

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

**ESTUDO COMPARATIVO UTILIZANDO LASERS DE  
685NM E 830NM NO PROCESSO DE REPARO TECIDUAL  
EM TENDÕES TENOTOMIZADOS DE RATOS**

**Patrícia Michelassi Carrinho**

**2004**

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

**Estudo comparativo utilizando lasers de 685nm e 830nm no  
processo de reparo tecidual em tendões tenotomizados de ratos**

**Patrícia Michelassi Carrinho**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fisioterapia.

Orientador: Prof. Dr. Nivaldo Antônio Parizotto

**SÃO CARLOS**

**2004**

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

C318ec

Carrinho, Patrícia Michelassi.

Estudo comparativo utilizando lasers de 685 nm e 830 nm no processo de reparo tecidual em tendões tenotomizados de ratos/ patrícia Micelassi Carrinho. -- São Carlos : UFSCar, 2004.  
143 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2004.

1. Medicina experimental – rato. 2. Laser de baixa potência. 3. Colágeno. 4. Birrefringência. 5. Reparo tecidual. 7. Microscopia de polarização. I. Título.

CDD: 619.93 (20<sup>a</sup>)

**Acima de tudo a Deus por ter me conduzido a realização desse sonho.**

**Aos meus avós, João e Nair (*in memoriam*), por me ensinar o sentido da humildade e perseverança.**

**Aos meus pais Antonio e Selma que me dedicaram o seu amor incondicional, minha eterna gratidão.**

**Ao meu noivo Rodrigo por fazer parte da minha vida, e pela benção de me fazer feliz, dedico.**

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AMP cíclico:** monofosfato de 3' 5' –adenosina cíclico

**ATP:** trifosfato de adenosina

**B:** birrefringência

**BF:** birrefringência de forma

**CO<sub>2</sub>:** anidrido carbônico

**CW:** continuous wave

**DNA:** ácido desoxiribonucleico

**EGF:** fator de crescimento epidermal

**FGF:** fator de crescimento do fibroblasto

**Ga-Al-As:** arseneto de gálio alumínio

**Ga-As:** arseneto de gálio

**He-Ne:** hélio-neônio

**HLLT:** terapia laser de alta potência

**Hz:** hertz

**LLLT:** terapia laser de baixa potência

**NGF:** fator de crescimento neural

**nm:** nanômetro

**$\eta_E$ :** índice de refração na direção do raio extraordinário

**$\eta_o$ :** índice de refração na direção do raio ordinário

**$\eta$ :** índice de refração

**O<sub>2</sub>:** oxigênio

**OR:** retardo óptico

**P.O.:** pós-operatório

**PDGF:** fator de crescimento derivado das plaquetas

**PGE1:** prostaglandinas E-1

**PGE2:** prostaglandinas E-2

**RNA:** ácido ribonucleico

**RNA<sub>m</sub>:** ácido ribonucleico mensageiro

**TGF- $\alpha$ :** fator de crescimento transformador

**TGF- $\beta$ -I:** fator de crescimento transformador

**$\alpha$ :** alfa

**$\lambda$ :** lâmbda (comprimento de onda)

**LISTA DE TABELAS**

	<b>PAG.</b>
<b>TABELA 1-</b> Grupos e Subgrupos experimentais.....	64
<b>TABELA 2-</b> Resultados do Teste de Kruskal-Wallis para a verificação das diferenças entre os subgrupos estudados.....	73
<b>TABELA 3-</b> Médias e Desvios Padrão dos valores de retardo óptico (OR em nm) de fibras colágenas de tendões calcaneares de ratos analisados em 45° em relação ao polarizador e analisador para os subgrupos em estudo A, B, C, D, E e F.....	74
<b>TABELA 4-</b> Médias e Desvios Padrão dos valores de retardo óptico (OR em nm) de fibras colágenas de tendões calcaneares de ratos observados com o alinhamento do eixo longo dos tendões em zero graus em relação ao polarizador para os subgrupos em estudo A, B, C, D, E e F.....	76
<b>TABELA 5-</b> Valores de p obtidos através do teste de comparações múltiplas para as medidas feitas em 45° em relação ao polarizador e analisador. Comparação dos valores de retardo óptico (OR em nm) de todos os subgrupos em estudo: A, B, C, D, E e F.....	77
<b>TABELA 6-</b> Comparação dos resultados obtidos nos subgrupos tratados, referentes a porcentagem (%) de aumento do OR (em nm) dos subgrupos estudados.....	79
<b>TABELA 7-</b> Valores de p obtidos através do teste de comparações múltiplas para as medidas feitas com o alinhamento do eixo longo dos tendões em zero grau em relação ao polarizador. Comparação dos valores de retardo óptico (OR em nm) de todos os subgrupos em estudo: A, B, C, D, E e F.....	79
<b>TABELA 8-</b> Comparação dos resultados obtidos nos subgrupos tratados, referentes a porcentagem (%) de aumento do OR (em nm) dos subgrupos estudados.....	81

**LISTA DE FIGURAS**

	<b>PÁG.</b>
Figura 1. Representação esquemática da lei de Arndt-Schultz.....	31
Figura 2. Imagens do tendão calcanear do rato liberado e exposto para a realização da tenotomia e da pele suturada, após o procedimento cirúrgico.....	65
Figura 3. Equipamento laser utilizado no estudo.....	66
Figura 4. Imagens dos ratos contidos e submetidos a sessões de tratamentos pontuais com laser de 685 nm e 830 nm sobre a região lesada.....	67
Figura 5. Esquema do protocolo de tratamento aplicado nos subgrupos experimentais....	68
Figura 6. Distribuições das medições de OR (em nm) de fibras colágenas, considerando as repetições a 45°.....	72
Figura 7. Distribuições das medições de OR (em nm) de fibras colágenas, considerando as repetições a zero graus.....	72
Figura 8. Médias e desvios padrão dos retardo ópticos, em nanômetros (nm) (N=40) observados através da microscopia de luz polarizada dos tendões calcaneares de ratos em relação aos diferentes subgrupos estudados.....	75
Figura 9. Médias e desvios padrão dos retardo ópticos, em nanômetros (nm) (N=40) observados através da microscopia de luz polarizada dos tendões calcaneares de ratos em relação aos diferentes subgrupos estudados.....	76
Figura 10. Imagens referentes às observações qualitativas da análise de birrefringência total dos tendões, por meio da microscopia de luz polarizada dos subgrupos: A e B.....	83
Figura 11. Imagens referentes às observações qualitativas da análise de birrefringência total dos tendões, por meio da microscopia de luz polarizada dos subgrupos: C e D.....	84
Figura 12. Imagens referentes às observações qualitativas da análise de birrefringência total dos tendões, por meio da microscopia de luz polarizada dos subgrupos E e F.....	85
Figura 13. Imagens referentes às observações qualitativas da análise de birrefringência total dos tendões, por meio da microscopia de luz polarizada dos subgrupos A e B.....	86
Figura 14. Imagens referentes às observações qualitativas da análise de birrefringência total dos tendões, por meio da microscopia de luz polarizada dos subgrupos C e D.....	87
Figura 15. Imagens referentes às observações qualitativas da análise de birrefringência total dos tendões, por meio da microscopia de luz polarizada dos subgrupos E e F.....	88

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	VII
2	REVISÃO DA LITERATURA .....	5
2.1	TECIDO TENDÍNEO .....	5
2.1.1	Definição .....	5
2.1.2	Arquitetura interna dos tendões .....	6
2.1.3	Tecido conjuntivo denso .....	7
2.1.4	Colágeno .....	7
2.2	TENDÃO CALCANEAR .....	9
2.2.1	Ruptura do tendão calcâneo .....	10
2.3	REPARO TENDÍNEO .....	11
2.3.1	Fase inflamatória e neoangiogênica (1 a 7 dias pós lesão) .....	13
2.3.2	Fase proliferativa (5 a 21 dias pós lesão) .....	15
2.3.3	Fase de remodelamento (21 a 360 dias pós lesão) .....	17
2.3.4	Cicatrização intrínscica e extrínscica do tecido tendíneo .....	19
2.3.5	Cicatrização intrínscica .....	19
2.3.6	Cicatrização extrínscica .....	20
2.3.7	Cicatrização intrínscica e extrínscica .....	20
2.4	LASER DE BAIXA POTÊNCIA: PRINCÍPIOS E GENERALIDADES .....	21
2.4.1	Histórico .....	21
2.4.2	Princípios físicos do laser .....	22
2.4.3	Tipos de laser .....	24
2.4.4	Características da luz laser .....	25
2.4.5	Parâmetros de irradiação laser .....	27
	Modo e tipo do feixe .....	35
2.4.6	Interação laser-tecido <sup>4</sup> .....	36
2.4.7	Efeitos do laser nos tecidos .....	39
2.4.8	Processo de biomodulação .....	42
2.4.9	Laser no reparo tendíneo .....	52
2.5	MICROSCOPIA DE POLARIZAÇÃO .....	58
2.5.1	Propriedades anisotrópicas ópticas .....	59
2.5.2	Birrefringência de materiais .....	60
3	OBJETIVOS .....	63
3.1	Geral .....	63
3.2	Específicos .....	63
4	MATERIAL E MÉTODOS .....	64
4.1	ANIMAIS EXPERIMENTAIS .....	64
4.2	MODELO EXPERIMENTAL .....	64
4.3	GRUPOS EXPERIMENTAIS .....	64
4.4	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....	66
4.4.1	Procedimento cirúrgico .....	66
4.4.2	Aparelho laser de baixa potência .....	68
4.4.3	Procedimento Experimental .....	69

4.5	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS E ANÁLISES DE DADOS.....	70
4.6	MEDIDAS DE BIRREFRINGÊNCIA .....	71
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	73
5	RESULTADOS.....	76
5.1	Análise Quantitativa.....	76
5.2	Análise Qualitativa.....	83
6	DISCUSSÃO .....	93
7	CONCLUSÕES .....	117
8	ANEXOS .....	118
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	126

## RESUMO

Várias técnicas terapêuticas são utilizadas para acelerar e/ou estimular o processo de reparo tendíneo, dentre elas a terapia laser de baixa potência (LLLT). Assim, este estudo teve por objetivo avaliar os efeitos do laser de baixa potência, aplicado a diferentes comprimentos de onda e diferentes densidades de energia sobre o processo de reparação tendínea no tendão calcâneo de rato. Foram utilizados 48 ratos machos, onde 40 animais foram lesados por uma tenotomia total unilateral feita por cisalhamento induzida na porção média do tendão calcâneo direito, os tendões não foram suturados após a incisão cirúrgica, somente a pele ao redor da incisão sofreu sutura. Os animais foram divididos aleatoriamente em 3 grupos experimentais homogêneos (1, 2 e 3), sendo que cada grupo foi subdividido em 2 subgrupos; o grupo 1 foi dividido em subgrupo A que recebeu tratamento com laser de 685 nm, 3 J/cm<sup>2</sup> e subgrupo B que recebeu tratamento laser 685 nm, 10 J/cm<sup>2</sup>; o grupo 2 foi dividido em subgrupo C que recebeu tratamento com laser de 830 nm, 3 J/cm<sup>2</sup> e subgrupo D cujo tratamento foi com laser de 830 nm, 10J/cm<sup>2</sup> e o grupo 3 que também foi dividido em subgrupo E (CL/PL) e F (CP) que foram classificados como controle lesado/tratamento placebo e controle padrão respectivamente. Foram utilizados os lasers de 685 nm e o diodo Ga-Al-As (830 nm), os parâmetros dosimétricos utilizados para ambos os lasers foram (15 mW, contínuo, densidade de potência de 5,4 W/cm<sup>2</sup> e doses de 3 J/cm<sup>2</sup> e 10 J/cm<sup>2</sup>), as aplicações foram feitas pontualmente a cada 24 horas, durante 12 dias consecutivos, irradiando-se transcutaneamente um único ponto sobre a região da lesão. Todos os animais foram sacrificados no 13º de P.O. e seus tendões foram retirados cirurgicamente e processados para a análise qualitativa e quantitativa realizadas por meio da microscopia de luz polarizada para se obter dados sobre o estado de concentração, agregação, orientação e deposição das fibras colágenas no local da tenotomia, foi utilizada medidas de birrefringência total tomadas no microscópio de luz polarizada. Posteriormente os tendões foram fotografados no microscópio de polarização para a análise histológica qualitativa do tecido. A análise estatística utilizada foi o teste não-paramétrico de comparações múltiplas para a comparação de todos os subgrupos dois a dois afim de detectar possíveis diferenças estatísticas. Os achados demonstraram por meio de diferenças de valores de OR (nm), correspondentes à birrefringência total, que as moléculas de colágeno presentes nos tendões em processo de reparação tecidual responderam a LLLT durante o período da coleta do material, provavelmente através do aumento da proliferação fibroblástica e síntese de colágeno. A reparação tendínea do subgrupo A tratado com laser de 685 nm e 3 J/cm<sup>2</sup> apresentou melhores resultados considerando o nível de organização, orientação, estado de agregação macromolecular e deposição das fibras colágenas no local da lesão, diferindo-se estatisticamente dos demais subgrupos, uma vez que este subgrupo apresentou valor de OR considerado estatisticamente maior que o OR dos demais subgrupos tratados com laser e o subgrupo controle lesado/tratamento placebo. Com base nos nossos resultados podemos concluir, nas condições que o nosso trabalho foi desenvolvido, que há diferenças na resposta organizacional do tecido tendíneo lesado e estimulado pela LLLT, há portanto uma relação de melhora do reparo tendíneo com a combinação dos parâmetros laser utilizados; neste caso houve aceleração do processo de reparação tendínea quando utilizou-se o laser de 685 nm e 3 J/cm<sup>2</sup>.

## ABSTRACT

A lot of therapeutic techniques are used to accelerate and/or stimulate the tendineous repair process, among this techniques we have the low level laser therapy (LLLT). Therefore, this study had the aim of evaluating the effects of LLLT, in different wavelengths and different densities energy, on the tendineous repair process of calcaneal tendon of mice. In this study was used 48 male mice. 40 animals were submitted to the unilateral total tenotomy induced in the middle portion of the right calcaneal tendon. The tendons weren't sutured after the surgery, just the skin around the surgery. The animals were randomized divided in 3 experimental groups (1, 2 and 3) and each group were divided in two subgroups. The subgroup A was treated with laser of 685 nm, 3 J/cm<sup>2</sup>, the subgroup B was treated with laser 685 nm, 10 J/cm<sup>2</sup>, the subgroup C was treated with 830 nm, 3 J/cm<sup>2</sup> and the subgroup D with laser 830 nm, 10J/cm<sup>2</sup>; the subgroups E and F were classifieds as injured control/placebo treatment and non-injured control. It was used the lasers 685 nm and diode GaAlAs (830 nm), the parameters used in both lasers were 15 mW, continuous, power density of 5,4 W/cm<sup>2</sup> and doses of 3 J/cm<sup>2</sup> and 10 J/cm<sup>2</sup>. The applications were made punctually in each 24 hours, during 12 consecutive days, in just one point on the injured lesion. All animals were killed on the 13<sup>o</sup> day after the surgery and the tendons were extracted cirurgically and prepared for qualitative and quantitative analysis carry out through of polarization microscopy for obtain data of state of concentration, aggregation, orientation and deposition of collagen fibers in the site of tenotomy, was used measures of total birefringence take in polarization microscopy. After, it was obtained a picture of each tendon in the polarization microscopy for the qualitative histologic analysis of the tissue. The data analysis were made using the non-parametric test of multiple comparations in order to compare the data of all subgroups. It was found through of difference of OR (nm) values corresponding for the total birefringence that the molecules of collagen of tendons in process of tissue repair answered to the LLLT during the period of data collection, probably through the increase in the fibroblastic proliferation and collagen synthesis. The tendinous repair of the subgroup A (685 nm, 3 J/cm<sup>2</sup>) showed the best result, considering the level of tissue organization, orientation, state of macromolecular aggregation and collagen deposition in the site of lesion. This subgroup was statistically different from the other subgroup, because it showed a higher OR value than the other subgroups treated with laser and the subgroup injured control/placebo treatment. We can conclude that, in the conditions our work was developed, there are different organizational answers in the injured tendineous tissue and treated with LLLT. Therefore, there is a relationship between the improvement in the tendineous repair and the laser parameters used. In this case there were an acceleration of the tendineous repair when used the laser 685 nm and the dose of 3 J/cm<sup>2</sup>.

## 1 INTRODUÇÃO

A reparação do tecido tendíneo tem início logo após a lesão. Esta passa por diferentes etapas de cicatrização, as quais por sua vez constam de diversos eventos ultraestruturais de reparo (ENWEMEKA, 1989). As fases da reparação tendínea incluem inflamação, proliferação (fibroplasia) e maturação ou remodelamento (STADLER et al., 2001).

A reparação de tendões tenotomizados pode levar semanas ou até meses para se completar, durante esse período normalmente o paciente é imobilizado para evitar uma reruptura, esse fato causa inúmeras complicações funcionais para o indivíduo retardando o processo de reabilitação (ENWEMEKA & REDDY, 2000).

A causa mais comum das rupturas tendíneas são os esforços excessivos que provocam microtraumas no tecido levando assim, a ruptura tendínea espontânea, principalmente no trabalho e em atividades esportivas (JÓZSA & KANNUS, 1997).

Fatores como fragilidade ligamentar, fraqueza muscular, discrepância de membros, redução da flexibilidade de tecidos moles, aumento da idade, obesidade dentre outros fatores, colaboram para o desenvolvimento das lesões tendíneas (JÓZSA & KANNUS, 1997).

A incidência dessas lesões é mais significativa nas mulheres do que nos homens. Isto está relacionado com o fato de que as mulheres estão atualmente mais interessadas na prática esportiva e em trabalhos que implicam em altas cargas tensionais em seus tendões (KANNUS et al., 1990, 1987). Fatores estruturais e funcionais também influenciam no aumento da incidência dessas lesões no sexo feminino (JÓZSA & KANNUS, 1997).

O uso do laser de baixa potência no reparo das lesões tendíneas vem sendo estudado por diversos pesquisadores (ENWEMEKA & REDDY, 2000; PARIZOTTO & BARANAUSKAS, 1998a; REDDY et al. 1998a; ENWEMEKA et al. 1992, 1990), pois uma vez lesado o tendão impossibilita a realização plena do movimento.

A radiação laser de baixa potência para fins terapêuticos e de pesquisa começou a ser utilizada nas décadas de 70 e 80 naquela época a luz laser já estava sendo utilizada de forma terapêutica, mesmo sem comprovação científica de seus reais efeitos. Os

primeiros trabalhos empregando a laserterapia de baixa potência foram executados pelo grupo do Prof. Endre Mester no início dos anos 70. Estes utilizaram o termo bioestimulação para descrever os efeitos fotobiológicos atribuídos a tal recurso, evidenciados inicialmente em experimentos *in vitro*, ao investigarem o comportamento celular após a irradiação com potências reduzidas, e posteriormente em experimentos conduzidos em animais *in vivo*, onde os pesquisadores observaram a aceleração da cicatrização de úlceras tórpidas, as quais se achavam resistentes aos tratamentos convencionais (LOW & REED, 2001; TÚNER & HODE, 1999; BAXTER, 1997).

Baseados nos estudos científicos esta modalidade terapêutica vem ganhando cada vez mais aceitação tanto no campo de pesquisa como na área clínica, o que reforça a importância de estudos bem controlados sobre seus reais efeitos e indicações.

O laser de baixa potência é um meio relativamente novo na área da fisioterapia, embora de ampla utilização. Este meio terapêutico vem sendo utilizado atualmente em muitos estudos laboratoriais e clínicos nas quais se tem investigado os efeitos do laser de baixa potência na modulação das funções celulares, na redução da dor e inflamação e sua influência no processo de cicatrização (BASFOR, 1995). Isto contribuiu de forma expressiva para aumentar o número de pesquisas “*in vitro*”, “*in vivo*”, e clínicas, nas quais são estudados os mais diversos processos biológicos em diferentes tipos de tecidos, tal como no processo de reparação tendínea.

Os mecanismos de ação e os efeitos produzidos a nível macroscópico por este tipo de radiação ainda não estão totalmente esclarecidos, visto que a interação da radiação laser de baixa potência com sistemas biológicos é melhor compreendida a nível celular, o que tem gerado muita discussão, principalmente porque vários dos estudos publicados reportam resultados contraditórios em relação aos parâmetros dosimétricos empregados como comprimento de onda, dose, potência, frequência de tratamento, entre outros (LAAKSO, et al., 1993a, 1993b). No entanto, segundo TÚNER & HODE (1999), BAXTER (1997), BASFOR (1995, 1989) e BECKERMAN et al. (1992), parte dos resultados conflitantes entre os diversos trabalhos pode ser explicada pelo fato da existência de eventuais falhas metodológicas, visto que a qualidade e o rigor científico das publicações são altamente variáveis, assim como devido a seleção equivocada por parte dos

pesquisadores dos parâmetros dosimétricos empregados. Porém, vários autores colocam que os efeitos positivos dos lasers de baixa potência no processo de reparação tecidual podem ser observados em muitos estudos bem controlados (ENWEMEKA et al., 2000; REDDY et al., 1998a; REDDY et al., 1997; GUM et al., 1997; STEHNO-BITTEL, 1997; ENWEMEKA, 1991; ENWEMEKA et al., 1990; ENWEMEKA, 1989; ENWEMEKA, 1988). Entretanto neste âmbito de pesquisa ainda falta definir parâmetros importantes, como a dose e a potência mais adequadas, assim como o tipo de laser mais efetivo no processo de reparo dos diferentes tecidos biológicos em condições fisiológicas especiais.

Segundo REDDY et al. (1998a), a fotoestimulação laser de baixa potência no tecido tendíneo promove aumento da síntese de ATP e ácidos nucleico intensificando assim a proliferação celular. Além disso, o laser estimula a produção de colágeno pelos fibroblastos aumentando a sua concentração no espaço extracelular.

Comparado com os estudos feitos em cicatrização cutânea, trabalhos sobre os efeitos do laser de baixa potência no reparo tendíneo ainda se encontram em processo de comprovação, porém vários estudos estão sendo vastamente explorados. Estes estudos demonstram que o laser de baixa potência parece influenciar de forma benéfica o curso do reparo das lesões tendíneas. Esse mecanismo ocorre através da aceleração do processo de cicatrização e na melhora da qualidade do reparo. Com isso o laser pode reduzir as sequelas da lesão tendínea e propiciar ao paciente um retorno mais rápido e eficaz as suas atividades funcionais (ENWEMEKA & REDDY, 2000).

McMEEKEN & STILLMAN (1993), realizaram um questionário com fisioterapeutas que utilizavam o tratamento laser de baixa potência em diversas desordens teciduais. Os autores concluíram que as lesões tendíneas estavam entre as mais tratadas com este tipo de tratamento seguidas por lesão ligamentar, processos dolorosos e lesões de tecidos moles.

No entanto, ainda existe grande dificuldade entre os clínicos em eleger qual comprimento de onda e dose do laser de baixa potência são mais eficazes para estimular o processo de reparação tendínea, pois na maioria dos serviços de atendimento fisioterápico os terapeutas contam com lasers vermelhos e infravermelhos em diversas doses para auxiliar nos seus tratamentos, dificultando assim a escolha do tipo de laser e dose mais

adequados para um determinado tecido biológico e patologia apresentada pelo paciente. Portanto, há claramente na literatura a necessidade da realização de novos estudos dentro desta linha de pesquisa, afim de esclarecer questões pendentes quanto aos mecanismos de ação de tal terapia, parâmetros dosimétricos adequados, assim como o tipo de laser e a dose mais indicada para a aceleração do reparo tendíneo.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 TECIDO TENDÍNEO**

#### **2.1.1 Definição**

Os tendões são estruturas anatômicas interpostas entre os músculos e ossos. Sua função é transmitir a força criada no músculo para os ossos tornando possível o movimento articular.

Tendões normais são brancos e brilhantes e possuem uma textura fibroelástica, mostrando grande resistência a cargas mecânicas (KHAN et al., 1999; JÓZSA & KANNUS, 1997; MCNEILLY et al., 1996; STOLINSKI, 1995; BIRK & TRELSTAD, 1986).

As fibras de colágeno são orientadas longitudinalmente, transversalmente e horizontalmente com fibrilas de colágeno longitudinais formando cordões espirais. Esta complexa estrutura promove ao tendão uma capacidade de equilibrar forças longitudinais, transversais, horizontais e rotacionais durante os movimentos e atividades (JÓZSA & KANNUS, 1997).

Contudo, a maioria das fibras são alinhadas em paralelo ao eixo longitudinal do tendão, para capacitar esta estrutura a resistir à forças unidirecionais e transmitir eficientemente essas forças geradas dos músculos para os ossos (CULAW et al., 1999).

Muitos tendões são circundados por um tecido conjuntivo frouxo chamado de paratendão que tem a função de permitir o livre movimento do tendão contra os tecidos circunvizinhos. Logo abaixo do paratendão uma fina bainha de tecido conjuntivo chamada de epitendão circunda o tendão. O endotendão circunda os feixes de colágeno mais internos do tendão (KHAN et al., 1999; JÓZSA & KANNUS, 1997; REYNOLDS & WORRELL, 1991).

### 2.1.2 Arquitetura interna dos tendões

De acordo com ENWEMEKA & SPIELHOLZ (1992), o tendão é constituído por fibroblastos e matriz extracelular, na qual estão imersas proteínas fibrosas de colágeno e elastina, proteoglicanas, glicoproteínas e mucopolissacarídeos. O colágeno é o maior componente da matriz extracelular, compreendendo cerca de 86% a 95% do peso úmido do tendão. A disposição das fibras colágenas no tendão é resultado do seu processo de maturação, sendo usualmente organizadas em fascículos de fibras que contém unidades menores denominadas fibrilas. As fibrilas de colágeno são longas e cristalinas, em tendões as fibrilas e fibras são altamente alinhadas. O desenvolvimento sistemático desta hierarquia é requerida para a integridade estrutural e função normal dos tendões (BIRK et al., 1997; BIRK & TRELSTAD, 1986).

Os fibroblastos também participam da organização do compartimento extracelular onde três níveis de organização da matriz são observados: fibrilas de colágeno, feixes de fibras e macroagregados que irão depender do tecido biológico específico (BIRK et al., 1989; BIRK & TRELSTAD, 1986).

A hidratação da matriz extracelular pode variar dependendo das proporções de ácido hialurônico e sulfato de condroitina. A capacidade das proteoglicanas e glicosaminoglicanas de se ligar às moléculas de água da matriz é importante para as propriedades biomecânicas do tendão de resistir às forças compressivas, além de promoverem estabilização do sistema colagenoso do tecido conjuntivo (JÓZSA & KANNUS, 1997).

### 2.1.3 Tecido conjuntivo denso

A matriz extracelular é estruturada por células (fibroblastos, macrófagos e mastócitos); fibras (colágeno e elastina) e proteoglicanas (TILLMAN & CUMMINGS, 1992a, b).

As características mecânicas do tecido conjuntivo como resistência à tensão, compressão, extensibilidade e torção, são determinados primariamente pela quantidade, tipo e arranjo da matriz extracelular, pela orientação das fibras e fibrilas, assim como pelo diâmetro e comprimento dessas fibrilas (CULAW et al., 1999; BIRK et al., 1997).

Variações no tipo e na concentração das macromoléculas da matriz extracelular podem determinar suas características funcionais. Além disso, a orientação das fibras tem uma importante função nas propriedades mecânicas dos tecidos, como também no estado de agregação ordenada do colágeno (VIDAL & CARVALHO, 1990).

Normalmente tecidos com alto conteúdo de fibras colágenas e baixa quantidade de proteoglicanas resiste a forças tensivas, já aqueles com grande quantidade de proteoglicanas combinado com uma rede de fibras colágenas resistem à compressão.

Traumas ou patologias podem alterar a morfologia normal do tecido conjuntivo levando a alterações biomecânicas importantes (CULAW et al., 1999).

### 2.1.4 Colágeno

As fibras colágenas são as mais abundantes no tecido conjuntivo, estas são constituídas por uma glicoproteína estrutural denominada colágeno, o qual tem sua composição de aminoácidos específica (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1990).

O colágeno é uma proteína que corresponde a 30% do peso corporal do homem. Ela participa da matriz extracelular dos animais multicelulares e é a mais abundante nos tecidos conjuntivos, cerca de 19 tipos distintos de colágeno foram encontrados, todos com características individuais que determinam as funções específicas dos diferentes tecidos (CULAW et al., 1999; PARIZOTTO, 1998).

Todas as moléculas de colágeno são longas e rígidas; constituídas de uma tríplice hélice de três cadeias de polipeptídeos chamadas de cadeias alfa. Os colágenos se distinguem uns dos outros por suas cadeias de polipeptídeos, propriedades físicas, morfologia, distribuição nos tecidos e funções. O colágeno tipo I constitui 90% do total de colágeno do corpo dos mamíferos e é encontrado com maior frequência nos tendões, ligamentos, cápsula dos órgãos, derme, dentina entre outros tecidos, este tipo de colágeno possui alta força tênsil com elasticidade limitada, além de boa capacidade para a transmissão de forças (CULAW et al., 1999; JÓZSA & KANNUS, 1997; PARKINSON et al., 1997; BIRK et al., 1989; MIMNI & HARKNESS, 1988).

O colágeno promove ao tendão uma grande força tênsil, enquanto que a substância fundamental fornece suporte para as fibras de colágeno regulando a estruturação extracelular das moléculas de procolágeno (KHAN et al., 1999).

O colágeno tipo I é sintetizado principalmente pelos fibroblastos, porém outras células como os macrófagos, os mastócitos e algumas células indiferenciadas originadas do tendão, epitendão e paratendão podem sintetizá-lo (CHAN et al., 1997; JÓZSA & KANNUS, 1997).

A biosíntese do colágeno é determinada por um conjunto de eventos ambos intracelular e extracelular. O fibroblasto sintetiza colágeno e outros componentes da matriz extracelular, portanto esta célula exerce um controle fino sobre a formação das fibrilas de colágeno e componentes da matriz extracelular (BIRK & TRELSTAD, 1986).

A formação do colágeno envolve a transcrição e a translação de genes similares a produção de outras proteínas, as cadeias alfas são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso dos fibroblastos, pela tradução de um RNAm, formando-se a molécula de tropocolágeno (estrutura composta por 3 cadeias de polipeptídeos enroladas em espiral formando uma tríplice hélice).

Cada cadeia longa de polipeptídeo é sintetizada com dois peptídeos de registro em cada extremidade, os quais terminam o alinhamento das cadeias protéicas para formar a molécula de colágeno (CULAW et al., 1999; SANTANDER, 1999; MIMNI & HARKNESS, 1988).

O que possibilita que o colágeno tenha características peculiares é a sua composição de aminoácidos; a cada três aminoácidos o terceiro é sempre glicina; a prolina e a hidroxiprolina aparecem em 20% dos aminoácidos da cadeia de colágeno (CULAW et al., 1999).

No colágeno tipo I, a tríplice hélice está constituída por duas cadeias  $\alpha$  (alfa) iguais, denominadas  $\alpha_1$  (alfa), e uma cadeia  $\alpha_2$  diferentes das demais em sua composição. As cadeias peptídicas se enrolam em hélice e são unidas entre si através de pontes de hidrogênio (VIDAL, 1987a).

No espaço extracelular as moléculas de colágeno são depositadas próximas à superfície dos fibroblastos, assim o conjunto de cinco moléculas são compactadas para formar a menor unidade de organização da fibra de colágeno; a microfibrila (JÓZSA & KANNUS, 1997).

Esta hierarquia reflete a alta organização da estrutura molecular do colágeno.

VIDAL (1995b), refere que a importância do auto-arranjo molecular transcende este amplo espectro biológico do campo da síntese da nanoestrutura do tendão. O auto-arranjo permanece e as fibras de colágeno formam feixes orientados em grupos, helicoidais ao eixo longitudinal do tendão, entretanto exibe vários graus de inclinação com relação ao eixo principal do colágeno, demonstrando uma distribuição helicoidal desta estrutura. Estes estudos reafirmam os achados de uma estrutura fibrilar encontrada nos estudos de VIDAL (1995a), onde o autor comprova a existência do *crimp* (organização estrutural com variação de orientação periódica) como sendo parte da estrutura helicoidal das fibras de colágeno.

## 2.2 TENDÃO CALCANEAR

O tendão calcanear inicia-se com a continuação do músculo gastrocnêmio e sóleo. Ele é extenso e largo perto de sua origem, tornando-se mais estreito e irregular distalmente; onde insere-se na porção médio-posterior do calcâneo através de uma rígida expansão fibrocartilaginosa.

Segundo ENWEMEKA (1989), o tendão calcâneo normal consiste de fibras colágenas orientadas no eixo longitudinal do tendão com poucos fibroblastos intercalados entre os feixes, algumas fibras de elastina também podem ser vistas entre os feixes de fibras colágenas.

O tendão calcâneo absorve forças no plano sagital (flexão plantar e dorsal) e no plano frontal (inversão e eversão), essas forças predominantemente de tensão criam estresses nas diferentes partes do tendão (JÓZSA & KANNUS, 1997).

No estado de repouso as fibras de colágeno mostram uma configuração ondulada, porém quando o tendão é estirado cerca de 2% de seu comprimento a morfologia das fibras é perdida (PLAPLER et al., 2001; JÓZSA & KANNUS, 1997; STOLINSKI, 1995; REYNOLDS & WORRELL, 1991).

Segundo ENWEMEKA et al. (1988), a força do tendão calcâneo de resistir a estiramentos é determinada pela densidade numérica, organização e arranjo das fibrilas dentro do tendão. O tendão calcâneo possui uma alta capacidade de resistir a grandes forças requeridas durante o suporte de peso e a locomoção.

### **2.2.1 Ruptura do tendão calcâneo**

Segundo Hipócrates citado por KURTZ (1996), em relação à ruptura do tendão calcâneo “se o tendão fosse lesado ou cortado, além de causar febre, induziria ao choque, desestruturaria a mente e em sua evolução acabaria trazendo a morte”.

Desde que foi descrito por Ambroise Paré em 1575 citado por CETTI (1993), a ruptura do tendão calcâneo tem recebido bastante atenção por vários pesquisadores. Esta atenção é baseada no fato de que a ruptura do tendão calcâneo além de ser uma lesão grave é uma das mais comuns dentre as lesões tendíneas (STHENO-BITTEL, 1998).

Segundo PUDDU (1976), em alguns casos de ruptura do tendão calcâneo há sintomas prévios à lesão como dor e rigidez, porém em outros os pacientes não apresentam nenhum sintoma que antecede à ruptura.

REYNOLDS & WORRELL (1991), relatam que a grande incidência das lesões do tendão calcâneo ocorre em esportes de alto impacto como a corrida e o salto, nessas atividades o tendão é bastante estressado durante a contração muscular excêntrica do gastrocnêmio e do sóleo.

Segundo SOMA & MANDELBAUM (1995), 75% de todas as rupturas do tendão calcâneo ocorrem em atletas com idades entre 30 e 40 anos. A maior frequência de ruptura ocorre nos futebolistas e com menor incidência nos tenistas e bailarinas (SALOMÃO et al., 1993).

Microtraumas repetitivos no tendão induzem a ruptura tendínea. O excesso de trabalho sobre o tecido tendíneo produzem uma reação inflamatória no tecido podendo levar este tendão a sofrer rupturas parciais ou totais (ALMEKINDERS & DEOL, 1999; STHENO-BITTEL, 1998; SOMA & MANDELBAUM, 1995).

A ruptura do tendão calcâneo normalmente é precedida por alterações degenerativas onde há redução do fluxo sanguíneo para o tendão com resultante hipóxia local. A alteração da nutrição e da atividade metabólica também predispõem a essas alterações (ALMEKINDERS & DEOL, 1999; SALOMÃO et al., 1993).

O envelhecimento promove mudanças biomecânicas importantes no tendão, o conteúdo de colágeno aumenta enquanto que a elastina e as proteoglicanas da matriz extracelular diminuem, terminando com perda da elasticidade do tecido, o conteúdo de água também declina agravando o quadro. A renovação do colágeno é reduzida com o avanço da idade retardando o processo de reparo (KANNUS & JÓZSA, 1991).

### **2.3 REPARO TENDÍNEO**

O processo de reparo tecidual é uma seqüência de eventos que envolvem diversas reações de um complexo processo biológico, cujo objetivo principal é o fechamento da lesão ou o reparo dos tecidos envolvidos (PARIZOTTO, 1998; JÓZSA & KANNUS, 1997).

Segundo CHAN et al. (1997), o reparo de tendões é similar a outros processos de reparação que ocorrem com outros tecidos biológicos. Na seqüência do reparo

há proliferação e migração de vários tipos de células, síntese de colágeno e angiogênese para a formação do tecido de granulação, e por fim, orientação das células do tendão e fibras de colágeno de maneira altamente organizada na tentativa de restaurar a estrutura e função do tendão lesado.

O tecido tendíneo possui baixa capacidade de regeneração devido a sua baixa vascularidade, oxigenação e nutrição, quando comparado, por exemplo, ao tecido muscular. Porém vários experimentos demonstraram que quando o tendão lesado é estimulado por métodos terapêuticos adequados este aumenta a sua capacidade de reparação (ENWEMEKA & REDDY, 2000; PARIZOTTO, 1998; REDDY et al., 1998a; GUM et al., 1997; ENWEMEKA, 1991; ENWEMEKA et al., 1990; ENWEMEKA, 1989).

Baseado nos estudos de JÓZSA & KANNUS, (1997), ROBBINS et al. (1994), ENWEMEKA & SPIELHOLZ, (1992), KUSCHNER et al. (1991), ENWEMEKA (1989), FLOREY (1958), o processo de reparação se dá em 3 fases distintas, porém sobrepostas:

- 1) Fase Inflamatória ou Exudativa Vascular;
- 2) Fase Proliferativa e Neoangiogênica;
- 3) Fase de Remodelamento.

No tecido tendíneo as duas últimas fases são essenciais para um adequado reparo tecidual onde haverá uma intensa proliferação celular (fibroblastos); síntese de fibrilas de colágeno e alinhamento das fibras no eixo longitudinal do tendão (ENWEMEKA, 1989).

### **2.3.1 Fase inflamatória ou exudativa vascular (1 a 7 dias pós lesão)**

A inflamação inicia-se imediatamente após a lesão, sendo uma resposta natural do organismo de responder ao trauma lesivo, ela é um pré-requisito para que o processo de reparo aconteça.

Com a lesão há ruptura dos vasos sanguíneos ocorrendo o extravasamento do sangue, plasma e fluidos teciduais para a área lesada (JÓZSA & KANNUS, 1997; GIGANTE, 1996).

Em poucas horas após a lesão ocorre alterações vasoativas que promovem a exsudação de fagócitos do sangue para as margens da lesão. A infiltração celular ocorre nas primeiras 24 horas e continua por poucos dias (JÓZSA & KANNUS, 1997; PEREIRA, 1994; REED & ZARRO, 1990).

Segundo GOGIA (1995), imediatamente após a lesão, fatores vasoativos como a norepinefrina e serotonina são secretados promovendo a vasoconstrição dentro dos primeiros 5 a 10 minutos.

Conjuntamente, as plaquetas agregam-se ao redor do endotélio dos vasos lesados e ao colágeno exposto liberando fosfolípidos que estimulam o mecanismo de coagulação. Fibrinas e fibronectinas formam ligações transversas com o colágeno, o que resulta em uma tênue estrutura que estanca a hemorragia local e funciona como resistência a forças de tensão durante a fase inicial de reparo (JÓZSA & KANNUS, 1997).

Por volta do 3º dia após lesão os fibroblastos iniciam a produção de fibrilas que se agregam ao acaso no espaço extracelular, isso de certa forma colabora para proteger o tecido tendíneo contra as forças aplicadas no início da cicatrização (ENWEMEKA et al., 1988).

A vasodilatação que se segue a vasoconstrição reflexa provoca um aumento no fluxo sanguíneo e da pressão hidrostática, com isso há aumento da permeabilidade vascular em resposta as reações químicas promovidas pela histamina que é liberada pelos mastócitos e plaquetas, e pela bradicinina que aumenta a permeabilidade vascular e estimula a liberação de prostaglandinas nas fases mais tardias da inflamação. As

prostaglandinas PGE-1 aumentam a permeabilidade vascular, já a PGE-2 atraem leucócitos (JÓZSA & KANNUS, 1997; REED & ZARRO, 1990).

Como consequência desse estágio inicial, o plasma é extravasado entrando em contato com o tecido lesado. Clinicamente observa-se ao redor da região lesada calor, rubor, dor e edema (REED & ZARRO, 1990).

Os leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos), são as primeiras células que migram para o sítio lesado, essas células se originam dos capilares ainda escoantes e iniciam a fagocitose de contaminantes e fragmentos produzidos pelo ferimento. Esse processo de migração e fagocitose permanece por 24 horas após a lesão (ENWEMEKA & SPIELHOLZ, 1992; ENWEMEKA, 1989).

