JESSICA LUCIA NEVES BASTOS

**ESTUDO COMPARATIVO DE SISTEMAS A BASE DE LASERS,
LEDs* E ULTRA-SOM (US) DE BAIXA INTENSIDADE NO
REPARO TECIDUAL EM TENDÃO CALCÂNEO.**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia - Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Bioengenharia.

Área de Concentração: Bioengenharia

Orientador: **Prof. Dr. Carlos Dias Maciel.**

São Carlos

2008

Dedico

Aos meus malucos pais que me contaminaram com os genes da curiosidade científica e me trouxeram a essa sofrida vida de pesquisadora.

AGRADEÇO:

A minha mãe e meu irmão pelas palavras de carinho, compreensão e apoio tão fundamentais durante a realização do projeto.

Profundos agradecimentos ao Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto por acreditar em minhas capacidades e me abrir as portas de seu laboratório, possibilitando esse meu crescimento científico e acadêmico. Este apoio tanto profissional quanto pessoal, foi de fundamental importância para o desenvolvimento com sucesso deste trabalho, e para minha formação como pesquisadora.

Ao Prof. Dr Carlos Dias Maciel por ter acreditado em minhas capacidades e habilidades para desenvolver essa pesquisa.

Agradeço aos amigos do Grupo de Óptica e Fotônica do Instituto de Física de São Carlos – IFSC/USP pela orientação, disponibilidade de equipamentos e apoios tanto profissional quanto pessoal. Especiais agradecimentos ao Departamento de Hidrobiologia DHB - UFSCar, Departamento de Biologia Evolutiva DEBE – UFSCar, Faculdade de Odontologia da UNESP – AQA, aos amigos do Laboratório de Instrumentação e Microeletrônica (LIM – ESC/ USP), ao Laboratório de Materiais Vítros (LAMAV – UFSCar) pela disponibilidade de equipamentos, ao Prof. Dr. José Guilherme Sabe cujo apoio foi de fundamental importância para se dar os primeiros passos dessa pesquisa, e aos meus queridos amigos que me acompanharam e me apoiaram durante essa caminhada.

Aos professores e funcionários da Bioengenharia por toda atenção e orientação conferidas a mim, em especial aos professores Orivaldo L. da Silva e José Carlos Pereira. Sinceros agradecimentos a Janete dos Santos pela paciência e dedicação.

“Great spirits have often encountered violent
opposition from weak minds”.

Albert Einstein

RESUMO

BASTOS, Jessica (2008). *Estudo Comparativo de Sistemas a base de Lasers, LEDs e Ultra-som (US) de Baixa Intensidade no Reparo Tecidual de Tendão Calcâneo*. 89p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós Graduação Interunidades em Bioengenharia - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

Um dos recursos mais utilizados no processo de reparo de lesões tendíneas é o laser que demonstrou ter resultados satisfatórios quando se buscam efeitos antiinflamatório e cicatrizante. No entanto, por requerer uma tecnologia de alto custo, um outro tipo de fototerapia vem sendo buscado, como o diodo emissor de luz, LED. Porém, o número de pesquisas realizadas para a determinação segura de seus efeitos terapêuticos ainda é muito pequeno, inviabilizando uma proposta de protocolo para adoção do LED. Um outro recurso também utilizado durante a reabilitação de lesões tendíneas é o ultra-som pulsado de baixa intensidade (LIPUS). Trabalhos realizados até o momento mostram alterações satisfatórias quanto à deposição e alinhamento das fibras de colágeno. Este estudo objetiva testar comparativamente a eficácia da aplicação de LEDs 630 nm e 830 nm em relação à terapia laser de baixa intensidade (LILT), com laser 685 nm e 830 nm, e à terapia com LIPUS em tendão calcâneo parcialmente lesado. Foram utilizados 56 ratos Wistar, submetidos à lesão mecânica parcial do tendão calcâneo. A análise da evolução do processo foi realizada através da microscopia de polarização. Os resultados mostraram uma real eficácia dos tratamentos com LEDs e lasers, e uma ineficácia do tratamento à base de US. Nosso estudo sugere que uma boa organização e um bom alinhamento das fibras de colágeno são conseguidos no processo de reparo de lesões tendíneas através de aplicações à base de LED 880nm e laser 630nm, os quais se mostraram mais eficazes. No entanto, outras pesquisas na área se fazem necessárias para uma determinação segura e eficaz dos protocolos de tratamento utilizando essa modalidade de fototerapia.

Palavras-Chave: lesão tendínea, fototerapia, ultra-som.

ABSTRACT

BASTOS, Jessica (2008). *Comparative study of Laser, LED and US systems of low intensity applied to tendon healing*. 89p. M.Sc. Dissertation. Programa de Pós Graduação Interunidades em Bioengenharia - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

Laser is one of the most effective resources of treatment for tendinous injury when anti-inflammatory and cicatrizing effects are wanted. However, it is considered an expensive treatment and so, an alternative and cheaper light therapy as effective as it has been searched and the light emitting diodes, LEDs, are a promising candidate for it. Results from the studies already done have been useful to predict the possible effects of LED on the injured tissues, but are not enough to establish a treatment protocol that guarantees its safe recommendation as a substitute therapeutic tool for tendinous injury treatment. Another promising resource for tendinous injury healing is the ultra-sound of low intensity (LIPUS). Studies done until the present moment have shown satisfactory results when deposition and alignments of collagens fibers are wanted. The aim of this study was to compare de effects of laser, light emitting diodes (LEDs) and ultra-sound of low intensity on the treatment of Achilles tendon of albino rats, Wistar lineage, exposed to mechanical trauma. The experimental model consisted of a partial mechanical lesion of the right Achilles tendon of 56 rats, which were divided in 6 groups, 5 with 10 animals and one, the control group, with 6. One hour after the lesion, the injured animals received the respective applications of laser, LED or US, and the same procedure was repeated each 24h. The healing process and the deposition were evaluated by analyze of the alignment of collagens fibers through polarization microscopy. The results showed a real efficiency of treatments based on LEDs and lasers, but the treatment based on US was inefficient. Applications of laser at 830 and LED 880nm were more efficient when the aim is a good organization and alignment of the collagen fibers on tendon healing. However more research is needed for a safety and more efficient determination of a protocol.

Keywords: tendon healing, phototherapy, ultra-sound.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE APÊNDICES

LISTA DE ABREVIACÕES

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	13
1.1. Introdução.....	13
2. TECIDO TENDÍNEO.....	13
3. LED	29
1.2 Objetivos	47
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
2.1 Materiais e Equipamentos	48
<i>Animais de Experimentação</i>	48
<i>LED</i>	48
LASER.....	49
ULTRA-SOM	50
2.2 INDUÇÃO DA LESÃO	51
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	59
6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES	82
Conclusões.....	82
Sugestões.....	83
APÊNDICES	97

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura do tendão.	14
Figura 2 – Vista posterior do tendão Calcâneo – à direita tem-se o tendão normal, não lesado, e à esquerda o aspecto de uma lesão nesta estrutura.	16
Figura 3 – Estrutura microscópica das fibras tendíneas – à esquerda aspecto das fibras não lesadas, e à direita, fibras após lesão.	18
Figura 4 – Esquema de uma cavidade ressonantica ou óptica.	29
Figura 5 – Esquema da estrutura de um LED.....	30
Figura 6 – Aparelho utilizado para aplicações de LED.....	49
Figura 7 – Máscara utilizada para redução do feixe de LED durante as aplicações do tratamento.	49
Figura 8 – Aparelho utilizado para as aplicações de laser.....	50
Figura 9 – Aparelho lesionador.....	52
Figura 10 – Tendão calcâneo sendo retirado.....	55
Figura 11 – Tendão sendo lavado em soro fisiológico.....	55
Figura 12 – Dispositivo utilizado para lavagem do material.....	56
Figura 13 – Dissecção do tendão calcâneo.....	60
Figura 14 – Aspecto macroscópico dos tendões no décimo dia.....	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 15 – Grupo Controle.....	64
Figura 16 – LED Infravermelho.....	64
Figura 17 – LED Vermelho.....	64
Figura 18 – Laser Infravermelho.....	65
Figura 19 – Laser Vermelho.....	65
Figura 20 – Ultra-som	65
Figura 21 – Médias e Desvios Padrão dos retardos ópticos quinto dia.....	67
Figura 22 – Médias e Desvios Padrão dos retardos ópticos décimo dia.....	68
Figura 23 – “Linha do tempo”	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tabela de comparações múltiplas entre os valores de retardo óptico dos subgrupos do quinto dia.....	68
Tabela 2 – Tabela de comparações múltiplas entre os valores de retardo óptico dos subgrupos do quinto dia.....	69
Tabela 3 – Tabela de comparações múltiplas entre os valores de retardo óptico dos subgrupos do quinto dia.....	69
Tabela 4 – Tabela de comparações múltiplas entre os valores de retardo óptico dos subgrupos do décimo dia.....	70
Tabela 5 – Tabela de comparações múltiplas entre os valores de retardo óptico dos subgrupos do décimo dia.....	70
Tabela 6 – Tabela de comparações múltiplas entre os valores de retardo óptico dos subgrupos do décimo dia.....	71
Tabela 7 – Comparação entre o grupo GC do décimo dia com os grupo LEDIV e LEDV referentes à porcentagem de aumentos do OR (nm).....	71

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A: Valores das Médias e dos Desvios Padrão do retardo óptico (OR) das fibras de colágeno dos tendões calcâneos dos animais.....	99
Apêndice B: Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal.....	100
Apêndice C: Parâmetros de Biossegurança para uso do laser/LED	101

LISTA DE ABREVIações

US: Ultra-som.

LIPUS: Ultra-som pulsado de baixa intensidade

LED: Light Emitting Diode – Diodo Emissor de Luz.

LEDIV: Diodo Emissor de Luz Infravermelha.

LEDV: Diodo Emissor de Luz Vermelha.

LIV: Laser Infravermelho.

LV: Laser Vermelho.

GC: Grupo Controle.

GN: Grupo Normal.

LILT: Terapia Laser de Baixa Intensidade.

LEDT: Terapia com Diodo Emissor de Luz.

Capítulo 1

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1. INTRODUÇÃO

TECIDO TENDÍNEO

- **Definição**

Tendões são estruturas anatômicas brancas e brilhantes localizadas entre os músculos e os ossos, de textura fibroelástica que lhes dá uma grande resistência a cargas mecânicas (Khan et al., 1999; Stolinski, 1995). Sua principal função é transmitir a força gerada nos músculos para os ossos, possibilitando a realização de movimentos tanto voluntários quanto involuntários, de uma maneira harmônica e eficaz. Apresentam a maioria de suas fibras elásticas, de acordo com Culaw et al. (1999), alinhadas em paralelo a um eixo longitudinal, capacitando-as a resistir principalmente a forças unidirecionais. No entanto, há também fibras que se orientam longitudinalmente, transversalmente e horizontalmente, de modo a oferecer um máximo de resistência a forças de tração originadas nos músculos e que são transmitidas para os ossos através dos tendões (Junqueira & Carneiro, 1990). Sua complexa estrutura lhes confere uma grande capacidade de equilibrar forças longitudinais, transversais, horizontais e rotacionais

durante a realização de movimentos articulares (JÓZSA & KANNUS, 1997).

Uma estrutura de tecido conjuntivo frouxo denominada paratendão pode apresentar-se circundando alguns tendões como o calcâneo e o patelar; ela permite o livre movimento do tendão com as demais estruturas adjacentes (JÓZSA & KANNUS, 1997).

