



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

**“ESTUDO DOS EFEITOS DO LASER DE BAIXA  
INTENSIDADE NA ANGIOGÊNESE EM RUPTURA  
PARCIAL DO TENDÃO CALCÂNEO DE RATOS”**

**Ana Claudia Bonome Salate**

**SÃO CARLOS**

**2004**

**Ana Claudia Bonome Salate**

**“ESTUDO DOS EFEITOS DO LASER DE BAIXA  
INTENSIDADE NA ANGIOGÊNESE EM RUPTURA  
PARCIAL DO TENDÃO CALCÂNEO DE RATOS”**

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 Antonio Parizott**

**SÃO CARLOS**

**2004**

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

S161ef

Salate, Ana Claudia Bonome.

Estudo dos efeitos do laser de baixa intensidade na angiogênese em ruptura parcial do tendão calcâneo de ratos / Ana Claudia Bonome Salate. -- São Carlos : UFSCar, 2005.

154p.

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

1. Medicina experimental - rato. 2. Laser de baixa potência. 3. Tendão de Aquiles. 4. Reparo tecidual. I. Título.

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

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter-me conduzido na realização deste trabalho, dando forças para suportar os momentos difíceis e disposição para permitir a concretização de mais essa etapa em minha vida.

Com muito amor à meus pais e meu namorado Cleiton pela paciência e incentivo constante, compartilhando comigo as dificuldades e os momentos de satisfação e alegria.

Ao meu orientador e amigo Nivaldo pela confiança, colaboração e assistência necessária para a realização deste trabalho.

Às minhas amigas Gisele, Patrícia Gaspar e Daniela pela amizade, pela ajuda durante o procedimento experimental e pelos grandes momentos de descontração e alegria. Muito obrigada!

Ao professor Benedito Galvão Benze pela grande contribuição no processamento estatístico.

À professora Salete pelo auxílio durante o período experimental e por sempre estar disposta a ajudar em qualquer circunstância.

À professora Tânia por abrir as portas de seu laboratório para poder realizar as análises deste trabalho.

Ao meu amigo Paulo Koeke pelas dicas, por estar sempre disposto à colaborar nos momentos em que precisei.

Aos companheiros de laboratório: Ana Claudia, Paulo, Wouber, Charles pela amizade, momentos de humor e ótima convivência.

À todas as pessoas da Pós-graduação que não se tornaram apenas colegas, e sim amigos dispostos a compartilhar conhecimentos e momentos grande descontração.

**COM TODO CARINHO, MUITO OBRIGADA!!!**



# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>5</b>
2.1. TECIDO TENDÍNEO.....	6
2.1.1. Definição.....	6
2.1.2. Arquitetura interna dos tendões.....	7
2.1.3. Vascularização do Tendão.....	7
2.2. TENDÃO CALCÂNEO.....	8
2.2.1. Vascularização do Tendão Calcâneo.....	9
2.2.2. Ruptura do tendão calcâneo.....	10
2.3. PROCESSO DE REPARO TECIDUAL.....	12
2.3.1. Fase Inflamatória (1 a 7 dias pós lesão).....	13
2.3.2. Fase Neoangiogênica e Proliferativa (5 a 21 dias pós-lesão).....	17
2.3.3. Fase de Remodelamento (14 a 360 dias pós-lesão).....	23
2.4. CICATRIZAÇÃO INTRÍNSICA E EXTRÍNSICA DO TECIDO TENDÍNEO	24
2.4.1. Cicatrização intrínseca.....	25
2.4.2. Cicatrização extrínseca.....	26
2.4.3. Cicatrização intrínseca e extrínseca.....	27
2.5. LASER DE BAIXA INTENSIDADE: PRINCÍPIOS E GENERALIDADES.....	28
2.5.1. Histórico.....	28
2.5.2. Tipos de laser.....	29
2.5.3. Características da luz laser.....	31
2.5.4. Parâmetros de irradiação laser.....	33
2.5.5. Penetração da luz nos tecidos.....	41
2.5.6. Efeitos do laser nos tecidos.....	42
2.6. LASER NO REPARO TENDÍNEO.....	54
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>62</b>
3.1. Objetivo geral.....	63
3.2. Objetivos específicos.....	63
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>64</b>
4.1. ANIMAIS.....	65
4.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	65
4.3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	68
4.3.1. Lesão.....	68
4.3.2. Equipamento utilizado.....	71
4.3.3. Procedimento de irradiação.....	72
4.3.4. Procedimento após a irradiação.....	74
4.4. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	75
4.5. ANÁLISE POR MICROSCOPIA DE LUZ COMUM.....	76
4.5.1. Contagem dos vasos.....	77
4.5.2. Análise qualitativa e semiquantitativa do reparo tendíneo.....	77

4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	78
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>82</b>
5.1. ANÁLISE QUALITATIVA.....	83
5.2. AVALIADORES.....	87
5.3. ANÁLISE QUANTITATIVA: NEOVASCULARIZAÇÃO.....	88
5.3.1. Análise dos campos.....	88
5.3.2. Análise dos dias de tratamento.....	90
5.4. ANÁLISE SEMIQUALITATIVA.....	91
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>102</b>
6.1.DA METODOLOGIA.....	103
6.2.DOS RESULTADOS.....	108
6.2.1.Quantitativos: vascularização.....	108
6.2.2.Qualitativos e semiquantitativos.....	116
6.3.CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	122
<b>7.CONCLUSÃO.....</b>	<b>127</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>130</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>145</b>

## RESUMO

### **ESTUDO DOS EFEITOS DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE NA ANGIOGÊNESE EM RUPTURA PARCIAL DO TENDÃO CALCÂNEO DE RATOS. Dissertação de Mestrado, Ana Claudia Bonome Salate.**

A proposta desse estudo foi analisar os efeitos do laser AsGaAl, de 660 nm, com 10 mW e 40 mW de potência de saída, aplicado durante 10 segundos, no processo de angiogênese e qualidade de reparo após lesão parcial do tendão calcâneo de ratos. Foram utilizados 104 ratos machos, sendo que 96 foram submetidos à lesão com a queda de um peso de 186 gramas na altura de 20 cm sobre o tendão direito. Estes foram divididos aleatoriamente em 3 grupos, tratados em 3 (n = 32), 5 (n = 32) e 7 (n = 32) dias, respectivamente. Cada um desses grupos foi ainda dividido em 4 subgrupos, submetidos ao laser com potência de saída de 10 mW (n = 8) e 40 mW (n = 8), grupo placebo (n = 8) e grupo sem tratamento (n = 8). As análises foram feitas através da contagem dos vasos que foram previamente corados com tinta nanquim e por meio de uma análise semiquantitativa da presença de células polimorfonucleares, mononucleares, organização de colágeno e neovascularização. Um quarto grupo com 8 animais foi estabelecido como controle padrão, sem lesão que foi utilizado como referência para a análise qualitativa. A comparação dos grupos evidenciou que os animais irradiados mostraram maior número de vasos do que os grupos controle ( $p < 0,05$ ) e o subgrupo de 40 mW apresentou melhor vascularização que os demais após 3 dias de irradiação ( $p < 0,01$ ). A análise semiquantitativa evidenciou diferença estatística ( $p < 0,05$ ) quando foi considerada a organização de colágeno e a neovascularização na comparação entre os grupos 10 mW e 40 mW com os controle. Qualitativamente os grupos tratados com laser apresentaram melhor aspecto do reparo. Os resultados nos permitem concluir que a terapia laser de baixa intensidade, com comprimento de onda de 660 nm promoveu aumento na neovascularização e melhora na qualidade de reparo e a potência de saída de 40 mW iniciou a neovascularização precocemente, mostrando diferença significativa após 3 dias de aplicação.

**Palavras-chave:** laser de baixa intensidade, tendão calcâneo, neovascularização, reparo tendíneo, irradiação

## ABSTRACT

### **STUDY OF THE LOW LEVEL LASER EFFECT ON ANGIOGENESIS IN PARTIAL RUPTURE OF ACHILLES TENDON (*TENDO CALCANEUS*) IN RATS.**

**Master Degree Dissertation. Ana Claudia Bonome Salate.**

The purpose of this study was to analyze the 660 nm GaAlAs laser effect with 10 mW and 40 mW, during 10 seconds, on angiogenesis process and repair quality after partial lesion of Achilles tendon in rats. It was used 104 male rats, that 96 rats had been submitted to lesion by a falling of 186 g from a height of 20 cm, above the right tendon. These rats had been randomly divided in 3 groups, treated in 3 (n = 32), 5 (n = 32) and 7 (n = 32) days, respectively. Each of these groups was divided again into 4 subgroups, which were submitted to laser with mean output of 10 mW (n = 8) and 40 mW (n = 8), a sham treatment (n = 8), and a group with no treatment (n = 8). The analyzes were made by vessels count that have been previous prepared with nanquim ink and by a semiquantitative analyze of polynuclear cells presence, mononuclear cells presence, collagen organization and neovascularization. A fourth group with 8 animals was established as control, without lesion and used as reference for qualitative analyze. The comparison of the groups made evident that the animals submitted to laser showed more vessels number than the control groups ( $p < 0,05$ ) and the 40 mW subgroup showed better vascularization than the others after 3 days of irradiation. ( $p < 0,01$ ). The semiquantitative analyze showed statistical difference ( $p < 0,05$ ) when considering collagen organization and neovascularization in the comparison between the 10 mW, 40 mW and control. Qualitatively, the groups treated with laser showed better repair aspect. The results permit us to conclude that Low Level Laser Therapy with 660 nm promoted an increase of the blood vessels number and better repair quality and the mean output of 40 mW had begun the neovascularization precocious, showing significant difference after 3 days of application.

**Key-words:** Low Level Laser, Achilles tendon, neovascularization, tendon repair, irradiance

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**FGF:** Fator de Crescimento dos Fibroblastos

**g:** Gramas

**GaAlAs:** Arseneto de Gálio e Alumínio

**HE:** Hematoxilina – Eosina

**He-Ne:** Hélio Neônio

**Hz:** Hertz

**J:** Joules

**J/cm<sup>2</sup>:** Joules por centímetro quadrado

**KHz:** Kilo Hertz

**AMP:** Adenosina Monofosfato

**As-Ga:** Arseneto de Gálio

**AsGaAl:** Arseneto de Gálio e Alumínio

**ATP:** Adenosina Trifosfato

**AV1:** Avaliador 1

**AV2:** Avaliador 2

**bFGF:** Fator de Crescimento básico dos Fibroblastos

**Ca:** Cálcio

**CL/PL:** Grupo com lesão, tratamento placebo.

**CL/ST:** Grupo com lesão, sem tratamento.

**CP:** Grupo controle padrão

**cm:** Centímetro

**cm<sup>2</sup>:** Centímetro quadrado

**CO<sub>2</sub>:** Anidrido Carbônico

**DNA:** Ácido Desoxirribonucléico

**DP:** Desvio Padrão

**EGF:** Fator de Crescimento Epidermal

**et al:** Colaboradores

**LLLT:** Terapia Laser de Baixa Intensidade

**LPLT:** *Terapia Laser de Baixa Potência*

**mg/kg:** miligramas por quilo

**mL:** mililitros

**mm:** milímetros

**mm<sup>2</sup>:** milímetros quadrados

**mW:** miliWatts

**mW/cm<sup>2</sup>:** miliWatts por centímetro quadrado

**NGF:** Fator de Crescimento Neural

**nm:** Nanômetros

**PDGF:** Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas

**pág:** página

**RNA:** Ácido Ribonucléico

**RNA<sub>m</sub>:** Ácido Ribonucléico mensageiro

**s:** segundos

**SOD:** Superóxido - Dismutase

**St<sub>b</sub>-St<sub>a</sub>:** Diferença entre os grupos

**SP<sub>j</sub>:** Soma dos postos

**TGF:** Fator de Crescimento Transformador

**UV:** Ultravioleta

**VEGF:** Fator de Crescimento Endotelial Vascular

**W:** Watts

**W/cm<sup>2</sup>:** Watts por centímetro quadrado

**W/m<sup>2</sup>:** Watts por metro quadrado

## LISTA DE SÍMBOLOS

% - Porcentagem

$\infty$  - Alfa

$\beta$  - Beta

° - Graus

°C - graus Celsius

>- maior

<- menor

$\geq$  - maior ou igual

$\neq$  - diferente

**p** - valor ou nível de significância

$\mu$  - micrômetro

$\Sigma$  - somatória

$\chi$  - qui-quadrado

ns – Não significativo estatisticamente

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1:</b> Fases do processo inflamatório (fonte: GRADIZAR, In GOULD III, 1993).....	<b>13</b>
<b>FIGURA 2:</b> Eventos da neovascularização (fonte: LEVINE et al, 2000).....	<b>19</b>
<b>FIGURA 3:</b> Representação esquemática da Lei de Arndt-Schultz.....	<b>37</b>
<b>FIGURA 4:</b> Equipamento utilizado para lesionar os animais.....	<b>69</b>
<b>FIGURA 5:</b> Modelo de lesão parcial do tendão calcâneo.....	<b>69</b>
<b>FIGURA 6:</b> Imagem de Ultrassonografia do tendão calcâneo de rato após lesão com queda de 186 g à uma altura de 20 cm em estudo piloto.(seta estreita = local de lesão, seta larga = osso adjacente). Vista longitudinal.....	<b>71</b>
<b>FIGURA 7:</b> Equipamento Laser utilizado no experimento.....	<b>71</b>
<b>FIGURA 8:</b> Esquema do protocolo experimental.....	<b>72</b>
<b>FIGURA 9:</b> Contensor para colocação dos animais.....	<b>73</b>
<b>FIGURA 10:</b> Procedimento de irradiação.....	<b>73</b>
<b>FIGURA 11:</b> Técnica de coloração de vasos sanguíneos.....	<b>75</b>
<b>FIGURA 12 A e B:</b> Fotomicrografia do tendão calcâneo normal, sem lesão, mostrando os vasos sanguíneos na região peritendínea (seta branca) e os fibroblastos ao longo do tendão (seta amarela). Coloração HE. (barra=37,8 µm).....	<b>83</b>
<b>FIGURA 13:</b> Fotomicrografia do tendão calcâneo direito após lesão parcial, mostrando a presença de vasos sanguíneos (seta branca). <b>10 mW/3dias:</b> Subgrupo tratado com laser de 10 mW durante 3 dias. <b>40 mW/3dias:</b> Subgrupo tratado com laser de 40 mW durante 3 dias. <b>CL/PL/3dias:</b> Subgrupo submetido ao efeito placebo durante 3 dias.	



**CL/ST/3dias:** Subgrupo lesionado e não tratado durante 3 dias. Coloração HE. Seta amarela = fibroblastos. Seta preta: infiltrado inflamatório (barra=37,88 μm)..... **84**

**FIGURA 14:** Fotomicrografia do tendão calcâneo direito após lesão parcial, mostrando a presença de vasos sanguíneos (seta branca), fibroblastos (seta amarela) e infiltrado inflamatório (seta preta). **10 mW/5dias.** Subgrupo tratado com laser de 10 mW durante 5 dias. **40 mW/5dias:** Subgrupo tratado com laser de 40 mW durante 5 dias. **CL/PL/5dias:** Subgrupo submetido ao efeito placebo durante 5 dias. **CL/ST/5dias.** Subgrupo não tratado durante 5 dias. Coloração HE. (barra = 37,88 μm)..... **85**

**FIGURA 15:** Fotomicrografia do tendão calcâneo direito após lesão parcial, mostrando a presença de vasos sanguíneos (seta branca), fibroblastos (seta amarela), infiltrado inflamatório (seta preta). **10 mW/7dias:** Subgrupo tratado com laser de 10 mW durante 7 dias. **40 mW/7dias:** Subgrupo tratado com laser de 40 mW durante 7 dias. **CL/PL/7dias:** Subgrupo submetido ao efeito placebo durante 7 dias. **CL/ST/7dias:** Subgrupo não tratado durante 7 dias. Coloração HE. (barra = 37,88 μm)..... **86**

**FIGURA 16:** Gráfico da correlação das médias dos subgrupos para o item 1 (presença de células inflamatórias polimorfonucleares) após 3 dias. Teste Kruskal Wallis (ns = não significativo) ..... **93**

**FIGURA 17:** Gráfico da correlação das médias dos subgrupos para o item 2 (presença de células inflamatórias mononucleares) após 3 dias. Teste Kruskal Wallis. (ns = não significativo)..... **94**

**FIGURA 18:** Gráfico da correlação das médias dos subgrupos para o item 3 (presença de organização de colágeno) após 3 dias. Teste Kruskal Wallis. (ns = não significativo)..... **94**

<b>FIGURA 19:</b> Gráfico da correlação das médias dos subgrupos para o item 4 (presença de neovascularização) após 3 dias. Teste Kruskall Wallis. (ns = não significativo e $p < 0,05$ = significativo).....	<b>95</b>
<b>FIGURA 20:</b> Gráfico da correlação das médias dos subgrupos para o item 1 (presença de células inflamatórias polimorfonucleares) após 5 dias. Teste Kruskall Wallis. (ns = não significativo e $p < 0,05$ = significativo).....	<b>96</b>
<b>FIGURA 21:</b> Gráfico da correlação das médias dos subgrupos para o item 2 (presença de células inflamatórias mononucleares) após 5 dias. Teste Kruskall Wallis. (ns = não significativo e $p < 0,05$ = significativo).....	<b>97</b>
<b>FIGURA 22:</b> Gráfico da correlação das médias dos subgrupos para o item 3 (presença de organização de colágeno) após 5 dias. Teste Bonferroni. ( $p < 0,05$ = significativo e $p > 0,05$ = não significativo).....	<b>98</b>
<b>FIGURA 23:</b> Gráfico da correlação das médias dos subgrupos para o item 4 (presença de neovascularização) após 5 dias. Teste Kruskall Wallis (ns = não significativo e $p < 0,05$ = significativo).....	<b>98</b>
<b>FIGURA 24:</b> Gráfico da correlação das médias dos subgrupos para o item 1 (presença de células inflamatórias polimorfonucleares) após 7 dias. Teste Kruskall Wallis. (ns = não significativo).....	<b>99</b>
<b>FIGURA 25:</b> Gráfico da correlação das médias dos subgrupos para o item 2 (presença de células inflamatórias mononucleares) após 7 dias. Teste Kruskall Wallis. (ns = não significativo).....	<b>100</b>
<b>FIGURA 26:</b> Gráfico da correlação das médias dos subgrupos para o item 3 (presença de organização de colágeno) após 7 dias. Teste Bonferroni. ( $p < 0,05$ = significativo e $p > 0,05$ = não significativo).....	<b>100</b>

<b>FIGURA 27:</b> Gráfico da correlação das médias dos subgrupos para o item 4 (presença de neovascularização) após 7 dias. Teste Kruskall Wallis. (ns = não significativo e $p < 0,05$ = significativo).....	<b>101</b>
<b>FIGURA 28:</b> Teste de homocedasticidade para a análise semiquantitativa do item 3 durante 5 dias após a lesão.....	<b>153</b>
<b>FIGURA 29:</b> Teste de homocedasticidade para a análise semiquantitativa do item 3 durante 7 dias após a lesão.....	<b>154</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1:</b> Grupos e subgrupos experimentais.....	<b>68</b>
<b>TABELA 2:</b> Escala de categorias para análise dos itens.....	<b>79</b>
<b>TABELA 3:</b> Medidas descritivas dos dados obtidos em relação à contagem de vasos sanguíneos.....	<b>88</b>
<b>TABELA 4:</b> Resultados das correlações entre os grupos com relação à contagem de vasos sanguíneos em cada campo de análise .....	<b>89</b>
<b>TABELA 5:</b> Resultados das correlações entre os grupos em cada fase com relação à contagem dos campos de análise.....	<b>90</b>
<b>TABELA 6:</b> Resultados das correlações entre os grupos considerando cada item (presença de células polimorfonucleares, mononucleares, organização de colágeno e neovascularização).....	<b>91</b>
<b>TABELA 7:</b> Valores e postos (entre parênteses) da análise qualitativa do item 1.	<b>148</b>
<b>TABELA 8:</b> Valores obtidos com o teste de análise de variância não paramétrica, considerando $\chi_{k-1;\alpha} = 12,84$ para $p < 0,005$ .....	<b>150</b>

## **1. INTRODUÇÃO**

Nas últimas duas décadas aumentou a atenção dos clínicos na evidência biológica para acelerar o reparo tendíneo e esta informação tem mostrado uma grande influência nas estratégias adotadas para o tratamento das lesões (PALMES et al., 2002; STADLER et al., 2000).

O uso do laser de baixa intensidade no reparo de lesões tendíneas vem sendo estudado por vários pesquisadores (PARIZOTTO & BARANAUSKAS, 1998a; STEHNO-BITTEL et al., 1998; REDDY et al., 1998a, b; ENWEMEKA, 1992; ENWEMEKA et al., 1990a), pois uma vez lesado, o tendão pode impossibilitar a realização plena do movimento. O laser, por sua vez, parece influenciar de forma benéfica a aceleração do processo de cicatrização e a melhora da qualidade do reparo, o que proporciona a redução das possíveis seqüelas e o retorno rápido do indivíduo às suas atividades funcionais.

Baseada em estudos científicos, essa 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.

A cicatrização de tendões pode levar semanas ou até meses para completar. Durante este período, normalmente o paciente é imobilizado para evitar uma reruptura, o que pode causar inúmeras complicações funcionais, retardando o processo de reabilitação (ENWEMEKA & REDDY, 2000).

Enquanto a maior parte dos tecidos moles cicatriza essencialmente por proliferação celular, os tendões requerem ao menos três processos separados, porém relacionados, que são: fase inflamatória, quando existe a presença de infiltrado inflamatório, fase proliferativa, onde ocorre intensa angiogênese e proliferação fibroblástica e a fase de remodelamento, onde é observada grande organização de fibras colágenas, hipocelularidade e recuperação da inervação normal (SOMA & MANDELBAUM, 1995;

ENWEMEKA, 1989a). A fase inicial do reparo requer de 7 a 10 dias para ocorrer e a reabilitação completa pode exigir semanas ou meses (SOMA & MANDELBAUM, 1995).

A angiogênese, ou seja, o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos, é uma parte vital no processo de cicatrização, restabelecendo a circulação normal, com maior transporte de células e nutrientes ao local da lesão, limitando conseqüentemente a necrose isquêmica e permitindo o reparo (AGAIBY et al., 2000; BIDDER et al., 2000; BATTEGAY, 1995; BAXTER, 1994; HUDLICKA & TYLER, 1986). Qualquer agente físico capaz de estimular ou iniciar a angiogênese poderá contribuir para a aceleração do processo cicatricial (YOUNG & DYSON, 1990).

O laser de baixa intensidade tem sido observado por aumentar e acelerar a formação de novos vasos após lesão tecidual (KIPSHIDZE et al., 2001; AGAIBY et al., 2000; SCHINDL et al., 1999; GHALI & DYSON, 1992; MORCOS et al., 1991; MAIER et al., 1990). Outros estudos (HONMURA et al., 1992; SCHMITT et al., 1993) relatam que o laser atua sobre o processo inflamatório, modulando a neovascularização e a proliferação fibrosa.

No entanto, não foram encontradas pesquisas sobre os efeitos de agentes físicos, especialmente do laser de baixa intensidade, promovendo aumento da angiogênese em tendões, que apresentam um padrão de baixa vascularização. A grande maioria das pesquisas (KIPSHIDZE et al., 2001; AGAIBY et al., 2000) referem-se à análises *in vitro* da liberação e secreção de células e fatores de crescimento relacionados com a neoformação vascular.

Além disso, a grande dificuldade encontrada na prática clínica para definição de parâmetros como a dose e a potência mais adequadas e o tipo de laser mais efetivo para os diferentes tecidos biológicos em condições fisiológicas especiais, bem como a ação

dessa forma de terapia na aceleração do processo cicatricial, proporcionando o retorno rápido do indivíduo às atividades funcionais, torna visível a necessidade de realizar mais pesquisas nesta área.

Portanto, foi proposto um estudo analisando a neovascularização e a qualidade de reparo tecidual após tratamento com laser de baixa intensidade com duas potências de saída distintas, em diferentes fases, objetivando determinar o melhor meio de promover um tratamento adequado e a possibilidade de aceleração do reparo após uma lesão parcial do tendão calcâneo.



## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## **2.1. TECIDO TENDÍNEO**

### **2.1.1. Definição**

De acordo com Khan et al. (1999), os tendões são estruturas anatômicas posicionadas entre os músculos e ossos que transmitem a força criada nos músculos, aos 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; MCNEILLY et al., 1996; STOLINSKI, 1995; BIRK & TRELSTAD, 1986).

As fibras de colágeno dos tendões são orientadas de modo a oferecer o máximo de resistência às forças de tração que normalmente atuam sobre o tecido (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1990). Dessa forma, orientam-se longitudinalmente, transversalmente e horizontalmente com as 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).

Culaw et al. (1999), no entanto, acrescentam que a maioria das fibras é alinhada em paralelo ao eixo longitudinal do tendão para capacitar essa estrutura a resistir às forças unidirecionais e transmitir, eficientemente, essas forças geradas dos músculos para os ossos.

Alguns tendões (calcâneo e patelar, por exemplo), são circundados por uma estrutura de tecido conjuntivo frouxo denominada paratendão, que permite o livre movimento do tendão com as estruturas adjacentes (JÓZSA & KANNUS, 1997). 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 (KHAN et al., 1999; REYNOLDS & WORRELL, 1991).

### **2.1.2. Arquitetura interna dos tendões**

O tendão é formado por fibroblastos e matriz extracelular, na qual estão imersas as proteínas fibrosas de colágeno e elastina, as proteoglicanas, as glicoproteínas e os mucopolissacarídeos. O colágeno é o maior componente da matriz extracelular, abrangendo cerca de 86% a 95% do peso úmido do tendão. As fibras colágenas do tendão possuem uma disposição resultante do seu processo de maturação, sendo usualmente organizadas em fascículos de fibras, contendo unidades menores denominadas fibrilas (ENWEMEKA & SPIELHOLZ, 1992). Estas são longas e cristalinas e, nos tendões, são altamente alinhadas. O desenvolvimento sistemático dessa hierarquia é requerido para a integridade estrutural e função normal dos tendões (BIRK et al., 1997; BIRK & TRELSTAD, 1986).

### **2.1.3. Vascularização do Tendão**

No início do século 20, os tendões eram considerados estruturas completamente avasculares. Porém, em 1916, Mayer constatou um padrão bem organizado intra e peritendíneo de vasos sanguíneos, demonstrando que o tendão recebe seu suprimento sanguíneo de 3 lugares (HARRISON et al., 2003):

- Vasos vindos dos músculos adjacentes;
- Vasos vindos do osso e periósteo da junção osteotendínea;
- Especialmente dos vasos vindos do paratendão, mesotendão e

bainha sinovial.

Em tendões que não necessitam de bainha sinovial, como o tendão calcâneo, o paratendão é o local mais importante para o suprimento sangüíneo, especialmente na região anterior (ZANTOP et al., 2003; KVIST et al., 1992; CARR & NORRIS, 1989).

Pequenos vasos originam-se de vasos adjacentes e correm transversalmente através do paratendão. Estes então, ramificam-se repetidamente e tornam-se longitudinais e transversais nos fascículos do tendão. As ramificações das artérias penetram transversalmente e obliquamente no epitendão e correm no endotendão para formar a cadeia intratendínea vascular (JÓZSA & KANNUS, 1997).

Os vasos comunicam-se uns com os outros através de anastomoses transversas. Algumas artérias são grandes em diâmetro e são chamadas de principais da estrutura intratendínea. As pequenas arteríolas e capilares que se originam da artéria longitudinal, formam as unidades microvasculares do tecido tendíneo (JÓZSA & KANNUS, 1997).

## **2.2. TENDÃO CALCÂNEO**

Através da continuação do músculo gastrocnêmio e sóleo, inicia-se o tendão calcâneo. Em sua origem, o tendão calcâneo é largo, tornando-se mais estreito e irregular distalmente; onde se insere na porção médio-posterior do calcâneo através de uma rígida expansão fibrocartilaginosa.

O tendão calcâneo normal consiste de fibras colágenas orientadas em seu eixo longitudinal, com poucos fibroblastos intercalados entre os feixes (ENWEMEKA, 1989a, b). Algumas fibras de elastina também podem ser vistas entre os feixes de fibras colágenas.

Segundo Józsa & Kannus (1997), criam-se estresses nas diferentes partes do tendão calcâneo, visto que este absorve forças no plano sagital (flexão plantar e dorsal) e no plano frontal (inversão e eversão).

Quando cerca de 2% do comprimento do tendão é estirado, perde-se a morfologia ondulada encontrada no estado de repouso das fibras de colágeno (PLAPLER et al., 2001; STOLINSKI, 1995; REYNOLDS & WORRELL, 1991).

De acordo com Enwemeka et al. (1988), a resistência do tendão calcâneo à estiramentos é definida pela densidade numérica, organização e arranjo das fibrilas dentro do tecido.

### **2.2.1. Vascularização do Tendão Calcâneo**

A distribuição vascular intra e extratendínea varia consideravelmente de tendão para tendão e a anatomia vascular detalhada não é muito conhecida em muitos tendões humanos. O calcâneo proporciona o melhor conhecimento da vascularização tendínea (JÓZSA & KANNUS, 1997).

De acordo com Kvist et al. (1992), a parte central do tendão calcâneo recebe 35% do seu suprimento sanguíneo do sistema vascular extrínseco. Os mesmos autores afirmam que este, assim como os dos músculos tibial anterior e do bíceps braquial, possuem um sistema vascular delicado com zonas críticas com pouco suprimento, o que deve contribuir para as rupturas.

Uma região de diminuição de vascularização pode ser vista em 2-6 cm acima da inserção do tendão (ZANTOP et al., 2003; CARR & NORRIS, 1989). O número de vasos intratendíneos, bem como seus diâmetros, diminuem das partes distais até proximais ao meio do tendão. Alguns autores (ZANTOP et al, 2003; JÓZSA & KANNUS, 1997)

consideram como este sendo um importante fator etiológico no desenvolvimento de tendinite, tendinose e rupturas espontâneas, especialmente porque as mais severas degenerações, assim como a maioria das rupturas, ocorrem nessa região.

Zantop et al. (2003) afirmam que a parte proximal do tendão calcâneo humano é suprida de pequenas ramificações da artéria tibial posterior, enquanto que a parte distal é vascularizada pelas artérias fibulares. O suprimento arterial desse tendão mostra uma aparência uniforme.

Na unidade gastrocnêmio-tendão, a junção miotendínea possui uma organização vascular onde os capilares unem-se às pequenas arteríolas, as quais penetram a junção e novamente voltam a se tornar capilares. No entanto, alguns capilares musculares penetram na junção diretamente e independentemente. O suprimento sangüíneo da junção osteotendínea ao tendão é mais limitado à zona de inserção apenas, não contribuindo, portanto, à vascularização de todo o tecido (JÓZSA & KANNUS, 1997).

### **2.2.2. Ruptura do tendão calcâneo**

A ruptura do tendão calcâneo tem recebido bastante atenção por vários pesquisadores. Esta atenção é baseada no fato de que, além de ser uma lesão grave, é uma das mais comuns dentre as lesões tendíneas (STEHNO-BITTEL et al., 1998).

Barry & McGuire (1996) consideram que as rupturas do tendão calcâneo, parciais ou completas, podem ocorrer como resultado de excesso de uso (*overuse*) e tendinite crônica. Segundo os autores, as rupturas completas são comuns em homens de meia idade envolvidos com atividades recreacionais e as rupturas parciais ocorrem com maior incidência em atletas de elite entre 20 e 40 anos de idade.