Cerca de 1 a 2 dias após a lesão, os leucócitos mononucleares (monócitos) quando penetram no sítio lesado se transformam em macrófagos teciduais e juntos com os linfócitos dão continuidade a fagocitose (GOGIA, 1995; ENWEMEKA, 1989).

Segundo HIRANUMA (1996), há uma extensa infiltração por leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e fibroblastos que permanecem no tecido de granulação por 1 a 2 semanas após à lesão.

Os macrófagos teciduais estão presentes na maior parte da fase de reparo. Além de fagocitarem as hemácias extravasadas e os produtos da destruição tecidual que não foram solubilizados pelos neutrófilos, eles fagocitam os neutrófilos mortos restantes na área lesada.

A participação dos macrófagos é essencial no processo de reparo, pois além da fagocitose eles secretam fatores de crescimento e fibronectina, os quais promovem a quimiotaxia dos fibroblastos, fixação e migração destas células no local da lesão estimulando a sua proliferação. Além disso, macrófagos e fibroblastos interagem um com o outro regulando a fase inflamatória e o processo de remodelamento da matriz extracelular (KAKAR et al., 1998).

As células inflamatórias atuam principalmente para limpar a área lesada de tecido necrótico e microorganismos, quando esse objetivo é alcançado por volta do 5 ao 7 dia pós lesão, inicia-se então a fase proliferativa (JÓZSA & KANNUS, 1997).

Outro aspecto da fase inflamatória é a resposta imune à lesão, a qual é formada por linfócitos T e B, produzidos por tecidos linfóides, que irão destruir microorganismos e toxinas específicas. Os linfócitos B produzem as imunoglobulinas específicas (anticorpos), as quais agem através do sistema complemento, neutralizando ou destruindo os antígenos. Os linfócitos T, liberam linfocinas que atuam na rejeição dos órgãos transplantados e secretam a interleucina-2 que potencializa a ação dos linfócitos B (PARIZOTTO, 1998).

### **2.3.2 Fase proliferativa e neoangiogênica (5 a 21 dias pós lesão)**

A fase proliferativa inicia-se com o acúmulo de fibroblastos, miofibroblastos e células endoteliais na área lesada. A migração e a proliferação dessas células é estimulada por fatores de crescimento liberados pelas plaquetas e macrófagos teciduais (JÓZSA & KANNUS, 1997; PEREIRA, 1994).

A fibrilogênese tem início poucos dias após a lesão, essa etapa da cicatrização pode através de um sistema de realimentação apressar a automontagem das fibrilas dentro dos feixes de colágeno (ENWEMEKA et al., 1988).

Durante a fase de proliferação alguns fibroblastos adquirem características ultraestruturais, funcionais, imunológicas e químicas que os distinguem dos fibroblastos teciduais ativos esses fibroblastos diferenciados chamam-se miofibroblastos. Embora os miofibroblastos possuem a morfologia do fibroblasto, eles contêm grande quantidade de microfilamentos de actina e miosina em seu interior (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1990).

Os miofibroblastos são capazes de se contraírem e moverem, contribuindo para a contração da região cicatricial, além de secretarem grande variedade de moléculas como colágeno, fibronectina, elastina, ácido hialurônico, glicosaminoglicanas e mucopolissacarídeos (PARIZOTTO, 1998).

Durante esta fase os fibroblastos e miofibroblastos mostram uma extensa proliferação e síntese de matriz extracelular. A combinação de novos capilares sanguíneos, fibroblastos, miofibroblastos e matriz extracelular formada por colágeno (predominantemente colágeno tipo III), ácido hialurônico e moderada quantidade de

proteoglicanas dão origem a um tecido conjuntivo ricamente vascularizado que preenche a área lesada este tecido recebe o nome de tecido de granulação (JÓZSA & KANNUS, 1997; PEREIRA, 1994; ENWEMEKA & SPIELHOLZ, 1992).

O depósito de colágeno aumenta progressivamente com o tempo atingindo seu pico por volta do 14º dia após a lesão. Paralelamente começa a ocorrer redução da síntese de glicosaminoglicanas, especialmente de ácido hialurônico, neste período o colágeno tipo I começa a predominar sobre o tipo III. Há simultâneas degradações de colágeno, resultando em intenso remodelamento, com lise de algumas fibras, agregação e aumento de novas fibras (ENWEMEKA & SPIELHOLZ, 1992).

Com o processo de fibrilogênese, as fibras de colágeno se tornam progressivamente mais espessas e numerosas, as células fagocitárias vão desaparecendo e o tecido de granulação passa a ser constituído por um tecido conjuntivo progressivamente mais denso e menos vascularizado (ENWEMEKA, 1989).

O colágeno existente vai sendo remodelado progressivamente, há um aumento das ligações cruzadas intermoleculares, tornando o tecido mais resistente e organizado (ENWEMEKA & SPIELHOLZ, 1992).

De acordo com GIGANTE (1996), ENWEMEKA & SPIELHOLZ (1992), ENWEMEKA (1989), há um maior alinhamento das fibras de colágeno no eixo longitudinal do tendão após um período de 21 dias de reparo tecidual.

A carga mecânica imposta precocemente ao tecido acelera o alinhamento paralelo e a polimerização das fibrilas dentro das fibras de colágeno. Com isso, o processo de alinhamento fibrilar pode-se iniciar 4 a 5 dias após ruptura ou incisão tendínea (ENWEMEKA et al., 1988).

A neoangiogênese que ocorre na fase proliferativa inicia-se por anastomoses de capilares sanguíneos próximos à área lesada, esses por sua vez se projetam para o interior da lesão formando inúmeras ramificações e desenvolvendo uma rica rede vascular. A neovascularização é essencial para que o processo de reparação ocorra, pois ela garante um abundante suporte de O<sub>2</sub> e nutrientes para a área lesada, removendo o CO<sub>2</sub> e outros metabólicos (ENWEMEKA, 1989).

GELBERMAN (1985), observou o aparecimento de novos vasos sanguíneos em tendões lesados por volta do 7º dia após a lesão.

A angiogênese é promovida por vários elementos presentes no foco da lesão, incluindo prostaglandinas, fatores de crescimento macrofágico, leucócitos polimorfonucleares, linfócitos T e fator de crescimento epidermal (EGF) (ENWEMEKA & SPIELHOLZ, 1992).

O fator de crescimento básico dos fibroblastos (FGF $\beta$ ) é uma citocina que tem importante função na angiogênese, ele é secretado pelos fibroblastos, plaquetas e células inflamatórias do tendão (CHANG et al., 1998).

O fator de crescimento fibroblástico (FGF $\beta$  e FGF2) é envolvido na cicatrização por facilitar a migração e proliferação de células endoteliais na angiogênese, regular a proliferação de fibroblastos e a síntese de colágeno e induzir ativadores plasminogênicos e colagenases no remodelamento do tendão (CHAN et al., 1997).

### **2.3.3 Fase de remodelamento (21 a 360 dias pós lesão)**

Recentes estudos relatam que o processo de remodelamento se inicia por volta da 2ª semana de cicatrização e se estende por um período de 1 ano ou mais (JÓZSA & KANNUS, 1997; TILLMAN & CUMMINGS, 1992b), sendo este cerca de 30 semanas para uma tenotomia parcial (POSTACCHINI & DE MARTINO, 1980).

JÓZSA & KANNUS, (1997), acreditam que o tendão lesado leva cerca de 4 a 12 meses para alcançar uma boa força tensiva, porém os mesmos autores relatam que o tecido tendíneo lesado nunca conseguirá atingir a morfologia e função biomecânica de tendões normais.

Nesta fase a cicatriz contém fibras colágenas bem organizadas. Os fibroblastos possuem formas alongadas com algumas reentrâncias citoplasmáticas correndo entre os feixes de colágeno que agora se encontram organizados no eixo longitudinal do tendão (ENWEMEKA, 1989).

O tecido muda gradualmente de celular para fibroso, com grande quantidade de fibras colágenas. Há um aumento na força da cicatriz e um aumento da estabilidade das

ligações intermoleculares (JÓZSA & KANNUS, 1997; ENWEMEKA & SPIELHOLZ, 1992).

O aumento da resistência do tecido lesado decorre do remodelamento do colágeno, principalmente pelo aumento do colágeno tipo I e do aumento das ligações cruzadas entre as moléculas (JÓZSA & KANNUS, 1997; PEREIRA, 1994). A maturação do colágeno e o realinhamento linear são normalmente vistos por volta do 5º ao 6º mês após a lesão (JÓZSA & KANNUS, 1997).

Por volta de 60 dias, as fibras de colágeno tipo I são compactas e espessas. Quando a cicatriz encontra-se completamente matura cerca de 3% de seus elementos são celulares (fibroblastos, miofibroblastos, macrófagos) e o restante é colágeno (JÓZSA & KANNUS, 1997; ENWEMEKA & SPIELHOLZ, 1992).

Em um estudo feito por ENWEMEKA (1992a), tendões tenotomizados que foram submetidos à carga funcional no 5º dia pós-lesão, tiveram uma maior área de secção transversa em relação aos tendões controles que não foram submetidos à carga, isso ocorreu devido a maior quantidade de fibras colágenas organizadas no eixo longitudinal do tendão.

Portanto, é plausível afirmar que a carga funcional acelera a proliferação fibroblástica, a fibrilogênese e o remodelamento da matriz extracelular, já que existe uma forte correlação entre a força dos tendões e o número, tamanho e arranjo das fibras de colágeno (POSTACCHINI & DE MARTINO, 1980).

Segundo PARIZOTTO (1998), o processo de reparo tecidual ocorre como consequência da destruição produzida pela lesão. O organismo tenta realizar ações concatenadas no sentido de reconstituir a morfologia dos tecidos envolvidos e dar maior funcionalidade para estes tecidos. Normalmente há um equilíbrio entre a formação de colágeno e a sua degradação. Uma das formas de fornecer maior funcionalidade aos tecidos lesados é a recuperação ou a substituição por células do mesmo tipo que havia antes da lesão.

### 2.3.4 Cicatrização intrínscica e extrínscica do tecido tendíneo

Alguns autores acreditam que o tecido tendíneo cicatriza por regeneração celular promovida por células dos próprios cotos tendíneos (cicatrização intrínscica) (JÓZSA & KANNUS, 1997; GELBERMAN et al., 1985; LUNDBORG 1985; MANSKE et al., 1984; MANSKE & LESKER, 1984).

Outros pesquisadores afirmam que o tendão cicatriza pela atividade celular do tecido peritendinoso (cicatrização extrínscica) (KAKAR et al., 1998; Takasugi et al. citado por JÓZSA & KANNUS, 1997; Potenza, citado por JÓZSA & KANNUS, 1997).

Um terceiro grupo de estudiosos apóia a idéia de que o tendão cicatriza através de ambos os processos de reparo (cicatrização intrínscica e extrínscica) (RUSSELL & MANSKE 1990; LUNDBORG et al., 1985; MANSKE & LESKER, 1984).

### 2.3.5 Cicatrização intrínscica

A capacidade de cicatrização intrínscica de tendões em processo de reparo tem sido demonstrado em modelos *in vitro*, onde a fonte celular extrínscica, suprimento sanguíneo e fluido sinovial foram completamente excluídos (MANSKE & LESKER, 1984).

A fagocitose ocorre pela transformação dos fibroblastos do epitendão, enquanto que a síntese de colágeno é feita pelas células do epitendão e endotendão. Essas células migram em direção a região lesada para fazer a reparação (GELBERMAN et al., 1985).

GELBERMAN et al. (1985), relata a importância da vascularidade intratendínea no processo de reparo intrínscico.

LUNDBORG et al. (1985), demonstrou que o reparo intrínscico de tendões ocorre através da proliferação e síntese de colágeno tanto das camadas superficiais e profundas do tendão.

Um experimento feito com tendões flexores dilacerados transversalmente demonstrou a capacidade de cicatrização intrínscica desses tendões, onde houve ausência de

fontes celulares extrínscas e ausência de nutrição pela circulação sanguínea ou fluido sinovial. A cicatrização ocorreu pela diferenciação dos fibroblastos do epitendão, de onde eles migraram para o local da lesão fazendo a remoção das células mortas e fragmentos de colágeno, ao mesmo tempo que sintetizaram novos colágenos (MANSKE et al., 1984).

### **2.3.6 Cicatrização extrínscas**

Segundo Potenza, citado por JÓZSA & KANNUS, (1997), o tendão suturado e imobilizado foi reparado pelo crescimento do tecido de granulação derivado de estruturas vizinhas ao tendão.

Takasugi et al. citado por JÓZSA & KANNUS, (1997), relatam que o reparo tendíneo ocorre pelo tecido tenosinovial onde células fibroblásticas cobrem e cicatrizam a área lesada.

Segundo KAKAR et al. (1998), a ativação celular no processo de reparo tem se mostrado maior na bainha sinovial ou no epitendão externo ao tecido tendíneo, quando comparados com o endotendão. A produção de fatores de crescimento no tecido sinovial como o fator transformante de crescimento  $\beta$  (TGF $\beta$ -I), sugere que a sinóvia possui um papel dominante na iniciação e formação cicatricial do tendão no início do reparo.

O processo de cicatrização extrínscas consiste no espessamento e diferenciação das células do epitendão, migração celular e fagocitose pelos macrófagos com importante participação dos fibroblastos.

### **2.3.7 Cicatrização intrínscas e extrínscas**

De acordo com Lundborg & Rank, Manske & Lesker, citados por JÓZSA & KANNUS, (1997), quando a microcirculação intratendínea e o fluido sinovial são preservados pela combinação de técnicas de suturas adequadas e reconstrução da bainha sinovial, os próprios tenócitos promovem a cicatrização intrínscas. Porém, quando a nutrição tendínea é prejudicada por técnicas de suturas inadequadas ou ressecção da bainha sinovial mecanismos extrínscos promovem a cicatrização do tecido tendíneo.

Segundo RUSSELL & MANSKE (1990), a proliferação e migração das células do epitendão (externas), assim como a proliferação das células do endotendão (internas) são capazes de repararem o tendão lesado.

## 2.4 LASER DE BAIXA POTÊNCIA: PRINCÍPIOS E GENERALIDADES

### 2.4.1 Histórico

A palavra LASER é um acrônimo em inglês para “*light amplification by the stimulated emission of radiation*”, que significa “*amplificação da luz por emissão estimulada de radiação*”, sendo este o princípio em que se baseou sua criação. Esta designação compreende uma vasta série de dispositivos com emissão de radiação eletromagnética, possuindo diversas faixas espectrais desde o raio x, passando pelo ultravioleta, visível, infravermelho e microondas (LOW & REED, 2001; TÚNER & HODE, 1999; BAXTER, 1997; KITCHEN & BAZIN, 1996; COLLS, 1985).

O fenômeno físico da emissão estimulada de radiação foi postulado por Albert Einstein em 1916. Baseados neste princípio, em 1951, Townes, Gordon e Zeiger construíram um instrumento de amônia emitindo radiação na faixa do microondas, esse aparelho ficou conhecido como MASER ou amplificador de microondas por emissão estimulada de radiação, criando portanto, a possibilidade de se trabalhar na região visível de radiação (TUNER & HODE, 1999; BAXTER, 1997; KLOTH, 1997).

Em 1960, Theodore H. Maiman criou o primeiro laser de material sólido utilizando o cristal de rubi com comprimento de onda na faixa vermelha do espectro. Em meados dos anos 60, Javan, Bennett e Herriott construíram o laser de hélio-neônio (He-Ne), este laser se tornou a primeira fonte de luz coerente disponível comercialmente, recebendo o nome de *cold laser* ou *soft laser* (TÚNER & HODE, 1999; BAXTER, 1997; KITCHEN & BAZIN, 1996).

Após a descoberta do laser de Hélio-Neônio, surgiram vários interesses em produzir um laser com emissão na faixa infravermelha, porém esses aparelhos só apareceram no final da década de setenta com o surgimento dos lasers de arseneto de gálio

(Ga-As) e de arseneto de gálio alumínio (Ga-Al-As) (TUNER & HODE, 1999; BAXTER, 1997; OSHIRO, 1991).

Desde sua concepção, os lasers encontraram uma aplicação imediata na medicina, em especial na cirurgia oftálmica que utilizou o laser com sucesso no tratamento do deslocamento de retina em seres humanos. Até o momento quase todas as aplicações médicas tomavam por base os efeitos fototérmicos ou fotodestrutivos do laser, utilizando-o para cortar, coagular e destruir os tecidos, sendo esta modalidade conhecida como *high reactive-level laser treatment* ou *HLLT* (terapia laser de alta potência) (KARU, 2000; KLOTH, 1997; KITCHEN & BAZIN, 1996; OSHIRO & FUJINO, 1993).

Os trabalhos iniciais da terapia laser de baixa potência começaram no final da década de 60 e início dos anos 70 na Europa Oriental, sendo fortemente baseados nos estudos do Prof. Endre Mester, de Budapest, onde foram observados os efeitos da radiação laser de baixa potência na modulação dos processos biológicos. Desde então o laser tornou-se uma modalidade de tratamento popular, principalmente na União Soviética e na Europa Oriental (KITCHEN & BAZIN, 1996; BAXTER et al., 1991; BASFORD, 1989).

No ocidente, um dos primeiros trabalhos foi o do Dr. Friedrich Plog em 1973, que estudou o efeito do laser em pontos de acupuntura (BAXTER, 1997; KITCHEN & PARTRIDGE, 1991).

Posteriormente, o tratamento com laser recebeu o nome terapia laser de baixa potência do inglês *low reactive-level laser* ou *LLLT*, dado por Oshiro e Calderhead em 1988 (BAXTER, 1997; BASFORD, 1989).

A partir desse momento inicia-se a aplicação do laser de baixa potência em diversos tipos de lesão e modelos experimentais, obtendo assim mais conhecimentos sobre os efeitos fisiológicos, mecanismos de ação e aperfeiçoamento dos aparelhos.

#### **2.4.2 Princípios físicos do laser**

Os elétrons de um átomo existem como uma nuvem de cargas negativas ao redor do núcleo carregado positivamente. De acordo com a teoria quântica os elétrons

podem só ocupar níveis específicos de energia em torno do núcleo ou bandas de valência. Quando um átomo recebe energia adicional tornando-se excitado, os elétrons mais externos deslocam-se para órbitas energéticas superiores. Com o aumento crescente de energia um elétron pode receber energia suficiente para libertar-se da tração do núcleo. Porém, quando os elétrons externos se encontram em estados de energia elevados eles apresentam uma tendência natural para retornar a um estado mais baixo de energia, às vezes até o estado mais estável ou basal. Os elétrons que caem de volta para seus estados estáveis emitem a energia absorvida em excesso em forma de fótons de luz com numerosos comprimentos de onda que seguem uma trajetória ondulatória. Este princípio caracteriza a emissão espontânea de luz por fontes não-lasers (LOW & REED, 2001; BAXTER, 1997; KITCHEN & BAZIN, 1996).

A produção da radiação laser ocorre quando um átomo se encontra no seu estado excitado e seus elétrons podem retornar para níveis mais baixos de energia a partir da colisão com um fóton incidente, caracterizando a emissão estimulada de radiação. Neste caso, a energia quântica do fóton incidente deve ser exatamente igual à diferença nos níveis de energia entre os estados excitados e em repouso do elétron. Quando um elétron sofre um salto quântico e retorna para a sua órbita original este emite um fóton de luz exatamente com as mesmas características do fóton incidente. Um efeito de amplificação ocorrerá, gerando uma grande quantidade de fótons idênticos através da rápida excitação do meio (BAXTER, 1997; KLOTH, 1997; KITCHEN & BAZIN, 1996).

Cada etapa de um nível de energia para o próximo é chamado de transição, sendo que o comprimento de onda e a frequência do fóton emitido são determinados pela diferença de energia entre os níveis. A diferença entre os níveis mais elevados de energia ocupados pelos elétrons estimulados e os níveis basais determina a energia quântica emitida pelo fóton. A energia carregada por um fóton de luz é inversamente relacionada com o comprimento de onda, assim a diferença entre os níveis de energia ocupadas pelos elétrons estimulados determinam o comprimento de onda característico de cada fonte de luz, portanto quanto maior a diferença entre os níveis de energia, menor o comprimento de onda

e maior a energia quantal carregada pelos fótons da fonte estimulada (LOW & REED, 2001; BAXTER, 1997).

Pode ser feita uma analogia de que as radiações visíveis comuns (não coerentes) são como uma multidão de pessoas usando roupas diferentes, caminhando em direções diferentes e em velocidades diferentes. A radiação laser é como uma coluna de soldados, todos marchando no mesmo ritmo (em fase), na mesma direção (coerência espacial) e usando o mesmo uniforme (monocromaticidade) (LOW & REED, 2001).

### **2.4.3 Tipos de laser**

Como foi revisado anteriormente, a produção da radiação laser ocorre através de um elétron ou uma molécula que sofre um salto quântico quando previamente estimulado, passando assim de um alto a um baixo estado de energia, emitindo ondas na mesma frequência, comprimento de onda e direção, originando o feixe laser que em geral possui mais potência que outras radiações ópticas não modificadas ou estimuladas (KITCHEN & PARTRIDGE, 1991).

O tipo de laser é determinado pelo comprimento de onda e pelo meio ativo utilizado para produzi-lo. Vários meios como sólidos, líquidos e gases têm sido utilizados para produzir lasers com comprimentos de onda específicos, no entanto o princípio básico para a produção de um feixe laser é o mesmo para todos os meios (BAXTER, 1997; KLOTH, 1997; LAAKSO et al., 1993a; KITCHEN & PARTRIDGE, 1991).

Por ser uma radiação óptica, o laser faz parte do espectro eletromagnético, o intervalo espectral mais comumente utilizado na prática clínica e laboratorial do laser de baixa potência está entre os comprimentos de onda de 630 nm a 1300 nm. Este por sua vez, inclui a luz visível e a parte próxima do espectro infravermelho, que é chamada de "janela terapêutica" para tecidos biológicos (BAXTER, 1997; KITCHEN & PARTRIDGE, 1991).

O laser de hélio-neônio mais utilizado na prática clínica emite luz visível vermelha, com um comprimento de onda de 632,8 nm e potência limitada entre 30 mW e 50 mW, sendo este último valor raramente atingido. A penetração deste comprimento de

onda no tecido biológico para um tratamento de contato é de 6-8 mm a 3,5 mW de potência, e de 8-10 mm com 7 mW de potência. Este tipo de laser é altamente colimado, possuindo pouca divergência, porém produz um alto risco ocular (LOW & REED, 2001; TUNER & HODE, 1999; BAXTER, 1997; KITCHEN & BAZIN, 1996; LAAKSO et al., 1993b).

Os lasers de emissão infravermelho emitem comprimentos de onda a partir de 770 nm até 1300 nm. Esses lasers estão constituídos fundamentalmente pelo cristal de arseneto de gálio (Ga-As) e pelo arseneto de gálio alumínio (Ga-Al-As) (KLOTH, 1997; HERCH & TERESI, 1987; COLLS, 1985).

O primeiro geralmente emite comprimentos de onda de 904 nm, potência (pico) entre 10-15 W, opera na forma pulsada e atinge a profundidade de penetração de 30mm a 50mm dependendo do tipo de tecido. O laser de GaAlAs emite comprimentos de onda entre 780 nm e 870 nm na faixa infravermelha, sendo geralmente usados comprimentos de onda de 820 nm e 830 nm, potências pico entre 20 e 100 mW, pode fornecer uma saída contínua ou pulsada, atingindo seu pico de penetração ao redor de 2-3 cm (LOW & REED, 2001; LAAKSO et al., 1993b; HEUSSLER et al., 1993; TÚNER & HODE, 1999).

#### **2.4.4 Características da luz laser**

As características que identificam e diferenciam a luz laser de outras fontes luminosas são: a monocromaticidade, a coerência, a polarização e a colimação (LOW & REED, 2001; TÚNER & HODE, 1999; BAXTER, 1997; KITCHEN & BAZIN, 1996; KITCHEN & PARTRIDGE, 1991).

- *Monocromaticidade:*

A luz produzida por um feixe laser é monocromática, ou seja, têm uma só cor, com a maior parte da radiação emitida agrupando-se em torno de um único

comprimento de onda (LOW & REED, 2001; BAXTER, 1997; KITCHEN & BAZIN, 1996; LAAKSO et al., 1993a).

Esta característica é considerada o atributo mais importante da luz laser, pois determina quais biomoléculas absorverão a radiação incidente e, portanto, a interação fotobiológica e os efeitos terapêuticos específicos (BAXTER, 1997; KITCHEN & BAZIN, 1996).

- *Coerência;*

A radiação laser além de possuir um único comprimento de onda, possui a mesma fase, ou seja, os picos e as depressões dos campos elétricos e magnéticos ocorrem ao mesmo tempo (coerência temporal) e na mesma direção (coerência espacial) (LOW & REED, 2001; BAXTER, 1997).

- *Polarização;*

A polarização ocorre quando as ondas de luz estão orientadas num só plano, linear ou circular, de tal modo que as vibrações em seus campos elétricos acontecem numa única direção. Esta propriedade por sua vez caracteriza a emissão de fótons unidirecionais e paralelos entre si (TÚNER & HODE, 1999; BAXTER, 1997).

RIBEIRO et al. (1998), reportam que a polarização do feixe laser aumenta a produção de colágeno pelos fibroblastos contribuindo desta forma para o processo de cicatrização.

Há dúvidas se todas as características são necessárias para produzir uma reação fotobiológica em um organismo ou se a monocromaticidade somente é suficiente para produzir tais reações (LAAKSO, et al., 1993a). No entanto, existem autores que consideram a coerência, a monocromaticidade e a polarização importantes para os efeitos positivos observados nos tecidos vivos, pois são justamente estas características que garantem a resposta fotobiológica dos tecidos a luz laser (VAN DER VEM et al., 1998; OSHIRO, 1991).

Segundo KARU (1987), para se conseguir o efeito fisiológico desejado não importa se a luz é coerente ou não, pois ambas têm demonstrado ser igualmente efetivas.

KARU (1987) e BAXTER (1997), relatam que os efeitos coerentes da luz ocorrem acima das intensidades normalmente utilizadas na prática clínica ( $10$  a  $10^2$  W/m<sup>2</sup>). Portanto sob condições normais a absorção da luz é de caráter puramente não coerente, sendo perdida nos primeiros micrômetros da superfície da pele.

Porém, LABBE et al. (1990), ao verificarem eventos bioquímicos como resposta da radiação laser em fibroblastos, sugerem que os citocromos da cadeia respiratória mitocondrial, absorvem luz dentro de um limite espectral descrito como bioestimulante. Em alguns casos, as absorbâncias são muito baixas, o que justifica a necessidade da utilização de luz coerente e altos valores de potência para se obter um efeito estimulante de produção de ATP.

TÚNER & HODE (1999), consideram que a coerência é diminuída no caso de reflexão difusa, porém nunca chega a zero. A luz não coerente é menos eficiente, atuando provavelmente apenas em estruturas mais superficiais.

- *Colimação;*

Devido à coerência espacial, o feixe laser se mantém paralelo, inexistindo praticamente qualquer divergência da radiação emitida ao longo da distância percorrida. O alto grau de paralelismo do feixe mantém uma área pequena de saída. Esta característica é fortemente responsável pelos perigos oculares gerados pelo laser (LOW & REED, 2001; TÚNER & HODE, 1999; BAXTER, 1997).

#### **2.4.5 Parâmetros de irradiação laser**

Os parâmetros que descrevem a luz laser são o comprimento de onda, a potência útil, a densidade de potência ou irradiância, a densidade de energia ou fluência, modo e tipo do feixe e a frequência de tratamento (LOW & REED, 2001; TÚNER & HODE, 1999; BAXTER, 1997; KITCHEN & BAZIN, 1996; LAAKSO et al., 1993a., 1993b., KITCHEN & PARTRIDGE, 1991).

### *Comprimento de onda ( $\lambda$ )*

É definida como a distância que separa duas cristas ou dois valores consecutivos de ondas (MAILLET, 1987). A unidade usual deste parâmetro é o nanômetro (nm), uma fração do metro.

Alguns autores consideram que o comprimento de onda é o fator determinante para os efeitos fisiológicos produzidos pela terapia laser. Pois, a especificidade de absorção para um determinado comprimento de onda determina quais os tipos de tecido que irão absorver preferencialmente a radiação incidente, e por sua vez a profundidade de penetração da mesma (SROKA et al., 1999; BAXTER, 1997; KITCHEN & BAZIN, 1996; LAAKSO et al., 1993a).

A máxima estimulação de macrófagos foi obtida com luz não coerente de 660 nm, luz coerente e polarizada de 820 nm e luz não coerente de 870 nm, com esta última gerando menor grau de estimulação. Em oposição, a luz não coerente de 880 nm teve um efeito inibitório sobre a proliferação de fibroblastos. Assim, este processo foi dependente do comprimento de onda (YOUNG et al., 1989).

Segundo KARU (1998), os comprimentos de onda ideais estão próximos a 760 nm e de 810 nm a 840 nm, pois nestas faixas do espectro eletromagnético os cromóforos superficiais têm uma fraca absorção havendo portanto, uma penetração na pele.

Segundo LAAKSO et al. (1993b), é consenso que comprimentos de onda mais curtos dentro da faixa visível são mais indicados para o tratamento de lesões superficiais, enquanto que comprimentos mais longos na faixa do infravermelho próximo são eficazes para o tratamento de lesões mais profundas.

### ***Potência útil (P)***

É a energia emitida em um segundo, medida em joules por segundo, ou seja, em watts (1 W = 1 J/s) ou miliWatts (1 mW = 0,001 W) (BAXTER, 1997; KLOTH, 1997).

$$P (W) = \frac{E (J)}{t (s)}$$

Normalmente este parâmetro é fixo e invariável, embora alguns aparelhos permitam que o operador selecione a porcentagem, além de oferecer a opção de pulsação da potência útil (KITCHEN & BAZIN, 1996).

Os lasers terapêuticos operam em potência de saída ou potência radiante inferior a 1 W, porém este parâmetro não é considerado por alguns autores tão importante para avaliar o potencial biológico e os efeitos clínicos do laser (BAXTER, 1997). No entanto, TUNER & HODE (1999), afirmam que através de uma alta potência de saída é possível obter-se uma alta densidade de potência.

Segundo Trelles & Mayayo, citado por TUNER & HODE (1999), os efeitos do laser de Hélio-Neônio sobre o recrutamento de mastócitos foram mais rápidos a 50 mW do que a 4 mW, sendo os dois grupos irradiados a 2,4 J/cm<sup>2</sup> concluindo portanto, que lasers com potências mais elevadas, onde a dose pode ser aplicada em tempo mais curto podem ser mais eficientes na promoção de respostas biológicas favoráveis.

Dois lasers com a mesma potência, porém com áreas de feixes diferentes, podem ter efeitos similares com tempos de aplicações diferentes e deposição de energia diferentes (LONGO, 1993).

OSHIRO (1991), observou que potências inferiores a 60 mW em comprimentos de onda entre 790 nm e 904 nm diminuiram a dor de maneira efetiva e a reação microvascular. Porém a 100 mW, foram observados efeitos quase termais como exacerbação do quadro algico, espasmo muscular involuntário e síncope nervosa.

VAN BREUGHEL (1992), em um estudo sobre os efeitos do laser He-Ne sobre culturas de fibroblastos humanos, evidenciou que o tratamento com 40 mW por 10 segundos foi mais eficiente do que 10 mW usados por 40 segundos, ambos com dose no mesmo valor. Porém, não existem dados conclusivos a respeito da potência ideal a ser usada o que gera muitas especulações sobre este parâmetro.

### ***Densidade potência***

A densidade de potência ou irradiância é a potência de saída da luz por área de irradiação é dada em  $\text{mW/cm}^2$  ou  $\text{W/cm}^2$ . Normalmente, na prática clínica e laboratorial a densidade de potência não ultrapassa  $50 \text{ mW/cm}^2$  (BAXTER, 1997; KLOTH, 1997; KITCHEN & PARTRIDGE, 1991).

$$\text{Densidade de potência (W/cm}^2\text{)} = \frac{\text{Potência radiante}}{\text{Área de irradiação (cm}^2\text{)}}$$

$$\text{Área de irradiação (cm}^2\text{)}$$

Em experimentos com culturas celulares este parâmetro é considerado o mais importante, inclusive mais do que a dose total (KARU, 1998).

No entanto, segundo SCHAFFER et al. (1997), as densidades de potência de  $10 \text{ mW/cm}^2$  e  $150 \text{ mW/cm}^2$  não influenciaram a taxa de proliferação de várias culturas celulares após a irradiação com laser de 805 nm.

Na técnica de tratamento de contato, onde as unidades de tratamento são firmemente pressionadas contra o tecido alvo, a área de irradiação corresponde à área de secção transversa do aplicador da fibra óptica. Em tratamentos onde a fibra não esta em contato com o tecido, a área de irradiação será portanto, maior o que determina um número relativamente menor de fótons por unidade de área para a mesma potência, ou seja, a densidade de potência ou irradiância diminuirá com o aumento da distância entre o aplicador e o tecido alvo a ser irradiado (BAXTER, 1997; LONGO, 1993).

Trelles et al., citado por LAAKSO et al. (1993b), afirmam que altas densidades de potência com tempos curtos de irradiação podem ser mais eficazes na promoção dos efeitos da LLLT. TÚNER & HODE (1999), relatam que a literatura suporta a hipótese de que maiores densidades de potência, obtidas com o uso de elevadas potências de saída produzem melhores efeitos clínicos.

### ***Densidade de energia (Fluência ou Dose)***

A fluência ou densidade de energia ou dose é a energia total transmitida por um feixe laser por unidade de área e é dada em  $J/m^2$  (sistema MKS) ou  $J/cm^2$  no caso da fisioterapia ou nas aplicações biomédicas. A energia fornecida em Joules (J) é calculada através da multiplicação da potência de saída em Watts (W), pelo tempo de irradiação ou aplicação em segundos (s) (TÚNER & HODE, 1999; BAXTER, 1997; KITCHEN & BAZIN, 1996; KITCHEN & PARTRIDGE, 1991).

$$\text{Densidade de Energia (J/cm}^2\text{)} = \frac{\text{Potência (W)} \times \text{tempo (s)}}{\text{Área de irradiação (cm}^2\text{)}}$$

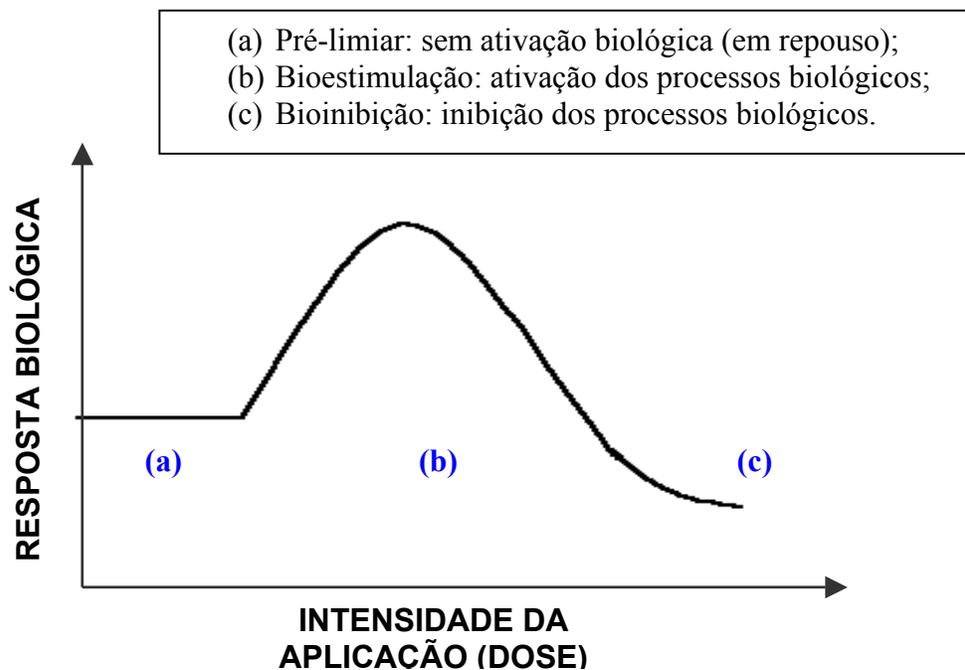
A dosimetria ótima para a laserterapia de baixa potência ainda permanece controversa. O cálculo preciso e o registro das doses para todas as aplicações é fundamental, de forma que os tratamentos possam ser aplicados com segurança (SANDOVAL-ORTIZ et al., 2001; BAXTER, 1997).

A dose ideal de radiação depende da distância entre a pele e o aparelho laser, do tamanho da área irradiada, do sistema óptico do aparelho (sistemas de lentes ou espelhos), do tipo de fonte laser utilizada, da saída de potência, do tempo de irradiação, da divergência do feixe, assim como, da reflexão, transmissão, dispersão, absorção e profundidade do tecido tratado (BAXTER, 1997; BECKERMAN et al., 1992).

Há autores que consideram que a resposta fisiológica é dose-dependente, conceito este que foi conferido em alguns trabalhos (FREITAS et al., 2000; SAITO &

SHIMIZU, 1997; MESTER et al., 1985). Seguindo esse preceito, LONGO & MESTER (1998), afirmam que cada laser pode estimular ou inibir as várias fases da cicatrização dependendo da dosagem empregada.

Considera-se que haja uma “janela terapêutica” para uma fotoestimulação efetiva, acima de um limiar, porém abaixo de um nível que cause inibição. Este conceito, descrito como Lei de Arndt-Schultz, tem sido invocado para tentar explicar os resultados conflitantes dos estudos sobre a LLLT. A lei prediz a existência de um efeito dose-dependente, representado por uma curva dose *versus* resposta (Figura 1) (LOW & REED, 2001; LONGO & MESTER, 1998; BAXTER, 1997; KLOTH, 1997; KITCHEN & BAZIN, 1996; TIPHLOVA & KARU, 1987).



**Figura 1:** Representação esquemática da Lei de Arndt-Schultz

KARU (1998, 1987), concluiu em seus estudos *in vitro*, pela avaliação do crescimento celular, que na maioria das curvas dose-resposta normalmente aparecia um limiar, um máximo e uma fase de declive, apresentando portanto uma dependência da dose. Porém, este formato de resposta não aparecia em todos os casos estudados, já que apresentavam-se uma segunda fase, observada nas culturas, que dependia do tempo de exposição.

KARU (1987), reporta que baixas doses regulam ou aceleram o transporte de elétrons da cadeia respiratória mitocondrial, enquanto que doses elevadas causam danos nesses transportadores da cadeia mitocondrial.

Desde os anos 60, o grupo do Prof. Mester, estabeleceu a dose de  $1 \text{ J/cm}^2$  como parâmetro ótimo para a cicatrização de feridas. Dez anos mais tarde surgiram pesquisas relatando que a dose de  $4 \text{ J/cm}^2$  seria ideal para o processo de reparo, desde então, vários pesquisadores utilizam estas doses como ideais para estimular o processo de cicatrização dos diversos tecidos (TÚNER & HODE, 1999).

KUBASOVA et al. (1984) referem-se à saturação dos efeitos bioestimulantes produzidos pela luz polarizada ocorrendo a  $4 \text{ J/cm}^2$ , onde as células encontram-se incapacitadas para absorver mais energia acima deste nível, o que provavelmente produziria efeitos inibitórios.

MESTER et al. (1985), relatam em um artigo de revisão os vários experimentos feitos pelo grupo sobre os efeitos da LLLT. Os autores evidenciaram que a fagocitose bacteriana por leucócitos foi aumentada pela radiação com laser rubi a  $0,05 \text{ J/cm}^2$  e inibida nos valores de  $2-4 \text{ J/cm}^2$ , eles também afirmaram que pequenas doses aplicadas em curto período de tempo resultavam em um efeito inibitório acumulativo. Além disso, a atividade da catalase em leucócitos submetidos a radiação laser em diversos valores de densidade de energia também foi investigado. Os autores evidenciaram que houve um aumento a partir da dose de  $0,05 \text{ J/cm}^2$ , elevando-se com  $5 \text{ J/cm}^2$  e diminuindo com  $50 \text{ J/cm}^2$ . Em outro experimento feito com úlceras e demais feridas abertas, houve bons resultados ao tratá-las com laser He-Ne (632 nm, 50 mW) e laser argônio (488 nm, 100 mW), na dose de  $4 \text{ J/cm}^2$ , duas vezes por semana, num total de 12-16 semanas. Ao

avaliarem o efeito do laser de rubi sobre a micromotilidade da mucosa intestinal, por atividade ganglionar *in situ*, evidenciaram que doses menores que  $1-3 \text{ J/cm}^2$  aumentaram o movimento das vilosidades intestinais, enquanto que doses maiores inibiram e até deprimiram a motilidade, este fato foi evidenciado na dose de  $7 \text{ J/cm}^2$ , onde sinais de destruição foram visíveis.

