos^{17,18} e ação imunitária²⁰. Esses efeitos da radiação laser dependem de vários

parâmetros, entre eles, comprimento de onda eletromagnética, intensidade, dose, especificidade tecidual, tempo e tipo de lesão.

Pouco se sabe sobre os efeitos da idade na regeneração tendínea induzida pela LLLT, pois diversas vias da biomodulação se encontram modificados no processo de maturação celular e senescência, dessa forma torna-se importante conhecer como esta variável pode influenciar na organização tecidual do processo regenerativo permitindo a prática clínica mais eficaz, e conseqüentemente, o retorno mais rápido do indivíduo lesado às suas funções normais.

Portanto, o objetivo deste estudo é verificar as alterações estruturais do tendão durante o processo de regeneração estimulada pela LLLT e a influência da idade na fotobiomodulação laser.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 80 ratos (*Rattus norvegicus albinus*), da raça Wistar, machos, com idade e peso corporal variando conforme a faixa etária de cada grupo. Estes receberam água e ração balanceada peletizada (*ad libitum*) e foram mantidos em ambiente higienizado, com iluminação em ciclo claro/ escuro de 12 horas.

Os animais foram aleatoriamente divididos em 2 grupos:

Grupo Jovem contendo 40 animais (idade de 4-5 semanas), subdivididos aleatoriamente em 4 subgrupos contendo cada 10 animais: J3J (dose 3J/cm², energia por ponto 8,5mJ), J10J (dose 10J/cm², energia por ponto 28,3mJ), placebo - JPL (dose 0J/cm²), e JCL (lesado sem tratamento).

Grupo Adulto contendo 40 animais (idade 27-28 semanas), subdivididos aleatoriamente em 4 subgrupos: A3J (dose 3J/cm², energia por ponto 8,5mJ), A10J

(dose $10\text{J}/\text{cm}^2$, energia por ponto $28,3\text{mJ}$), placebo - APL (dose $0\text{J}/\text{cm}^2$), ACL (lesado sem tratamento).

Todos os animais foram submetidos ao procedimento de tenotomia total do tendão calcâneo da pata posterior direita, entre a inserção calcâneo e a junção miotendínea, sem posterior tenorrafia. Os subgrupos placebo (JPL e APL) receberam tratamento com o equipamento desligado e enquanto os subgrupos lesados sem tratamento (JCL e ACL) permaneceram durante o experimental em suas gaiolas no biotério.

TRATAMENTO

O equipamento utilizado foi um laser (DMC[®] - São Carlos, Brasil), classe 3B, diodo AsGaAl, comprimento de onda 685nm , potência de saída de 15mW , área da fibra de $0,0028\text{cm}^2$, diâmetro do feixe de $0,6\text{mm}$, divergência de $1,5^\circ$, emissão contínua e densidade de potência de $5,4\text{W}/\text{cm}^2$, em doses de $3\text{J}/\text{cm}^2$ (energia por ponto $8,5\text{mJ}$) e $10\text{J}/\text{cm}^2$ (energia por ponto $28,3\text{mJ}$), sendo os parâmetros de emissão conferidos ao final de cada sessão através de um medidor de potência (Lasercheck - Coherent[®])

A terapia laser iniciou-se 24h após a tenotomia, compondo-se de 12 sessões consecutivas intervaladas por 24h, realizadas num mesmo período circadiano, através de irradiação transcutânea pela técnica de contato a um ângulo de 90° em relação à superfície da área lesada. No 13º dia após a tenotomia (24 horas pós a última sessão) os animais sofreram eutanásia e seus tendões direitos foram retirados para a preparação das lâminas histológicas.

PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS E ANÁLISE DOS DADOS

Para uma avaliação do reparo tendíneo, os tendões foram removidos e submetidos à fixação em solução de formalina 10% durante 24 horas e desidratados em banhos sucessivos de álcool (70, 90, 95 e 100%) e imersão de xilol por 1 hora. Cortes semi-seriados de 7,0µm de espessura foram realizados para então submeter as lâminas à coloração de hematoxilina e eosina (HE) os quais foram fotografados em 3 campos da área de lesão, num aumento de 40 vezes, através de um microscópio de luz (*Axiolab – Carl Zeiss®*, Alemanha).

As imagens obtidas foram analisadas no software ImageTool 3.0 (*University of Texas Health Science Center in San Antonio - UTHSCSA*), no qual foi contabilizada a quantidade de fibroblastos presentes na fotomicrografia.

Para a análise da topografia das amostras foi utilizado um microscópio de força atômica (*BioProbe – Park Scientific Instruments*) em meio aéreo, operando no modo de contato, frequência de varredura de 0,8Hz, num campo de análise de 100X100µm.

As lâminas foram hidratadas por cerca de 30 minutos em água destilada e obtidas cerca de 3 imagens de sua topografia sob uma disposição aleatória na área correspondente à lesão.

Em seguida, os dados dimensionais da superfície obtida foram analisados através do software IP2.0 (*Park Scientific Instruments – Veeco®*), obtendo-se o valor das espessuras dos feixes de colágeno.

Também foi analisada qualitativamente a forma de organização das fibras e feixes de colágeno através imagens tridimensionais obtidas pela MFA.

ANÁLISE DOS DADOS

Os dados obtidos das análises quantitativas foram analisados através do teste ANOVA, sendo aplicado o teste *post hoc* de Bonferroni.

RESULTADOS

ESPESSURA DOS FEIXES DE COLÁGENO



Figura 1: Medidas obtidas através da análise por microscopia de força atômica dos subgrupos JCL (jovem controle lesado), JPL (jovem placebo), J3J (jovem 3J/cm²), J10J (jovem 10J/cm²), ACL (adulto controle lesado), APL (adulto placebo), A3J (adulto 3J/cm²) e A10J (adulto 10J/cm²). As barras horizontais na porção superior do gráfico indicam as comparações entre os subgrupos que apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

O valor da medida da espessura dos feixes de colágeno mostrou um aumento marcante no grupo adulto conforme aumentava o estímulo externo, sendo a maior média encontrada no subgrupo A10J. Para esta análise, os resultados foram estatisticamente

semelhantes entre os subgrupos A3J e APL, já que a diferença entre eles é $p > 0.05$, porém estatisticamente maior que o ACL.

No grupo jovem, observa-se que o efeito da radiação laser e o efeito placebo foram estatisticamente significativos para o aumento da espessura dos feixes de colágeno em comparação ao controle.

Na análise intergrupo, somente no subgrupo A10J encontrou-se diferença estatisticamente significativa à sua contraparte J10J, demonstrando maior efeito neste subgrupo.