De acordo com Salomão et al. (1993), a maior frequência de ruptura deste tendão ocorre em futebolistas, com menor incidência em tenistas e bailarinas. Já Reynolds & Worrell (1991), referem que as lesões do tendão calcâneo ocorrem, em sua grande maioria, em esportes de alto impacto como a corrida e o salto. Estes tipos de atividades esportivas permitem que este tecido seja bastante estressado durante a contração muscular excêntrica do gastrocnêmio e do sóleo.

Segundo Almekinders & Deol (1999); Stehno-Bittel et al. (1998) e Soma & Mandelbaum (1995), uma sobrecarga de trabalho sobre o tecido tendíneo leva-o à fadiga e, como consequência, há uma reação inflamatória com rupturas parciais ou totais. Salomão et al. (1993) consideram que microtraumas repetitivos induzem a ruptura tendínea que normalmente é precedida por alterações degenerativas onde há redução do fluxo sanguíneo com resultante hipóxia local. As alterações da nutrição e da atividade metabólica também predis põem a essas alterações.

Em alguns casos, o indivíduo refere sintomas prévios à lesão, como dor e rigidez. No entanto, há os casos que não apresentam nenhum sintoma que antecede à ruptura (PUDDU, 1976).

A degeneração colagenosa, que ocorre com o avanço da idade, provoca 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. Além disso, 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).

As rupturas parciais ou incompletas significam que uma pequena parte das fibras tendíneas mostra rupturas macroscópicas. Ocasionalmente, isso é evidenciado por

palpação na superfície, mas normalmente diagnóstico por imagem é necessário (JÓZSA & KANNUS, 1997).

A Ressonância Magnética e a Ultra-sonografia são úteis na confirmação diagnóstica de lesões tendíneas, especialmente nos casos de rupturas parciais (BARRY & McGUIRE, 1996).

Embora a Ressonância Magnética permita a aquisição de imagens melhores dos tecidos e é menos dependente de operadores que o ultra-som, este último pode ser considerado suficiente para tendões devido à alta confiabilidade, custo reduzido e segurança (ASTROM et al., 1996).

### **2.3.PROCESSO DE REPARO TECIDUAL**

O processo de reparo tecidual é uma perpetuação de acontecimentos 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).

O processo de reparo de tendões segue uma sucessão de eventos: a) proliferação e migração por vários tipos de células; b) angiogênese para a formação do tecido de granulação; c) síntese de colágeno; d) 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 tecido lesado (CHAN et al., 1997).

Devido a sua baixa vascularidade, oxigenação e nutrição, o tecido tendíneo possui baixa capacidade de reparação. No entanto, diversos estudos demonstraram que quando o tendão lesado é estimulado por meios biofísicos apropriados, cicatriza

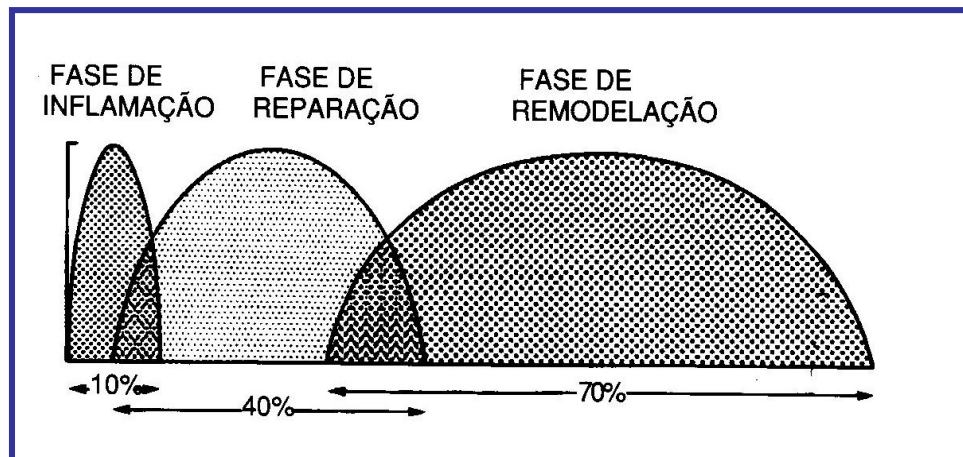


adequadamente (ENWEMEKA & REDDY, 2000; PARIZOTTO, 1998; REDDY et al., 1998a, b; GUM et al., 1997; ENWEMEKA, 1991a, b; ENWEMEKA et al., 1990b; ENWEMEKA, 1989b).

Baseado nos estudos de Enwemeka & Spielholz, (1992), Kuschner et al. (1991), Enwemeka (1989a), o processo de reparação se dá, com intuito didático, em 3 fases distintas, porém sobrepostas (FIGURA 1):

- 1) Fase Inflamatória (1-7 dias);
- 2) Fase Neoangiogênica e Proliferativa (5-21 dias);
- 3) Fase de Remodelamento (14-360 dias).

Para o tendão, 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, 1989a).



**FIGURA 1:** Fases do processo inflamatório (FONTE: GRADIZAR, In GOULD III, 1993)

### **2.3.1.Fase Inflamatória (1 a 7 dias pós-lesão)**

A resposta inflamatória está intimamente ligada ao processo de reparo (COTRAN et al., 1994). Por isso, inicia-se imediatamente após a lesão, sendo uma reação natural do organismo ao trauma lesivo.

A lesão provoca ruptura dos vasos sanguíneos, com conseqüente extravasamento de sangue, plasma e fluidos teciduais para a área lesada (JÓZSA & KANNUS, 1997; BAXTER, 1994; GIGANTE, 1996).

De acordo com Gogia (1995) e Cotran et al. (1994), dentro de 24 a 48 horas ocorre a fase inflamatória aguda.

O estágio inicial da inflamação é caracterizado por 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 (PEREIRA, 1994; REED & ZARRO, 1990).

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

Simultaneamente, as plaquetas reúnem-se ao redor do epitélio dos vasos lesados e ao colágeno exposto, liberando fosfolípídeos 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 do reparo (JÓZSA & KANNUS, 1997).

A vasodilatação, seguida da vasoconstrição transiente, provoca um aumento na pressão hidrostática e no fluxo sanguíneo. Com isso, a permeabilidade vascular aumenta em resposta às reações químicas promovidas pela histamina, que é liberada pelas plaquetas, mastócitos e leucócitos granulares; e pela bradicinina que, além dessa função, estimula a liberação de prostaglandinas nas fases mais tardias da inflamação. As prostaglandinas PGE-1 aumentam a permeabilidade vascular e 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).

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

Quando os leucócitos mononucleares (monócitos) penetram no sítio lesado, atraídos por citocinas liberadas pelos neutrófilos cerca de 1 a 2 dias após a lesão (MARSOLAIS et al., 2001), transformam-se em macrófagos teciduais e, junto com os leucócitos polimorfonucleares, dão continuidade à fagocitose (GOGIA, 1995; ENWEMEKA, 1989a).

Durante 1 a 2 semanas após a lesão, há uma extensa infiltração por leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e fibroblastos, que permanecem no tecido de granulação (HIRANUMA et al., 1996). O acúmulo dessas células inflamatórias pode ocorrer tanto pelo recrutamento de novas células do sistema circulatório, como pela mitose de células residentes (MARSOLAIS et al., 2001).

Na maior parte da fase de reparo os macrófagos estão presentes. Além de fagocitarem o sangue extravasado e os produtos da destruição tecidual que não foram solubilizados pelos neutrófilos, eles fagocitam os neutrófilos mortos restantes na área lesada. Além disso, secretam fatores de crescimento e fibronectina, que promovem a quimiotaxia dos fibroblastos, fixação e migração dessas células no local da lesão, estimulando a sua proliferação (MARSOLAIS et al., 2001).

Os macrófagos e fibroblastos interagem uns com os outros regulando a fase inflamatória e o processo de remodelamento da matriz extracelular (KAKAR et al., 1998). Alguns monócitos, que são células imaturas, intensificam sua capacidade de defesa no momento em que penetram nos tecidos e convertem-se em macrófagos (ENWEMEKA & SPIELHOLZ, 1992; REED & ZARRO, 1990).

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

A resposta imune à lesão é outro aspecto da fase inflamatória, sendo 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 (ROITT et al. (1985), citados por PARIZOTTO, 1998).

Por meio de toxinas ou complexos imunes, são ativadas as proteínas enzimáticas do sistema complemento, as quais estão envolvidas nas etapas do processo inflamatório, incluindo a fagocitose, aumento da permeabilidade vascular e a quimiotaxia de neutrófilos. O complemento possui um efeito intensificador da inflamação, promovendo a liberação da histamina pela ativação dos mastócitos e basófilos (REED & ZARRO, 1990).

### **2.3.2. Fase Neoangiogênica e Proliferativa (5 a 21 dias pós-lesão)**

Segundo Józsa & Kannus (1997) e Pereira (1994), a fase proliferativa inicia-se com a chegada 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.

O suprimento vascular do tendão é significativamente reduzido após a ruptura. A ativação angiogênica das células endoteliais possui um grande papel na promoção e regulação de eventos importantes durante o processo de reparo (ZHANG et al., 2003).

A angiogênese é definida como a formação de novos capilares sanguíneos através de ramificações de microvasos pré – existentes. É um processo morfogenético que possui um papel principal no envolvimento do suprimento vascular em tecidos adultos em remodelação (BATTEGAY, 1995).

A formação de novos vasos é o componente essencial para o desenvolvimento normal do tecido, reparo tecidual e crescimento tumoral. É necessária para a formação do tecido de granulação e o restabelecimento da integridade vascular, restaurando o suprimento de oxigênio e nutrientes para o novo tecido, melhorando a alta demanda metabólica local e permitindo a continuação do crescimento celular e síntese, divisão e migração de células ao local de lesão (PETERSEN et al., 2003; AGAIBY et al., 2000).

Os estímulos à neovascularização incluem vários fatores quimiotáxicos e fatores de crescimento, em particular o fator de crescimento dos fibroblastos (FGF), ácido láctico e a baixa quantidade de oxigênio (BAXTER, 1994).

Bidder et al. (2000) consideram que os mecanismos que controlam a neovascularização durante as fases iniciais de reparo são os fatores de crescimento angiogênicos.

Muitas células, incluindo os monócitos, macrófagos, mastócitos, linfócitos, células de tecido conjuntivo e células tumorais, influenciam a formação de novos vasos pela secreção de fatores solúveis e moléculas, incluindo a matriz extracelular e enzimas proteolíticas (BATTEGAY, 1995).

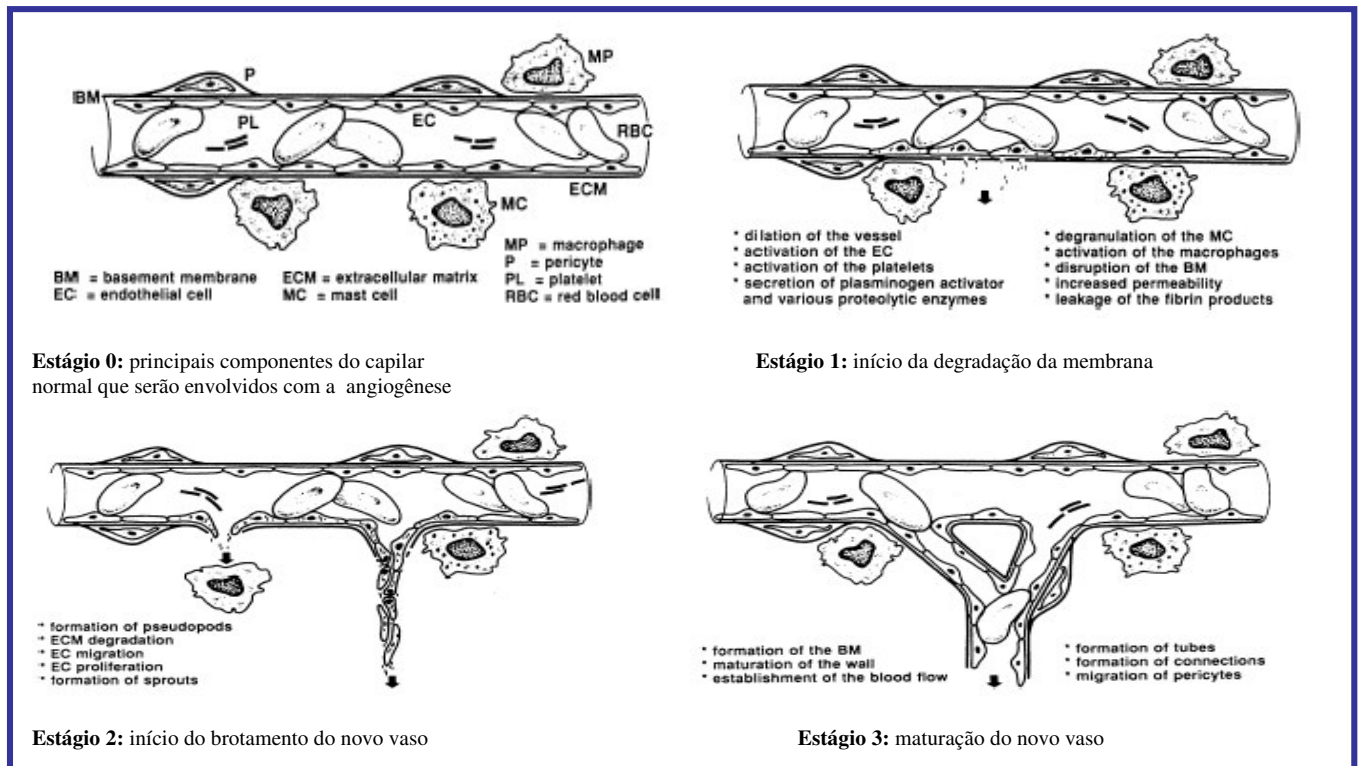
De acordo com Petersen et al. (2003), um dos mais importantes fatores angiogênicos é o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), com atividade mitogênica local direta nas células endoteliais de artérias, veias e vasos linfáticos (BOYER et al., 2001; BIDDER et al., 2000). Além disso, Zhang et al. (2003), mostraram que este fator pode iniciar a produção de outros fatores de crescimento no reparo tendíneo, como o TGF- $\beta$ , e aumentar a proliferação fibroblástica.

O fator de crescimento básico dos fibroblastos (bFGF) possui também uma grande função no reparo tendíneo. Parece que é um importante mediador da angiogênese devido à capacidade de induzir a migração e proliferação de células endoteliais ao local de lesão (CHANG et al., 1998; CHAN et al., 1997; NISSEN et al., 1996).

Segundo Enwemeka (1989a), a neoangiogênese inicia-se através de anastomoses de capilares sanguíneos próximos à área lesada que, por sua vez, projetam-se para o interior da lesão, formando inúmeras ramificações e desenvolvendo uma rica rede vascular.

Levine et al. (2000), explicam que há uma seqüência de eventos responsáveis pela neoformação vascular (FIGURA 2). Em resposta a um ou mais estímulos angiogênicos ou quimiotáticos liberados pelos macrófagos, as células endoteliais próximas

aos capilares produzem enzimas proteolíticas que degradam a lâmina basal. A superfície do vaso começa a desenvolver estruturas como se fossem pseudópodes que penetram na frágil lâmina basal em direção à matriz extracelular. Essas ramificações começam então a migrar e crescer em direção aos fatores quimiotáticos, formando o novo vaso.



**FIGURA 2:** Eventos da neovascularização (fonte: LEVINE et al., 2000).

A importância dos fatores de crescimento como reguladores das fases do reparo tendíneo tem sido bem estabelecida através de estudos experimentais, mostrando a liberação do fator derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador (TGF), fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento insulínico (IGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e as ações destes na indução da neovascularização, quimiotaxia dos fibroblastos, estímulo da proliferação fibroblástica e síntese de colágeno (ZHANG et al., 2003).

De acordo com Maxwell (1992), a estimulação dos fibroblastos por substâncias liberadas através das plaquetas e dos macrófagos, que promovem seu crescimento, acompanha a retração vascular no processo de reparo tecidual e são responsáveis pela síntese de colágeno e sua deposição na matriz extracelular. Os níveis de lactato aumentados estimulam a atividade da prolidoxilase, uma enzima essencial na síntese de colágeno e, sob a condição de hipóxia, os fibroblastos produzem um precursor polipeptídico do colágeno. Contudo, a presença de oxigênio é fundamental para a hidroxilação dos aminoácidos lisina e prolina e para a liberação do colágeno. Além disso, para que se estabeleça a maturação e as ligações cruzadas do colágeno, há necessidade de oxigênio.

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

Segundo Klein et al. (2002), o TGF  $\beta$  é uma citosina com atividades biológicas numerosas relacionadas com o reparo tecidual, incluindo o recrutamento de fibroblastos e macrófagos e, principalmente, o estímulo da produção de colágeno.

A fibroplasia e fibrilogênese têm início poucos dias após a lesão. Essas etapas da cicatrização impõem uma tensão mecânica ao tecido tendíneo, acelerando a polimerização 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, sendo chamados miofibroblastos. Embora os miofibroblastos possuam 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 contrair e moverem-se, contribuindo para a contração da região cicatricial, além de secretar grande variedade de moléculas como colágeno, fibronectina, elastina, ácido hialurônico, glicosaminoglicanas e mucopolissacarídeos. Durante esta fase, os fibroblastos e miofibroblastos mostram uma extensa proliferação, síntese de matriz extracelular e abundância de vesículas citoplasmáticas em seu interior (sugerindo secreção de fibras de colágeno) (PARIZOTTO, 1998).

A combinação de novos capilares, fibroblastos, miofibroblastos e matriz extracelular formada por colágeno e outros componentes não colagenosos, dão origem à um tecido conjuntivo ricamente vascularizado que preenche a área lesada (JÓZSA & KANNUS, 1997).

Esse tecido conjuntivo frouxo rico em capilares sangüíneos e contendo leucócitos e matriz extracelular formada por fibras colágenas finas (predominantemente colágeno tipo III), ácido hialurônico e moderada quantidade de proteoglicanas, recebe o nome de tecido de granulação (PEREIRA, 1994).

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. Nesse período, o colágeno tipo I começa a predominar sobre o tipo III. Há simultâneas degradações, resultando em uma grande quantidade de remodelamento, com lise de algumas fibras, agregação e aumento de outras (ENWEMEKA & SPIELHOLZ, 1992).

Com o processo de fibrilogênese, as fibras de colágeno tornam-se 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, 1989a).

O tecido cicatricial ainda é dinâmico; a contração da cicatriz é contínua, aproximando ainda mais as bordas da área lesada. Segundo Gogia (1995), a contração segue uma taxa uniforme aproximada de 0,6 mm a 0,75 mm ao dia e independe do tipo de ferida, mas depende da nutrição tecidual.

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 (1989a), há um maior alinhamento das fibras 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 iniciar em 4 a 5 dias após ruptura ou incisão tendínea (ENWEMEKA et al., 1988).

Segundo estudos de Enwemeka (1989a), através de análises por microscopia eletrônica, pode ser visualizado uma elevação do alinhamento das fibras de colágeno no eixo longitudinal do tendão após um período de 21 dias de reparo tecidual.

### **2.3.3. Fase de Remodelamento (14 a 360 dias pós-lesão)**

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.

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

Nessa fase, a cicatriz contém fibras colágenas bem organizadas. O tecido gradualmente muda de predominantemente celular, para fibroso com grande quantidade de fibras colágenas. Há um aumento gradual de força própria da cicatriz e um aumento da estabilidade das ligações moleculares. (ENWEMEKA & SPIELHOLZ, 1992).

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, 1989a).

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 (PEREIRA, 1994). A maturação 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 (ENWEMEKA & SPIELHOLZ, 1992).

Em um estudo feito por Enwemeka (1992), tendões tenotomizados que foram submetidos à carga funcional no 5º dia pós-lesão, tiveram uma maior área de secção transversa em relação aos tendões controle que não foram submetidos à carga. Isso ocorreu devido à 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 inflamação. 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.

## **2.4.CICATRIZAÇÃO INTRÍNICA E EXTRÍNICA DO TECIDO TENDÍNEO**

A biologia do reparo tendíneo é dominada por duas teorias: capacidade de reparo extrínseco e intrínseco (LIN et al., 2004). Há muito debate na literatura em relação às evidências experimentais para provar ou desaprovear cada mecanismo.

No processo de reparo extrínseco, é considerado que o tendão não possui capacidade para cicatrizar por si próprio e requer a formação de adesões, infiltração de

células inflamatórias e fibroblastos e um suprimento sanguíneo externo (KAKAR et al., 1998; POTENZA (1978), citado por JÓZSA & KANNUS, 1997).

No mecanismo intrínseco, é proposto que o tendão é reparado pela proliferação de células do epitendão e do endotendão, com um suprimento vascular intratendíneo e sem necessidade de formação de adesão (JÓZSA & KANNUS, 1997; GELBERMAN et al., 1985; LUNDBORG et al., 1985; MANSKE et al., 1984).

No entanto, há um outro argumento de que os dois mecanismos, tanto o extrínseco como o intrínseco, ocorrem (RUSSELL & MANSKE, 1990; LUNDBORG et al., 1985; MANSKE & LESKER, 1984), porém não há evidência clínica sobre qual teoria é correta (LIN et al., 2004).

#### **2.4.1 Cicatrização intrínseca**

Tem sido demonstrada em modelos *in vitro* e *in vivo*, a capacidade de cicatrização intrínseca de tendões em processo de reparo, onde a fonte celular extrínseca, o suprimento sanguíneo e o fluido sinovial foram completamente excluídos (MANSKE & LESKER, 1984).

De acordo com Gelberman et al. (1985), a transformação dos fibroblastos do epitendão provoca a fagocitose, enquanto que a síntese de colágeno é feita pelas células do epitendão e do endotendão. Essas células migram em direção a região lesada para fazer a reparação. Estes autores mencionam a importância da vascularização intratendínea, pois a nutrição sinovial não é suficiente para o suprir o tecido no processo de reparo intrínseco.

Segundo Lundborg et al. (1985), o reparo intrínseco de tendões ocorre através da proliferação e síntese de colágeno tanto das camadas superficiais como nas camadas profundas do tendão.

No estudo de Manske et al. (1984), feito com tendões flexores dilacerados transversalmente, foi demonstrada a capacidade de cicatrização intrínseca desses tendões, onde houve ausência de fontes celulares extrínsecas e de nutrição pela circulação sanguínea ou fluido sinovial. A cicatrização ocorreu pela diferenciação dos fibroblastos do epitendão, que migraram para o local da lesão e removeram as células debridadas e fragmentos de colágeno, ao mesmo tempo em que sintetizaram novos colágenos.

#### **2.4.2. Cicatrização extrínseca**

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

Segundo Potenza (1978), citado por Józsa & Kannus (1997), houve reparo do tendão suturado e imobilizado, devido ao crescimento do tecido de granulação, derivado de estruturas vizinhas ao tendão.

Takasugi et al. (1976), citados por Józsa & Kannus (1997), referem que o reparo do tendão ocorre pelo tecido tenosinovial onde células fibroblásticas cobrem e cicatrizam a área lesada.

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

### **2.4.3. Cicatrização intrínseca e extrínseca**

Manske et al. (1984) consideram que as observações feitas em relação à capacidade intrínseca de reparo tendíneo não podem eliminar o alto potencial de contribuição extrínseca de células para promover a cicatrização.

Para Russell & Manske (1990), o processo de reparação do tendão lesado ocorre pela proliferação e migração das células do epitendão (externas), assim como a proliferação das células do endotendão (internas).

De acordo com Lundborg et al. (1985) e Manske & Lesker (1984), 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, através de expressões gênicas, promovem a cicatrização intrínseca. Porém, quando a nutrição tendínea é prejudicada por técnicas de suturas inadequadas ou ressecção da bainha sinovial, mecanismos extrínsecos promovem a cicatrização do tecido tendíneo.

Lundborg et al. (1985), acreditam que ambos mecanismos ocorrem durante o reparo, porém há condições nas quais haverá predominância do padrão intrínseco ou extrínseco.

Lin et al. (2004), afirmam que é plausível afirmar que o reparo tendíneo ocorre com uma combinação de mecanismos intrínsecos e extrínsecos e é dependente da localização do tecido, magnitude do trauma, suprimento sangüíneo e grau de mobilização do tendão.

## 2.5. LASER DE BAIXA INTENSIDADE: PRINCÍPIOS E GENERALIDADES

### 2.5.1. 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 foi baseada sua criação (LOW & REED, 2001; TUNÉR & 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 emitindo radiação na faixa das microondas, que ficou conhecido como MASER ou amplificador de microondas por emissão estimulada de radiação, criando, portanto, a possibilidade de trabalhar na região visível (TUNÉR & HODE, 1999; BAXTER, 1997; KLOTH, 1997).

Dr. Theodore H. Maiman, em 1960, propôs a primeira produção de radiação laser com um material sólido utilizando o cristal de rubi, dentro da faixa vermelha do espectro eletromagnético. Em meados dos anos 60, Javan, Bennett e Herriott construíram o laser de Hélio-Neônio (He-Ne), que se tornou a primeira fonte de luz coerente disponível comercialmente, recebendo o nome de *cold laser* ou *soft laser* (TUNÉR & HODE, 1999; BAXTER, 1997; KITCHEN & BAZIN, 1996).

A partir daí, começou a surgir interesse em produzir um equipamento com emissão na faixa infravermelha fora do alcance da emissão visível, porém, esses aparelhos só apareceram no final da década de setenta com o surgimento dos lasers de arseneto de



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

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 na modulação dos processos biológicos. Desde então, a LLLT (Low Level Laser Therapy) 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 os efeitos do laser em pontos de acupuntura (BAXTER, 1997; KITCHEN & PARTRIDGE, 1991).

Posteriormente, o tratamento recebeu o nome terapia laser de baixa intensidade (LILT), do inglês *Low Reactive-Level Laser* ou *Low Level Laser Therapy*, dado por OHSHIRO e CALDERHEAD, em 1988 (BAXTER, 1997; BASFORD, 1989).

A partir deste momento, iniciou-se a aplicação do laser de baixa intensidade em diversas patologias, pesquisas e experimentações, obtendo, assim, mais conhecimentos sobre os efeitos fisiológicos, mecanismos de ação e aperfeiçoamento dos aparelhos.

### **2.5.2. Tipos de laser**

A produção da radiação laser ocorre através de um elétron de um átomo que sofre um salto quântico quando previamente estimulada, passando de um baixo a um alto estado de energia, emitindo, posteriormente, ondas na mesma frequência, comprimento de onda e direção, originando o feixe que, em geral, possui mais densidade de potência do que

as 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 equipamentos 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).

Os comprimentos de onda utilizados nos lasers terapêuticos estão na faixa do visível e do infravermelho próximo. Os lasers com emissão infravermelha emitem comprimentos de onda entre 770 nm e 1300 nm. Estes estão constituídos fundamentalmente pelo cristal de arseneto de gálio (As-Ga), e pelo arseneto de gálio e alumínio (As-Ga-Al) (KLOTH, 1997; HEUSSLER et al., 1993; LAAKSO et al., 1993b; HERCH & TERESI, 1987; COLLS, 1985). O primeiro emite comprimentos de onda de 904 nm, com potência de saída entre 10-15 W e, segundo Tunér & Hode (1999), possui penetração de 30 a 50 mm dependendo do tecido. Estes mesmos autores relatam que o laser de As-Ga-Al emite comprimentos de onda entre 780 nm e 870 nm, sendo geralmente usados comprimentos de 820 nm a 830 nm na faixa infravermelha e as potências de pico variam entre 20 mW e 100 mW e a profundidade de penetração pode alcançar 2-3 cm dependendo do tecido.

O laser de Hélio-Neônio emite luz visível, vermelha, com um comprimento de onda de 632,8 nm e potência, entre 1 e 10 mW. Este equipamento é altamente colimado, possuindo pouca divergência, porém com um alto risco ocular (BAXTER, 1997; KITCHEN & BAZIN, 1996).

### **2.5.3. 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 (TUNÉR & HODE, 1999; BAXTER, 1997; KITCHEN & PARTRIDGE, 1991).

A monocromaticidade indica que a radiação é constituída de fótons com um único comprimento de onda e, portanto, uma só cor. Essa característica é considerada o atributo mais importante da luz, pois determina quais biomoléculas absorverão a radiação incidente e, portanto, a interação fotobiológica e os efeitos terapêuticos específicos (LOW & REED, 2001; KITCHEN & BAZIN, 1996; LAAKSO et al., 1993a).

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), sendo esta outra característica que difere a luz laser da luz comum (BAXTER, 1997).

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. Essa propriedade, por sua vez, caracteriza a emissão de fótons unidirecionais e paralelos entre si (TUNÉR & HODE, 1999).

Devido à coerência espacial, o feixe laser mantém-se paralelo, não existindo praticamente qualquer divergência da radiação emitida ao longo da distância percorrida. O alto grau de paralelismo do feixe mantém uma área pequena de saída. Esse efeito de colimação é fortemente responsável pelos perigos oculares gerados (LOW & REED, 2001).

Há dúvidas sobre 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). 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 do tecido à luz laser (VAN DER VEM et al., 1998; OHSHIRO, 1991).

No entanto, segundo Karu (1987), para 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.

Labbe et al. (1990), ao verificarem eventos bioquímicos como resposta da radiação laser em fibroblastos, sugerem que os citocromos da cadeia respiratória mitocondrial absorvem a 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.

Tunér & 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.

#### **2.5.4. 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; a frequência de tratamento (LOW & REED, 2001; TUNÉR & HODE, 1999; LAAKSO et al., 1993b; KITCHEN & PARTRIDGE, 1991).

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; LAAKSO et al., 1993a).

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

De acordo com Laakso et al. (1993b), os comprimentos de onda mais curtos, dentro da faixa visível, são os 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.

Os lasers terapêuticos operam em potência de saída ou potência radiante inferior a 1 W, mas este parâmetro não é considerado tão importante por alguns autores para avaliar o potencial biológico e os efeitos clínicos do laser (BAXTER, 1997). No entanto, Tunér & Hode (1999) discordam dessa afirmação, considerando que com uma alta potência de saída, é possível obter uma alta densidade de potência.

Segundo Trelles & Mayayo (1992), citados por Tunér & 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>. Os autores concluíram 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 deposição de energia e tempos de aplicações diferentes (LONGO, 1993).

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

Van Breughel et al. (1992), em um estudo sobre os efeitos do laser He-Ne em culturas de fibroblastos humanos, evidenciaram 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.

A densidade de potência ou irradiância é a potência de saída da luz por área de irradiação e é dada em mW/cm<sup>2</sup> ou W/cm<sup>2</sup>. Normalmente, na prática clínica e laboratorial a densidade de potência não ultrapassa 50 mW/cm<sup>2</sup> (BAXTER, 1997; KLOTH, 1997; KITCHEN & PARTRIDGE, 1991). 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 mW/cm<sup>2</sup> e 150 mW/cm<sup>2</sup>, 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 nos quais a fibra não está em contato com o tecido, a área de irradiação será, portanto, maior, determinando um número relativamente menor de fótons por unidade de área para a mesma potência, ou seja, a densidade de potência ou irradiância diminuirá com o aumento da distância entre o aplicador e o tecido alvo a ser irradiado (BAXTER, 1997; LONGO, 1993).

Trelles et al. (1989), citados 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. Tunér & 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.

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<sup>2</sup> ou J/cm<sup>2</sup> 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) (TUNÉR & 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 intensidade 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 potência de saída, 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.