LABBE et al. (1990), observaram uma maior produção de hidroxiprolina em cultura de fibroblastos na dose de  $0,005 \text{ J/cm}^2$  e  $0,007 \text{ J/cm}^2$  de laser de As-Ga (904 nm), quando comparado com a cultura controle não irradiada.

A proliferação de células normais foi observada após a irradiação com laser de 805 nm na dose de  $4 \text{ J/cm}^2$ , onde este efeito foi suprimido quando as células foram irradiadas a  $20 \text{ J/cm}^2$  (SCHAFFER et al., 1997).

PARIZOTTO & BARANAUSKAS (1998a), evidenciaram uma melhor evolução no reparo tendíneo em ratos nos grupos irradiados com laser He-Ne (632,8 nm), sendo que a dose de  $5 \text{ J/cm}^2$  intensificou esta resposta comparado a dose de  $50 \text{ J/cm}^2$ .

Em experimentos realizados com monocamadas celulares, as doses ótimas nas regiões vermelha e infravermelha distante do espectro, foram encontradas em torno de  $10^2 \text{ J/m}^2$ . Porém, a aplicação sobre estruturas mais complexas como nos tecidos biológicos, há muita perda pela reflexão e dispersão. Devido a isso, KARU (1998), sugere o uso de doses aproximadamente 400 vezes mais altas para o tratamento desses tecidos.

A experiência norte-americana sugere que a dose total em uma sessão de tratamento não deve ultrapassar  $8 \text{ J/cm}^2$  a  $9 \text{ J/cm}^2$  (LAAKSO, 1993b).

Deve-se lembrar também que os efeitos da exposição à terapia laser são cumulativos, como tem sugerido vários autores (OSHIRO, 1991; GOLDMAN et al., 1980).

A efetividade clínica da terapia laser esta intimamente relacionada com as doses energéticas adequadas, aplicadas corretamente e usadas gradual e regularmente. Pois, doses baixas ou ainda sobredosificação podem não produzir efeitos ou ainda gerar prejuízos (KARU, 1989).

### **Modo e tipo do feixe**

Estes parâmetros vão depender da fonte e da configuração do sistema de produção da radiação laser. Nos aparelhos de onda contínua (CW), normalmente a potência útil não varia com o tempo, enquanto que no aparelho pulsado há uma variação. Nos lasers pulsados, a potência média temporal, que depende do comprimento e frequência do pulso, precisa ser diferenciada do pico de potência temporal, equivalente a cada pulso. Os pulsos individuais muito curtos podem ter alguns poucos Watts, no entanto sua potência média será em miliWatts. Em alguns equipamentos a saída média da potência é sempre a mesma, isso se dá quando se ajusta a duração do pulso de modo que frequências baixas tenham comprimentos de pulso longos e altas frequências tenham comprimentos de pulso mais curtos (LOW & REED, 2001; BAXTER, 1997; KITCHEN & BAZIN, 1996).

A frequência de repetição do pulso é expressa em Hertz (Hz – pulsos por segundo). As taxas de repetição dos pulsos variam de 2 Hz a 500 Hz. Apesar da baixa potência média dos lasers terapêuticos, a potência de pico do laser pulsátil pode ser alta, atingindo a ordem de Watts (W) ou superior a miliWatts (mW). Atualmente vários estudos vem sendo realizados para controlar este parâmetro que é considerado crítico, no entanto não há evidências comprovando que a emissão pulsada comparada a emissão contínua produza resultados terapêuticos mais satisfatórios (BAXTER, 1997; KITCHEN & BAZIN, 1996; LAAKSO et al., 1993b; KITCHEN & PARTRIDGE, 1991).

Os resultados de alguns trabalhos mostram que a duração e frequência do pulso são parâmetros importantes da irradiação laser (KARU et al., 1990).

KARU (1998), realizou um experimento com laser contínuo e pulsado na mesma dose e comprimento de onda, foi encontrado que o laser contínuo não apresentou mudança significativa no modelo utilizado, no entanto, o laser pulsado gerou efeitos inibitórios que foram dependentes da duração e taxa de repetição do pulso e do intervalo interpulsátil.

### ***Freqüência de tratamento***

Sobre a freqüência ideal de tratamento ainda não existe um consenso, no entanto, KARU (1989) e MESTER et al. (1985), consideram que um tratamento a cada dois dias ou duas vezes por semana seria o protocolo ideal. Porém há autores que usam uma freqüência diária de tratamento (Hallman et al., citado por LAAKSO et al., 1993b).

Estudos sugerem que baixas doses de irradiação repetidas durante um intervalo semanal produzem melhores efeitos comparados com altas doses de energia aplicadas em curto período de tempo (SIMUNIVIC et al., 1998; SIMUNOVIC, 1996).

A irradiação simples em cultura de fibroblastos embrionários feita com laser de Hélio-Neônio a  $1 \text{ J/cm}^2$  não causou mudanças nas superfícies celulares, porém quando estas células foram irradiadas 4 vezes a cada 24 horas com a mesma dose, mudanças funcionais em suas membranas foram observadas (KUBASOVA et al., 1984).

### **2.4.6 Interação laser-tecido**

Os efeitos da radiação laser com a matéria são os mesmos de qualquer outra radiação eletromagnética equivalente ocorrendo os eventos de reflexão, refração, dispersão e absorção (LOW & REED, 2001; KLOTH, 1997; LAAKSO et al., 1993a; 1993b; KITCHEN & PARTRIDGE, 1991).

A primeira interação da luz com a pele acontece na superfície do estrato córneo, onde cerca de 5 a 7% de radiação incidente é refletida (PARRISH & DEUTSCH, 1984). A aplicação em contato perpendicular do aparelho laser com a superfície da pele durante a irradiação aumentará a profundidade de penetração devido a redução da reflexão e dispersão (BAXTER, 1997; LAAKSO et al., 1993b; GREATHOUSE et al., 1985).

Cerca de 93% a 97% da radiação que penetra nos substratos subseqüentes passa a ser dispersada por reflexão interna, refração, divergência e ainda atenuada por absorção. A reflexão interna múltipla pode acontecer como resultado da não homogeneidade da pele e dos tecidos profundos. Além disso, a grande variabilidade nos

índices refrativos dos componentes teciduais promove mudanças na direção de propagação do feixe, provocando um alargamento do mesmo durante sua passagem através do tecido irradiado, isso resulta por fim em uma rápida perda da coerência (LOW & REED, 2001; KITCHEN & BAZIN, 1996; LAAKSO et al., 1993b; GONZÁLES & COLLS, 1988). Assim, o grau relativo de absorção e dispersão é dependente do tipo de tecido através do qual a luz está passando, assim como do comprimento de onda da luz incidente (BAXTER, 1997; KLOTH, 1997).

Ao passo que a luz é absorvida e dispersada pelos tecidos do corpo, há uma redução no efeito da radiação em proporção direta a sua penetração, atenuando a luz a diferentes frequências e em diferentes graus. Portanto, a penetração da luz nos tecidos é determinada principalmente pelo comprimento de onda e secundariamente pela potência, assim como pelos fenômenos de dispersão e de absorção (TUNER & HODE, 1999; BAXTER, 1997; LAAKSO et al., 1993b; KITCHEN & PARTRIDGE, 1991; OSHIRO, 1991).

A penetração da luz nos tecidos também é influenciada pela complexa estrutura e geometria tecidual, assim como pela variabilidade de suas propriedades ópticas (BAXTER, 1997).

Apesar disso, a extensão da ação fotoquímica permite atuar indiretamente afetando estruturas profundas como a 5 cm. Os processos químicos podem ser iniciados nos níveis mais superficiais, ampliando esses efeitos para níveis mais profundos e até a níveis sistêmicos (LAAKSO et al., 1993b; KITCHEN & PARTRIDGE, 1991).

A especificidade das biomoléculas absorventes também afeta a penetração e absorção do feixe laser incidente, visto que estas, diferenciam-se umas das outras quanto ao seu espectro de absorção, ou seja, os comprimentos de onda que podem absorver. Acredita-se que o pico de penetração no tecido biológico ocorra no intervalo do infravermelho próximo, entre os comprimentos de onda de 600 nm a 1200 nm, isso ocorre pela fraca absorção pela água. Pois, na interação laser-tecido a absorção da radiação pela água predomina na faixa do infravermelho, para comprimentos de onda maiores que 1200 nm, e na faixa do ultravioleta, para comprimentos de onda menores que 200 nm. Por outro lado,

na faixa visível e ultravioleta próximo, a água pode ser considerada transparente para todas as aplicações práticas de interação laser-tecido. Nesta porção do espectro, junto com a faixa espectral do infravermelho próximo, a absorção é realizada pelas moléculas orgânicas fotorreceptoras, onde se evidencia que a luz visível com comprimentos de onda entre 400 nm e 700 nm é fortemente absorvida pela melanina, hemoglobina e mioglobina (BAXTER, 1997; LAAKSO et al., 1993a).

Considera-se que o pico de penetração no tecido ocorra dentro do limite infravermelho, entre os comprimentos de onda de 700 nm a 1200 nm. Estudos sugerem que possa haver uma janela de penetração ótima entre os comprimentos de onda de 820 nm e 840 nm devido a fraca absorção pela água dentro desse intervalo espectral (LAAKSO et al., 1993a). Segundo KARU (1998), os comprimentos de onda ideais estão próximos de 760 nm e de 810 nm a 840 nm, visto que neste intervalo espectral os cromóforos superficiais da pele possuem uma fraca absorção, permitindo assim, uma máxima penetração da luz.

Assim, se um laser tiver boa absorção nas camadas superficiais ele não penetrará profundamente. Comprimentos de onda curtos (na faixa visível) dispersam mais do que comprimentos longos e penetram menos profundamente. Portanto, se o laser tiver boa absorção inicial ele não penetrará profundamente, enquanto que se apresentar penetração profunda, como nos casos dos comprimentos longos na faixa do infravermelho, sua energia será distintamente absorvida pelas estruturas superficiais (STOLIK et al., 2000; LAAKSO et al., 1993a; 1993b).

Portanto, comprimentos de onda no intervalo do vermelho podem ser, mais indicados para o tratamento de lesões superficiais e comprimentos de onda no intervalo infravermelho próximo, podem ser mais utilizados para o tratamento de lesões profundas (LAAKSO et al., 1993b).

Segundo KARU (1998), mais importante que a alta monocromaticidade da luz, é o comprimento da onda que deve estar no espectro de absorção da molécula fotorreceptora, o qual tem mostrado possuir uma estreita faixa de absorção para um determinado intervalo espectral.

A penetração e a absorção da radiação laser também podem ser afetados pela potência de saída dos aparelhos laser, visto que, quanto maior o número de fótons introduzidos no tecido de uma só vez, maior o número dos mesmos que estarão presentes em qualquer profundidade. Além disso, ao considerar cada fóton como sendo pacotes de energia que atuam em grande número estimulando as células, se a potência do laser for relativamente alta (15 mW a 60 mW), então o mesmo número de pacotes de energia podem ser fornecidos em um período de tempo menor (TÚNER & HODE ,1999; LAAKSO et al., 1993b).

#### **2.4.7 Efeitos do laser nos tecidos**

Nos tecidos biológicos é evidenciado uma função fotorreguladora relacionado com a existência de estruturas fotoreceptoras. Segundo BAXTER (1997), estas moléculas orgânicas responsáveis pela absorção da luz podem ser classificadas em dois grupos. O *Grupo* (1) é constituído pelos aminoácidos e ácidos nucleicos constituintes do DNA e das proteínas celulares. Os aminoácidos apresentam absorção na faixa intermediária e inferior do espectro ultravioleta, enquanto que os ácidos nucleicos possuem um espectro de absorção na mesma faixa dos aminoácidos, além da região do infravermelho. Porém, ambos não apresentam absorção significativa na faixa espectral do ultravioleta próximo ou do visível. Por outro lado, o *Grupo* (2) é formado pelas proteínas que apresentam um cromóforo como grupo funcional aderido. Estas biomoléculas absorvem luz na região visível do espectro.

Os cromóforos são definidos como componentes dos pigmentos da cadeia respiratória mitocondrial, de diferentes tamanhos e formas, os quais vão atuar ou ressonar com uma estimulação específica ou energia de radiação. Eles podem transferir a estimulação funcionalmente para os diferentes processos e componentes celulares envolvidos na cadeia respiratória mitocondrial (WILDEN & KARTHEIN, 1998; BAXTER, 1997).

Os cromóforos são classificados como especializados ou não especializados, podendo constituir enzimas, membranas celulares ou substâncias extracelulares, tais como:

- *Hemoglobina*: sua curva de absorção característica é determinada pelo seu estado reduzido ou oxigenado, onde a hemoglobina oxigenada apresenta picos de absorção a 420 nm e 577 nm, enquanto que a hemoglobina reduzida apresenta um pico de absorção a 560 nm (BAXTER, 1997);
- *Melanina*: apresenta grande absorção para comprimentos de onda superiores a 300 nm, diminuindo sua absorção para comprimento maiores que 1200 nm (KARU, 2000; BAXTER, 1997);
- *Componentes da cadeia respiratória mitocondrial*: (1) citocromos do sistema de fosforilação, tais como o *citocromo a-a<sub>3</sub>* e o *citocromo c oxidase*. Estas estruturas constituem os componentes funcionais terminais do sistema transporte de elétrons na membrana mitocondrial. Essas moléculas absorvem luz no intervalo espectral do infravermelho próximo (700 nm e 900 nm) e na região do visível quando encontram-se no seu estado redox intermediário, ou seja, nem totalmente reduzido ou oxidado; (2) componentes derivados da porfirina; ferro de baixa rotação e demais moléculas que absorvem radiação entre os comprimentos de onda de 950 nm e 1300 nm; (3) flavoproteínas e oxidases terminais que absorvem radiação no intervalo espectral do violeta ao azul, com o máximo de absorção a 405 nm e 436 nm. Estes são responsáveis pela geração de oxigênio molecular (KARU, 2000, 1998, 1995, 1989; LUBART et al., 2000; BAXTER, 1997; SCHAFFER et al., 1997; LABBE et al., 1990).

KARU (1987), afirma que os componentes da cadeia respiratória mitocondrial podem ser considerados como fotoreceptores primários da irradiação laser.

Segundo BAXTER (1997), KARU (1987) e PARRISH et al. (1985), a absorção da luz ocorre preferencialmente no nível de interação molecular. No aspecto molecular podem acontecer três situações:

- Excitação das cadeias de elétrons nas mitocôndrias, gerada pelo espectro visível e infravermelho próximo. As

moléculas excitadas apresentam um maior potencial para gerar reações químicas, induzindo a um observável efeito biológico;

- Vibrações moleculares, que consistem na ocorrência de estiramento e batimento das ligações que causam deslocamentos dos núcleos atômicos, porém sem afetar suas posições de equilíbrio. Estas vibrações são geradas pela absorção da irradiação infravermelha;
- Rotação total da biomolécula, ou parte dela ao redor de um eixo gerado pelo campo eletromagnético da luz incidente, podendo ocorrer um discreto aumento da temperatura.

A terapia laser de baixa energia acontece em intensidades tão baixas, que não se sabem ao certo se alguns efeitos biológicos que ocorrem são devidos a efeitos diretos da radiação ou como resultado do aquecimento.

As radiações ópticas podem ser ou não ionizantes, sua ação pode ser fotoquímica para as radiações ultravioletas ou termal para a faixa do infravermelho do espectro. A região visível permanece entre estes dois extremos, sendo considerada uma região de transição caracterizada pelos dois efeitos: termais e fotoquímicos (KITCHEN & PARTRIDGE, 1991).

Alguns autores afirmam que os efeitos do LLLT são baseados em mecanismos não termais, que não geram um aumento significativo da temperatura dos tecidos (WILDEN & KARTHEIN, 1998; BAXTER, 1997; KLOTH, 1997; KITCHEN & BAZIN, 1996; HONMURA et al., 1993). Pois, as densidades de potência normalmente empregadas na LLLT são inferiores a  $200 \text{ mW/cm}^2$ , não causando aumento considerável da temperatura nos tecidos (SCHAFFER et al., 1997).

Isso é demonstrado no trabalho de ROCHKIND et al. (1988) onde a temperatura não alterou mais que  $0,1^\circ \text{ C}$ , não produzindo desta forma, influência na atividade celular.

BASFORD (1989), relata um aumento discreto na temperatura após a terapia laser de 0,1 a 0,5° C, considerando a utilização de baixas doses e potências de 50 mW ou menos.

BRAVERMAN et al. (1989), não encontrou mudança significativa na temperatura da pele de coelhos durante ou após a irradiação laser durante o período de 50 minutos, onde os animais receberam doses de 1.65 J/cm<sup>2</sup> de laser Hélio-Neônio, ou 8,25 J/cm<sup>2</sup> de radiação infravermelho e ambas combinadas doses e aparelhos. O comprimento de onda e a saída de energia do laser podem ter um efeito significativo sobre a quantidade de radiação a ser convertida em vibração termal. Porém, o efeito bioestimulante pode não ser dependente de um efeito termal mensurável, mas possivelmente de uma reação fotoquímica com um componente receptivo em nível celular.

Durante os estados de excitação eletrônica, uma importante fração de energia excitada é convertida em calor, a qual por sua vez gera aumento na temperatura dos cromóforos absorventes, o que vem a ser um possível mecanismo de ação do laser. Porém, deve-se notar que o aquecimento local e transitório das moléculas absorventes difere do aquecimento celular total, o qual não é observado nas doses e intensidades usadas em estudos com culturas celulares (KARU, 1995).

#### **2.4.8 Processo de biomodulação**

A biomodulação laser ou reações laser catalisadas referem-se à aplicação de energia eletromagnética pelo laser de baixa potência aos tecidos biológicos, a qual por sua vez pode influenciar as funções celulares, como estimulação ou inibição de atividades bioquímicas, fisiológicas e proliferativas. Porém, devido à estimulação e a inibição serem possíveis de acontecerem, o termo biomodulação é ultimamente usada para nomear os dois efeitos (DE BIE et al., 1998; SCHAFFER et al., 1997; BECKERMAN et al., 1992).

A magnitude do efeito biomodulatório ou fotobioregulador atribuído a LLLT ao interagir com os tecidos biológicos, é referido como sendo dependente do

comprimento de onda, dose e densidade de potência, assim como da frequência de tratamento, do tipo de lesão e do espectro específico de absorção dos cromóforos moleculares (DE BIE et al., 1998; BASFORD, 1995; BECKERMAN et al., 1992; HARRIS, 1991; KITCHEN & PARTRIDGE, 1991; KARU, 1989, 1987).

Ao analisar a taxa de proliferação e inibição do crescimento celular KARU (1987), relata que a mesma molécula funciona como fotorreceptor da luz laser, contudo parâmetros como dose e comprimento de onda determinam a intensidade da resposta fotobiológica. A autora concluí, que baixas doses estão relacionadas com o processo de estimulação enquanto que doses elevadas relacionam-se com a inibição de processos biológicos.

Segundo KARU (1987), existem razões para achar que o fenômeno de biomodulação é de natureza fotobiológica, isto porque através de seus trabalhos, a inibição que ocorre com alguns processos biológicos ocorre pela fotodestruição de um ou mais citocromos da cadeia respiratória.

Doses baixas usadas em aplicações repetidas produzem efeitos que são cumulativos resultando também em um efeito inibitório (MESTER et al., 1985). Com isso, pode-se dizer, que a irradiação com laser de baixa potência resulta numa modulação das atividades celulares (SCHAFFER et al., 1997).

KARU et al. (1996), realizaram um experimento para verificar o grau de adesão celular utilizando vários comprimentos de onda na faixa do vermelho e infravermelho próximo. A dependência da adesão celular ao comprimento de onda usado estava relacionado com a intensidade do fluxo de íons através da membrana celular que por sua vez é dependente da intensidade do sinal captado pela molécula fotorreceptora, esse processo irá produzir reações biológicas que serão específicas para um comprimento de onda utilizado.

O efeito bioestimulante do laser sofreu várias tentativas de explicação através de várias teorias. A primeira delas foi o princípio de Arndt-Schultz, o qual propõem que os tecidos reagem à quantidade de energia absorvida por unidade de tempo de tal

maneira que estímulos fracos excitam a atividade fisiológica, enquanto aqueles muito fortes vão inibi-la (BAXTER, 1997; KLOTH, 1997).

Kleinkort & Foley, citado por KLOTH, 1997, postularam uma outra teoria para explicar este efeito, afirmando que o laser pode estimular a formação de ATP como depósito de energia. O ATP estimulará a atividade enzimática para que se restaure os processos fisiológicos normais em nível celular e do organismo em geral.

BECKERMAN et al., (1992), propôs que quando há uma alteração no estado de energia celular, há alteração da comunicação celular a qual, pode ser influenciada pela terapia laser.

No entanto, segundo SANDOVAL-ORTIZ et al. (2001), a teoria fotoquímica é atualmente a mais estudada e fundamentada, oferecendo uma explicação para a sensibilidade das células à luz laser, propondo que a energia eletromagnética estimula moléculas fotoreceptoras ou cromóforos, os quais respondem a uma faixa específica de luz, realizando assim, a conversão de energia fotoquímica. Para participar da fotobioregulação, esta molécula fotoreceptora precisa fazer parte da estrutura chave que atua regulando a via metabólica, ou seja, os componentes da cadeia respiratória mitocondrial que por sua vez controlam a homeostase celular (SANDOVAL-ORTIZ et al., 2001; KARU, 2000, 1998; WILDEN & KARTHEIN, 1998).

Os cromóforos são conjuntos de elétrons bem direcionados capazes de interagir com os fótons de luz e assim gerar respostas biológicas específicas. Os cromóforos podem constituir moléculas inter-relacionadas como enzimas, membranas moleculares ou qualquer outra substância extra-celular, estes estão capacitados para absorver luz, além de apresentarem algumas etapas comuns na realização de efeitos causados pelas diferentes faixas espectrais (KARU, 1998; BECKERMAN et al., 1992).

Como os efeitos da biomodulação possuem um amplo intervalo espectral, assume-se que devem ser diferentes cromóforos os alvos fotorreceptores, e isto pode depender de cada órgão, ou da localização e concentração dos fotorreceptores, o que por

sua vez, vai diferir entre células normais e patológicas (SROKA et al., 1999; SCHAFFER et al., 1997).

Quando a radiação é absorvida, acredita-se que os eventos primários fotoquímicos e fotofísicos ocorram na mitocôndria, no caso das células eucariotas e na membrana citoplasmática no caso da *E. coli*. No entanto, a questão sobre qual (is) molécula (s) é/são fotoreceptora (s) na cadeia respiratória permanece em aberto (KARU, 2000).

É proposto como mecanismo primário de ação a ocorrência de quatro respostas a partir da incidência da radiação laser sob as moléculas fotorreceptoras, havendo a possibilidade de que a energia dos fótons produza: (1) mudanças no estado de oxidação-redução dos componentes da cadeia respiratória, juntamente com uma aceleração na transferência de elétrons; (2) alterações na atividade bioquímica e estrutural pelo aquecimento transitório dos cromóforos; (3) aumento na produção do ânion superóxido ( $O_2^-$ ), como o subsequente aumento da concentração do produto de sua dismutação ( $H_2O_2$ ); (4) geração de oxigênio molecular ou singleto ( $^1O_2$ ). Na seqüência, os mecanismos secundários de ação consequentes às reações bioquímicas e/ou biofísicas iniciadas correspondem a transdução do fotosinal e amplificação ao núcleo por uma cascata de reações ocorridas no citoplasma e na membrana celular, essas reações são conectadas a alterações dos parâmetros de homeostase celular (pH, concentração de  $Ca^{+2}$ , AMP cíclico, ATP e outros), as quais acontecem minutos ou horas após a irradiação. Isto leva a ocorrência de possíveis mudanças na taxa de síntese de DNA e RNA, alterações na taxa do consumo de  $O_2$ , alteração do potencial de membrana, entre outras. Estas respostas são convencionalmente divididas em efeitos a curto prazo ou diretos e efeitos a longo prazo ou indiretos (SANDOVAL-ORTIZ et al., 2001; ALEXANDRATOU et al., 2000; KARU, 2000, 1998, 1995, 1989; 1987; LUBART et al., 2000; BAXTER, 1997; KITCHEN & PARTRIDGE, 1991).

As respostas a curto prazo são aquelas onde o efeito da radiação laser pode ser observado uns poucos segundos ou minutos após a radiação. Entre as respostas a curto prazo está a fotoestimulação da taxa respiratória e a síntese de ATP (KARU, 1998, 1987).

A ativação da cadeia respiratória pela radiação gera um gradiente de próton na membrana mitocondrial que atua como um sinal iniciador para a proliferação celular (KARU, 1995).

MANTEIFEL et al. (1997), observaram através de análises tridimensionais de linfócitos humanos irradiados com laser He-Ne (632,8 nm), a presença de mitocôndrias gigantes uma hora após a irradiação. De acordo com os autores, estas evidências embasam a proposta de que as mudanças nas propriedades químicas e físicas das membranas mitocondriais externas geradas pela radiação laser promovem uma fusão de mitocôndrias adjacentes, levando assim ao aparecimento de mitocôndrias gigantes. Estas estruturas por sua vez são capazes de proporcionar altos níveis de energia de reposição.

A irradiação de mitocôndrias de hepatócitos *in vitro* por laser de hélio-neônio a  $5 \text{ J/cm}^2$ , causou aumento no potencial de membrana mitocondrial e gradiente de próton gerando aumento do ATP mitocondrial. Este evento parece estar intimamente correlacionado com a transferência de elétrons na cadeia mitocondrial. Portanto, um potencial extra-eletroquímico, gerado através de um mecanismo atualmente desconhecido, é finalizado como síntese de ATP (PASSARELLA et al., 1984).

KARU et al. (1995), observou aumento na síntese de ATP após irradiar culturas celulares com laser He-Ne.

Porém, GAMALEYA (1977), afirmou que nos níveis subcelulares as unidades estruturais mais sensíveis à irradiação laser devem ser as estruturas membranosas da célula, como o retículo endoplasmático e as membranas que constituem parte considerável do citoplasma e das organelas que formam os limites de interface intracelulares.

A fotossensibilidade das células não é um fenômeno do tipo “tudo ou nada”, e as células podem responder aos estímulos da luz em vários graus. A magnitude da fotorresposta está relacionado ao estado fisiológico prévio à irradiação o qual, no caso de cultura celular é condicionado por exemplo, pela quantidade de nutrientes disponíveis e a idade da cultura, no caso de uma baixa concentração de oxigênio e queda do pH, haverá

alteração do estado redox celular, o que influenciará a resposta biológica à irradiação. Portanto, a resposta celular será fraca ou ausente quando o potencial redox é ótimo, e forte quando este se encontra alterado (estado intermediário) (KARU, 1998; 1987; KARU et al., 1995).

Com isso concluí-se, que o laser tem melhores efeitos sobre órgãos e tecidos afetados por uma condição deteriorada, como quando o paciente sofre algum tipo de desordem funcional ou lesão tecidual (TUNER & HODE, 1999).

Assim, evidências experimentais comprovam que a alteração do estado redox no sentido da oxidação está relacionado com o efeito estimulatório do laser, enquanto que a alteração no sentido da redução, correlaciona-se com o efeito inibitório. Isto explica porque o efeito bioestimulante nem sempre é conseguido, havendo uma grande diversidade de resultados reportados na literatura (SANDOVAL-ORTIZ et al., 2001; KARU, 2000).

Alguns estudos sugerem que os efeitos da LLLT possam ser manifestados não apenas no local da irradiação como também a nível sistêmico. Esses efeitos podem ocorrer através de mediadores metabólicos liberados na circulação, atingindo áreas distantes do local de aplicação (LAAKSO et al., 1993b; OSHIRO, 1991; TUNER & HODE, 1999; KITCHEN & PARTRIDGE, 1991). Porém, esta é uma evidência controversa, visto que outros trabalhos citados por SANDOVAL-ORTIZ et al. (2001) não comprovam a sua ocorrência.

Os efeitos a longo prazo ou respostas indiretas à irradiação são observados horas ou ainda dias após o término da irradiação (KARU, 1998, 1987). Os três principais efeitos fisiológicos reportados na literatura sobre a LLLT a longo prazo são:

### ***(1) Efeito anti-inflamatório***

Tem sido proposto que o laser de baixa potência possui um efeito anti-inflamatório e a evidência clínica e de laboratório pode ser extensivamente revisada em

vários trabalhos, embora não se conheça claramente o mecanismo de ação e muitos dos resultados são controversos.

A ação inibitória da LLLT sobre o processo inflamatório é embasada na promoção de diversos efeitos tais como (a) inibição da emergência de fatores quimiotáticos nas primeiras etapas da lesão; (b) interferência com diversos efeitos dos mediadores químicos ou superóxidos induzidos pela inflamação; (c) diminuição do volume do exudato alterando assim a permeabilidade vascular; (d) normalização da permeabilidade de membrana (SANDOVAL-ORTIZ et al., 2001; KARU, 1998; HONMURA et al., 1992).

Segundo KITCHEN & BAZIN (1996), os benefícios da LLLT no tratamento de doenças como a artrite reumatóide, osteoartrite e dor artrogênica foram avaliados por diversos pesquisadores que encontraram divergência dos resultados. Alguns grupos de pesquisadores encontraram uma redução da dor e da inflamação, associado com uma melhora do estado funcional articulares após o tratamento com laser, outros artigos não conseguiram detectar qualquer benefício da laserterapia nesses processos inflamatórios.

Em seu estudo HONMURA et al. (1992), observaram um efeito inibitório do laser GaAlAs (780 nm),  $31.8 \text{ J/cm}^2$ , contínuo, 10 mW, sobre o modelo inflamatório induzido em ratos, através da redução do exsudato quando os animais foram irradiados antes e após a indução da inflamação.

AMANO et al. (1994), evidenciaram uma redução da sintomatologia dolorosa e inflamatória de 32 pacientes portadores de artrite reumatóide submetidos a tratamento com laser Ga-Al-As (790 nm), 10 mW, pontual, durante 8 minutos de irradiação, num período de 6 sessões.

BECKERMAN et al. (1992), avaliaram a eficácia da LLLT em disfunções músculo-esqueléticas ao analisar os resultados de 36 estudos aleatórios. Os autores concluíram através de suas análises que o emprego da terapia laser mostrou melhor resultado quando comparado com os grupos controles principalmente nos casos de artrite reumatóide, dor miofascial e traumatismo articular.

SANDOVAL-ORTIZ (2001), concluiu que a terapia laser apresenta uma ação modulatória sobre o processo inflamatório, induzido no modelo experimental de inflamação em joelhos de coelhos submetidos ao tratamento com laser de Ga-Al-As (830 nm, CW, 77 mW), densidade de energia de  $27,5 \text{ W/cm}^2$ , obtendo melhores resultados na dose de  $3,4 \text{ J/cm}^2$ .

No trabalho de BASFORD et al. (1987), o tratamento com laser não mostrou resultados satisfatórios quando aplicado em pacientes portadores de osteoartrite no polegar, tratados 3 vezes por semana com laser de He-Ne (632,8 nm), 0,9 mW, contínuo, pontual, e tempo de irradiação de 15 segundos.

Estudos sobre o efeito do laser de baixa potência nos processos inflamatórios se encontram ainda em uma fase inicial, havendo a necessidade de mais trabalhos experimentais e clínicos bem controlados para confirmar se as ações do laser são pró ou anti-inflamatórias (HONMURA et al., 1992).

## ***(2) Efeito analgésico***

Segundo BORGES et al. (1996), os mecanismos envolvidos no efeito analgésico do laser de baixa potência estão provavelmente relacionados ao relaxamento muscular e os mecanismos opióides endógenos.

O laser atuaria na diminuição da inflamação e da dor através da promoção da reabsorção de exsudatos inflamatórios, favorecendo desta forma, a eliminação de substâncias algogênicas, como bradicinina, histamina e acetilcolina. Além disso, haveria uma elevação do limiar de dor nos nervos periféricos, havendo um bloqueio na despolarização das fibras aferentes tipo C (TUNER & HODE, 1998; TAGUCHI, 1991; SNYDER-MACKLER & BORK, 1988; COLLS, 1985).

COLLS (1985), também propõem outra teoria para justificar o efeito analgésico do laser, onde existiria uma manutenção do gradiente iônico na membrana celular, evitando a sua despolarização devido ao aumento de ATP que por sua vez,

favoreceria a expulsão de sódio através da bomba de sódio/potássio. O autor também descreve que o laser pode induzir a diminuição da capacidade de alterar os gradientes iônicos dos dois lados da membrana celular, não permitindo a abertura dos canais de sódio, provavelmente às custas de uma mobilização de lipídios que atuam bloqueando os canais de penetração de íons. Assim, pode-se inferir que o laser atua como um fator estabilizador do potencial de membrana em repouso (hiperpolarização), dificultando a transmissão do impulso doloroso local. VILLAROYA-APARICIO et al. (1994) e COLLS (1985), relatam que o contato e a absorção da carga fotônica da radiação laser em alguns locais do organismo pode levar a uma estimulação das fibras grossas táteis, o que de acordo com a teoria do controle do portão descrita por Melzack & Wall em 1965, provocaria um bloqueio na transmissão dos impulsos dolorosos das fibras finas.

No entanto, GREATHOUSE et al. (1985), com o objetivo de demonstrar os efeitos do laser infravermelho na condução nervosa sensorial periférica e na mudança da temperatura tecidual circundante ao nervo tratado, aplicaram uma radiação de intensidade normalmente utilizada na prática clínica em cinco segmentos de 1 cm<sup>2</sup> no nervo radial superficial do antebraço direito de humanos. Medidas de latência, amplitude e temperatura foram tomadas e analisadas, levando a conclusão de que o laser infravermelho não altera a condução dos nervos sensoriais e nem eleva a temperatura subcutânea.

### *(3) Efeito cicatrizante*

Diversos trabalhos evidenciam o benefício da irradiação laser de baixa potência sobre a proliferação celular, justificando os resultados positivos da sua utilização nos processos de reparação tecidual.

A LLLT tem sido usada para estimular o processo de reparo tecidual, principalmente de feridas agudas e crônicas desde 1970.

Segundo KITCHEN & PARTRIDGE (1991), o efeito bioestimulante do laser de baixa potência no processo de cicatrização ocorra através do recrutamento

aumentado de macrófagos, degranulação de mastócitos, angiogênese, aumento da atividade fagocitária e fotodissociação de oxihemoglobina.

Alguns autores sugerem que fotoestimulação laser potencialize o reparo tecidual por favorecer a liberação de fatores de crescimento, além de promover os aumentos da síntese de ATP, produção de ácidos nucleicos e divisão celular (MESTER et al., 1985; PASSARELA et al., 1984).

VAN DER VEM et al. (1998), evidenciaram um efeito proliferativo sobre culturas de fibroblastos relacionado ao aumento da síntese de DNA através da radiação laser de baixa potência (904 nm), pulsado e densidade de potência de  $0,003 \text{ W/cm}^2$ .

KARU (1987), verificou um aumento significativo no número de fibroblastos humanos após a irradiação com laser de He-Ne, também foram observados mudanças no nível de AMPcíclico comparado com o grupo placebo. A alta taxa de AMPcíclico estimula a síntese de DNA promovendo assim, um aumento da mitose celular.

ALMEIDA-LOPES (2001), relata um efeito proliferativo ou ativador da síntese protéica, em estudos com fibroblastos *in vitro*, onde a magnitude do efeito foi dependente das características e parâmetros de irradiação utilizados como comprimento de onda, forma de emissão do feixe, densidade de potência e energia.

AMARAL et al. (2001), evidenciou uma melhora qualitativa no reparo tecidual do músculo tibial anterior de camundongos, tratados com laser He-Ne (632,8 nm), 2,6 mW, feixe de  $0,07 \text{ cm}^2$ , contínuo, com grande significância na dose de  $2,6 \text{ J/cm}^2$ .

KITCHEN & BAZIN (1996), reportam que a LLLT foi avaliada no tratamento de diversos tipos de feridas e lesões ulceradas, com melhores resultados, especialmente quando a terapia laser foi aplicada nos casos mais crônicos e intratáveis.

Porém, outros trabalhos não evidenciam resultados positivos da laserterapia como estímulo para o processo de reparo tecidual. OLIVEIRA et al. (1999), utilizando um modelo de lesão do músculo tibial anterior de camundongos, não evidenciou alterações morfológicas significantes no tecido de reparo neoformado, ao comparar os grupos tratados com o placebo, o autor utilizou um laser de Ga-As (904 nm), 1,5 mW, emissão pulsada com

duração de pulso de 200 ns e frequência de 1000 Hz, densidade de potência de  $7,5 \text{ mW/cm}^2$  e dose de  $3 \text{ J/cm}^2$ .

#### **2.4.9 Laser no reparo tendíneo**

O modelo de cicatrização tendínea é bastante discutido por ENWEMEKA (1991) como sendo adequado para estudos de métodos físicos sobre a estrutura do colágeno que pode ser avaliado quanto a intensidade de síntese e orientação ou organização das fibras.

Estudos utilizando o tecido tendíneo mostraram significativa confiabilidade da terapia laser de baixa potência no processo de reparo. Segundo ENWEMEKA & REDDY (2000), o laser estimula a proliferação fibroblástica levando a um aumento na síntese de colágeno.

REDDY et al. (1998a) em seu estudo detectou aumento na produção de colágeno em tendões de 24 coelhos tratados com feixe laser He-Ne (632,8 nm) a  $1 \text{ J/cm}^2$ , diariamente por 14 dias, comparados com o grupo controle não tratado.

ENWEMEKA (1992b), reportou um aumento das fibras de colágeno no citoplasma de fibroblastos de tendões tenotomizados de coelhos expostos ao feixe laser He-Ne (632,8 nm), potência de 11 mW, feixe pulsado (50%), área de  $5 \text{ cm}^2$  e densidade de energia de  $1 \text{ mJ/cm}^2$  e  $5 \text{ mJ/cm}^2$ . Esse mesmo efeito foi observado quando utilizou-se um laser de As-Ga (904 nm), nas doses de  $1 \text{ mJ/cm}^2$  e  $5 \text{ mJ/cm}^2$  (ENWEMEKA & REDDY, 2000).

ENWEMEKA & REDDY (2000), utilizando doses de  $1 \text{ mJ/cm}^2$  e  $5 \text{ mJ/cm}^2$  e  $0,5 \text{ J/cm}^2$  e  $1 \text{ J/cm}^2$  de laser He-Ne (632,8 nm) observaram um aumento de 30 – 40% na força tênsil de tendões após 14 dias da indução da tenotomia. Esse efeito foi mais pronunciado na dose de  $1 \text{ J/cm}^2$ .

Um estudo similar feito com laser de As-Ga (904 nm) em tendões tenotomizados nas doses de  $0,5 \text{ J/cm}^2$ ;  $1,0 \text{ J/cm}^2$  e  $1,5 \text{ J/cm}^2$ , demonstrou um aumento de 40% na capacidade biomecânica de tendões lesados comparados com seus respectivos

controles, após 14 dias de reparo, esse efeito foi intensificado na dose de  $1,0 \text{ J/cm}^2$  (ENWEMEKA et al., 1994).

Os mesmos autores acima citados, quando compararam o nível de resposta tecidual entre os dois lasers utilizados He-Ne (632,8 nm), contínuo e As-Ga (904 nm), pulsado, ambos na dose de  $1 \text{ J/cm}^2$ , observaram que o processo de reparo tendíneo e a performance biomecânica dos tendões lesados foram melhorados quando utilizou-se o laser de He-Ne (632,8 nm) (ENWEMEKA & REDDY, 2000).

Um estudo feito em 18 tendões tenotomizados de coelhos, utilizando o laser He-Ne (632,8nm), potência de 11mw, feixe pulsado (50%), spot de  $1,82 \text{ mm}^2$  e área de  $1 \text{ cm}^2$  nas doses de 1, 2, 3, 4 e  $5 \text{ mJ/cm}^2$ , demonstrou nos tendões tratados uma maior produção de colágeno e maior alinhamento do mesmo no eixo longitudinal do tendão, esses efeitos foram mais significantes nas doses de 4 e  $5 \text{ mJ/cm}^2$ , esses achados indicam que a fotoestimulação laser He-Ne pode modular a biossíntese do colágeno em tendões lesados (ENWEMEKA et al., 1990).

REDDY et al. (1997), estudaram o efeito do laser de He-Ne (632,8 nm) e da estimulação elétrica (corrente galvânica) no processo de reparo tecidual de tendões tenotomizados de coelhos. O tratamento consistiu de 5 aplicações consecutivas de estimulação elétrica transcutânea iniciando no primeiro dia do pós operatório juntamente com a aplicação de laser de He-Ne,  $1 \text{ J/cm}^2$ , o tratamento com laser seguiu até o 14 dia do pós operatório. Os resultados demonstraram uma maior produção de colágeno acelerando o processo cicatricial dos tendões lesados.

Ao estudar o processo de reparação tendínea durante 14 dias GUM et al. (1997), utilizou um protocolo de terapia combinada com estimulação elétrica transcutânea (corrente galvânica), laser de Ga-As (904 nm),  $1 \text{ J/cm}^2$  e Ultra-Som. Os resultados demonstraram aumento na produção de colágeno, porém sem significâncias estatísticas na performance funcional dos tendões tratados em relação ao grupo controle, sugerindo que terapias combinadas podem não influenciar de forma positiva no processo de cicatrização tendínea.