- **Arquitetura interna dos tendões**

Os tendões apresentam uma estrutura formada por fibroblastos e matriz extracelular, na qual se encontram proteínas fibrosas de colágeno e elastina, proteoglicanas, glicoproteínas e mucopolissacarídeos. O principal componente desta matriz é o colágeno, o qual apresenta-se numa porcentagem de 86% a 95% no peso úmido do tendão. As fibras colágenas apresentam-se normalmente organizadas em fascículos de fibras, contendo unidades menores denominadas fibrilas; a disposição destas fibras no tendão depende do processo de maturação a que foram submetidas (ENWEMEKA & SPIELHOLZ, 1992).

Figura 1: Estrutura do tendão. Fonte: www.aafp.org/afp/20050901/811_f2.jpg

- **Vascularização tendínea**

Apenas em 1916 é que se constatou, através de Mayer, que os tendões apresentam um padrão bem organizado de vasos sanguíneos, tanto intra quanto peritendíneos, recebendo suprimento de sangue de 3 lugares:

- vasos oriundos de músculos adjacentes
- vasos do osso e do periósteo da junção osteotendínea
- vasos provenientes do paratendão, mesotendão e bainha sinovial

Alguns tendões, como o calcâneo, não apresentam bainha sinovial sendo, nesses casos, o paratendão o local de maior importância para um suprimento sangüíneo eficaz. É através do paratendão que pequenos vasos originam-se e correm transversalmente até ramificarem-se repetidas vezes, tornando-se longitudinais e transversais nos fascículos do tendão. Essas ramificações arteriais penetram transversalmente e obliquamente no epitendão e correm no endotendão, formando assim, a cadeia vascular intratendínea (JÓZSA & KANNUS, 1997).

- **Tendão calcâneo**

O tendão calcâneo faz a inserção dos músculos gastrocnêmio e sóleo (tríceps sural) na porção médio – posterior do osso calcâneo, através de uma rígida expansão fibrocartilaginosa. Apresenta-se largo em sua origem e mais estreito e irregular em sua porção distal. Sua estrutura normal é formada por fibras colágenas orientadas longitudinalmente com poucos fibroblastos e algumas fibras de elastina entre seus feixes (Enwemeka, 1989). Este tendão é capaz de absorver forças no plano sagital (flexão dorsal e plantar) e no plano frontal (inversão e eversão), sendo sua resistência definida pela densidade numérica, organização e arranjo das fibrilas dentro do tecido (Enwemeka et al., 1988; Józsa & Kannus, 1997). A morfologia ondulada encontrada no estado de repouso de suas fibras colágenas é perdida quando temos um estiramento de cerca 2% do comprimento do tendão (STOLINSKI, 1995; REYNOLDS & WORRELL, 1991).

A vascularização desta estrutura, por ser delicada, apresenta zonas críticas com pouco suprimento, o que possivelmente contribui para a ocorrência de rupturas. Sua parte central

recebe cerca de 35% do suprimento sanguíneo proveniente do sistema vascular extrínseco. Sua porção proximal, em humanos, é irrigada por pequenas ramificações da artéria tibial posterior, enquanto que sua porção distal é vascularizada pelas artérias fibulares (ZANTOP, et al., 2003).

Uma das razões que levam o desenvolvimento de tendinites, tendinoses e rupturas espontâneas está no fato de que o número de vasos intratendíneos, assim como seus diâmetros, diminuem das partes distais até proximais do tendão, tornando a irrigação escassa, e o tecido mais suscetível a processos degenerativos e rupturas (JÓZSA & KANNUS, 1997).

Figura 2: Vista posterior do tendão Calcâneo – à direita tem-se o tendão normal, não lesado, e à esquerda o aspecto de uma lesão nesta estrutura. Fonte:

eorthopod.com/images/ContentImages/foot/foot_achilles/foot_achilles_tendon_anatomy01a.jpg

- **Ruptura do tendão calcâneo**

Este tipo de lesão, além de ser um das mais graves, é também o mais comum dentre as lesões tendíneas. Rupturas do calcâneo podem ocorrer de uma forma parcial ou total, sendo que a primeira apresenta uma maior incidência em atletas de elite, entre 20 e 40 anos de idade,

e a segunda, é mais comum em homens de meia idade, envolvidos com atividades recreacionais. Vale dizer que as lesões ocorrem, em sua grande maioria, como resultado de excesso de uso (*overuse*) e tendinite crônica (BARRY & MCGUIRE, 1996).

Nos esportes, a maior frequência de rupturas dessa estrutura se dá entre os futebolistas e em esportes de alto impacto, como a corrida e o salto; isso porque esses tipos de atividades ocasionam um grande estresse ao tendão durante a contração muscular excêntrica do tríceps sural. Entre os tenistas e as bailarinas esse tipo de lesão é bem menos frequente (SALOMÃO et al., 1993; REYNOLDS & WORRELL, 1991).

Microtraumas repetitivos e sobrecargas de trabalho sobre o tecido tendíneo induzem a ruptura total ou parcial do tendão a qual é, normalmente, precedida por inflamação e alterações degenerativas, implicando numa redução do fluxo sanguíneo com conseqüente hipóxia local (ALMEKINDERS & DEOL, 1999; SOMA & MANDELBAUM, 1995; SALOMÃO et al., 1993).

Mudanças biomecânicas importantes no tendão ocorrem com o avanço da idade, as quais estão relacionadas a uma degeneração colagenosa. A elastina e as proteoglicanas da matriz extracelular diminuem, a quantidade de água declina e o conteúdo de colágeno aumenta, levando a uma perda da elasticidade do tecido como um todo. Um fator agravante, e que determina um retardo no processo de reparo tendíneo, está no fato de que, com o avanço da idade, a renovação do colágeno também é reduzida (KANNUS & JÓZSA, 1991).

Figura 3: Estrutura microscópica das fibras tendíneas – à esquerda aspecto das fibras não lesadas, e à direita, fibras após lesão. Fonte: www.aafp.org/afp/20050901/811_f2.jpg

- **Processo de reparo tecidual**

Em uma lesão tecidual, seja qual for a sua origem, há a ativação de vários mecanismos, cujo objetivo principal é sempre o reparo adequado das estruturas envolvidas. Todo o complexo das alterações teciduais observadas é denominado *inflamação*. (GUYTON & HALL, 2002; JÓZSA & KANNUS, 1997).

O processo de reparo tendíneo segue a seguinte sucessão de eventos (GUYTON & HALL, 2002; CHAN et al., 1997):

- Proliferação e migração de vários tipos de células;
- Angiogênese para a formação do tecido de granulação;
- Síntese de colágeno;
- Orientação altamente organizada das células tendíneas e das fibras colágenas como tentativa de restaurar a estrutura e a função do tecido lesado.

O tendão, por ser um tecido com uma vascularização pobre e, conseqüentemente, com baixa nutrição e oxigenação, apresenta uma baixa capacidade de reparação tecidual. No entanto, quando esse tecido lesado é estimulado por meios biofísicos apropriados (laser, p.e.), tem-se uma adequada cicatrização (ENWEMEKA & REDDY, 2000; PARIZOTTO, 1998).

O processo de reparação tecidual pode ser, didaticamente, dividido em 3 diferentes fases que, na prática, não são separadas e sim, sobrepostas (ENWEMEKA & SPIELHOLZ, 1992; KUSCHNER et al., 1991):

- Fase inflamatória (1 – 7 dias)
- Fase neoangiogênica e proliferativa (5 – 21 dias)
- Fase de remodelamento (14 – 360 dias)

No tendão, ocorre uma intensa proliferação de fibroblastos, síntese de fibrilas de colágeno e alinhamento das fibras no eixo longitudinal nas 2 últimas fases, sendo estas, portanto, de fundamental importância para um reparo adequado desta estrutura (ENWEMEKA, 1989).

- ***Fase inflamatória (1 – 7 dias pós - lesão)***

A fase inflamatória ocorre imediatamente após o trauma, sendo desencadeada por ruptura de vasos sanguíneos no local da lesão, com conseqüente extravasamento de fluidos teciduais para a área lesada (Józsa & Kannus, 1997; Gigante, 1996). O estágio inicial inflamatório caracteriza-se por vasodilatação dos vasos sanguíneos locais, aumento da permeabilidade dos capilares, imigração de inúmeros granulócitos e monócitos para o tecido e edema das células. A infiltração celular ocorre nas primeiras 24 horas e continua por poucos dias (Guyton & Hall, 2002; Pereira, 1994; Reed & Zarro, 1990). Vale dizer que dentro das primeiras 24 a 48 horas é que ocorre a chamada “fase inflamatória aguda”, e nela podemos observar, clinicamente, ao redor da região lesada, aumento de temperatura (calor), rubor e edema (GOGIA, 1995; COTRAN et al., 1994).

Após o trauma, as plaquetas se reúnem ao redor do epitélio dos vasos lesados e ao colágeno exposto, estimulando o mecanismo de coagulação através da liberação de fosfolipídios. A hemorragia local é estancada devido à formação de uma estrutura de fibrinas

e fibronectinas ligadas trasversalmente ao colágeno, funcionando como resistência a forças de tensão durante a fase inicial de reparo. Esse processo ocorre como um mecanismo para isolar a área lesada dos demais tecidos remanescentes, e retardar a disseminação das bactérias ou dos produtos tóxicos (Guyton & Hall, 2002; Józsa e Kannus, 1997). A vasodilatação inicial determina um excesso de fluxo sanguíneo para o local, aumentando a pressão hidrostática; desta forma, ocorre um aumento da permeabilidade vascular em resposta à liberação de fatores químicos como a histamina, presente nas plaquetas, mastócitos e leucócitos granulares, e a bradicinina, que em fases mais tardias da inflamação, vai estimular a liberação de prostaglandinas. Pode-se dizer que prostaglandinas PGE – 1 aumentam a permeabilidade vascular, e a PGE – 2 atraem leucócitos (JÓZSA e KANNUS, 1997; REED & ZARRO, 1990).

Os neutrófilos (leucócitos polimorfonucleares), originados dos capilares ainda escoantes, são as primeiras células a migrarem para o sítio lesado; são elas que iniciam a ingestão de contaminantes e fragmentos produzidos pelo ferimento, processo esse que permanece por 24 horas após a ocorrência do trauma (Enwemeka & Spielholz, 1992). O processo de fagocitose é potencializado cerca de 1 a 2 dias após a lesão, através da chegada dos monócitos (leucócitos mononucleares) que, ao penetrarem no sítio de lesão, atraídos por citocinas liberadas pelos neutrófilos, transformam-se em macrófagos teciduais e passam a atuar junto com os primeiros (GUYTON, 2002; GOGIA, 1995; ENWEMEKA, 1989).

Os macrófagos estão presentes na maior parte da fase de reparo, sendo eles os responsáveis pela fagocitose do sangue extravasado, dos produtos da destruição tecidual não solubilizados pelos neutrófilos e dos neutrófilos mortos restantes na área lesada. São eles também que secretam fatores de crescimento e fibronectina determinando, desta forma, a quimiotaxia dos fibroblastos, a migração e fixação dessas células no local da lesão e sua

conseqüente proliferação. Na área lesada também temos a presença de fibroblastos que, ao interagirem com os macrófagos, regulam a fase inflamatória e o processo de remodelamento da matriz extracelular (KAKAR et al., 1998).

Além da ativação do processo inflamatório, a lesão também ativa outro aspecto da fase inflamatória, que é a resposta imune - esta é formada por linfócito T e B, produtos do tecido linfóide, que vão atuar na destruição de microorganismos e toxinas específicas. Os linfócitos B (produtores de anticorpos) agem através do sistema complemento, neutralizando ou destruindo os antígenos, enquanto os linfócitos T, responsáveis pela rejeição de órgãos transplantados, secretam a interleucina – 2 que potencializa a ação dos linfócitos B (GUYTON & HALL, 2002; ROITT et al. (1985), citados por PARIZOTTO, 1998).

As células da fase inflamatória atuam na remoção de tecido necrótico e microorganismos localizados na área lesada, processo esse que dura cerca de 5 a 7 dias pós- lesão, dando-se início, então, à fase proliferativa (JÓZSA & KANNUS, 1997).