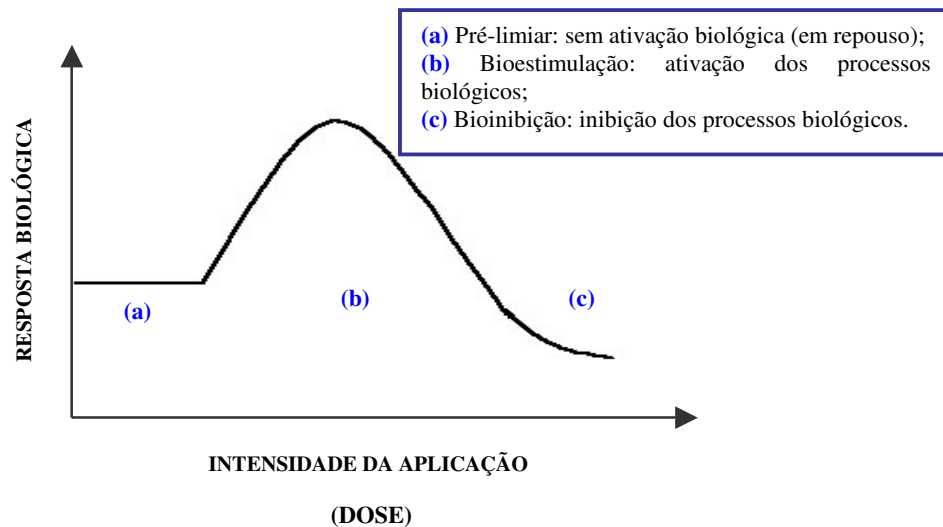
Considera-se que haja uma “janela terapêutica” para a fotoestimulação efetiva acima de um limiar; porém, abaixo de um nível que cause inibição. Esse conceito, descrito como Lei de Arndt-Schultz, tem sido invocado para tentar explicar os resultados conflitantes dos estudos sobre a LLLT. A lei prediz a existência de um efeito dose-



dependente, representado por uma curva dose *versus* resposta (FIGURA 3) (LOW & REED, 2001; LONGO & MESTER, 1998; BAXTER, 1997; KLOTH, 1997; KITCHEN & BAZIN, 1996; TIPHLOVA & KARU, 1987).

Karu (1998, 1987) concluiu em seus estudos *in vitro*, pela avaliação do crescimento celular, que na maior parte da curva dose-resposta aparecia geralmente 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 se apresentava uma segunda fase, observada nas bactérias, que dependia do tempo de exposição.

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



**FIGURA 3:** Representação esquemática da Lei de Arndt-Schultz

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 essas doses como ideais para estimular o processo de cicatrização dos diversos tecidos (TUNÉR & HODE, 1999).

Kubasova et al. (1984) referem-se à saturação dos efeitos bioestimulativos produzidos pela luz polarizada ocorrendo a  $4 \text{ J/cm}^2$ , quando 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 de 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 à radiação laser em diversos valores de densidade de energia também foi investigada. 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  $50 \text{ J/cm}^2$  (MESTER et al., 1985).

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 diferentes células em tecido normal foi observada após a irradiação com laser de 805 nm na dose de 4 J/cm<sup>2</sup>, e esse efeito foi suprimido quando as células foram irradiadas a 20 J/cm<sup>2</sup> (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 J/cm<sup>2</sup> intensificou essa resposta comparado à dose de 50 J/cm<sup>2</sup>.

Em experimentos realizados com monocamadas celulares, as doses ótimas nas regiões vermelha e vermelha distante do espectro, foram encontradas em torno de 10<sup>2</sup> J/m<sup>2</sup>. Porém, na 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 J/cm<sup>2</sup> a 9 J/cm<sup>2</sup> (LAAKSO, 1993b).

A efetividade clínica da terapia laser está intimamente relacionada com as doses energéticas adequadas, aplicadas corretamente e usadas gradualmente e regularmente. Doses baixas, ou ainda sobredosificação, podem não produzir efeitos ou gerar prejuízos. (OHSHIRO, 1991; GOLDMAN et al., 1980).

Segundo Simunovic et al. (1998), a dose ótima aplicada na área afetada é mais importante do que o comprimento de onda do laser. Outros autores (YOUNG et al., 1989) consideram que o comprimento de onda é o fator determinante nos efeitos fisiológicos. 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, embora esta última,

gerando estimulação em menor extensão. 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 utilizado.

Resultados de alguns trabalhos demonstraram que a duração e a frequência de pulso são parâmetros importantes da fonte de radiação (KARU et al., 1990).

O feixe pulsátil ou contínuo depende da fonte de material e configuração do sistema de produção do laser. As taxas de repetição dos pulsos variam de 2 Hz a 500 KHz. Apesar da potência média dos lasers ser baixa, a potência de pico do laser pulsátil pode ser alta, sendo na ordem de W ou mW (KITCHEN & PARTRIDGE, 1991). Foram feitos estudos comparativos entre o laser contínuo e pulsátil com o mesmo comprimento de onda e dose, sendo que não houve mudança significativa no uso do laser contínuo, porém o laser pulsado gerou efeitos inibitórios que foram dependentes da duração e taxa de repetição do pulso e do intervalo interpulso (KARU, 1998).

Sobre a frequência ideal de tratamento, ainda não existe um consenso. Karu (1989) e Mester et al. (1985), consideram que um tratamento a cada dois dias ou duas vezes por semana seria o protocolo ideal. No entanto, há autores que usam uma frequência diária de tratamento (HALLMAN et al. (1988), citados por LAAKSO et al., 1993b).

Estudos sugerem que baixas doses de irradiação, repetidas durante um intervalo semanal, produzem melhores efeitos quando comparadas com altas doses de energia aplicadas em curto período de tempo (SIMUNOVIC 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).

### **2.5.5. Penetração da luz nos tecidos**

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 com contato perpendicular do aparelho laser na superfície da pele durante a irradiação, aumenta a profundidade de penetração devido à 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 subsequentes passa a ser dispersa 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 de refração dos componentes teciduais, promove mudanças na direção de propagação do feixe, provocando um alargamento do mesmo durante sua passagem através do tecido irradiado, o que resulta, por fim, numa rápida perda da coerência (LOW &

REED, 2001; KITCHEN & BAZIN, 1996; LAAKSO et al., 1993b; GONZÁLES & COLLS, 1988).

Ao passo em que a luz é absorvida e dispersada pelos tecidos do corpo, há uma redução no efeito da radiação em proporção direta à sua penetração, atenuando a luz a diferentes frequências e em diferentes graus (KITCHEN & PARTRIDGE, 1991; OHSHIRO, 1991). Apesar disso, a extensão da ação fotoquímica permite atuar indiretamente afetando estruturas tão profundas como a 5 cm (LAAKSO et al., 1993b). Isso devido aos processos químicos que podem ser iniciados nos níveis mais superficiais, ampliando os efeitos aos níveis mais profundos (KITCHEN & PARTRIDGE, 1991).

#### **2.5.6. Efeitos do laser nos tecidos**

Uma vez absorvida, a energia laser pode fazer com que as biomoléculas específicas alcancem um estado de excitação eletrônica, em que são capazes de sofrer reações químicas como oxidação, redução, isomerização, ruptura de ligações covalentes ou interações com outras biomoléculas (PARRISH et al., 1985).

No aspecto molecular, podem acontecer três situações (BAXTER, 1997; PARRISH et al., 1985; KARU, 1987):

- 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 um observável efeito biológico;

- Vibrações moleculares, que consistem em estiramento e batimento das ligações que causam deslocamentos dos núcleos atômicos, mas não afetam 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.

As radiações ópticas podem ou não ser ionizantes e sua ação pode ser fotoquímica, para as radiações ultravioletas, ou termais, para a faixa infravermelha 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).

A terapia laser de baixa energia acontece em intensidades tão baixas que não se sabe ao certo se alguns efeitos biológicos ocorrem em decorrência dos efeitos diretos da radiação ou como resultado do aquecimento.

Basford (1989) reportou aumentos de temperatura tão pequenos como 0,1 a 0,5 graus Celsius ( $^{\circ}\text{C}$ ), considerando a utilização de baixas doses e potências de 50 mW ou menos. Karu et al. (1990), usando  $3 \text{ W/m}^2$  de intensidade, encontraram aumento de temperatura média de  $10^{-3} \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Um aumento de temperatura de 0,4 a 0,6  $^{\circ}\text{C}$  na pele irradiada por um diodo laser As-Ga de 850 nm e 70 mW, também foi relatado por Boussignac (citado por KARU et al., 1990).

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).

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  $0,1 \text{ }^\circ\text{C}$ , não produzindo, desta forma, influência na atividade celular.

Hall et al. (1994) afirmam que os benefícios do laser devem ser atribuídos a um processo não termal resultante da interação ou absorção nos tecidos específicos, dependente do comprimento de onda e da frequência que podem causar a modulação bioestimulatória.

Durante os estados de excitação eletrônica, uma importante fração de energia excitada é convertida em calor, o que gera aumento na temperatura dos cromóforos absorventes, sendo 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, que não é observado nas doses e intensidades usadas em estudos com culturas celulares (KARU, 1995).

A bioestimulação laser, ou reações laser catalisadas, referem-se à aplicação de energia eletromagnética pelo laser de baixa potência aos tecidos biológicos que, por sua vez, pode influenciar as funções celulares com a estimulação ou a inibição de atividades bioquímicas, fisiológicas e proliferativas. Porém, devido à estimulação e a inibição serem possíveis, o termo biomodulação é ultimamente usado 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 à 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 (KIPSHIDZE et al. 2001; DE BIE et al., 1998; BASFORD, 1995; BECKERMAN et al., 1992; HARRIS, 1991; KITCHEN & PARTRIDGE, 1991; KARU, 1989, 1987).

Segundo Karu (1987), existem razões para achar que o fenômeno de biomodulação é de natureza fotobiológica. Isso porque, de acordo com seus estudos, a inibição em alguns processos biológicos ocorre pela fotodestruição de um ou mais citocromos da cadeia respiratória. Os efeitos cumulativos em aplicações repetidas também resultam num efeito inibitório (MESTER et al., 1985). Assim, pode-se dizer que a radiação de baixa potência resulta em modulação das atividades celulares (SCHAFFER et al., 1997).

O efeito bioestimulante do laser sofreu várias tentativas de explicação através das várias teorias. A primeira delas foi o princípio de Arndt-Schultz, o qual propõe 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 irão anulá-la (BAXTER, 1997; KLOTH, 1997).

Kleinkort & Foley (1990), citados 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 os processos fisiológicos normais sejam restaurados em nível celular e do organismo em geral.

Beckerman et al. (1992) propuseram que, quando há uma alteração no estado de energia celular, há alteração da comunicação celular que será influenciada diretamente pela terapia laser.

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. Essa teoria considera que a energia eletromagnética estimula moléculas fotorreceptoras ou cromóforos, os quais respondem a uma faixa específica de luz realizando, assim, a conversão em energia fotoquímica. Esses cromóforos são um grupo de moléculas inter-relacionadas que podem ser enzimas, membranas ou qualquer outra substância capacitada à absorver luz e apresentando etapas comuns na realização dos efeitos causados pelas diferentes faixas de luz (KARU, 1998; BECKERMAN et al., 1992).

Além disso, os cromóforos têm sido definidos como componentes da cadeia respiratória de diferentes tamanhos e formas, que atuarão ou ressonarão com uma estimulação específica ou energia de radiação. Podem transferir a estimulação funcionalmente para os diferentes processos e componentes da célula, envolvidos na cadeia respiratória mitocondrial. Dependendo do comprimento de onda, a radiação eletromagnética na forma de luz pode estimular macromoléculas, iniciar mudanças na conformação de proteínas e transferir energia aos elétrons (WILDEN & KARTHEIN, 1998).

Alguns elementos têm sido propostos como fotorreceptores primários. Um desses elementos é a melanina, que possui alta absorção em comprimentos de onda superiores a 300 nm, mostrando uma ligeira diminuição em comprimentos de onda maiores que 1200 nm (PARRISH et al., 1985).

Baxter (1997) considera como moléculas responsáveis pela absorção da luz, os aminoácidos e ácidos nucleicos e, como cromóforos, a melanina e a hemoglobina. Os aminoácidos têm alta absorção na faixa intermediária do espectro ultravioleta (UV) e também em comprimentos de onda menores que do UV; os ácidos nucleicos possuem seu espectro de absorção nas mesmas faixas dos aminoácidos e também na região infravermelha; os cromóforos absorvem luz na região visível do espectro.

Outros pesquisadores consideram que os primeiros meios absorventes são as proteínas e a água (LAAKSO et al., 1993b).

Gamaley (1977) postulou que nos níveis subcelulares, as unidades estruturais mais sensíveis à irradiação laser, devem ser as estruturas membranosas das células, primariamente o retículo endoplasmático e as membranas que constituem uma parte considerável do citoplasma e as membranas das organelas que formam os limites de fase intracelular.

Em outros trabalhos (KARU, 1998; LABBE et al., 1990), o citocromo a-a<sub>3</sub> ou citocromo-oxidase é considerado como o fotorreceptor primário para o intervalo espectral infravermelho próximo entre os comprimentos de onda de 700 nm e 900 nm e na região visível. No entanto, essa função não pode ser realizada quando o citocromo encontra-se totalmente oxidado ou totalmente reduzido, mas somente quando ele adquire uma forma intermediária (KARU, 1998, 1995; SCHAFFER et al., 1997).

Karu (1998, 1995) considera também que as moléculas fotorreceptoras primárias poderiam ser ferro de baixa rotação ou componentes derivados das porfirinas da cadeia respiratória, tendo uma absorção perto de 950 nm e 1300 nm. A cadeia respiratória é, portanto, um receptor de luz visível monocromática de baixa potência. Isso explica

satisfatoriamente a dependência da dose ou do comprimento de onda no efeito estimulativo de tal radiação (KARU, 1987).

A hemoglobina, presente nas células sanguíneas vermelhas, pode também atuar como um cromóforo, tomando parte na absorção de fotoirradiações de comprimentos de onda entre 600 nm e 700 nm, o que foi comprovado por ter amplificado os efeitos da irradiação de 5,0 J/cm<sup>2</sup> sobre as culturas de linfócitos com aumento da enzima SOD (superóxido-dismutase), a qual atua como anti-oxidante, eliminando os superóxidos em excesso (STADLER et al., 2000).

Como os efeitos da biomodulação possuem um amplo intervalo espectral, assume-se que devem ser diferentes cromóforos os alvos fotorreceptores, e isso 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 *Escherichia coli*. A partir desse momento, devem ser diferenciados dois tipos de reações.

É proposto como mecanismo primário de ação, a possibilidade de ocorrência de quatro respostas a partir da incidência da radiação laser sob as moléculas fotorreceptoras: mudanças no estado redox e aceleração na transferência de elétrons; alterações na atividade bioquímica e estrutural pelo aquecimento transitório dos cromóforos; aumento da produção de superóxido e, finalmente, a geração de oxigênio molecular. Na seqüência, os mecanismos secundários de ação conseqüente às reações

bioquímicas e/ou biofísicas iniciadas, correspondem à transdução do fotosinal e amplificação ao núcleo por uma cascata de reações ocorridas no citoplasma e na membrana celular, sendo conectadas a alterações dos parâmetros de homeostase celular (pH, concentração de  $\text{Ca}^{+2}$ , AMP cíclico, ATP e outros), que acontecem minutos ou horas após a irradiação. Isso leva à possíveis mudanças na taxa de síntese de DNA e RNA, alterações na taxa do consumo de  $\text{O}_2$ , alteração do potencial de membrana, entre outras. (SANDOVAL-ORTIZ et al., 2001; ALEXANDRATOU et al., 2000; LUBART et al., 2000; KARU, 2000, 1998; BAXTER, 1997; KARU et al., 1996, 1995; KITCHEN & PARTRIDGE, 1991; KARU, 1987).

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 relacionada ao estado fisiológico prévio à irradiação, o qual é condicionado, no caso de cultura celular, por exemplo, pela quantidade de nutrientes disponíveis e a idade da cultura e no caso de uma baixa concentração de oxigênio e queda do pH, 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, 1995, 1987).

Com isso, conclui-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 (TUNÉR & HODE, 1999).

Assim, evidências experimentais comprovam que a alteração do estado redox no sentido da oxidação está relacionada com o efeito estimulatório do laser, enquanto

que a alteração no sentido da redução, correlaciona-se com o efeito inibitório. Isso 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).

O laser gera efeitos fotoquímicos, fotofísicos e fotobiológicos, afetando não só a área de atuação, mas também as regiões circundantes (TUNÉR & HODE, 1999). Os efeitos fotobiológicos podem, convencionalmente, ser divididos em curto prazo ou diretos e em longo prazo ou indiretos à radiação (KARU, 1998). As respostas em curto prazo são aquelas em que o efeito do laser pode ser observado uns poucos segundos ou minutos após a irradiação. Entre elas, está a fotoestimulação da taxa respiratória e a síntese de ATP (KARU, 1998, 1987). Os efeitos em longo prazo são observados horas ou dias depois do final da irradiação.

Há uma proposta de que as mudanças nas propriedades químicas e físicas das membranas mitocondriais externas induzidas pelo laser, resultem em fusão preferencial de membranas mitocondriais adjacentes, constituindo, assim, uma mitocôndria gigante. Esta estrutura é capaz de proporcionar altos níveis de respiração e energia de reposição (MANTEIFEL et al., 1997).

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).

Entre os efeitos fisiológicos do LLLT em longo prazo, estão o aumento da mitose e a reversibilidade da hiperpolarização da membrana celular (WEBB et al., 1998; TATARUNAS et al., 1998; KESAVA et al., 1998, RICEVUTI et al., 1989).

Tem sido proposto que o laser de baixa potência possui um efeito antiinflamatório e a evidência clínica e laboratorial pode ser extensivamente revisada em vários trabalhos, embora não se conheça claramente o mecanismo de ação e muitos dos resultados são controversos (HONMURA et al., 1993; HONMURA et al., 1992; SCHMITT et al., 1993).

Evidências acumuladas também indicam que a fotoestimulação com laser de baixa potência intermedia os processos de inflamação por modular os níveis de várias prostaglandinas (ENWEMEKA et al., 1990 a), embora o estudo de Hall et al. (1994) não concorde com esse mecanismo. Goats et al. (1996) também chegaram à conclusão de que o laser de baixa potência, combinado com fototerapia infravermelha, não modifica a performance do sistema imune.

Mester et al. (1985) consideraram que, sob uma dada condição, o feixe laser não estimula diretamente o metabolismo dos linfócitos, e sim influencia um ou mais fatores que induzem a estimulação.

Segundo Kitchen & Bazin (1996), os benefícios da LLLT no tratamento de patologias como a artrite reumatóide, osteoartrite e dor artrogênica, foram avaliados por diversos pesquisadores que encontraram divergência dos resultados. Alguns grupos de estudiosos observaram uma redução da dor e da inflamação, associado à melhora do estado funcional articular após o tratamento com laser. Outros artigos não conseguiram detectar qualquer benefício da laserterapia em experimentos controlados e comunicados.

No modelo experimental de inflamação induzida no trabalho de Honmura et al. (1992), utilizando laser 780 nm (As-Ga-Al) a 10 mW e densidade de potência de 31,8 mW/cm<sup>2</sup>, a irradiação realizada imediatamente antes ou logo após a inflamação, não foi diferente do efeito da irradiação laser usada 3 horas depois, o que indica que o tratamento feito imediatamente antes e depois da lesão foi efetivo em diminuir o volume de exsudato, influenciando a permeabilidade vascular. Em relação ao edema dos grupos tratados, não foram observadas modificações significativas e a irradiação laser foi considerada não efetiva.

Alguns autores (SANDOVAL-ORTIZ et al., 2001; KARU, 1998; HONMURA et al., 1992) consideram que o efeito inibitório do laser sobre a inflamação pode envolver os seguintes processos: - inibição da emergência de fatores quimiotáxicos nas primeiras etapas da lesão; - interferência com os efeitos dos mediadores químicos ou superóxidos induzidos pela inflamação; - diminuição do volume do exsudato alterando assim a permeabilidade vascular; - normalização da permeabilidade de membrana. Assim, diferentes mecanismos podem estar envolvidos nos efeitos inibitórios do laser de baixa potência sobre a permeabilidade vascular da água e as proteínas do plasma.

A irradiação laser pode inibir, *in vivo* e *in vitro*, a quimiotaxia, tendo assim um efeito antiinflamatório global e facilitando o processo de cicatrização (SANDOVAL-ORTIZ, 2001).

Amano et al. (1994) evidenciaram uma redução da sintomatologia dolorosa e inflamatória de 32 pacientes portadores de artrite reumatóide submetidos a tratamento com laser As-Ga-Al (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 que o emprego da terapia laser mostrou melhores resultados quando comparado com os grupos controle, 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 As-Ga-Al (830 nm), CW, 77 mW, densidade de potência de 27,5 mW/cm<sup>2</sup>. Os melhores resultados foram obtidos com dose de 3,4 J/cm<sup>2</sup>.

A irradiação laser de baixa potência tem sido observada também por aumentar e acelerar a formação de novos vasos após lesão tecidual (AGAIBY et al., 2000).

De acordo com os estudos de Simunovic et al. (1998), o tratamento com LLLT em epicondilite promoveu aumento na microcirculação do tecido afetado, aumentando o suprimento sanguíneo para as células e promovendo a remoção de catabólitos.

No experimento de Schindl et al. (1999), houve um aumento no número de vasos em úlceras cutâneas após a irradiação com laser He-Ne por 4 semanas, sendo 2 vezes por semana com densidade de potência de 10 mW e densidade de energia de 30 J/cm<sup>2</sup>. Segundo estes autores, há uma grande evidência sugerindo que o laser possa induzir a angiogênese *in vitro* e *in vivo*.

Ghali & Dyson (1992) relatam que a terapia laser pode estimular ou inibir a proliferação de células endoteliais, que são as principais células envolvidas com a angiogênese, dependendo do comprimento de onda e densidade de energia utilizada.

Agaiby et al. (2000), estudaram os efeitos do laser As-Ga-Al de 820 nm com densidades de energia de 1.2 J/cm<sup>2</sup>, 3.6 J/cm<sup>2</sup>, 6.0 J/cm<sup>2</sup>, 8.4 J/cm<sup>2</sup> e potência de 50 mW em culturas de linfócitos T humanos e demonstraram que a terapia de luz é capaz de estimular indiretamente a proliferação de células endoteliais com as densidades de energia menores (1.2 J/cm<sup>2</sup> e 3.6 J/cm<sup>2</sup>). Já as doses de 6.0 e 8.4 J/cm<sup>2</sup> mostraram efeitos inibitórios o que leva a conclusão de que a síntese e secreção de fatores de crescimento angiogênicos em resposta à terapia de luz, é dose-dependente.

A possibilidade de a LLLT estimular a liberação e secreção de fatores de crescimento relacionados com a angiogênese, em especial o VEGF, foi investigada por Kipshidze et al. (2001), constatando que o laser He-Ne, contínuo, com potência de saída de 5 mW, irradiado durante 0, 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 40 e 60 minutos, aumentou a produção do VEGF em cultura de células musculares lisas, fibroblastos e miócitos cardíacos até 20 minutos de exposição. Após esse tempo, houve um decréscimo na produção deste fator de crescimento.

## **2.6. LASER NO REPARO TENDÍNEO**

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.

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 (830 nm), no processo de reparo tecidual em tendões calcaneares de ratos.

Tavares (2002), estudou o efeito do laser As-Ga (904 nm), com potência média de 3,7 mW e dose de 4 J/cm<sup>2</sup> no processo cicatricial de tendões tenotomizados de ratos durante 7 e 14 dias após a lesão e constatou diferenças significativas da quantidade de células inflamatórias em relação ao grupo controle durante os 7 primeiros dias. Após 14 dias, não houve diferença significativa entre os grupos. Neste mesmo estudo, o autor investigou a presença de neovascularização e constatou aumento na formação de novos vasos no grupo tratado com laser durante 14 dias após a tenotomia.

Enwemeka & Reddy (2000), utilizando doses de 0,001 J/cm<sup>2</sup> e 0,005 J/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>.

Um estudo similar feito com 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>, demonstrou um aumento de 40% na capacidade biomecânica de tendões lesados após 14 dias de reparo, o que foi intensificado na dose de 1,0 J/cm<sup>2</sup> (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 J/cm<sup>2</sup>, observaram que o processo de reparo tendíneo e a

performance biomecânica dos tendões lesados foram melhorados quando foi utilizado o laser de He-Ne (632,8 nm) (ENWEMEKA & REDDY, 2000).

Reddy et al. (1998b), 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 em 5 aplicações consecutivas de estimulação elétrica transcutânea, iniciando no primeiro dia do pós-operatório, juntamente com a aplicação de laser de  $1 \text{ J/cm}^2$ , até o 14º 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), utilizaram um protocolo de terapia combinada com estimulação elétrica transcutânea (corrente galvânica), laser de As-Ga (904 nm),  $1 \text{ J/cm}^2$  e Ultra-Som. Os resultados demonstraram aumento na produção de colágeno, porém sem diferenças estatisticamente significantes na performance funcional dos tendões tratados em relação ao grupo controle, sugerindo que terapias combinadas podem não influenciar de forma positiva o processo de cicatrização tendínea.

Parizotto & Baranauskas (1998a), utilizando um feixe laser He-Ne (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, aumento das ligações de hidrogênio intra e intermoleculares 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).

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 calcâneo 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. Foram observados melhores resultados em relação ao alívio do quadro algíco 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 algíco, 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 antiinflamatórios não esteroidais.

A efetividade do tratamento com laser de baixa potência nas lesões tendíneas foi também evidenciada por England et al. (1989). Estes autores realizaram um estudo com 30 pacientes com tendinite de supraespinhoso e bíceps braquial, utilizando

laser As-Ga (904 nm), 3 mW, 4000 Hz, pulsos de 180 nanosegundos, pontual, durante 5 minutos, 3 vezes por semana por um período de duas semanas. Os resultados mostraram redução do quadro algico e melhora funcional nos indivíduos tratados quando comparados com o grupo controle não irradiado.

No entanto, 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), 10 mW, distância de 10 cm da pele do paciente, área de aplicação de 4 cm<sup>2</sup> e laser de As-Ga (904 nm), pulsado, 30 mW e densidade de potência de 7,5 W/cm<sup>2</sup>, em aplicações de 15 minutos diários. Os autores não fizeram citações 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) realizaram 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 tenham demonstrado aumento da proliferação fibroblástica e aumento da síntese de colágeno dos tendões quando comparados com o 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. (1993), citados por Tunér & Hode (1999), fizeram um estudo com 50 galinhas brancas, onde 10 serviram como controle e 40 sofreram lesão do seu tendão profundo do 2º e 3º dedos do pé. Os tendões tratados receberam laser de HeNe e 10,74 mW/cm<sup>2</sup> 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, estimulação 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 a cultura foi 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, foram comparados 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 mostraram que, quando foram comparados dois comprimentos de onda diferentes (670 nm e 780 nm), 2 J/cm<sup>2</sup>, e potências de 10 mW e 50 mW, a proliferação fibroblástica foi intensificada com 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 (ALMEIDA-LOPES et al., 2001).

Pereira et al. (2002) avaliaram a proliferação fibroblástica após a irradiação com laser de As-Ga (904 nm), 120 mW de potência e doses de 3 J/cm<sup>2</sup>, 4 J/cm<sup>2</sup> e 5 J/cm<sup>2</sup>. As doses de 3 J/cm<sup>2</sup> e 4 J/cm<sup>2</sup> aumentaram em 3 a 6 vezes a taxa de proliferação celular, enquanto que a dose de 5 J/cm<sup>2</sup> proporcionou crescimento celular semelhante à cultura de células controle.

Rigau et al. (1994) constataram aumento na proliferação de fibroblastos *in vitro* sob irradiação com laser de 633 nm, 2 J/cm<sup>2</sup>, 38 mW, 4 mW/cm<sup>2</sup>, 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 conseqüente aumento na proliferação de fibroblastos após a irradiação de cultura destas células com laser de As-Ga (904 nm), 0,003 W/cm<sup>2</sup> e 0,3 J/cm<sup>2</sup>.

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

Lubart et al. (1992) observaram um aumento no número de mitoses quando irradiaram 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. (1985), citados por Baxter (1997), encontraram aumento na proliferação fibroblástica usando laser de He-Ne (632,8 nm) e laser infravermelho. O aumento no tamanho do retículo endoplasmático rugoso, relacionado com estimulação na



síntese protéica, foi observado, assim como a proliferação 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 encontraram 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), observaram 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.

Bolton et al. (1991), citados por Tunér & Hode (1999), irradiaram fibroblastos com 50 mW do laser de As-Ga-Al. A proliferação de fibroblastos e a atividade da enzima succinase desidrogenase foi aumentada quando foi utilizada dose de 2 J/cm<sup>2</sup>, porém, ambas foram inibidas na dose de 16 J/cm<sup>2</sup>.

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

### **3. OBJETIVOS**

### **3.1. OBJETIVO GERAL**

- Analisar os efeitos do laser terapêutico de baixa intensidade no comprimento de onda de 660 nm sobre o processo de neovascularização após lesão parcial do tendão calcâneo de ratos.

### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Analisar os efeitos do laser nas diferentes fases da neovascularização após lesão parcial de tendão calcâneo de ratos;

- Analisar a melhor potência de saída do laser, dentre as utilizadas, para promover a neovascularização após lesão tendínea;

- Analisar e comparar a qualidade de reparo tendíneo com a aplicação do laser com diferentes potências de saída, considerando a predominância de células inflamatórias polimorfonucleares, mononucleares, organização de colágeno e neovascularização;

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### 4.1. ANIMAIS

Foram utilizados 104 ratos machos albinos (*Rattus norvegicus albinus*), da raça Wistar, com 10 a 12 semanas de idade e massa corporal variando entre 230 e 275 gramas (média = 249,15 gramas e desvio padrão =  $\pm 11,83$ ) obtidos no Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), campus de São Carlos.

Os ratos foram mantidos no Biotério do Laboratório de Eletrotermofototerapia da UFSCar durante todo o procedimento experimental em gaiolas de polipropileno padrão, agrupados com 4 animais em cada. Permaneceram em ambiente higienizado com ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo água e ração balanceada *ad libitum* durante todo o período experimental.

#### 4.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os 104 animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos (1, 2, 3 e 4), sendo 1, 2 e 3 contendo 32 animais em cada e 4 contendo 8 animais.

Os grupos 1, 2 e 3 foram ainda divididos em 4 subgrupos cada.

**GRUPO 1 (n = 32):** O tendão calcâneo direito foi lesionado por um trauma e foi sacrificado no 4º dia após a lesão:

- subgrupo A (n = 8): recebeu tratamento com laser com potência de saída de 10 mW por 10 s durante os três primeiros dias após a lesão, com densidade de energia de 2,5 J/cm<sup>2</sup>.

- subgrupo B (n = 8): recebeu tratamento com laser com potência de saída de 40 mW por 10 s durante os três primeiros dias após a lesão, com densidade de energia de 10 J/cm<sup>2</sup>.

- subgrupo C (n = 8): recebeu tratamento placebo com equipamento desligado durante os três primeiros dias após a lesão, ou seja, os tendões dos animais deste grupo tiveram um processo de reparo tecidual de curso normal, sem interferências externas, porém houve o estresse da simulação do tratamento.

- subgrupo D (n = 8): foi lesionado e mantido em sua gaiola durante os três primeiros dias após a lesão, ou seja, os tendões dos animais deste grupo tiveram um processo de reparo tecidual de curso normal sem interferências externas e sem o estresse provocado pela simulação do tratamento.

**GRUPO 2 (n = 32):** O tendão calcâneo direito foi lesionado por um trauma e foi sacrificado no 6º dia após a lesão

- subgrupo E (n = 8): recebeu tratamento com laser com potência de saída de 10 mW por 10 s durante os cinco primeiros dias após a lesão, com densidade de energia de 2,5 J/cm<sup>2</sup>.