PARIZOTTO & BARANAUSKAS (1998a), utilizando um feixe laser HeNe (632,8 nm) com 6 mW de potência, spot de 1 mm e emissão contínua, nas doses de 0,5; 5;

e  $50 \text{ J/cm}^2$  em 32 tendões de ratos, observaram através da análise por Espectroscopia por Infravermelho um aumento das ligações de hidrogênio intra e intermolecular em moléculas de colágeno de tendões lesados, com maior significância na dose de  $5 \text{ J/cm}^2$  comparados com o grupo controle.

Em outro estudo os mesmos autores reportaram melhora da organização molecular dos feixes de colágeno em tendões lesados utilizando os mesmos parâmetros do estudo anterior. Através da análise por Microscopia de Força Atômica observou-se melhor arranjo e ordem molecular nas moléculas e fibrilas de tendões tratados com laser, principalmente na dose de  $5 \text{ J/cm}^2$  (PARIZOTTO & BARANAUSKAS, 1998b).

Um estudo de LONGO et al. (1987), demonstrou que é possível obter aceleração da cicatrização na faixa do infravermelho, através da utilização de um laser de baixa potência com intervalo espectral na faixa do infravermelho próximo (830nm) no processo de reparo tecidual em tendões calcaneares de ratos.

ROBERTO (1998), realizou um estudo comparativo entre o laser diodo (780 nm) e o laser de  $\text{CO}_2$  (10,600 nm) no tratamento da tendinite do tendão calcanear de 40 atletas que foram divididos em 4 grupos experimentais. Os parâmetros utilizados para a irradiação do primeiro grupo foram 780 nm,  $20 \text{ J/cm}^2$ , contínuo e aplicação por varredura, os parâmetros do segundo grupo foram 780 nm,  $180 \text{ J/cm}^2$ , pulsado e aplicação pontual. O terceiro grupo recebeu irradiação com laser de  $\text{CO}_2$  (10,600 nm),  $15 \text{ J/cm}^2$ , pulsado e aplicação por varredura, o quarto grupo recebeu laser de  $\text{CO}_2$  (10,600 nm),  $15 \text{ J/cm}^2$ , aplicação pontual. Foi observado melhores resultados em relação ao alívio do quadro algico no tratamento laser de 780 nm nas duas modalidades terapêuticas empregadas.

O tratamento com laser de 830 nm, contínuo, 3 J por ponto, feito duas vezes por semana durante o período de oito semanas, não demonstrou resultados satisfatórios na redução do quadro algico, rigidez e limitação do movimento, quando utilizado no tratamento da tendinite dos tendões rotadores do ombro de 35 pacientes que foram submetidos ao protocolo de tratamento (VECCHIO et al., 1993).

PAOLINI & PAOLINI-PISANI (2000), observaram um efeito positivo do laser de He-Ne (632,8 nm) no tratamento da tendinite dos tendões do manguito rotador,

quando comparado com o tratamento com diodo laser não-coerente (660 nm) e o uso de anti-inflamatórios não esteroidais.

A efetividade do tratamento com laser de baixa potência nas lesões tendíneas foi evidenciada por ENGLAND et al. (1989), ao estudarem o efeito desta modalidade terapêutica no tratamento da tendinite do músculo supraespinhoso e bíceps braquial de humanos. O tratamento com laser consistiu de irradiação com laser de As-Ga (904 nm), 3mW, 4000 Hz, pulsos de 180 nanosegundos, pontual, durante 5 minutos, 3 vezes por semana por um período de duas semanas. Os pacientes tratados apresentaram uma redução do quadro álgico e melhora funcional quando comparado com o grupo controle não tratado.

No entanto, um estudo feito por SIEBERT et al. (1987), não constatou melhora do quadro álgico e do desempenho funcional de 32 pacientes portadores de tendinopatias. O tratamento foi realizado com a combinação do laser de He-Ne (632,8 nm), 10 mW, distância de 10 cm da pele do paciente, área de aplicação de 4 cm<sup>2</sup> e laser de GaAlAs (904 nm), pulsado, 30 mW e densidade de potência de 7,5 W/cm<sup>2</sup>, o tratamento foi realizado em aplicações de 15 minutos diários, os autores não fizeram citações do valor das doses empregadas.

BJORDAL (2000), realizou uma revisão bibliográfica sobre o efeito do laser de baixa potência na cicatrização tendínea. O autor encontrou um intervalo de doses ótimas para a estimulação de fibroblastos com LLLT a 3,2 J/cm<sup>2</sup> – 6,3 J/cm<sup>2</sup> e para a estimulação de fibras de colágeno com doses de 0,2 J/cm<sup>2</sup> – 2,0 J/cm<sup>2</sup>.

SCHMITT et al. (1993), realizou um experimento em trinta cães que foram submetidos a tenotomia e tenorrafia do tendão calcâneo de ambas as patas, foi utilizado um laser de As-Ga (904 nm), 4 J/cm<sup>2</sup> pontual e 1 J/cm<sup>2</sup> na forma de varredura ao longo do tendão esquerdo durante 10 dias consecutivos, o tendão direito serviu como controle. Embora os resultados não demonstraram aumento da proliferação fibroblástica e aumento da síntese de colágeno dos tendões quando comparados com o seu controle contralateral, os autores relataram que macroscopicamente os tendões tratados apresentaram-se melhor vascularizados, com redução de aderências e ótimo aspecto estético de cicatrização.

Xu et al., citado por TÚNER & HODE (1999), fez um estudo com 50 galinhas brancas, onde 10 serviram como controle e 40 sofreram lesão do seu tendão profundo do 2º e 3º dedo do pé. Os tendões tratados receberam laser de He-Ne e  $10,74 \text{ mW/cm}^2$  de densidade de potência, a irradiação iniciou-se 24 horas após a lesão e continuou por 3 semanas. Os resultados demonstraram que o laser de He-Ne atuou benéficamente no processo inflamatório, absorção do edema, estimulante da síntese de colágeno e remodelamento do tendão sendo decisivo para a recuperação funcional desta estrutura lesada.

Um estudo comparativo foi realizado para avaliar a proliferação de fibroblastos quando irradiada com vários comprimentos de onda (670 nm, 780 nm, 692 nm e 786 nm) e dose de  $2 \text{ J/cm}^2$ . Na primeira parte do estudo foi comparado o efeito dos comprimentos de onda 670 nm e 780 nm,  $2 \text{ J/cm}^2$  e duas potências de irradiação (10 mW para 670 nm, 50 mW para 780 nm), na segunda parte do estudo foi comparado os comprimentos de onda de 692 nm e 786 nm,  $2 \text{ J/cm}^2$ , utilizando uma potência única de 30 mW. Os resultados concluíram que quando comparou-se dois comprimentos de onda diferentes (670 nm e 780 nm),  $2 \text{ J/cm}^2$ , e potências de 10 mW e 50 mW a proliferação fibroblástica foi intensificada quando utilizou-se o laser infra vermelho de 780 nm. No entanto, a taxa de proliferação fibroblástica não diferiu quando os lasers de 692 nm e 786 nm,  $2 \text{ J/cm}^2$ , potência única de 30 mW foram comparados (ALMEIDA-LOPES et al., 2001).

PEREIRA et al. (2002), avaliou a proliferação fibroblástica após a irradiação com laser de As-Ga (904 nm), 120 mW de potência e doses de  $3 \text{ J/cm}^2$ ;  $4 \text{ J/cm}^2$  e  $5 \text{ J/cm}^2$ . A dose de  $3 \text{ J/cm}^2$  e  $4 \text{ J/cm}^2$  aumentou em 3 a 6 vezes a taxa de proliferação celular, enquanto que a dose de  $5 \text{ J/cm}^2$  proporcionou crescimento celular semelhante a cultura de células controles.

RIGGAU et al. (1994), constatou um aumento na proliferação de fibroblastos *in vitro* sob irradiação com laser de 633 nm,  $2 \text{ J/cm}^2$ , 38 mW,  $4 \text{ mW/cm}^2$ , verificando um efeito positivo da radiação laser de baixa potência neste tipo de células.

VAN DER VEM et al. (1998), observaram aumento na síntese de DNA com consequente aumento na proliferação de fibroblastos após a irradiação com laser de As-Ga (904 nm), 0,003 W/cm<sup>2</sup> e 0,3 J/cm<sup>2</sup>.

A irradiação com laser de As-Ga (904 nm), 0,2 J/cm<sup>2</sup>, aumentou a proliferação de fibroblastos, porém altas doses dessa irradiação inibiu o índice de crescimento celular (GAYDESS et al., 1998).

LUBART et al. (1992), observou um aumento no número de mitoses quando irradiou cultura de fibroblastos com laser de He-Ne (633 nm), na dose de 15 J/cm<sup>2</sup>, no entanto, a dose de 60 J/cm<sup>2</sup> inibiu esse processo.

A transformação *in vitro* de fibroblastos em miofibroblastos foi observada 24 horas após a irradiação com laser de He-Ne (632,8 nm), 1,2 J/cm<sup>2</sup> confirmando o efeito positivo do laser de baixa potência no processo de reparação tecidual (POURREAU-SCHNEIDER et al., 1990).

VAN DER VEEM (2000), verificou um aumento na proliferação fibroblástica em feridas em processo de cicatrização utilizando a combinação de laser He-Ne (632,8 nm), 5 mW e laser As-Ga (904 nm), 68,8 mW.

Tocco et al., citado por BAXTER (1997), encontrou um aumento na proliferação fibroblástica usando laser de He-Ne (632,8 nm) e laser infravermelho. Um aumento no tamanho do retículo endoplasmático rugoso relacionado com uma estimulação na síntese protéica foi observada, assim como, um aumento do número e tamanho das mitocôndrias das células irradiadas.

A irradiação com diodo laser 660 nm, pulsado a 5000 Hz, dose de 2,4 J/cm<sup>2</sup> e 4,0 J/cm<sup>2</sup>, 17 mW de potência e 0,078 W/cm<sup>2</sup>, aumentou o número de fibroblastos derivados de cicatrizes hipertróficas (WEBB et al., 1998).

Por outro lado, HALLMAN et al. 1988, não encontrou aumento na proliferação fibroblástica, após a irradiação com laser de He-Ne (633 nm), 0,9 mW, 24,7 mW/cm<sup>2</sup> durante 60 segundos.

BOSATRA et al. (1984), observou um aumento na proliferação de cultura de fibroblastos humanos após a irradiação com laser de He-Ne (632,8 nm), 2 J/cm<sup>2</sup>, 25 mW.

A síntese de DNA e proliferação celular foi aumentada em culturas de fibroblastos quando esta foi irradiada com laser Ga-Al-As (812 nm), 0,45 J/cm<sup>2</sup>, 84 mW. Segundo LOEVSCHELL & ARENHOLT-BINDSLEV (1994), o comprimento de onda de 812 nm usado neste experimento foi absorvido especificamente pelo citocromo oxidase dos fibroblastos aumentando a síntese de DNA e proliferação celular das células irradiada.

Bolton et al., citado por TÚNER & HODE (1999), irradiou fibroblastos com 50 mW do laser de GaAlAs. A proliferação de fibroblastos e a atividade da enzima succinase desidrogenase foi aumentada quando utilizou-se doses de 2 J/cm<sup>2</sup>, porém ambas foram inibidas na dose de 16 J/cm<sup>2</sup>.

Segundo KARU (1998), a atividade de fibroblastos foi aumentada quando se irradiou a cultura com laser de He-Ne (632,8 nm), contínuo ou As-Ga (904 nm), pulsado durante um período de 4 dias. A irradiação com He-Ne causou uma maior síntese de colágeno quando comparado com o laser de As-Ga, a autora conclui que os efeitos bioestimulantes na produção de colágeno foram dependentes do comprimento de onda utilizado.

## 2.5 MICROSCOPIA DE POLARIZAÇÃO

A microscopia de luz polarizada possibilita a quantificação em níveis elevados de precisão, a determinação estatística exata da ordem molecular, da direção da vibração, do momento de transição e de variações nos estados de agregação molecular (VIDAL, 1987a e b).

Segundo VIDAL (1987b), o microscópio de luz polarizada é basicamente constituído de dois filtros polarizadores: o Polarizador (Pol) e o Analisador (An).

O Pol está localizado abaixo do condensador e permite movimentação para ser removido ou colocado no trajeto da luz, além de uma rotação de 360°.

O An é um polarizador situado acima das objetivas e abaixo das oculares, assim, a luz polarizada (com o vetor elétrico vibrante em um só plano) emitida, encontrará o plano de polarização do analisador perpendicular à sua direção de vibração, absorvendo-a; esse fenômeno ocorre pela própria natureza dos polarizadores.

A placa polarizadora absorve todos os vetores elétricos da radiação de forma seletiva deixando passar apenas a energia radiante em uma direção, aquela que corresponde ao seu plano de polarização. Devido a isso, toda a radiação polarizada perpendicularmente ao plano de polarização do analisador será absorvida e a intensidade de passagem de luz será máxima quando o Pol e o An estiverem paralelos entre si (VIDAL, 1987b).

Vários autores tem utilizado o microscópio de luz polarizada para avaliar a organização e agregação das fibras de colágeno de tendões e ligamentos (VIDAL, 1995a; VIDAL, 1994; WHITTAKER & CANHAM, 1991; VIDAL & CARVALHO, 1990; VIDAL, 1986; PIMENTEL, 1981; VIDAL et al. 1975; MELLO et al. 1975; VIDAL, 1966).

### **2.5.1 Propriedades anisotrópicas ópticas**

Chamam-se propriedades anisotrópicas ópticas a birrefringência e o dicroísmo.

Muitas substâncias cristalinas (sólidos cujos átomos se distribuem de uma maneira regular) são opticamente anisotrópicas, ou seja, as suas propriedades ópticas não são as mesmas em todas as direções numa mesma amostra (HECHT, 1991).

Segundo VIDAL (1987b), em um corpo isotrópico, com respeito ao índice de refração, em qualquer direção que a luz se propague nele esta o fará com a mesma velocidade. Isto não é observado em um corpo birrefringente, pois este possui dois índices de refração diferentes e conseqüentemente duas direções diferentes de propagação da luz.

### 2.5.2 Birrefringência de materiais

O termo birrefringência é definido como anisotropia devida à diferença de índices de refração do objeto, o que significa uma propagação da luz com velocidades diferentes, em direções diferentes, as quais são perpendiculares uma a outra no corpo birrefringente (VIDAL, 1987b).

Quando a luz polarizada entra no corpo birrefringente esta propaga-se em dois caminhos óptico diferentes, sendo uma na direção do raio ordinário ( $n_o$ ), e outro na direção do raio extraordinário ( $n_e$ ). Devido essa diferença de caminho óptico ou retardo óptico (OR), o material apresenta um brilho característico quando analisado pela microscopia de polarização, cuja intensidade é máxima quando um dos seus eixos de propagação, correspondentes aos índices de refração, são colocados a  $45^\circ$  dos dois filtros polarizadores do microscópio (VIDAL & CARVALHO, 1990; VIDAL, 1987b).

Quando os eixos de propagação do objeto estiverem paralelos ao An e ao Pol desaparecem as imagens birrefringentes, enegrecendo-se o objeto (posição de extinção). Se esse fato não ocorre, permanecendo brilho em alguns setores do objeto, é porque existe material anisotrópico distribuído em outra direção que não aquela que foi extinta (VIDAL, 1987b).

A birrefringência expressa-se pela equação  $B = (n_o - n_e)$  e o retardo óptico expressa-se pela equação  $OR = (n_o - n_e) \times t$ , onde  $t$  representa a espessura do objeto. Portanto, temos que  $OR = B \times t$ .

A birrefringência do colágeno é denominada birrefringência de forma (BF) ou textural, pois dá-se devido a presença de microcorpos com morfologia assimétrica dispostas ordenadamente, de tal maneira que seus diâmetros e distâncias sejam menores que o comprimento de onda ( $\lambda$ ), sendo dependente dos índices de refração, da contribuição dos volumes parciais das partículas e do meio homogêneo dispersante.

Existem materiais que além da BF apresentam uma birrefringência intrínseca; é o caso do colágeno. Os feixes apresentam BF ou textural e também intrínseca positivas (VIDAL, 1987b).

A BF é dependente do volume parcial (concentração), estado de agregação e orientação das fibras de colágeno. A birrefringência intrínseca é determinada pela força orientacional de todas as transições eletrônicas na molécula (VILARTA & VIDAL, 1989).

A modificação dos meios de imersão dos feixes de colágeno, em diferentes índices de refração ( $n$ ), permite avaliar as suas propriedades ópticas como a birrefringência. A imersão do colágeno nestes meios fará com que possa ser vista a variação do brilho deste, isto porque o valor da BF varia com o  $n$  do meio de imersão (VIDAL, 1987b; MELLO et al. 1975).

A curva de birrefringência é determinada pela plotagem dos valores de retardo óptico (OR em nm) das fibras de colágeno em função do índice de refração médio dos fluidos de imersão, como a água destilada ( $n = 1,333$ ); 20%, 30%, 40%, 60%, 80%, 100% de soluções de glicerina, cujos  $n = 1,3600$ ; 1,3724; 1,3864; 1,4131; 1,4353 e 1,4610, respectivamente; e finalmente o nujol ( $n = 1,4786$ ).

Em água destilada os feixes de colágeno apresentam os maiores valores de birrefringência, correspondendo aos valores de birrefringência total, ou seja, representam os valores da BF somada à birrefringência intrínseca, e podem representar com objetividade a morfologia das moléculas de colágeno, o diâmetro e grau de empacotamento das fibras (VIDAL, 1987b).

Segundo VIDAL et al. (1975), modificações foram observadas nas curvas de birrefringência, as quais foram relacionadas ao grau de agregação ordenada lateralmente das fibras de colágeno. Diferença nos estados organizacionais de um mesmo tipo de colágeno podem ser encontradas em função da idade e da localização topográfica. Portanto, o aumento da birrefringência total está relacionado ao aumento de ligações cruzadas entre as fibrilas de colágeno, aumentando a cristalinidade e a agregação ordenada do colágeno tipo I.

Apesar do conhecimento já existente sobre os aspectos de birrefringência da molécula de colágeno, ainda pode-se conseguir maiores informações sobre estes aspectos de ordem molecular quando nos encontramos frente a diferentes processos fisiológicos (PIMENTEL, 1981).

O tendão é uma estrutura já estudada pelo método de análise da birrefringência e, portanto é conhecido o padrão desenvolvido para a sua reparação (MELLO et al., 1975). Comprovação deste método de estudo para diferentes situações funcionais e tecidos, sob intervenção de métodos físicos também se configura no trabalho de WHITTAKER & CANHAM (1991), demonstrando que além da análise qualitativa, pode-se quantificar o fenômeno ligado a organização molecular do colágeno.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Comparar os efeitos de dois comprimentos de onda (685nm e 830nm) em diferentes doses do laser de baixa potência no processo de reparo tecidual do tendão calcâneo de ratos.

#### **3.2 Específicos**

- Determinar o estado de concentração e agregação do tecido colágeno;
- Analisar a organização linear das fibras colágenas no tecido tendíneo;
- Verificar a deposição das fibras no local da tenotomia;
- Comparar os resultados obtidos com diferentes doses do laser sobre as variáveis de avaliação definidas;
- Fazer uma análise qualitativa, por meio da birrefringência do colágeno, do processo de reparo tendíneo.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS**

Foram utilizados 48 animais machos (*Rattus norvegicus albinus*), da raça Wistar, com 12 semanas de idade e peso corporal entre  $225 \pm 25$ g provenientes do biotério central da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Estes permaneceram no biotério do Laboratório de Eletrotermofoterapia da mesma Universidade, em gaiolas de polipropileno padrão, agrupados em número de 4 animais, mantidos em ambiente higienizado com iluminação em ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo água e ração balanceada *ad libitum*.

### **4.2 MODELO EXPERIMENTAL**

O modelo utilizado neste estudo foi baseado nos experimentos de ENWEMEKA et al. (2000); REDDY et al. (1998a); REDDY et al. (1997); GUM et al. (1997); STEHNO-BITTEL, (1997); ENWEMEKA, (1991); ENWEMEKA et al. (1990); ENWEMEKA, (1989); ENWEMEKA, (1988), ao promoverem uma tenotomia total na porção média do tendão calcâneo de coelhos através de uma incisão transversal do tendão dissecado.

### **4.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS**

Os animais foram divididos aleatoriamente em 3 grupos experimentais contendo 16 elementos cada um ( $n=16$ ). Cada grupo foi dividido aleatoriamente em dois subgrupos, sendo os grupos 1 e 2 experimentais e o grupo 3 controle. O grupo 1 foi dividido em subgrupos A e B; o grupo 2 foi dividido em subgrupos C e D e o grupo 3 em subgrupos E e F.

**Grupo 1 (n=16):**

- Subgrupo A (n=8): Neste subgrupo o tendão calcâneo lesado pela tenotomia recebeu irradiação com laser vermelho (685 nm) contínuo, potência de 15 mW e dose de 3 J/cm<sup>2</sup>.
- Subgrupo B (n=8): Neste subgrupo o tendão lesado pela tenotomia recebeu irradiação com laser vermelho (685 nm) contínuo, potência de 15 mW e dose de 10 J/cm<sup>2</sup>.

Para efeito didático, os subgrupos experimentais do grupo 1 serão denominados pelo tipo de laser utilizado e pelo valor da dose administrada. Sendo respectivamente subgrupos A (685 nm e 3 J/cm<sup>2</sup>) e B (685 nm, 10 J/cm<sup>2</sup>).

**Grupo 2 (n=16):**

- Subgrupo C (n=8): Neste subgrupo o tendão calcâneo lesado pela tenotomia recebeu irradiação com laser infravermelho (830 nm) contínuo, potência de 15 mW e dose de 3 J/cm<sup>2</sup>.
- Subgrupo D (n=8): Neste subgrupo o tendão calcâneo lesado pela tenotomia recebeu irradiação com laser infravermelho (830 nm) contínuo, potência de 15 mW e dose de 10 J/cm<sup>2</sup>.

Também para efeito didático os subgrupos do grupo 2 serão denominados pelo tipo de laser utilizado e pelo valor da dose administrada. Sendo denominados subgrupos C (830 nm e 3 J/cm<sup>2</sup>) e D (830 nm e 10 J/cm<sup>2</sup>).

**Grupo 3 (n=16):**

- Subgrupo E (n=8): Neste subgrupo os animais foram lesados pela tenotomia e receberam tratamento placebo com o aparelho desligado. Portanto esses animais tiveram um reparo tecidual de curso normal, sem interferências externas, porém houve o estresse da simulação do tratamento. Este subgrupo será representado pela sigla CL/PL (com lesão e tratamento placebo).

- Subgrupo F (n=8): Neste subgrupo os animais não foram lesados pela tenotomia e não receberam nenhum tipo de tratamento com laser, portanto seus tendões desenvolveram-se normalmente durante todo o período experimental. Este subgrupo será representado pela sigla CP (controle padrão).

Os animais dos subgrupos lesados não receberam nenhum tipo de imobilização, ou seja, foi permitido suporte de peso pós-cirúrgico. Pois, em um experimento realizado por ENWEMEKA (1992), tendões tenotomizados que foram submetidos à carga funcional no 5º do pós-operatório, mostraram maior área de secção transversa devida ao maior número de fibras colágenas depositadas no eixo longitudinal do tendão.

**TABELA 1- Grupos e Subgrupos experimentais**

<b>Grupos Experimentais</b>		
<b>Grupo 685 nm (n=16)</b>	<b>Grupo 830 nm (n=16)</b>	<b>Grupo Controle (n=16)</b>
A: 3 J (n=8)	C: 3 J (n=8)	E: CL/PL (n=8)
B: 10 J (n=8)	D: 10 J (n=8)	F: CP (n=8)

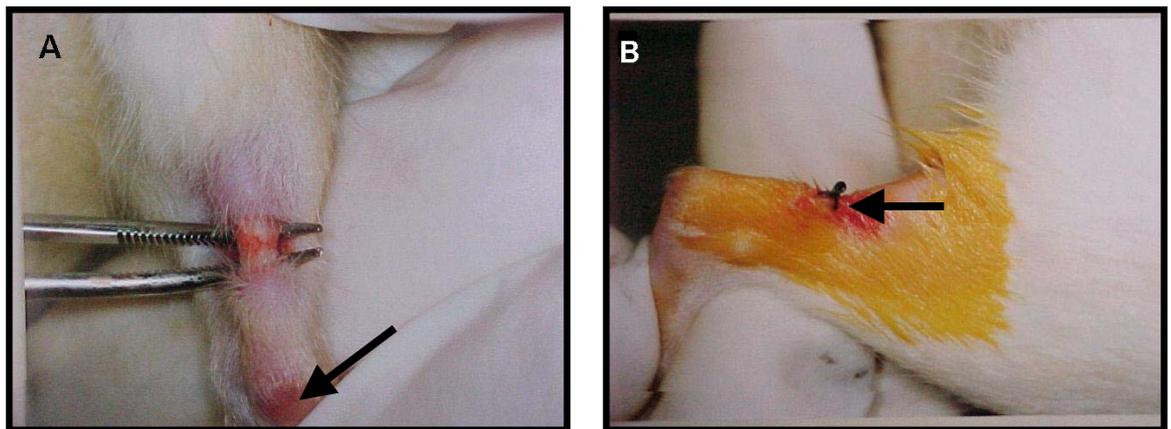
#### **4.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

##### **4.4.1 Procedimento cirúrgico**

Antes do procedimento cirúrgico todos os animais foram pesados. Os animais do grupo 1 (subgrupo A e B), grupo 2 (subgrupo C e D) e grupo 3 (subgrupo E) foram anestesiados, utilizando-se uma combinação a base de cloridrato de ketamina (95mg/Kg) e cloridrato de xilazina 2% (12mg/kg), aplicado intraperitonealmente.

A pele ao redor do tendão calcâneo da pata direita foi tricotomizada e posteriormente limpa com álcool etílico. Uma pequena incisão longitudinal sobre a pele foi feita onde o tendão calcâneo direito foi dissecado sofrendo tenotomia total por cisalhamento transversal na região medial, entre a inserção calcâneo e a junção miotendínea. Os tendões não foram suturados após a incisão cirúrgica.

Finalizando, a pele foi suturada com fio catagute 4.0 não reabsorvível e então limpa com solução de álcool iodado, afim de propiciar a higienização local. Como profilaxia antimicrobiana, de acordo com o trabalho de DAVID et al. (1996), foi administrado intraperitonealmente em dose única CEFAZOLINA (20mg/100g de peso corporal).



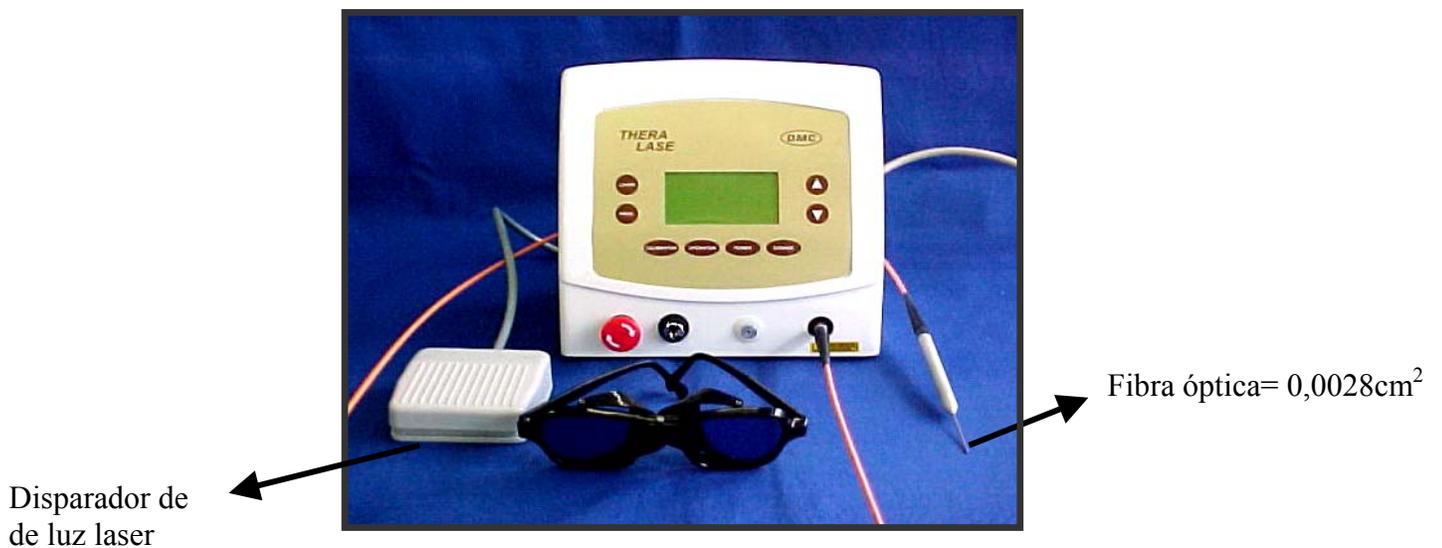
**Figura 2:** A imagem A mostra o tendão calcâneo do rato liberado e exposto (seta) para a realização da tenotomia. Na imagem B temos a pele suturada, após o procedimento cirúrgico. A seta aponta a posterior sutura da pele e o local da lesão.

#### 4.4.2 Aparelho laser de baixa potência

O equipamento utilizado foi um modelo portátil de Laser DMC, classe 3B. Sendo este modelo composto de 2 comprimentos de onda distintos.

O feixe vermelho possui um comprimento de onda de 685 nm, potência de saída de 15 mW, contínuo e densidade de potência de  $5,4 \text{ W/cm}^2$ , área da fibra de  $0,0028 \text{ cm}^2$ , área do feixe de  $2 \text{ mm}^2$ , divergência de  $1,5^\circ$ , com tempo de aplicação correspondente a 6 segundos e a 19 segundos, respectivamente nas doses de  $3 \text{ J/cm}^2$  e  $10 \text{ J/cm}^2$ .

O diodo GaAlAs possui um comprimento de onda 830 nm, potência de saída de 15 mW, contínuo e densidade de potência de  $5,4 \text{ W/cm}^2$ , área da fibra de  $0,0028 \text{ cm}^2$ , área do feixe de  $2 \text{ mm}^2$ , divergência de  $1,5^\circ$ , com tempo de aplicação correspondente a 6 segundos e a 19 segundos, respectivamente nas doses de  $3 \text{ J/cm}^2$  e  $10 \text{ J/cm}^2$ .



**Figura 3:** Equipamento laser utilizado no estudo

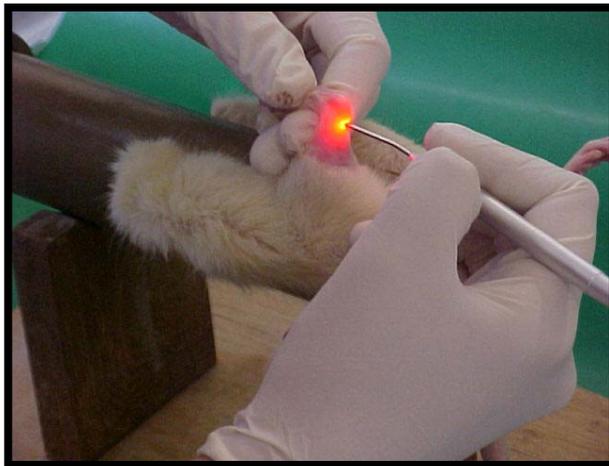
#### 4.4.3 Procedimento Experimental

No primeiro e no último dia do procedimento experimental o equipamento laser foi aferido e calibrado no Grupo de Óptica da Universidade de São Paulo (USP) – Campus de São Carlos, afim de se obter uma alta confiabilidade da intensidade efetiva da emissão laser.

A terapia laser teve início 24 horas após a tenotomia. O tratamento constou de 12 sessões, durante 12 dias consecutivos e ininterruptos. Todo o procedimento experimental foi realizado num período do dia determinado.

Para a realização do tratamento os animais dos grupos 1 (subgrupo A e B), grupo 2 (subgrupo C e D) e grupo 3 (subgrupo E), foram sedados com éter etílico e mantidos no contensor de animais.

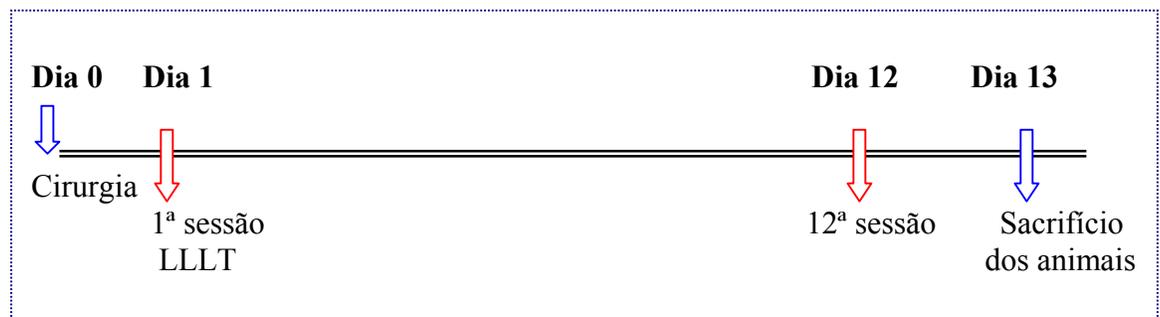
As aplicações foram feitas através da técnica de contato, onde a fibra óptica foi mantida perpendicular à pele, irradiando-se por fotoestimulação transcutânea um único ponto correspondente a área da lesão.



**Figura 4: Irradiação pontual dos tendões lesados tratados com laser 685 nm e 830 nm.**

Os animais do grupo 3 (subgrupo F ) permaneceram em suas gaiolas durante todos os dias do procedimento experimental.

Os animais foram sacrificados no 13º dia após a tenotomia através da inalação excessiva de éter etílico e seus tendões direitos foram retirados cirurgicamente por dissecação desde a inserção calcanear até a junção miotendínea. Imediatamente os tendões foram lavados em solução salina a 0.9%, onde foram preparados para os demais procedimentos empregados na coleta de dados.



**Figura 5:** Esquema do protocolo de tratamento aplicado aos subgrupos experimentais

#### 4.5 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS E ANÁLISES DE DADOS

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

Logo após os tendões foram lavados em água corrente por 24 horas para em seguida, serem desidratados em soluções crescentes de álcool etílico, a 70%, 90% por uma hora em cada solução e em seguida passaram por 6 banhos de 1 hora cada na solução de álcool a 100%.

Após os banhos em álcool a 100% os tendões foram diafanizados em solução de álcool/xilol 1:1 por 1 hora, em seguida passaram por 2 banhos de xilol puro; onde a duração de cada banho foi de 1 hora cada um.

Os tendões foram retirados do xilol e colocados imediatamente em parafina líquida (60°C). Após algumas horas essa parafina foi substituída por uma segunda parafina (Paraplast). Durante o segundo banho de parafina as peças foram levadas a uma estufa a vácuo onde permaneceram por um período de 2 horas, posteriormente os blocos foram confeccionados para obtenção dos cortes histológicos.

Os tendões inclusos nos blocos de parafina foram cortados longitudinalmente em cortes semi-seriados por meio de um micrótomo rotativo da marca Ancap, com espessura padronizada de 7 micras no Laboratório de Anatomia da Universidade Federal de São Carlos. Os cortes foram montados em lâminas histológicas sem cobertura por lamínulas e/ou coloração.

Cada lâmina histológica foi montada com uma série de no mínimo 3 cortes consecutivos de cada tendão e cada grupo de animais foi representado por 16 lâminas histológicas montadas com seus respectivos tendões.

Após serem montadas, todas as lâminas foram desparafinizadas e hidratadas novamente (ANEXO A).

#### **4.6 MEDIDAS DE BIRREFRINGÊNCIA**

A análise das fibras de colágeno foi realizada utilizando para isso uma de suas propriedades anisotrópicas ópticas: a birrefringência total, através da microscopia de polarização.

Para a efetivação da análise de birrefringência total as lâminas histológicas de cada subgrupo, foram imersas por 30 minutos em água destilada, cujo índice de refração é de ( $n = 1,333$ ), antes da análise no microscópio de polarização, em referência aos estudos de VIDAL, (1987b). As medidas de OR em H<sub>2</sub>O representam a soma das birrefringências intrínseca e textural dos feixes de colágeno.

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

As medidas dos retardos ópticos (OR em nm), foram obtidas pela microscopia de luz polarizada no microscópio Zeiss, com uma objetiva Pol 10x/0,22, condensador 0,9 compensador de Sénarmont  $1 / 4 \lambda$ , luz monocromática  $\lambda = 546 \text{ nm}$ , obtida por meio de um filtro de interferência Zeiss; no Laboratório de Biologia Celular da Universidade Estadual de Campinas UNICAMP, sob a orientação do Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal.

Levando-se em consideração a possibilidade que podem ocorrer modificações no curso das fibras de colágeno em relação ao eixo longitudinal do tendão foram feitas medidas em duas posições; com o eixo do tendão a  $45^\circ$  em relação ao polarizador e analisador; e medidas com o alinhamento do eixo longo dos tendões com o polarizador em zero graus em relação ao analisador do microscópio. É conhecido que a  $45^\circ$  as fibras de colágeno exibem o maior brilho de birrefringência e conseqüentemente um alto valor de OR, isso ocorre pois a maioria das fibras de colágeno se orientam no eixo longo do tendão. Porém, algumas fibras podem orientar-se com variações de direção ao eixo longo do tendão, esse fato ocorre também em tendões em processo de reparação. Este achado pode ser analisado com o eixo longo do tendão paralelo ao polarizador ou ao analisador do microscópio.

Primeiramente foram realizadas cinco medidas de OR para cada tendão dos subgrupos estudados com o eixo orientado a  $45^\circ$  do polarizador. As medidas foram feitas em diferentes pontos das regiões centrais dos tendões, que correspondem a região da lesão por tenotomia total, totalizando um total de 40 medidas ( $N = 40$ ) para cada subgrupo estudado (A, B, C, D, E e F).

Posteriormente, o eixo longo dos tendões dos subgrupos estudados foram alinhados a zero graus ou paralelos ao polarizador. Nesta posição foram tomadas cinco medidas de cada tendão dos subgrupos estudados, totalizando 40 medidas ( $N = 40$ ) para cada subgrupo em estudo (A, B, C, D, E e F).

Para a análise qualitativa os tendões foram fotografados no microscópio de polarização da marca Leica DMRx, aumento de 10x com um analisador de imagens KS 200

versão 3.0 do Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de São Carlos.

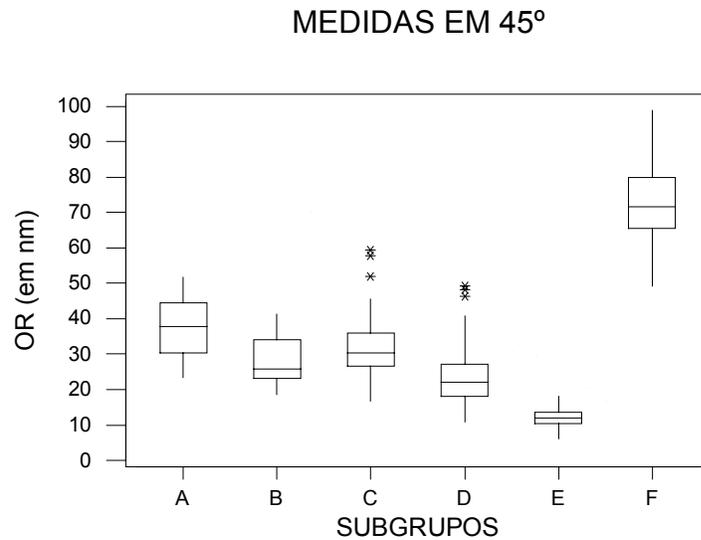
#### **4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Para verificar se houve diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos estudados (A, B, C, D, E e F), estes foram comparados dois a dois utilizando o teste não paramétrico de comparações múltiplas através do programa MINITAB. Foi considerado um nível de significância com valor de  $p \leq 0,001$  e  $p \leq 0,05$ .