CONTAGEM DE FIBROBLASTOS

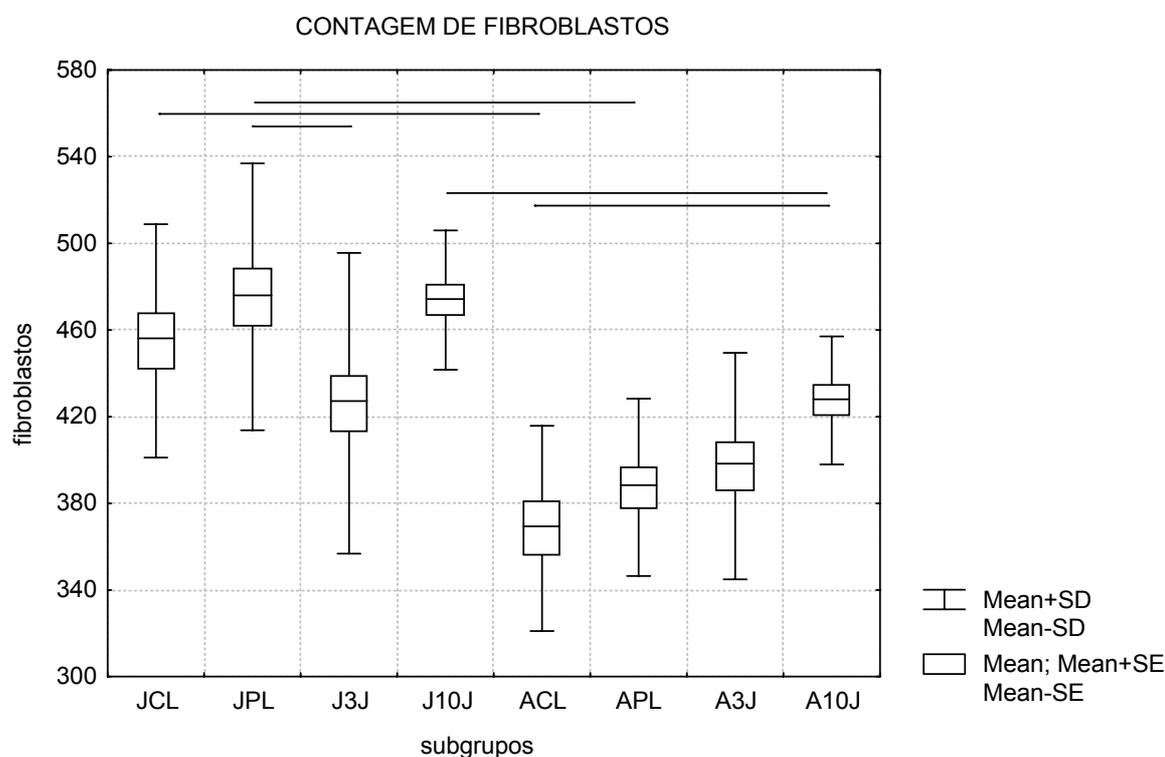


Figura 2: Contagem de fibroblastos através de microscopia de luz obtidas nas fotomicrografias dos subgrupos JCL (jovem controle lesado), JPL (jovem placebo), J3J (jovem 3J/cm²), J10J (jovem 10J/cm²), ACL (adulto controle lesado), APL (adulto placebo), A3J (adulto 3J/cm²) e A10J (adulto 10J/cm²). As barras horizontais na porção superior do gráfico indicam as comparações entre os subgrupos que apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

A análise das lâminas mostrou claramente que o número de fibroblastos contados apresenta-se em menor quantidade no grupo adulto. Somente no subgrupo A10J houve

aumento estatisticamente significativo quando comparado com o subgrupo ACL. Já no grupo jovem, a dose de $3\text{J}/\text{cm}^2$ mostrou um efeito deletério no número células fibroblásticas significante quando comparado ao JPL, sugerindo inibição, equiparando o número de fibroblastos ao grupo A3J.

PRANCHA MFA Grupo Jovem

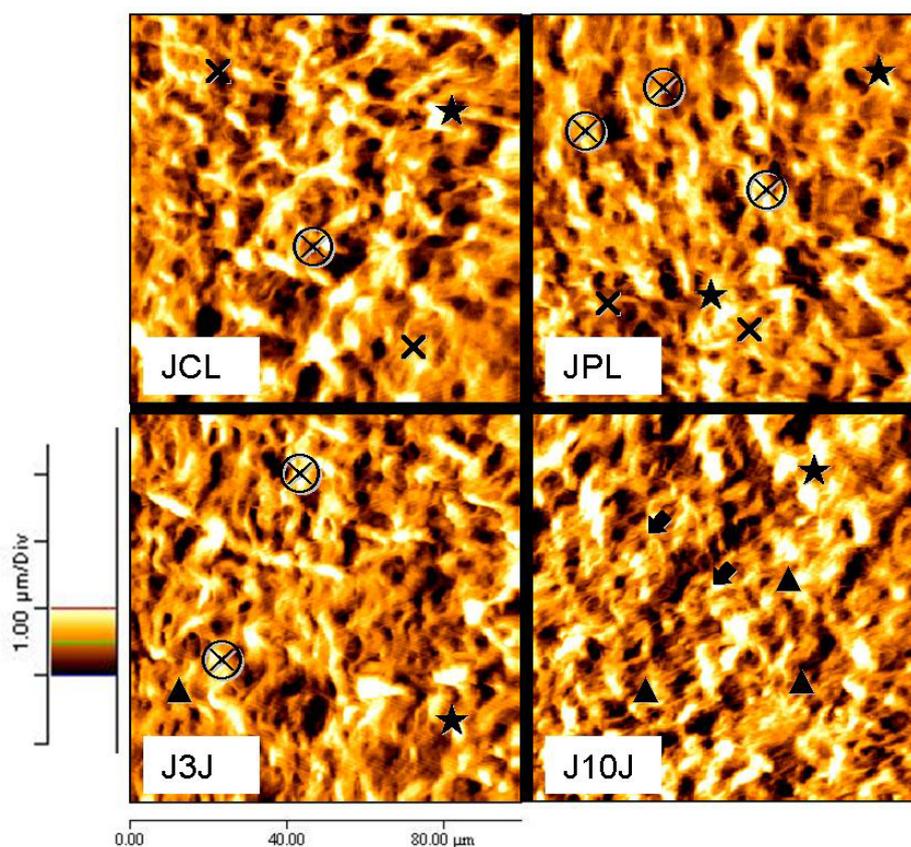


Figura 3: Imagens obtidas através da microscopia de força atômica para o grupo jovem. Observa-se diferenças qualitativas dos subgrupos JCL (jovem controle lesado), JPL (jovem placebo), J3J (jovem $3\text{J}/\text{cm}^2$), J10J (jovem $10\text{J}/\text{cm}^2$), o \times representa área de baixa homogeneidade, \blacktriangle área de agregação de feixes, \blacktriangleright aponta feixes de colágeno com espessura marcadamente maior, \otimes aponta feixes com orientação bem definida e \square marca região com orientação indefinida.

A análise das amostras obtidas pela MFA demonstra no JCL baixa organização tecidual, fibras esparsas e sem orientação predominante com regiões cuja definição

estrutural não é clara. O subgrupo JPL já demonstra alinhamento dos feixes no sentido vertical (mesmo sentido de orientação do tendão), formação de feixes de colágeno mais espessos, porém ainda são perceptíveis regiões onde a orientação tecidual não é clara e as estrutura ainda não está bem definida.

Nos subgrupos tratados observa-se no J3J e J10J que já é bem clara a orientação dos feixes e que a estrutura geral se apresenta mais homogênea e poucas regiões são indefinidas.