- ***Fase neoangiogênica e proliferativa (5 – 21 dias pós – lesão)***

Esta fase é caracterizada pela chegada de fibroblastos, miofibroblastos e células endoteliais, atraídas por fatores de crescimento liberados pelas plaquetas e macrófagos teciduais, os quais também estimulam a proliferação das mesmas (KAKAR et al., 1998 JÓZSA & KANNUS, 1997).

A ativação angiogênica (formação de novos capilares sanguíneos) é de fundamental importância para o processo de reparação tendínea, uma vez que após a lesão, seu suprimento vascular é drasticamente reduzido. A angiogênese ocorre através de ramificações de microvasos pré-existent, estimulados por vários fatores como o fator de crescimento dos fibroblastos (FGF), ácido láctico e baixa quantidade de oxigênio (Baxter, 1994), constituindo

um processo morfogênético e que caracteriza a reconstituição do suprimento vascular em tecidos adultos em processo de remodelação (Zhang et al., 2003; Battegay, 1995). Esta fase é de fundamental importância para a formação do tecido de granulação e para o restabelecimento da integridade vascular da área lesada, restaurando a oxigenação e a nutrição adequada do novo tecido e melhorando, assim, a demanda metabólica local, permitindo a continuação da síntese, divisão, migração e crescimento celular (PETERSEN et al., 2003; AGAIBY et al., 2000).

Um importante mediador da angiogênese é o fator de crescimento básico dos fibroblastos (bFGF) o qual, além de possuir uma grande função no processo de reparo tendíneo, é capaz de induzir a migração e a proliferação de células endoteliais ao local da lesão (Chang et al., 1998; Nissen et al., 1996). O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) também apresenta uma considerável importância por estimular a atividade mitogênica local direta nas células endoteliais de artérias, veias e vasos linfáticos, além de poder iniciar a produção de outros fatores de crescimento no reparo tendíneo, como o TGF – β , e aumentar a proliferação fibroblástica (ZHANG et al., 2003; BOYER et al., 2001; BIDDER et al., 2000).

A regulação da proliferação dos fibroblastos e a síntese de colágeno, a indução de ativadores plasminogênicos e collagenases no remodelamento do tendão e a facilitação da migração e proliferação de células endoteliais na angiogênese são feitas, segundo Chan et al. (1997), pelos fatores de crescimento fibroblásticos FGF β e FGF2. O FGF β é uma citosina com várias atividades biológicas, incluindo o recrutamento de fibroblastos e macrófagos e, principalmente, o estímulo da produção de colágeno.

Os miofibroblastos são fibroblastos que adquiriram características ultraestruturais, funcionais, imunológicas e químicas. Estes apresentam em seu interior uma grande quantidade de microfilamentos de actina e miosina, capazes de se contrair e de se mover,

contribuindo, desta forma, para a retração da região cicatricial. Além disso, também são capazes de secretar uma grande variedade de substâncias como colágeno, fibronectina, elastina, ácido hialurônico, glicosaminoglicanas e mucopolissacarídeos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1990; PARIZOTTO, 1998).

Um tecido conjuntivo frouxo, ricamente vascularizado, composto de uma combinação de novos capilares, fibroblastos, miofibroblastos, matriz extracelular formada por fibras colágenas finas (principalmente colágeno tipo III), ácido hialurônico e moderada quantidade de proteoglicanas, preenche a área lesada, recebendo o nome de tecido de granulação (JÓZSA & KANNUS, 1997; PEREIRA, 1994).

Por volta do 14^o dia ocorre o pico da deposição de colágeno onde se observa, além do início da predominância do colágeno tipo I sobre o tipo III, uma redução da síntese de glicosaminoglicanas, especialmente do ácido hialurônico, e a lise de algumas fibras, agregação e aumento de outras, resultando num intenso processo de remodelamento (ENWEMEKA & SPIELHOLZ, 1992).

O tecido de granulação passa a ter uma constituição progressivamente mais densa e menos vascularizada durante o processo de fibrilogênese, onde também ocorre um espessamento e aumento de número das fibras de colágeno, e desaparecimento das células fagocitárias (Enwemeka, 1989). No entanto, vale dizer que o processo de contração cicatricial continua no intuito de aproximar ainda mais as bordas da área lesada, seguindo uma taxa uniforme de 0,6 nm a 0,75 nm ao dia, variando de acordo com o estado de nutrição do tecido (GOGIA, 1995).

Após um período de 21 dias de reparo tecidual, tem-se um remodelamento progressivo do colágeno, caracterizado por um aumento das ligações cruzadas intermoleculares, o que torna o tecido mais resistente, organizado e com um maior alinhamento das fibras no eixo

longitudinal do tendão, o qual pode ser observado através da microscopia eletrônica (GIGANTE, 1996; ENWEMEKA & SPIELHOLZ, 1992; ENWEMEKA 1989).

- ***Fase de remodelamento (14 – 360 dias pós – lesão)***

Nesta fase, que se inicia por volta da 2ª semana de cicatrização e se estende por um período de um ano ou mais em rupturas totais (Tillman & Cummings, 1992) e cerca de 30 semanas em tenotomias parciais (Postacchini & De Martino, 1980), a cicatriz contém fibras colágenas bem organizadas, passando de predominantemente celular para fibroso (3% de componentes celulares e 97% de fibras colágenas) (Enwemeka & Spielholz, 1992). O tecido lesado apresenta-se mais resistente em decorrência do remodelamento do colágeno, principalmente do colágeno tipo I, o qual apresenta fibras compactas e espessas por volta do 60º dia, e do aumento das ligações cruzadas entre as moléculas (PEREIRA, 1994).

O processo de reparação tecidual ocorre como uma tentativa do organismo de reconstituir a morfologia dos tecidos destruídos em consequência do processo inflamatório, e dar maior funcionalidade aos mesmos. Em geral, há um equilíbrio entre os processos de degradação e formação de colágeno (Parizotto, 1998). De acordo com Józsa & Kannus (1997), o tecido tendíneo lesado nunca conseguirá atingir a morfologia e a função biomecânica de tendões normais. Entretanto, Parizotto (1998) afirma que 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.

- **Cicatrização intrínseca e extrínseca do tendão**

Em relação ao processo de cicatrização do tendão, existem 3 teorias que tentam explicar seu mecanismo: a cicatrização intrínseca, a extrínseca e a combinada. No entanto, ainda não se tem evidências clínicas que indiquem qual delas é a correta.

- *Cicatrização intrínseca*

Neste mecanismo o tendão é reparado através da proliferação de células do endotendão e do epitendão, sendo o suprimento vascular intratendíneo, não havendo necessidade de formação de adesões (Józsa e Kannus, 1997; Gelberman et al., 1985). Os experimentos que tentam demonstrar esse processo excluem completamente a fonte celular extrínseca, o suprimento sanguíneo externo e o fluido sinovial, deixando apenas as estruturas internas do tendão (Manske & Lesker, 1984). Desta forma, foi observado que os fibroblastos do epitendão se transformam e ficam responsáveis pelo processo de fagocitose, enquanto as células do epitendão e do endotendão sintetizam o colágeno. A vascularização intratendínea é de fundamental importância uma vez que a nutrição sinovial não é suficiente para nutrir o tecido durante o processo de cicatrização intrínseca (GELBERMAN et al., 1985; MANSKE et al., 1984).

- *Cicatrização extrínseca*

Nessa teoria é considerado que o tendão não apresenta capacidade de reparar-se sozinho, requerendo a formação de adesões, migração e infiltração de células inflamatórias e fibroblastos e suprimento sanguíneo externo (Kakar et al., 1998). A fagocitose é realizada por macrófagos com uma importante participação dos fibroblastos. Potenza (1978), citado por Józsa & Kannus (1997), afirma que o reparo em um tendão suturado e imobilizado ocorreu devido ao crescimento do tecido de granulação, o qual era derivado de estruturas vizinhas. Já Takasugi et al. (1976), citados pelos mesmos autores acima, defendem que a cicatrização tendínea ocorreu pelo tecido tenosinovial, no qual células fibroblásticas cobriram e cicatrizaram a área lesada.

Uma vez que tem-se a produção de fatores de crescimento, como o fator de crescimento

beta transformador I (TGF β -I), no tecido sinovial, diz-se que a sinóvia possui um papel dominante na iniciação e perpetuação da formação cicatricial do tendão no início do reparo, uma vez que é nela, ou no epitendão externo, que a ativação celular tem-se mostrado mais intensa quando comparada ao endotendão (KAKAR et al., 1998).

- ***Cicatrização intrínseca e extrínseca (combinada)***

Alguns autores argumentam que ambos os processos ocorrem concomitantemente no processo de reparo tendíneo, uma vez que um não exclui o outro. Lundborg et al. (1985) e Manke & Lesker (1984) observam que ao haver preservação da microcirculação intratendínea e do fluido sinovial através de técnicas de suturas adequadas e reconstrução da bainha sinovial, os tenócitos, por meios de expressões gênicas, determinam uma cicatrização intrínseca. No entanto, ao se ter uma nutrição tendínea prejudicada devido técnicas de sutura inadequadas ou ressecção da bainha sinovial, a cicatrização do tecido tendíneo é feita através de mecanismos extrínsecos.

Em geral, é mais plausível afirmar que ambos os mecanismos ocorrem, havendo, de acordo com as condições da lesão, predominância de padrão intrínseco ou extrínseco. Tal predominância é determinada de acordo com a localização do tecido, magnitude do trauma, suprimento sangüíneo e grau de mobilização do tendão (LUNDBORG et al., 1985).

LASER

A palavra *laser*, acrônimo para “*Light Amplification by the Stimulated Emission of Radiation*” (Amplificação da Luz pela Emissão Estimulada de Radiação), significa uma fonte de luz coerente de um feixe estreito monocromático nas faixas visível, infravermelho e ultravioleta do espectro.

Os diversos tipos de lasers diferem entre si pelo comprimento de onda e pela natureza do

meio ativo; a semelhança está no princípio básico para a produção de um feixe de laser (Kitchen & Partridge, 1991). Lasers de gás e com comprimentos de onda entre 630 nm e 1300 nm (faixa do visível ao infravermelho) são os mais utilizados nas aplicações de LLLT (terapia laser de baixa potência), sendo conhecidos como “janela terapêutica” para tecidos biológicos (KITCHEN e PARTRIDGE, 1991; MAILLET, 1987).

A radiação emitida pelo laser terapêutico possui características que a diferem dos demais tipos de aparelhos devido aos seguintes aspectos principais:

- Monocromaticidade: a luz emitida apresenta apenas um comprimento de onda (LOW & REED, 2001; BAXTER, 1997; KITCHEN & BAZIN, 1996).
- Coerência: em uma radiação laser temos não só um único comprimento de onda, mas também picos e vales (depressões) dos campos elétricos e magnéticos ocorrendo ao mesmo tempo (coerência temporal) e “viajando” numa mesma direção (coerência espacial).
- Colimação: os feixes de laser permanecem sempre paralelos em consequência da coerência espacial, o que resulta em uma inexistência de divergência da radiação durante sua propagação ao longo de grandes distâncias. (LOW & REED, 2001; TUNÉR e HODE, 1999)

Princípios físicos do laser

De acordo com a teoria quântica, um elétron pode ocupar apenas uma das camadas, ou órbitas, que envolvem o núcleo, sendo que aquele que está posicionado mais externamente é o mais suscetível a ser atingido por fenômenos externos. Se um átomo recebe uma carga adicional de energia, os elétrons mais externos deslocam-se para órbitas de energia superiores e, caso se tenha um acréscimo progressivo da mesma, um desses elétrons pode ser capaz de se “libertar” da força atrativa que o núcleo exerce sobre ele. Desta forma, o átomo se torna um

íon positivamente carregado, e o elétron uma carga livre de energia negativa.