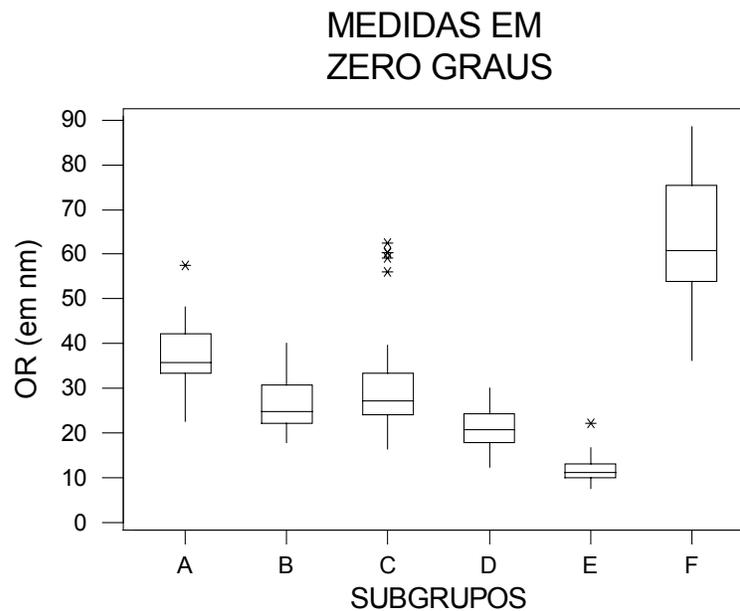
##### **Distribuição das medidas feitas a 45° e a zero graus**

Para visualizar o formato das distribuições das medições nos 6 subgrupos (simetrias e assimetrias), compará-las graficamente e identificar possíveis valores atípicos da OR (em nm), foram construídos os desenhos esquemáticos (boxplot), considerando somente as 5 repetições em 45° e depois as 5 repetições em zero graus para cada tendão estudado. Os resultados são apresentados nas figuras 7 e 8.

Nota-se diferenças evidentes nas correspondentes distribuições das medidas feitas em 45° e em zero graus, e a ocorrência de assimetrias em ambas as situações. O desenho esquemático mostra que a variabilidade no subgrupo D diminui significativamente quando se passa para a situação de medições em zero graus.



**Figura 6: Distribuições das medições de OR (em nm) de fibras de colágeno, considerando somente as repetições em 45°.**



**Figura 7: Distribuições das medições de OR (em nm) de fibras de colágeno, considerando somente as repetições em zero graus.**

Apesar da manutenção do mesmo padrão comparativo entre os subgrupos nas figuras 6 e 7, observa-se diferenças significativas no formato e variabilidades das correspondentes distribuições. Assim, torna-se recomendável análises separadas para cada tipo de medição.

Para uma comparação estatística mais rigorosa dos seis subgrupos estudados, e verificação da indicação de diferença entre os tipos de medida (em 45° e a zero graus) torna-se necessário a aplicação de métodos estatísticos não paramétricos equivalentes (como os baseados em postos das observações), os quais são mais robustos que os seus correspondentes paramétricos sob violação dessas condições.

### **Comparação estatística entre os seis grupos estudados**

Como deveriam ser comparados mais de dois subgrupos independentes, isto é, seis subgrupos cujos tendões pertenciam a diferentes ratos, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

O teste de Kruskal-Wallis compara a igualdade das medianas de dois ou mais grupos.

Este teste foi primeiro aplicado às médias ME1, das medições na posição 45°, em seguida foi aplicado às médias ME2, das medições a zero graus. Os resultados são resumidos na tabela a seguir.

**Tabela 2: Resultados do teste de Kruskal-Wallis para a verificação da diferença entre os subgrupos estudados.**

Tipo de medição	Tipo de dado	p valor
45°	ME1	0,000
Zero Graus	ME2	0,000

Observa-se que o teste rejeitou a igualdade entre os subgrupos A, B, C, D, E e F a um nível de significância menor que 0,1% ( $p < 0,001$ ) nas duas situações analisadas (45° e a zero graus). Portanto usou-se, um teste de comparações múltiplas, para identificar quais subgrupos diferem entre si.

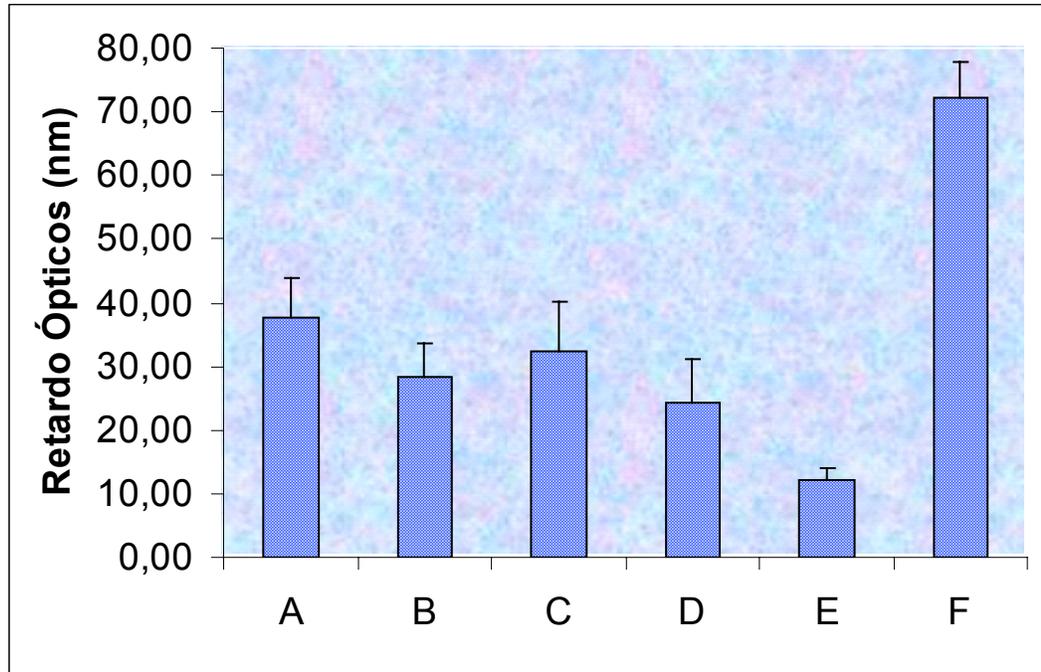
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Análise Quantitativa

A tabela 3 e a figura 8 mostram os valores médios e desvios padrão referentes aos valores de retardos ópticos (OR em nm) dos tendões dos subgrupos experimentais analisados a 45° em relação ao polarizador e analisador. Cabe ressaltar que foram feitas cinco medidas na posição de 45° em relação ao polarizador e analisador de cada um dos 8 tendões que constituíram cada subgrupo estudado totalizando 40 observações em cada um dos subgrupos ( $N = 40$ ).

**Tabela 3:** Médias e Desvios Padrão dos valores de retardo óptico (OR em nm) de fibras de colágeno de tendões calcaneares de ratos analisadas em 45° em relação ao polarizador e analisador para os subgrupos em estudo: A, B, C, D, E e F

Subgrupos	N	Média	Desvio Padrão
A (685 nm, 3J)	40	37,67	6,13
B (685 nm, 10J)	40	28,32	5,36
C (830 nm, 3J)	40	32,32	7,83
D (830 nm, 10J)	40	24,43	6,66
E (CL/PL)	40	12,11	1,75
F (CP)	40	72,19	5,54

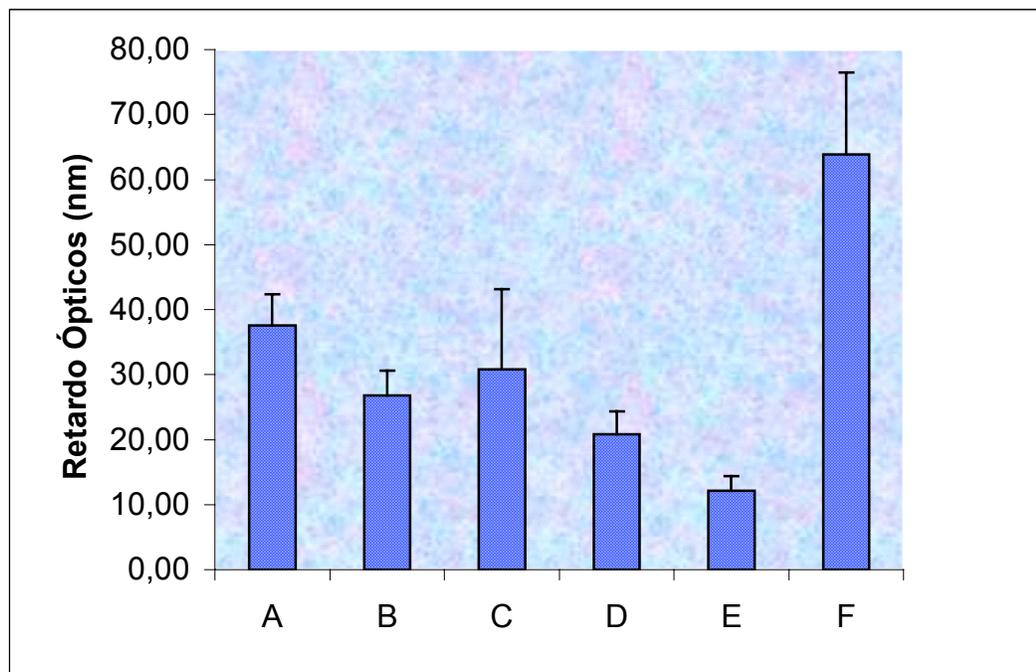


**Figura 8:** Médias e Desvios Padrão dos retardo ópticos, em nanômetros (nm) (N=40) observados através da microscopia de luz polarizada dos tendões calcaneares de ratos em relação aos diferentes subgrupos estudados

A tabela 4 e a figura 9 representam as médias e desvios padrão referentes aos valores de retardos ópticos (OR em nm) dos tendões dos subgrupos experimentais observados com o alinhamento do eixo longo dos tendões orientados em zero graus em relação ao polarizador do microscópio. Foram realizadas cinco medidas de cada um dos 8 tendões que constituíram cada subgrupo estudado totalizando 40 observações em cada um dos subgrupos (N = 40). As medidas foram realizadas com o alinhamento do eixo longo dos tendões orientados em zero graus ou paralelos ao polarizador do microscópio.

**Tabela 4:** Médias e Desvios Padrão dos valores de retardo óptico (OR em nm) de fibras de colágeno de tendões calcaneares de ratos observadas com o alinhamento do eixo longo dos tendões a zero graus ao polarizador para os subgrupos em estudo: A, B, C, D, E e F

SUBGRUPOS	N	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
A (685 nm, 3J)	40	37,53	4,84
B (685 nm, 10J)	40	26,80	3,83
C (830 nm, 3J)	40	30,76	12,37
D (830 nm,10J)	40	20,84	3,48
E (CL/PL)	40	12,12	2,22
F (CP)	40	63,86	12,65



**Figura 9:** Médias e Desvios Padrão dos retardo ópticos, em nanômetros (nm) (N=40) observados através da microscopia de luz polarizada dos tendões calcaneares de ratos em relação aos diferentes subgrupos estudados

Com relação ao grau de birrefringência apresentado pelas fibras de colágeno tipo I na área de reparo tendíneo, foi possível através da análise do valor de retardo óptico (OR em nm) obter e comparar a efetividade dos diferentes tratamentos propostos.

Para verificar se houve diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos estudados, os subgrupos foram comparados dois a dois usando o teste estatístico não paramétrico de comparações múltiplas feito através do programa estatístico MINITAB (TABELA 5 e 7).

**Tabela 5:** Valores de p obtidos através do teste de comparações múltiplas para as medidas feitas em 45° em relação ao polarizador e analisador. Comparação valores de retardo óptico (OR em nm) de todos os subgrupos em estudo: A (685 nm, 3J), B (685 nm, 10J), C (830 nm, 3J), D (830 nm, 10J), E (CL/PL), F (CP)

Subgrupos Comparados	P	Comparações Múltiplas
A x B	0,0017	*
A x C	0,0291	*
A x D	0,0000	**
A x E	0,0000	**
A x F	0,0008	**
B x C	0,2816	NS
B x D	0,1093	NS
B x E	0,0000	**
B x F	0,0000	**
C x D	0,0093	**
C x E	0,0000	**
C x F	0,0000	**
D x E	0,0008	**
D x F	0,0003	**
E x F	0,0000	**

NS: não significativo; \* significativo ( $P \leq 0,05$ ); \*\* altamente significativo ( $P \leq 0,001$ )

Note-se que: quanto menor o valor de p, maior é a evidência de diferença entre os subgrupos estudados.

Na tabela 5 as medidas dos subgrupos em estudo foram tomadas a 45° do polarizador e analisador.

Em relação ao retardo óptico (OR em nm) podemos observar que os valores encontrados nos animais do subgrupo F (CP) apresentaram diferenças estatisticamente significativas ( $p \leq 0,001$ ) em relação aos valores encontrados nos animais dos demais subgrupos: A (685 nm, 3J), B (685 nm, 10J), C (830 nm, 3J), D (830nm, 10J) e E (CL/PL) respectivamente (tabela 5).

Quando comparados o subgrupo E (CL/PL) com os demais subgrupos (A, B, C, D e F) foi verificado que os valores de OR (nm) foi estatisticamente diferentes ( $p \leq 0,001$ ) que os demais subgrupos: A (685 nm, 3J), B (685 nm, 10J), C (830 nm, 3J), D (830nm, 10J) e F (CP) (tabela 5).

Essa diferença considerada altamente significativa ( $p \leq 0,001$ ) mantém-se quando comparado os valores de OR (nm) entre os subgrupos tratados A (685 nm, 3J) e D (830 nm, 10 J). Quando comparados os subgrupos tratados A (685 nm, 3J) e B (685 nm, 10J); A (685 nm, 3J) e C (830 nm, 3J); também pode-se observar uma diferença estatística significativa ( $p \leq 0,05$ ) (tabela 5).

No entanto, quando comparados os subgrupos tratados B (685 nm, 10J) e C (830 nm, 3J); B (685 nm, 10J) e D (830 nm, 10J) não observou-se diferença estatisticamente significativa, considerando  $p \leq 0,05$  (tabela 5).

Os subgrupos C (830 nm, 3J) e D (830 nm, 10J) quando comparados apresentaram uma diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ).

Quando comparado através das médias os subgrupos tratados A (685 nm, 3J) e B (685 nm, 10J) os resultados obtidos no subgrupo A foram 33% maiores que o subgrupo B. O subgrupo A (685 nm, 3J) também mostrou-se 16% maior em relação ao subgrupo C (830 nm, 3 J). Quando comparou-se a média do subgrupo A (685 nm, 3J) com o subgrupo D (830 nm, 10J), o primeiro foi 54% maior que o subgrupo D.

Embora não havendo uma diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ), o subgrupo C (830 nm, 3J) mostrou-se 14% maior quando comparado com o subgrupo B (685 nm, 10J).

O subgrupo C (830 nm, 3 J) foi 32% maior quando comparado com o subgrupo D (830 nm, 10 J).

O subgrupo B (685 nm, 10J) mostrou-se 15% maior em relação ao subgrupo D (830 nm, 10 J), mesmo não havendo uma diferença considerada estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 6:** Comparação dos resultados obtidos nos subgrupos tratados referentes a porcentagem (%) de aumento do OR (em nm) dos subgrupos estudados

Subgrupos	Porcentagem (%)
A x B	33%
A x C	16%
A x D	54%
C x B	14%
C x D	32%
B x D	15%

**Tabela 7:** Valores de p obtidos através do teste de comparações múltiplas para as medidas feitas com o alinhamento do eixo longo dos tendões em zero graus em relação ao polarizador. Comparação valores de retardo óptico (OR em nm) de todos os subgrupos em estudo: A (685 nm, 3J), B (685 nm, 10J), C (830 nm, 3J), D (830 nm, 10J), E (CL/PL), F (CP)

Subgrupos Comparados	P	Comparações Múltiplas
A x B	0,0000	**
A x C	0,0007	**
A x D	0,0000	**
A x E	0,0000	**
A x F	0,0023	**
B x C	0,1465	NS
B x D	0,0041	*
B x E	0,0000	**
B x F	0,0000	**
C x D	0,0002	**
C x E	0,0000	**
C x F	0,0000	**
D x E	0,0008	**
D x F	0,0000	**
E x F	0,0000	**

NS: não significativo; \* significativo ( $P \leq 0,05$ ); \*\* altamente significativo ( $P \leq 0,001$ )

Note-se que: quanto menor o valor de  $p$  maior é a evidência de diferença entre os subgrupos estudados.

Na tabela 7 as medidas dos subgrupos em estudo foram tomadas com o eixo longo dos tendões orientados a zero graus em relação ao polarizador do microscópio.

Em relação ao retardo óptico (OR em nm) podemos observar que os valores encontrados nos animais do subgrupo F (CP) apresentaram diferenças estatisticamente significativas ( $p \leq 0,001$ ) em relação aos valores encontrados nos animais dos demais subgrupos: B (685 nm, 10J), C (830 nm, 3J), D (830nm, 10J) e E (CL/PL) respectivamente. Quando comparado com o subgrupo A o subgrupo F mostrou diferença estatística significativa ( $p \leq 0,05$ ) (tabela 7).

Quando comparados o subgrupo E (CL/PL) com os demais subgrupos (A, B, C, D e F) foi verificado que os valores de OR (nm) foram estatisticamente diferentes ( $p \leq 0,001$ ) que os demais subgrupos: A (685 nm, 3J), B (685 nm, 10J), C (830 nm, 3J), D (830nm, 10J) e F (CP) (tabela 7).

Essa diferença considerada altamente significativa ( $p \leq 0,001$ ) mantém-se quando comparado os valores de OR (nm) entre os subgrupos tratados A (685 nm, 3J) e B (685 nm, 10J); A (685 nm, 3J) e C (830 nm, 3 J) e A (685 nm, 3J) e D (830 nm, 10J) (tabela 7).

No entanto, quando comparados os subgrupos tratados B (685 nm, 10J) e C (830 nm, 3J); não observou-se diferença estatisticamente significativa, considerando  $p \leq 0,05$ . Os subgrupos B (685 nm, 10J) e D (830 nm, 10J) quando comparados mostraram uma diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) (tabela 7).

Os subgrupos C (830 nm, 3J) e D (830 nm, 10J) quando comparados apresentaram uma diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,001$ ).

Quando comparado através das médias os subgrupos tratados A (685 nm, 3J) e B (685 nm, 10J) foi observado que o subgrupo A mostrou-se 40% maior em relação ao subgrupo B. O subgrupo A (685 nm, 3J) também foi 22% maior em relação ao subgrupo C (830 nm, 3 J). Quando comparou-se a média do subgrupo A (685 nm, 3J) com o subgrupo D (830 nm, 10J), o primeiro mostrou-se 80% maior que o subgrupo D.

O subgrupo C (830 nm, 3J) foi 14% maior em relação ao subgrupo B (685 nm, 10J), mesmo não havendo uma diferença considerada estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ).

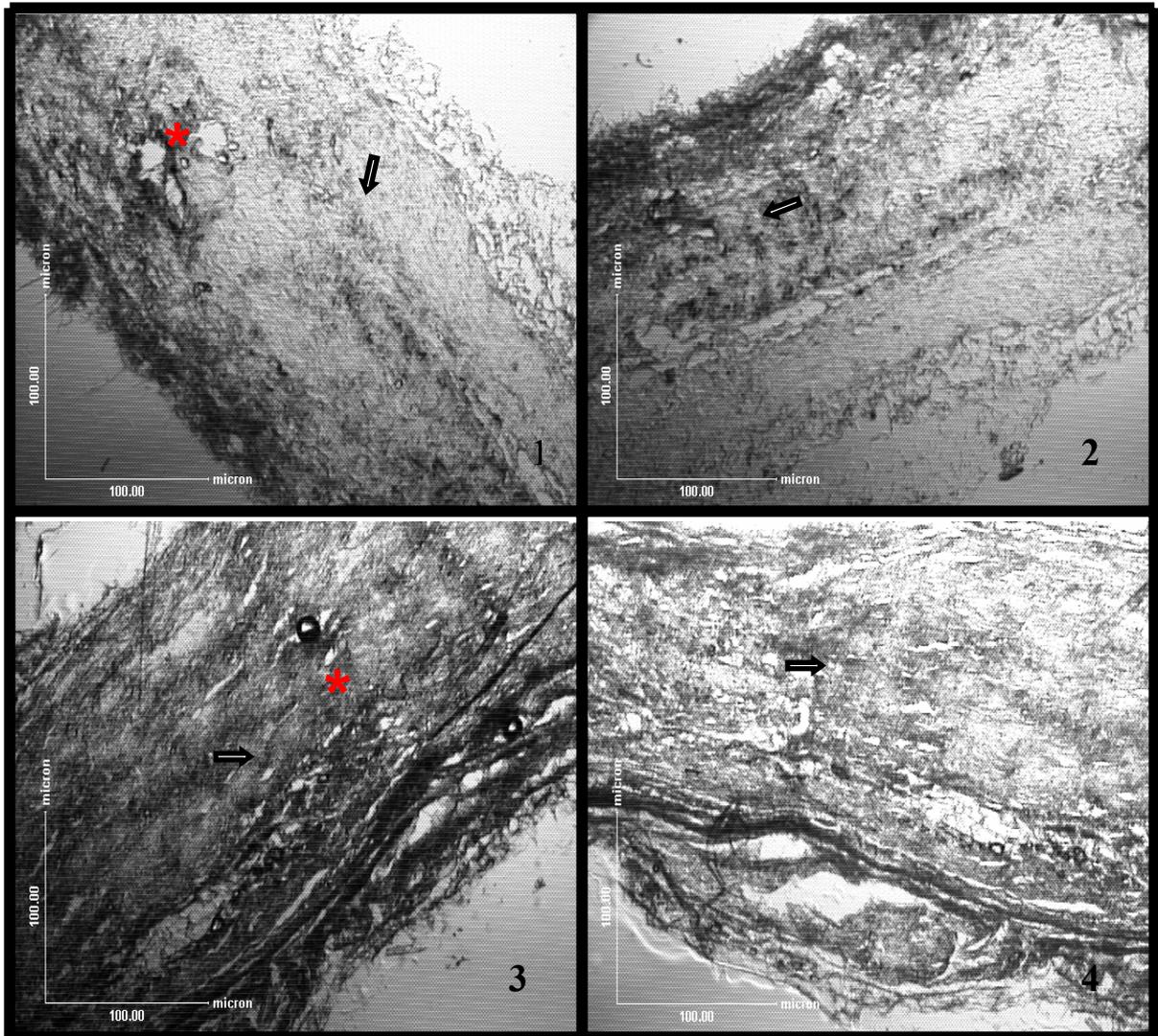
O subgrupo B (685 nm, 10J) mostrou-se 28% maior em relação ao subgrupo D (830 nm, 10J).

O subgrupo C (830 nm, 3J) mostrou-se 47% maior em relação ao subgrupo D (830 nm, 10 J).

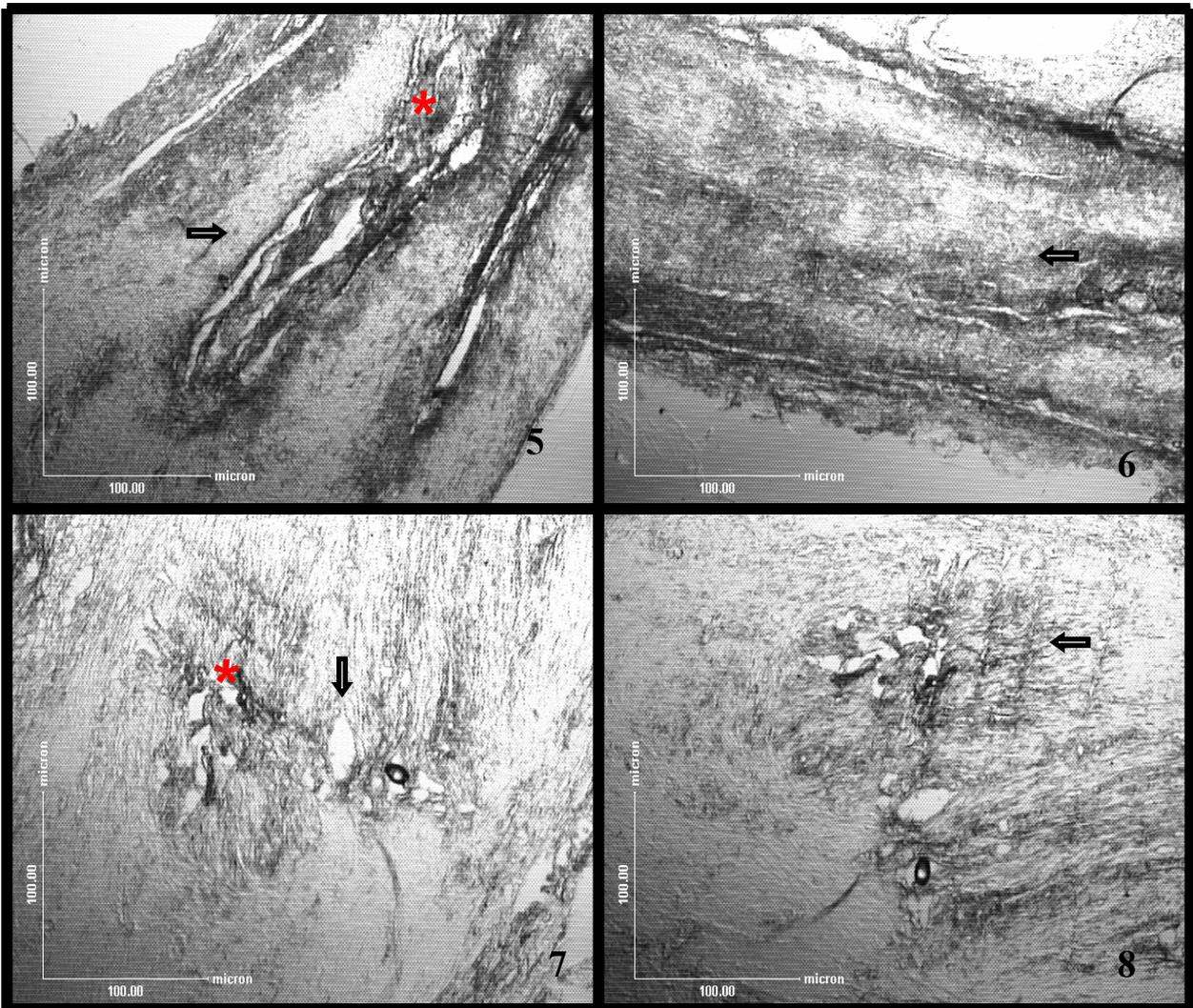
**Tabela 8:** Comparação dos resultados obtidos nos subgrupos tratados referentes a porcentagem (%) de aumento do OR (em nm) dos subgrupos estudados

Subgrupos	Porcentagem (%)
A x B	40%
A x C	22%
A x D	80%
C x B	14%
C x D	47%
B x D	28%

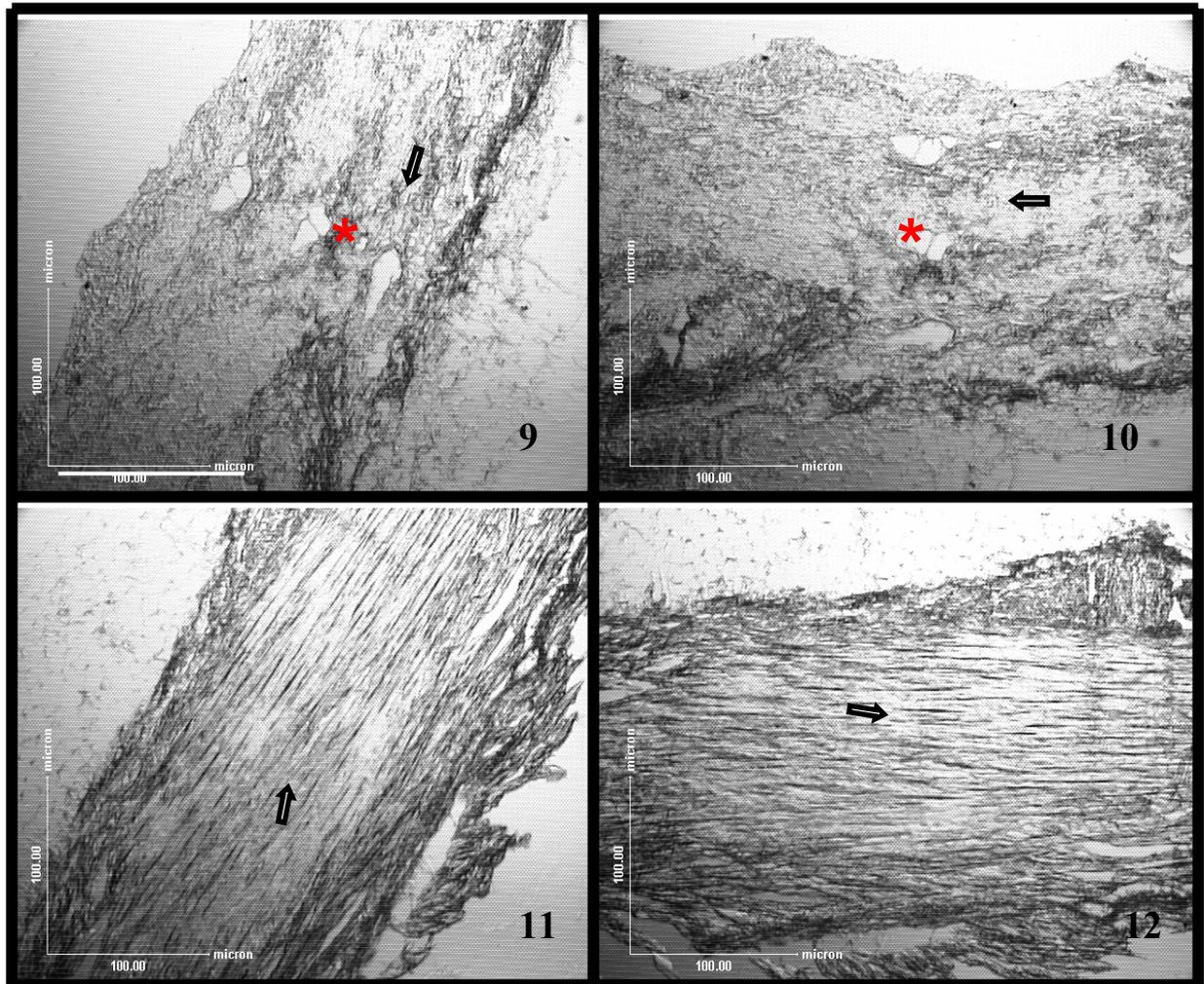
## 5.2 Análise Qualitativa



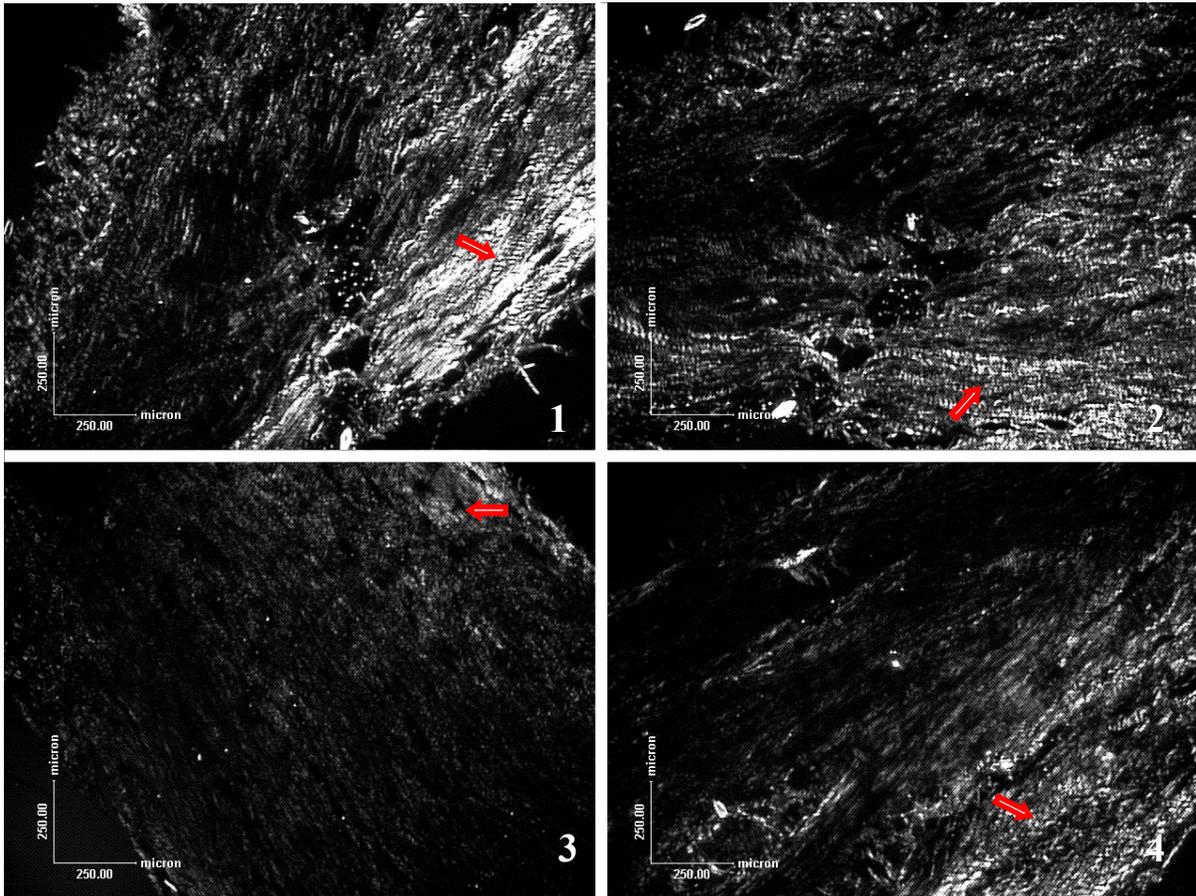
**Figura 10** - As fotomicrografias referem-se às observações qualitativas da análise de birrefringência total dos tendões por meio da microscopia de luz polarizada dos seguintes subgrupos: A e B. As imagens 1 e 3 estão alinhadas em  $45^{\circ}$  entre o polarizador e analisador. As imagens 2 e 4 correspondem ao alinhamento do eixo longo dos tendões em zero graus em relação ao polarizador. As setas mostram o alinhamento das fibras colágenas e as estrelas mostram o local da tenotomia. A barra clara corresponde a  $100\ \mu\text{m}$ .



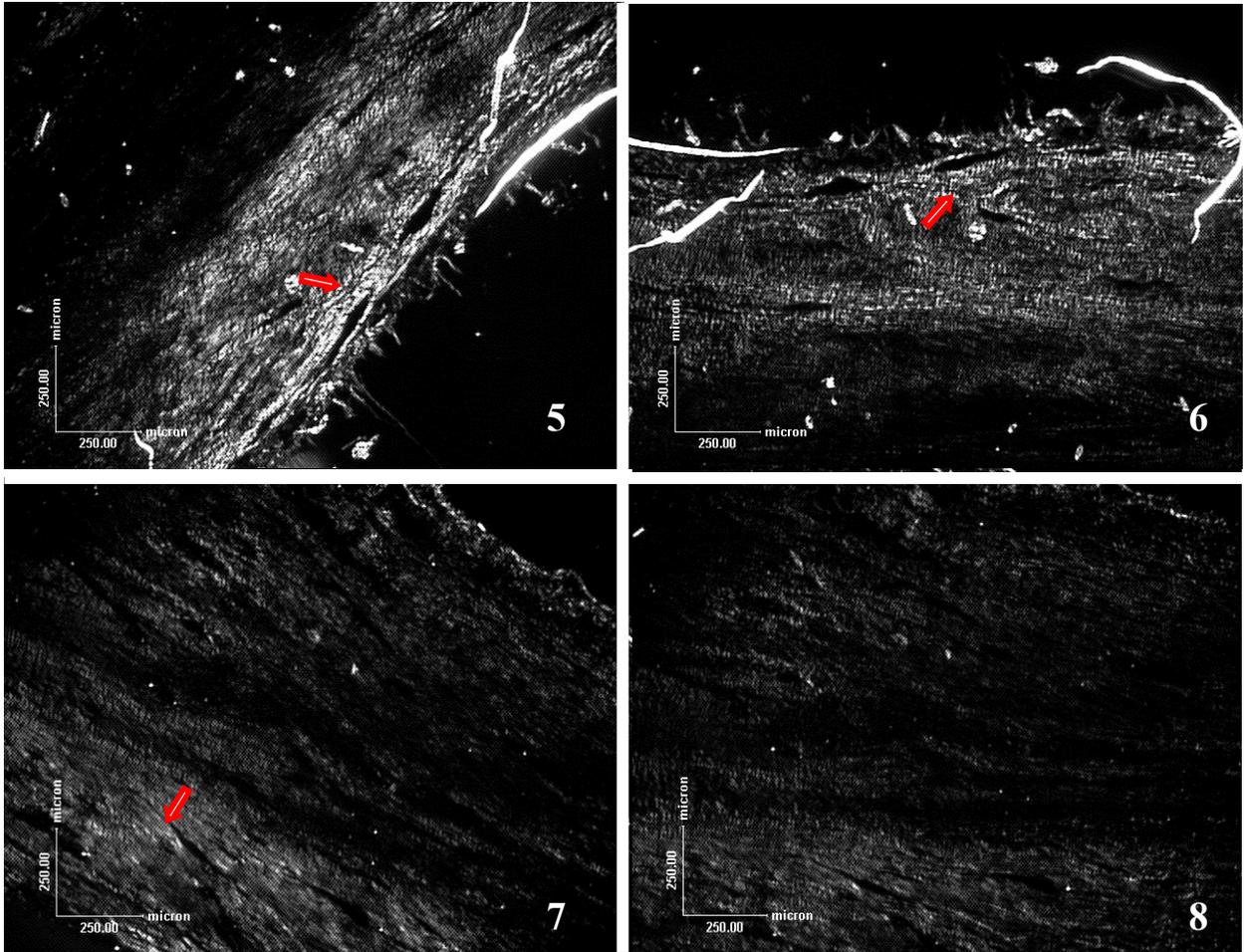
**Figura 11** - As fotomicrografias referem-se às observações qualitativas da análise de birrefringência total dos tendões por meio da microscopia de luz polarizada dos seguintes subgrupos: C e D. As imagens 5 e 7 estão alinhadas em  $45^\circ$  entre o polarizador e analisador. As imagens 6 e 8 correspondem ao alinhamento do eixo longo dos tendões em zero graus em relação ao polarizador. As setas mostram o alinhamento das fibras colágenas e as estrelas mostram o local da tenotomia. A barra clara corresponde a  $100\ \mu\text{m}$ .



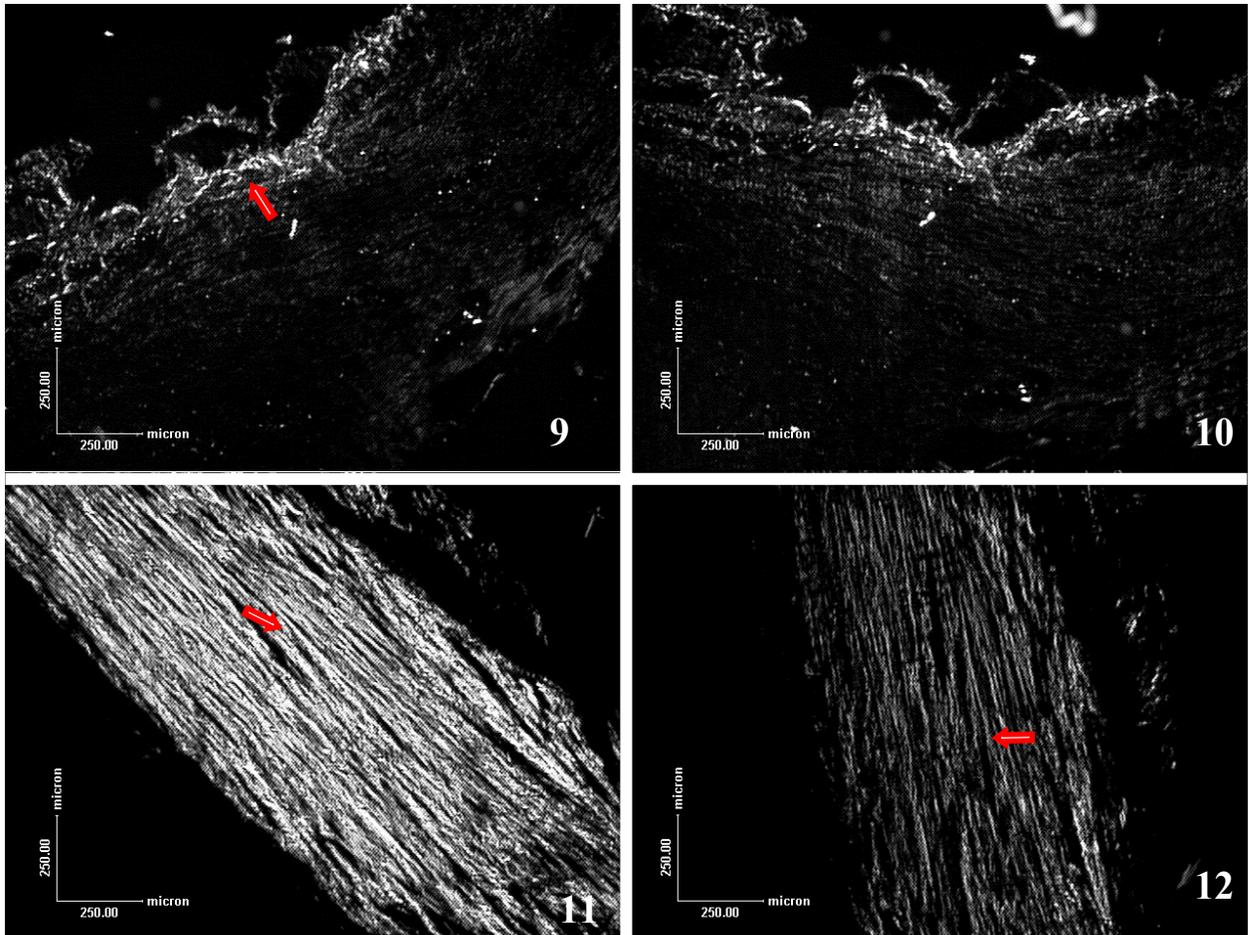
**Figura 12** - As fotomicrografias referem-se às observações qualitativas da análise de birrefringência total dos tendões por meio da microscopia de luz polarizada dos seguintes subgrupos: E e F. As imagens 9 e 11 estão alinhadas em  $45^\circ$  entre o polarizador e analisador. As imagens 10 e 12 correspondem ao alinhamento do eixo longo dos tendões em zero graus em relação ao polarizador. As setas mostram o alinhamento das fibras colágenas e as estrelas mostram o local da tenotomia. A barra clara corresponde a  $100\ \mu\text{m}$ .