- subgrupo F (n = 8): recebeu tratamento com laser com potência de saída de 40 mW por 10 s durante os cinco primeiros dias após a lesão, com densidade de energia de 10 J/cm<sup>2</sup>.

- subgrupo G (n = 8): recebeu tratamento placebo com equipamento desligado durante os cinco primeiros dias após a lesão, ou seja, os tendões dos animais deste grupo tiveram um processo de reparo tecidual de curso normal, sem interferências externas, porém houve o estresse da simulação do tratamento.

- subgrupo H (n = 8): foi lesionado e mantido em sua gaiola durante os cinco primeiros dias após a lesão, ou seja, os tendões dos animais deste grupo tiveram um processo de reparo tecidual de curso normal sem interferências externas e sem o estresse provocado pela simulação do tratamento.

**GRUPO 3 (n = 32):** O tendão calcâneo direito foi lesionado por um trauma e foi sacrificado no 8º dia após a lesão.

- subgrupo I (n = 8): recebeu tratamento com laser com potência de saída de 10 mW por 10 s durante os sete primeiros dias após a lesão, com densidade de energia de 2,5 J/cm<sup>2</sup>.

- subgrupo J (n = 8): recebeu tratamento com laser com potência de saída de 40 mW por 10 s durante os sete primeiros dias após a lesão, com densidade de energia de 10 J/cm<sup>2</sup>.

- subgrupo K (n = 8): recebeu tratamento placebo com equipamento desligado durante os sete primeiros dias após a lesão, ou seja, os tendões dos animais deste grupo tiveram um processo de reparo tecidual de curso normal, sem interferências externas, porém houve o estresse da simulação do tratamento.

- subgrupo L (n = 8): foi lesionado e mantido em sua gaiola durante os sete primeiros dias após a lesão, ou seja, os tendões dos animais deste grupo tiveram um processo de reparo tecidual de curso normal sem interferências externas e sem o estresse provocado pela simulação do tratamento.

**GRUPO 4 (n = 8):** neste grupo, os animais não foram lesionados com trauma e não receberam nenhum tratamento, sendo considerados como controle. Portanto seus tendões desenvolveram-se normalmente durante todo o período experimental. Este subgrupo foi utilizado como referência para a análise e será representado pela sigla CP (controle padrão).

Para efeito didático, os grupos irradiados com laser serão identificados de acordo com a potência de saída administrada e os dias de tratamento (potência de saída em mW / dias de tratamento), o grupo que recebeu tratamento placebo com a sigla CL/PL/ dias (com lesão, tratamento placebo e dias de tratamento) e o grupo que foi lesionado e não recebeu nenhum tratamento com a sigla CL/ST/ dias (com lesão, sem tratamento e dias que permaneceu sem tratamento).

**TABELA 1: Grupos e subgrupos experimentais**

<b>Grupo 1 (n = 32):</b>	<b>Grupo 2 (n = 32)</b>	<b>Grupo 3 (n = 32)</b>	<b>Grupo 4 (n = 8)</b>
<b>3 dias</b>	<b>5 dias</b>	<b>7 dias</b>	<b>Controle padrão</b>
<b>A (n = 8)</b>	<b>E (n = 8)</b>	<b>I (n = 8)</b>	<b>CP</b>
10 mW / 3 dias	10 mW / 5 dias	10 mW / 7 dias	
<b>B (n = 8)</b>	<b>F (n = 8)</b>	<b>J (n = 8)</b>	-
40 mW / 3 dias	40 mW / 5 dias	40 mW / 7 dias	
<b>C (n = 8)</b>	<b>G (n = 8)</b>	<b>K (n = 8)</b>	-
CL/PL / 3dias	CL/PL / 5 dias	CL/PL / 7 dias	
<b>D (n = 8)</b>	<b>H (n = 8)</b>	<b>L (n = 8)</b>	-
CL/ST/ 3dias	CL/ST/ 5 dias	CL/ST/ 7 dias	

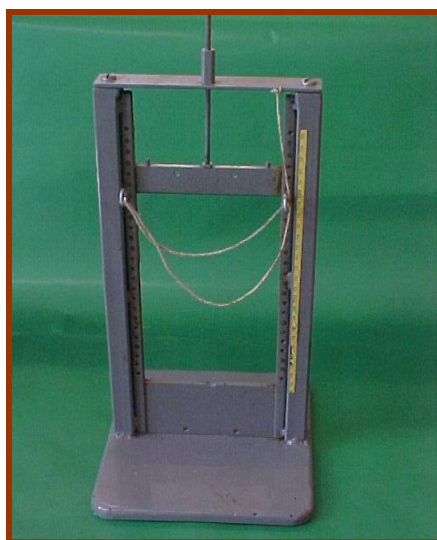
### **4.3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

#### **4.3.1. Lesão**

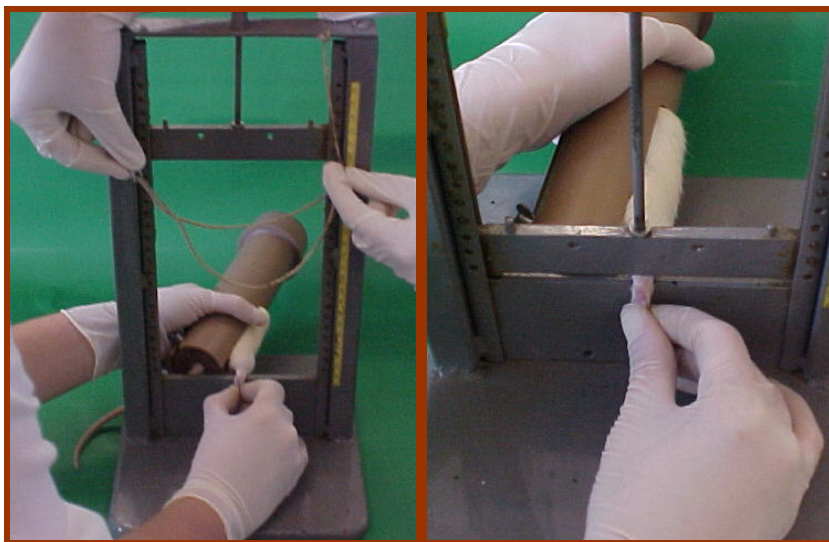
Os animais dos grupos 1 (n = 32), 2 (n = 32) e 3 (n = 32) foram pesados sedados com uma combinação de Ketamina<sup>®</sup> (35 mg/ kg) e Xilazina<sup>®</sup> (4 mg/ kg) injetada intraperitonealmente utilizando uma seringa de insulina simples de 50 unidades.



A pele ao redor do tendão calcâneo da pata direita foi tricotomizada e posicionada no equipamento feito pela Oficina Mecânica da UFSCar (FIGURA 4). Foi feita uma leve tração na região calcanear direita com o tornozelo em dorsi-flexão e um peso de 186 g foi solto perpendicularmente de uma altura de 20 cm sobre o tendão do animal. (FIGURA 5). A energia potencial de queda sobre o tendão foi de 364,9 mJ.



**FIGURA 4:** Equipamento utilizado para lesionar os animais



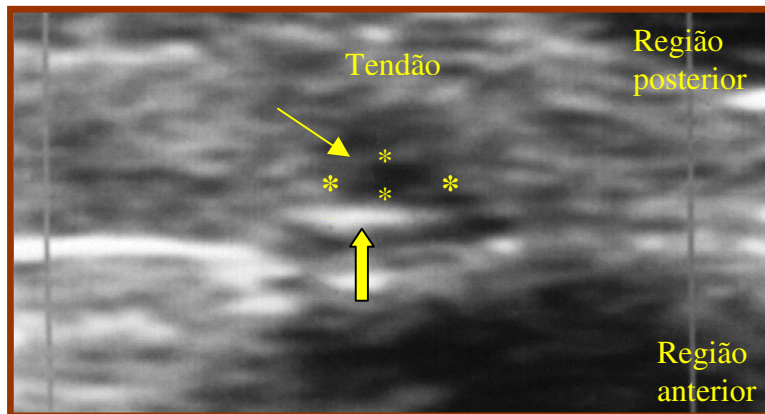
**FIGURA 5:** Modelo de lesão parcial do tendão calcâneo

Imediatamente após esse procedimento, o peso foi retirado e o local da lesão foi marcado com uma caneta de retroprojektor para aplicação do laser. A partir daí, o animal foi recolocado em sua gaiola e observado até o retorno do efeito do sedativo.

Todo o procedimento foi feito durante o período da manhã e sempre pelos mesmos examinadores a fim de evitar qualquer possibilidade de erro no posicionamento correto do animal durante o trauma.

O peso e a altura utilizados durante o trauma foram previamente definidos em um estudo piloto realizado neste mesmo laboratório para possibilitar a ocorrência de uma lesão parcial na porção mais profunda do tendão. Neste caso, os animais foram submetidos ao trauma e em seguida a um exame de ultrassonografia (10 MHz) para diagnosticar e localizar a lesão.

A FIGURA 6 mostra a imagem ultrassônica de um dos animais deste estudo piloto com queda de 186 g a 20 cm de altura, evidenciando uma área hipocogência na região anterior do tendão (entre asteriscos amarelos e indicada pela seta estreita) identificada como local de ruptura. Todos os animais submetidos à essa carga apresentaram imagens semelhantes de ultra-som.



**FIGURA 6:** Imagem de Ultrassonografia do tendão calcâneo de rato após lesão com queda de 186 g à uma altura de 20 cm em estudo piloto. (seta estreita = local de lesão, seta larga = osso adjacente). Vista longitudinal

#### 4.3.2. Equipamento utilizado

Foi utilizado um modelo portátil de laser As-Ga-Al da marca MMOptics, modelo Twin Laser, classe 3B, modo contínuo, com comprimento de onda de 660 nm, potência de saída de 10 mW e 40 mW e área do feixe de saída de 4,0 mm<sup>2</sup> (FIGURA 7).



**FIGURA 7:** Equipamento Laser utilizado no experimento

O equipamento foi previamente calibrado na própria fábrica de equipamentos laser MMOptics localizada na cidade de São Carlos e novamente aferido após o procedimento experimental, a fim de se obter uma alta confiabilidade na intensidade efetiva da emissão.

#### 4.3.3. Procedimento de irradiação

As aplicações foram consecutivas e ininterruptas durante 3, 5 e 7 dias após a lesão iniciando no mesmo dia (FIGURA 8), porém durante a tarde, sendo mantido esse mesmo período todos os dias de tratamento.

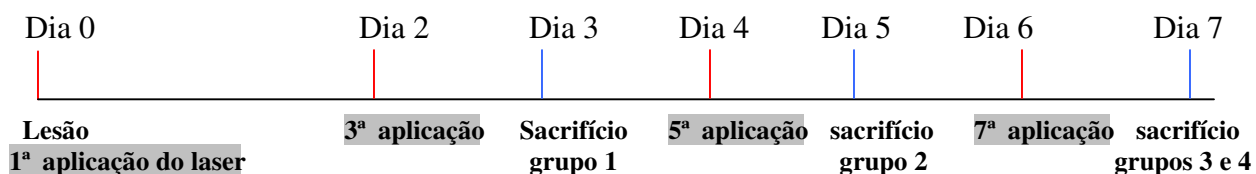
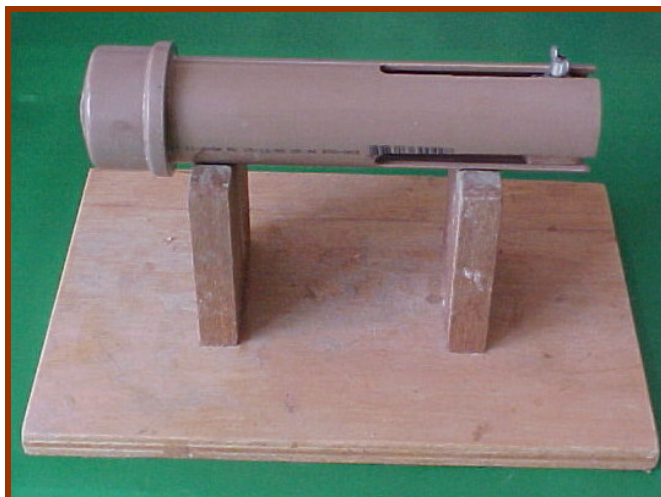


FIGURA 8: Esquema do protocolo experimental

Para o tratamento os animais foram colocados em um contendor (FIGURA 9) e receberam radiação laser durante 10 segundos, sendo que a potência de saída de 10 mW proporcionou densidade de energia de  $2,5 \text{ J/cm}^2$  e densidade de potência de  $2,5 \text{ mW/mm}^2$  e a potência de saída de 40 mW, densidade de energia de  $10 \text{ J/cm}^2$  e densidade de potência de  $10 \text{ mW/mm}^2$ .



**FIGURA 9:** Contensor para colocação dos animais

A técnica de aplicação foi feita perpendicular, com contato direto na pele do animal, em um único ponto no local da lesão (FIGURA 10), previamente marcado com uma caneta.

Todos os pesquisadores envolvidos com o tratamento com laser utilizaram óculos de proteção durante a radiação.



**FIGURA 10:** Procedimento de irradiação

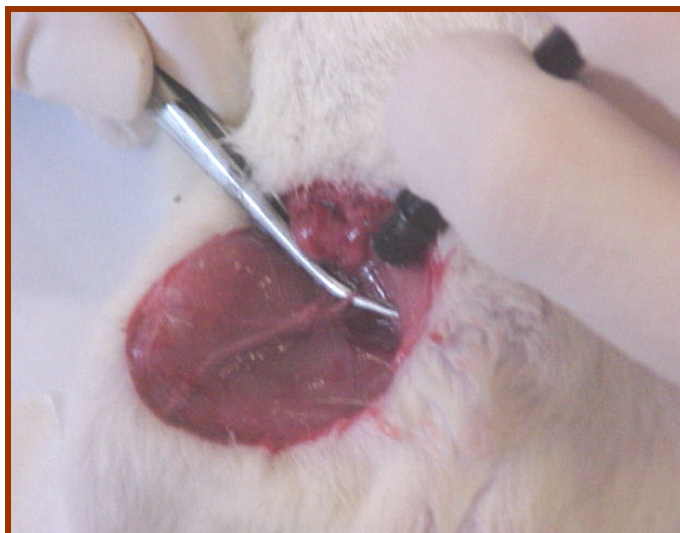
Os animais dos grupos CL/PL (com lesão / placebo) foram submetidos ao mesmo procedimento descrito acima, porém com o equipamento desligado. Os animais dos grupos CL/ST (com lesão / sem tratamento) permaneceram em suas gaiolas após o trauma. Os animais do grupo 4 (CP: controle padrão) também permaneceram em suas gaiolas e foram sacrificados após 7 dias do início do experimento.

#### **4.3.4. Procedimento após a irradiação**

No dia seguinte ao último tratamento, cada animal foi pesado e anestesiado intraperitonealmente com uma combinação de Ketamina<sup>®</sup> (95 mg/kg) e Xilazina<sup>®</sup> (12 mg/kg) e foi feita uma incisão na perna direita na região da artéria ilíaca externa. Esta foi separada cuidadosamente da veia, do nervo e estruturas adjacentes com a colocação de uma linha de algodão comum. Após esse procedimento, foi injetado por meio de uma agulha tamanho 26 G, aproximadamente 1,5 mL de tinta nanquim (FIGURA 11), previamente diluída em soro fisiológico (1: 6) em fervura por 5 minutos.

A adequação da perfusão da solução no membro foi julgada pela aparência da tinta na pata do animal.

Imediatamente após a aplicação da técnica de coloração dos vasos, foi feita uma pressão manual na região do tendão até que os animais fossem sacrificados com inalação excessiva de éter etílico.



**FIGURA 11:** Técnica de coloração de vasos sanguíneos

Em seguida, os tendões foram retirados cirurgicamente desde a inserção calcanear até a junção miotendínea por dissecação e logo após, lavados em solução salina a 0,9%.

#### **4.4. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS**

Os tendões dissecados foram submetidos à fixação em solução de Boin por 6 horas e posteriormente foram desidratados em soluções de álcool etílico 70 %, 90 %, 95 % e 3 banhos em álcool etílico absoluto à 100 %, sendo 1 hora em cada.

Em seguida, o material foi diafanizado em solução de álcool-xilol e dois banhos de xilol, também por 1 hora em cada.

Os tendões ainda foram submetidos à 3 banhos de parafina líquida à 60° onde ficaram por 1 hora em cada antes dos blocos serem preparados para o corte para lâmina histológica

Os cortes foram feitos longitudinalmente em micrótomo da marca ANCAP, com espessura de 7 micrômetros e montados em lâminas histológicas.

Foi feita 1 lâmina de cada tendão, com 4 cortes e em seguida desparafinizadas e coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) (ANEXO A) para análise semiquantitativa de exsudato inflamatório e organização de colágeno.

#### **4.5. ANÁLISE POR MICROSCOPIA DE LUZ COMUM**

As lâminas previamente coradas com HE foram analisadas por meio de um Vídeo Microscópio de luz comum da marca Zeiss, com monitor da marca Sony.

As análises foram feitas por dois avaliadores (AV1 e AV2) em diferentes períodos, não havendo contato com os dados obtidos por cada um deles durante a fase de análise. Além disso, a identificação de cada lâmina foi coberta com uma fita adesiva de modo que não houvesse um conhecimento prévio sobre qual grupo estava sendo analisado, evitando, portanto, qualquer possibilidade de indução nos resultados obtidos.

Ao término da análise a fita era retirada e o resultado anotado de acordo com o respectivo grupo.



#### **4.5.1. Contagem dos vasos**

Cada examinador realizou a contagem através da seleção de 5 campos de igual tamanho. Para determinação destes campos foi inicialmente identificado o local da lesão e a região paratendínea mais próxima a esse local foi considerada como campo 1. Acima dessa região, intercalando um campo sem análise, foi considerado como campo 2 e em seguida 3, também com uma região intercalada. O mesmo foi feito abaixo do primeiro local de contagem para os campos 4 e 5 (ANEXO B).

O tamanho de cada campo foi estabelecido de acordo com o tamanho do monitor e com aumento de 40 X no microscópio.

#### **4.5.2. Análise qualitativa e semiquantitativa do reparo tendíneo**

A análise, denominada de semiquantitativa, também foi feita por dois examinadores em diferentes momentos onde foram considerados os seguintes itens:

1. Presença de células inflamatórias polimorfonucleares
2. Presença de células inflamatórias mononucleares
3. Presença de organização do colágeno
4. Presença de neovascularização

No item 2 não foi considerado a presença de fibroblastos. Estes foram analisados qualitativamente apenas pela observação de cada tendão.

O grupo CP foi analisado qualitativamente como referência do aspecto tecidual normal não sendo, portanto, avaliado estatisticamente.

Para a avaliação destes itens foi considerada uma escala de classificação, segundo a pesquisa de Tavares (2002), em graus que variaram de:

Ausente: (-)

Presença leve: (+)

Presença moderada: (++)

Presença acentuada: (+++)

Presença muito acentuada: (++++)

Além dessas classificações, também foram feitas classificações intermediárias como (-/+), (+/++), (++/+++), (+++/++++).

#### **4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Todos os registros em cruces determinados pela escala de classificação descrita acima foram submetidos a valores numéricos para análise estatística, como pode ser visto na TABELA 2.

**TABELA 2: Escala de categorias para análise dos itens**

(-)	0	(-/+)	0,5
(+)	1	(+/++)	1,5
(++)	2	(++/+++)	2,5
(+++)	3	(+++/++++)	3,5
(++++)	4		

Para verificar se houve diferença estatisticamente significativa entre os dois avaliadores, foi feito o teste de correlação linear de Pearson para cada item individualmente e para todas as análises de contagem de vasos nos campos.

Para obter uma comparação estatística mais rigorosa dos grupos há a necessidade da aplicação de testes estatísticos paramétricos apropriados, como uma análise de variância (ANOVA) paramétrica. Em geral, a validade dos resultados obtidos por essas técnicas está condicionada à satisfação de condições como a homocedasticidade (isto é, deve haver homogeneidade nas variâncias dos grupos). A alternativa é a utilização de testes não paramétricos (como os baseados nos postos de observações), os quais são mais robustos que os seus correspondentes paramétricos sob violação destas condições.

Os resultados de cada análise (quantitativa e semiquantitativa), considerando cada campo individualmente (5) e cada classificação dos itens (4), foram determinados através de um Teste de Variância não Paramétrica (HOLLANDER & WOLFE, 1999), considerando o Teste de Friedman com dados replicados a dois fatores: dias, com três

níveis (3, 5 e 7) e tratamento, com quatro níveis (10 mW, 40 mW, CL/PL, CL/ST). Cada valor foi analisado de acordo com os respectivos postos, os quais foram obtidos pela ordenação dos dados em ordem crescente, dentro de cada nível (3, 5 e 7) do fator dias (considerado como Bloco no delineamento). (ANEXO C)

A estatística de teste é dada por Hollander & Wolfe (1999) (ANEXO C).

As hipóteses a serem testadas são:

$$H_o : \tau_1 = \tau_2 = \tau_3 = \tau_4 \text{ (os efeitos dos 4 tratamentos são iguais)}$$

contra

$H_1 : \tau_1, \tau_2, \tau_3 \text{ e } \tau_4 \text{ não são todos iguais}$  (no mínimo 2 tratamentos não têm efeitos iguais).

Se hipótese de igualdade dos efeitos de tratamentos fosse rejeitada, ou seja, se houvesse ao menos dois tratamentos com diferença significativa nos efeitos, aplicava-se um Teste de Comparações Múltiplas, para determinar quais tratamentos (10 mW, 40 mW, CL/PL, CL/ST) diferiram entre si.

Em outro momento, foi fixado o período de tratamento (3, 5 e 7 dias) e foi feita a mesma análise para a contagem de vasos, porém considerando os campos (1-5) como blocos de delineamento.

Para identificar se houve diferença estatisticamente significativa entre os dados semiquantitativos em cada fase do tratamento (3, 5 ou 7 dias), fixou-se a fase e foi feito um teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (ANEXO D), comparando os grupos tratados com laser (10 mW/dias, 40 mW/dias) e os grupos CL/PL/dias e CL/ST/dias.

Em alguns casos, o teste de Kruskal-Wallis rejeitou  $H_0$ , porém não foi capaz de determinar quais grupos seriam estatisticamente diferentes. Nesses dados, foi aplicado o teste paramétrico ANOVA e utilizando o teste Bonferroni para as comparações múltiplas (altamente robusto com relação à normalidade) para confirmar os resultados, após a verificação da homocedasticidade (ANEXO E).

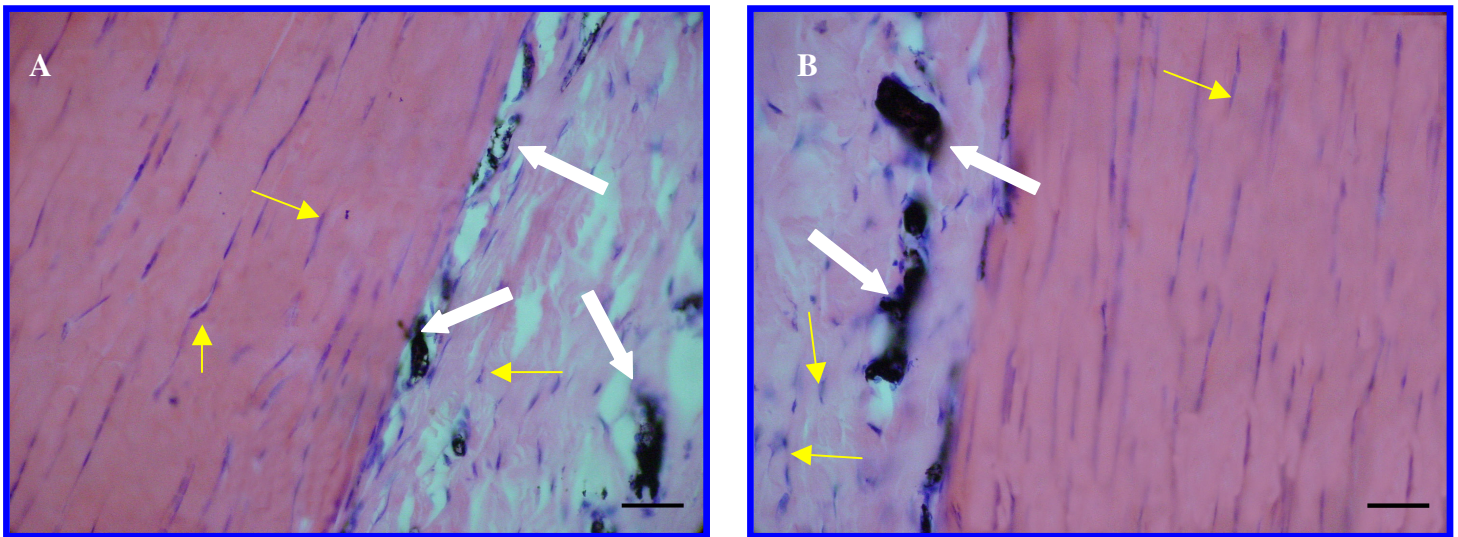
## **5. RESULTADOS**

## 5.1. ANÁLISE QUALITATIVA

A análise qualitativa realizada revelou que grande maioria dos vasos sanguíneos dos tendões localiza-se na região peritendínea (FIGURA 12 A e B), sendo que há mínima quantidade no meio do tecido.

O tendão calcâneo normal (FIGURA 12 A e B) consiste em feixes de colágeno organizados com poucos fibroblastos entre eles. Neste tendão, os fibroblastos possuem geralmente aparência com pouco citoplasma entre os feixes adjacentes de colágeno e o núcleo destas células variam consideravelmente em tamanho.

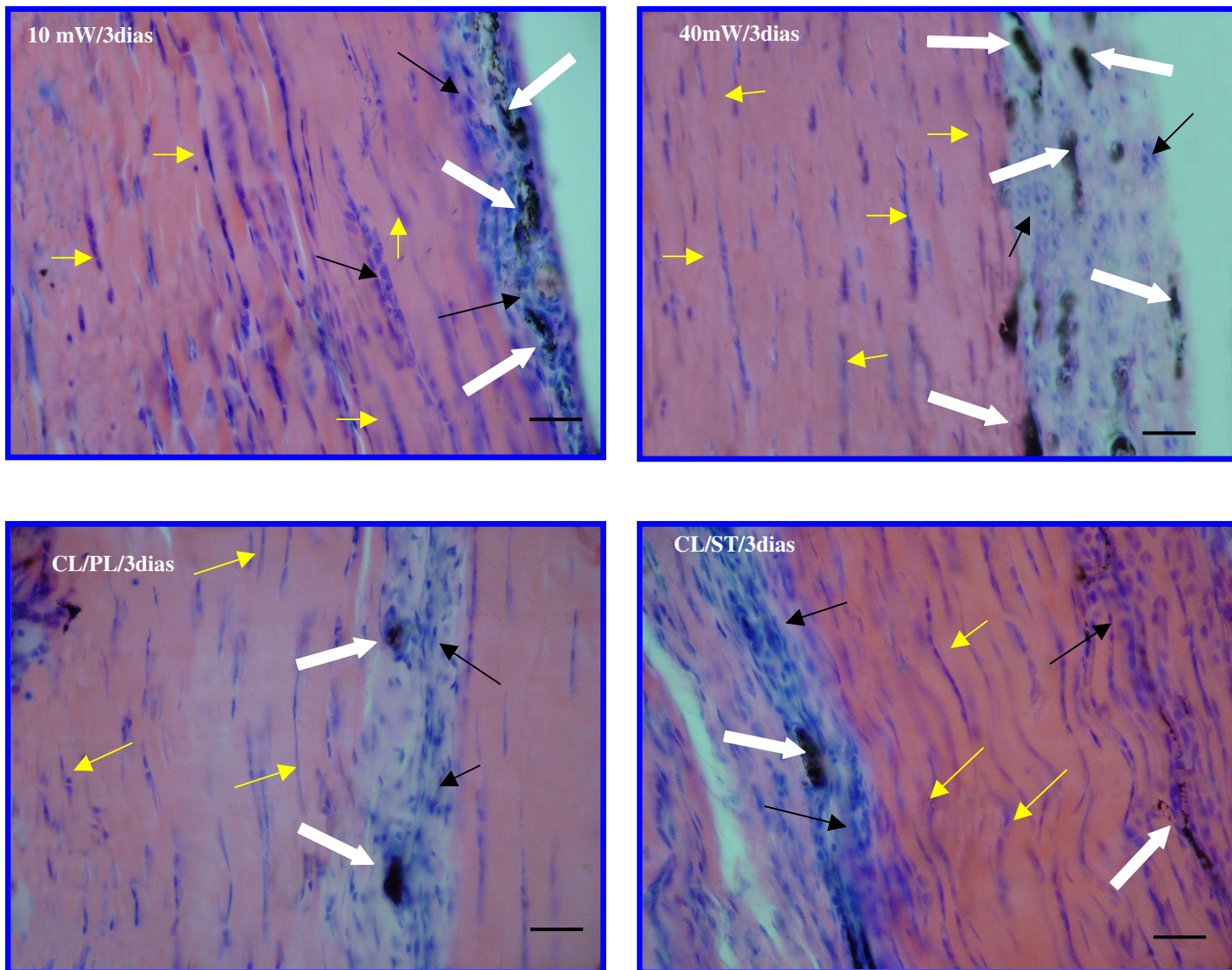
Já o tendão lesionado possui características diferentes destas do tecido normal. A infiltração de grande quantidade de células polimorfonucleares e mononucleares, bem como um aumento na quantidade de fibroblastos com forma e características diferentes pode ser vista nos períodos iniciais após a lesão.