Entretanto, os elétrons que se encontram com uma carga adicional de energia tendem a retornar para seus níveis energéticos mais baixos, ou até mesmo para níveis mais estáveis e basais. Para tanto, eles liberam a energia adicional recebida, o que é feito através da emissão de um fóton de radiação, processo esse chamado de *emissão espontânea de radiação*. Os fótons liberados seguem uma trajetória ondulatória, conhecida como comprimento de onda, o qual depende da diferença energética existente entre o nível do qual o elétron saiu e do que ele entrou. Tal processo caracteriza a produção de luz por fontes não lasers. (LOW & REED, 2001; BAXTER, 1997; MAILLET, 1987).

Ao se ter um átomo em um estado excitado, os elétrons podem não conseguir liberar facilmente / espontaneamente a energia adicional absorvida; nestes casos, uma colisão com um fóton incidente se torna necessária, alterando o complexo energético através da interação molecular, causando excitação e caracterizando a emissão estimulada presente nos aparelhos de laser. Elétrons retornando aos seus níveis estáveis emitem fótons com um característico comprimento de onda, o qual está relacionado com a diferença existente nos níveis de energia entre os estados excitados e em repouso do elétron. O fóton de luz emitido apresenta as mesmas propriedades do fóton incidente. Através da rápida excitação do meio, ocasionada pelo aumento do número de colisões entre os fótons liberados e os elétrons carregados, teremos um efeito de amplificação, gerando uma grande quantidade de fótons idênticos (LOW & REED, 2001; KITCHEN & BAZIN, 1996, BAXTER, 1997).

Para se ter um perfeito funcionamento do laser faz-se necessária a presença de uma *inversão de população*, ou seja, tem que se ter um número de átomos excitados maior do que os em equilíbrio energético, tornando possível uma liberação eficiente de fótons. A transição dos elétrons de um nível de energia para outro gera diferentes comprimentos de onda, sendo a

frequência de emissão dos fótons determinada pela diferença de energia entre os níveis. Quanto maior for a diferença, menor será o comprimento de onda e mais alta a frequência de emissão dos fótons (LOW & REED, 2001).

Fig. 4: Esquema de uma cavidade ressonância ou óptica.

LED

O termo LED é um acrônimo para *Light Emitting Diode* (Diodo Emissor de Luz), onde dois diferentes compostos semicondutores emitem luz ao reagir com uma determinada tensão aplicada. Esse tipo de fonte de luz, descoberto nos anos 70, por ser mais barato e ter vida útil geralmente mais longa que a dos lasers, apresenta uma vantagem real em relação ao seu desempenho, quando comparado a outros tipos de luz.

No LED o diodo de junção é formado por dois tipos de materiais semicondutores, sendo um do tipo P e outro do tipo N, dispostos em 2 regiões diferentes. Cada uma dessas regiões é dopada com impurezas para dar-lhes as características elétricas desejadas, sendo que a região P tem impurezas caracterizadas por serem empobrecidas de elétrons, criando “buracos”, e a região N é enriquecida com elétrons, sendo portanto dopada de impurezas doadoras de elétrons. Uma pequena corrente elétrica é aplicada através do diodo semicondutor, fazendo

com que uma tensão contínua externa flua através da junção. A aplicação de uma voltagem positiva na região P e uma negativa na região N faz com que os elétrons e os “buracos” fluam em direção à junção onde ocorre um processo de combinação, chamado de recombinação. Em muitos LEDs a energia de recombinação é liberada na forma de um fóton de luz, que pode emergir do material semiconductor. Há também a possibilidade da energia ser dissipada na forma de calor, o que acontece em semicondutores de silício e germânio.

Ao se ter um elétron caindo de um nível de condução (banda de elétrons livres) para um nível de valência (banda de elétrons reunidos), temos a liberação da diferença existente em forma de energia entre os dois níveis (banda intermediária). A quantidade de energia liberada e o comprimento de onda emitido dependem da composição do semiconductor e, portanto, da diferença da banda intermediária entre os dois níveis de energia. As principais diferenças entre o LED e o laser estão no fato de o LED não apresentar coerência e colimação de seus feixes luminosos. Este fato se dá em virtude da ausência de uma cavidade óptica, mas essa ausência não interfere na banda do espectro eletromagnético gerado, a qual é próxima a do laser.

Figura 5: Esquema da estrutura de um LED.

A potência do LED durante uma aplicação depende do ângulo no qual a luz é emitida, do tamanho da área de emissão de luz, do alinhamento da fonte e da fibra e das características de coleta de luz da fibra, variando diretamente com a corrente de entrada (modulação direta). Um laser e um LED feitos do mesmo material podem ter um mesmo comprimento de onda central, mas o LED tem uma largura espectral mais ampla (Hechy, 1993). Desta forma, um maior número de cromóforos mitocondriais, os quais absorvem energia em um comprimento de onda próximo do central, variando de alguns nanômetros, podem também absorver a energia luminosa que está sendo irradiada na área lesionada, potencializando ainda mais as reações do processo de cicatrização, tendo-se uma maior eficácia no reparo da lesão.

A cor de um LED depende da estrutura e da composição da junção P-N, ou seja, os materiais que compõe as duas regiões determinam o nível de energia disponível durante a carga de recombinação na região da junção, e conseqüentemente, determinam também o comprimento de onda da luz emitida. Dentre as várias cores de LED, temos:

- Vermelho: essa variedade de LED apresenta um comprimento de onda de 633 +/- 35 nm, sendo seu semicondutor composto de índio-gálio-alumínio-fósforo (AlGaInP).
- Infravermelho: com um comprimento de onda de 880 +/- 30 nm, seu semicondutor é formado por gálio-alumínio-arseneto/ gálio-arseneto (GaAlAs/GaAs).
- Azul: composto por gálio-nitrogênio/silício-carbono (GaN/SiC), apresenta um comprimento de onda de 470 +/- 25 nm. Tem uma ampla utilização na área de odontologia.

Pesquisas realizadas pela *NASA Marshall Space Flight Center – SBIR Program* com a tecnologia LED mostraram que fototerapias com o diodo emissor de luz são capazes de provocar a cicatrização de úlceras e de estimular a proliferação de células teciduais em humanos. Comprimentos de onda de 680, 730 e 880 nm demonstraram uma maior eficácia

nesses processos, ocasionando uma maior estimulação da produção de energia nas mitocôndrias de cada célula, e, no caso da emissão infravermelha, ativando os cromóforos e os citocromos celulares. Os experimentos realizados com esses 3 comprimentos de onda, combinados com a utilização de uma terapia hiperbárica de oxigênio, em fibras musculares do antebraço e da panturrilha, aplicação única de 4 J/ cm², demonstraram um aumento de 5 vezes na síntese de DNA, de fibroblastos e de células musculares. (Whelan *et al*, 2001). Na última década, pesquisadores, ainda que poucos, demonstraram que o LED terapêutico apresenta uma eficácia relevante na fotobiomodulação celular, sendo semelhante ao LILT (VINK, 2003; YOUNG *et al*, 1989).

El Sayed & Dyson (1990) realizaram uma pesquisa utilizando 21 diodos (1 laser de 820 nm e 20 LEDs de 660, 870, 880, 940 e 950 nm) aplicados em feridas induzidas em ratos Wistar, cujos resultados demonstraram uma elevada degranulação em mastócitos, principalmente quando tratados com o conjunto múltiplo de diodos monocromáticos.

Whelan *et al* (2001), através de uma análise bioquímica de feridas nos dias 0, 4, 7 e 14, após intervenção com LED, 880 nm, fluência de 4 J/ cm², perceberam que os fatores de crescimento fibroblástico básico (FGF-2) apresentavam níveis significativos em todos os dias de análise, principalmente no quarto dia, enquanto que os níveis de fatores de crescimento vascular endotelial (VEGF) eram semelhantes ao do grupo controle. Este experimento, quando comparado ao grupo controle, demonstrou resultados positivos no aumento da taxa de crescimento da cicatrização das feridas.

Quando comparado ao laser, tem-se uma grande divergência de opiniões em relação à real eficácia do LED. De acordo com a NASA os LEDs apresentam uma vantagem maior por oferecerem uma maior variedade de comprimentos de onda (variedade de cores) e por possibilitarem uma maior comodidade em tratamentos de úlceras grandes, por permitirem

uma “saída” maior de luz no aplicador, sem, no entanto, alterar os resultados positivos da terapia. Eles também listam uma série de problemas que podem ser tratados através do diodo emissor de luz: queimaduras, úlceras, fraturas, lesões musculares, feridas ocasionadas por traumas isquêmicos, entre outros. Em contrapartida, Tunér & Hode trazem em seu site (www.laser.nu - *Internet discussion about treatment with LED vs laser light*) uma ampla discussão que nos leva a crer que ainda é muito cedo para se afirmar uma possível substituição do laser pelo LED. Segundo o apresentado, apesar de alguns experimentos terem apresentado resultados positivos na terapia com LED, o número de publicações que reportam um resultado não eficaz, ou até mesmo negativo, é muito grande, não justificando, portanto, uma substituição imediata do laser pelo LED. Alguns pesquisadores que participaram da discussão defendem o LED através da argumentação de que o número de trabalhos com resultados negativos, ou não eficazes, realizados com o laser também foi grande, não sendo este, entretanto, fator determinante para que as terapias com o mesmo não fossem aceitas, amplamente aplicadas e pesquisadas.

Uma vez que o número de pesquisas realizadas com o diodo emissor de luz ainda é muito escasso, não se pode afirmar ou negar uma substituição eficaz do laser pelo LED. O conhecimento de seus efeitos terapêuticos benéficos ou maléficos ainda é muito pequeno, apesar de, em diversas áreas como a Odontologia, estar sendo amplamente utilizado e com resultados positivos.

Interação luz – tecido

Os efeitos da interação da luz (LILT e LEDT) com os tecidos são os mesmos existentes com outros tipos de radiações eletromagnéticas equivalentes, tais como reflexão, refração, dispersão e absorção. As diferenças dependem das características do tecido em questão, do ângulo de aplicação da radiação (ângulo de incidência) e do comprimento de onda (LOW &

REED, 2001; KITCHEN e PARTRIDGE, 1991).

Para se ter uma absorção máxima da radiação é necessário que a aplicação seja realizada em contato direto com o tecido, a um ângulo de 90° (ângulo reto). Dessa forma, teremos uma redução significativa da reflexão e da dispersão, tornando o tratamento mais eficaz, já que cerca de 5% a 7% da radiação incidente é refletida pela pele em casos de aplicações feitas em outros ângulos que não o reto (LOW & REED, 2001; GREATHOUSE et al, 1985; LAAKSON et al, 1993b).

Uma vez que a radiação penetra nos substratos subsequentes (93% a 97%), ela se dispersa através da reflexão interna, refração e divergência, sendo suas proporções dependentes do comprimento de onda e das características do tecido. Pode ocorrer a chamada reflexão interna múltipla, a qual está relacionada com os casos em que temos uma heterogeneidade dos tecidos profundos. Desta forma, diz-se que o grau relativo de absorção e dispersão só depende do tipo de tecido através do qual a luz está passando, já que o laser, ao penetrar, perde rapidamente a sua coerência devido ao alargamento dos feixes, provocado pela grande variabilidade de índices refrativos existentes nos componentes do tecido em questão (LOW & REED, 2001; KITCHEN & BAZIN, 1996; LAAKSON et al., 1993b; GONZÁLES e COLLIS, 1988).

Um outro fator que interfere na penetração e absorção dos feixes incidentes pelos substratos é a especificidade das biomoléculas absorventes, as quais diferem umas das outras quanto ao seu espectro de absorção (comprimento de onda capazes de absorver). A especificidade dessas biomoléculas é determinada pela presença de moléculas orgânicas fotorreceptoras, tendo-se a evidência de que comprimentos de onda entre 400 nm e 700 nm da luz laser visível são altamente absorvidos pela melanina, hemoglobina e mioglobina (BAXTER, 1997; LAAKSON et al., 1993a).