PRANCHA MFA Grupo adulto

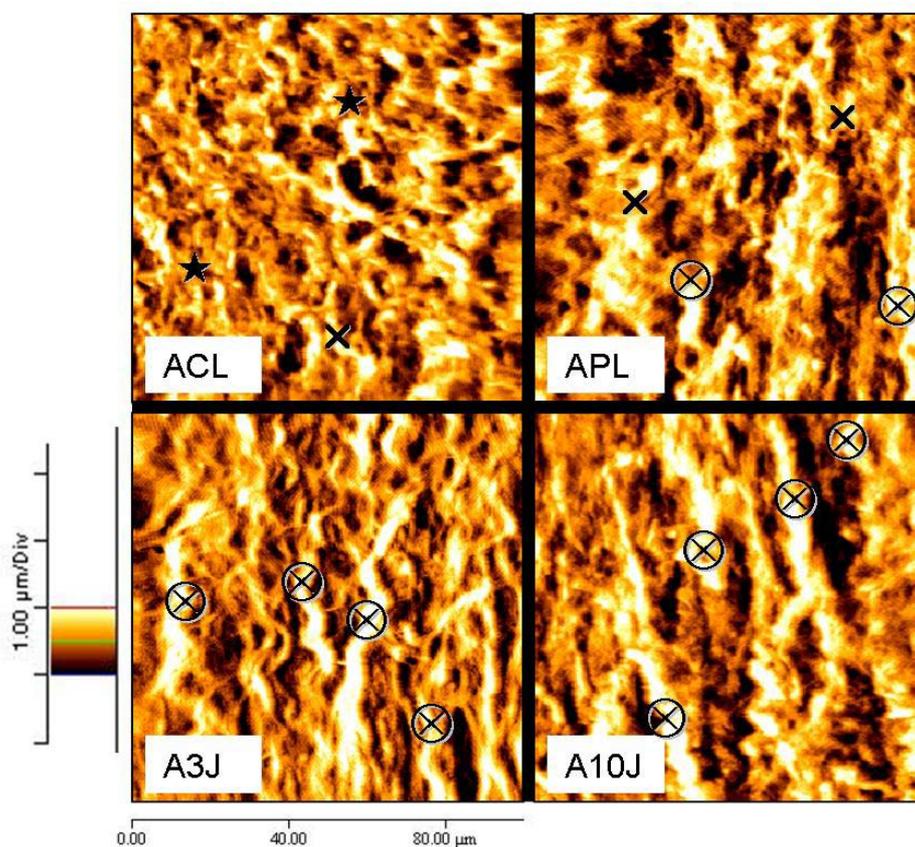


Figura 4: Imagens obtidas através da microscopia de força atômica para o grupo jovem. Observa-se diferenças qualitativas dos subgrupos ACL (adulto controle lesado), APL (adulto placebo), A3J (adulto 3J/cm²), A10J (adulto 10J/cm²), o ✕ representa área de baixa homogeneidade, ★ aponta feixes de colágeno com espessura marcadamente maior, ⊗ aponta feixes com orientação bem definida e □ marca região com orientação indefinida.

A análise das amostras obtidas pela MFA demonstra no ACL, assim como observado no JCL, que há baixa organização tecidual, fibras esparsas e sem orientação predominante com regiões cuja definição estrutural também não é clara. No subgrupo APL é bem definida a disposição dos feixes no sentido vertical e formação de feixes de colágeno mais espessos, porém esta se dá de forma muito irregular sendo sua homogeneidade baixa e ainda é perceptível regiões onde a estrutura tecidual não está bem definida.

O subgrupo A3J apresenta a formação de feixes bem claros com relação a um aumento da espessura e orientação relativamente homogênea, estrutura tecidual também é bem definida. No subgrupo A10J, também é bem clara a orientação dos feixes, observamos claramente aumento da espessura e agregação, definindo uma estrutura mais “sólida”, porém observa-se ainda alguma heterogeneidade.

DISCUSSÃO

O aumento da população de fibroblastos observado em nosso estudo é um fato relatado em diversos estudos científicos anteriores utilizando a LLLT^{5,6,7,21,22}.

Segundo os dados obtidos, observamos uma resposta à radiação laser maior no grupo adulto quando comparado ao jovem, tanto qualitativamente como quantitativamente.

A explicação para este fato pode ser baseada em uma das teorias mais importantes da fotoestimulação laser, a teoria fotoquímica, onde determinados componentes da cadeia respiratória respondem à comprimentos de onda eletromagnética específicos, no sentido de aumentar o fluxo de elétrons da membrana mitocondrial interna, viabilizando à célula um aumento do metabolismo energético. Esse mecanismo ocorre quando estes

fotorreceptores se encontram num estado redox intermediário, característico em situação onde há estresse oxidativo^{14,15,16}.

No processo de envelhecimento tecidual, diversas alterações no meio celular podem ocorrer, como redução das capacidades de proliferação, infiltração, fagocitose^{11,12} comunicação celular, diminuição da produção fatores de crescimento^{23,24} e de receptores para fatores de crescimento¹², diminuição da angiogênese²⁶, desequilíbrio na produção de colágeno e colagenase¹¹, necrose e apoptose celular²⁷. Porém, o estresse oxidativo é dos principais eventos do envelhecimento^{27,28}, sendo considerado responsável por diversas alterações citadas acima. O aumento do estresse oxidativo é relacionado à redução da eficiência de medidas antioxidantes com o envelhecimento, levando à dano na membrana celular, mitocondrial, mutação gênica e aumento dos índices de neoplasia com o avanço da idade²⁹.

Talvez o estresse oxidativo provocado pelo incremento da idade seja o fato potencializador do efeito gerado pela laserterapia nos parâmetros observados em nosso estudo, no qual verificamos um efeito mais significativo para a contagem de fibroblastos e aumento da espessura dos feixes de colágeno no grupo adulto em comparação à sua contraparte jovem.

Além disso, é possível que essas modificações decorrentes do avanço da idade possam ser modulados pela laserterapia, já que, efeitos contrários como aumento de divisão celular²¹, liberação de citocinas¹⁸, provimento de ATP^{15,16,17}, produção de colágeno³⁰, atividade fagocitária²⁰, aumento da comunicação intra e intercelular³¹ são descritos, de tal maneira a provocar benefícios mais significativos em populações mais velhas do que nas jovens.

Também é de fundamental importância o efeito pró-angiogênico da laserterapia³¹ que, segundo alguns pesquisadores ocorre, através do aumento da geração de VEGF

(vascular endothelial growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor), óxido nítrico e superóxido dismutase^{14,30,32,33}. O aumento da quantidade de vasos melhora a permuta de gases, a eliminação de catabólitos além de ser um via de transição de diversas células como fibroblastos, macrófagos e outras células relacionadas ao processo de reparo tecidual³⁴.

Esses efeitos da laserterapia também podem ter influenciado os resultados obtidos pela análise de MFA, no qual observa-se incremento da agregação, homogeneidade e alinhamento dos feixes de colágeno em uma direção predominante, coincidente com o eixo do tendão, no sentido das forças de tração, verificado principalmente no A3J e A10J.

O fato de a LLLT influenciar na estrutura do tecido não é um fato inédito. Estudos analisando o efeito da LLLT nas estruturas de colágeno mostraram evidências do aumento da síntese de colágeno e remodelamento em tendões submetidos à laserterapia, no qual também foi observado incremento da resistência mecânica, promovendo melhora funcional significativa da qualidade de regeneração⁷.

Se considerarmos que o aumento das pontes cruzadas de hidrogênio correlacionam-se com a agregação e força do tendão tratado com o laser, é provável que a terapia laser aumente a qualidade das moléculas de colágeno através do incremento de forças intermoleculares⁴. Isso explica algumas alterações observadas qualitativamente nos feixes de colágeno através da MFA nos subgrupos irradiados (J3J, J10J, A3J, A10J) e os valores quantitativos de espessura dos feixes. Esse efeito da laserterapia sobre as pontes cruzadas pode dessa forma, ter uma relação dose-dependente e idade-dependente.

Adicionalmente, os resultados observados no grupo adulto vs jovem, podem ter uma relação com a diferença entre as massas corpóreas dos animais. O fato dos animais

adultos terem sua massa significativamente maior que os jovens implica em maior carga mecânica sobre o tendão. Sabe-se que o colágeno é um material piezoelétrico (capacidade de produzir potencial elétrico a partir de estímulo mecânico) e o efeito biológico desse evento bioelétrico caracteriza-se pela sinalização de processos celulares como replicação, proteólise e organização tecidual^{35,36}.

Então o efeito piezoelétrico explica, em parte, o resultado obtido nos subgrupos JPL e APL, no qual são evidentes alterações qualitativas e quantitativas quando comparamos aos subgrupos JCL e ACL. Contudo esse ganho não foi homogêneo nesses subgrupos, gerando regiões com feixes de colágeno de diferentes tamanhos e agregados de forma irregular.

Para os subgrupos tratados, deve ser considerado que o efeito analgésico da laserterapia³⁷ possa ter permitido maior atividade física aos animais tratados em comparação ao grupo controle lesados e placebos, gerando ainda mais efeito mecânico sobre o tendão.