**FIGURA 12 A e B:** Fotomicrografia do tendão calcâneo normal, sem lesão, mostrando os vasos sanguíneos na região peritendínea (seta branca) e os fibroblastos ao longo do tendão (seta amarela). Coloração HE. (barra = 37,88  $\mu\text{m}$ )



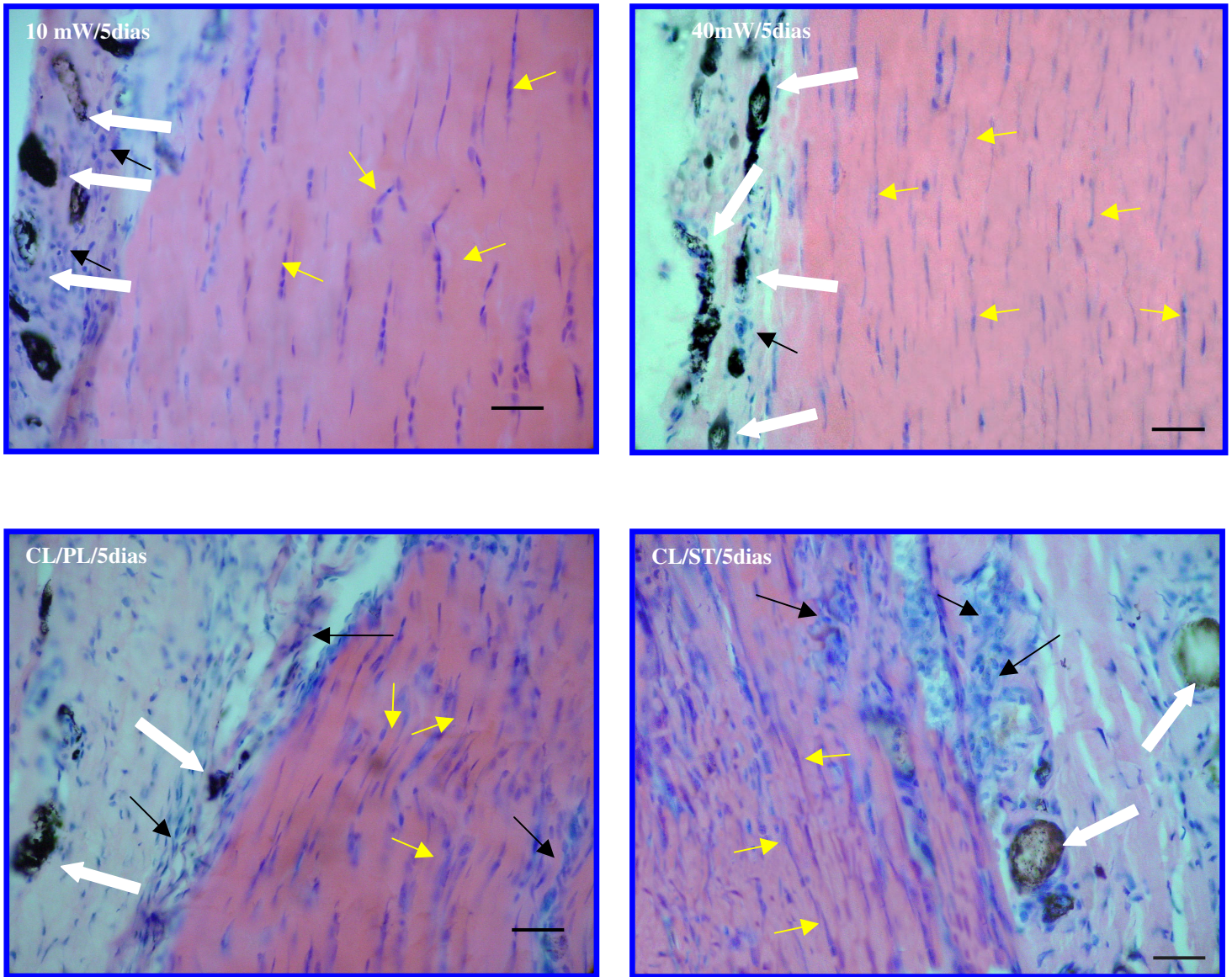
Na FIGURA 13 pode ser observada a presença de vasos sanguíneos nos tendões (seta branca) após 3 dias de tratamento, através da coloração em preto efetuada pela técnica com a injeção de tinta nanquim. Nota-se uma maior quantidade de pontos pretos, ou seja, de vasos sanguíneos, no subgrupo de 40 mW/3dias em relação aos demais.



**FIGURA 13:** Fotomicrografia do tendão calcâneo direito após lesão parcial, mostrando a presença de vasos sanguíneos (seta branca). **10 mW/3dias:** Subgrupo tratado com laser de 10 mW durante 3 dias. **40 mW/3dias:** Subgrupo tratado com laser de 40 mW durante 3 dias. **CL/PL/3dias:** Subgrupo submetido ao efeito placebo durante 3 dias. **CL/ST/3dias:** Subgrupo lesionado e não tratado durante 3 dias. Coloração HE. Seta amarela = fibroblastos. Seta preta: infiltrado inflamatório (barra = 37,88  $\mu$ m).



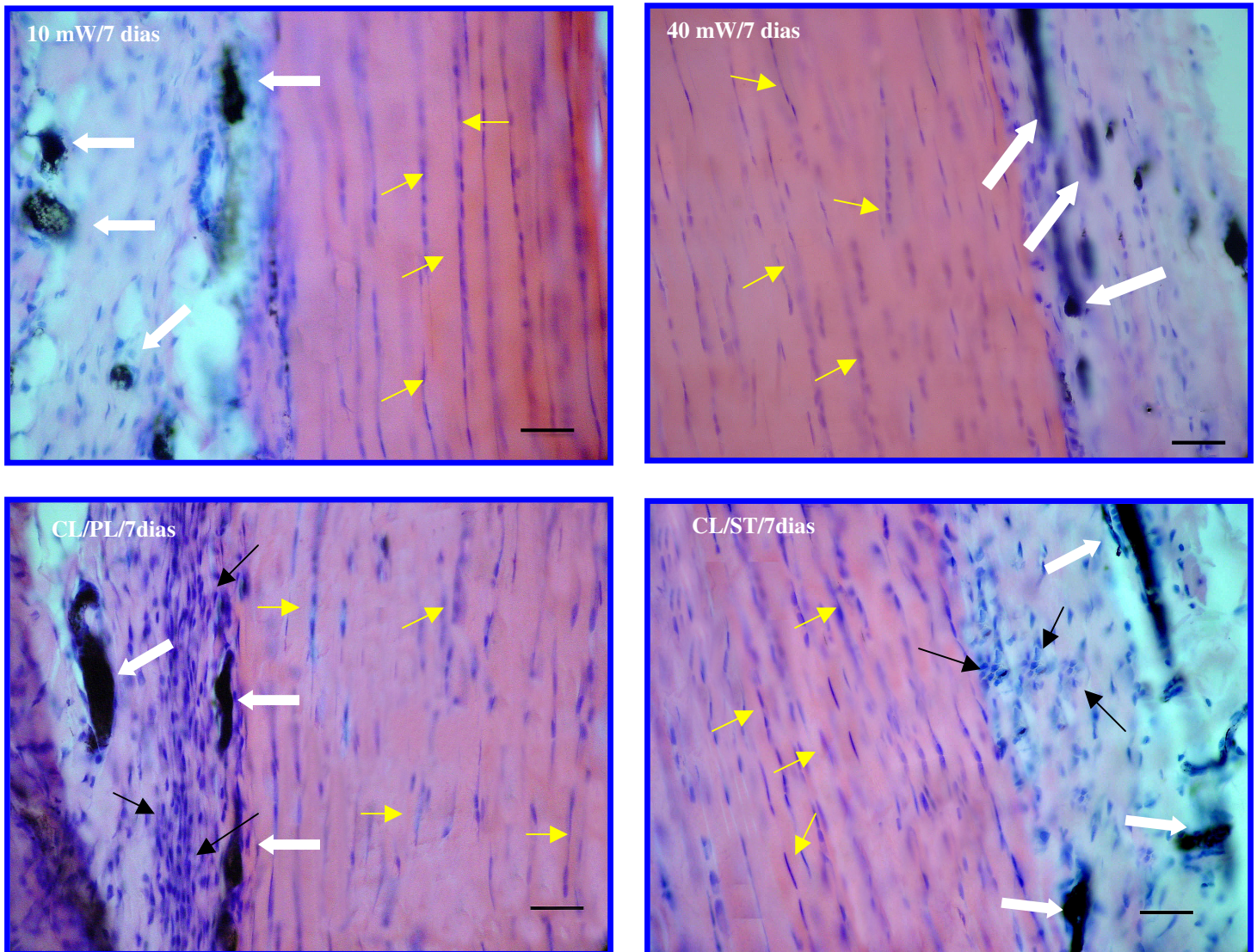
A FIGURA 14 evidencia que após 5 dias de tratamento, ambos subgrupos irradiados (10 mW/5dias e 40 mW/5dias) apresentaram quantidade semelhante de vasos. Os subgrupos não irradiados mostraram menor vascularização e infiltrado inflamatório em grande quantidade (seta preta).



**FIGURA 14:** Fotomicrografia do tendão calcâneo direito após lesão parcial, mostrando a presença de vasos sanguíneos (seta branca), fibroblastos (seta amarela) e infiltrado inflamatório (seta preta). **10 mW/5dias.** Subgrupo tratado com laser de 10 mW durante 5 dias. **40 mW/5dias:** Subgrupo tratado com laser de 40 mW durante 5 dias. **CL/PL/5dias:** Subgrupo submetido ao efeito placebo durante 5 dias. **CL/ST/5dias.** Subgrupo não tratado durante 5 dias. Coloração HE. (barra = 37,88  $\mu$ m)



A FIGURA 15 mostra os subgrupos CL/PL/7dias e CL/ST/7dias apresentando menor quantidade de vasos sanguíneos em relação aos demais, com presença de infiltrado inflamatório no subgrupo CL/ST/7dias. Os grupos irradiados evidenciaram um aspecto semelhante em relação à vascularização. O subgrupo 40 mW/7dias, apresentou quantidade de vasos sanguíneos menor do que visto a 5 dias, sendo próximo do tendão normal, porém ainda maior que os subgrupos controle.



**FIGURA 15:** Fotomicrografia do tendão calcâneo direito após lesão parcial, mostrando a presença de vasos sanguíneos (seta branca), fibroblastos (seta amarela), infiltrado inflamatório (seta preta). **10 mW/7dias:** Subgrupo tratado com laser de 10 mW durante 7 dias. **40 mW/7dias:** Subgrupo tratado com laser de 40 mW durante 7 dias. **CL/PL/7dias:** Subgrupo submetido ao efeito placebo durante 7 dias. **CL/ST/7dias:** Subgrupo não tratado durante 7 dias. Coloração HE. (barra = 37,88  $\mu$ m)

A análise qualitativa dos grupos que foram lesionados e tratados durante 3 dias, não evidenciou organização de colágeno em nenhum dos subgrupos. Esta começou a ser vista nos subgrupos irradiados a partir do 5º dia de tratamento, especialmente o de 40 mW/5dias, com o início do alinhamento dos feixes de colágeno intercalados com os fibroblastos no eixo longitudinal do tendão. Nesta fase, os fibroblastos foram vistos mais alinhados e alongados nos grupos irradiados com laser (10 mW/5dias e 40 mW/5dias).

Após 7 dias os grupos tratados com laser 10 mW e 40 mW, já mostravam uma certa organização das fibras colágenas e há pouco infiltrado inflamatório comparado com os subgrupos controle CL/PL/7dias e CL/ST/7dias.

## **5.2. AVALIADORES**

A análise estatística, através do coeficiente de correlação de Pearson, dos dados fornecidos pelos dois avaliadores (AV1 e AV2), (independentemente do tipo de classificação) apresentou altas correlações, com alta significância ( $p = 0,000$ ), indicando alta concordância entre os avaliadores. Portanto, a descrição dos resultados das análises a seguir refere-se aos dados de um deles, escolhido aleatoriamente.

Para verificar se houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados, foi necessária a aplicação de um teste de Análise de Variância Não-paramétrica.

O teste rejeitou a hipótese de igualdade em grande parte dos grupos analisados. O nível de significância refere-se à probabilidade de rejeitar a hipótese inicial, dado que ela é verdadeira. Portanto, quanto menor o p valor, maior é a evidência de

diferença entre os grupos (populações), neste caso considerando o p valor como 0,005 (ANEXO C - TABELA 8).

A partir daí, foi realizado o teste de Comparações Múltiplas, com o objetivo de identificar quais grupos diferiram entre si, fixando-se inicialmente os itens e campos e posteriormente, os períodos de tratamento (3, 5 ou 7 dias).

### 5.3. ANÁLISE QUANTITATIVA: NEOVASCULARIZAÇÃO

As médias, medianas e desvios padrões dos dados obtidos para a contagem dos vasos estão organizados na TABELA 3 abaixo:

**TABELA 3: Medidas descritivas dos dados obtidos em relação à contagem de vasos sanguíneos**

	10mW	40mW	CL/PL	CL/ST	10mW	40mW	CL/PL	CL/ST	10mW	40mW	CL/PL	CL/ST
	3dias	3dias	3dias	3dias	5dias	5dias	5dias	5dias	7dias	7dias	7dias	7dias
<b>Média</b>	8,250	11,325	7,100	6,675	9,200	9,225	5,850	5,975	11,150	9,425	6,425	5,475
<b>Mediana</b>	8,000	11,000	7,000	6,000	8,500	8,000	5,000	6,000	11,000	9,000	7,000	6,000
<b>Máximo</b>	15,000	19,000	12,000	12,000	16,000	16,000	13,000	11,000	25,000	16,000	11,000	8,000
<b>Mínimo</b>	4,000	2,000	3,000	3,000	5,000	5,000	3,000	3,000	1,000	4,000	2,000	3,000
<b>DP</b>	2,295	3,452	0,312	0,331	0,459	0,463	0,371	0,274	0,704	0,437	0,356	0,199

#### 5.3.1. Análise dos campos

A TABELA 4 fornece os resultados do teste de comparações múltiplas em relação aos tratamentos fixando os campos, onde se observa que para uma taxa de erro experimental  $\alpha=0,05$ ,  $St_b-St_a \geq 20,871$  e para  $\alpha=0,01$ ,  $St_b-St_a \geq 25,296$ , para que  $t_a \neq t_b$  (vide ANEXO C).

**TABELA 4: Resultados das correlações entre cada grupos com relação à contagem de vasos sanguíneos em cada campo de análise.**

	CAMPO 1	CAMPO 2	CAMPO 3	CAMPO 4	CAMPO 5
<b>10 mWx40mW</b>	2,188 < 20,871	9,438 < 20,871	6,750 < 20,871	14,563 < 20,871	3,063 < 20,871
<b>10 mWxCL/PL</b>	29,812 > 20,871 **	27,750 > 20,871 **	25,375 > 20,871 **	21,875 > 20,871 *	28,188 > 20,871 **
<b>10mWxCL/ST</b>	33,125 > 20,871 **	31,187 > 20,871 **	33,375 > 20,871 **	21,187 > 20,871 *	35,500 > 20,871 **
<b>40mWxCL/PL</b>	32,000 > 20,871 **	37,188 > 20,871 **	32,125 > 20,871 **	36,438 > 20,871 **	25,125 > 20,871 *
<b>40mWxCL/ST</b>	35,313 > 20,871 **	40,625 > 20,871 **	40,125 > 20,871 **	35,750 > 20,871 **	32,437 > 20,871 **
<b>CL/PTxCL/ST</b>	3,313 < 20,871	3,437 < 20,871	8,000 < 20,871	0,688 < 20,871	7,312 < 20,871

\* estatisticamente significativo à  $p < 0,05$

\*\* estatisticamente significante à  $p < 0,01$

Observa-se que a uma taxa de erro experimental de 1%, para os campos 1,2 e 3, os grupos CL/ST apresentaram medianas diferentemente significativas em relação aos grupos 10 mW e 40mW e os grupos CL/PL em relação aos grupos 10 mW e 40mW.

O campo 4 evidenciou diferença estatisticamente significativa dos grupos de 40 mW em relação aos grupos CL/PL e CL/ST a uma taxa de erro experimental de 1% e a de 5%, os grupos de 10 mW em relação aos grupos CL/PL e CL/ST.

A análise feita com as medianas dos dados do campo 5, evidenciaram que, a uma taxa de erro experimental de 1%, os grupos de 40 mW foram diferentes estatisticamente em relação aos grupos CL/ST e os grupos de 10 mW em relação os grupos CL/PL e CL/ST. Quando foi considerada a taxa de 5%, o grupo de 40 mW foi diferente estatisticamente do grupo CL/PL.

As comparações feitas entre os grupos de 10 mW e 40 mW, e entre CL/PL e CL/ST não mostraram diferenças estatisticamente significativas à uma taxa de erro experimental de 5%, sendo, portanto considerado que, a esse valor, são considerados iguais estatisticamente em relação à contagem dos vasos.

### 5.3.2. Análise dos dias de tratamento

A TABELA 5 fornece os resultados do teste de comparações múltiplas em relação aos tratamentos fixando os campos, onde se tem que, para uma taxa de erro experimental  $\alpha=0,05$ ,  $Stb-Sta \geq 26,942$  e para  $\alpha=0,01$ ,  $Stb-Sta \geq 32,653$ , para que  $t_a \neq t_b$  (vide ANEXO C).

**TABELA 5: Resultados das correlações entre os grupos em cada fase com relação à contagem dos campos de análise**

	3 dias	5dias	7 dias
<b>10 mWx40mW</b>	44,688 >26,942**	1,937 < 26,942	12,812 < 26,942
<b>10 mWxCL/PL</b>	18,375 < 26,942	58,812 > 26,942**	55,875 > 26,942**
<b>10mWxCL/ST</b>	28,187 > 26,942*	52,750 >26,942**	74,437 > 26,942**
<b>40mWxCL/PL</b>	63,063 > 26,942**	56,875 > 26,942**	43,063 > 26,942**
<b>40mWxCL/ST</b>	72,875 > 26,942**	50,813 >26,942 **	61,625 >26,942 **
<b>CL/PTxCL/ST</b>	9,812 < 26,942	6,062 < 26,942	18,562 < 26,942

\* estatisticamente significativo à  $p < 0,05$

\*\* estatisticamente significante à  $p < 0,01$

Observa-se que o subgrupo de 40 mW/3dias mostrou uma diferença altamente significativa (1%) quando comparado com os subgrupos 10 mW/3dias, CL/PL/3dias e CL/ST/3dias. O subgrupo 10 mW/3dias, apresentou mediana diferentemente significativa a uma taxa de erro experimental de 5% com relação ao subgrupo CL/ST/3dias.

Após 5 dias de tratamento, a uma taxa de erro experimental de 1%, o subgrupo 40 mW/5dias, apresentou mediana diferentemente significativa em relação aos grupos CL/PL/5dias e CL/ST/5dias, o mesmo ocorrendo com o grupo de 10 mW/5dias em relação aos grupos CL/PL/5dias e CL/ST/5dias.

As respostas obtidas com os grupos submetidos ao tratamento durante 7 dias após a lesão foram semelhantes às obtidas após 5 dias, conforme descrito na TABELA 5 acima.

#### 5.4. ANÁLISE SEMIQUALITATIVA

Após a substituição das classificações qualitativas pelos valores considerados na TABELA 2 (pág.77), o teste de comparações múltiplas forneceu os resultados mostrados na TABELA 6, para uma taxa de erro experimental  $\alpha=0,05$ ,  $St_b - St_a \geq 20,871$  e para  $\alpha=0,01$ ,  $St_b - St_a \geq 25,296$ , para que  $t_a \neq t_b$  (vide ANEXO C).

**TABELA 6: Resultados das correlações entre os grupos considerando cada item (presença de células polimorfonucleares, mononucleares, organização de colágeno e neovascularização)**

	ÍTEM 1	ÍTEM 2	ÍTEM 3	ÍTEM 4
<b>10 mWx40mW</b>	6,812 < 20,872	3,875 < 20,871	2,500 < 20,871	3,375 < 20,871
<b>10 mWxCL/PL</b>	1,312 < 20,872	21,125 > 20,871*	27,687 > 20,871**	45,313 > 20,871**
<b>10mWxCL/ST</b>	22,812 > 20,872*	12,750 < 20,871	30,812 > 20,871**	47,375 > 20,871**
<b>40mWxCL/PL</b>	5,500 < 20,872	17,250 < 20,871	25,187 > 20,871*	41,938 > 20,871**
<b>40mWxCL/ST</b>	29,687 > 20,872**	16,625 < 20,871	28,312 > 20,871**	44,000 > 20,871**
<b>CL/PTxCL/ST</b>	24,187 > 20,872*	33,875 > 20,871**	3,125 < 20,871	2,062 < 20,871

\* estatisticamente significativo à  $p < 0,05$

\*\* estatisticamente significante à  $p < 0,01$



### **ITEM 1: presença de células polimorfonucleares**

Os grupos CL/ST mostraram diferença significativas nas medianas em relação aos grupos de 10 mW e CL/PL a uma taxa de erro experimental de 5% e com os grupos de 40 mW a uma taxa de erro experimental de 1%.

### **ITEM 2: presença de células mononucleares**

Neste item, observa-se que, a uma taxa de erro experimental de 5%, o tratamento CL/PL apresentou mediana diferentemente significativa em relação aos grupos de 10 mW e a uma taxa de 1%, os grupos CL/ST em relação aos grupos CL/PL.

### **ITEM 3: presença de organização de colágeno**

A uma taxa de erro experimental de 1% os grupos tratados com laser de 10 mW e 40 mW apresentaram medianas diferentemente significativas em relação aos grupos CL/ST e os grupos CL/PL em relação ao tratamento com 10 mW e a uma taxa de erro experimental de 5% os grupos de 40 mW em relação aos grupos CL/PL quando foi considerada a organização de colágeno.

### **ITEM 4: Presença de Neovascularização**

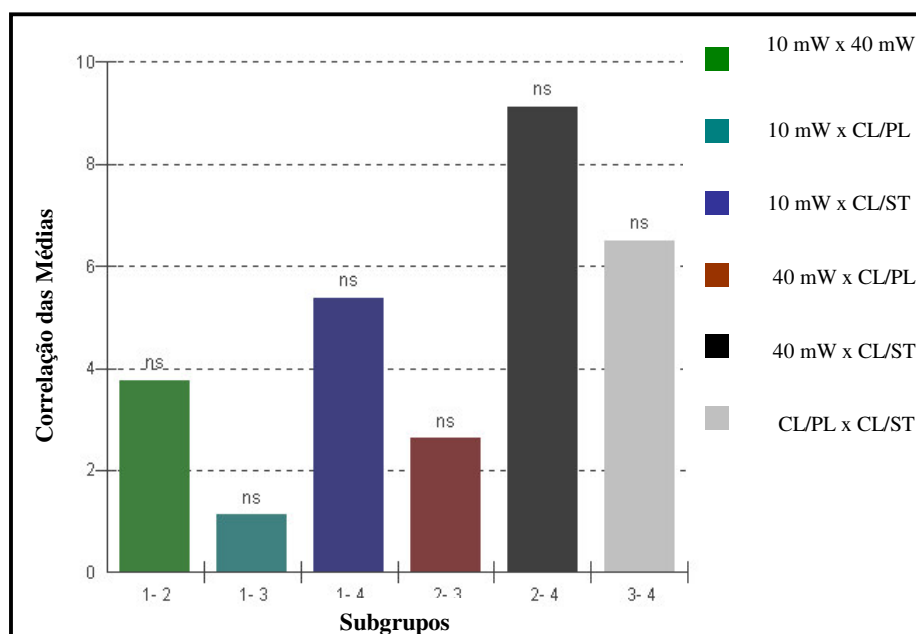
Para a análise qualitativa, sobre a presença de novos vasos sanguíneos, foi observado que a uma taxa de erro experimental de 1%, os grupos que foram submetidos ao tratamento com laser (10mW e 40mW), apresentaram mediana diferentemente significativa em relação aos grupos CL/ST e CL/PL.

Para determinar os efeitos de cada item nas diferentes fases do tratamento, foi feito o teste de Kruskal-Wallis e Bonferroni quando necessário, fixando os dias (3, 5 e 7) e cada item analisado. Os resultados deste teste não identificaram diferença significativa

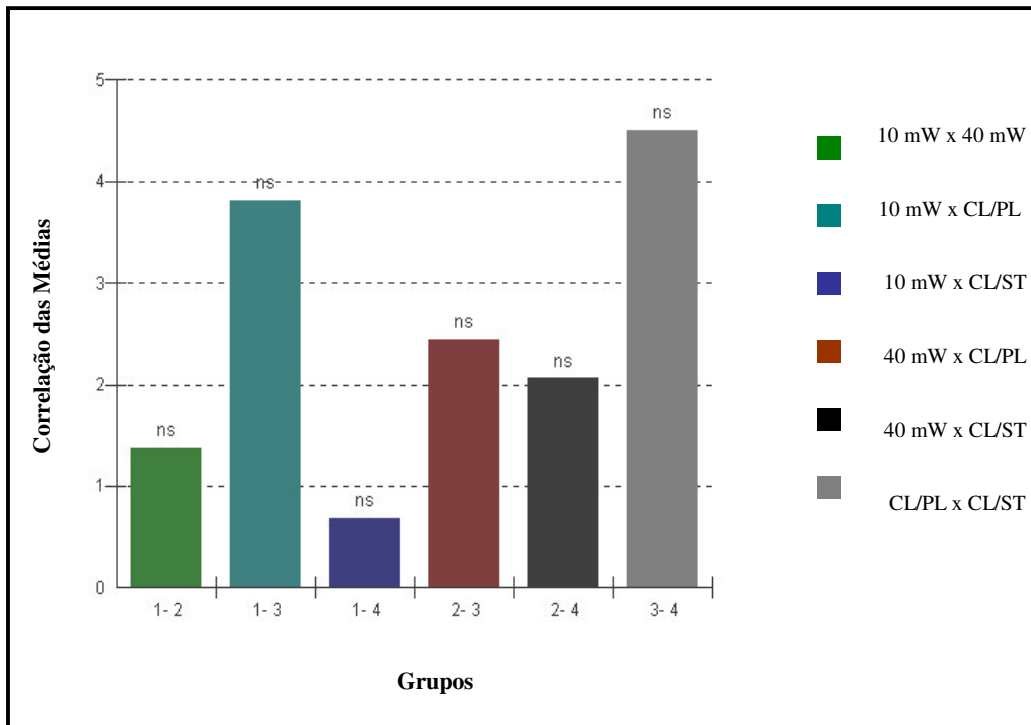


entre os subgrupos tratados durante 3 dias para os itens 1,2 e 3 e para os subgrupos tratados durante 7 dias nos itens 1 e 2 . Os demais apresentaram diferenças significativas.

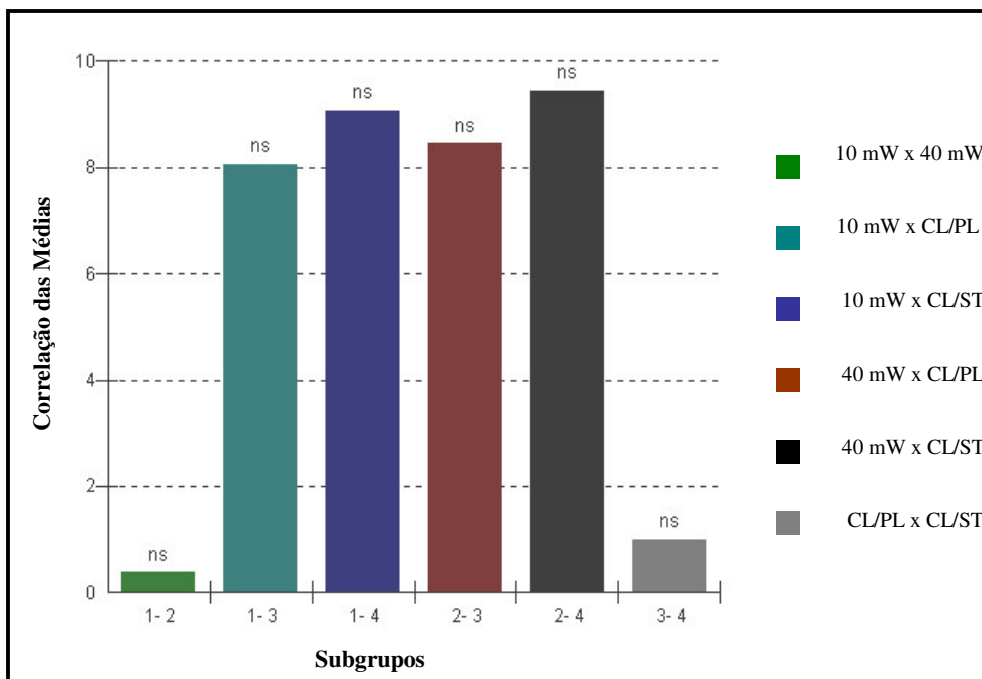
As FIGURAS 16-27 indicam a correlação feita entre cada grupo durante os dias de tratamento para a presença de células inflamatórias polimorfonucleares, mononucleares, organização de colágeno e neovascularização.



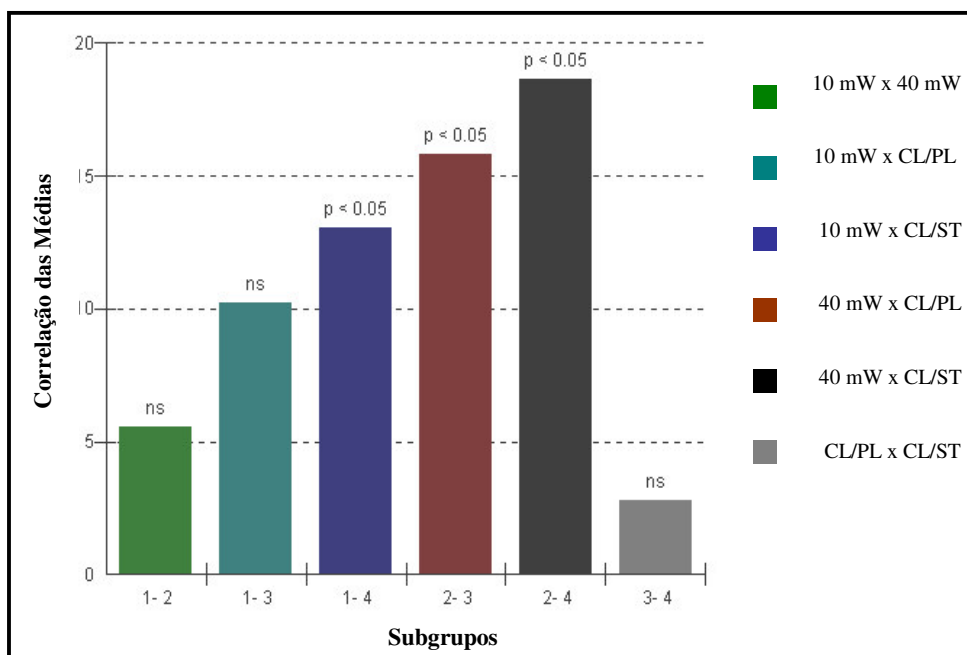
**FIGURA 16:** Gráfico da correlação das médias dos subgrupos para o item 1 (presença de células inflamatórias polimorfonucleares) após 3 dias. Teste Kruskal Wallis. (ns = não significativo)



**FIGURA 17:** Gráfico da correlação das médias dos subgrupos para o item 2 (presença de células inflamatórias mononucleares) após 3 dias. Teste Kruskal Wallis. (ns = não significativo)



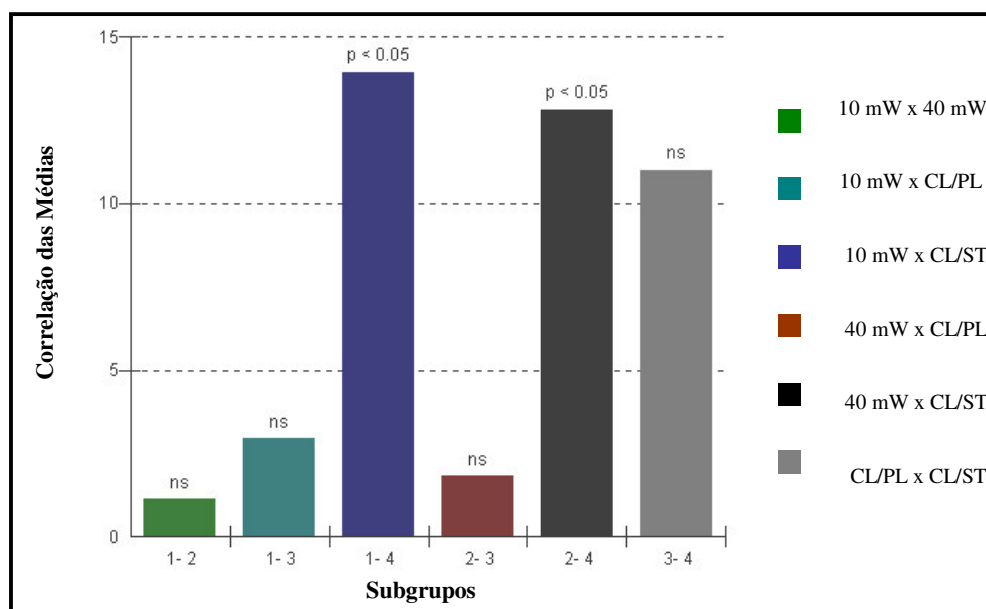
**FIGURA 18:** Gráfico da correlação das médias dos subgrupos para o item 3 (presença de organização de colágeno) após 3 dias. Teste Kruskal Wallis. (ns = não significativo)



**FIGURA 19:** Gráfico da correlação das médias dos subgrupos para o item 4 (presença de neovascularização) após 3 dias. Teste Kruskal Wallis. (ns = não significativo e  $p < 0,05$  = significativo)

Apenas o item 4, mostrado na FIGURA 19 evidenciou, através do teste, que os subgrupos tratados com laser com potência de saída de 40 mW foram diferentes estatisticamente dos subgrupos CL/PL/3dias e CL/ST/3dias e o subgrupo 10 mW/3dias apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao subgrupo CL/ST/3dias.