Ao se ter a absorção da luz com um determinado comprimento de onda pelas moléculas fotorreceptoras, estas adotam um estado excitado eletronicamente nos processos moleculares primários, desencadeando efeitos biológicos específicos em determinadas circunstâncias. (KARU, 1990).

Radiações com uma penetração mais profunda, como as do infravermelho próximo (904 nm), são escolhidas em casos de tratamento de estruturas subcutâneas, enquanto que lesões na pele ou feridas superficiais são tratadas por laser vermelho (comprimento de onda curto), o qual se dispersa mais e é facilmente absorvido pelas moléculas ali presentes (Low & Reed, 2001; Stolik et al., 2000). Acredita-se que para se ter uma penetração tecidual ótima nos limites do infravermelho, esta tem que ocorrer entre os comprimentos de onda de 700 nm a 1200 nm pois, segundo Karu (1998), comprimentos de onda entre 810 nm a 840 nm tem uma fraca absorção pelos cromóforos superficiais da pele, permitindo, assim, uma máxima penetração da luz. A autora defende ainda que a característica mais importante da luz não é a monocromaticidade e sim seu comprimento de onda, o qual deve estar no espectro de absorção da molécula fotorreceptora alvo, dando maior eficácia ao tratamento.

Alguns comprimentos de onda podem atingir uma profundidade maior caso haja um estímulo de respostas celulares capazes de desencadear reações a níveis teciduais mais profundos, aumentando desta forma a ação fotoquímica do laser ou do LED. Com isso, pode-se atingir estruturas com até 5 cm de profundidade, possibilitando também a ocorrência de efeitos sistêmicos (LAAKSO et al., 1993b; KITCHEN & PARTRIDGE, 1991).

Por apresentar intensidades inferiores a 200 mW/cm^2 (intensidade esta que pode variar de acordo com o parêntese), alguns autores afirmam que os efeitos do LILT e do LEDT não são baseados em mecanismos térmicos, uma vez que não determinam um aumento significativo da temperatura dos tecidos envolvidos (Wilden & Katheine, 1998; Baxter, 1997; Kitchen &

Bazin, 1996). Tal feito foi demonstrado no trabalho de Rockind et al. (1988) no qual o aumento da temperatura proporcionado pela radiação laser não foi superior a 0,1^o C, não apresentando, portanto, influência relevante na atividade celular.

Outros trabalhos como o de Basford (1989) e de Braverman et al. (1989) também mostraram um aumento não significativo na temperatura da pele durante ou após a irradiação laser, levando a crer que o efeito bioestimulante do LILT pode ser independente de um efeito termal mensurável, e dependente de uma reação fotoquímica com um componente receptivo localizado na célula a ser atingida pela radiação.

A ação fotoquímica está relacionada à capacidade de certos corpos absorverem seletivamente um ou vários comprimentos de onda do espectro das radiações eletromagnéticas. Desta maneira, estruturas celulares podem ser atingidas sem que haja maiores danos à célula como um todo (Maillet, 1987). Um exemplo disso pode ser encontrado no trabalho de Karu (1995), onde se tem que um dos possíveis mecanismos da radiação laser pode estar relacionado ao aumento de temperatura nos respectivos cromóforos absorventes, sem que seja notado, no entanto, um aquecimento celular total. O aquecimento das moléculas absorventes é local e transitório, sendo causado em virtude da conversão de uma significativa fração de energia absorvida em calor durante o estado de excitação eletrônica.

De acordo com Sandoval – Ortiz et al. (2001), a teoria fotoquímica, por ser atualmente a mais estudada e fundamentada, é a que oferece uma melhor explicação para a sensibilidade das células à luz laser e, possivelmente, à luz LED. De acordo com ela, a energia eletromagnética estimula os cromóforos os quais respondem a uma faixa de luz específica, determinando, assim, uma conversão de energia fotoquímica. Vale dizer que para participar do processo de fotobiorregulação o cromóforo necessita ser um dos componentes da cadeia

respiratória mitocondrial, fazendo desta forma, parte de uma estrutura chave que controla a homeostase celular (SANDOVAL – ORTIZ et al., 2001; KARU, 2000, 1998; WILDEN & KARTHEIN, 1998).

De acordo com Karu (2000), quando a radiação é absorvida, eventos fotoquímicos e fotofísicos ocorrem na mitocôndria, em casos de células eucariotas, e na membrana citoplasmática, no caso da *E. coli*. Entretanto, ainda não se sabe qual (is) molécula (s) é/são fotorreceptora (s) na cadeia respiratória.

Acredita-se que o mecanismo primário de ação da radiação laser/LED sob as moléculas fotorreceptoras ocorra de 4 maneiras diferentes:

- Mudanças no estado de oxidação – redução dos componentes da cadeia respiratória e aceleração na transferência de elétrons.
- Alteração na atividade bioquímica e estrutural determinada pelo aquecimento transitório dos cromóforos.
- Aumento na concentração de H_2O_2 , determinando um subsequente aumento do ânion superóxido (O_2^-).
- Produção de oxigênio molecular ou singleto (O_2).

As reações subseqüentes a esses mecanismos, também chamadas de mecanismos secundários às reações bioquímicas ou biofísicas iniciadas, apresentam ligações à alteração dos parâmetros de homeostase celular (pH, concentração de Ca^{2+} , AMP cíclico, ATP, entre outros), podendo haver transdução do fotossinal e amplificação ao núcleo por uma cascata de reações ocorridas no citoplasma, determinando a ocorrência de possíveis mudanças na taxa de síntese de RNA e DNA, alterações na taxa de consumo de O_2 e do potencial de membrana, entre outros (SANDOVAL – ORTIZ et al., 2001; KARU, 2000, 1998, 1995, 1989; BAXTER,

1997, KITCHEN & PARTRIDGE, 1991).

As respostas possíveis de serem desencadeadas pela LILT/LEDT podem ser divididas em 2 grupos: efeitos a *curto prazo* ou diretos, onde os efeitos podem ser observados poucos segundos ou minutos após a aplicação da radiação, e efeitos a *longo prazo* ou indiretos, que podem ser observados horas ou dias após o fim da irradiação (KARU, 1998, 1987; LUBART et al., 2000).

Dentre os efeitos à *curto prazo* temos:

- Liberação de substâncias pré – formadas:

A irradiação estimula a liberação de substâncias como a serotonina, a bradicinina e a histamina, as quais já estavam formadas no organismo.

- Aumento da proliferação celular:

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

- Presença de mitocôndrias gigantes:

Manteifel et al. (1997) irradiaram linfócitos humanos com laser He – Ne (632,8 nm) e observaram que houve mudanças nas propriedades físicas e químicas das membranas mitocondriais externas, determinando uma fusão de mitocôndrias adjacentes levando, desta forma, ao aparecimento de mitocôndrias gigantes. Essas, por sua vez, são capazes de proporcionar altos níveis de energia de reposição.

- Aumento do ATP mitocondrial:

Evidências mostradas no trabalho de Passarella et al. (1984), onde mitocôndrias de

hapatócitos *in vitro* foram irradiadas por laser He – Ne a 5 J/cm², levam a crer que tal processo está intimamente relacionado à transferência de elétrons na cadeia mitocondrial, onde um potencial extra – eletroquímico, gerado através de um mecanismo ainda desconhecido, é finalizado com uma síntese de ATP. No entanto, Danhof (2000) preconiza que o laser atua diretamente na permeabilidade celular, facilitando a mobilidade dos íons cálcio, sódio e potássio (Ca⁺, Na⁺, K⁺) e aumentando indiretamente a produção de ATP, visto que a energia liberada pela hidrólise do ATP permitirá o correto funcionamento da bomba de sódio e potássio.

São vários os efeitos à *longo prazo* da irradiação, sendo que os 3 principais são:

- Efeito anti – inflamatório:

Mesmo ainda não se sabendo claramente o mecanismo de ação sobre um processo inflamatório, fototerapias de baixa intensidade têm sido amplamente utilizadas como tal. Nesses casos, sua ação tem como base a promoção de efeitos como: (SANDOVAL – ORTIZ et al., 2001; KARU, 1998)

- inibição de fatores quimiotáticos característicos das primeiras etapas da lesão.
- alteração da permeabilidade vascular reduzindo, desta forma, o volume de exsudato.
- normalização da permeabilidade de membrana.
- interferência com diversos efeitos dos mediadores químicos ou superóxidos induzidos pela inflamação.

- Efeito analgésico:

A inflamação e a dor são diminuídas através da aplicação de LILT/LEDT devido à promoção da reabsorção de exsudatos inflamatórios, o que favorece a eliminação de substâncias algogênicas (bradicinina, histamina e acetilcolina), e também determina uma

elevação do limiar de dor nos nervos periféricos, levando a um bloqueio na despolarização das fibras aferentes tipo C (fibras condutoras de estímulos dolorosos) (TUNER & HODE, 1998; TAGUCHI, 1991; COLLS, 1985).

Colls (1985) defende que o efeito analgésico do laser ocorre por este ser capaz de manter o gradiente iônico da membrana celular, evitando assim sua despolarização em virtude do aumento de ATP, o que favorece a expulsão de sódio através da bomba de sódio/potássio. De uma maneira geral, pode-se dizer que a luz atua como um fator estabilizador do potencial de membrana em repouso (hiperpolarização), o que dificulta a transmissão do impulso doloroso no local.

Uma outra maneira de explicar o mecanismo envolvido no efeito analgésico de fototerapias é trazido por Borges et al. (1996), o qual teoriza que a LILT/LEDT está provavelmente relacionada ao relaxamento muscular e aos mecanismos opióides endógenos.

- Efeito cicatrizante:

De acordo com Kitchen & Partridge (1991) o efeito da LILT na cicatrização está relacionado ao aumento de macrófagos, degranulação de mastócitos, angiogênese, aumento da atividade fagocitária e fotodissociação de oxihemoglobina.

Outros efeitos conseguidos através da irradiação laser/LED estão relacionados ao favorecimento da liberação de fatores de crescimento, promoção do aumento da síntese de ATP, produção de ácidos nucleicos (DNA e RNA) devido aumento dos níveis de AMPcíclico, o que promove um aumento da mitose celular, aumento significativo no número de fibroblastos e ativação da síntese protéica (MESTER et al., 1985; PASSARELA et al., 1984; KARU, 1987; ALMEIDA – LOPES, 2001).

Entretanto, temos a existência de alguns trabalhos onde não foram evidenciados os

resultados positivos da fototerapia como estímulo para o processo de reparo tecidual. Como exemplo, podemos citar Oliveira et al. (1999) que não evidenciou alterações morfológicas significativas no tecido de reparo neoformado após realizar aplicações laser num modelo de lesão do músculo tibial anterior de camundongos.

As células que passaram pelo processo de radiação laser/LED podem responder aos estímulos de luz em vários graus, o que implica em dizer que sua fotossensitividade não está relacionada com o fenômeno do “tudo ou nada”. A intensidade da fotorresposta está relacionada ao estado fisiológico prévio da célula, ou seja, no caso de culturas celulares, fatores como disponibilidade de nutrientes, idade da cultura, baixa concentração de oxigênio e queda do pH, causam alterações do estado redox celular, influenciando a resposta biológica à irradiação. A resposta celular será baixa ou ausente quando o seu redox é ótimo (célula normal), e alta ou forte quando o mesmo se encontra alterado (célula lesada) (KARU, 1998, 1987; KARU et al., 1995).

Sandoval – Ortiz et al. (2001) e Karu (2000), através de evidências experimentais de seus trabalhos, comprovam que alterações do redox celular no sentido da oxidação estão relacionadas com o efeito estimulatório da luz, enquanto alterações no sentido da redução, se correlacionam com o efeito inibitório.