A associação do estímulo mecânico com a radiação laser parece ter sido mais significativo para o grupo adulto do que para o grupo jovem, promovendo qualitativamente uma estrutura mais homogênea, com características de agregação e alinhamento mais apropriados para a finalidade do tendão e quantitativamente, maior concentração de fibroblastos e espessura de feixes de colágeno.

Sugerimos também que, como a célula jovem apresenta um metabolismo elevado, cujas condições bioquímicas como fatores de crescimento, aporte sanguíneo e sinalização intra e intercelular considerados ideais, é possível que os benefícios da radiação laser sejam mais significativos para populações mais velhas, restaurando processos metabólicos e bioquímicos que foram declinando durante o processo de envelhecimento.

Por fim, concluímos com base nos resultados obtidos e na literatura consultada que a associação dos efeitos do envelhecimento como alterações metabólicas, celulares, bioquímicas do meio e de sinalização, pode de forma significativa, influenciar no processo de biomodulação laser estabelecendo uma relação idade dependente e dose dependente.

REFERÊNCIAS

1. Raspanti, M., Gongiu, T., Guizzardi, S. (2002). Structural aspects of the extracellular matrix of the tendon: an atomic force and scanning electron microscopy study. *Arch. Histol. Cytol.*, 65(1), 37-43.
2. Ottania, V., Raspanti, M., Ruggeria A. (2001). Review: Collagen structure and functional implications *Micron* 32, 251–260.
3. Kadler, K.E., Holmes, D.F., Trotter, J.A. and Chapman, J.A. (1996). Review Article: Collagen fibril formation, *Biochem. J.* 316, 1-11.
4. Parizotto, N.A.; Baranauskas, V. (1998). Structural analysis of collagen fibrils after He-Ne laser photostimulated regenerating rat tendon In: *Proceeding 2nd Congress World Association for Laser Therapy*. Kansas City, Missouri, USA, September 2–5, 66-67.
5. Enwemeka, C. S. Inflammation, cellularity, and fibrillogenesis in regenerating tendon: implications for tendon rehabilitation. *Physical Therapy*. v. 69, n. 10, p. 816-825, 1989.
6. Enwemeka, C.S.; Rodriguez, O.O.; Gall, N.G.; Walsh, N.E. (1998) Morphometrics of collagen fibril populations in HeNe laser photostimulated tendons. *J. Clin. Laser Med. Surg.* 47-62.
7. Enwemeka, C.S. (1991) Connect tissue plasticity: ultra-structural, biomechanical, and morphometric effects of physical factors on intact and regenerating tendons. *J. Orth. Sports phys. Ther.* 14 (5) 198-212.
8. Bailey, A.J., Paul, R.G., Knott. L. (1998). Review: Mechanisms of maturation and ageing of collagen. *Mechanisms of Ageing and Development* 106, 1–56.
9. Uitto, J., (1986). Connective-tissue biochemistry of the aging dermis-age-related alterations in collagen and elastin. *Dermatol. Clin.* 4, 433–436.
10. Mays, P.K., McAnulty, R.J., Campa, J.S., Laurent, G.J., 1991. Age-related-changes in collagen-synthesis and degradation in rat tissues-importance of

- degradation of newly synthesized collagen in regulating collagen production. *Biochem. J.* 276, 307–313.
11. Khorramizadeh, M.R., Tredget, E.E., Telasky, C., Shen Q. and Ghahary A. (1999). Aging differentially modulates the expression of collagen and collagenase in dermal fibroblasts, *Molecular and Cellular Biochemistry.* 194, 99–108.
 12. Feng yao, et al, (2001) Age and growth factors in porcine full thickness wound healing. *Wound Repair and Regeneration.* 371-77.
 13. Kainberger, F., Mittermaier, F., Seidl, G., Parth, E., Weinstalbl, R. (1997) Imaging of tendons – adaptation, degeneration, rupture., *European journal of radiology,* 25, 209-222.
 14. Vladimirov, Y.A., Osipov, A.N. and Klebanov, G.I. (2004). Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. *Biochemistry (Moscow).* 69(1), 81-90.
 15. Passarella S. Casamassima, E., Molinari, S., Pastore, D., Quagliariello, E., Catalano, I.M., Cingolani, A. (1984) Increase of proton electromchemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by helium-neon laser. *FEBS Letter* 175, 95-99.
 16. Karu, T.I., Pyatibrat, L.V. and Afanasyeva, N.I. (2005) Cellular effects of low power laser therapy can be mediated by nitric oxide. *Lasers Surg. Med.* 36, 307–314.
 17. Mohammed Ihsan, F.R., (2005) Low-level laser therapy accelerates collateral circulation and enhances microcirculation. *Photomedicine and Laser Surgery.* 23, (3), 289–294.
 18. Yu, W., Naim, J.O., Lanzafame, R.J. (1994) The effect of laser irradiation on the release of bFGF from 3T3 fibroblasts. *Photochem Photobiol;* 59, 167–170.
 19. Tuby, H., Maltz, L., Oron, U. (2006) Modulations of VEGF and iNOS in the rat heart by low level laser therapy are associated with cardioprotection and enhanced angiogenesis. *Lasers Surg. Med.*, article In press.
 20. Young, S., Bolton, P., Dyson, M., Harvey, W., Diamantopoulos, C. (1989). Macrophage responsiveness to light therapy. *Lasers Surg. Med.* 9(5),497–505.
 21. Azevedo, L.H., et al., (2006) Influence of different power densities of LILT on cultured human fibroblast growth: A pilot study. *Lasers Med. Sci,* 21, 86–89.
 22. Hawkins, D.H. and Abrahamse, H. (2006) The role of laser fluence in cell viability, proliferation, and membrane integrity of wounded human skin fibroblasts following helium-neon laser irradiation. *Lasers Surg. Med.* 38, 74–83.

23. Brink, H.E., Miller, G.J., Beredjikian, P.K., Nicoll, S.B. (2006). Serum-dependent effects on adult and fetal tendon fibroblast migration and collagen expression. *Wound Rep. Reg.* 14, 179–186.
24. Roubenoff, R., Harris, T.B., Abad, L.W. (1998) Monocyte cytokine production in an elderly population: effect of age and inflammation. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 53, 20-26.
25. Chakravarti, B., Abraham, G.N. (1999). Aging and T-cell-mediated immunity. *Mech Ageing Dev* 108, 183-206.
26. Swift, M.E., Kleinman, H.K., DiPietro, L.A. (1999). Impaired wound repair and delayed angiogenesis in aged mice. *Lab Invest* 79, 1479-1487.
27. Ohshima, S. (2006) Apoptosis and necrosis in senescent human fibroblasts. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1067, 228–234.
28. Harman, D. (1981). The aging process (free radicals/ evolution/ antioxidants/ degenerative diseases/ longevity). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78, (11), 7124-7128.
29. Ames, B.N., Shigenaga, M.K. (1992). Oxidants are a major contributor to aging. *Ann NY Acad Sci* 663, 85-96.
30. Yamamoto, Y., Kono, T., Kotani, H., Kasai, S., Mito, M. (1996). Effect of low-power laser irradiation on procollagen synthesis in human fibroblasts. *J Clin Laser Med Surg*, 14(3):129–32.
31. Mirsky, N., Krispel, Shoshany, Maltz, and Oron, U. (2002) Promotion of Angiogenesis by Low Energy Laser Irradiation. *Antioxidants & Redox Signaling.* 4 (5), 785-790.
32. Klebanov, G.I., Poltanov, E.A., Chichuk, T.V., Osipov, A.N. and Vladimirov, Y.A. (2005) Changes in Superoxide Dismutase Activity and Peroxynitrite Content in Rat Peritoneal Macrophages Exposed to He₂Ne Laser Radiation *Biochemistry (Moscow).* 70 (12), 1335-1340.
33. Fujimaki, Y., Shimoyama, T., Liu, Q., Umeda, T., Nakaji, S., Sugawara, K. (2003) Low-Level Laser Irradiation Attenuates Production of Reactive Oxygen Species by Human Neutrophils. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery.* 21 (3), 165–170.
34. D'Amore, P.A. and Thompson, R.W. (1987) Mechanism of angiogenesis. *Ann. Rev. Physiol* 49, 453 – 64.
35. Palmes, D. et al., (2002) Achilles tendon healing: Long-term biomechanical effects of postoperative mobilization and immobilization in a new mouse model. *Journal of Orthopaedic Research.* 20, 939–946.