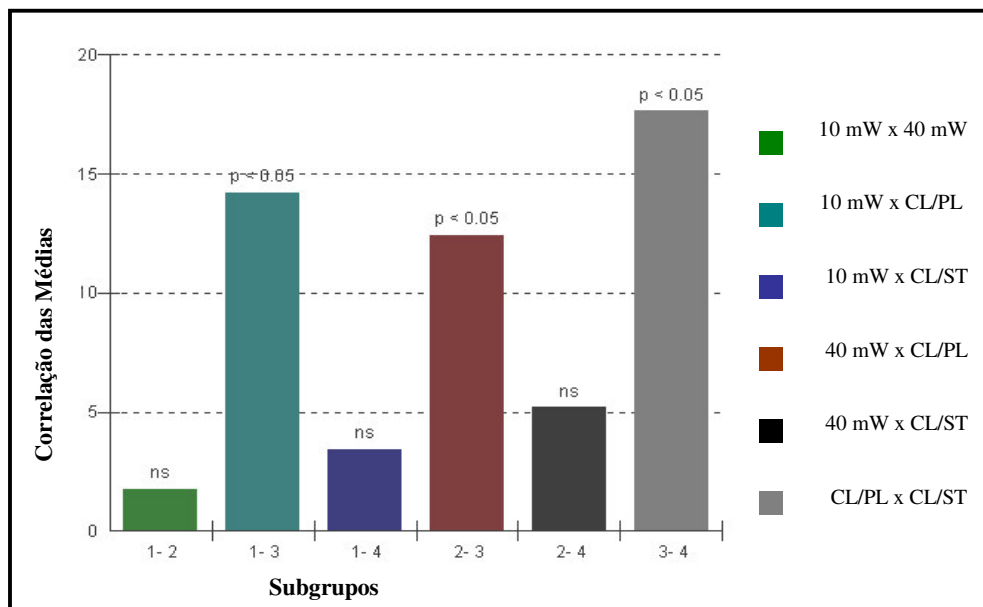
As FIGURAS 20, 21, 22 e 23 a seguir mostram as correlações feitas entre os grupos em relação aos itens analisados após 5 dias de tratamento.



**FIGURA 20:** Gráfico da correlação das médias dos subgrupos para o item 1 (presença de células inflamatórias polimorfonucleares) após 5 dias. Teste Kruskal Wallis. (ns = não significativo e  $p < 0,05$  = significativo)

A FIGURA 20 mostra que os subgrupos tratados com laser de 10 mW e 40 mW apresentaram diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em relação ao subgrupo CL/ST/5dias quando comparada a presença de células polimorfonucleares 5 dias após a lesão.

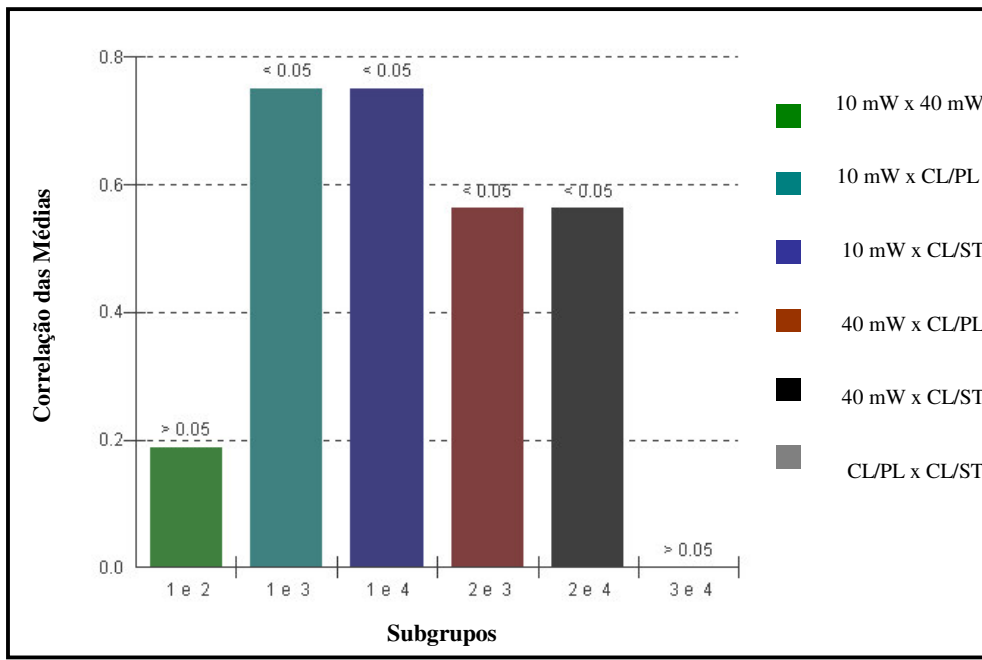
Já em relação à presença de células mononucleares, os subgrupos tratados com laser com 10 mW e 40 mW mostraram-se diferentes estatisticamente do subgrupo CL/PL/5dias e este em relação ao subgrupo CL/ST/5dias ( $p < 0,05$ ) (FIGURA 21).



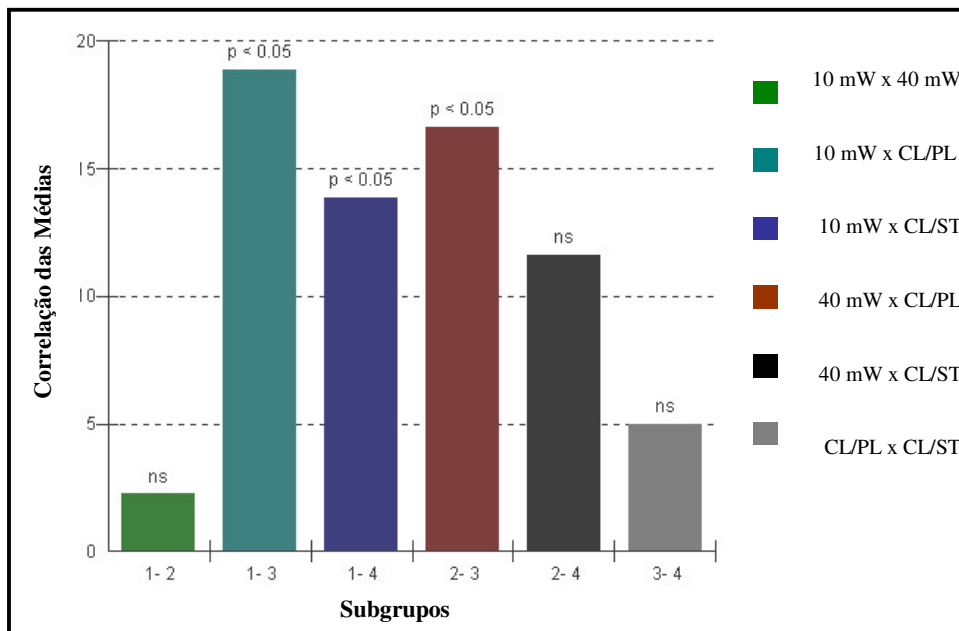
**FIGURA 21:** Gráfico da correlação das médias dos subgrupos para o item 2 (presença de células inflamatórias mononucleares) após 5 dias. Teste Kruskal Wallis. (ns = não significativo e  $p < 0,05$  = significativo)

A FIGURA 22 a seguir apresenta as correlações entre os grupos considerando a organização de colágeno. Nota-se que os subgrupos tratados com laser (10 mW/5dias e 40 mW/5dias) apresentaram diferenças em relação aos subgrupos CL/PL/5dias e CL/ST/5dias à  $p < 0,05$ .

Em relação à neovascularização, a FIGURA 23 mostra que os subgrupos tratados com laser foram estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) quando comparados com o subgrupo CL/PL/5dias e o subgrupo irradiado com 10 mW mostrou diferença em relação ao CL/ST/5dias, 5 dias após a lesão.



**FIGURA 22:** Gráfico da correlação das médias dos subgrupos para o item 3 (presença de organização de colágeno) após 5 dias. Teste Bonferroni. ( $p < 0,05$  = significativo e  $p > 0,05$  = não significativo)

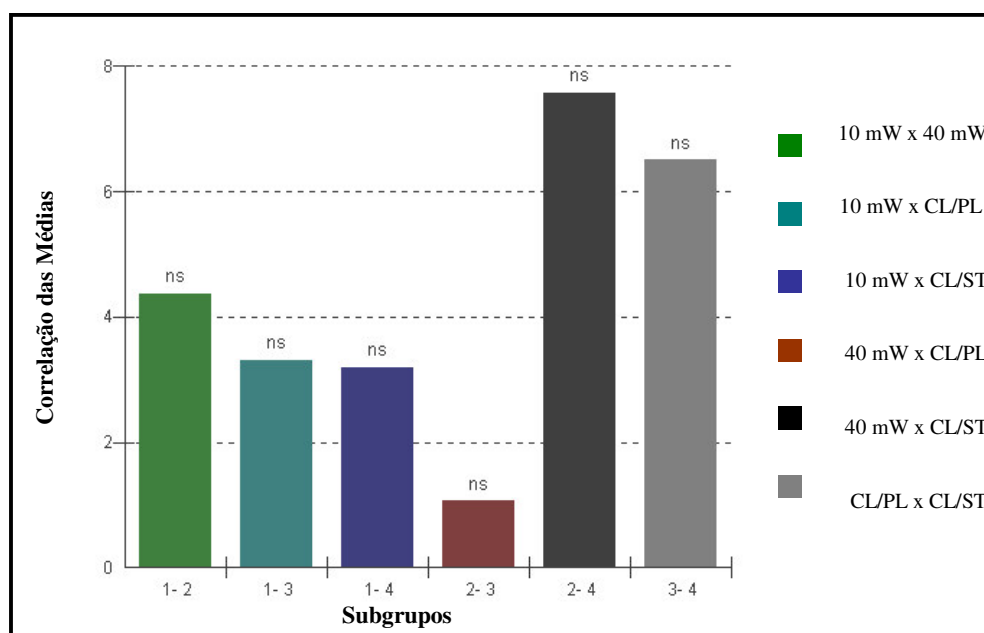


**FIGURA 23:** Gráfico da correlação das médias dos grupos para o item 4 (presença de neovascularização) após 5 dias. Teste Kruskal Wallis. (ns = não significativo e  $p < 0,05$  = significativo)

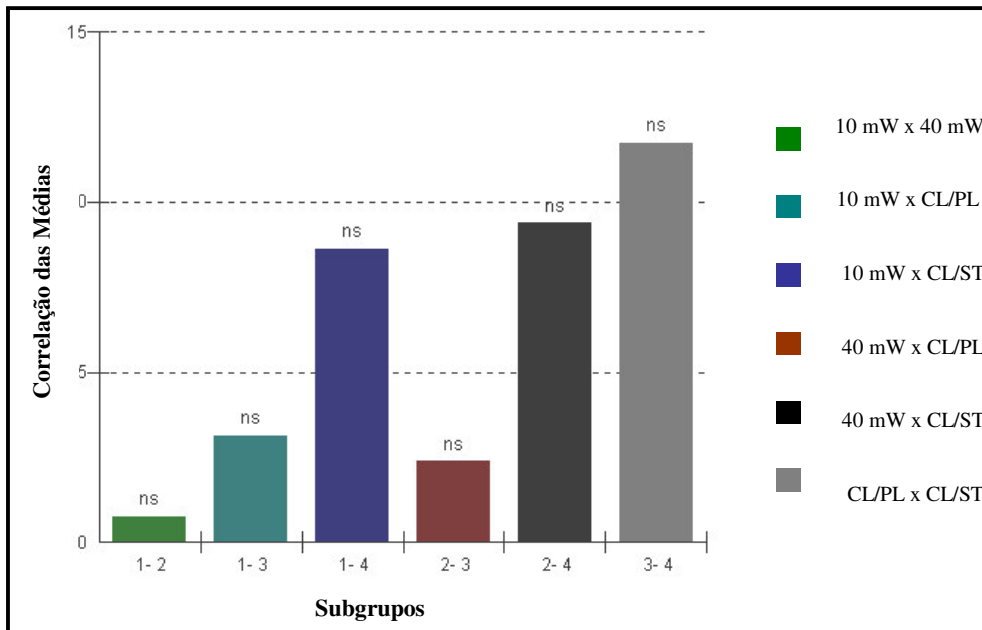
Nas comparações feitas com os subgrupos após 7 dias de lesão, foram obtidos os resultados demonstrados pelas FIGURAS 24, 25, 26 e 27.

As FIGURAS 24 e 25 mostram que não houve diferenças significativas entre os subgrupos à 5% ( $p < 0,05$ ) em relação à presença de células inflamatórias polimorfonucleares e mononucleares.

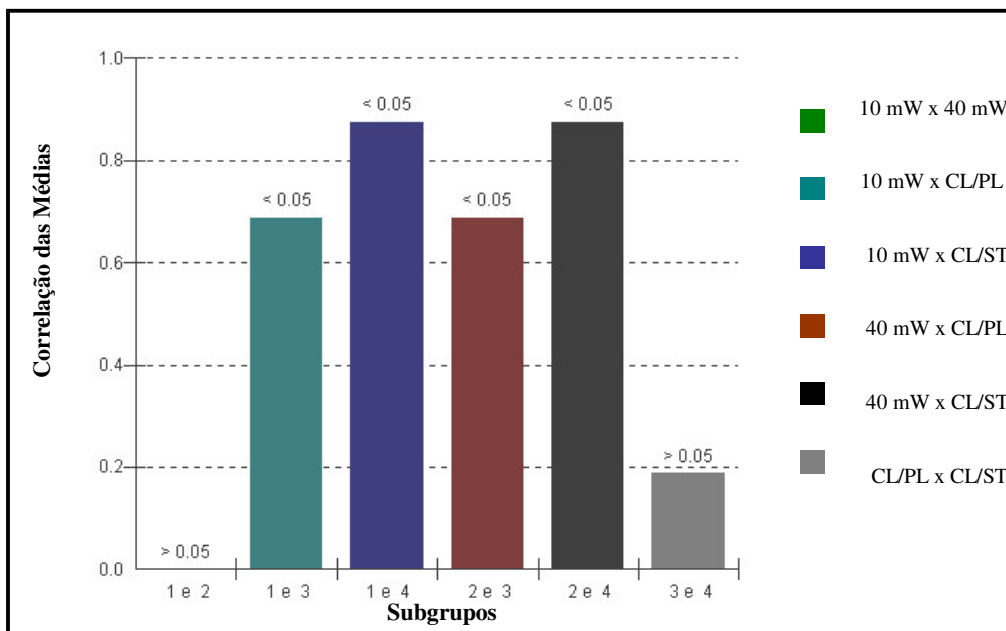
Quando foi comparada a organização de colágeno nesta fase, observou-se que os subgrupos 10 mW/7dias e 40 mW/7dias foram diferentes estatisticamente dos subgrupos CL/PL/7dias e CL/ST/7dias ( $p < 0,05$ ) (FIGURA 26).



**FIGURA 24:** Gráfico da correlação das médias dos subgrupos para o item 1 (presença de células inflamatórias polimorfonucleares) após 7 dias. Teste Kruskal Wallis. (ns = não significativo)



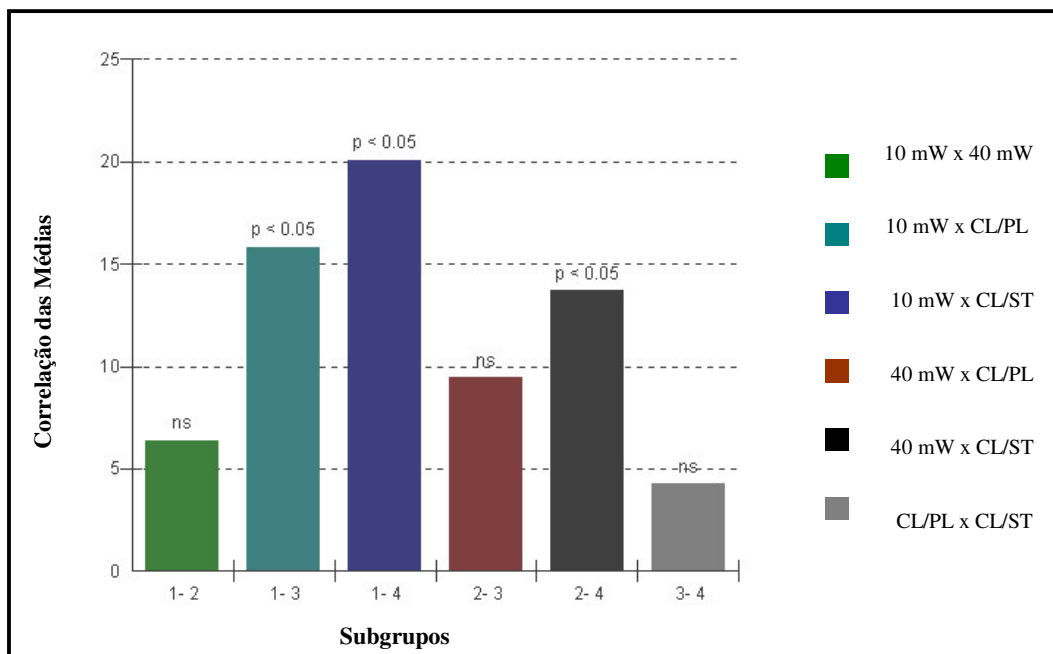
**FIGURA 25:** Gráfico da correlação das médias dos subgrupos para o item 2 (presença de células inflamatórias mononucleares) após 7 dias. Teste Kruskal Wallis. (ns = não significativo)



**FIGURA 26:** Gráfico da correlação das médias dos subgrupos para o item 3 (presença de organização de colágeno) após 7 dias. Teste Bonferroni. ( $p < 0,05$  = significativo e  $p > 0,05$  = não significativo)



Em relação à neovascularização, a FIGURA 27 evidencia diferença entre os grupos, sendo que os subgrupos 10 mW/7dias apresentaram diferenças em relação aos subgrupos CL/PL/7dias e CL/ST/7dias e o de 40 mW/ 7dias em relação ao CL/ST/7dias.



**FIGURA 27:** Gráfico da correlação das médias dos subgrupos para o item 4 (presença de neovascularização) após 7 dias. Teste Kruskal Wallis. (ns = não significativo e p< 0,05 = significativo)

## **6. DISCUSSÃO**

## 6.1. DA METODOLOGIA

As exigências da sociedade moderna para os padrões apropriados de ética, restringem rigorosamente a possibilidade de utilização de modelos humanos para a realização de alguns tipos de pesquisas. Como consequência, modelos alternativos são necessários, levando à utilização de animais (KOEKE, 2003).

O rato é a espécie animal mais utilizada para procedimentos experimentais. A facilidade de obtenção desses animais em laboratório permite o emprego de uma amostragem maior por grupo, além de resultados em períodos de tempo mais curtos, devido ao acelerado metabolismo dos ratos em relação aos demais animais utilizados em experimentos. Foi selecionado rato macho devido às variações no ciclo hormonal das fêmeas.

O tendão calcâneo foi utilizado pela facilidade de acesso e em decorrência da grande incidência de lesões nessa região, além de facilitar a execução da técnica experimental em função da ampla forma anatômica.

O modelo experimental é essencial para a aquisição de resultados reprodutíveis. A grande maioria dos estudos em reparo de lesões tendíneas são feitos a partir de tenotomia induzida (KOEKE, 2003; REDDY et al., 2001; ENWEMEKA & REDDY, 2000; REDDY et al., 1998a, b; STEHNO-BITTEL et al., 1998; GUM et al., 1997; ENWEMEKA, 1991a, b; ENWEMEKA et al., 1990a; ENWEMEKA, 1989b), promovendo ruptura completa das fibras com objetivo de investigar a influência de agentes físicos no processo de reparo.

Entretanto, no presente estudo foi elaborado um modelo experimental a fim de promover rupturas parciais das fibras tendíneas. Várias pesquisas piloto foram

previamente realizadas com o objetivo de padronizar o equipamento para tendões de ratos. A carga e energia suficientes para promover lesão parcial foram estabelecidas através de tentativas aleatórias até que fosse obtido um resultado satisfatório. A análise destes dados foi feita através de um exame de ultra-sonografia e foi constatado que todas as rupturas foram parciais, com variação de tamanho menor que 10 % entre os animais, e ocorreram na região anterior do tendão. Dessa forma, foi determinado como padrão para esta pesquisa a queda de 186 gramas de altura de 20 centímetros com a finalidade de promover lesão parcial do tendão calcâneo.

Considerando a possibilidade de ocorrer algum efeito no processo de reparo devido à tração da perna do animal quando colocado no contensor e do estresse sofrido durante a aplicação, independente deste receber a radiação ou apenas a indução desta, como no grupo placebo, um outro grupo controle foi acrescentado à pesquisa e comparado com os demais, sendo que este sofreria a lesão e não teria nenhum tipo de tratamento.

Como anestesia, utilizou-se a associação de Ketamina<sup>®</sup> e Xilazina<sup>®</sup>, via intraperitoneal. Veterinários indicam essa associação para promover adequada sedação, prolongando o efeito anestésico em animais com metabolismo intenso como os ratos.

A importância em identificar um comprimento de onda adequado para determinado tecido foi mencionada por Labbe et al. (1990), que consideram que cada tipo celular possui diferentes cromóforos e em quantidades distintas, capazes de absorver a radiação.

O comprimento de onda utilizado neste estudo (660 nm) foi determinado de acordo com algumas pesquisas (CARRINHO, 2004; LAAKSO et al., 1993b; REDDY et al., 1998b; YOUNG, 1989), que afirmam que, por ser um tecido superficial, a faixa

vermelha do espectro de irradiação promove melhores resultados ao tendão calcâneo do que a faixa infravermelha que é mais adequada às lesões profundas.

Segundo Karu et al. (1995), a irradiação com laser de 633 nm, aumenta o potencial de membrana mitocondrial e o gradiente de próton transmembrana, induzindo à mudanças nas propriedades ópticas da mitocôndria que levam ao aumento da taxa de ATP e síntese de proteínas. Em 1987, a mesma autora relatou que a irradiação na faixa vermelha do espectro causa um aumento metabólico da célula e tanto o comprimento de onda quanto a dose determinam a intensidade da resposta biológica.

Em relação às potências utilizadas não existem dados conclusivos a esse respeito, dando margem a especulações sobre qual é a ideal para promover o reparo adequado. De acordo com Van Breugel (1992), na maioria dos estudos, a dose é considerada a principal variável com respeito aos efeitos da irradiação laser. Poucos experimentos têm sido feitos para determinar o quanto a densidade de potência do laser pode ser importante.

Tunér & Hode (1999) consideram que com uma alta potência de saída, é possível obter uma alta densidade de potência. Grande parte das pesquisas (KIPSHIDZE et al., 2001; SCHINDL et al., 1999; WEBB et al., 1998; YOUNG et al., 1989) selecionam potências de saída na faixa entre 10 mW e 17 mW e existem poucos dados na literatura na faixa de 30 mW a 50 mW o que levou à escolha de duas potências distintas, uma baixa de 10 mW e outra intermediária de 40 mW, permitindo a comparação de qual destas promoveria melhor resultado.

Segundo Trelles & Mayayo (1992), citados por Tunér & 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  $2,4 \text{ J/cm}^2$ , sugerindo, 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. Esta afirmação favoreceu ainda mais a escolha das diferentes potências de saída para identificar qual é mais efetiva no reparo tendíneo.

O tempo de 10 segundos foi definido por ser o tempo mínimo de aplicação fornecido pelo equipamento utilizado em ambas potências de saída, promovendo aplicação de  $2,5 \text{ J/cm}^2$  com 10 mW e  $10 \text{ J/cm}^2$  com 40 mW.

As aplicações foram feitas através da técnica de contato, em que a fibra óptica foi mantida perpendicular à pele, proporcionando irradiação por fotoestimulação transcutânea em um único ponto correspondente à área da lesão. A escolha dessa técnica obedeceu à teoria de que ao penetrar no tecido o feixe sofre o fenômeno de dispersão, atingindo toda a área lesada e também regiões circunvizinhas à lesão. O tamanho da fibra, relativamente pequeno ( $4 \text{ mm}^2$ ) proporciona a concentração de maior densidade de potência na área tratada, colaborando para a efetividade do tratamento.

Antes e após o procedimento experimental, o equipamento laser foi aferido com a finalidade de se obter máxima confiabilidade em relação aos parâmetros empregados, pois uma vez que a potência de saída da fibra não se iguala ao “*display*” do equipamento, o efeito esperado ao tecido pode estar comprometido. Em ambas aferições, o equipamento apresentou boa calibração, não havendo necessidade de correções.

As análises realizadas em diferentes fases de reparo (3, 5 e 7 dias), foram feitas com objetivo de determinar a possibilidade de aceleração, retardo ou inibição da angiogênese que poderia ser produzida pelo laser nas diferentes potências de saída.

O processo de coloração de vasos sanguíneos foi feito de acordo com algumas pesquisas (ZANTOP et al., 2003; CARR & NORRIS, 1989; SCHATZKER & BRANEMARK, 1969), que investigam a vascularização de tendões normais e lesionados em animais ou cadáveres. A quantidade de tinta injetada foi determinada em estudos piloto prévios, sendo considerado 1,5 mL, o mínimo suficiente para promover a completa coloração dos vasos do tendão calcâneo de ratos. Os vasos foram contados na região peritendínea, pois, após a análise qualitativa, verificou-se que a grande parte da vascularização localizava-se nessa região, evidenciando mínima quantidade de vasos no meio do tecido.

Segundo Schindl et al. (1999), o método de contagem de vasos em campos de igual tamanho através de um vídeo microscópio, representa uma forma útil para quantificar o número de estruturas vasculares.

Alguns cuidados foram levados em conta para evitar indução dos resultados ou influência de alguns fatores. A contagem dos vasos foi feita através de um estudo cego por dois avaliadores sem que tivessem acesso às respostas um do outro. A análise estatística não mostrou diferença significativa entre os dois avaliadores ( $p = 0,000$ ), o que proporcionou maior confiança nos resultados obtidos.

Além desta análise quantitativa, foi também avaliada a qualidade de reparo através de uma escala de classificação de acordo com a pesquisa de Tavares (2002) e os itens selecionados levando-se em conta as fases do processo inflamatório. Neste caso, também não houve diferença estatisticamente significante entre os resultados fornecidos pelos dois avaliadores ( $p = 0.000$ ), confirmando a concordância entre ambos.

Esta análise estatística, confirmando a concordância entre os avaliadores, permitiu a escolha aleatória dos dados de um deles, evitando, desta forma, apresentação de resultados duplicados.

## **6.2. DOS RESULTADOS**

### **6.2.1. Quantitativos: Vascularização**

Os resultados deste trabalho sugerem que a terapia com laser de baixa intensidade com comprimento de onda de 660 nm, aplicada em estágios iniciais após lesão parcial de tendão calcâneo, promove um efeito de aumento na formação de novos vasos quando comparado ao grupo controle.

Após uma revisão bibliográfica na literatura, não foram encontrados trabalhos relatando os efeitos da LLLT na neovascularização *in vivo* do tendão calcâneo após lesão parcial e durante o reparo tecidual normal, podendo ser considerado que esta é provavelmente, a primeira pesquisa a ser desenvolvida com este objetivo.

Há um grande número de trabalhos realizados em relação à vascularização em tendões normais devido ao fato da grande variação da distribuição vascular intra e extratendínea e a anatomia vascular detalhada não ser muito conhecida em muitos tendões humanos. O tendão calcâneo proporciona o melhor conhecimento da vascularização tendínea (JÓZSA & KANNUS, 1997).

Petersen et al. (2003) consideram que os tendões normais de humanos mostram um padrão de baixa vascularização, devido ao baixo requerimento metabólico. No entanto, possuem uma estrutura vascular intra e peritendínea bem organizada. Uma lesão, como as rupturas espontâneas ou traumáticas, destrói esse padrão bem organizado intra e



peritendíneo de vasos. Portanto, a angiogênese – formação de novos vasos sanguíneos a partir de capilares pré-existentes – é um evento necessário para o reparo tendíneo.

Nas áreas de lesão, onde os vasos sanguíneos foram traumáticamente rompidos, a angiogênese cria camadas capilares e tecido de granulação para transportar as células essenciais para a inflamação e síntese de colágeno (PETERSEN et al., 2003). A invasão vascular pode trazer o oxigênio necessário para a sobrevivência da célula e múltiplos fatores de crescimento, além de liberar as células inflamatórias para remover o tecido necrótico (ZHANG et al., 2003).

Devido ao fato de o crescimento capilar ocorrer durante a formação do tecido de granulação e ser acompanhado pelo aumento no número de leucócitos, tem sido sugerido que o início do processo angiogênico deva ser devido à liberação de alguma substância ou substâncias destas células (YOUNG & DYSON, 1990). Os macrófagos também possuem um papel crucial na produção de fatores angiogênicos além de estimular a proliferação de células endoteliais *in vitro* (POLVERINI et al., 1977). De acordo com Baxter (1997), a adição prematura de macrófagos à lesão resulta no crescimento de novos vasos precocemente ao esperado e pode ser demonstrado que o fator de crescimento derivado dos macrófagos pode induzir a angiogênese mesmo em áreas avasculares.

Algumas pesquisas *in vitro* (KIPSHIDZE et al., 2001; AGAIBY et al., 2000) têm sido desenvolvidas com a finalidade de promover estímulos através de agentes físicos para a liberação destes fatores de crescimento responsáveis pela neoformação vascular ou na aplicação das próprias substâncias para acelerar o reparo de diversos tecidos.

Este estudo, não objetivou a análise específica destes fatores ou qualquer análise *in vitro* e sim a contagem dos vasos já formados no tendão com ou sem estímulo do agente físico e no tecido normal que não sofreu lesão.

O efeito do laser no desenvolvimento de novos vasos sanguíneos foi citado por Mester et al. (1985), demonstrando que o desenvolvimento da circulação dos tecidos em regeneração é significativamente influenciada pela radiação. Nestes experimentos, foi aplicado o laser He-Ne e houve aumento no número de capilares quando comparado ao grupo controle. No entanto, os autores não citaram os parâmetros utilizados no experimento.

No presente estudo, a irradiação com laser As-Ga-Al com comprimento de onda de 660 nm, mostrou maior vascularização nos tendões lesionados quando comparados aos grupos controle nos 3, 5 e 7 dias de tratamento, independente dos parâmetros de dose e potência de saída utilizados. Isso foi determinado pela análise feita em cada campo em que foram feitas as contagens.

Webb et al. (1998), utilizando este mesmo comprimento de onda (660 nm), estudaram a irradiação de cultura de fibroblastos com potência de saída de 17 mW e doses de 2,4 J/cm<sup>2</sup> e 4 J/cm<sup>2</sup>. Seus resultados demonstraram que o comprimento de onda utilizado com os parâmetros estabelecidos pode induzir a secreção e liberação de fatores de crescimento pelos fibroblastos, especialmente o bFGF, que está relacionado com a neovascularização.