Dentre a literatura existente sobre a LILT temos uma evidência, ainda controversa por não ser comprovada, por exemplo, nos trabalhos citados por Sandoval – Ortiz et al. (2001), de que alguns de seus efeitos podem ser manifestados não apenas no local da irradiação, mas também a nível sistêmico, ou seja, eles podem ocorrer através de mediadores metabólicos liberados na circulação, atingindo, assim, áreas distantes do local de aplicação (OSHIRO, 1991; TÚNER & HODE, 1999; KITCHEN & PARTRIDGE, 1991).

ULTRA-SOM (US)

Um outro recurso também utilizado durante o processo de reabilitação de lesões tendíneas é o ultra-som (US) biomédico de baixa intensidade. Esse tipo de onda mecânica é produzido através da aplicação de uma corrente elétrica alternada sobre um material piezelétrico, determinando a compressão/ descompressão alternada do mesmo, o que resulta na produção de ondas mecânicas de baixa frequência (Hoogland, 1986; Starkey, 1999). Esse material piezelétrico pode ser um cristal de quartzo ou uma cerâmica PZT composta por chumbo, zircônio e titânio, estando localizada no transdutor do aparelho. É no transdutor que temos a conversão de energia elétrica para energia mecânica, determinando a geração de ondas de US com uma frequência que depende da cerâmica/cristal utilizado. Essas ondas são capazes de se propagar através dos tecidos, ocasionando efeitos terapêuticos principalmente em nível molecular (HOOGLAND, 1986; ZISKIN et al, 1999).

As ondas geradas por um aparelho de US podem ser do tipo longitudinal (deslocamento ao longo da direção de propagação, apresentando pontos de compressão e rarefação) ou transversal (deslocamento perpendicular à direção de propagação) (Wells, 1977; Ziskin et al., 1999), sendo emitidas de uma maneira contínua ou pulsada. Na primeira, a intensidade das ondas permanece a mesma durante todo o tempo em que o aparelho se encontra ligado e, na segunda, tem-se um sistema de chaveamento da corrente elétrica, criando “pacotes” de pulsos que são emitidos em ciclos fixos, pré – determinados (Willians, 1987). Em meios líquidos e gasosos, apenas ondas longitudinais são capazes de se propagar (WELLS, 1977).

Piezeletricidade do Colágeno

Tem-se por piezeletricidade a capacidade que um material apresenta de se deformar ao receber uma tensão elétrica e/ou alterar a sua polarização ao receber uma tensão mecânica. Xavier e Duarte (1983) trazem, em um estudo feito com ossos, que é possível que a energia mecânica das ondas de US seja convertida em energia elétrica pelas unidades de tropocolágeno, sendo essas precursoras da fibra de colágeno. Dessa forma cria-se um campo elétrico na superfície lesada, estimulando a produção de células ósseas no local. Em uma demonstração teórica, Silva (1987) preconiza que tal efeito é passível de ocorrer em outros tecidos, não somente o ósseo, necessitando apenas que este apresente colágeno em sua composição, uma vez que tal efeito está relacionado à unidade de tropocolágeno. Em seu estudo, ele traz que a aplicação de US na região da lesão determina o aumento do influxo de alguns íons (K^+ , Na^+ , Ca^{2+}) próprios do ciclo celular através de mudanças significativas do potencial de membrana, resultando numa redução significativa no tempo de reparo da lesão.

Agitação acústica:

O campo acústico do US é capaz de determinar a ocorrência de uma circulação constante de fluidos, a qual acredita-se ser responsável pelos efeitos terapêuticos benéficos desse tipo de terapia (Ter Haar, 1987; Hoogland, 1986). As células, assim como suas estruturas internas e externas, ficam expostas a essa “micro-circulação” sendo possível haver alterações em suas atividades, ocasionando, por exemplo, um aumento da permeabilidade celular para os íons sódio, potássio e outros metabólitos, alteração nas características iônicas da membrana, aumento da síntese e secreção celulares, levando, dessa forma, a um aumento na velocidade de reparo em um tecido lesado (DYSON, 1987; KITCHEN E PATRIDGE, 1990).

De acordo com Dyson (1987), uma lesão tratada com US pode determinar mudanças fisiológicas que levam a um aumento da velocidade no reparo tecidual, sendo também possível haver uma concomitante diminuição do quadro algico. Em um experimento realizado com tendão calcâneo de cachorros saudáveis após lesão cirúrgica, fez-se aplicações diárias (à partir do terceiro dia pós operatório) de US pulsado, intensidade de $0.5\text{W}/\text{cm}^2$, por 10 minutos, durante 10 dias consecutivos, resultando numa potencialização do reparo da lesão tendínea. (Saini et al, 2002). Cunha et al (2001) compararam o efeito do ultra-som contínuo e pulsado por mensuração de birrefringência em ratos tenotomizados, frequência de 1.0 MHz, intensidade de $0,5\text{W}/\text{cm}^2$, por 5 minutos, em um período de 14 dias. Foi demonstrado que tratamento com ultra-som pulsado obteve-se melhor resultado de organização e agregação dos feixes colágenos no tecido reparado em comparação com o ultra-som de onda contínua o qual pareceu provocar uma pressão acústica forte, capaz o suficiente de causar uma pressão e dano local na formação de fibras colágenas em áreas de lesão do tecido. Em uma pesquisa realizada por Yeung et al (2006), onde foram realizadas aplicações de US pulsado em tendões calcâneos lesados de cobaias, 3 vezes por semana, por 5 minutos, durante 2 semanas, obtiveram-se resultados que mostraram uma considerável eficácia do ultra-som pulsado na aceleração da cicatrização de tendões rompidos.

Larsen et al (2005) estudaram o efeito de várias intensidades de ultra-som pulsado (0, 50, 100, 200, 500, 750, 1000 e 2000 mW/cm^2 , frequência de 3 MHz) aplicadas em tendões calcâneos tenotomizados, suturados e imobilizados de coelhos adultos. As aplicações eram diárias, por 5 minutos, durante 11 dias, utilizando-se gel para um melhor acoplamento entre o aplicador e a pele do animal. Observou-se, após análise do material coletado, que a extensibilidade dos tendões tratados com US de $2000\text{ mW}/\text{cm}^2$ era maior que a dos tratados com os de $50\text{ mW}/\text{cm}^2$. Um leve declínio na rigidez/dureza dos tendões também foi

observado com o aumento da intensidade do US aplicado.

Ng et al. (2003) estudaram os efeitos do ultra-som terapêutico nas propriedades estruturais e funcionais na recuperação do tendão calcâneo. Dez ratos, cirurgicamente lesados (tendão), foram tratados diariamente com US contínuo, 1 MHz, intensidade de 1.0 W/cm^2 , por 4 min; 11 animais foram tratados com uma intensidade de 2.0 W/cm^2 também por 4 min e 09 animais lesados serviram de controle, não recebendo qualquer tratamento. Os resultados mostraram que a Carga de Tensão Máxima (*Ultimate Tensile Strength*) de ambos os grupos tratados foi significativamente maior comparado ao grupo controle. Em relação aos outros parâmetros (carga de relaxamento, Índice de Funcionalidade do Tendão - *Achilles Functional Index* - e dureza), nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos. De uma maneira geral, os resultados apontam para um aumento da velocidade de cicatrização pós-ruptura do tendão calcâneo, indicado pelo aumento da força de tendões parcialmente seccionados, quando submetidos à tratamento com US.

Maiti et al. (2006) realizaram aplicações de ultra-som em cabras para pesquisar seus efeitos sobre um tendão lesado. Os animais foram tratados com ultra-som pulsado (3 dias pós-lesão), intensidade de $1,0 \text{ W/cm}^2$ por 10 minutos, aplicações por 10 dias consecutivos. Estudos histopatológicos mostraram que o tecido de granulação estava melhor organizado no grupo tratado com US.

Lu et al (2006), usando um modelo de patelectomia parcial em coelhos, fizeram aplicações diárias de ultra – som nos animais lesados (3 dias pós – lesão). Após o tratamento, a porção patela – tendão patelar dos coelhos foi radiografada e biomecanicamente avaliada. Radiograficamente observou-se uma significativa neoformação óssea na junção patela – tendão quando comparado ao grupo controle; a microscopia de fluorescência mostrou uma

precoce neoformação óssea no grupo tratado com US; testes mecânicos revelaram um significativo aumento na força de rompimento e na força de tensão nos animais submetidos à terapia. Após esses resultados, concluiu-se que o US é capaz de acelerar o reparo de uma lesão ocorrida em uma junção osso – tendão.

Através desses trabalhos publicados, pode-se observar uma eficácia já comprovada das terapias à laser e US, o que possibilita uma análise comparativa segura entre seus resultados e os possíveis resultados obtidos através dessa nova terapia de luz, o LED, em casos de lesão parcial do tendão calcâneo. Desta forma, tem-se o enriquecimento da literatura existente, possibilitando uma escolha segura pelos terapeutas de qual recurso utilizar, tendo em vista suas limitações tanto financeiras quanto tecnológicas.

1.2 OBJETIVOS

Fazer uma avaliação comparativa entre fontes de luz à base de laser (685nm, 35mW e 830nm, 100mW) e LED (880 +/- 10nm, 50mW e 630 +/- 10nm, 100mW), e da terapia com US pulsado de baixa intensidade (117 mW, frequência 1,5 MHz e SATA de 25 mW/cm²) no processo de reparo tecidual em tendão calcâneo parcialmente lesado de cobaias.

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- Analisar se o que interfere no processo de cicatrização é a quantidade de energia aplicada ao tecido ou a natureza do estímulo.
- Testar a eficácia de sistemas à base de LED no processo de reparo tecidual em lesão do tendão calcâneo.

Capítulo 2

MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Foram utilizados ratos machos, saudáveis, da linhagem Wistar, os quais foram alojados em caixas de polipropileno a uma temperatura de 22°C, com fotoperíodos de 12 horas, em ambientes com exaustores e filtros na entrada e saída do ar. Os animais foram alimentados com ração sólida e água a vontade.

LED

As aplicações de LED foram realizadas através do aparelho Fisio Led da MM Optics que apresenta comprimentos de onda de 880 +/- 10nm (infra-vermelho) e 630 +/- 5nm (vermelho), e potências de 50mW e 100mW, respectivamente. Como o diâmetro de saída da caneta de aplicação do aparelho em questão era muito grande, adaptou-se uma “máscara” de 3mm de diâmetro (Figura 7) para redução do feixe emitido, havendo também uma considerável redução na potência de saída, passando para 20mW e 30mW. (Figura 6).

- Alimentação: 110 ~ 220 V
- Comprimento de onda da luz: 880 +/- 10 nm e 630 +/- 10 nm.
- Área do feixe de saída: 0,2826cm²
- Irradiância: 425 mW/cm² (630nm) e 283 mW/cm² (880nm).
- Temporizador ajustável.

Figura 6: Aparelho utilizado para aplicações de LED. À esquerda tem-se a saída do feixe sem a “máscara”, e à direita com ela.

Figura 7: Máscara utilizada para redução do feixe de LED durante as aplicações do tratamento.

LASER

Para as aplicações de laser vermelho foi utilizado o aparelho Thera Lase da DMC equipamentos, que apresenta um comprimento de onda de 685nm e potência máxima de 35mW. As aplicações de laser infravermelho foram realizadas através do mesmo aparelho

acima descrito, com um comprimento de onda de 830nm e potência máxima de 100mW.
(Figura 8)

- Alimentação: 90v ~ 240v
- Comprimento de onda da luz: 685nm e 830nm
- Área do feixe de saída: 0.028cm²
- Irradiância: 600 mW/cm²
- Temporizador ajustável.

Figura 8: Aparelho utilizado para as aplicações de laser.