36. Bassett, C.A. (1968) Biologic significance of piezoelectricity. *Calcif. Tissue Res.* 1(4), 252-72.
37. Chow, R.T., Barnsley, L. (2005). Systematic Review of the Literature of Low-Level Laser Therapy (LLLT) in the Management of Neck Pain. *Lasers Sur. Med.* 37, 46–52.

PARTE III

Conclusões gerais
Considerações finais

5. CONCLUSÕES GERAIS

Este estudo verificou a relevância na hipótese da relação idade-dependente da fotobioestimulação laser, o qual justificaria mais investigações considerando a idade como uma variável clínica para a parametrização da laserterapia.

Pontualmente, concluímos a partir dos nossos resultados:

1. Existe uma relação da idade em relação ao processo de regeneração tecidual, no qual verificamos no nosso grupo controle, características diferenciadas em diversos parâmetros analisados (contagem de fibroblastos e células inflamatórias e características qualitativas da matriz extracelular).
2. Para uma mesma dose, a resposta celular, angiogênica e do colágeno foi diferente entre a idade de 4-5 semanas e a idade de 27-28 semanas.
3. Para uma mesma idade houve diferença da resposta celular e do colágeno a doses de laser diferentes.
4. Houve aumento na contagem de capilares sangüíneos nos grupos irradiados, sendo estatisticamente significativa a diferença da resposta entre as idades, porém não entre as doses de irradiação, sugerindo menor influência da dose do que da idade para a angiogênese.
5. É provável que essas alterações tenham uma relação com o estímulo/ estresse mecânico sobre o tendão, devido às características piezoelétricas do colágeno.
6. As alterações observadas podem ter uma importante relação com a função tecidual, pois representam modificações estruturais e celulares que definem algumas propriedades mecânicas do tendão.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar dos resultados obtidos neste estudo, podemos apresentar algumas limitações em decorrência do modelo adotado. Talvez o uso de animais com idade mais avançada (1 a 2 anos) poderia trazer dados mais significativos para relacionarmos ao envelhecimento. A contagem diferencial das células do processo inflamatório poderia trazer dados mais conclusivos permitindo diferenciar a fase do processo inflamatório.

Neste estudo, verificamos que há a influência da idade sobre a resposta da laserterapia no reparo tendíneo, porém parâmetros precisos de radiação devem ser pesquisados visando melhores resultados na regeneração.

Assim como verificado neste estudo, é possível que outras modalidades terapêuticas como a termoterapia, eletroestimulação, técnicas manuais de mobilização e manipulação, treinamento para fortalecimento muscular e propriocepção possam também sofrer influência da idade. Sendo assim, sugerimos que investigações a respeito devam ser realizadas com o objetivo de buscar mais respostas para essa questão.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMES, B.N.; SHIGENAGA, M.K. Oxidants are a major contributor to aging. **Ann. NY. Acad. Sci.**, n. 663, p. 85-96, 1992.

ÅSTRÖN. M.; RAUSING, A. Chronic Achilles tendinopathy. A survey of surgical and histopathologic findings. **Clin. Orthop.**, v. 316, p. 151-164, 1995.

AZEVEDO, L.H.; et al. Influence of different power densities of LILT on cultured human fibroblast growth: A pilot study. **Lasers Med. Sci.**, 21, p. 86–89, 2006.

BAILEY, A.J.; PAUL, R.G.; KNOTT, L. Review Mechanisms of maturation and ageing of collagen. **Mechanisms of Ageing and Development**, 106, p. 1–56, 1998.

BASSETT, C.A. Biologic significance of piezoelectricity. **Calcif. Tissue Res.**, 1(4), p. 252-72, 1968.

BIRREN, J.E; SCHAIE, K.W; SCHROOTS, J.F. History, concepts and theory in the psychology of aging. In: BIRREN, J.E; SCHAIE, K.W. **Handbook of the psychology of aging**. 5° ed. San Diego: Academic Press, 1996.

BIZOT-FOULON, V.; BOUCHARD, B.; HORNEBECK, W.; et al. Uncoordinate expressions of type I and III collagens, collagenase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase I along in vitro proliferative life span of human fibroblasts. Regulation by all-trans retinoic acid. **Cell. Biol. Intl.**, n. 19, p. 129–135, 1995.

BRAVERMAN, B.; MCCARTHY, R.J.; IVANKOVICH, A.D.; et al. Effect of helium-neon and infrared laser irradiation on wound healing in rabbits. **Lasers Surg. Med.**, v. 9, p. 50–58, 1989.

BRINK, H.E.; MILLER, G.J.; BEREDJIKLIAN, P.K.; NICOLL, S.B. Serum-dependent effects on adult and fetal tendon fibroblast migration and collagen expression. **Wound Rep. Reg.**, 14, p. 179–186, 2006.

CHAKRAVARTI, B.; ABRAHAM, G.N. Aging and T-cell-mediated immunity. **Mech. Ageing. Dev.**, 108, p. 183-206, 1999.

CHOW, R.T.; BARNSLEY, L. Systematic Review of the Literature of Low-Level Laser Therapy (LLLT) in the Management of Neck Pain. **Lasers Sur. Med.**, 37, p. 46–52, 2005.

D'AMORE, P.A. and THOMPSON, R.W. Mechanism of angiogenesis. **Ann. Rev. Physiol.**, 49, p. 453 – 64, 1987.

ENWEMEKA, C. S. Inflammation, cellularity, and fibrillogenesis in regenerating tendon: implications for tendon rehabilitation. **Physical Therapy**, v.69, n. 10, p. 816-825, 1989.

ENWEMEKA, C.S. Connect tissue plasticity: ultrastructural, biomechanical, and morphometric effects of physical factors on intact and regenerating tendons. **J. Orth. Sports phys. Ther.**, 14 (5), p. 198-212, 1991.

ENWEMEKA, C.S. Functional loading augments the initial tensile strength and energy absorption capacity of regenerating rabbit Achilles tendons. **American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation**, v. 71, n. 1, p. 31-38, 1992.

ENWEMEKA, C.S.; REDDY, K. The biological effects of laser therapy and other physical modalities on connective tissue repair processes. **Laser Therapy**, v. 12, p. 22-30, 2000.

ENWEMEKA, C.S.; RODRIGUEZ, O.O.; GALL, N.G.; WALSH, N.E. Morphometrics of collagen fibril populations in HeNe laser photostimulated tendons. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**, p. 47-62, 1990.

FENG YAO, et al. Age and Growth factors in porcine full thickness wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, p. 371-377, 2001.

FILLIPIN, L.I.; MAURIZ, J.L; VEDOVELLI, K.; et al. Low-Level Laser Therapy (LLLT) Prevents Oxidative Stress and Reduces Fibrosis in Rat Traumatized Achilles Tendon. **Lasers in Surgery and Medicine**, 37, p. 293–300, 2005.

FUJIMAKI, Y.; SHIMOYAMA, T.; LIU, Q.; et al. Low-Level Laser Irradiation Attenuates Production of Reactive Oxygen Species by Human Neutrophils. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v.21, n. 3, p. 165–170, 2003.

FUKADA, E. Electrical phenomena in biorheology. **Biorheology.**, v.19, n 1/2, p. 15-27, 1982.