Além deste trabalho, Young et al. (1989), observaram um aumento na liberação de fatores de crescimento pelos macrófagos, levando à maior proliferação fibroblástica quando utilizaram o comprimento de onda de 660 nm, potência de 15 mW e irradiância de 120 mW/cm<sup>2</sup>, durante 20 segundos. Comprimentos de onda maiores (880 nm) mostraram efeitos inibitórios sobre a estimulação fibroblástica.

Como os macrófagos e fibroblastos estão intimamente relacionados com a liberação de fatores de crescimento e moléculas solúveis envolvidas com a angiogênese,

pode ser que a resposta de aumento no número de vasos sanguíneos nos tendões irradiados com 660 nm do presente estudo tenha ocorrido devido ao aumento destes fatores por essas células, concordando com os resultados obtidos por Webb et al. (1998) e Young et al. (1989).

Os resultados deste estudo mostraram também que a aplicação com laser de 40 mW durante 3 dias após a lesão, levou ao aumento estatisticamente significativo da neovascularização em relação aos demais subgrupos (10 mW/3dias, CL/PL/3dias e CL/ST/3dias). O subgrupo 10 mW/3dias mostrou-se melhor que o CL/ST/3dias, porém não melhor estatisticamente do que o CL/PL/3dias, indicando que ambos apresentavam mesma quantidade de vasos nesta fase.

No 5º dia de aplicação, todos os subgrupos evidenciaram aumento no número de vasos em relação à fase anterior (3dias).

O nº de vasos do subgrupo 40 mW/5dias em relação ao controle foi estatisticamente maior, porém este aumento não ocorreu quando correlacionado com os tendões irradiados com 10 mW de potência.

Além disso, os mesmos subgrupos (CL/PL/5dias, CL/ST/5dias) que, após 5 dias, mostraram diferença estatisticamente significativa com o de 40 mW/5dias, mostraram também alterações em relação ao subgrupo 10 mW/5dias. Esse dado nos leva a considerar que a irradiação de 10 mW, que na fase anterior não evidenciou diferença em relação ao CL/PL/3dias, e nesta fase mostra um grande aumento de vasos em relação ao mesmo grupo, pode ter iniciado a neovascularização no curso normal, porém com maior quantidade de vasos sanguíneos sendo formados quando comparado com o reparo tendíneo sem a influência de agentes físicos.

Já o subgrupo de 40 mW/5dias continuou com alto número de vasos em relação aos controles. Como esses tendões já se apresentaram mais vascularizados na primeira fase de análise, pode ser considerado que a angiogênese iniciou provavelmente mais precocemente neste caso.

Portanto, estes dados podem indicar que o tratamento com potência mais alta mostrou que o processo de reparo ocorreu mais precocemente, com neoformação vascular ocorrendo entre os 3 primeiros dias após a lesão. Já a irradiação com potência de saída mais baixa, promoveu esse crescimento de novos vasos em fase normal, porém houve aumento na quantidade destes em relação aos grupos controle.

A correlação feita entre os grupos tratados durante 7 dias, indicou uma queda no nº de vasos no subgrupo de 40 mW/7dias e um aumento no subgrupo de 10 mW/7dias, novamente mostrando que a maior potência encontrava-se possivelmente em um estágio mais acelerado em relação aos demais. De acordo com dados da literatura (ENWEMEKA, 1989a), a angiogênese que ocorre durante a fase proliferativa inflamatória causa um aumento na quantidade vascular que diminui dentro de alguns dias até atingir a quantidade de vasos de um tecido normal.

Uma das precauções deste trabalho foi em relação aos grupos CL/PL, em que o estresse sofrido pelos animais pela simulação da irradiação pudesse causar algum tipo de estímulo que influenciaria nos resultados obtidos. A comparação deste grupo com o CL/ST, que não teve nenhum tipo de tratamento, não mostrou diferença significativa para o número de vasos, porém, em um dos casos (10 mW/3dias), o grupo irradiado não foi diferente do CL/PL e mostrou alteração em relação ao CL/ST. Isso pode evidenciar que

esse grupo que não recebeu nenhum tratamento após a lesão foi inferior aos demais, mesmo não sendo identificado estatisticamente.

Nossa pesquisa concordou com o estudo de Van Breughel et al. (1992), mostrando maior eficiência do tratamento com potência de 40 mW. O autor pesquisou os efeitos do laser He-Ne sobre culturas de fibroblastos humanos, evidenciando que o tratamento com 40 mW por 10 segundos foi melhor do que 10 mW usados por 40 segundos, ambos com dose no mesmo valor.

Trelles et al. (1989), citados 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. Além disso, Tunér & 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, o que foi evidenciado nesse estudo.

Nota-se pelos resultados deste trabalho que a LLLT foi efetiva, porém o efeito das diferentes potências foi totalmente dependente do número de irradiações efetuadas, ou seja, da fase em que se encontrava o tecido a ser reparado, sendo que a irradiação com 10 mW de potência promoveu estímulo à angiogênese durante a fase normal de proliferação vascular enquanto que a irradiação com potência de 40 mW promoveu antecipadamente este estímulo. Porém ambas foram eficientes por causar aumento na quantidade de vasos em relação ao reparo sem o estímulo de agentes físicos.

Schindl et al. (1999) pesquisaram os efeitos do laser He-Ne (632,8 nm) com 10 mW de potência e  $30 \text{ J/cm}^2$ , na neovascularização em úlceras e relataram aumento do número de vasos após 4 semanas de irradiação no centro e margem da úlcera comparado com as condições pré tratamento e do tecido normal. Os autores consideram que a

irradiação laser induz a neoangiogênese *in vitro* e *in vivo*, estimulando certas funções celulares como a síntese protéica e mitose, indução da liberação e secreção de fatores de crescimento como citocinas e bFGF.

De acordo com Agaiby et al. (2000), as células endoteliais são consideradas um importante pré-requisito para o processo de angiogênese. Estes autores estudaram os efeitos da irradiação laser As-Ga-Al de 820 nm e 50 mW de potência em cultura de linfócitos T de sangue humano e mostraram que a terapia de luz com densidades de energia de 3,6 J/cm<sup>2</sup> é capaz de estimular a proliferação indireta das células endoteliais através da interação com os linfócitos T. As densidades de energia de 6,0 e 8,4 J/cm<sup>2</sup> apresentaram efeito inibitório.

Kipshidze et al. (2001) realizaram um estudo *in vitro* com a aplicação de laser He-Ne (632,8 nm) em cultura de células endoteliais com doses variando entre 0,1 e 6,3 J/cm<sup>2</sup>, constatando que o laser promoveu aumento na secreção de VEGF, que é o principal fator envolvido com a angiogênese.

Alguns autores (MORCOS et al., 1991; MAIER et al., 1990; KAMI et al., 1985; KOVACS et al., 1974), citados por Agaiby et al. (2000), observaram que a LLLT acelerou a formação de novos vasos na orelha de coelhos e na pele de ratos. Além disso, os autores consideraram que a LLLT pode mostrar um efeito de estímulo ou inibição da proliferação de células endoteliais em bovinos, dependendo do comprimento de onda e densidade de energia utilizada. No entanto, os autores não citaram a dosimetria utilizada nas pesquisas.

Todos os estudos relatados mostraram aumento na angiogênese, utilizando densidades de energia baixas e moderadas de LLLT, diretamente através da análise do

número de vasos ou indiretamente através de análises *in vitro* da liberação e secreção de células e fatores de crescimento relacionados com a neoformação vascular.

Pode-se considerar que o aumento na neovascularização a partir da contagem do número de vasos mostrado nos resultados deste trabalho, com potências de saída baixas e intermediárias, ocorreu, provavelmente, devido à uma cascata de eventos incluindo a indução da liberação de fatores de crescimento como VEGF, bFGF, TGF  $\beta$ , entre outros, e estímulo na proliferação celular no início do processo inflamatório, como macrófagos, células endoteliais e fibroblastos como observado por Kipshidze et al. (2001), Agaiby et al. (2000) e Schindl et al. (1999).

Além disso, é possível que a diferença entre as respostas potência de saída esteja relacionada com a ocorrência destes eventos, sendo que cada potência (10 mW ou 40 mW) pode ter promovido estímulo a um fator de crescimento determinado ou a proliferação de uma célula específica, resultando em diferentes reações no tecido.

Apesar do objetivo deste estudo ser investigar os efeitos de diferentes potências de saída laser no reparo tendíneo, não pode ser desconsiderado um efeito dose-dependente, levando-se em conta que a potência de 10 mW emitiu densidade de energia de  $2,5 \text{ J/cm}^2$  e a de 40 mW,  $10 \text{ J/cm}^2$ .

A análise realizada não nos permitiu distinguir qual potência ou dose foi específica para qual célula ou fator de crescimento. Portanto, a necessidade em desenvolver pesquisas com esta finalidade torna-se evidente a fim de proporcionar uma melhor qualidade em relação aos dados referentes à terapia laser de baixa intensidade.

Esta pesquisa confirmou o que já é relatado por diversos autores que estudam os efeitos do LLLT, evidenciando que o efeito laser depende dos parâmetros de irradiação utilizados para promover respostas adequadas. Porém faltam ainda muitas

pesquisas a serem realizadas para podermos estabelecer a dosimetria ideal para atingir o objetivo específico.

### **6.2.3. Qualitativos e semiquantitativos**

A análise qualitativa desta pesquisa concordou com os estudos de Schmitt et al. (1993), afirmando que o aspecto dos tendões lesionados diferem dos tendões normais e que os subgrupos irradiados com laser apresentam um aspecto de melhor vascularização, maior organização das fibras colágenas e maior proliferação de fibroblastos.

Os resultados indicaram que a quantidade de células inflamatórias polimorfonucleares foi maior nos subgrupos CL/ST, evidenciando diferença significativa em relação aos demais. Já em relação às células mononucleares, houve diferença significativa do subgrupo 10 mW em relação ao CL/PL e esse em relação ao CL/ST, sendo que o de 10 mW e o CL/ST apresentaram maior quantidade.

De acordo com Young et al. (1989), o laser estimula a proliferação de macrófagos. Além disso, Hemvani et al. (1998) encontraram aumento da proliferação e mudanças na morfologia de macrófagos recolhidos de pessoas sadias e em pacientes com tuberculose depois de irradiação *in vitro* com laser He-Ne. O aumento significativo das células mononucleares do grupo irradiado com laser de 10 mW parece concordar com esses autores. Entretanto, outras pesquisas objetivando análises mais específicas desses parâmetros de irradiação no aumento dos macrófagos são necessários para confirmar estes resultados.

Pode ser afirmado que há diferença em relação aos subgrupos CL/ST e CL/PL, sendo que o que não sofreu nenhum estresse ou simulação de tratamento,



apresentou maior quantidade de células inflamatórias do que o que recebeu tratamento placebo.

Além disso, a análise qualitativa do CL/ST evidenciou um aspecto inferior aos demais, com maior desorganização e maior número de células inflamatórias em todas as fases avaliadas. Esse subgrupo mostrou um processo de reparo mais lento, o que deixa claro a existência do efeito placebo, que pode ser mediado através de processos fisiológicos, como o estresse sofrido pelo animal durante o posicionamento no contensor ou então durante a simulação da aplicação.

É possível que a irradiação tenha promovido aceleração do reparo pela invasão precoce de células polimorfonucleares e mononucleares, porém este tipo de análise classificatória não foi precisa o suficiente para permitir esta informação.

Com relação à presença de células inflamatórias mononucleares durante a classificação dos itens, não foram considerados os fibroblastos, pois estas são as células presentes no tendão normal sem lesão. Embora o formato dos fibroblastos seja modificado quando o tecido está sofrendo reparo, a análise por microscopia de luz comum torna a comparação difícil, sendo mais precisa a análise por microscopia eletrônica.

No entanto, o exame qualitativo dos tendões mostrou que os fibroblastos presentes nos subgrupos irradiados eram de maior quantidade e mais alinhados do que as mesmas células nos subgrupos CL/PL e CL/ST, o que concorda com as pesquisas de diversos autores (PEREIRA et al., 2002; ALMEIDA-LOPES et al., 2001; BJORDAL, 2000; KARU, 1998; RIGAU et al., 1994; YOUNG et al., 1989) que investigaram os efeitos do laser na proliferação de fibroblastos e evidenciaram que a irradiação é capaz de promover esse estímulo.

Alguns autores (CARRINHO, 2004; ENWEMEKA & REDDY, 2000; PARIZOTTO & BARANAUSKAS, 1998b; ENWEMEKA & SPIELHOLZ, 1992) estudaram os efeitos do laser no alinhamento das fibras colágenas, mostrando que a irradiação é efetiva na proliferação de fibroblastos, síntese e organização de colágeno no 14º dia após a lesão.

Em microscopia de luz comum esse aspecto é facilmente visível, porém a análise por microscopia de luz polarizada é mais eficaz para essa função. Entretanto, não foi objetivo deste trabalho analisar quantitativamente a organização das fibras colágenas e observação realizada foi necessária para a obtenção dos resultados desejados.

Os efeitos da LLLT na neovascularização sob aspecto qualitativo ou semiquantitativo confirmaram os resultados quantitativos, evidenciando que o laser foi eficaz na promoção da neovascularização após ruptura parcial do tendão calcâneo.

Os resultados qualitativos e semiquantitativos também foram analisados em relação aos períodos (3, 5 e 7) de irradiação após a lesão e foram evidenciados os efeitos em relação ao reparo tendíneo em cada fase.

#### *Reparo Tendíneo após 3 dias de irradiação*

A análise semiquantitativa não evidenciou diferenças significativas entre os subgrupos quando foi considerada a presença de células inflamatórias polimorfonucleares e mononucleares após 3 dias de irradiação.

Sob aspecto qualitativo foi visto nesta fase maior predominância de fibroblastos nos subgrupos submetidos à irradiação em relação aos controles e aparentemente, concordando com as pesquisas (PEREIRA et al., 2002; ALMEIDA-LOPES

et al., 2001; BJORDAL, 2000; KARU, 1998; RIGAU et al., 1994; YOUNG et al., 1989) sobre os efeitos da LLLT na proliferação de fibroblastos.

A análise qualitativa evidenciou também maior predominância de células mononucleares nos subgrupos irradiados e no CL/ST/3dias.

Neste período, não foi esperado que os tendões apresentassem organização de colágeno. Contudo, a análise foi feita com intuito de observar se havia diferença mínima entre os grupo irradiados e controle. Não houve nenhuma alteração entre os subgrupos que pudesse ser considerada significativa. Apenas sob aspecto qualitativo, os tendões irradiados mostravam-se melhor do que os que não receberam radiação.

Já em relação à neovascularização, a análise semiquantitativa após 3 dias, concordou com os dados quantitativos deste estudo, mostrando diferença altamente significativa entre os grupos sendo que o subgrupo 40 mW/3dias mostrou presença acentuada de vasos e o subgrupo CL/ST/3dias mostrou-se inferior aos demais.

Portanto, a análise qualitativa do tratamento efetuado durante 3 dias mostrou pouca diferença entre os subgrupos avaliados, especialmente em relação ao número de células. Vale salientar que não foi objetivo deste estudo determinar a quantidade de células presentes, especialmente porque a coloração com HE não é específica para esta finalidade. O propósito foi determinar o aspecto geral do tecido em reparação e macroscopicamente isso foi observado, sendo que os subgrupos irradiados mostravam qualidade de cicatrização melhor do que os controle lesionados, especialmente sobre o subgrupo que não sofreu nenhum tipo de tratamento (CL/ST/3dias).

### *Reparo tendíneo após 5 dias de irradiação*

Em processo inflamatório normal, nesse período ocorre o início da fase neoangiogênica e proliferativa (JÓZSA & KANNUS, 1997; ENWEMEKA & SPIELHOLZ, 1992; ENWEMEKA, 1989a), com diminuição da quantidade de células polimorfonucleares e aumento de macrófagos, fibroblastos e células endoteliais.

As respostas semiquantitativas a 5 dias da lesão já apresentaram resultados significativos, especialmente em relação a presença de células inflamatórias polimorfonucleares. Neste caso, os subgrupos irradiados com laser (10 mW/5dias e 40 mW/5dias), mostraram presença leve destas células, assim como o subgrupo placebo (CL/PL/5dias). O subgrupo que não recebeu tratamento algum evidenciou maior presença destas células, sendo significativa em relação aos grupos irradiados, o que nos leva a considerar que este subgrupo pode ter um processo inflamatório mais acentuado que os outros.

Em relação às células mononucleares, os subgrupos irradiados apresentaram quantidade estatisticamente maior quando comparados com o CL/PL/5dias, novamente concordando com os estudos de Hemvani et al. (1998) e Young et al. (1989) que consideram que o laser estimula a proliferação de macrófagos. O subgrupo CL/ST/5dias mostrou presença acentuada destas células, sendo também estatisticamente significativa em relação ao CL/PL/5dias.

Já a organização de colágeno evidenciou diferença significativa entre os subgrupos avaliados, sendo que os tendões irradiados com 10 mW e 40 mW já apresentavam moderado alinhamento das fibras e os grupos CL/PL/5dias e CL/ST/5dias ainda não mostravam essa característica. É provável que além da ação já conhecida do laser, o alinhamento precoce das fibras tenha ocorrido devido ao fato de a ruptura não ser

completa, como na maioria das pesquisas. Assim, não serão todas as fibras que estarão rompidas no tecido, sendo mais rápido o reparo e a organização das mesmas.

A neovascularização novamente confirmou os dados qualitativos, mostrando acentuada quantidade de vasos nos subgrupos 10 mW/5dias e 40 mW/5dias e leve quantidade nos demais. Devido ao fato de a angiogênese estar intimamente relacionada à liberação de citocinas e fatores de crescimento pelos macrófagos e fibroblastos, possivelmente a irradiação com laser com os parâmetros utilizados neste estudo, permitiu um aumento da síntese e liberação de substâncias como o bFGF e VEGF para promover o neoformação vascular.

#### *Reparo tendíneo após 7 dias de irradiação*

Nessa fase, o aspecto geral dos tendões irradiados diferiu dos demais em relação à neovascularização. O nº de vasos foi superior nos subgrupos submetidos ao LLLT, confirmando os resultados anteriormente citados. Apenas quando comparados os subgrupos 40 mW/7dias e CL/PL/7dias não houve diferença significativa, podendo indicar que este grupo irradiado já mostrava redução do número de vasos, como observado na análise quantitativa e novamente concordando com Enwemeka (1989a) que considera que após alguns dias a quantidade de vasos diminui até atingir os níveis vasculares normais pré-lesão.

Nos subgrupos avaliados, a presença de células inflamatórias foi mínima após 7 dias de irradiação. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos nesta fase.

Os subgrupos que não receberam a irradiação ainda não apresentavam alinhamento das fibras de colágeno, mostrando a diferença estatisticamente significativa em

relação aos subgrupos 10 mW/7dias e 40 mW/7dias. Isso confirma novamente a ação do laser no alinhamento e organização das fibras colágenas citado por vários autores (CARRINHO, 2004; ENWEMEKA & REDDY, 2000; PARIZOTTO & BARANAUSKAS, 1998b; ENWEMEKA & SPIELHOLZ, 1992).

A influência benéfica da LLLT sobre o reparo tendíneo ocorreu provavelmente devido ao fato de a fotoestimulação com laser de baixa intensidade com certos comprimentos de onda 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; SAPERIA et al., 1986; MESTER et al., 1985), promove a produção de ácidos nucleicos, aumenta a divisão celular (PASSARELLA et al., 1984) e facilita eventos induzindo a síntese de moléculas de procolágeno (SAPERIA et al., 1986; MESTER et al., 1985).

Segundo Mester et al. (1985), o laser de baixa intensidade aumenta a proliferação celular e acelera a formação precoce do 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. Outros autores (YOUNG et al., 1989), consideram que com o aumento da proliferação de fibroblastos, a fase proliferativa do reparo pode ser acelerada.

### **6.3. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os mecanismos reais nos quais o laser estimula o reparo tendíneo não estão totalmente comprovados. De acordo com Simunovic et al. (2000), a LLLT atuaria

estimulando a atividade mitocondrial, no aumento de ATP, na síntese de DNA e RNA e de proteínas, na modulação da atividade enzimática e na aceleração do metabolismo celular.

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

Segundo Kipshidze et al. (2001), Webb et al. (1998) e Young et al. (1989), a terapia laser pode induzir a liberação de fatores de crescimento pelos macrófagos e fibroblastos, o que provavelmente atuam como agentes autócrinos e pácrinos, estimulando a mitose e/ou reduzindo a morte celular. A irradiação agiria também nas citocinas, colaborando ainda mais com o reparo.

Os resultados do presente estudo em relação ao aumento do nº de vasos nos permitem acreditar na influência benéfica do laser de baixa intensidade na proliferação de fibroblastos e macrófagos e, principalmente com o estímulo da liberação e secreção dos fatores de crescimento como o FGF e VEGF por estas células, pois são estes fatores os componentes essenciais na modulação do processo de reparo, aumentando a quimiotaxia e a atividade mitogênica das células endoteliais e conseqüentemente promovendo a angiogênese.

Laakso et al. (1993a) consideram 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 que foi evidenciado no presente estudo, pois o comprimento de onda de 660 nm promoveu aumento da neovascularização e melhora na qualidade de reparo em todos os grupos analisados.

Segundo Longo & Mester (1998), Basford (1995), Laakso et al. (1993a), Kitchen & Partridge (1991), a LLLT pode estimular ou inibir a cicatrização, dependendo dos parâmetros utilizados. Nossos resultados parecem concordar com essa afirmação, embora ambas potências ou doses tenham mostrado efeitos de estimulação da neovascularização, porém com a potência de saída de 40 mW (densidade de energia de 10 J/cm<sup>2</sup>), estes ocorreram mais precocemente.

De acordo com Sandoval-Ortiz et al. (2001) e Baxter (1997), 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. Longo & Mester (1998), afirmam que cada laser pode estimular ou inibir as várias fases da cicatrização dependendo da dosagem empregada.

Embora exista uma grande quantidade de trabalhos na literatura que reportem o efeito positivo da radiação laser de baixa intensidade nas lesões do tecido conjuntivo, alguns autores relatam os efeitos negativos deste tipo de radiação, fato que pode ser influência dos parâmetros adotados.

Ao estudarem o processo de reparação tendínea durante 14 dias, Gum et al. (1997) utilizaram um protocolo de terapia combinada com estimulação elétrica transcutânea (corrente galvânica), laser As-Ga (904 nm), 1J/cm<sup>2</sup> e ultra-som. Os resultados indicaram 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.

Siebert et al. (1987) não constataram melhora do quadro algico e do desempenho funcional de 32 pacientes portadores de tendinopatias. O tratamento foi



realizado com a combinação do laser HeNe (632,8 nm) e laser As-Ga (904 nm) em aplicações de 15 minutos diários. Os autores não citaram as densidades de energia empregadas.

A não efetividade da LLLT também foi constatada no estudo de Schlager et al. (2000) na cicatrização de feridas de ratos. Porém, nesta pesquisa, o mesmo animal foi utilizado como controle, dificultando a comparação dos resultados, já que é relatado na literatura (BRAVERMAN et al. 1989) que o laser produz efeitos sistêmicos capazes de promover benefícios terapêuticos no membro contralateral.

Dada a natureza controversa da LLLT, é de fundamental importância suplementar as publicações nessa área. Por outro lado, Tunér & 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*.

As 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 enquanto que no tecido vivo irá ocorrer a absorção dentro de uns poucos milímetros (CARRINHO 2004).

Laakso et al. (1993a) relatam que experimentos em culturas celulares dificultam a extrapolação para situações *in vivo*, pois comparados com organismos vivos, são realizados em meio artificial. Além disso, Niccoli-Filho et al. (1993) consideram que alguns autores salientam que os resultados positivos obtidos em animais não podem ser transferidos ao homem, devido à presença de variáveis como dissimilaridade de cor, estrutura tecidual, individualidades nas propriedades de absorção/reflexão e diferenças nas suscetibilidades dos tecidos irradiados.

Já Ozawa et al. (1998) e Basford (1989), consideram que os experimentos *in vitro* 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 LLLT na prática clínica sejam completamente elucidados.

Enwemeka & Reddy (2000), no entanto, relatam que embora o processo de reparo tecidual possa diferir entre animais e humanos, lesões como a ruptura do tendão calcâneo em humanos pode ser beneficiada com as doses adequadas de laser He-Ne ou As-Ga adquiridas em experimentos animais. Os autores acrescentam que as doses e comprimentos de onda apropriados para as lesões tendíneas podem promover síntese de colágeno, maturação e remodelamento precoce do mesmo.

Segundo Kitchen & Partridge (1991), há uma grande dificuldade por parte dos pesquisadores em interpretar e associar as informações obtidas sobre os efeitos fisiológicos da LLLT aplicada aos tecidos vivos por duas razões: (1) a grande diversidade de sujeitos utilizados nos estudos, variando de culturas celulares a espécies animais e humanos; (2) a grande variedade de parâmetros de tratamento utilizada dificulta a comparação dos resultados.

Devido à grande diversidade de resultados e ausência de padronização de protocolos de tratamento, ainda há dificuldade na interpretação dos dados e a relação destes com os efeitos da LLLT em cada tecido. Porém, a terapia laser de baixa intensidade tem um grande futuro na prática clínica, necessitando de estudos mais detalhados para determinar mais precisamente os efeitos proporcionados no tecido biológico.

## **7. CONCLUSÕES**

De acordo com a proposta e as condições específicas deste trabalho, os resultados nos permitiram concluir que:

1) A LLLT com comprimento de onda de 660 nm promoveu aumento na neovascularização pelo aumento no número de vasos sanguíneos após ruptura parcial do tendão calcâneo de ratos.

2) Após 3 dias de irradiação com laser, os subgrupos submetidos à potência de 40 mW apresentaram maior quantidade de vasos em relação aos demais.

3) Após 5 dias, ambas potências de saída apresentaram maior vascularização em relação aos demais subgrupos.

4) Após 7 dias, o subgrupo submetido ao tratamento de 40 mW mostrava-se em fase mais avançada que os demais, restabelecendo a organização vascular normal.

5) Com relação às potências de saída empregadas, a de 40 mW apresentou efeitos precocemente quando comparada com a de 10 mW.

6) Quando foram feitas as análises qualitativas e semiquantitativas do processo de reparo, não houve muita alteração, porém os grupos irradiados com laser com potências de saída de 10 mW e 40 mW, apresentaram invasão precoce de células inflamatórias, melhor organização de colágeno e maior quantidade de neovascularização quando comparados com os grupos controle placebo e controle sem tratamento.

7) A comparação entre os grupos controle placebo e controle sem tratamento, mostrou a evidência do efeito placebo embora este não seja semelhante aos submetidos ao laser.

8) O grupo que não recebeu tratamento mostrou qualidade de reparo inferior aos demais em todas as fases de análise.

9) Nenhum tratamento proposto desfavoreceu a estruturação normal que se desenvolve no sítio da lesão.

10) O equipamento desenvolvido para a promover a lesão parcial do tendão calcâneo dos ratos foi eficaz, possibilitando um novo protocolo para procedimentos experimentais.

11) De acordo com os resultados, podemos propor uma ação do laser de 660 nm sobre a neovascularização de tendões, permitindo aceleração do processo de reparo.

12) Após revisão bibliográfica da literatura, podemos concluir que esta foi a primeira pesquisa a ser desenvolvida com o objetivo de verificar a ação do laser de baixa intensidade na angiogênese após lesão tendínea.

13) Os resultados especulam a possibilidade da utilização dos parâmetros metodológicos do presente trabalho experimental em situações clínicas.

14) Na qualidade de proposição para futuros estudos, destacamos a necessidade de investigações *in vitro* dos efeitos das potências de saída e densidades de energia consideradas sobre proliferação das células e fatores de crescimento para definir qual é mais efetiva para que tipo de condição.

## **REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA<sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup>De acordo com norma da ABNT- NBR-6023 (agosto/2002)

AGAIBY, A. D. et al. Laser Modulation of Angiogenic Factor Production by T-Lymphocytes **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 26, p. 357-63. 2000.

ALEXANDRATOU, E. et al. 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, 2000. v. 4159, p. 25-33.

ALMEIDA-LOPES, L. et al. 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. et al. Histological Studies on the rheumatoid synovial membrane irradiated with a low energy laser. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 15, p. 290 – 294, 1994.

ASTROM, M. et al. Imaging in chronic tendinopathy: a comparison of ultrasonography, magnetic resonance imaging and surgical findings in 27 histologically verified cases. **Skeletal Radiology**, v. 25, p. 615-20, 1996.

BARRY, N.M.; McGUIRE, J.L. Overuse Syndromes in adult athletes. **Musculoskeletal Medicine**, v.22 n. 3, p. 515-29, 1996.

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. Low-intensity laser Therapy: still not an established clinical tool. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 16, p 331-42, 1995.

BATTEGAY, E.J. Angiogenesis: mechanistic insights, neovascular diseases, and therapeutic prospects. **J Mol Med**, v. 73, p. 333-46, 1995.

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

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

BECKERMAN, H. et al. 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.

BIDDER, M. et al. Expression of mRNA for Vascular Endothelial Growth Factor at the Repair Site of Healing Canine Flexor Tendon. **Journal Orthopaedic Research**, v. 18, n. 2, p. 247-52, 2000.

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. et al. 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.

BOSATRA, M. et al. In vitro fibroblast and dermis fibroblast activation by laser irradiation at low energy. **Dermatologica**, v. 168, p. 157-162, 1984.

BOYER, M.I. et al. Quantitative variation in VEGF mRNA expression during early flexor tendon healing: an investigation in a canine model. **Journal Orthopaedic Research**, v.19, p.869-72, 2001.

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.

CARR, A.J.; NORRIS, S.H. The Blood supply of the Calcaneal Tendon. **Journal of Bone and Joint Surgery [Br]**, v.71-B, p. 100-1, 1989.

CARRINHO, P.M. **Estudo comparativo utilizando Lasers de 685 nm e 830 nm no processo de reparo tecidual em tendões tenotomizados de ratos**. 2004. 143 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – SP.

CHAN, B.P. et al. Effect of basic fibroblast growth factor. **Clin Orth Rel Res**, v. 342, p.239-47, 1997.

CHANG, J. et al. Molecular studies in flexor tendon Wound Healing. The role Basic Fibroblast Growth Factor Gene Expression. **J Hand Surg**, v. 23 A, n. 6, p. 152-58, 1998.

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

COTRAN, R.S. et al. **Patologia estrutural e Funcional Robbins**. 5ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. p: 43-83. 1994.

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.



DE BIE, R.A. et al. Low-level laser therapy in ankle sprains: a randomized clinical trial. **Arch Phys Med Rehabil.** v. 79, p. 1415-1420, 1998.

ENGLAND, S. et al. Low power laser therapy of shoulder tendonitis. **Scand J Rheumatology.** v. 18, p. 427-431, 1989.

ENWEMEKA, C.S. Inflammation, Cellularity, and Fibrillogenesis in Regeneration Tendon: Implications for Tendon Rehabilitation. **Physical Therapy,** v. 69, p. 816-25, 1989a.

ENWEMEKA, C.S. The Effects of Therapeutic Ultrasound on Tendon Healing a Biomechanical Study. **Am J Physical Med Reh,** p. 283-87, 1989b.

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

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, 1991b.

ENWEMEKA, C.S. Functional Loading Augments the Initial Tensile Strength and Energy Absorption Capacity of Regenerating Rabbit Achilles Tendons. **Am Physical Med Rehab,** v. 7, n.1, p. 31-38, 1992.

ENWEMEKA, C.S. et al. Biomechanical effects of three different periods of GaAs laser photostimulation on tenotomized tendons. **Laser Therapy,** v. 6, p 191-88, 1994.

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. et al. Morphometrics of collagen fibril populations in HeNe laser photostimulated tendons. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery,** v. 8, p. 47-62, 1990 a.