ULTRA-SOM

As aplicações de ultra-som foram realizadas com o aparelho do Programa de Pós-Graduação interunidades em Bioengenharia que apresenta potencia de saída de 117 mW, frequência de 1,5 MHz e intensidade efetiva (SATA) de 25 mW/cm²

Os aparelhos de LED e laser foram calibrados antes e depois dos experimentos no

“Centro de Pesquisas em Óptica e Fotônica – CEPOF” da Escola de Engenharia de São Carlos – EESC/USP. O aparelho de US foi calibrado na Bioengenharia, unidade de São Carlos – EESC/USP.

2.2 INDUÇÃO DA LESÃO

Os animais logo após a pesagem, foram anestesiados através da combinação de Ketamina[®] (35 mg/ kg) e Xilazina[®] (4 mg/ kg), injetada intraperitonealmente utilizando uma seringa de insulina simples de 50 unidades. A seguir, foram submetidos ao mecanismo de lesão mecânica do tendão calcâneo, utilizando-se os mesmos procedimentos do trabalho de SALATE (2005), descrito a seguir:

- Tricotomia da pata direita do animal
- Posicionamento da pata no equipamento feito pela Oficina Mecânica da UFSCar (Figura 9).
- Leve tração na região calcâneo direita com o tornozelo em dorsi-flexão, soltando-se, posteriormente, um peso de 186g perpendicularmente de uma altura de 20cm, sobre o tendão do animal. O peso e a altura foram determinados previamente em um estudo piloto para possibilitar a ocorrência de uma lesão parcial na porção mais profunda do tendão
- Imediatamente após a lesão, o peso de foi retirado e o local da lesão marcado com uma caneta de retroprojektor para aplicação do laser/LED/US, que se iniciou 1 hora depois.

Figura 9: Equipamento utilizado para lesionar os animais

FONTE: Carrinho, *et al* (2006)

2.3 PROCEDIMENTO DE TRATAMENTO

O total de 50 animais foi dividido em 5 grupos de 10 cada, os quais, por sua vez, foram divididos em 2 subgrupos de 5 animais. Desta forma, teremos:

- Grupo 1 (LV): animais que foram submetidos à terapia com *laser vermelho*, comprimento de onda de 684 nm, potência de 100 mW, dose de 6 J/ cm², aplicação pontual por 10 segundos realizada a cada 24 horas.
 - G 1.1: animais sacrificados no quinto dia após início da terapia.
 - G 1.2: animais sacrificados no décimo dia após início da terapia.
- Grupo 2 (LIV): animais que foram submetidos à terapia com *laser infravermelho*, comprimento de onda de 830 nm, 35 mW de potência, dose de 6 J/ cm² aplicação pontual por 10 segundos a cada 24 horas.
 - G 2.1: animais sacrificados no quinto dia após início da terapia.
 - G 2.2: animais sacrificados no décimo dia após início da terapia.
- Grupo 3 (LEDV): animais que foram submetidos à terapia com *LED vermelho*,

comprimento de onda de 630 +/- 10 nm, potência de 30 mW, dose de 6 J/ cm², aplicação pontual por 15 segundos a cada 24 horas.

- G 3.1: animais sacrificados no quinto dia após início da terapia.
- G 3.2: animais sacrificados no décimo dia após início da terapia.
- Grupo 4 (LEDIV): animais submetidos à terapia com *LED infravermelho*, comprimento de onda de 880 +/- 10 nm, potência de 20 mW, dose de 6 J/ cm², aplicação pontual por 20 segundos a cada 24 horas.
 - G 4.1: animais sacrificados no quinto dia após lesão.
 - G 4.2: animais sacrificados no décimo dia após lesão.
- Grupo 5 (US): neste grupo os animais receberam aplicações de US pulsado, frequência de 1.5 MHz, intensidade efetiva de 25 mW/cm² (SATA), aplicações diárias por 5 minutos.
 - G 5.1: animais sacrificados no quinto dia após lesão.
 - G 5.2: animais sacrificados no décimo dia após lesão.

As aplicações de fototerapia foram iniciadas 1 hora após a lesão.

Houve um sexto grupo denominado “grupo controle” (Gc) no qual os animais lesados não foram submetidos a qualquer tipo de terapia e foram sacrificados também no quinto e no décimo dia pós - lesão. Tivemos também o “grupo normal” (GN), onde os animais não sofriam qualquer tipo de lesão e/ou tratamento no tendão.

Em relação aos protocolos utilizados algumas modificações foram feitas com o objetivo de igualar as doses dos 3 diferentes recursos terapêuticos em questão, ou seja, para se obter uma mesma quantidade de energia chegando aos tecidos, fixou-se a dose em 6J/cm², tendo-se uma variação apenas no tempo em relação à potência efetiva de cada aparelho.

Sendo assim, pôde-se realizar uma análise comparativa mais justa uma vez que em todas as situações o tecido lesado estava recebendo uma mesma quantidade energética, mesmo que as fontes fossem diferentes, permitindo analisar também se o que interfere no processo de cicatrização é a quantidade de energia aplicada ou a natureza do estímulo.

2.4 PROCEDIMENTOS GERAIS

As aplicações de laser/ LED/ US foram realizadas diariamente, no mesmo horário, com o auxílio de uma segunda pessoa a qual imobilizava o tronco e a cintura pélvica do animal, evitando que o mesmo escapasse. Os animais foram sacrificados por eutanásia e, logo após, o tendão calcâneo direito foi retirado, lavado em soro fisiológico 0,9% e colocado em solução de formol à 10%, onde permaneceu por 24h (Figuras 10 e 11). Após esse período de tempo, o material foi levado para lavagem em água corrente por 24h seguidas (Figura 12) e depois, mantido em álcool 70% para dar-se início ao processo de desidratação, o qual segue a seqüência abaixo:

- Álcool 90% - 40 min
- Álcool 95% - 40 min
- Álcool 100% - 40 min
- Álcool 100% - 40 min
- Álcool 100% - 40 min
- Álcool – xilol – 15 min
- Xilol 1 – 15 min
- Xilol 2 – 15 min
- Banho na parafina 1 – 45 min
- Banho em parafina 2 – 45 min
- Banho parafina 3 – 45 min

Em seguida, o material foi emblocado em parafina para ser, posteriormente, cortado no micrótomo a uma espessura de $7\mu\text{m}$, e colocado sobre uma lâmina para possibilitar a realização das análises por microscopia de luz e polarização (birrefringência).

Figura 10: Tendão calcâneo sendo retirado.

Figura 11: Tendão sendo lavado em soro fisiológico para depois ser colocado em formalina 10%.

Figura 12: Dispositivo utilizado para lavagem do material em água corrente.

Para as análises por microscopia de polarização as lâminas não necessitaram de corantes: elas foram previamente colocadas de molho em água destilada por 20 minutos e, depois, receberam uma lamínula embebida também em água destilada, possibilitando desta forma as análises de birrefringência (medidas do retardo óptico – OR em nm).

MICROSCOPIA DE POLARIZAÇÃO

O microscópio de luz polarizada é constituído por dois filtros polarizadores: o Polarizador (Pol) e o Analisador (An) (Vidal, 1987b). A luz polarizada permite a determinação estatística exata da ordem molecular, da direção da vibração, do momento de transição e de variações nos estados de agregação molecular (VIDAL, 1987 a e b).

A placa polarizadora absorve todos os vetores elétricos da radiação de forma seletiva, deixando passar apenas a energia radiante em uma direção, a qual corresponde ao seu plano de polarização. Desta forma, toda a radiação polarizada encontrada perpendicularmente ao

plano de polarização do analisador será absorvida e a intensidade de passagem de luz será máxima quando o Pol e o An estiverem paralelos entre si (VIDAL, 1987b).

BIRREFRINGENCIA DE MATERIAIS

A birrefringência é considerada, juntamente com o dicroísmo, uma propriedade anisotrópica, o que quer dizer que suas propriedades ópticas não são as mesmas em todas as direções numa mesma amostra. (HECHT, 1991).

Num corpo birrefringente encontram-se dois índices de refração diferentes, resultando em duas velocidades e direções diferentes de propagação da luz, sendo que em relação à direção, tem-se que estas são perpendiculares uma a outra no corpo birrefringente (VIDAL, 1987b).

Ao se ter a penetração de uma luz polarizada no corpo birrefringente, há uma propagação da mesma em dois caminhos ópticos diferentes, sendo um na direção do raio ordinário (no) e outro na direção do raio extraordinário (ne). Essa diferença de caminho óptico é conhecida como retardo óptico (OR), e é responsável pelo brilho característico do material quando analisado pela microscopia de polarização. Esse brilho é máximo quando um de seus eixos de propagação são colocados a 45° dos dois filtros polarizadores do microscópio. (VIDAL & CARVALHO, 1990).

O colágeno apresenta uma birrefringência denominada de birrefringência de forma (BF) e é dada devido à presença de microcorpos com morfologia assimétrica dispostos ordenadamente, de maneira tal que seus diâmetros e distâncias sejam menores que o comprimento de onda, e dependentes dos índices de refração, da contribuição dos volumes parciais das partículas e do meio homogêneo dispersante. Além da BF, o colágeno apresenta a birrefringência intrínseca, a qual é determinada pela força orientacional de todas as transições eletrônicas da molécula (VILARTA & VIDAL, 1989).

Ao estarem embebidos em água destilada, os feixes de colágeno apresentam os maiores valores de birrefringência e podem representar, com objetividade, a morfologia das moléculas de colágeno, o diâmetro e o grau de empacotamento das fibras (Vidal, 1987b). Quanto maior o padrão de brilho apresentado pelo material analisado, maior é o grau de organização das fibras de colágeno ali presentes. Quanto maiores os valores de OR obtidos, maior é o grau de organização das fibras de colágeno observadas.

Capítulo 3

RESULTADOS E DISCUSSÕES

ANÁLISE MACROSCÓPICA

Durante as aplicações de LIPUS foram observados alguns aspectos relevantes em relação ao comportamento dos animais, o que levou a algumas alterações significativas nos procedimentos experimentais.

No segundo dia de aplicação observou-se que à partir do segundo animal, todos os ratos apresentaram um intenso desconforto durante o tratamento. Esse desconforto foi associado a um aumento da temperatura local, possivelmente causado pelo cabeçote aplicador de US. Pode-se constatar também uma hiperemia na pele dos animais, indicando o possível início de um quadro de queimadura.

No quinto dia quando foi realizado o sacrifício dos primeiros 4 animais tratados e 2 do grupo controle, pode-se observar uma intensa fibrose nos tendões tratados com LIPUS, havendo necessidade de se fazer uma dissecação para conseguir realizar a retirada do material. Fazendo-se uma rápida análise comparativa entre o grupo tratado com LIPUS e o grupo tratado com laser, pode-se dizer que a fibrose encontrada no grupo de LIPUS foi muito maior, e uma menor espessura dos tendões também foi constatada. Em relação ao grupo controle, não se observou diferenças significativas em relação à arquitetura externa dos tendões: ambos os grupos, LIPUS e controle, apresentaram uma aparência semelhante.

Fig. 13: A seta vermelha aponta para o tendão tratado com US, envolto por uma matéria “amorfa” gelatinosa, indicada pela seta preta. É possível também visualizar a intensa fibrose presente no local, o que dificultou a retirada do material.

O desconforto dos animais durante as aplicações ainda permaneceu durante os outros dias, mas com a redução do tempo de tratamento, conseguiu-se reduzir, também, o quadro de hiperemia no local tratado. A autofagia observada outrora em alguns animais também foi “eliminada” ao se reduzir o tempo de aplicação do LIPUS.

Ao se realizar o segundo sacrifício (10^o. dia), observou-se mais uma vez uma intensa fibrose local, o que dificultou bastante a retirada dos tendões. Em relação ao aspecto macroscópico, ainda não se obteve uma diferença significativa em relação ao grupo controle. Em relação ao grupo de laser, ainda teve-se uma menor espessura dos tendões tratados com LIPUS.