GRIFFITHS, E. J., Mitochondria – potential role in cell life and death. **Cardiovascular Research**, 46, p. 24-27, 2000.

GUM, S.L.; REDDY, G.K.; STEHNO-BITTEL, L.; et al. Combined ultrasound, electrical stimulation, and laser promote collagen synthesis with moderate changes in tendon biomechanics. **American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation**, v. 76, n. 4, p. 288-296, 1997.

HARMAN, D. The Aging Process (free radicals/ evolution/ antioxidants/ degenerative diseases/ longevity). **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**. v.78, n. 11, p. 7124-7128, 1981.

HARMAN, D. Free radical theory of aging: consequences of mitochondrial aging. **Age**, 6, p. 86-94, 1983.

HASTAD, K.; LARSSON, L.G.; LINDHOLM, A. Clearance of radiosodium after local deposit in the Achilles tendon. **Acta Chir Scand**, v.116, p. 251-255, 1958/59.

HAWKINS, D.H. and ABRAHAMSE, H. The Role of Laser Fluence in Cell Viability, Proliferation, and Membrane Integrity of Wounded Human Skin Fibroblasts Following Helium-Neon Laser Irradiation. **Lasers Surg. Med.**, 38, p. 74-83, 2006.

IPPOLITO, E.; NATALI, P.G.; POSTACCHINI, F.; ACCINNI, L.; DE MARTINO, C. Morphological, immunochemical, and biochemical study of rabbit Achilles tendon at various ages. **J. Bone Joint Surg (Am)**, v. 62, p.583-598, 1980.

JAZWINSKI, S.M; Agin and longevity genes. **Acta Biochimica Polonica**, v. 47, p. 269-279, 2/2000.

JÒZNA, L.; KVIST, M.; BALINT, B.J.; et al. The role of recreational sport activity in Achilles tendon rupture. A clinical, pathoanatomical, and sociological study of 292 cases. **Am. J. Sports Med.** v.17, n. 3, p. 338-343, 1989.

KADLER, K.E.; HOLMES, D.F.; TROTTER, J.A. AND CHAPMAN, J.A. Review Article: Collagen fibril formation, **Biochem. J.** 316, p. 1-11, 1996.

KAINBERGER, F.; MITTERMAIER, F.; SEIDL, G.; et al. Imaging of tendons – adaptation, degeneration, rupture, **European journal of radiology**, 25, p. 209-222, 1997.

KARU, T.; ANDREICHUK, T.; RYABYKH, T. Changes in oxidative metabolism of murine spleen following laser and superluminous diode (660-950 nm) irradiation: Effects of Cellular composition and radiation parameters. **Laser in surgery and medicine**, 13, p. 453-462, 1993.

KARU, T.I., PYATIBRAT, L.V. AND AFANASYEVA, N.I. Cellular Effects of Low Power Laser Therapy Can be Mediated by Nitric Oxide. **Lasers Surg. Med.**, 36, p. 307-314, 2005.

KHORRAMIZADEH, M.R.; TREDGET, E.E.; TELASKY, C.; et al. Aging differentially modulates the expression of collagen and collagenase in dermal fibroblasts. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 194, p. 99-108, 1999.

KLEBANOV, G.I.; POLTANOV, E.A.; CHICHUK, T.V.; et al. Changes in Superoxide Dismutase Activity and Peroxynitrite Content in Rat Peritoneal Macrophages Exposed to He-Ne Laser Radiation. **Biochemistry (Moscow)**, v.70, n. 12, p. 1335-1340, 2005.

KOEKE, P.U.; PARIZOTTO, N.A.; CARRINHO, P.M.; SALATE, A.C.B. Comparative study of the efficacy of the topical application of hydrocortisone, therapeutic ultrasound and phonophoresis of the tissue repair process in rat tendons. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 31, n. 3, p. 345-350, 2005.

LEEUWENBURGH, C. Role of Apoptosis in Sarcopenia. **Journal of Gerontology**, v. 58, n. 11, p. 999-1001, 2003.

LEPPILAHTI, J.; PURANEN, J.; ORAYA, S. Incidence of Achilles tendon rupture. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, v. 67, n. 3, p. 277-279, 1996.

LUBART, R.; EICHLER, M.; LAVI, R.; et al. Low-Energy Laser Irradiation Promotes Cellular Redox Activity. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 23, n. 1, p. 3–9, 2005.

MAYS, P.K.; MCANULTY, R.J.; CAMPA, J.S.; et al. Age-related-changes in collagen-synthesis and degradation in rat tissues-importance of degradation of newly synthesized collagen in regulating collagen production. **Biochem. J.**, 276, p. 307–313, 1991.

MERRY, B.J. Oxidative stress and mitochondrial function with aging – the effects of calorie restriction. **Aging cell**, 3, p. 7-12, 2004.

MIRSKY, N.; ORON, U. Promotion of Angiogenesis by Low Energy Laser Irradiation. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.4, n. 5, p. 785-790, 2002.

MOHAMMED IHSAN, F.R., Low-Level Laser Therapy Accelerates Collateral Circulation and Enhances Microcirculation. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.23, n. 3, p. 289–294, 2005.

NESTORSON, J.; MOVIN, T.; MOLLER, M.; KARLSSON, J. Function after Achilles tendon rupture in the elderly. **Acta Orthop. Scand.**, v.71, n. 1, p. 64-68, 2000.

OHSHIMA, S. Apoptosis and Necrosis in Senescent Human Fibroblasts **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, n.1067, p. 228–234, 2006.

OTTANIA, V.; RASPANTIB, M.; RUGGERIA A. Review: Collagen structure and functional implications, **Micron**, 32, p. 251–260, 2001.

PALMES, D. et al. Achilles tendon healing: Long-term biomechanical effects of postoperative mobilization and immobilization in a new mouse model. **Journal of Orthopaedic Research.**, 20, p. 939–946, 2002.

PARIZOTTO, N. Ação do laser He-Ne sobre o processo de reparo tecidual: um estudo por microscopia eletrônica de varredura, microscopia de força atômica e espectroscopia infravermelho. 1998. 181 f. Tese (Doutorado em Engenharia Elétrica) – Faculdade de Engenharia Elétrica e Computação, UNICAMP, Campinas.

PARIZOTTO, N.A.; BARANAUSKAS, V. Structural analysis of collagen fibrils after He-Ne laser photostimulated regenerating rat tendon **In: Proceeding 2nd Congress World Association for Laser Therapy**. Kansas City, Missouri, USA, September 2–5, p. 66-67, 1998.

PASSARELLA S.; CASAMASSIMA, E.; MOLINARI, S.; et al. Increase of proton electromchemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by helium-neon laser. **FEBS Letter**, 175, p. 95-99, 1984.

POUSSON, M.; VALOUR, D. Compliance changes of the series elastic component of elbow flexor muscles with age in humans. **Eur. J. Physiol.**, n. 445, p. 721-727, 2003.

RASPANTI, M.; GONGIU, T.; GUIZZARDI, S. Structural aspects of the extracellular matrix of the tendon: an atomic force and scanning electron microscopy study. **Arch. Histol. Cytol.**, v.65, n. 1, p. 37-43, 2002.

RIVARD, A.; FABRE, J.E.; SILVER, M. et al. Age-dependent impairment of angiogenesis, **Circulation**, 99, p. 111–120, 1999.

ROUBENOFF, R.; HARRIS, T.B.; ABAD, L.W. Monocyte cytokine production in an elderly population: effect of age and inflammation. **J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci**, 53, p. 20-26, 1998.

SHIBATA, Y.; OGURA, N.; YAMACHIRO, K.; et al. Anti-inflammatory effect of linear polarized infrared irradiation on interleukin-1b-induced chemokine production in MH7A rheumatoid synovial cells, **Lasers in Medical Science.**, n. 20, p. 109–113, 2005.