ENWEMEKA, C.S.; RODRIGUEZ, O.; MENDOSA, S. The Biomechanical Effects of Low Intensity Ultrasound on Healing Tendons. **Ultrasound Med Biol,** v.16, n.8, p. 801-07, 1990 b.

ENWEMEKA, C.S.; SPIELHOLZ, N.I.; NELSON, A.J. The Effect of Early Functional Activities on Experimentally Tendomized Achilles Tendons in Rats. **Am J Physical Med Rehabil,** v. 67, n.6, p. 264-69, 1988.

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.

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

GAYDESS, E. et al. 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.

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

GELBERMAN, R.H. et al. The early stages of flexor tendon healing: a morphologic study of the first fourteen days. **J Hand Sur**, v.10 A, n.6, p. 776-84, 1985.

GHALI, L.; DYSON, M. The direct effect of light therapy on endothelial cell proliferation. In: STEINER R., WEIZ. LANGER R, editors. **Angiogenesis: key principles-science-technology-medicine**. Basel: Birkhauser Verlag: 1992. p.411-14.

GIGANTE, A. et al. Fibrillogenesis in tendon healing: on experimental study. **J Biol Res**, v.7, n.8, p. 203-210, 1996.

GOATS, G.C. et al. Low intensity laser and phototherapy for rheumatoid arthritis. **Physiotherapy** v. 82 n. 5; p. 311-20. 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. et al. 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.

GRADIZAR JR, I.A. Estabilização e consolidação das fraturas. In: GOULD III, J.A. **Fisioterapia na ortopedia e na medicina do esporte**. Cap.c 5, p.119-135, São Paulo: Manole, 1993.

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. et al. Combined Ultrasound, Electrical Stimulation, and Laser Promote Collagen Synthesis with Moderate Changes in Tendon Biomechanics. **Am J Physical Med & Rehab**, v.76, n.4, p. 289-95, 1997.

HALL, J. et al. Low Level Laser Therapy is ineffective in the management of rheumatoid arthritic finger joints. **British Journal of Rheumatology** v. 33, pag. 142-47. 1994.

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.

HARRISON, R.K.; JONES, M.E.; CLAYTON, E.; GROBBRLAAR, A.O.; SANDERS, R. Mapping of Vascular Endothelium in the human Flexor Digitorum Profundus Tendon. **J Hand Surg** 28 A (5): 806-13, 2003.

HEMVANI, N.; SADASHIVS, D.; SATRANDAS, N. Effects if helium –neon Laser on cultured human macrophages. **Laser Therapy**. V. 10, pp. 159-64. 1998.

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

HEUSSLER, J.K. et al. 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. et al. Extracellular matrices in peritendinous connective tissue after surgical injury to the chicken flexor tendon. **Arch Orthop Trauma Surg**, v. 115, p.63-67, 1996.

HOLLANDER, M. & WOLFE, D.A. **Nonparametric Statistical Methods**. Second Edition, Wiley Series in Probability and Statistics. 1999.

HONMURA, A. et al. 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. et al. 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.

HUDLICKA, O.; TYLER, K.R. Angiogenesis. The growth of the vascular system. **London Academic Press**. v. 3. 1986.

JÓZSA, L.; KANNUS, P. **Human Tendons**. United States of America: Human Kinetics, 1997.

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

KAKAR, S.; KHAN, U.; MCGROUTHER, D.A. Differential cellular response within the rabbit tendon unit following tendon injury. **J Hand Surg**, v. 23 B, n.5, p. 627-32, 1998.

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.

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

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. et al. 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.I.; PYATIBRAT, L.; KALENDU, 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. et al. 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. et al. Histopathology of common tendinopathies. **Injury Clinic**, v. 27, n. 6, p. 393-408, 1999.

KESAVA, R. et al. Biochemistry and biomechanics of healing tendon: part II, Effect of combined laser therapy and electrical stimulation. **Medicine & Science in sports & exercise**, p. 794-800. 1998.

KIPSHIDZE, N. et al. 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. 355-64, 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.

KLEIN, M.B.; Flexor Tendon Healing in vitro: Effects of TGF $\beta$  on tendon cell collagen Production. **J Hand Surg**, v.27 A, n.4, p. 615-20, 2002.

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

KOEKE, P.U. **Estudo comparativo da eficácia da fonoforese, do ultra-som terapêutico e da aplicação tópica de hidrocortisona no tratamento do tendão de rato em processo de reparo tecidual**. 2003. 152 f. Dissertação (Mestrado) - – Área de Interunidades em Bioengenharia EESC/FMRP/IQSC - Universidade de São Paulo - USP.

KUBASOVA, T. et al. 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.

KUSCHNER, S.H. et al. A comparison of the healing properties of rabbit Achilles tendon injuries at different levels. **Clin Orthop Rel Res**, v. 272, p.268-73, 1991.

KVIST, M.; JÓZSA, L.; JARVINEN, M. Vascular changes in the ruptured Achilles tendon and paratendon. **Int Orthop (SICOT)**, v. 16, p. 377-82, 1992.

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. et al. 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.

LEVINE, H.A.; SLEEMAN, B.D.; NILSEN-HAMILTON, M. A mathematical model for the roles of pericytes and macrophages in the initiation of angiogenesis.I. The role of protease inhibitors in preventing angiogenesis. **Mathematical Biosciences**, v. 168, p. 77-115, 2000.

LIN, T.W.; CARDENAS, L.; SOSLOWSKY, J. Biomechanics of tendon injury and repair. **Journal of Biomechanics**, v. 37, p. 865-77, 2004.

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

LONGO, L. et al. 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.

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

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. et al. 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. et al. 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.

MAIER, M.; HAINA, D.; LANDTHALER, M. Effect of low energy laser and the growth and regeneration of capillaries. **Lasers Med Sci**, v. 5, p.381-89. 1990.

McNEILLY, C.M. et al. Tendon cells in vivo form a three dimension network of cell processes linked by gap junctions. **J. Anat.** v. 189, p. 593-600, 1996.

MANSKE, P.R.; LESKER, B.S. Histologic evidence of intrinsic flexor tendon repair in various experimental animals: an in vitro study. **Clin Orth Rel Res**, v. 182, p. 297-304, 1984.

MANSKE, P.R et al. Intrinsic flexor-tendon repair: a morphological study *in vitro*. **J Bone Joint Surg**, v.66-A, n.3, p.385-89, 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.

MARSOLAIS, D.; CÔTÉ, C.H.; FRENETTE, J.; Neutrophils and Macrophages accumulate sequentially following Achilles tendon injury. **J Orth Res**, v. 19, p. 1203-09, 2001.

MAXWELL, L. Therapeutic Ultrasound: Its Effects on the Cellular and Molecular Mechanisms of Inflammation and Repair. **Physiotherapy**, v. 78, n.6, p. 421-25, 1992.

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

MORCOS, N.C. et al. Bovine coronary artery endothelium: culture, characterization, angiogenesis and sensitivity to laser photodynamic treatment modalities. **J Clin Lab Immunol**, v. 34, p. 99-106, 1991.

NICCOLI-FILHO, W.D. et al. 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.

NISSEN, N.N. et al. Basic Fibroblast Growth Factor mediates angiogenic activity in early surgical wounds. **Surgery**, v. 119, n.4, p.457-65, 1996.

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

OZAWA, Y. et al. 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.

PALMES, D. et al. Achilles tendon healing: Long-term biomechanical effects of postoperative mobilization and immobilization in a new mouse model. **J Orth Res**, v.20, p. 939-46, 2002.

PAOLINI, D.E.; PAOLINI-PISANI, L.E. Tratamiento de la lesión del tendón manguito de los rotadores con laser de baja potencia – estudio prospectivo. Disponível em: <http://www.laser.nu/lllt/lllt-science7.htm#5>. Acesso em: 25 de maio de 2004.

PARIZOTTO, N. A. **Ação do Laser de Hélio-Neônio sobre o Processo de Reparo Tecidual: Um Estudo do Colágeno por Microscopia Eletrônica de Varredura, Microscopia de Varredura, Microscopia de Força Atômica e Espectroscopia por Infravermelho**. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, Universidade Estadual de Campinas, 1998.

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.

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. et al. 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, F.E.L. Degenerações. Morte Celular. Alterações do Interstício. In: BOGLIOLO, **Patologia**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 47-81, 1994.

PEREIRA, A.N. et al. 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.

PETERSEN, W. et al. The splice variants 120 and 164 of the angiogenic peptide vascular endothelial cell growth factor (VEGF) are expressed during Achilles tendon healing. **Arch Orthop Trauma Surg**, v. 123, p. 475-80, 2003.

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. **Con Tissue Res**, v. 8, p. 41-47, 1980.

POURREAU-SCHNEIDER, N. et al. 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. et al. 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, 1998a.

REDDY, G.K. et al. Biochemistry and biomechanics of healing tendon: Part II. Effects of combined laser therapy and electrical stimulation. **Med & Sci Sports & Exerc**, p. 794-800, 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. 248-55, 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.

RICEVUTI, G et al. In vivo and in vitro HeNe laser effects on phagocyte functions. **Inflammation**, v. 13, p. 507-27, 1989.

RIGAU, J. et al. Effects of the 633 nm laser on the behavior and morphology of primary fibroblast culture. **SPIE**, v.2630, p.28-42, 1994.

ROBERTO, C. The 780 laser and the CO2 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.

RUSSELL, J.E.; MANSKE, P.R. Collagen synthesis during primate flexor tendon repair in vitro. **J Orth Res**, 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. 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. et al. Laser de baixa intensidade: princípios e generalidades – Parte 1. **Fisioterapia Brasil**, v. 2, n. 1, p. 221-240, 2001.

SAPERIA, D. et al. 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. 1123-28, 1986.

SCHAFFER, M. et al. 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.

SCHATZKER, J.; BRANEMARK, P-I. Intravital observation on the microvascular anatomy and microcirculation of the tendon. **Acta Orthop Scan Supl** p.126, 1969.

SCHINDL, A. et al. Increased dermal angiogenesis after low-intensity laser therapy for a chronic radiation ulcer determined by a video measuring system. **J Am Ac Dermatol**, v.40, n.3, p.481-84, 1999.

SCHLAGER, A. et al. 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.

SCHMITT I. et al. 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.

SIEBERT, W. et al. 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.; 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.

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.

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. et al. 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. et al. In Vitro Effects of Low –Level Laser Irradiation at 660 nm on Peripheral Blood Lymphocytes. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 27, p. 255-61, 2000.

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

STOLINSKI, C. Disposition of collagen fibrils in human tendons. **J. Anat.**, v.186, p.577-583, 1995.

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.

TAVARES, M.R. **Efeito do Laser Terapêutico na cicatrização tendinosa: estudo experimental em ratos.** 2002. 67 p. Dissertação (Mestrado) – Área de Interunidades em Bioengenharia EESC/FMRP/IQSC - Universidade de São Paulo.

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.

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 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).

VAN DER VEM, P.H. et al. 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.

VECCHIO, P. et al. 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.

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.

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. et al. Macrophage responsiveness to light therapy. **Lasers Surgery and Medicine**, v. 9, p. 497-505, 1989.

YOUNG, S.R.; DYSON, M. The effect of therapeutic ultrasound on angiogenesis. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 16, n.3, p. 261-69, 1990.

ZANTOP, T.; TILLMANN, B.; PETERSEN, W. Quantitative assessment of blood vessels of the human Achilles tendon: an immunohistochemical cadaver study **Arch Orthop Trauma Surg**, v.123p. 501-04, 2003.

ZHANG, F. et al. Effect of Vascular Endothelial Growth Factor on Rat Achilles Tendon Healing. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v.112, n.6, p.1613-19, 2003.

**ANEXOS**

## ANEXO A

### TÉCNICA PARA COLORAÇÃO POR HEMATOXILINA-EOSINA FLOXINA PARA CORTES HISTOLÓGICOS

Fixação

Processamento em parafina

Cortes de 7  $\mu\text{m}$  micrótomo

Desparafinar, hidratar e lavar em água corrente

Corar na solução de hematoxilina por 3 minutos

Diferenciar em álcool-ácido

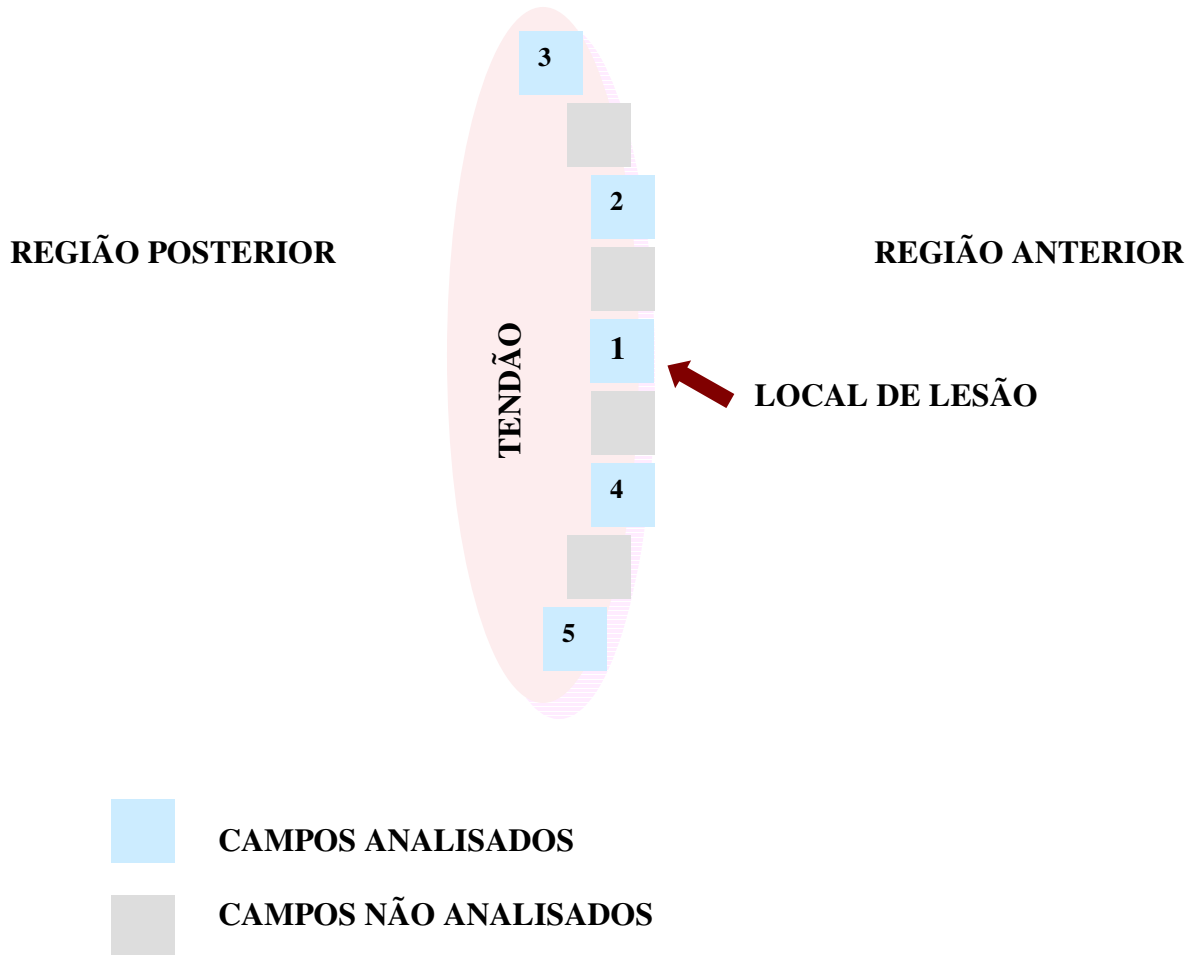
Lavar em água corrente

Corar na solução de Eosina-floxina por 30 segundos

Desidratar, diafanizar e montar com a lamínula.

## ANEXO B

### MÉTODO PARA SELEÇÃO DOS CAMPOS PARA ANÁLISE



## ANEXO C

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

Por exemplo, para os dados do item 1, obtém-se:

**TABELA 7: Valores e postos (entre parênteses) da análise qualitativa do item 1**

<b>Dias</b>	<b>10mW (1)</b>	<b>40mW (2)</b>	<b>CL/PL (3)</b>	<b>CL/ST (4)</b>
3	3.0 (30.0)	2.0 ( 9.0)	2.5 (21.0)	3.0 (30.0)
3	3.0 (30.0)	2.5 (21.0)	2.0 ( 9.0)	2.5 (21.0)
3	2.0 ( 9.0)	2.0 ( 9.0)	1.5 ( 2.0)	2.5 (21.0)
3	2.0 ( 9.0)	2.5 (21.0)	3.0 (30.0)	2.5 (21.0)
3	2.5 (21.0)	2.5 (21.0)	2.0 ( 9.0)	2.0 ( 9.0)
3	2.5 (21.0)	2.0 ( 9.0)	2.5 (21.0)	3.0 (30.0)
3	1.5 ( 2.0)	1.5 ( 2.0)	2.5 (21.0)	2.5 (21.0)
3	2.0 ( 9.0)	2.0 ( 9.0)	2.0 ( 9.0)	2.5 (21.0)
5	1.5 ( 7.5)	1.5 ( 7.5)	1.0 ( 1.0)	3.0 (27.5)
5	1.5 ( 7.5)	3.0 (27.5)	1.5 ( 7.5)	3.0 (27.5)
5	3.5 (31.5)	2.0 (15.0)	3.0 (27.5)	3.0 (27.5)
5	2.0 (15.0)	2.0 (15.0)	2.0 (15.0)	3.5 (31.5)
5	1.0 ( 1.0)	1.0 ( 1.0)	2.0 (15.0)	2.5 (22.0)
5	1.0 ( 1.0)	2.0 (15.0)	2.5 (22.0)	2.5 (22.0)
5	2.5 (22.0)	2.0 (15.0)	2.0 (15.0)	3.0 (27.5)
5	1.5 ( 7.5)	1.5 ( 7.5)	2.0 (15.0)	2.5 (22.0)
7	1.0 ( 5.5)	2.0 (25.5)	1.0 ( 5.5)	2.0 (25.5)
7	1.0 ( 5.5)	1.0 ( 5.5)	2.0 (25.5)	1.5 (16.0)
7	1.5 (16.0)	1.5 (16.0)	1.5 (16.0)	1.0 ( 5.5)
7	2.5 (31.0)	1.0 ( 5.5)	2.0 (25.5)	1.5 (16.0)
7	2.0 (25.5)	1.5 (16.0)	1.0 ( 5.5)	2.0 (25.5)
7	1.5 (16.0)	1.5 (16.0)	2.0 (25.5)	1.5 (16.0)
7	2.0 (25.5)	1.5 (16.0)	1.0 ( 5.5)	2.5 (31.0)
7	1.5 (16.0)	1.0 ( 5.5)	1.0 ( 5.5)	2.5 (31.0)



Em seguida, seguindo o exemplo dos dados da TABELA 7 tem-se:

$SP_j$	365.0	310.5	354.5	548.0
$S_j=SP_j/8$	45.6250	38.8125	44.3125	68.5000
$(S_j)^2$	2081.64	1506.41	1963.60	4692.25

onde  $SP_j$  = soma dos postos no j-ésimo tratamento e:

$$S_1^2 + S_2^2 + S_3^2 + S_4^2 = 10244$$

A estatística de teste é dada por HOLLANDER & WOLFE (1999), através da seguinte equação:

$$MS = \frac{12}{k(N+n)} \left( \sum_{j=1}^k S_j^2 \right) - 3(N+n)$$

onde:

k = tratamentos (10 mW, 40 mW, CL/PL, CL/ST) = 4

n = fases de tratamento (3 dias, 5 dias e 7 dias) ou blocos = 3

N = número total de observações = 96.

Quando a hipótese de igualdade ( $H_0$ ) entre os grupos é rejeitada, então existe, no mínimo, dois grupos que diferem entre si.

Por exemplo, substituindo-se os valores exemplificados acima com os dados do item 1 na fórmula, temos que  $MS = 13,42$

Rejeita-se  $H_0$  quando valor é maior do que o nível de significância adotado.

Como:  $MS = 13,42 > 12,84 = \chi_{4-1; 0,005}$ ,

então, rejeita-se a hipótese de igualdade dos efeitos de tratamentos, isto é, existe pelo menos dois tratamentos com diferença significativa nos efeitos ( $p < 0,005$ ).

Note que:  $\chi_{k-1; \alpha}$  representa o valor crítico da distribuição qui-quadrado, com k-1 graus de liberdade e nível de significância  $\alpha$ .

A tabela a seguir apresenta os valores obtidos com o teste em relação aos dados dos campos de análise do número de vasos e dos itens semiquantitativos, considerando o avaliador 1.

**TABELA 8: Valores obtidos com o teste de análise de variância não paramétrica, considerando  $\chi_{k-1;\alpha} = 12,84$  para  $p < 0,005$**

CAMPOS		ÍTEMS	
1	32,33	1	13,42
2	36,91	2	17,73
3	34,12	3	23,97
4	28,33	4	61,93
5	28,76	-	-

Para determinar quais são esses grupos diferentes estatisticamente, utiliza-se o **Teste de Comparações Múltiplas**.

Neste teste, para quaisquer dois dos  $k(k-1)/2$  pares de tratamentos  $a$  e  $b$ ,  $1 \leq a < b \leq k$ , decide-se que  $\tau_a \neq \tau_b$ , se  $|S_a - S_b| \geq [k(N+n)/12]^{1/2} \cdot q_\alpha$ , caso contrário, decide-se que  $\tau_a = \tau_b$ , onde  $\tau$  = tratamento;  $S$  = soma dos postos/ 8;  $q_\alpha$  é um valor crítico tabelado, dependente do número  $k$  de tratamentos e da escolha da taxa de erro experimental  $\alpha$ . Então, para  $\alpha = 0,05$ , tem-se  $q_\alpha = 3,633$  e para  $\alpha = 0,01$ , tem-se  $q_\alpha = 4,403$  (IN: HOLLANDER & WOLFE, 1999- tabela A17, pp. 669) e substituindo no exemplo acima:

$$[k(N+n)/12]^{1/2} \cdot q_\alpha = 5,745 \times 3,633 = 20,872 \text{ para } \alpha = 0,05$$

$$[k(N+n)/12]^{1/2} \cdot q_\alpha = 5,745 \times 4,403 = 25,296 \text{ para } \alpha = 0,01$$

$$|S_2 - S_1| = |38,813 - 45,625| = 6,812 < 20,872 \Rightarrow \tau_2 = \tau_1$$

$$|S_3 - S_1| = |44,313 - 45,625| = 1,312 < 20,872 \Rightarrow \tau_3 = \tau_1$$

$$|S_4 - S_1| = |68,500 - 45,625| = 22,875 > 20,872 \Rightarrow \tau_4 \neq \tau_1 \text{ (p<0,05)}$$

$$|S_3 - S_2| = |44,313 - 38,813| = 5,500 < 20,872 \Rightarrow \tau_3 = \tau_2$$

$$|S_4 - S_2| = |68,500 - 38,813| = 29,687 > 20,872 \Rightarrow \tau_4 \neq \tau_2 \text{ (p<0,01)}$$

$$|S_4 - S_3| = |68,500 - 44,313| = 24,187 > 20,872 \Rightarrow \tau_4 \neq \tau_3 \text{ (p<0,05)}$$

## ANEXO D

### TESTE DE KRUSKAL-WALLIS

Este teste foi desenvolvido através do programa BIOSTAT versão 3,0.

A estatística de teste é definida como:

$$T = \frac{1}{S^2} \left( \sum_{i=1}^k \frac{R_i^2}{n_i} - \frac{N(N+1)^2}{4} \right) \quad (1)$$

onde:  $R_i$  é a soma dos postos no i-ésimo grupo;

$n_i$  é a quantidade de postos dentro do grupo i

$N$  é a quantidade de postos em todos os grupos comparados

$S^2$  é determinado por:

$$S^2 = \frac{1}{N-1} \left( \sum_{\text{todos-os-postos}} R(X_{ij})^2 - \frac{N(N+1)^2}{4} \right) \quad (2)$$

$R(X_{ij})^2$  é a soma de todos os postos elevada ao quadrado

Quando a hipótese ( $H_0$ ) de igualdade entre os grupos (populações) é rejeitada, então existe, no mínimo, dois grupos que diferem entre si. Para determinar quais são estes grupos pode-se usar o seguinte procedimento:

Obs.: Rejeita-se  $H_0$  quando o p valor é menor que o nível de significância adotado.

#### Teste de comparações múltiplas

Se para dois grupos i e j ocorrer:

$$\left| \frac{R_i}{n_i} - \frac{R_j}{n_j} \right| > t_{1-\frac{\alpha}{2}} \left( S^2 \frac{N-1-T}{N-k} \right)^{\frac{1}{2}} \left( \frac{1}{n_i} + \frac{1}{n_j} \right)^{\frac{1}{2}}, \quad (3)$$

onde:  $R_i$  e  $R_j$  são as somas dos postos dos correspondentes grupos e  $t_{1-(\alpha/2)}$  é o percentil que acumula uma área abaixo de  $(1-\alpha/2)$  % (por exemplo, ao nível de 5% de significância,  $\alpha=0,05$  e  $(1-0,05/2)\%=97,5\%$ ), sob a curva da distribuição t com N-k graus de liberdade, sendo k igual ao número de grupos que estejam sendo comparados, então os grupos i e j tendem a diferir entre si.

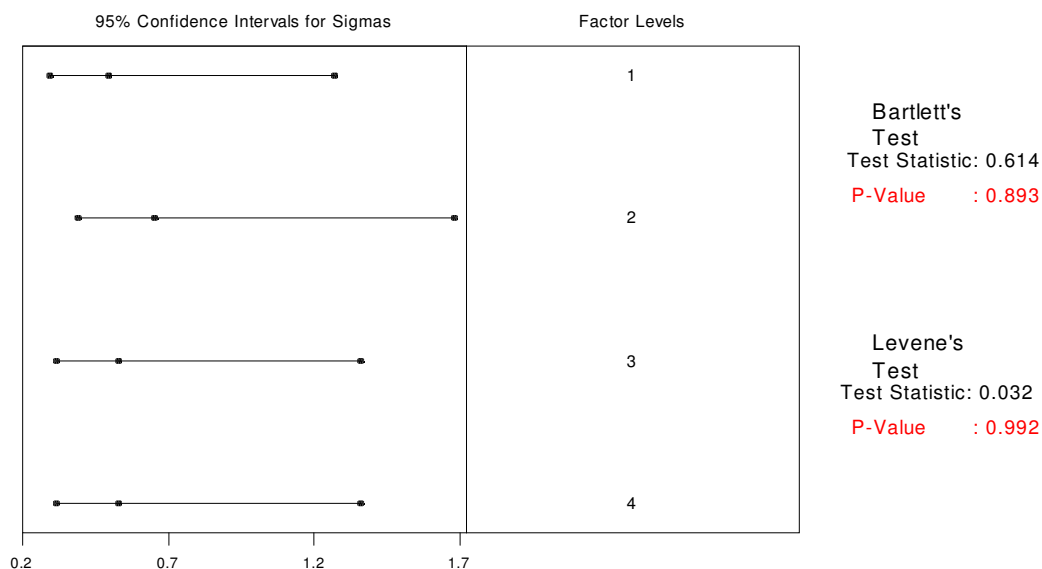
Nestas condições, o p valor pode ser determinado calculando-se, por integração numérica, a área sob a curva da distribuição t com N-k graus de liberdade, deixada acima do valor observado  $t_{ob}$ , obtido segundo a expressão:

$$t_{ob} = \frac{\left| \frac{R_i}{n_i} - \frac{R_j}{n_j} \right|}{S^2 \left( \frac{N-1-T}{N-k} \right)^{\frac{1}{2}} \left( \frac{1}{n_i} + \frac{1}{n_j} \right)^{\frac{1}{2}}}. \quad (4)$$

## ANEXO E

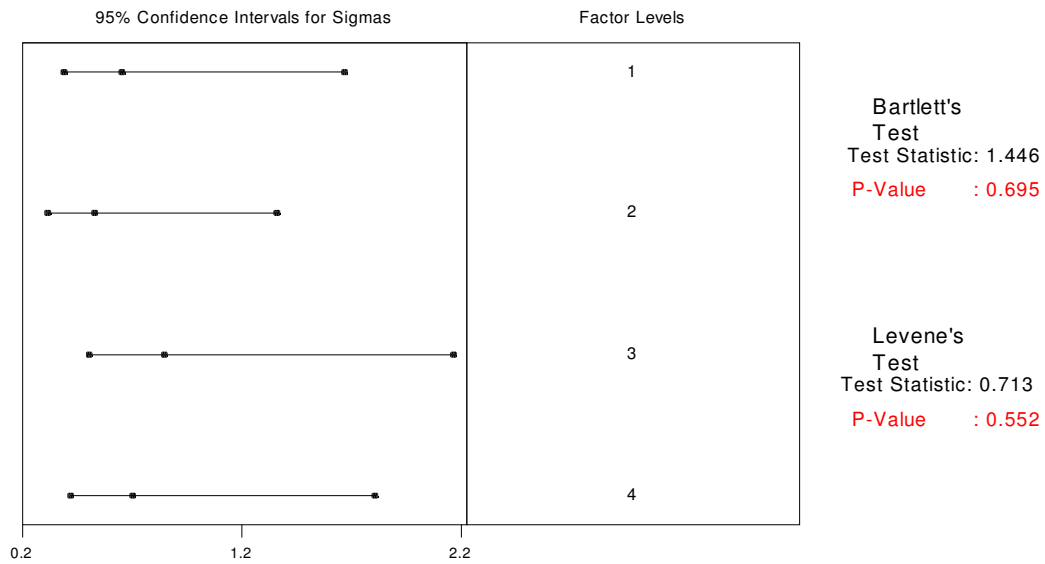
### TESTES DE HOMOCEDESTICIDADE (igualdade de variâncias entre os quatro grupos na organização de colágeno após 5 dias e 7 dias de lesão) utilizando o programa BIOSTAT 3.0

**FIGURA 28:** Teste de homocedasticidade para a análise semiquantitativa do item 3 durante 5 dias após a lesão.



De acordo com os testes acima (BARTLETT'S e LEVENE'S) não houve diferença estatística entre os grupos ( $p = 0,893$  e  $p=0,992$ ), ou seja, houve homogeneidade nas variâncias dos grupos estudados em relação à presença de organização de colágeno após 5 dias de lesão.

**FIGURA 29** : Teste de homocedasticidade para a análise semiquantitativa do item 3 durante 7 dias após a lesão.



Em relação à organização de colágeno após 7 dias de lesão, os testes (BARTLETT'S e LEVENE'S) não evidenciaram diferença estatística entre os grupos ( $p = 0,695$  e  $p = 0,552$ ), ou seja, houve homogeneidade nas variâncias dos grupos estudados.

Após estes testes de confirmação da homocedasticidade, foi feito o teste BONFERRONI paramétrico para as comparações múltiplas que o teste não paramétrico de KRUSKAL-WALLIS não detectou.

BONFERRONI	5 dias (p)	7dias (p)
Diferenças entre Médias (10 mW e 40 mW) =	> 0.01	> 0.01
Diferenças entre Médias (10 mW e CL/PL) =	< 0.01 **	> 0.01
Diferenças entre Médias (10 mW e CL/ST) =	< 0.01 **	< 0.01 **
Diferenças entre Médias (40 mW e CL/PL) =	> 0.01	> 0.01
Diferenças entre Médias (40 mW e CL/ST) =	> 0.01	< 0.01 **
Diferenças entre Médias (CL/PL e CL/ST) =	> 0.01	> 0.01

\*\* diferenças significativas a  $p < 0,01$