**Figura 13** - As fotomicrografias referem-se às observações qualitativas da análise de birrefringência total dos tendões por meio da microscopia de luz polarizada dos seguintes subgrupos: A e B. As imagens 1 e 3 estão alinhadas em  $45^\circ$  entre o polarizador e analisador. As imagens 2 e 4 correspondem ao alinhamento do eixo longo dos tendões em zero graus em relação ao polarizador. As setas mostram o brilho de birrefringência apresentado pelas fibras colágenas nos tendões estudados. A barra clara corresponde a  $250\ \mu\text{m}$ .



**Figura 14** - As fotomicrografias referem-se às observações qualitativas da análise de birrefringência total dos tendões por meio da microscopia de luz polarizada dos seguintes subgrupos: C e D. As imagens 5 e 7 estão alinhadas em  $45^{\circ}$  entre o polarizador e analisador. As imagens 6 e 8 correspondem ao alinhamento do eixo longo dos tendões em zero graus em relação ao polarizador. As setas mostram o brilho de birrefringência apresentado pelas fibras colágenas nos tendões estudados. A barra clara corresponde a 250  $\mu\text{m}$ .



**Figura 15** - As fotomicrografias referem-se às observações qualitativas da análise de birrefringência total dos tendões por meio da microscopia de luz polarizada dos seguintes subgrupos: E e F. As imagens 9 e 11 estão alinhadas em  $45^\circ$  entre o polarizador e analisador. As imagens 10 e 12 correspondem ao alinhamento do eixo longo dos tendões em zero graus em relação ao polarizador. As setas mostram o brilho de birrefringência apresentado pelas fibras colágenas nos tendões estudados. A barra clara corresponde a  $250\ \mu\text{m}$ .

Nas figuras 10, 11 e 12, podemos observar a concentração, estado de agregação, orientação e deposição das fibras colágenas no local da tenotomia por meio da microscopia de luz polarizada. As imagens da esquerda (1, 3, 5, 7, 9 e 11) estão alinhadas em 45° entre o polarizador e o analisador. As imagens da direita (2, 4, 6, 8, 10 e 12) correspondem as observações do alinhamento do eixo longo dos tendões a zero graus ou paralelo ao polarizador.

Nas figuras 13, 14 e 15 podemos observar o brilho de birrefringência apresentado pelas fibras colágenas nos tendões estudados. As imagens da esquerda (1, 3, 5, 7, 9 e 11) estão alinhadas em 45° entre o polarizador e o analisador. As imagens da direita (2, 4, 6, 8, 10 e 12) correspondem as observações do alinhamento do eixo longo dos tendões a zero graus ou paralelo ao polarizador.

A figura 10 refere-se aos tendões dos animais dos subgrupos tratados com laser: A (685 nm, 3J – imagens: 1 e 2) e B (685 nm, 10 J – imagens: 3 e 4). A figura 11 mostra os tendões dos subgrupos tratados C (830 nm, 3J – imagens: 5 e 6) e D (830 nm, 10J – imagens: 7 e 8).

As imagens 1 e 2 da figura 10 mostram uma melhor organização e paralelismo das fibras de colágeno dos tendões do subgrupo A (685 nm e 3 J) (ponta da seta), quando comparadas com as imagens dos tendões dos demais subgrupos que receberam tratamento laser. O local da tenotomia nas imagens 1 e 2 do subgrupo A (685 nm, 3 J), esta quase que totalmente preenchido por fibras colágenas (estrela).

Nos subgrupos B (685 nm, 10 J) e D (830 nm, 10 J) a concentração, estado de agregação e orientação das fibras colágenas (seta), assim como a deposição das mesmas no local da tenotomia (estrela) se mostram um pouco diminuídas.

O subgrupo C (830 nm, 3J), mostra um certo grau de organização e estado de agregação das fibras colágenas (seta), como uma quantidade considerável das mesmas no local da tenotomia (estrela), mostrando-se melhor que os subgrupos B e D. Porém, comparado ao subgrupo A (685 nm, 3J) o subgrupo C (830 nm, 3J) apresenta nível de organização e agregação das fibras assim como deposição das mesmas no local da tenotomia inferior ao subgrupo A (685 nm, 3J).

A figura 12 mostra os tendões dos animais do subgrupo controle lesado e tratamento placebo (imagens: 9 e 10) e os tendões dos animais do subgrupo controle padrão (imagens: 11 e 12).

As imagens 11 e 12 (figura 12) mostram o alto grau de agregação e organização das fibras colágenas (seta), fato que não pode ser observado nos tendões das imagens 9 e 10 do subgrupo controle lesado e tratamento placebo .

Na figura 12, a estrela mostra nas imagens 9 e 10 dos tendões do subgrupo controle lesado e tratamento placebo a falta de deposição das fibras colágenas no local da tenotomia quando comparada com os demais subgrupos tratados com laser.

A figura 13 refere-se aos tendões dos animais dos subgrupos tratados com laser: A (685 nm, 3J – imagens: 1 e 2) e B (685 nm, 10 J – imagens: 3 e 4). A figura 14 mostra os tendões dos subgrupos tratados C (830 nm, 3J – imagens: 5 e 6) e D (830 nm, 10J – imagens: 7 e 8).

As imagens 1 e 2 da figura 13 mostram um maior brilho de birrefringência das fibras de colágeno dos tendões do subgrupo A (685 nm e 3 J) (ponta da seta), quando comparadas com as imagens dos tendões dos demais subgrupos que receberam tratamento laser.

Nos subgrupos B (685 nm, 10 J – imagens 3 e 4: figura 13) e D (830 nm, 10 J – imagens 7 e 8: figura 14) o brilho de birrefringência apresentado pelas fibras colágenas (seta) se mostra um pouco diminuído.

O subgrupo C (830 nm, 3J – imagens 5 e 6: figura 14), mostra um certo brilho de birrefringência (seta), mostrando-se melhor que os subgrupos B e D. Porém, comparado ao subgrupo A (685 nm, 3J) o subgrupo C (830 nm, 3J) mostra um menor brilho de birrefringência.

A figura 15 mostra os tendões dos animais do subgrupo controle lesado e tratamento placebo (imagens: 9 e 10) e os tendões dos animais do subgrupo controle padrão (imagens: 11 e 12).

Podemos observar nas regiões demarcadas por pontas de setas a morfologia do *crimp* com diferenças evidentes nas dimensões das fibras e periodicidade das ondulações entre os dois subgrupos (controle lesado e controle padrão). As imagens 11 e 12 (figura 15)

mostram o alto grau de paralelismo das fibras colágenas, assim como um alto brilho de birrefringência (seta), fato que não pode ser observado nos tendões das imagens 9 e 10 (figura 15) do subgrupo controle lesado e tratamento placebo .

Todos os subgrupos tratados com laser e o subgrupo controle padrão mostraram melhor concentração, estado de agregação e orientação das fibras colágenas que o subgrupo controle lesado/tratamento placebo. No entanto, mesmo com o tratamento laser nenhum dos subgrupos tratados atingiu o grau de organização, agregação e orientação das fibras colágenas como o subgrupo controle padrão.

## 6 DISCUSSÃO

O processo de reparação tendínea vem sendo estudado experimentalmente através da tenotomia induzida (ENWEMEKA et al., 2000; REDDY et al., 1998a; REDDY et al., 1997; GUM et al., 1997; STEHNO-BITTEL, 1997; ENWEMEKA, 1991; ENWEMEKA et al., 1990; ENWEMEKA, 1989; ENWEMEKA, 1988). Muitos autores têm utilizado o modelo de tenotomia para investigar a influência de agentes terapêuticos sobre o reparo tendíneo, dentre eles a LLLT. O tendão de rato por sua vez, oferece a vantagem de ser um tecido superficial, minimizando ao máximo o trauma cirúrgico e facilitando assim a execução da técnica experimental. A escolha do modelo experimental é fundamental para a obtenção de resultados reprodutíveis. Portanto, com base na literatura foi utilizado no presente estudo o modelo experimental de tenotomia induzida em tendões calcaneares de ratos, para investigar o efeito do laser terapêutico de baixa potência no processo de reparação tendínea. Especial atenção foi dada a padronização das variáveis citadas acima, de acordo com os resultados obtidos nas publicações de CUNHA, 2001; ENWEMEKA et al. 2000; REDDY et al. 1998a; REDDY et al. 1997; GUM et al. 1997; STEHNO-BITTEL, 1997; ENWEMEKA, 1991; ENWEMEKA et al. 1990; ENWEMEKA, 1989; ENWEMEKA, 1988, que evidenciaram a ação de agentes terapêuticos sobre o processo de reparação tecidual em tendões calcaneares tenotomizados.

Como metodologia de avaliação proposta, consideramos que o processo de reparação tendínea possa ser melhor estudado e compreendido através de avaliações quantitativas, assim como qualitativas das alterações que ocorrem na concentração, estado de agregação, orientação e deposição das fibras de colágeno no local da tenotomia. Os métodos ou critérios de avaliação empregados neste trabalho foram utilizados por vários autores, no estudo de agentes terapêuticos e fatores como aquecimento, exercício e outros processos fisiológicos que influenciam no processo de reparação tendínea (CUNHA, 2001; WHITTAKER & CANHAM 1991; VILARTA & VIDAL, 1989; VIDAL, 1987b; PIMENTEL, 1981; VIDAL et al., 1975; MELLO et al., 1975).

## Aspectos Quantitativos das Medidas a 45°

Os resultados presentes neste trabalho demonstraram que as células fibroblásticas e as moléculas de colágeno, durante os 13 dias do processo de reparo tecidual, responderam ao tratamento com LLLT, colaborando com os resultados de ENWEMEKA & REDDY, 2000; PAOLINI & PAOLINI-PISANI, 2000; BJORDAL, 2000; PARIZOTTO & BARANAUSKAS, 1998a; PARIZOTTO & BARANAUSKAS, 1998b; ROBERTO, 1998; REDDY et al., 1998a; GUM et al. 1997; ENWEMEKA et al. 1994; SCHMITT et al. 1993; ENWEMEKA, 1992b; ENWEMEKA, 1991; ENWEMEKA et al., 1990; ENGLAND et al. 1989; LONGO et al., 1987.

O tratamento com LLLT (685 nm, 3J), promoveu um efeito estimulante no processo de reparo tecidual com aumento do estado de agregação ordenado das fibras de colágeno evidenciado pelo maior brilho de birrefringência representado quantitativamente pelo valor de OR (em nm), estatisticamente maior ( $p \leq 0,05$ ), que os valores de OR obtidos nos tendões dos subgrupos B (685 nm, 10J) e C (830 nm, 3J). O tratamento A (685 nm, 3J), mostrou-se 33% maior em relação ao tratamento B (685 nm, 10J), quanto ao valor de OR. Em relação ao tratamento C (830 nm, 3J) o tratamento A (685 nm, 3J) foi 16% maior. Considerando uma diferença estatística de  $p \leq 0,001$  o subgrupo A (685 nm, 3J) diferiu-se do subgrupo D (830 nm, 10J), mostrando-se 54% superior a este quanto ao valor de OR.

Segundo os dados deste trabalho quando comparou-se os subgrupos B (685 nm, 10J) e C (830 nm, 3J); B (685 nm, 10J) e D (830 nm, 10J) não constatou-se diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ). Porém, em relação a porcentagem (%) de aumento no valor de OR, o tratamento C (830 nm, 3J) foi 14% maior que o tratamento B (685 nm, 10J) e este 15% maior que o tratamento D (830 nm, 10J) quanto ao valor de OR.

Os resultados obtidos entre a comparação dos subgrupos C (830 nm, 3J) e D (830 nm, 10J) mostraram uma diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ), sendo que neste caso o tratamento C (830 nm, 3J) foi 32% superior quanto ao valor de OR do tratamento D (830 nm, 10J).

As observações de valor de OR significativamente maior para o subgrupo F (controle padrão), quando comparado com os valores de OR dos demais subgrupos

tenotomizados: A, B, C, D e E ( $p \leq 0,001$ ), podem ser explicados pelo alto grau de organização e empacotamento das fibras de colágeno nos tendões deste subgrupo, uma vez que não sofreram nenhum tipo de lesão. Esses dados estão condizentes com o trabalho de VIDAL & CARVALHO (1990), tanto em relação a idade do animal como a espessura do corte do tendão na lâmina, demonstrando uma acuracidade das medidas.

Os animais do subgrupo E (controle lesado), apresentaram valores de OR estatisticamente menores ( $p \leq 0,001$ ) que os valores de OR encontrados no subgrupo F (controle padrão), o que já era esperado, pois o subgrupo E (controle lesado) representa uma cicatrização sem intervenção de um mecanismo externo. Este subgrupo quando comparado com os demais subgrupos tratados com a LLLT (A, B, C e D) também apresentou valor de OR estatisticamente inferior ( $p \leq 0,001$ ) este fato confirma os resultados obtidos por vários autores que demonstraram que a LLLT produz um efeito benéfico sobre tendões em processo de reparação (ENWEMEKA & REDDY, 2000; PAOLINI & PAOLINI-PISANI, 2000; BJORDAL, 2000; PARIZOTTO & BARANAUSKAS, 1998a; PARIZOTTO & BARANAUSKAS, 1998b; ROBERTO, 1998; REDDY et al., 1998a; GUM et al., 1997; ENWEMEKA et al., 1994; SCHMITT et al., 1993; ENWEMEKA, 1992b; ENWEMEKA, 1991; ENWEMEKA et al., 1990; ENGLAND et al., 1989; LONGO et al., 1987).

### **Aspectos Quantitativos das Medidas a Zero Graus**

Quando as medidas de OR (em nm) foram feitas a zero graus ou paralelas ao polarizador do microscópio algumas mudanças nos resultados estatísticos foram detectadas. Isso ocorreu, devido as modificações no curso das fibras de colágeno em relação ao eixo longo do tendão o que nos levou a realizar medidas nesta posição afim de detectar tais alterações.

Os resultados obtidos nesta análise colaboram com aqueles obtidos na análise feita a 45° onde o subgrupo A (685 nm, 3J) promoveu um efeito benéfico no processo de reparo tendíneo com aumento da síntese de colágeno no local da lesão. Neste subgrupo (685 nm, 3J) foi verificado um maior brilho de birrefringência representado

quantitativamente pelo valor de OR, estatisticamente maior ( $p \leq 0,001$ ), que os valores de OR obtidos nos tendões dos subgrupos B (685 nm, 10J), C (830 nm, 3J) e D (830 nm, 10J). O tratamento A (685 nm, 3J) foi 40% maior que o tratamento B (685 nm, 10J); 22% maior que o tratamento C (830 nm, 3J) e 80% maior que o tratamento D (830 nm, 10J).

Quando comparou-se o tratamento B (685 nm, 10J) e C (830 nm, 3J) o mesmo resultado se manteve como nas análises feitas a 45°, não havendo diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre os dois subgrupos tratados. Porém, considerando o nível de porcentagem (%) de aumento de OR, o tratamento C (830 nm, 3J) foi 14% maior que o tratamento B (685 nm, 10J).

No entanto quando comparados os subgrupos B (685 nm, 10J) e D (830 nm, 10J) houve uma diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre os subgrupos, onde o tratamento B (685 nm, 10J) mostrou-se 28% maior que o tratamento D (830 nm, 10J). Podemos inferir através destes resultados que provavelmente o laser vermelho de 685 nm, 10 J, produziu um efeito benéfico na proliferação e concentração das fibras de colágeno que se arranjaram em várias direções no eixo longo do tendão quando as medidas foram tomadas a zero graus em relação ao polarizador do microscópio.

Em relação aos resultados obtidos entre o subgrupo C (830 nm, 3J) e D (830 nm, 10J) houve diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,001$ ), mostrando que o tratamento C (830 nm, 3J) foi 47% maior que o tratamento D (830 nm, 10J).

As observações de valor de OR significativamente maior para o subgrupo F (controle padrão), quando comparado com os valores de OR dos subgrupos tenotomizados B, C, D e E ( $p \leq 0,001$ ), como mencionado anteriormente, podem ser explicados pelo alto grau de organização e empacotamento das fibras de colágeno nos tendões deste subgrupo, uma vez que não sofreram nenhum tipo de lesão. O mesmo foi observado quando analisou-se os valores de OR do subgrupo F (controle padrão) em relação ao subgrupo A (685 nm, 3J) onde estes diferiram-se estatisticamente considerando  $p \leq 0,05$ .

Colaborando com o que foi dito previamente os animais do subgrupo E (controle lesado), apresentaram valores de OR estatisticamente menores ( $p \leq 0,001$ ) que os

valores de OR encontrados no subgrupo F (controle padrão), já que o subgrupo E (controle lesado) representa uma cicatrização sem intervenção de um mecanismo externo. Este subgrupo quando comparado com os demais subgrupos tratados com a LLLT (A, B, C e D) também apresentou valor de OR estatisticamente inferior ( $p \leq 0,001$ ).

A partir dos resultados expostos podemos inferir que a efetividade do tratamento laser mostrou primeiramente uma relação dose-dependente no processo de reparo tendíneo e secundariamente uma dependência no comprimento de onda laser utilizado, visto que ao final do 13 dias de P.O. o tratamento A (685 nm, 3J) mostrou ser mais efetivo no processo de cicatrização ( $p \leq 0,05$ ) que o tratamento B (685 nm, 10J), demonstrando a influência da dose de 3J no processo de reparação tendínea. Quando comparou-se o tratamento A (685 nm, 3J) com o C (830 nm, 3J) o primeiro foi mais eficaz ( $p \leq 0,05$ ) mostrando que o comprimento de onda 685 nm colaborou na resposta benéfica do reparo. Considerando ( $p \leq 0,001$ ) o tratamento A (685 nm, 3J) mostrou-se melhor que o tratamento D (830 nm, 10J), neste caso a dose de 3J e o comprimento de onda 685 nm parecem influenciar benéficamente na melhora. O tratamento B (685 nm, 10J) foi melhor que o tratamento D (830 nm, 10J) quando ( $p \leq 0,05$ ), mostrando a influência do comprimento de onda 685 nm no processo de cicatrização. O tratamento C (830 nm, 3J) mostrou-se mais efetivo que o tratamento D (830 nm, 10J), considerando ( $p \leq 0,05$ ), neste caso a dose de 3J influenciou na aceleração do processo de reparo. Através desses dados podemos concluir que o laser de 685 nm, 3J mostrou-se mais efetivo no processo de reparo tendíneo seguido pelo laser 830 nm, 3J, em ambos os tratamentos a dose de 3J parece ter uma influência benéfica no processo de reparo tendíneo predominando sobre o comprimento de onda laser.

Segundo VIDAL (1987b), durante o processo de reparo tendíneo as fibras de colágeno tornam-se progressivamente mais espessas e seu brilho de birrefringência aumenta, indicando uma melhor organização e estado de agregação macromolecular. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram claramente isso quando reportamos os resultados dos animais do subgrupo E (controle lesado), que demonstraram um baixo valor de OR principalmente quando comparados como subgrupo F (controle padrão), evidenciando que existe alteração da morfologia do colágeno após a lesão. Os animais

tratados com laser modificaram as suas propriedades anisotrópicas (figura 10). Portanto, concordando com as afirmações de VIDAL (1987a), no presente trabalho, a microscopia de polarização mostrou ser um meio de análise valioso para o estudo da matriz extracelular, permitindo obter informações a respeito da organização molecular da mesma, podendo assim ser considerada um meio de pesquisa da infraestrutura da matriz. Este método permitiu ainda, a detecção e a quantificação do fenômeno anisotrópico do colágeno denominado birrefringência.

A influência benéfica da LLLT sobre a organização e agregação das fibras colágenas em tendões em processo de reparação ocorre provavelmente devido a fotoestimulação laser de baixa potência com certos comprimentos de onda estimular o reparo tecidual por favorecer a liberação de fatores de crescimento dos fibroblastos e estimular o processo cicatricial. Além disso, estudos prévios sugerem que a fotoestimulação laser aumenta a síntese de ATP pela aceleração na transferência de elétrons na cadeia mitocondrial, (YAAKOBI et al., 1996; ENWEMEKA, 1988; SAPARIA et al., 1986; MESTER et al., 1985; PASSARELLA et al., 1984) promove a produção de ácidos nucleicos, aumenta a divisão celular (YAAKOBI et al., 1996; PASSARELLA et al., 1984) e facilita os eventos pós-translacionais induzindo a síntese de moléculas de procolágeno (SAPARIA et al., 1986; MESTER et al., 1985; PASSARELLA et al., 1984). Também é reportado que a LLLT aumenta a microvascularização ao mesmo tempo que acelera a proliferação fibroblástica, melhorando assim a qualidade do reparo (LONGO & MESTER, 1998).

VAN DER VEM et al. (1998), sugerem que o laser de baixa potência atua na reparação, contribuindo para a regeneração dos vasos linfáticos lesados, que quando restabelecidos na área lesada promovem a drenagem do fluido inflamatório.

Segundo MESTER et al. (1985), o laser de baixa potência aumenta a proliferação celular e acelera a formação precoce de tecido de granulação. Os mesmos autores sugerem que as vias metabólicas são as responsáveis por este efeito cicatrizante, em decorrência principalmente do aumento da disponibilidade de energia química (ATP) nas células.

Os mecanismos reais pelos quais a fotoestimulação laser facilita a produção de colágeno em tendões em processo de reparo ainda não é clara. É possível que a estimulação da produção de colágeno em tendões lesados fotoestimulados pelo laser seja atribuído à alterações na regulação dos genes ou em modulações que ocorrem nas enzimas que estão envolvidas no metabolismo do colágeno (REDDY et al., 1998a).

O laser atuaria estimulando a atividade mitocondrial, no aumento de ATP, no aumento da síntese de DNA e RNA, no aumento da síntese de proteínas, na modulação da atividade enzimática e na aceleração do metabolismo celular (SIMUNOVIC et al., 2000).

LOPES-ALMEIDA et al. (2001), relatam que a LLLT aumenta o metabolismo celular e o potencial regenerativo dos tecidos biológicos, aumentando a neovascularização e a formação de tecidos regenerados.

Segundo KIPSHIDZE et al. (2001); WEBB et al. (1998), a LLLT pode induzir a liberação de fatores de crescimento pelos fibroblastos, o que provavelmente atuariam como agentes autócrinos estimulando a mitose e/ou reduzindo a morte celular. O laser também atuaria nas citocinas colaborando ainda mais com o processo de reparo. Os fatores de crescimento, principalmente FGF-1 e FGF-2, são substâncias essenciais na modulação do processo de reparo, aumentando a quimiotaxia e a atividade mitogênica das células endoteliais.

Tem sido reportado na literatura que a estimulação laser de baixa potência parece promover um sinal na matriz extracelular promovendo mudanças nas estruturas fibrilares, isso ocorre após a coerência eletromagnética interagir com as moléculas de colágeno. A organização azimutal do colágeno no eixo longitudinal do tendão apresenta uma boa evidência das mudanças estruturais que ocorrem com as fibras após serem irradiadas com laser, tendo desta forma uma significativa influência na performance funcional desta estrutura corporal (PARIZOTTO, 1998a, ENWEMEKA et al., 1990; MOORE & BEAUX, 1987; HUNTER & FINLAY, 1973).

Nossos resultados vêm concordar com a influência benéfica do laser de baixa potência na proliferação de fibroblastos e no aumento da síntese de colágeno para a matriz extracelular, quando reportamos os efeitos encontrados no tratamento de tendões

tenotomizados principalmente com laser de 685 nm e 3J. Estudos de ENWEMEKA & REED (2000); PAOLINI & PAOLINI-PISANI (2000); BJORDAL (2000); Xu et al., citado por TÚNER & HODE (1999); REDDY et al., (1998a); PARIZOTTO & BARANAUSKAS (1998a); PARIZOTTO & BARANAUSKAS, (1998b); REDDY et al., (1997); ENWEMEKA (1992b); ENWEMEKA et al., (1990); dão suporte e sustentação aos resultados encontrados neste trabalho.

ENWEMEKA & REDDY (2000), utilizando doses de 1 mJ/cm<sup>2</sup> e 5 mJ/cm<sup>2</sup> e 0,5 J/cm<sup>2</sup> e 1 J/cm<sup>2</sup> de laser He-Ne (632,8 nm) observaram um aumento de 30 – 40% na força tênsil de tendões após 14 dias da indução da tenotomia. Esse efeito foi mais pronunciado na dose de 1 J/cm<sup>2</sup>.

Os mesmos autores acima citados, quando compararam o nível de resposta tecidual entre os dois lasers utilizados He-Ne (632,8 nm) e As-Ga (904 nm) ambos na dose de 1 J/cm<sup>2</sup>, observaram que o processo de reparo tendíneo e a performance biomecânica dos tendões lesados foram melhorados quando utilizou-se o laser de He-Ne (632,8 nm) (ENWEMEKA & REDDY, 2000).

PAOLINI & PAOLINI-PISANI (2000), observaram um efeito positivo do laser de He-Ne (632,8 nm) no tratamento da tendinite dos tendões do manguito rotador, quando comparado com o tratamento com diodo laser não-coerente (660 nm) e o uso de anti-inflamatórios não esteroidais.

BJORDAL (2000), realizou uma revisão bibliográfica sobre o efeito do laser de baixa potência na cicatrização tendínea. O autor encontrou um intervalo de doses ótimas para a estimulação de fibroblastos com LLLT a 3,2 J/cm<sup>2</sup> – 6,3 J/cm<sup>2</sup> e para a estimulação de fibras de colágeno com doses de 0,2 J/cm<sup>2</sup> – 2,0 J/cm<sup>2</sup>.

Xu et al., citado por TÚNER & HODE (1999), fez um estudo com 50 galinhas brancas, onde 10 serviram como controle e 40 sofreram lesão do tendão profundo do 2º e 3º dedo do pé. Os tendões tratados receberam laser de He-Ne, a irradiação iniciou-se 24 horas após a lesão e continuou por 3 semanas. Os resultados demonstraram que o laser de He-Ne atuou benéficamente no processo inflamatório, absorção do edema, estimulante da síntese de colágeno e remodelamento do tendão sendo decisivo para a recuperação funcional desta estrutura lesada.

REDDY et al. (1998a), constatou aumento na produção de colágeno em tendões de coelhos tenotomizados tratados com feixe laser He-Ne (632,8 nm) a  $1 \text{ J/cm}^2$ , diariamente por 14 dias, comparados com o grupo controle não tratado.

PARIZOTTO e BARANAUSKAS (1998a), utilizando um feixe laser He-Ne (632,8 nm), nas doses de 0,5; 5; e  $50 \text{ J/cm}^2$  em 32 tendões lesados de ratos, observaram através da análise por Espectroscopia por Infravermelho um aumento das ligações de hidrogênio intra e intermolecular nas moléculas de colágeno desses tendões, com maior significância na dose de  $5 \text{ J/cm}^2$  comparados com o grupo controle.

Em outro estudo os mesmos autores reportaram melhora da organização molecular dos feixes de colágeno em tendões lesados utilizando os mesmos parâmetros do estudo anterior. Através da análise por Microscopia de Força Atômica observou-se melhor arranjo e ordem molecular nas moléculas e fibrilas dos tendões tratados com laser, principalmente na dose de  $5 \text{ J/cm}^2$  (PARIZOTTO & BARANAUSKAS, 1998b).

REDDY et al. (1997), estudaram o efeito do laser de He-Ne (632,8 nm) e da estimulação elétrica (corrente galvânica) no processo de reparo tecidual de tendões tenotomizados de coelhos. O tratamento consistiu de 5 aplicações consecutivas de estimulação elétrica transcutânea iniciando no primeiro dia do P.O juntamente com a aplicação de laser de He-Ne,  $1 \text{ J/cm}^2$ , o tratamento com laser seguiu até o 14º dia do P.O. Os resultados constataram uma maior produção de colágeno acelerando o processo cicatricial dos tendões lesados.

ENWEMEKA (1992b), reportou um aumento das fibras de colágeno no citoplasma de fibroblastos de tendões tenotomizados de coelhos expostos ao feixe laser He-Ne (632,8 nm) e densidade de energia de  $1 \text{ mJ/cm}^2$  e  $5 \text{ mJ/cm}^2$ .

Um estudo feito em tendões tenotomizados de coelhos, utilizando o laser He-Ne (632,8 nm), nas doses de 1, 2, 3, 4 e  $5 \text{ mJ/cm}^2$ , demonstrou nos tendões tratados uma maior produção de colágeno e maior alinhamento do mesmo no eixo longitudinal do tendão, esses efeitos foram mais significantes nas doses de 4 e  $5 \text{ mJ/cm}^2$ , esses achados indicam que a fotoestimulação laser He-Ne pode modular a biossíntese do colágeno em tendões lesados (ENWEMEKA et al., 1990).

Embora os melhores resultados obtidos neste trabalho foram com laser vermelho 685 nm, 3J, alguns estudos reportam o benefício terapêutico do laser infravermelho nas desordens tendíneas. Este fato nos chama atenção, já que o laser 830 nm, 3J também produziu resultados terapêuticos satisfatórios no processo de reparo tendíneo dos animais estudados.

ROBERTO (1998), realizou um estudo comparativo entre o laser diodo (780 nm) e o laser de CO<sub>2</sub> (10,600 nm) no tratamento da tendinite do tendão calcâneo de 40 atletas que foram divididos em 4 grupos experimentais. Os parâmetros utilizados para a irradiação do primeiro grupo foram 780 nm, 20 J/cm<sup>2</sup>, contínuo e aplicação por varredura, os parâmetros do segundo grupo foram 780 nm, 180 J/cm<sup>2</sup>, pulsado e aplicação pontual. O terceiro grupo recebeu irradiação com laser de CO<sub>2</sub> (10,600 nm), 15 J/cm<sup>2</sup>, pulsado e aplicação por varredura, o quarto grupo recebeu laser de CO<sub>2</sub> (10,600 nm), 15 J/cm<sup>2</sup>, aplicação pontual. Foi observado melhores resultados em relação ao alívio do quadro algico no tratamento laser de 780 nm nas duas modalidades terapêuticas empregadas.

ENWEMEKA et al. (1994), estudou o efeito do laser de As-Ga (904 nm) em tendões tenotomizados nas doses de 0,5 J/cm<sup>2</sup>; 1,0 J/cm<sup>2</sup> e 1,5 J/cm<sup>2</sup>, o autor constatou um aumento de 40% na capacidade biomecânica de tendões lesados após 14 dias de reparo, esse efeito foi intensificado principalmente na dose de 1,0 J/cm<sup>2</sup>.

SCHMITT et al. (1993), realizou um experimento em trinta cães que foram submetidos a tenotomia e tenorrafia do tendão calcâneo de ambas as patas, foi utilizado um laser de As-Ga (904 nm), 4 J/cm<sup>2</sup> pontual e 1 J/cm<sup>2</sup> na forma de varredura ao longo do tendão esquerdo durante 10 dias consecutivos, o tendão direito serviu como controle. Embora os resultados não demonstraram aumento da proliferação fibroblástica e aumento na síntese de colágeno dos tendões quando comparados com o seu controle contralateral, os autores relataram que macroscopicamente os tendões tratados apresentaram-se melhor vascularizados, com redução de aderências e ótimo aspecto estético de cicatrização.

ENGLAND et al. (1989), estudaram o efeito do laser de baixa potência nas tendinites do músculo supraespinhoso e bíceps braquial de humanos. O tratamento foi feito com laser de As-Ga (904 nm), 3 vezes por semana por um período de duas semanas. Os

pacientes tratados apresentaram uma redução do quadro algico e melhora funcional quando comparado com o grupo controle não tratado.

LONGO et al. (1987), demonstrou que é possível obter aceleração da cicatrização na faixa do infravermelho, através da utilização de um laser de baixa potência com intervalo espectral na faixa do infravermelho próximo (830nm) no processo de reparo tecidual em tendões calcaneares de ratos.

Embora exista uma grande quantidade de trabalhos na literatura que reportam o efeito positivo da radiação laser de baixa potência nas lesões do tecido conjuntivo, alguns autores relatam efeitos negativos deste tipo de radiação comprovados em seus trabalhos.

No trabalho de REDDY et al. (1998b), os autores não observaram melhora na performance biomecânica de feridas induzidas em ratos diabéticos tratadas com laser de As-Ga (904 nm), 1 J/cm<sup>2</sup>.

O tratamento com laser de 830 nm, contínuo, 3 J por ponto, feito duas vezes por semana durante o período de oito semanas, não demonstrou resultados satisfatórios na redução do quadro algico, rigidez e limitação do movimento, quando utilizado no tratamento da tendinite dos tendões rotadores do ombro de 35 pacientes que foram submetidos ao protocolo de tratamento (VECCHIO et al., 1993).

Ao estudar o processo de reparação tendínea durante 14 dias GUM et al. (1997), utilizou um protocolo de terapia combinada com estimulação elétrica transcutânea (corrente galvânica), laser de As-Ga (904 nm), 1 J/cm<sup>2</sup> e Ultra-Som. Os resultados demonstraram aumento na produção de colágeno, porém sem significâncias estatísticas na performance funcional dos tendões tratados em relação ao grupo controle, sugerindo que terapias combinadas podem não influenciar de forma positiva no processo de cicatrização tendínea.

Um estudo feito por SIEBERT et al. (1987), não constatou melhora do quadro algico e do desempenho funcional de 32 pacientes portadores de tendinopatias. O tratamento foi realizado com a combinação do laser de He-Ne (632,8 nm) e laser de As-Ga (904 nm), em aplicações de 15 minutos diários, vale ressaltar que os autores não fizeram citações do valor das doses empregadas.

### **Aspectos Qualitativos da Análise em Microscopia de Polarização**

No presente estudo, a execução do referido modelo experimental envolveu a secção completa do tendão, sendo evidenciado através da análise qualitativa feita por fotomicrografias dos tendões dos subgrupos estudados. Através desta análise, foi permitido a visualização do reparo tendíneo em diversos graus nos tendões tenotomizados experimentalmente. Estes achados coincidem com os estudos de CUNHA, (2001); SANKARAN & WALSH (1998); THOMSEN et al., (1989).

A área padronizada como região de investigação corresponde a área total da tenotomia produzida ao nível da região média do tendão. Esta pode ser identificada pela presença de fibras colágenas imaturas tentando se organizar para preencher o local lesado (setas e estrelas das figuras 10, 11 e 12). Através da análise qualitativa podemos observar o maior brilho de birrefringência nos tendões do subgrupo A (685 nm, 3J) e subgrupo F (controle padrão) e o auto-arranjo e organização das fibras colágenas formando feixes orientados em grupos helicoidais ao eixo longo dos tendões representados pelas setas. Portanto, a terapia laser de baixa potência influenciou benéficamente na remodelação e na organização do tecido tendíneo submetido a tenotomia total. Estes achados corroboram com os trabalhos de CUNHA et al., (2001); SANKARAN & WALSH (1998); WHITTAKER & CANHAM (1991); THOMSEN et al., (1989); VIDAL, (1986); que estudaram o grau de birrefringência e a orientação das fibras de colágeno em tecidos conjuntivos sob condições normais e sob a influência de agentes externos.

WHITTAKER & CANHAM (1991), relatam que o conhecimento da organização estrutural de um tecido é freqüentemente requerido para compreendermos a sua função.

A birrefringência textural (forma) é dependente do volume parcial (concentração), estado de agregação e orientação dos feixes de colágeno, sua mensuração possibilita o melhor meio para se estudar a ordem molecular e o grau de agregação ordenada dos feixes de colágeno (VIDAL, 1986).

Um estudo sobre a influência do ultra-som terapêutico no processo de reparo tendíneo feito por CUNHA et al. (2001), evidenciou através da análise qualitativa feita pela microscopia de luz polarizada a concentração, estado de agregação e a orientação das fibras de colágeno nos tendões estudados. Neste trabalho, as imagens também foram tomadas com o alinhamento do eixo longo dos tendões a zero graus ou paralelo ao polarizador e com o eixo orientado a 45° entre o polarizador e analisador do microscópio. Foi verificado maior brilho de birrefringência nos tendões tratados com ultra-som na modalidade pulsada e uma intensificação do mesmo nos tendões que não sofreram nenhum tipo de intervenção.

VIDAL (1986), estudou o grau de birrefringência de tendões calcaneares normais de bovinos. Na análise qualitativa os tendões mostraram uma orientação paralela das fibras colágenas em relação ao eixo longitudinal do tendão e um alto valor de birrefringência.

SANKARAN & WALSH (1998), analisaram o efeito do aquecimento sobre a composição estrutural de tendões de ratos através da análise de birrefringência e imagens feitas por fotomicrografias dos tendões estudados. O aquecimento promoveu a desnaturação dos tendões provocando uma queda de 68% no brilho de birrefringência, comprovando a influência de agentes externos na mudança da estrutura do tecido tendíneo.

O efeito do aquecimento com laser de Nd:Yag (1,600 nm) e potência de 60 W também foi estudado por THOMSEN et al., (1989), em tecidos contendo colágeno, onde mudanças no valor de birrefringência e na cor das amostras de colágeno foram detectadas quando analisadas e microfotografadas pelo microscópio de luz polarizada.

WHITTAKER & CANHAM (1991), analisaram através de fotomicrografias feitas pelo microscópio de polarização a ação do estiramento sobre fibras colágenas de tendões calcaneares de cães. A análise qualitativa revelou um aumento no alinhamento das fibras colágenas submetidas ao estiramento quando comparadas com as fibras dos tendões não estirados.

## Aspectos Gerais

Com relação ao protocolo de tratamento, a escolha dos valores dos comprimentos de onda utilizados no presente estudo foram baseados nos trabalhos de PARIZOTTO & BARANAUSKAS (1998a); PARIZOTTO & BARANAUSKAS (1998b); REDDY et al. (1998a); GUM et al. (1997); REDDY et al. (1997); KARU et al. (1995); LUBART et al. (1992); ENWEMEKA (1992b); ENWEMEKA et al. (1990); LABBE et al. (1990); YOUNG et al. (1989); KARU (1987).

Estes autores sugerem que os lasers de comprimento de onda na faixa do visível e infravermelho podem ser mais eficazes na promoção de respostas com melhores resultados clínicos. É sabido que a resposta celular a radiação depende do comprimento de onda laser já que cada célula possui moléculas fotorreceptoras capazes de absorver a radiação e assim gerar uma resposta biológica desejada. Segundo reportado por LABBE et al. (1990), a fotobiomodulação possui um intervalo terapêutico de 633 nm a 1060 nm. Os mesmos autores mencionam a importância de identificar qual comprimento de onda é mais efetivo para um determinado tecido, já que cada tipo celular possui diferentes cromóforos e quantidades distintas dos mesmos capazes de absorver a radiação. O presente trabalho veio na tentativa de esclarecer uma dúvida presente na literatura, ou seja, qual o comprimento de onda e dose da LLLT são mais efetivos no processo de reparação tendínea após a tenotomia.

É consenso que os comprimentos de onda mais curtos (na faixa do visível) dispersam mais e são prontamente absorvidos, penetrando menos do que os comprimentos longos, sendo portanto, mais apropriados para o tratamento de lesões superficiais. Por outro lado, os comprimentos de onda mais longos, dentro da faixa do infravermelho próximo (700 nm até 1200 nm) são mais adequados para o tratamento de lesões profundas (LAAKSO et al., 1993b). Nosso trabalho concorda com essa definição já que por se tratar de um tecido superficial, o tendão calcâneo lesado foi melhor beneficiado quando utilizou-se laser de 685 nm, 3J.