STEHNO-BITTEL, L.; REDDY, G.K.; GUM, S.; et al. Biochemistry and biomechanics of healing tendon: Part I. effects of rigid plaster casts and functional casts. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 30, n. 6, p. 788-793, 1998.

SUNDERKOTTER, C.; KALDEN, H.; LUGER, T.A. Aging and the skin immune system. **Arch. Dermatol.**, 133, p. 1256±1262, 1997.

SWIFT, M.E.; BURNS, A.L.; GRAY K.L. et al. Age-Related Alterations in the Inflammatory Response to Dermal Injury. **J. Invest. Dermatol.**, 117, p. 1027-1035, 2001.

TUBY, H.; MALTZ, L.; ORON, U. Modulations of VEGF and iNOS in the Rat Heart by Low Level Laser Therapy are Associated With Cardioprotection and Enhanced Angiogenesis. **Lasers Surg. Med.**, article In press, 2006.

UITTO, J. Connective-tissue biochemistry of the aging dermis-age-related alterations in collagen and elastin. **Dermatol. Clin.**, n.4 , p. 433–436, 1986.

VIDAL, B.C. Métodos em Biologia Celular. In: VIDAL, B.C.; MELLO, M.L.S. **Biologia Celular**. Rio de Janeiro e São Paulo: Atheneu, p. 5-40, 1987.

VINCK, E.M.; CAGNIE, B.; CORNELISSEN, M.J.; et al. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. **Lasers Med. Sci**. 18, p. 95–99, 2003.

VLADIMIROV, Y.A.; OSIPOV, A.N; KLEBANOV, G.I. Photobiological Principles of Therapeutic Applications of Laser Radiation. **Biochemistry (Moscow)**. V. 69, n. 1, p. 81-90, 2004.

YAMAMOTO, Y.; KONO, T.; KOTANI, H.; et al. Effect of low-power laser irradiation on procollagen synthesis in human fibroblasts. **J. Clin. Laser. Med. Surg.**, v.14, n. 3, p. 129–32, 1996.

YOUNG, S.; BOLTON, P.; DYSON, M.; et al. Macrophage responsiveness to light therapy. **Lasers Surg. Med.**, v. 9, n. 5, p. 497–505, 1989.

YU, W.; NAIM, J.O; LANZAFAME, R.J. The effect of laser irradiation on the release of bFGF from 3T3 fibroblasts. **Photochem. Photobiol**, 59, p. 167–170, 1994.

8. ANEXOS:**1. Parecer do comitê de Ética em pesquisa com animais**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
Comissão de Ética em Experimentação Animal
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676
Fones: (016) 3351.8109 / 3351.8110
Fax: (016) 3361.3176
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil
propp@power.ufscar.br - www.propp.ufscar.br

Parecer 002/2005

Protocolo nº 003/2005

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos – CCEA/UFSCar - **APROVOU** o trabalho intitulado Análise ultraestrutural da ação do laser de baixa intensidade sobre o processo de regeneração do tendão de ratos em diferentes fase maturacionais do (s) autor (es) Carles Taciro, Nivaldo Antonio Parizotto, na 3ª. Reunião, ocorrida em 24/06/2005.
São Carlos, 27 de junho de 2005.

Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto
Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal

2. ANÁLISE DE ESPESSURA DE FEIXES – MFA.

<i>Subgrupos</i>	<i>Espessura de feixes de colágeno em micrômetros</i>	
	MÉDIA	D.P.
JCL	4.681	0,592
JPL	5.229	0,580
J3J	5.142	0,666
J10J	5.080	0,669
ACL	4.618	0,581
APL	5.106	0,602
A3J	5.137	0,590
A10J	5.695	0,693
Bonferroni	B	p
JCL vs JPL	0.133	< 0.05
JCL vs J3J	0.136	< 0.05
JCL vs J10L	0.136	< 0.05
JCL vs ACL	0.135	> 0.05
JCL vs APL	0.136	< 0.05
JCL vs A3J	0.138	< 0.05
JCL vs A10J	0.136	< 0.05
JPL vs J3J	0.136	> 0.05
JPL vs J10L	0.136	< 0.05
JPL vs ACL	0.135	< 0.05
JPL vs APL	0.136	> 0.05
JPL vs A3J	0.138	> 0.05
JPL vs A10J	0.136	< 0.05
J3J vs J10L	0.139	> 0.05
J3J vs ACL	0.138	< 0.05
J3J vs APL	0.139	< 0.05
J3J vs A3J	0.141	> 0.05
J3J vs A10J	0.139	> 0.05
J10J vs ACL	0.138	< 0.05
J10J vs APL	0.139	< 0.05
J10J vs A3J	0.141	> 0.05
J10 vs A10J	0.139	< 0.05
ACL vs APL	0.139	< 0.05
ACL vs A3J	0.140	< 0.05
ACL vs A10J	0.138	< 0.05
APL vs A3J	0.141	> 0.05
APL vs A10J	0.139	< 0.05
A3J vs A10J	0.141	< 0.05

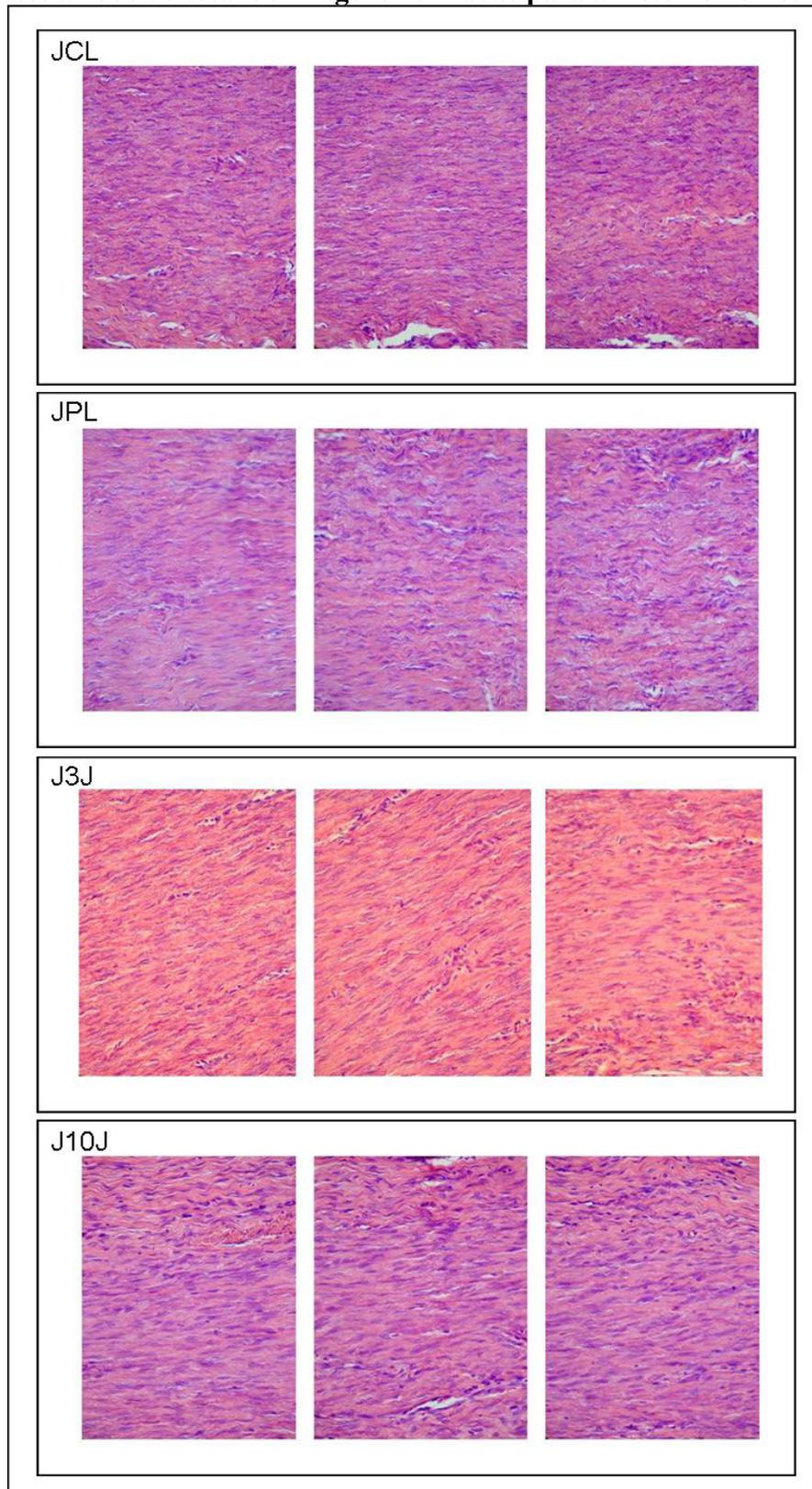
3. HISTOMORFOMETRIA: CONTAGEM DE CÉLULAS E CAPILARES SANGUÍNEOS.