Segundo KARU et al. (1995), a irradiação com laser de 633 nm, aumentou o potencial de membrana mitocondrial e o gradiente de próton transmembrana, induzindo a

mudanças nas propriedades ópticas da mitocôndria que levaram ao aumento da taxa de ATP e síntese de proteínas. KARU (1987), relata que a irradiação na faixa do vermelho causa um aumento no índice mitótico, fazendo com que a luz tenha um papel fundamental no controle metabólico da célula, a autora afirma que tanto o comprimento de onda quanto a dose da LLLT determinam a intensidade da resposta biológica.

Através da análise por Espectroscopia por Infravermelho, PARIZOTTO & BARANAUSKAS (1998a), observaram um aumento das ligações de hidrogênio intra e intermolecular em moléculas de colágeno de tendões lesados, utilizando um laser He-Ne (632,8 nm).

Em outro estudo os mesmos autores reportaram melhora da organização molecular dos feixes de colágeno em tendões lesados. Através da análise por Microscopia de Força Atômica observou-se melhor arranjo e ordem molecular nas moléculas e fibrilas de tendões tratados com laser He-Ne (632,8 nm) (PARIZOTTO & BARANAUSKAS, 1998b).

REDDY et al. (1998a), reporta que a LLLT com determinados comprimentos de onda pode acelerar a reparação tecidual por estimular a liberação de fatores de crescimento dos fibroblastos estimulando assim a cicatrização. Os autores estudaram o efeito do laser de He-Ne (632,8 nm) no processo de reparação tendínea após tenotomia induzida e foi observado um aumento na produção de colágeno o que facilitou o processo de reparo.

O aumento da síntese de fibrilas pelos fibroblastos foi observada quando tendões tenotomizados foram irradiados com laser de He-Ne (632,8 nm) (ENWEMEKA, 1992b).

ENWEMEKA et al. (1990), utilizando um laser de He-Ne (632,8 nm) em tendões tenotomizados observaram um maior alinhamento de fibroblastos e fibras de colágeno no eixo longitudinal do tendão.

Para investigar a sensibilidade das células a irradiação laser LUBART et al. (1992), irradiou culturas de fibroblastos com comprimentos de onda de 360 nm, 632 nm e 780 nm e doses que variaram de 0,1 J/cm<sup>2</sup> a 90 J/cm<sup>2</sup>. Os autores concluíram que a

proliferação celular foi estimulada em doses mais baixas, sendo que doses elevadas causaram a destruição celular por superestimular a liberação de  $^1\text{O}_2$  simples, o comprimento de onda que mais contribuiu para a proliferação fibroblástica foi o 632 nm.

YOUNG et al. (1989), observaram um aumento na liberação de fatores de crescimento pelos macrófagos levando a um aumento na proliferação fibroblástica quando utilizaram o comprimento de onda de 660 nm, os comprimentos de 820 nm e 870 nm também produziram efeitos estimulantes, mas em menor intensidade, por outro lado, o comprimento de onda de 880 nm produziu um efeito inibitório sobre a estimulação fibroblástica. Este estudo corrobora com os achados no presente estudo, onde acreditamos que exista uma sensibilidade a luz laser particular para cada tipo de célula, fazendo com que cada célula ou tecido responda diferentemente a LLLT, dependendo de parâmetros como comprimento de onda, dose, potência, entre outros.

REDDY et al. (1997), estudaram o efeito do laser de He-Ne (632,8 nm) e da estimulação elétrica em tendões tenotomizados de coelhos. Os resultados mostraram uma melhora na performance biomecânica e bioquímica desses tendões após a terapia combinada.

Em um estudo realizado por GUM et al. (1997), utilizando laser de As-Ga (904 nm) a  $1 \text{ J/cm}^2$  em combinação com estimulação elétrica e ultra-som terapêutico, podê-se quantificar através de análises biomecânicas, bioquímicas e histológicas uma melhora no reparo tendíneo após tenotomia induzida, utilizando um laser na faixa do infravermelho.

Com relação aos parâmetros dose e frequência de tratamento, a efetividade do tratamento laser mostrou uma relação dose-dependente, visto que ao final de 13 dias de P.O. os subgrupos tratados com dose de  $3 \text{ J/cm}^2$  apresentaram diferenças estatisticamente significativas ( $p \leq 0,001$  e  $p \leq 0,05$ ) quando comparado com os demais subgrupos irradiados com dose de  $10 \text{ J/cm}^2$ . No entanto, quando comparou-se os subgrupos C (830 nm, 3J) e B (685 nm, 10J) não houve diferença estatisticamente significativa considerando  $p \leq 0,05$ . Porém podemos justificar que neste caso além da dose os comprimentos de onda laser são diferentes, dificultando a comparação. Estes resultados corroboram com os estudos *in vivo* de REZENDE et al. (2002); STADLER et al. (2001); REDDY et al. (2001); ENWEMEKA

& REDDY (2000); PARIZOTTO & BARANAUSKAS (1998a); PARIZOTTO & BARANAUSKAS (1998b); TATARUNAS et al. (1998); KANA et al. (1981) que evidenciaram melhores resultados no processo de reparação do tecido conjuntivo *in vivo* ao empregarem doses, respectivamente nos valores de 1,3 - 3 J/cm<sup>2</sup> de laser 830 nm; 5 J/cm<sup>2</sup> de 830 nm; 1 J/cm<sup>2</sup> de HeNe; 0,5-1,5 J/cm<sup>2</sup> de HeNe e AsGa; 5 J/cm<sup>2</sup>, 5 J/cm<sup>2</sup> de HeNe; 2 J/cm<sup>2</sup> de AsGa e 4 J/cm<sup>2</sup> de HeNe.

Além destes, estudos *in vitro*, obtiveram resultados satisfatórios quando utilizaram doses respectivamente de 3 J/cm<sup>2</sup> - 4 J/cm<sup>2</sup>; 2 J/cm<sup>2</sup>; 2,1 J/cm<sup>2</sup>; 4 J/cm<sup>2</sup>; 4 J/cm<sup>2</sup> e 2 J/cm<sup>2</sup> em culturas de fibroblastos (PEREIRA, et al., 2002; ALMEIDA-LOPES et al., 2001; KIPSHIDZE et al., 2001; WEBB, et al., 1998; RIGAU et al., 1994).

Segundo KARU (1995), o fotocontrole do metabolismo celular é estabelecido por um estreito intervalo de doses da LLLT. Doses elevadas podem causar destruição dos fotorreceptores, acompanhado pela inibição do metabolismo ou ainda morte celular.

SANDOVAL-ORTIZ et al. (2001), relatam que em altas doses a LLLT diminui a proliferação de fibroblastos e a produção de colágeno.

Autores como MESTER et al. (1985b), postulam que as doses ideais para o processo de cicatrização com laser de He-Ne estão entre 1-4 J/cm<sup>2</sup>. KITCHEN & PARTRIDGE (1991), relatam que a dose ideal para se produzir efeitos terapêuticos desejados estaria em torno de 4 J/cm<sup>2</sup>, doses acima deste valor poderiam causar efeitos inibitórios sobre células e tecidos irradiados. Concordando com estes autores ENWEMEKA (1992b), reporta que para se conseguir a aceleração de processos biológicos em tecidos vivos, estes devem ser expostos a radiação laser com doses inferiores a 10 J/cm<sup>2</sup>.

Segundo TATARUNAS et al. (1998), as doses recomendadas em laserterapia de baixa potência para promover aumento no número de fibroblastos e conseqüentemente de fibras colágenas, incremento vascular e reepitelização deve se situar entre 1 - 5 J/cm<sup>2</sup>.

Além destes, estudos *in vitro* como o de KUBASOVA et al. (1984), no qual o efeito estimulatório da LLLT sobre culturas de fibroblastos foi investigado, os melhores resultados foram obtidos nas doses de 1 J/cm<sup>2</sup> e 5 J/cm<sup>2</sup> quando aplicadas a intervalos de 24 horas por quatro vezes.

Um significativo aumento do índice mitótico de células normais foi observado depois da aplicação de 4 J/cm<sup>2</sup>. Contrariamente, numa fluência de 20 J/cm<sup>2</sup> observou-se uma ligeira diminuição do índice mitótico destas células (SANDOVAL-ORTIZ et al., 2001).

Segundo KITCHEN & PARTRIDGE (1991), KARU (1987), os efeitos positivos a radiação são conseguidos com doses mais baixas, sendo que doses elevadas podem produzir efeitos deletérios a nível celular, esses efeitos negativos são conseguidos pela destruição de um ou mais citocromos da cadeia respiratória mitocondrial. Tanto para a estimulação quanto para a inibição de um processo celular, a mesma molécula funciona como alvo fotorreceptor da radiação laser, o que determinará o tipo de resposta biológica é a dose e o comprimento de onda laser.

Quanto às aplicações de laser efetuadas num total de 12 sessões consecutivas, tal protocolo teve por objetivo investigar a ação da LLLT na aceleração do reparo tendíneo aos 13 de P.O., já que segundo ENWEMEKA (1992a), a fibrilogênese e o processo de remodelamento da matriz extracelular inicia-se por volta de 12 dias após a tenotomia, o protocolo de tratamento proposto veio na tentativa de acelerar tais processos.

As aplicações foram feitas através da técnica de contato, onde a fibra óptica foi mantida perpendicular à pele, irradiando-se por fotoestimulação transcutânea um único ponto correspondente a área da lesão. Essa técnica foi escolhida pois, ao penetrar no tecido o feixe sofre o fenômeno de dispersão atingindo toda a área lesada e também regiões circunvizinhas á lesão, o tamanho da fibra considerado relativamente pequeno (0,0028 cm<sup>2</sup>) proporciona a concentração de uma maior densidade de potência ou irradiância na área tratada, colaborando assim para a efetividade do tratamento (LOW & REED, 2001; KLOTH, 1997; LAAKSO et al., 1993a; 1993b; KITCHEN & PARTRIDGE, 1991).

A escolha do valor da potência utilizada no presente trabalho foi baseada no estudo piloto deste, onde utilizamos duas potências distintas, 15 mW e 35 mW , para ambos os comprimentos de onda (685 nm e 830 nm). Através da análise histológica concluímos que a potência de 15 mW do laser de 685 nm e 830 nm produziu melhores efeitos no processo de reparo tendíneo.

ALMEIDA-LOPES et al. (2001); WEBB et al. (1998), em trabalhos com culturas de fibroblastos utilizaram respectivamente 10 mW e 17 mW do laser de 670 nm e de 660 nm, os autores observaram resultados satisfatórios com as potências empregadas.

Trabalhos como o de ENWEMEKA et al. (1990), que utilizaram potência de 11 mW de laser He-Ne no processo de reparação tendínea também obtiveram resultados satisfatórios.

BRAVERMAN et al. (1989), utilizou 10 mW de laser de He-Ne (632,8 nm) na cicatrização de feridas em coelhos, observando melhora na força tênsil e liberação de fatores de crescimento com os parâmetros empregados.

KIM et al. (1997), avaliando a taxa de cicatrização de feridas infectadas utilizou potência de 14 mW de As-Ga (904 nm), observando bons resultados na taxa de cicatrização dessas feridas.

Estes autores sugerem que os lasers com potências intermediárias podem ser mais eficazes na promoção de respostas com melhores resultados clínicos. No entanto, dada a controvérsia frente aos resultados contraditórios, não existem dados conclusivos a respeito deste parâmetro, dando margem a especulações sobre a potência ideal a ser empregada.

Já é sabido na literatura que a LLLT com diferentes comprimentos de onda produzem efeitos diferentes nos fibroblastos. Na literatura, os estudos comparando os efeitos dos lasers vermelhos e infravermelhos na cicatrização de tecidos mostraram diferenças quanto aos melhores resultados terapêuticos, muitos destes estudos relataram que os melhores resultados foram encontrados quando utilizou-se lasers vermelhos (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; KIPSHIDZE et al., 2001).

Segundo ENWEMEKA & REDDY (2000), doses e comprimentos de onda apropriados para os lasers vermelhos e infravermelhos podem acelerar o processo de reparação em tendões, por aumentar a síntese de colágeno pelos fibroblastos e sua taxa de remodelação aumentando assim, a capacidade funcional desta estrutura tecidual.

A síntese de colágeno foi estimulada através da formação de novas fibrilas no espaço extracelular e da proliferação fibroblástica, essas alterações foram observadas quando utilizaram-se laser de He-Ne (632,8 nm) e As-Ga (904 nm) ambos nas doses de 1-5 mJ/cm<sup>2</sup> (ENWEMEKA & REDDY, 2000).

A LLLT foi usada em tendões tenotomizados nos comprimentos de onda 632,8 nm e 904 nm, ambos nas doses de 0,5; 1,0 e 1,5 J/cm<sup>2</sup>. A estimulação do processo de reparação foi observada principalmente no comprimento de onda de 632,8 nm e dose de 1,0 J/cm<sup>2</sup> (ENWEMEKA & REDDY, 2000).

ROBERTO (1998), comparou o efeito do laser de 780 nm e CO<sub>2</sub> (10,600 nm) na tendinite do tendão calcâneo, os resultados obtidos demonstraram que o laser de 780 nm foi mais efetivo no alívio da dor segundo a VAS do que o laser de CO<sub>2</sub> (10,600 nm).

Um estudo comparativo de ALMEIDA-LOPES et al. (2001) foi realizado para avaliar a proliferação de fibroblastos quando irradiada com vários comprimentos de onda (670 nm, 780 nm, 692 nm e 786 nm) e dose de 2 J/cm<sup>2</sup>. Na primeira parte do estudo foi comparado o efeito dos comprimentos de onda 670 nm e 780 nm, 2 J/cm<sup>2</sup> e duas potências de irradiação (10 mW para 670 nm, 50 mW para 780 nm), na segunda parte do estudo foi comparado os comprimentos de onda de 692 nm e 786 nm, 2 J/cm<sup>2</sup>, utilizando uma potência única de 30 mW. Os resultados concluíram que quando comparou-se dois comprimentos de onda diferentes (670 nm e 780 nm), 2 J/cm<sup>2</sup>, e potências distintas de 10 mW e 50 mW a proliferação fibroblástica foi intensificada quando utilizou-se o laser infravermelho de 780 nm. No entanto, a taxa de proliferação fibroblástica não diferiu quando os lasers de 692 nm e 786 nm, 2 J/cm<sup>2</sup>, potência única de 30 mW foram comparados. Os autores relatam, que para o laser visível de 670 nm e 10 mW o tempo de exposição da cultura a radiação foi cinco vezes maior que para o laser de 780 nm e 50 mW,

assim eles concluem que o tempo reduzido de exposição a radiação é mais favorável para a estimulação celular *in vitro*.

ALWATBAN (1998), estudou a influência dos comprimentos de onda de 442, 514, 632, 670, 780 e 830 nm em feridas de pele de ratos, o comprimento de onda de 632 nm foi mais efetivo para acelerar o processo de cicatrização. WATBAN & ZHANG (1998), fizeram um experimento semelhante ao avaliarem o processo de cicatrização de feridas utilizando os lasers de Argônio, He-Ne e Ga-Al-As, os resultados também confirmaram a maior efetividade do laser de He-Ne no processo de cicatrização.

SIMUNOVIC et al. (2000), ao comparar os lasers de He-Ne (632,8 nm) e As-Ga (904 nm), em feridas de coelhos, encontrou que houve uma melhor reparação nas feridas tratadas com laser de He-Ne (632,8 nm) e 4 J/cm<sup>2</sup>.

O processo de reparação tecidual em feridas de coelhos foi investigada por BRAVERMAN et al. (1989), onde os autores utilizaram o laser de He-Ne (632,8 nm), o As-Ga (904 nm) e a combinação de ambos. No final de 21 dias a taxa de cicatrização foi maior para todos os grupos tratados com laser em relação ao grupo controle, porém não houve diferença estatística na taxa de cicatrização entre os grupos irradiados.

Ao comparar os lasers de He-Ne (632,8 nm) e Argônio (514,5 nm), KANA et al. (1981), observou que a cicatrização em feridas de ratos foi mais efetiva quando utilizou-se o laser de He-Ne na dose de 4 J/cm<sup>2</sup>. Porém, quando utilizou-se laser de He-Ne (632,8) na dose de 10 J/cm<sup>2</sup>, este não produziu efeitos na taxa de cicatrização, já 20 J/cm<sup>2</sup> promoveu inibição no processo de cicatrização.

No entanto, alguns estudos comparando a efetividade da LLLT na cicatrização de tecidos conjuntivos não encontraram resultados satisfatórios na aplicação dos protocolos de tratamento.

SIEBERT et al. (1987), comparou a efetividade dos lasers de He-Ne (632,8 nm) e a As-Ga (904 nm) nas tendinopatias de 64 pacientes que sofriam dessas desordens. Os resultados nos grupos tratados com laser não diferiram estatisticamente dos seus respectivos controles. Porém, vale ressaltar que os autores não mencionaram as doses. As

potências utilizadas diferiram para ambos os grupos sendo 10 mW para He-Ne e 30 mW para o As-Ga, o que dificulta a comparação dos resultados.

A não efetividade da LLLT também foi constatada num estudo feito por SCHLAGER et al. (2000), onde os autores comparam o laser de 635 nm com o de 690 nm na cicatrização de feridas de ratos, o mesmo animal serviu como seu próprio controle o que pode ter dificultado a comparação dos resultados, já que é citado na literatura que o laser produz efeitos sistêmicos capazes de promover benefícios terapêuticos do lado não tratado (BRAVERMAN et al., 1989).

### **Considerações finais**

Na última década muitos estudos têm sido feitos para demonstrar os efeitos dos diferentes comprimentos de onda em tipos celulares envolvidos no processo de reparo. Segundo DYSON (1998), a luz vermelha é mais suscetível para atingir todos os tipos de células envolvidos na cicatrização de tecidos que a radiação infravermelha.

WEBB et al. (1998), reporta que diferentes doses e comprimentos de onda podem estimular ou inibir as moléculas fotorreceptoras presentes da cadeia respiratória mitocondrial, com isso o efeito biológico requerido dependerá da combinação dos parâmetros da LLLT utilizada. Nossos resultados parecem concordar com essa teoria, pois o comprimento de onda de 685 nm e dose de 3 J promoveu uma melhora da qualidade do reparo tendíneo de ratos quando comparados com os outros parâmetros de laser empregados, isso ocorreu provavelmente devido a esse comprimento de onda laser (685 nm) e dose de 3 J promover a aceleração no transporte de elétrons da cadeia respiratória mitocondrial e aumento do gradiente de próton transmembrana levando assim, ao aumento da produção de ATP e proliferação fibroblástica (MORIMOTO et al., 1994).

Segundo LONGO & MESTER (1998), BASFORD (1995), LAAKSO et al. (1993a), KITCHEN & PARTRIDGE (1991), a LLLT pode estimular ou inibir o processo de cicatrização dependendo da dose e do comprimento de onda utilizados.

Trabalhos de Karu citados por LAAKSO et al. (1993a), afirmam que a radiação laser na faixa vermelha do espectro eletromagnético pode aumentar o metabolismo celular. O efeito fotobiológico da estimulação dependerá do comprimento de onda, dose e potência da LLLT.

O primeiro estudo utilizando a LLLT em processo de reparação tecidual foi realizado a mais de trinta anos (Mester & Coll. 1968 citado por LONGO & MESTER, 1998). Os primeiros trabalhos eram feitos “*in vitro*” e “*in vivo*”, porém os dados obtidos eram discordantes devido a falta de protocolos de pesquisa e a adoção de métodos e modelos que pudessem ser reprodutíveis.

Dada a natureza controversa da LLLT é de fundamental importância complementar as publicações nesta área. Por outro lado, TÚNER & HODE (1998) e KITCHEN & PARTRIDGE (1991), relatam que existe uma aparente dicotomia entre os resultados obtidos em estudos feitos com culturas celulares *in vitro* e os estudos *in vivo*.

Dificuldades de interpretação surgem quando é feita a extrapolação entre tais resultados, visto a tendência da energia incidente passar diretamente através da superfície das culturas celulares, enquanto que no tecido vivo irá ocorrer a absorção dentro de uns poucos milímetros. LAAKSO et al. (1993a), relatam que experimentos em culturas celulares dificultam a extrapolação para situações *in vivo*, pois estes são realizados num meio artificial comparado com organismos vivos. Além disso, NICCOLO-FILHO et al. (1993), relatam que alguns autores salientam que os resultados positivos obtidos em animais não podem ser transferidos para o homem, devido ao fato da presença de variáveis tais como dissimilaridade de cor e estrutura tecidual, individualidades nas propriedades de absorção/reflexão e diferenças nas susceptibilidades dos tecidos irradiados.

Entretanto, ENWEMEKA & REDDY (2000), relatam que embora o processo de reparo tecidual possa diferir entre animais e humanos, segundo os seus achados feitos em coelhos, lesões como a ruptura do tendão calcâneo em seres humanos podem ser beneficiadas com doses adequadas de He-Ne ou As-Ga. Os autores acrescentam que doses e comprimentos de onda apropriados para lesões tendíneas podem promover um aumento na síntese de colágeno, maturação e remodelamento precoce do mesmo. Estes achados

corroboram com os resultados encontrados neste trabalho onde a reparação do tecido tendíneo foi estimulada com irradiação de 685 nm e 3J.

Segundo KITCHEN & PARTRIDGE (1991), há por parte dos pesquisadores uma grande dificuldade em interpretar e associar as informações obtidas sobre os efeitos fisiológicos da LLLT aplicada aos tecidos vivos por duas razões: (1) existe uma grande diversidade de sujeitos usados nos estudos, variando de culturas celulares a espécies animais e humanos (2) a grande variedade dos parâmetros de tratamento utilizados dificultam a comparação de resultados. BASFORD (1989) e OZAWA et al. (1998), consideram que os experimentos *in vitro* ou a nível celular sejam os mais adequados para avaliar quantitativamente os efeitos da LLLT, sendo que os trabalhos feitos em animais e humanos são sugestivos, porém novas pesquisas com maior rigor científico são necessárias para que o mecanismo dos efeitos benéficos advindos do uso da aplicação da LLLT na prática clínica seja completamente elucidado.

Posto a existência da grande diversidade de resultados e a ausência de uma padronização de protocolos de tratamentos observados em alguns estudos, acreditamos ainda ser muito difícil interpretar e interrelacionar os dados existentes sobre os efeitos da LLLT. Porém, como descrito por BASFORD (1989), acreditamos que a terapia laser de baixa potência tem um futuro promissor na prática clínica da fisioterapia, necessitando-se de estudos mais detalhados a fim de determinar parâmetros importantes como comprimento de onda, dose, potência e número de aplicações para a espécie animal e a patologia estudadas.

Concordamos que os resultados do presente estudo estabelecem a possibilidade do uso da LLLT em situações clínicas, já que constatamos que a estimulação do processo de reparação tendínea em ratos foi dependente do comprimento de onda, dose e potência laser utilizados, entretanto estudos futuros devem ser feitos para melhor definir parâmetros dosimétricos adequados para o tratamento em humanos.

Como sugestão, destacamos a necessidade de se promover experimentações com investigações a estágios mais precoces e/ou em vários períodos distintos do processo de reparação tendínea.

## 7 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo sobre os efeitos dos lasers de 685 nm e 830 nm, ambos CW, com 15 mW de potência e doses de 3 J/cm<sup>2</sup> e 10 J/cm<sup>2</sup>, empregados no tratamento do modelo de lesão tendínea por tenotomia induzida no tendão calcâneo de rato, permitiram concluir que:

- Sob as condições experimentais da investigação, a LLLT com certos parâmetros dosimétricos utilizados favoreceu o processo de reparação tendínea no 13º de P.O., estimulando possivelmente a proliferação fibroblástica e a síntese de colágeno no local da lesão, podê-se observar através da análise da birrefringência do colágeno um certo grau de organização, agregação, alinhamento e deposição das fibras colágenas no local da tenotomia;
- Os resultados demonstraram uma relação dose-dependente e secundariamente uma relação com o comprimento de onda laser utilizado, onde os melhores benefícios no processo de reparação tendínea foram observados quando utilizou-se o laser de 685 nm e 3 J/cm<sup>2</sup>;
- Com relação as densidades energéticas empregadas, o valor de 3 J/cm<sup>2</sup> de ambos os lasers (685 nm e 830 nm) apresentou o melhor resultado no processo de reparação comparada ao valor de 10 J/cm<sup>2</sup>;
- O comprimento de onda de 685 nm se mostrou mais efetivo para acelerar o reparo tendíneo comparado ao comprimento de onda de 830 nm;
- Todos os subgrupos tratados com laser mostraram melhor qualidade de reparo que o subgrupo controle lesado/ tratamento placebo;
- No entanto, mesmo com o tratamento laser nenhum dos subgrupos tratados atingiu o grau de organização, agregação e orientação das fibras colágenas como o subgrupo controle padrão.

## 8 ANEXOS

### ANEXO A

#### **Etapas da Tramitação**

**Laboratório de Patologia, Dep. Otondologia –UNESP. Araraquara.**

- Depois de retiradas as biópsias as peças são deixadas em formaldeído 10% durante 24 horas;
- Lavar em água corrente por 24 horas; depois começar as etapas de desidratação;
- Banho em solução de álcool 70% por 1 hora;
- Banho em solução de álcool 90% por 1 hora;
- Em seguida 6 a 8 banhos, de 1 hora, com álcool 100%;
- Banho de xilol/álcool 1:1, de 1 hora;
- 2 banhos de xilol puro de 1 hora cada um;
- As peças são retiradas do xilol; o excesso de xilol é retirado com papel absorvente, e então são colocadas imediatamente em parafina líquida (60%). Após algumas horas essa primeira parafina é substituída por uma segunda parafina de boa qualidade (Paraplastic ou Histosec). Durante o segundo banho de parafina as peças são levadas a uma estufa a vácuo (durante 2 a 4 horas) para evitar a formação de bolhas e garantir que a parafina penetre em todos os espaços da peça.
- Os blocos são confeccionados e obtém-se os cortes;
- Os cortes obtidos são de 5 ou 6 micrometros de espessura;
- Esses cortes podem ser: “cortes seriados” – onde todos os cortes obtidos foram coletados em seqüência e as lâminas numeradas, ou seja, a primeira lâmina contém os primeiros 5 cortes, a segunda os cortes de 6 a 10, a terceira os cortes de 11 a 15, e assim por diante. Quando se fala em “cortes semi-seriados” significa que na primeira lâmina estão os cortes de 1 a 5, os cortes de 6 a 10 são desprezados, na lâmina 2 ficam os cortes de 11 a 15, depois os próximos são desprezados e assim por diante...
- Depois de obtidos os cortes eles ficam cerca de 2 horas em estufa (60%), retirados posteriormente, resfriados espontaneamente para serem corados ou não.

## ANEXO B

Teste Não Paramétrico de Wilcoxon para a comparação dos dois subgrupos, constituídos, respectivamente, pelas médias das medidas de OR (em nm) em 45° do polarizador e analisador e a zero graus do analisador. Determinação do intervalo com 95% de confiança da correspondente diferença de medianas (DIFMED), usando o programa estatístico MINITAB, versão 13.2.

### Teste de Wilcoxon (para comparação dos grupos de medições em 45° e a zero graus):

Test of median = 0.000000 versus median not = 0.000000

	N	Test	Statistic	P	Median
DIFMED	48	48	822.5	0.016	1.867

### Intervalo de confiança para a diferença entre as medianas das medições emparelhadas tomadas a 45° e a zero graus :

	N	Median	Confidence	Confidence Interval
DIFMED	48	1.87	95.0	( 0.31; 3.79)

## ANEXO C

### O teste de Kruskal-Wallis

Os dados de todos os subgrupos são unidos em um único conjunto e ordenados em ordem crescente. Ao menor valor é atribuído o posto 1, ao próximo valor é atribuído o posto 2 e assim por diante até último valor. Quando ocorrem empates entre os valores, considera-se como seus postos a média dos postos que lhes seriam atribuídos se fossem colocados um em seguida do outro. Em seguida, os valores dos dados dentro de cada grupo são substituídos pelos seus postos e em cada grupo são realizadas as somas dos postos correspondentes.

Por exemplo, para os dados das tabela obtém-se:

**Tabela. Postos das médias das medições da birrefringência tomadas somente em 45°.**

TENDÃO	GRUPO1	GRUPO2	GRUPO3	GRUPO4	GRUPO5	GRUPO6
1	35	30	40	18	2,5	42
2	39	20	12	16	7	45
3	38	14	24	13	8	48
4	27	29	23	9	4,5	41
5	36	17	22	11	2,5	43
6	21	15	28	26	6	47
7	37	19	25	33	1	46
8	31	34	32	10	4,5	44

Observa-se que as medições do grupo controle 6 possuem os maiores postos. O grupo 1 é o que apresenta a magnitude dos seus postos mais próxima da do grupo 6 e o grupo 5 é o que apresenta a magnitude mais afastada.

**Tabela. Valores dos percentis observados ( $t_{ob}$ ) e os correspondentes p valores para a comparação múltipla dos seis grupos estudados.**

Grupos	Em 45°		Em Zero Graus	
	$t_{ob}$	p valor	$t_{ob}$	p valor
1 x 2	3,3500	0,0017	4,6987	0,0000
1 x 3	2,2593	0,0291	3,6339	0,0007
1 x 4	4,9860	0,0000	7,7308	0,0000
1 x 5	8,8813	0,0000	11,3416	0,0000
1 x 6	3,5837	0,0008	3,2405	0,0023
2 x 3	1,0907	0,2816	1,0647	0,1465
2 x 4	1,6360	0,1093	3,0321	0,0041
2 x 5	5,3755	0,0000	6,6429	0,0000
2 x 6	6,9336	0,0000	7,9391	0,0000
3 x 4	2,7267	0,0093	4,0969	0,0002
3 x 5	6,6220	0,0000	7,7076	0,0000
3 x 6	5,8430	0,0000	6,8744	0,0000
4 x 5	3,8953	0,0008	3,6108	0,0008
4 x 6	8,5697	0,0003	10,9712	0,0000
5 x 6	12,4650	0,0000	14,5820	0,0000

## Testes realizados via programa MINITAB 13.2

### Kruskal-Wallis Test: ME1 versus GRUPOS

Kruskal-Wallis Test on ME1

FATORES	N	Median	Ave Rank	Z
1	8	38.63	33.0	1.88
2	8	25.69	22.3	-0.50
3	8	31.20	25.8	0.28
4	8	22.93	17.0	-1.66
5	8	12.12	4.5	-4.43
6	8	72.93	44.5	4.43
Overall	48		24.5	

H = 38.17 DF = 5 P = 0.000  
 H = 38.17 DF = 5 P = 0.000 (adjusted for ties)

### Kruskal-Wallis Test: ME2 versus GRUPOS

Kruskal-Wallis Test on ME2

FATORES	N	Median	Ave Rank	Z
1	8	36.21	35.4	2.41
2	8	27.08	22.7	-0.40
3	8	29.36	25.6	0.24
4	8	21.12	14.5	-2.21
5	8	11.51	4.8	-4.37
6	8	62.17	44.1	4.34
Overall	48		24.5	

H = 40.73 DF = 5 P = 0.000  
 H = 40.75 DF = 5 P = 0.000 (adjusted for ties)

### Kruskal-Wallis Test: ME versus GRUPOS

Kruskal-Wallis Test on ME

FATORES	N	Median	Ave Rank	Z
1	8	37.71	34.8	2.27
2	8	25.95	22.2	-0.51
3	8	30.48	25.8	0.29
4	8	23.40	15.3	-2.05
5	8	12.21	4.5	-4.43
6	8	67.93	44.5	4.43
Overall	48		24.5	

H = 40.72 DF = 5 P = 0.00

## ANEXO D

Tendão	Posição Medida	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D	Grupo E	Grupo F
1	45	39,39	37,26	52,11	27,27	12,12	80,29
1	45	43,32	36,05	57,87	24,84	10,3	66,05
1	45	35,75	34,54	45,45	21,21	9,39	68,47
1	45	36,96	34,23	59,38	25,14	11,81	67,56
1	45	35,75	24,84	27,27	24,54	9,39	63,63
1	paralelo	31,51	24,14	59,08	24,24	16,66	60,29
1	paralelo	31,51	26,08	56,05	29,99	15,15	86,35
1	paralelo	31,2	35,45	60,29	23,02	22,11	88,47
1	paralelo	27,87	24,84	62,41	19,69	16,66	78,78
1	paralelo	27,57	26,96	60,29	26,96	14,24	84,53
2	45	48,17	24,84	21,21	26,96	13,93	49,69
2	45	46,05	21,21	23,33	16,96	13,33	80,29
2	45	40,6	36,36	16,66	18,48	13,63	55,75
2	45	41,2	27,27	21,21	19,99	14,54	89,68
2	45	50,6	23,93	22,42	37,26	12,72	89,68
2	paralelo	47,26	19,69	23,33	25,14	8,78	53,32
2	paralelo	43,93	24,24	18,48	23,33	9,99	42,42
2	paralelo	43,02	30,3	18,18	25,75	9,99	43,03
2	paralelo	40,29	23,02	17,57	24,24	12,42	41,2
2	paralelo	47,26	22,11	16,36	20,9	10,6	36,36
3	45	38,48	24,84	28,17	27,57	18,18	88,47
3	45	51,81	25,75	35,45	22,42	14,24	89,38
3	45	43,93	20,9	26,05	19,69	13,63	62,72
3	45	46,35	19,69	34,84	18,18	14,24	74,53
3	45	44,23	25,75	29,39	21,81	13,63	87,87
3	paralelo	33,33	21,21	24,24	23,33	13,33	72,72
3	paralelo	34,84	24,84	23,93	21,81	12,42	86,65
3	paralelo	34,54	23,93	23,93	25,75	10,3	84,53
3	paralelo	57,57	38,17	17,27	24,24	9,09	86,35
3	paralelo	48,17	37,26	26,36	24,24	7,57	84,53
4	45	30,3	41,2	40,29	24,84	10,9	74,84
4	45	27,87	31,81	30,3	10,9	12,12	68,78
4	45	33,33	33,93	28,48	17,87	12,12	51,51
4	45	36,05	26,05	30,3	15,45	12,72	62,11
4	45	33,63	33,33	24,24	12,12	12,72	49,38
4	paralelo	33,63	24,84	24,24	15,15	10,6	79,08
4	paralelo	33,02	30,6	25,45	14,84	11,21	59,08
4	paralelo	27,27	39,99	25,75	12,42	9,69	60,6
4	paralelo	34,23	34,84	33,33	15,75	12,12	60,6
4	paralelo	40,9	36,36	39,69	17,87	9,39	58,17
5	45	23,33	22,72	18,18	18,18	11,81	60,6
5	45	39,08	24,24	24,24	17,87	11,21	75,44
5	45	45,45	19,99	27,57	24,24	10,6	72,72

5	45	41,2	21,21	28,78	15,15	6,06	66,35
5	45	46,05	33,33	38,17	27,27	10,3	78,78
5	paralelo	35,14	21,51	21,81	15,75	9,39	49,38
5	paralelo	37,87	22,42	25,45	18,78	13,93	52,41
5	paralelo	39,99	25,45	19,69	15,45	12,72	62,41
5	paralelo	34,84	22,11	30,3	17,87	13,93	60,9
5	paralelo	34,84	24,24	28,17	15,45	11,21	52,41
6	45	30,3	18,78	30,3	48,17	15,15	66,96
6	45	27,27	27,87	37,87	49,38	12,42	63,63
6	45	24,24	27,27	31,81	24,54	13,33	69,69
6	45	24,24	24,24	33,63	21,51	13,33	75,75
6	45	30,3	21,21	31,2	15,75	12,72	68,78
6	paralelo	41,2	24,24	26,96	19,08	12,72	52,11
6	paralelo	40,9	19,69	35,14	16,05	13,02	57,57
6	paralelo	35,14	27,27	34,54	24,24	9,09	49,38
6	paralelo	22,72	19,08	24,54	18,18	10,6	74,53
6	paralelo	39,39	17,87	33,33	24,24	12,42	75,75
7	45	44,54	24,24	30,9	30,6	12,72	83,02
7	45	29,39	23,02	33,33	46,35	9,36	65,44
7	45	30,6	25,45	36	40,9	9,69	67,56
7	45	46,96	22,72	30,3	31,2	11,21	75,75
7	45	45,75	27,87	27,57	33,33	9,69	82,11
7	paralelo	43,32	30,6	33,33	19,69	9,99	64,23
7	paralelo	36,36	25,75	28,17	20,6	9,39	60,6
7	paralelo	30,6	30,9	28,17	20,9	11,21	60,9
7	paralelo	33,93	19,99	34,23	20,6	10,6	55,44
7	paralelo	34,84	26,05	25,45	18,78	12,72	66,96
8	45	30,3	40,29	39,99	19,08	12,12	69,69
8	45	32,42	40,6	26,36	19,69	9,99	77,26
8	45	33,33	30,3	43,63	21,21	12,12	70,9
8	45	37,26	35,75	34,84	16,66	9,09	72,72
8	45	40,9	37,87	33,63	22,42	14,24	73,62
8	paralelo	40,29	21,51	31,51	20,9	13,33	61,2
8	paralelo	47,26	18,48	27,27	26,66	12,72	60,9
8	paralelo	42,42	34,54	27,57	19,99	13,02	60,6
8	paralelo	36,96	34,54	25,75	22,11	10,9	64,53
8	paralelo	44,23	36,96	33,02	19,69	10,3	65,14

ME-A1	ME-B1	ME-C1	ME-D1	ME-E1	ME-F1
38,23	33,38	48,42	24,6	10,6	69,2
45,32	26,72	20,97	23,93	13,63	73,02
44,96	23,39	30,78	21,93	14,78	80,59
32,24	33,26	30,72	16,24	12,12	61,32
39,02	24,3	27,39	20,54	10,6	70,78

27,27	23,87	32,96	31,87	13,33	74,96	
39,45	24,66	31,62	36,48	9,69	74,78	
34,84	36,96	35,69	19,81	12,12	72,84	
37,67	28,32	32,32	24,43	12,11	72,19	MÉDIAS 45°
6,13	5,36	7,83	6,66	1,75	5,54	DESVIO PADRÃO
MÉDIAS	DP					
A	37,67	6,13				
B	28,32	5,36				
C	32,32	7,83				
D	24,43	6,66				
E	12,11	1,75				
F	72,19	5,54				

ME-A2	ME-B2	ME-C2	ME-D2	ME-E2	ME-F2	
29,93	27,49	59,62	24,78	16,96	79,68	
44,35	23,87	18,78	23,87	10,36	43,27	
41,69	29,08	23,15	23,87	10,54	82,96	
33,81	33,33	29,69	15,21	10,6	63,51	
36,54	23,15	25,08	16,66	12,72	55,5	
35,87	21,63	30,9	20,36	12,42	61,87	
35,81	26,66	29,87	20,11	10,6	61,63	
42,23	29,21	29,02	21,87	12,72	62,47	
37,52875	26,8025	30,76375	20,84125	12,115	63,86125	MÉDIAS ZERO
4,843265	3,83181	12,37266	3,482177	2,218436	12,64859	GRAUS DESVIO PADRÃO

	MÉDIAS	DP
A	37,53	4,84
B	26,80	3,83
C	30,76	12,37
D	20,84	3,48
E	12,12	2,22
F	63,86	12,65

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDRATOU, E.; YOVA, D.; ATLAMAZOGLOU, V.; HANDRIS, P.; KLETSAS, D.; LOUKAS, S. Low power laser effects at the single cell level. A confocal microscopy study. In: KARU, T.I. & LUBART, R. **Effects of low-power light on biological systems V**. Amsterdam, Netherlands: Proceedings of SPIE, v. 4159, p. 25-33, 2000.

ALMEIDA-LOPES, L.; RIGAU, J.; ZÂNGARO, R.A.; GUIDUGLI-NETO, J.; JAEGER, M.M.M. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 29, p. 179-184, 2001.

ALMEKINDERS, L.C., DEOL, G. The effects of aging, anti-inflammatory drugs, and ultrasound on the in vitro response of tendon tissue. **The American Journal of Sports medicine**, v. 27, n. 4, p. 417-421, 1999.

AMANO, A MIYAGI, K. AZUMA, T. ISHIHARA, Y. KATSUBE, S. AOYAMA, I. Histological Studies on the rheumatoid synovial membrane irradiated with a low energy laser. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 15, p. 290 – 294, 1994.

AMARAL, A.C.; PARIZOTTO, NA.; SALVINI, T.F. He-Ne laser action in the regeneration of tibialis anterior muscle of mice. **Lasers in Medical Science**, v. 16, p. 44-52, 2001.

ALWATBAN, F.A.H. Lasers wound healer dosimetric dependence In: **Proceeding 2<sup>nd</sup> Congress World Association for Laser Therapy**. Kansas City, Missouri, USA, September 2–5, p. 43, 1998.

ALWATBAN, F.A.H. XING, Y.Z. The evaluation of relationship between the effects of wound healing and laser skin transmission In: **Proceeding 2<sup>nd</sup> Congress World Association for Laser Therapy**. Kansas City, Missouri, USA, September 2–5, p. 44, 1998.