Na tabela a seguir são mostrados os resultados (média e mediana) obtidos para a contagem de fibroblastos, capilares sanguíneos e leucócitos, submetidos ao teste post hoc de bonferroni para identificação das comparações estatisticamente significativas, considerando um $p < 0.05$:

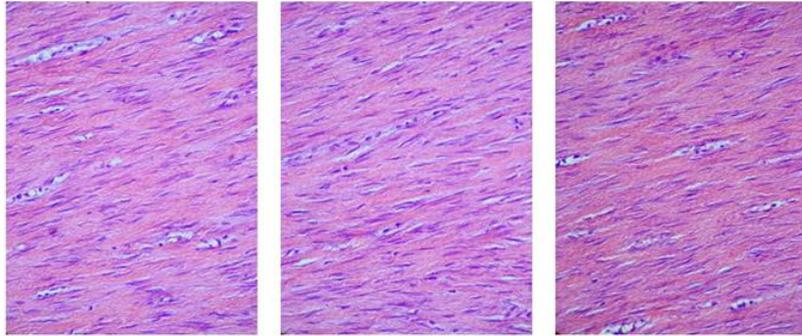
<i>Subgrupos</i>	<i>Capilares sanguíneos</i>		<i>Fibroblastos</i>		<i>Células inflamatórias</i>	
	MÉDIA	D.P.	MÉDIA	D.P.	MÉDIA	D.P.
JCL	4.333	1.49	454.944	53.86	13.952	6.07
JPL	5.238	2.11	475.284	61.56	35.476	21.53
J3J	7.766	1.67	426.166	69.40	54.966	25.96
J10J	7.333	1.59	473.809	32.14	76.857	31.42
ACL	3.4	1.18	368.399	47.38	18.8	4.76
APL	5.555	2.35	387.388	40.90	61.944	34.19
A3J	8.571	2.31	397.095	52.26	38.523	14.74
A10J	8.555	2.20	427.499	29.52	40.888	15.97
Bonferroni	B	p	B	P	B	P
JCL vs JPL	0.9674	> 0.05	45.098	> 0.05	11.329	< 0.05
JCL vs J3J	0.8919	< 0.05	41.860	> 0.05	10.445	< 0.05
JCL vs J10L	0.9674	< 0.05	45.098	> 0.05	11.329	< 0.05
JCL vs ACL	1.0598	> 0.05	49.085	< 0.05	12.410	> 0.05
JCL vs APL	1.0069	< 0.05	46.801	< 0.05	11.791	< 0.05
JCL vs A3J	0.9674	< 0.05	45.098	< 0.05	11.329	< 0.05
JCL vs A10J	1.0069	< 0.05	46.801	> 0.05	11.791	< 0.05
JPL vs J3J	0.8919	< 0.05	39.947	< 0.05	10.445	< 0.05
JPL vs J10L	0.9674	< 0.05	43.329	> 0.05	11.329	< 0.05
JPL vs ACL	1.0598	< 0.05	47.465	< 0.05	12.410	< 0.05
JPL vs APL	1.0069	> 0.05	45.098	< 0.05	11.791	< 0.05
JPL vs A3J	0.9674	< 0.05	43.329	< 0.05	11.329	> 0.05
JPL vs A10J	1.0069	< 0.05	45.098	< 0.05	11.791	> 0.05
J3J vs J10L	0.8919	> 0.05	39.947	< 0.05	10.445	< 0.05
J3J vs ACL	0.9913	< 0.05	44.399	< 0.05	11.609	< 0.05
J3J vs APL	0.9346	< 0.05	41.860	> 0.05	10.945	> 0.05
J3J vs A3J	0.8919	> 0.05	39.947	> 0.05	10.445	< 0.05
J3J vs A10J	0.9346	> 0.05	41.860	> 0.05	10.945	< 0.05
J10J vs ACL	1.0598	< 0.05	47.465	< 0.05	12.410	< 0.05
J10J vs APL	1.0069	< 0.05	45.098	< 0.05	11.791	< 0.05
J10J vs A3J	0.9674	< 0.05	43.329	< 0.05	11.329	< 0.05
J10 vs A10J	1.0069	< 0.05	45.098	< 0.05	11.791	< 0.05
ACL vs APL	1.0959	< 0.05	49.085	> 0.05	12.834	< 0.05
ACL vs A3J	1.0598	< 0.05	47.465	> 0.05	12.410	< 0.05
ACL vs A10J	1.0959	< 0.05	49.085	< 0.05	12.834	< 0.05
APL vs A3J	1.0069	< 0.05	45.098	> 0.05	11.791	< 0.05
APL vs A10J	1.0449	< 0.05	46.801	> 0.05	12.237	< 0.05
A3J vs A10J	1.0069	> 0.05	45.098	> 0.05	11.791	> 0.05

4. PRANCHAS DE MICROSCOPIA DE LUZ

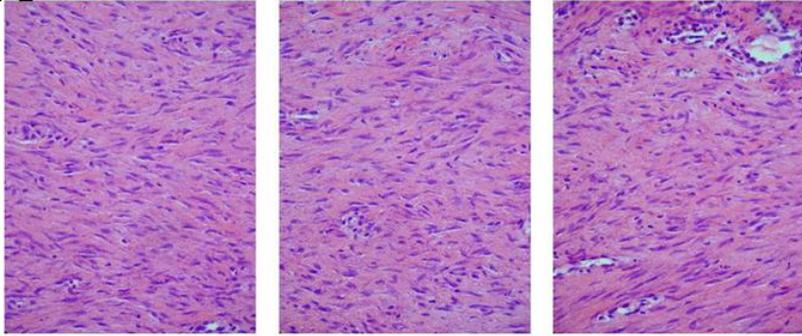
Fotomicrografias dos tendões dos ratos dos grupos jovem e adulto, sendo equivalentes a 10% do total de imagens utilizadas para a histomorfometria.



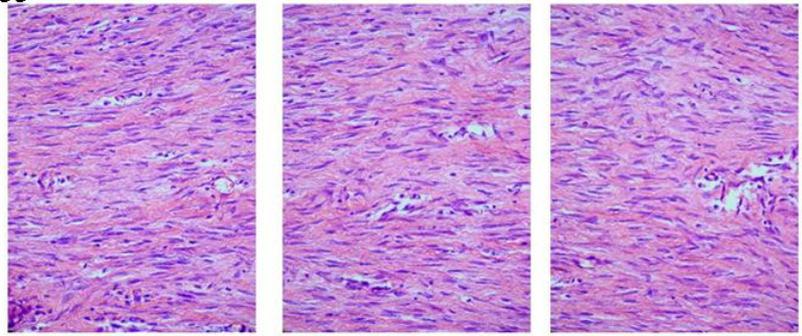
ACL



APL



A3J



A10J