BASFORD, J.R. Low-energy laser therapy : controversies and new research findings. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 9, p. 1-5, 1989.

BASFORD, J.R. Laser therapy: scientific basis and clinical role. **Orthopedics**. v. 6, p. 541-547, 1993.

BASFORD, J.R. Low-intensity laser therapy: still not an established clinical tool. **Lasers Surg. Med.** v. 16, p. 331-342, 1995.

BASFORD, J.R; SHEFFIELD, C.G.; MAIR, S.D.; ILSTRUP, D.M. Low energy helium neon laser treatment of thumb osteoarthritis. **Arch. Phys. Med.**, v. 68, p. 794-797, 1987.

BAXTER, G.D. **Therapeutic lasers: theory and practice**. United States of America: Ed. Churchill Livingstone, 1997.

BAXTER, G.D. Bionergetics and tissue optics. In: **Therapeutic lasers: theory and practice**. Edinburg: Churchill Livingstone, 1994.

BAXTER, G.D.; BELL, A.J.; ALLEN, J.M.; RAVEY, J. Low level laser therapy: current clinical practice in Northern Ireland. **Physiotherapy**, v. 77, p. 171-178, 1991.

BECKERMAN, H.; DE BIE, R.; BOUTER, L.; DE CUYPER, H.; OOSTENDORP, R. The efficacy of laser therapy for musculoskeletal and skin disorders: A criteria-based meta-analysis of randomized clinical trials. **Physical Therapy**, v. 72, p. 483-491, 1992.

BIRK, D.E.; TRELSTAD, R.L. Extracellular compartments in tendon morphogenesis: Collagen fibril, bundle, and macroaggregate formation. **The Journal of Cell Biology**, v. 103, p. 231-240, 1986.

BIRK, D.E.; ZYCBAND, E.I.; WINKELMANN, D.A.; TRELSTAD, R.L. Collagen fibrillogenesis *in situ*: fibril segments are intermediates in matrix assembly. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 86, p. 4549-4553, 1989.

BIRK, D.E.; ZYCBAND, E.I.; WOODRUFF, S.; WINKELMANN, D.A.; TRELSTAD, R.L. Collagen fibrillogenesis *in situ*: fibril segments become long fibrils as the developing tendon matures. **Developmental Dynamics**, v. 208, p. 291-298, 1997.

BJORDAL, J.M. Level laser therapy in tendon injuries? – a review of *in vitro* and *in vivo* trials. Disponível em: [http://www.laser.nu/lllt/lllt\\_science6.htm](http://www.laser.nu/lllt/lllt_science6.htm). Acesso em: 16 jul. 2002.

BORGES, D.S.; MORETTI, J.A.; PARIZOTTO, N.A.; CHAGAS, E.F. Influência do laser de arseneto de gálio (Ga-As) sobre a dor no modelo experimental de contorção abdominal em camundongos. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 1, n. 1, p. 1-7, 1996.

BOSATRA, M.; JUCCI, A.; OLLIARO, P.; QUACCI, D.; SACCHI, S. *In vitro* fibroblast and dermis fibroblast activation by laser irradiation at low energy. **Dermatologica**, v. 168, p. 157-162, 1984.

BRAVERMAN, B.; McCARTHY, R.J.; IVANKOVICH, A.D.; FORDE, D. Effect of helium-neon and infrared laser irradiation on wound healing in rabbits. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 9, p. 50-58, 1989.

CETTI, R.; CHRISTENSEN, S.E.; EJSTED, R.; JENSEN, N.M.; JORGENSEN, U. Operative versus nonoperative treatment of Achilles tendon rupture- A prospective randomized study and review of the literature. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 21, n. 6, p. 791-799, 1993.

CHAN, B.P.; CHAN, K.M.; MAFFULLI, N.; WEBB, S.; LEE, K.K.H. Effect of basic fibroblast growth factor. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n. 342, p. 239-247, 1997.

CHANG, J.; MOST, D.; THUNDER, R.; ALTO, P.; MEHRARA, B.; LONGAKER, M.T.; LINEAWEAVER, W.C. Molecular studies in flexor tendon wound healing: The pole of basic fibroblast growth factor gene expression. **The Journal of Hand Surgery**, v. 23A, n. 6, p. 1052-1058, 1998.

COLLS, J. **La terapia láser hoy**. Barcelona: Edición Centro de Documentación Láser, 1985.

CULAW, E.M.; CLARK, C.H.; MERRILEES, M.J. Connective tissues: Matrix composition and its relevance to physical therapy. **Physical Therapy**, v. 79, n. 3, p. 308-319, 1999.

CUNHA, A. **Ação do ultra-som terapêutico no processo de reparo do tendão em rato**. 2001. 59 f. Dissertação (Mestrado) –Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

DAVID, R.; NISSAN, M.; COHEN, I.; SOUDRY, M. Effect of low-power He-Ne laser on fracture healing in rats. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 19, p. 458-464, 1996.

DE BIE, R.A.; DE VET, H.; LENSSEN, T.F.; WILDENBERG, F.; KOOTSTRA, G. Low-level laser therapy in ankle sprains: a randomized clinical trial. **Arch Phys Med Rehabil**. v. 79, p. 1415-1420, 1998.

DYSON, M. The present state of laser yherapy in tissue repair: recent developments and future directions. In: **Proceeding 2<sup>nd</sup> Congress World Association for Laser Therapy**. Kansas City, Missouri, USA, September 2–5, p. 9, 1998.

ENGLAND, S.; FARRELL, A.J.; COPPOCK, J.S.; STRUTHERS, G.; BACON, P.A. Low power laser therapy of shoulder tendonitis. **Scand J Rheumatology**. v. 18, p. 427-431, 1989.

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. Membrane-bound intracellular collagen fibrils in fibroblasts and myofibroblasts of regenerating rabbit calcaneal tendons. **Tissue and Cell**, v. 23, n. 2, p. 173-190, 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, 1992a.

ENWEMEKA, C.S. Ultrastructural morphometry of membrane-bound intracytoplasmic collagen fibrils in tendon fibroblasts exposed to HeNe laser beam. **Tissue and Cell**. v. 24, n. 4, p. 511-523, 1992b.

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.

ENWEMEKA, C.S.; SPIELHOLZ, N.I. Modulation of tendon growth and regeneration by electrical fields and currents. In: CURRIER, D.P.; NELSON, R.M. **Dynamics of Human Biologic Tissue**. Philadelphia: F.A. Davis Company, cap. 3, p. 231-254, 1992.

ENWEMEKA, C.S.; COHEN-KORNBERG, E.; DUSWALT, E.P.; WEBER, D.M.; RODRIGUEZ, I.M. Biomechanical effects of three different periods of GaAs laser photostimulation on tenotomized tendons. **Laser Therapy**, v. 6, p. 181-188, 1994.

ENWEMEKA, C.S.; SPIELHOLZ, N.I.; NELSON, A.J. The effect of early functional activities on experimentally tenotomized Achilles tendons in rats. **American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation**, p. 264-269, 1988.

ENWEMEKA, C.S. Laser biostimulation of healing wounds: specific effects and mechanisms of action. **The Journal of Orthopaedic and Sports Physical Therapy**, v. 9, n. 10, p. 333-338, 1988.

FREITAS, I.G.F.; BARANAUSKAS, V.; CRUZ-HÖFLING, M.A. Lasers effects on osteogenesis. **Applied Surface Science**, v. 154-155, p. 548-554, 2000.

FLOREY, H.W. **General Pathology – Florey**. Philadelphia and London, ed. W.B. Saunders Company, 2 ed., 1958.

GAMALEYA, N.F. Laser biomedical research in the URSS. In: WOLBARSH, M.L. **Laser applications in medicine and biology**. New York and London: Plenum Press, p. 15-149, 1977.

GAYDESS, E.; SALAZAR, A.; REDDY, G.K.; MARSH, J.; KEMLING, L.; GOERKE, S.; SMALLEY, J.; SUZUKI, S.; ENWEMEKA, C.S.; STEHNO-BITTEL, L. The effects of laser stimulation on cell and bacterial growth in a cell culture wound model. In:

**Proceeding 2<sup>nd</sup> Congress World Association for Laser Therapy.** Kansas City, Missouri, USA, September 2–5, p. 72-73, 1998.

GELBERMAN, R.H.; VANDEBERG, J.S.; MANSKE, P.R.; AKESON, W.H. The early stages of flexor tendon healing: a morphologic study of the first fourteen days. **The Journal of Hand Surgery**, v. 10A, n. 6, p. 776-784, 1985.

GIGANTE, A.; SPECCHIA, N.; RAPALI, S.; VENTURA, A.; DE PALMA, L. Fibrillogenesis in tendon healing: on experimental study. **J. Biol. Res.** v. 7, n. 8, p. 203-210, 1996.

GOGIA, P.P. Physiology of wound healing. In: **Clinical Wound Management**. 1.ed. United States of America: SLACK Incorporated, cap. 1, p. 1-12, 1995.

GOLDMAN J.A. CHIAPPELLA J, CASEY H, BASS N. Laser therapy of rheumatoid arthritis. **Lasers in surgery and medicine**, v. 1, p. 93-101, 1980.

GONZÁLEZ, M.V. COLLS, J.C. Comportamiento de la Luz en la Interacción con Los Tejidos, en Especial el Láser de Baja Potencia. **Bol. Centro Documentación Láser**, v. 15-16, p. 6-21, 1988.

GREATHOUSE, D.C.; CURRIER, D.P.; GILMORE, R.L. Effects of clinical infrared laser on superficial radial nerve conduction. **Physical Therapy**, v. 65, n. 8, p. 1184-1187, 1985.

GUM, S.L.; REDDY, G.K.; STEHNO-BITTEL, L.; ENWEMEKA, C.S. 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.

HALLMAN, H.O.; BASFORD, J.R.; O'BRIEN, J.F.; CUMMINS, L.A. Does low-energy helium-neon alter "in vitro" replication of human fibroblasts? **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 8, p. 125-129, 1988.

HARRIS, D.M. Biomolecular mechanisms of laser biostimulation. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, p. 277-280, 1991.

HERCH J./ TERESI D. **El rayo láser**. Barcelona: Salvat Editores S.A. 1987.

HECHT, E. Óptica. Tradução e Prefácio: Rebordão, J.M.N.V. 2 ed: Fundação Calouste Gubelkain. Cap. 8, p. 282-346, 1991.

HEUSSLER J.K, HINCHEY G, MARGIOTTA E, QUINN R, BUTLER P, MARTIN J, STURGES AD. A double blind randomised trial of low power laser treatment in rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 52, p. 703-706, 1993.

HIRANUMA, K.; SUZUKI, K.; HIRATA, K.; NAKAMURA, H.; HIGASHI, K.; HIRANO, H. Extracellular matrices in peritendinous connective tissue after surgical injury to the chicken flexor tendon. **Arch Orthop Trauma Surg**, v. 115, p. 63-67, 1996.

HONMURA A, YANASE M, OBATA J, HARUKI E. Therapeutic effect of Ga-Al-As diode laser irradiation on experimentally induced inflammation in rats. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 12, p. 441-449, 1992.

HONMURA, A ISHII, A YANESE, M. OBATA, J. HARUKI, E. Analgesic effect of Ga-Al-As diode laser irradiation on hyperalgesia in carrageenin-induced inflammation. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 13, p. 463-469, 1993.

HUNTER, J.A.A.; FINLAY, B. Scanning electron microscopy of connective tissues in health and disease. **Intern. Rev. Connect. Tis. Res**, v. 6, p. 218-256, 1973.

JÓZSA, L.; KANNUS, P. **Human Tendons: Anatomy, Physiology and Pathology**. Human Kinetics, USA, 1997.

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J.S.F. **Histologia Básica**. 7 ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1990.

KAKAR, S.; KHAN, U.; MCGROUTHER, D.A. Differential cellular response within the rabbit tendon unit following tendon injury. **The Journal of Hand Surgery**, v. 23B, n. 5, p. 627-632, 1998.

KANA, J.S.; HUTSCHENREITER, G.; HAINA, D.; WAIDELICH, W. Effect of low-power density radiation on healing of open skin wounds in rats. **Arch. Surg.**, v. 116, p. 293-296, 1981.

KANNUS, P.; JÓZSA, L. Histopathological changes preceding spontaneous rupture of a tendon - A controlled study of 891 patients. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 73-A, n. 10, p. 1507-1525, 1991.

KANNUS, P.; NIITTYMAKI, S.; JARVINEN, M. Recent trends in women's sports injuries. A three-year prospective, controlled study. **Journal Sports Trauma**. v. 12, p. 161-167, 1990.

KANNUS, P.; NIITTYMAKI, S; JARVINEN, M. Sports injuries in women: A one-year prospective follow-up study at on outpatient sports clinic. **Br. Journal Sports Med**. v. 21, p. 37-39, 1987.

KARU T, PYATIBRAT L, KALENDO G, ESENALIEV R. Effects of monochromatic low-intensity light and laser irradiation on adhesion of HeLa cells in vitro. **Lasers in surgery and Medicine**, v. 18, p. 171 –177, 1996.

KARU, T. The science of Low-Power Laser Therapy. Australia: **Gordon and Breach Science Publishers**; 1998.

KARU, T.I. Mechanisms of interaction of monochromatic visible light with cells. **Proceedings of Effects of Low Power Light on Biological Systems**, v. 2630, p. 2-9, 1995.

KARU, T.I.; PYATIBRAT, L.; KALENDO, G. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 27, p. 219-223, 1995.

KARU, T.I. Mechanisms of low-power laser light action on cellular level. In: KARU, T.I. & LUBART, R. **Effects of low-power light on biological systems V**. Amsterdam, Netherlands: Proceedings of SPIE, v. 4159, p. 01-17, 2000.

KARU, T.I. Molecular mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser radiation. **Lasers Life Sci**. v. 1, n. 2, p. 53-74, 1988.

KARU, T.I. Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. **IEEE Journal of Quantum electronics QE**, v. 23, n. 10, p. 1703-1717, 1987.

KARU, T.I. **Photobiology of low-power laser therapy**, v. 8. London: Harwood Academic Publishers, 1989.

KARU, T.I.; KALENDO, G.S.; LETOKHOV, V.S.; LOBKO, V.V. Biostimulation of He-La cells by low intensity visible light. **Sov. J. Quantum Electron**. v. 9, p. 1761-1767, 1982.

KARU, T.I.; KALENDO, G.S.; LETOKHOV, V.S.; LOBKO, V.V. Biostimulation of He-La cells by low intensity visible light. Stimulation of DNA and RNA synthesis in a wide spectral range. **Sov. J. Quantum Electron**, v. 10, p. 1771-1776, 1983.

KARU, T.I.; TIPHLOVA, O.; SAMOKHINA, M.; DIAMANTOPOULOS, C. Effects of near-infrared laser and superluminous diode irradiation on *Escherichia Coli* division rate. **IEEE Journal of Quantum Electronics**, v. 26, p. 2162-2165, 1990.

KHAN, K.M.; COOK, J.L.; BONAR, F.; HARCOURT, P.; ASTROM, M. Histopathology of common tendinopathies. **Injury Clinic**, v. 27, n. 6, p. 393-408, 1999.

KIM, K.S.; LEE, P.; LEE, J.H.; KIM, Y, K. Effects of different modes of low level laser irradiation on the healing of experimentally infected wounds. **Laser Therapy**, v. 10, p. 10-17, 1998.

KIPSHIDZE, N.; NIKOLAYCHIK, V.; KEELAN, M.; SHANKAR, L.R.; KHANNA, A.; KORNOWSKI, R.; LEON, M.; MOSES, J. Low-power helium:neon laser irradiation enhances production of vascular endothelial growth factor and promotes growth of endothelial cells in vitro. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 28, p. 355-364, 2001.

KITCHEN, S. S. & BAZIN, S. **Eletroterapia de Clayton**. São Paulo: Ed. Manole Ltda, p. 191-210, 1996.

KITCHEN, S.S. & PARTRIDGE, C.J. A review of level laser therapy. Part I: background, physiological effects and hazards. **Physiotherapy**, v. 77, n. 3, p. 161-170, 1991.

KLOTH, Luther. **Wound Healing: alternatives in management**. USA: Churchill Livingstone. p. 347-364, 1997.

KUBASOVA, T.; KOVACS, L.; SOMOSY, Z.; UNK, P.; KOKAI, A. Biological effect of He-Ne laser: investigations on functional and micromorphological alterations of cell membranes, in vitro. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 4, p. 381-388, 1984.

KUBASOVA, T.; FENYO, M.; SOMOSY, Z. et al. Investigations on biological effect of polarised light. **Photochemistry and Photobiology**, v. 48, p. 505-509, 1988 *apud* LAAKSO, L.; RICHARDSON, C.; CRAMOND, T. Factors affecting low level laser therapy. **Australian J. Physiotherapy**, v. 39, n. 2, p. 95-99, 1993b.

KURTZ, R.C.; ALMEIDA, A.L.; APFEL, M.R.; ELIAS, N.; MESQUITA, K.C. Cicatrização nas lesões agudas do tendão calcâneo - estudo experimental comparativo entre tratamento conservador e cirúrgico. **Rev Bras Ortop**, v. 31, n. 10, p. 857-861, 1996.

KUSCHNER, S.H.; ORLANDO, C.A.; MCKELLOP, H.A.; SARMIENTO, A. A comparison of the healing properties of rabbit Achilles tendon injuries at different levels. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n. 272, p. 268-273, 1991.

LAAKSO, L.; RICHARDSON, C.; CRAMOND, T. Quality of light – is laser necessary for effective photobiostimulation ? **Australian J. Physiotherapy**, v. 39, n. 2, p. 87-92, 1993a.

LAAKSO, L.; RICHARDSON, C.; CRAMOND, T. Factors affecting low level laser therapy. **Australian J. Physiotherapy**, v. 39, n. 2, p. 95-99, 1993b.

LABBE, R.F.; SKOGERBOE, K.J; DAVIS, H.A.; RETTMER, R.L. Laser photobioactivation mechanisms: In vitro studies using ascorbic acid uptake and

hydroxyproline formation as biochemical markers of irradiation response. **Lasers Surg. Med.**, v. 10, p. 201-207, 1990.

LOEVSCHELL, H.; ARENHOLT-BINDSLEV, D. Effect of low level diode laser irradiation of human oral mucosa fibroblasts in vitro. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 14, p. 347-354, 1994.

LONGO, G.J. Está correta a dosimetria laser em  $J/cm^2$  ?. **Fisioterapia em Movimento**, v. 6, n. 1, p. 33-38, 1993.

LONGO, L. & MESTER, A. Present and future of laser cicatrization. In: **Proceeding 2<sup>nd</sup> Congress World Association for Laser Therapy**. Kansas City, Missouri, USA, September 2-5, p. 10-11, 1998.

LONGO, L.; EVANGELISTA, S.; TINACCI, G.; SESTI, A .G. Effects of diode laser silver Arsenide-Aluminium (Ga-Al-As) 904 nm on healing of experimental wounds. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 7, p. 444-447, 1987.

LOPES, L.A. Laser de baixa intensidade na clínica odontológica: reparação tecidual. In: Semana de Óptica do Instituto de Física de São Carlos, 6, São Carlos, 2001. **Anais da 6<sup>a</sup> Semana de Óptica do Instituto de Física de São Carlos**. São Carlos: IFSC – USP, p. 4-5, 2001.

LOW, L.; REED, A. **Eletroterapia Explicada: Princípios e Prática**. 3<sup>a</sup>ed., Barueri-SP: Manole, 2001.

LUBART, R.; LAVIE, R.; FRIEDMANN, M.; SINYKOV, M.; SHAINBERG, H.; BREITBART, H.; GROSSMAN, N. UVA and visible light-induced reactive oxygen species (ROS) formation in cell cultures: an electron paramagnetic resonance (EPR) study. In: KARU, T.I. & LUBART, R. **Effects of low-power light on biological systems V**. Amsterdam, Netherlands: Proceedings of SPIE, v. 4159, p. 18-19, 2000.

LUBART, R.; WOLLMAN, Y.; FRIEDMANN, H.; ROCHKIND, S.; LAULICHT, I. Effects of visible and near-infrared lasers on cell cultures. **J. Photochem. Photobiol.** v. 12, p. 305-310, 1992.

LUNDBORG, G.; RANK, F.; HEINAU, B. Intrinsic tendon healing: a new experimental model. **Scand J Plast Reconstr Surg**, v. 19, p. 113-117, 1985.

MAILLET, H. **O Laser – Princípios e técnicas de aplicação**. São Paulo - SP: Ed. Manole, 1987.

MANSKE, P.R.; LESKER, B.S. Histologic evidence of intrinsic flexor tendon repair in various experimental animals: an in vitro study. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n. 182, p. 297-304, 1984.

MANSKE, P.R.; LOUIS, S.T.; GELBERMAN, R.H.; VANDE BERG, J.S. Intrinsic flexor-tendon repair: a morphological study *in vitro*. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 66-A, n. 3, p. 385-389, 1984.

MANTEIFEL, V.; BAKEEVA, L.; KARU, T. Ultrastructural changes in chondriome of human lymphocytes after irradiation with He-Ne laser: appearance of giant mitochondria. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 38, p. 25-30, 1997.

McMEEKEN, J.; STILLMAN, B. Perceptions of the clinical efficacy of laser therapy. **Australian Journal of Physiotherapy**, v. 39, n. 2, p. 101-107, 1993.

MCNEILLY, C.M.; BANES, A.J.; BENJAMIN, M.; RALPHS, J.R. Tendon cells in vivo form a three dimension network of cell processes linked by gap junctions. **J. Anat.** v. 189, p. 593-600, 1996.

MELLO, M.L.; GODO, C.; VIDAL, B.C.; ABUJADI, J.M. Changes in Macromolecular Orientational on Collagen Fibers During the Process of Tendon Repair in the Rat. **Ann. Histochem.** v. 20, p. 145-152, 1975.

MESTER, E.; MESTER, A.F.; MESTER, A. The biomedical effects of laser application. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 5, p. 31-39, 1985.

MIMNI, M.E.; HARKNESS, R.D. Molecular structures and functions of collagen. In: MIMNI, M.E. **Collagen**. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, p. 1-77, 1988.

MOORE, M.J.; BEAUX, A. A quantitative ultrastructural study of rat tendon from birth to maturity. **J. Anat.** v. 153, p. 163-169, 1987.

MORIMOTO, Y.; ARAI, T.; KIKUCHI, M.; NAKAJIMA, S.; NAKAMURA, H. Effect of low-intensity argon laser irradiation on mitochondrial respiration. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 15, p. 191-199, 1994.

NICCOLI-FILHO, W.D.; OKAMOTO, T.; CARDENUTO, N.; PICON, L.C. Efeitos da radiação laser do tipo hélio neônio verde (550 nm) no processo de reparo em feridas de extração dental: estudo histológico em ratos. **Rev. Odontol. UNESP**, v. 22, n. 2, p. 213-221, 1993.

OHSHIRO, T. **Low reactive-level laser therapy practical application**. Chichester: Ed. John Wiley & Sons, p. 3-10, 1991.

OHSHIRO, T. & FUJINO, T. Laser applications in plastic and reconstructive surgery. **Keio J. Med.**, v. 42, n. 4, p. 191-195, 1993.

OLIVEIRA, N.M.L.; PARIZOTTO, N.A.; SALVINI, T.F. Ga-As (904 nm) laser radiation does not affect muscle regeneration in mouse skeletal muscle. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 25, p. 13-21, 1999.

OZAWA, Y.; SHIMIZU, N.; KARIYA, G.; ABIKO, Y. Low-energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells. **Bone**, v. 22, n. 4, p. 347-354, 1998.

PAOLINI, D.E.; PAOLINI-PISANI, L.E. Tratamiento de la lesion del tendon manguito de los rotadores con laser de baja potencia – estudio prospectivo. Disponível em: <http://www.laser.nu/lllt/lllt-science7.htm#5>. Acesso em: 16 jul. 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. Hydrogen bonding of collagen molecule stimulated by He-Ne laser in the regenerating of tendon. In: **Proceeding 2<sup>nd</sup> World Association of Laser Therapy**. Kansas City, Missouri, USA, September 2–5, p. 64-65, 1998a.

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

PARKINSON, J.; BRASS, A.; CANOVA, G.; BRECHET, Y. The mechanical properties of simulated collagen fibrils. **J. Biomechanics**, v. 30, n.6, p. 549-554, 1997.

PARRISH J, DEUTSCH T. Laser photomedicine. **IEEE Journal of Quantum electronics**, v. QE-20, n. 12, p. 1386-1396, 1984.

PARRISH, J.A.; ROSEN, C.F.; GANGE, W. Therapeutic uses of light. **Annals New York Academy of Sciences**, p. 354-364, 1985.

PASSARELLA, S.; CASAMASSIMA, E.; MOLINARI, S.; PASTORE, D. Increase of proton electrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by helium neon laser. **FEBS**, v. 175, n. 1, p. 95-99, 1984.

PEREIRA, A.N.; EDUARDO, C.P.; MATSON, E.; MARQUES, M.M. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 31, p. 263-267, 2002.

PEREIRA, F.E.L. Degenerações. Morte Celular. Alterações do Intertício. In: BOGLIOLO, **Patologia**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 47-81, 1994.

PIMENTEL, E.R. Form birrefringence of collagen bundles. **Acta Histochem. Citochem**, v. 14, n. 1, p. 35-49, 1981.

PLAPLER, P.G.; CAMANHO, G.L.; SALDIVA, P.H.N. Avaliação numérica das ondulações das fibras colágenas em ligamento patelar humano (tendão patelar). **Rev. Bras. Ortop.** v. 36, n. 8, p. 317-321, 2001.

POSTACCHINI, F.; DE MARTINO, C. Regeneration of rabbit calcaneal tendon maturation of collagen and elastic fibers following partial tenotomy. **Connective Tissue Research**, v. 8, p. 41-47, 1980.

POURREAU-SCHNEIDER, N.; AHMED, A.; SOUDRY, M.; JACQUEMIER, J.; KOPP, F.; FRANQUIN, J.C.; MARTIN, P.M. Helium-neon laser treatment transforms fibroblasts into myofibroblasts. *American Journal of Pathology*, v. 137, n. 1, p. 171-177, 1990.

PUDDU, G.; IPPOLITO, E.; POSTACCHINI, F. A classification of Achilles tendon disease. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 4, n. 4, p. 145-150, 1976.

REDDY, G.K.; STEHNO-BITTEL, L.; ENWEMEKA, C.S. Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit achilles tendons. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 22, p. 281-287, 1998a.

REDDY, G.K.; GUM, S.; STEHNO-BITTEL, L.; ENWEMEKA, C.S. Biochemistry and biomechanics of healing tendon: Part II. Effects of combined laser therapy and electrical stimulation. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, p. 794-800, 1997.

REDDY, G.K.; CHILDS, E.; OGLE, A.; ENWEMEKA, C.S.; STEHNO-BITTEL, L. The effects of laser stimulation on wound healing in diabetic rats. In: **Proceeding 2<sup>nd</sup> Congress World Association for Laser Therapy**. Kansas City, Missouri, USA, September 2-5, p. 124-125, 1998b.

REDDY, G.K.; STEHNO-BITTEL, L.; ENWEMEKA, C.S. Laser photostimulation accelerates wound healing in diabetic rats. **Wound Repair and Regeneration**, v. 9, n. 3, p. 248-255, 2001.

REED, B.; ZARRO, V. Inflammation and repair on the use of thermal agents. In: MICHLOVITZ, S.L. **Thermal Agents in Rehabilitation**. 2 ed. Philadelphia: F.A. Davis Company, p. 3-17, 1990.

REYNOLDS, N.L.; WORRELL, T.W. Chronic Achilles peritendinitis: etiology, pathophysiology, and treatment. **JOSPT**, v. 13, n. 4, p. 171-176, 1991.

REZENDE, S.B.; RIBEIRO, M.S.; GARCIA, V.G.; MALDONADO, E.P. Histological and biometrical comparison among three irradiation configurations for skin wound healing acceleration in rats, using an 830 nm diode laser. In: **American Society for Laser Medicine and Surgery Twenty-Second Annual Meeting**. Atlanta, Georgia, April 10-14, 2002.

RIBEIRO, M.S.; ZECELL, D.M.; FONTENELE, J.D.; PELLEGRINI, C.M.R.; ZORN, T.M.T. Incorporation of [<sup>3</sup>H]-praline in the dermis of mice following He-Ne polarized laser radiation in the wound healing process. A preliminary study. In: **Proceeding 2<sup>nd</sup> Congress World Association for Laser Therapy**. Kansas City, Missouri, USA, September 2-5, p. 13-14, 1998.

RIGAU, J.; SUN, C.; TRELLES, M.A.; BERNS, M. Effects of the 633 nm laser on the behaviour and morphology of primary fibroblast culture. **SPIE**, v. 2630, p. 38-42, 1994.

ROBERTO, C. The 780 laser and the CO<sub>2</sub> laser in chronic Achilles tendonitis: different methods compared. In: **Proceeding 2<sup>nd</sup> Congress World Association for Laser Therapy**. Kansas City, Missouri, USA, September 2-5, p. 40-42, 1998.

ROBBINS, S.L.; COTRAN.; KUMAR. Inflamação e Reparação. In: **Patologia Estrutural e Funcional**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.45-83, 1994.

ROCKIND S, NISSAN M, LUBART R, AVRAM J, BARTAL A The in vivo nerve response to direct low-energy laser irradiation. **Acta Neurochir**, v. 94, p. 74-77, 1988.

RUSSELL, J.E.; MANSKE, P.R. Collagen synthesis during primate flexor tendon repair in vitro. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 8, p. 13-20, 1990.

SAITO, S. & SHIMIZU, N. Stimulatory effects of low-power laser irradiation on bone regeneration in midpalatal suture during expansion in the rat. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v. 111, p. 525-532, 1997.

SALOMÃO, O.; CARVALHO, A.E.; FERNANDES, T.D.; FILHO, I.H.T.; NETO, J.C. Lesões tendíneas no pé e no tornozelo do esportista. **Rev. Bras. Ortop.**; v. 28, n. 10, p. 731-736, 1993.

SANDOVAL-ORTIZ, M.C. **Efeito do laser de baixa potência sobre o processo inflamatório articular de coelhos.** 2001. 161 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

SANDOVAL-ORTIZ, M.C.; CARRINHO, P.M; SANTO, A.; GONÇALVES, R. Laser de baixa intensidade: princípios e generalidades – Parte 1. **Fisioterapia Brasil**, v. 2, n. 1, p. 221-240, 2001.

SANTANDER, R.G.; ARRIBA, M.A.P.; CUADRADO, G.M.; ALONSO, A.L.; MARTINEZ, M.G.S.; ALONSO, F.J.M.; MONTEAGUDO, M.; LOBO, M.V.T. Intracellular biogenesis of collagen fibrils in ‘activated fibroblasts’ of tendo achillis. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 81, p. 522-530, 1999.

SANKARAN, V.; WALSH, J.T. Birefringence measurement of rapid structural changes during collagen denaturation. **Photochemistry and Photobiology**, v. 68, n. 6, p. 846-851, 1998.

SAPARIA, D.; GASSBERG, E.; LYONS, R.F.; ABERGEL, R.P.; BANEUX, P.; CASTEL. J.C.; DWYER, R.; UITTO, J. Demonstration of elevated type I and type III procollagen mRNA levels in cutaneous wounds treated with Helium-Neon laser. **Biochem. Biophys. Res. Com.** v. 138, n. 3, p. 1123-1128, 1986.

SCHAFFER M, SROKA R, SCHRADER-REICHARDT U, SCHAFFER P.M. Biomodulative effects induced by 805 nm laser light irradiation of normal and tumor cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 40, p. 253-357, 1997.

SCHMITT I.; RAISER, A.G.; GRAÇA, D.L.; CASTAGNA, C.D.; GEHVER, C.; MAIORKA,P. Os efeitos da radiação laser de arseneto de gálio (AsGa) sobre a regeneração de tendões em cães. **Braz. J. vet Res. Anim. Sci.** v. 30, n. 2, p. 145-149, 1993.

SCHLAGER, A.; KRONBERGER, P.; PETSCHKE, F.; ULMER, H. Low-Power laser light in the healing of burns: a comparison between two different wavelengths (635 nm and 690 nm) and a placebo group. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 27, p. 39-42, 2000.

SIEBERT, W.; SEICHERT, N.; SIEBERT, B.; WIRTH, C.J. What is the efficacy of “soft” and “mid” lasers in therapy of tendinopathies? **Arch Orthop Trauma Surg**. v. 106, p. 358-363, 1987.

SIMUNOVIC, Z. Low level laser therapy with trigger points technique: a clinical study on 243 patients. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v. 14, p. 163-167, 1996.

SIMUNOVIC, Z.; TROBONJACA, T.; TROBONJACA, Z. Treatment of medial and lateral epicondylitis – tennis and golfer’s elbow with low level laser therapy: a multicenter

double blind, placebo - controlled clinical study on 324 patients. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v. 16, p. 145-151, 1998.

SIMUNOVIC, Z.; IVANKOVICH, A.D.; DEPOLO, A. Wound healing of animal and human body sport and traffic accident injuries using low-level laser therapy treatment: a randomized clinical study of seventy-four patients with control group. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v. 18, n. 2, p. 67-73, 2000.

SNYDER-MACKLER, L. & BORK, C.E. Effect of helium-neon laser irradiation on peripheral sensory nerve latency. **Physical Therapy**, v. 68, n. 2, p. 223-225, 1988.

SOMA, C.A.; MANDELBAUM, B.R. Repair of acute achilles tendon ruptures. **Orthopedic Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 239-247, 1995.

SROKA, R.; SCHAFFER, M.; FUCHS, C.; PONGRATZ, T. Effects on the mitosis of normal and tumor cells induced by light treatment of different wavelengths. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 25, p. 263-271, 1999.

STADLER, I.; LANZAFAME, R.J.; EVANS, R.; NARAYAN, V.; DAILEY, B.; BUEHNER, N.; NAIM, J.O. 830 nm irradiation increases the wound tensile strength in a diabetic murine model. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 28, p. 220-226, 2001.

STEHNO-BITTEL, L.; REDDY, G.K.; GUM, S.; ENWEMEKA, C.S. 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.

STOLIK, S.; DELGADO, J.A.; PÉREZ, A.; ANASAGASTI, L. Measurement of the penetration depths of red and near infrared light in human "ex vivo" tissues. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 57, p. 90-93, 2000.

STOLINSKI, C. Disposition of collagen fibrils in human tendons. **J. Anat.**, v.186, p.577-583, 1995.

TAGUCHI, Y. Thermographic changes following laser irradiation for pain relief. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, april, p. 143-146, 1991.

TATARUNAS, A.C.; MATERA, J.M.; DAGLI, M.L.Z. Estudo clínico e anatomopatológico da cicatrização cutânea no gato doméstico. Utilização do laser de baixa potência GaAs (904 nm). **Acta Cir. Bras.**, v. 13, n. 2, 1998.

THOMSEN, S.; PEARCE, J.; CHEONG, W.F. Changes in birefringence as markers of thermal damage in tissues. **IEEE transactions on biomedical engineering**, v. 36, n. 12, p. 1174-1176, 1989.

TILLMAN, L.J; CUMMINGS, G.S. Biologic mechanisms of connective tissue mutability. In: CURRIER, D.P; NELSON, R.M. **Dynamics of Human Biologic Tissue**, Philadelphia: F.A. Davis Company, cap. 1, p. 1-41, 1992a.

TILLMAN, L.J; CUMMINGS, G.S. Remodeling of dense connective tissue in normal adult tissues. In: CURRIER, D.P.; NELSON, R.M. **Dynamics of Human Biologic Tissue**, Philadelphia: F.A. Davis Company, cap. 2, p. 45-69, 1992b.

TIPHLOVA, O.A. & KARU, T.I. Action of monochromatic low-intensity visible light on growth of E. coli. **Microbiol.**, v. 60, p. 626-630, 1987.

TUNER, J.; HODE, L. It's all in the parameters: a critical analysis of some well-known negative studies on low level laser therapy. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v. 16, n. 5, p. 245-248, 1998.

TUNÉR, J.; HODE, L. **Low level laser therapy. Clinical practice and scientific background**. Sweden: Prima Books; 1999.

VAN BREUGHEL, H. *et al.* Power density and exposure time of He-Ne laser irradiation are more important than total energy dose in photo-biomodulation of human fibroblasts in vitro. **Lasers Surgery and Medicine**, v. 12, p. 528, 1992 *apud* TUNÉR, J.; HODE, L. **Low level laser therapy. Clinical practice and scientific background**. Sweden: Prima Books; 1999.

VAN DER VEM, P.H.; LEYS, A.; VERBUYST, C.; VAN DER BRADEN, E.; KERCKHOFS, E.; LIEVENS, P. The influence of IR-laser on the proliferation of fibroblasts: an *in vitro* study. In: **Proceedings 2<sup>nd</sup> Congress World Association for Laser Therapy**. Kansas, USA, p. 12, 1998.

VAN DER VEEM, L. Wound healing process: influence of LLLT on the proliferation on fibroblasts and on the lymphatic regeneration. Disponível em: [http://www.laser.nu/lllt/lllt\\_science6.htm](http://www.laser.nu/lllt/lllt_science6.htm). Acesso em Jul. 2002.

VECCHIO, P.; CAVE, M.; KING, V.; ADEBAJO, A.O.; SMITH, M.; HAZLEMAN, B.L. A double-blind study of the effectiveness of low level laser treatment of rotator cuff tendonitis. **British Journal of Rheumatology**, v. 32, p. 740-742, 1993.

VEÇOSO, M.C. **Laser em fisioterapia**. 1<sup>a</sup> ed. Louvise. São Paulo, 1993.

VIDAL, B.C. Crimp as part of a helical structure. **Life Sciences Biochemistry**, v.318, p.173-178, 1995a.

VIDAL, B.C. From collagen type I solution to fibers with a helical pattern: a self-assembly phenomenon. **Life Sciences Biochemistry**, v. 318, p. 831-836, 1995b.

VIDAL, B.C. Matrix extracellular. In: VIDAL, B.C.; MELLO, M.L.S. **Biologia Celular**, Rio de Janeiro e São Paulo: Livraria Atheneu, cap.19, p. 273-304, 1987a.

VIDAL, B.C. Métodos em Biologia Celular. In: VIDAL, B.C.; MELLO, M.L.S. **Biologia Celular**. Rio de Janeiro e São Paulo: Atheneu, cap.2, p.5-40, 1987b.

VIDAL, B.C.; CARVALHO, H. F. Agregational state on molecular order of tendons as a function of age. **Matrix**, v. 10, p. 48-57, 1990.

VIDAL, B.C. Macromolecular desorientation in detached tendons. **Protoplasma**, p.122-132, 1966.

VIDAL, B.C.; MELLO, M.L.S.; GODO, C.; CASEIRO, A.C.; ABUJADI, J.M. Anisotropic properties of silver plus food – impregnated collagen bundles ADB and form birefringence curves. **Ann. Histochem**, v. 20, p. 15-26, 1975.

VIDAL, B.C. Evaluation of the carbohydrate role in the molecular order of collagen bundles: microphotometric measurements of textural birefringence. **Cellular and Molecular Biology**, v. 32, n. 5, p. 527-535, 1986.

VIDAL, B.C. Cell. and extracellular matrix interaction: a feed-back theory based on molecular order recognition – adhesion events. **Revista FCM. UNICAMP**, v. 4, n. 11, 1994.

VILLARROYA-APARICIO, A.; EZQUERRO-ALONSO, A.I.; VILLARROYA-APARICIO, S.; MOROS-GARCIA, T.; MARCO-SANZ, C. El laser y el dolor. **Rehabilitación**, v. 28, n. 5, p. 346-353, 1994.

VILLARTA, R.; VIDAL, B.C. Anisotropic and biomechanical properties of tendons modified by exercise and denervation: aggregation and macromolecular order in collagen bundles. **Matrix**, v. 9, p. 55-61, 1989.

WEBB, C.; DYSON, M.; LEWIS, W.H.P. Stimulatory effect of 660 nm low level laser energy on hypertrophic scar-derived fibroblasts: possible mechanisms for increase in cell counts. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 22, p. 294-301, 1998.

WHITTAKER, E.; CANHAM, P.B. Demonstration of quantitative fabric analysis of tendon collagen using two-dimensional polarized light microscopy. **Matrix**, v. 11, p. 56-62, 1991.

WILDEN, L. & KARTHEIN, R. Import of radiation phenomena of electrons and therapeutic low-level laser in regard to the mitochondrial energy transfer. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v. 16, n. 3, 1998.

YAAKOBI, T.; MALTZ, L.; ORON, U. Promotion of repair in the cortical bone of the tibia in rats by low energy laser (HeNe) irradiation. **Calcified Tissue International**, v. 59, p. 297-300, 1996.

YOUNG, S.; BOLTON, P.; DYSON, M.; HARVEY, W.; DIAMANTOPOULOS, C. Macrophage responsiveness to light therapy. **Lasers Surgery and Medicine**, v. 9, p. 497-505, 1989.