De maneira geral foi possível constatar uma grande deposição de um material gelatinoso em volta dos tendões tratados com LIPUS (Fig. 13), principalmente no primeiro sacrifício. Essa matéria amorfa pode ser resultado da destruição, pelo calor do cabeçote, dos fibroblastos ali depositados. Em uma primeira hipótese, se considera que as ondas de US ao mesmo tempo que estimulam uma intensa deposição de fibroblastos na área tratada, também determinam a sua destruição.

Um outro fato observado foi o de que os animais que recebiam as aplicações de LIPUS quando o transdutor já apresentava uma leve “elevação de temperatura”, ao serem sacrificados, possuíam tendões mais espessos dos que aqueles que recebiam tratamento com o transdutor “frio”. Essa situação nos leva a questionar se o efeito terapêutico do US está ligado a esse leve aumento de temperatura local ou ao efeito mecânico das ondas sobre o tecido. A quantidade de matéria gelatinosa em volta dos tendões era maior naqueles que receberam tratamento com transdutor levemente aquecido

Os animais do grupo laser não apresentaram comportamento agressivo ou desconforto durante a aplicação do tratamento. Ao se realizar a retirada dos tendões dos ratos, se observou uma leve fibrose local, a qual não dificultou o procedimento em questão. Em relação ao aspecto macroscópico, se constatou uma maior espessura dos tendões em relação ao grupo controle e, entre os grupos do quinto e do décimo dia, os do décimo apresentaram-se mais espessos. Não se constatou diferenças significativas macroscópicas em relação aos grupos laser vermelho e infravermelho, ambos os grupos apresentando tendões brancos, brilhantes e espessos (Fig 14).

Em relação aos animais do grupo LED não se observou também um comportamento agressivo durante as aplicação de fototerapia; no entanto, uma intensa fibrose foi constatada durante a retirada dos tendões, principalmente nos do décimo dia, tratados com luz vermelha

(680nm). O aspecto macroscópico do material não mostrou uma espessura muito maior dos tendões tratados ao serem comparados com o grupo controle. Eles apresentaram-se um pouco mais finos do que os tratados com LILT, no entanto ainda conservando uma aparência branca, brilhante e espessa (Fig. 14).

Figura 14: Aspecto macroscópico dos tendões no décimo dia tratados com LILT (foto superior esquerda), LEDT (foto superior direita) e US (foto inferior). Nota-se facilmente a estrutura mais fina do tendão tratado com US, apresentando este um “envoltório” translúcido, identificado como “matéria amorfa” resultante de uma intensa degeneração das fibras de colágeno ali depositadas.

ANÁLISE QUALITATIVA

Figura 15: Grupo Controle quinto (esquerda) e décimo (direita) dia. Em ambas as fotos pode-se perceber uma intensa desorganização das fibras de colágeno na área lesada, a qual está indicada pelas estrelas vermelhas.

Figura 16: LED Infravermelho quinto (esquerda) e décimo (direita) dia. Percebe-se que no décimo dia o resultado foi satisfatório em relação ao bom alinhamento e organização das fibras de colágeno na área lesionada, delimitada pelas estrelasvermelhas.

Figura 17: LED Vermelho quinto (esquerda) e décimo (direita) dia. Nota-se que já no quinto dia o processo de cicatrização apresentava-se bem adiantado, com fibras já organizadas em feixes, porém ainda desalinhadas. No décimo dia têm-se fibras mais bem organizadas e alinhadas na região lesada (estrelas vermelhas).

Figura 18: Laser Infravermelho quinto (esquerda) e décimo (direita) dia. No quinto dia pode-se perceber uma intensa atividade fibroblástica no local da lesão, indicada pela presença de uma grande quantidade de fibras desorganizadas e desalinhadas na região (estrelas vermelhas). Já no décimo dia esse grau de desorganização e desalinhamento reduzem consideravelmente.

Figura 19: Laser Vermelho quinto (esquerda) e décimo (direita) dia. Com dez dias de tratamento percebe-se que a área lesionada já foi preenchida por fibras de colágeno, porém o grau de desalinhamento das mesmas ainda é relevante.

Figura 20: Ultra-som quinto (esquerda) e décimo (direita) dia. A área lesionada não foi eficazmente reparada pelo tratamento aplicado, apresentando ainda áreas de descontinuidade das fibras de colágeno e alta desorganização e desalinhamento das fibras de colágeno ali depositadas.

De acordo com a foto da esquerda na Fig. 15, pode-se perceber uma intensa desorganização das fibras de colágeno (regiões assinaladas pelas estrelas), indicando a região que foi lesionada. Na foto da direita, nota-se ainda a presença de fibras desorganizadas e desalinhadas no canto superior esquerdo, e no canto inferior direito, tem-se fibras já posicionadas em feixes paralelos, mesmo que ainda desorganizadas, indicando uma não adequação das mesmas para o retorno das atividades de tensão e tração desenvolvidas pelo tendão. A possibilidade de se ter uma nova lesão nessa região é muito grande.

As estrelas da Fig. 16 na foto da esquerda indicam as fibras que foram lesionadas e estão em processo de regeneração. Nessa região pode-se perceber uma desorganização de algumas fibras e outras ainda lesionadas, mas já em meios de recuperação. À direita temos a foto

do tendão já praticamente recuperado: as estrelas indicam as fibras novas de colágeno, as quais não apresentam um alinhamento perfeito, mas já se encontram organizadas em feixes paralelos, indicando uma maior semelhança com a constituição de um tendão não lesado.

Na foto à esquerda da Fig. 17 as estrelas delimitam a região onde ocorreu a lesão; a presença de fibras desalinhadas, mas já levemente organizadas em feixes, indica um processo de reparo eficaz e avançado da lesão sofrida. À direita têm-se fibras novas, com um bom alinhamento em feixes paralelos, porém ainda com um leve grau de desorganização.

Na Fig. 18 da foto da esquerda constata-se, na região marcada pelas estrelas, a presença de fibras rompidas e desalinhadas, indicando a área lesionada. Na direita têm-se feixes paralelos de fibras ainda não totalmente alinhadas, mas já muito próximos da organização original do tendão.

A Fig. 19 na foto da esquerda apresenta, delimitadas pelas estrelas, as fibras que sofreram lesão, encontrando-se desorganizadas e desalinhadas. À direita, pode-se perceber um maior alinhamento das fibras, mas ainda havendo um grau considerável de desorganização das mesmas, assim como algumas regiões em que ainda se vê fibras lesionadas, não reparadas.

À esquerda na Fig. 20 pode-se claramente perceber as áreas lesionadas, caracterizadas pela presença de descontinuidades entre as fibras desalinhadas e desorganizadas. À direita, após aplicação de terapia à base de US, percebe-se um reparo não eficaz da lesão, tendo-se ainda, na região, a presença de feixes de fibras desalinhados e desorganizados, indicando uma cicatrização não eficaz do tecido lesado.

ANÁLISE QUANTITATIVA

Figura 21: Médias e Desvios Padrão dos retardos ópticos (OR- nm) obtidos através da microscopia de luz polarizada, realizada com os grupos do quinta dia.

Figura 22: Médias e Desvios Padrão dos retardos ópticos (OR- nm) obtidos através da microscopia de luz

polarizada, realizada com os grupos do décimo dia.

Tabela 1: Tabela de comparações múltiplas entre os valores de retardo óptico (OR – nm) dos subgrupos do quinto dia.

SUBGRUPOS 5º DIA	DIFERENÇA (rank médio)	VALOR DE P
LEDIV vs. LV	55.906	P>0.05 ns
LEDIV vs. LIV	34.750	P>0.05 ns
LEDIV vs. LEDV	32.768	P>0.05 ns
LEDIV vs. GC	100.82	P<0.01 **
LEDIV vs. US	102.08	P<0.001 ***

Tabela 2: Tabela de comparações múltiplas entre os valores de retardo óptico (OR – nm) dos subgrupos do quinto dia.

SUBGRUPOS 5º DIA	DIFERENÇA (rank médio)	VALOR DE P
LEDV vs. LV	23.138	P>0.05 ns
LEDV vs. LIV	1.982	P>0.05 ns
LEDV vs. LEDIV	- 32.768	P>0.05 ns
LEDV vs. GC	68.052	P>0.05 ns
LEDV vs. US	69.307	P>0.05 ns

Tabela 3: Tabela de comparações múltiplas entre os valores de retardo óptico (OR – nm) dos subgrupos do quinto dia.

SUBGRUPOS 5º DIA	DIFERENÇA (rank médio)	VALOR DE P
GN vs. LEDIV	51.125	P>0.05 ns
GN vs. LEDV	48.400	P>0.05 ns
GN vs. LV	107.03	P<0.001 ***
GN vs. LIV	85.875	P<0.01 **
GN vs. GC	112.27	P<0.001 ***
GN vs. US	166.70	P<0.001 ***

Tabela 4: Tabela de comparações múltiplas entre os valores de retardo óptico (OR – nm) dos subgrupos do décimo dia.

SUBGRUPOS 10º DIA	DIFERENÇA (rank médio)	VALOR DE P
LEDIV vs. LV	31.817	P>0.05 ns
LEDIV vs. LIV	-5.123	P>0.05 ns
LEDIV vs. LEDV	6.246	P>0.05 ns
LEDIV vs. GC	70.119	P>0.05 ns
LEDIV vs. US	124.55	P<0.001 ***

Tabela 5: Tabela de comparações múltiplas entre os valores de retardo óptico (OR – nm) dos subgrupos do décimo dia.

SUBGRUPOS 10º DIA	DIFERENÇA (rank médio)	VALOR DE P
LEDV vs. LV	25.571	P>0.05 ns
LEDV vs. LIV	-11.369	P>0.05 ns
LEDV vs. LEDIV	-6.246	P>0.05 ns
LEDV vs. GC	63.873	P>0.05 ns
LEDV vs. US	118.30	P<0.001 ***

Tabela 6: Tabela de comparações múltiplas entre os valores de retardo óptico (OR – nm) dos subgrupos do décimo dia.

SUBGRUPOS 10º DIA	DIFERENÇA (rank médio)	VALOR DE P
GN vs. LEDIV	42.154	P>0.05 ns
GN vs. LEDV	48.400	P>0.05 ns
GN vs. LV	73.971	P>0.05 ns
GN vs. LIV	37.031	P>0.05 ns
GN vs. GC	112.27	P<0.001 ***
GN vs. US	166.70	P<0.001 ***

As tabelas 1, 2, 3, 4, 5 e 6 trazem os valores de P para os subgrupos do quinto e do décimo dia, obtidos através do teste de comparações múltiplas (Kruskal – Wallis), onde quanto menor for o valor de P, maior é a diferença entre os grupos comparados.

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

Tabela 7: Comparação entre o grupo GC do décimo dia com os grupo LEDIV e LEDV referentes à porcentagem de aumentos do OR (nm).

SUBGRUPOS (10 ^a)	%
LEDIV – GC	33,8
LEDV – GC	29,28

Figura 23: “Linha do tempo” mostrando as distâncias entre os grupos tratados com LED vermelho e LED infravermelho em relação aos grupos não lesados (GN) e lesados/não tratados (GC).

DISCUSSÃO:

Os tendões, entre outras funções, são estruturas que apresentam uma real importância por permitirem que a força gerada nos músculos seja transmitida ao sistema esquelético. Desta maneira tem-se a execução dos movimentos, tanto voluntários quanto involuntários, de uma forma harmônica e eficaz. Lesões nessas estruturas são consideradas de difícil reparo devido a pobre vascularização presente na região. Métodos que aceleram e determinam uma neovascularização eficaz e uma boa deposição e alinhamento de fibras de colágeno na área lesada são de grande importância por permitirem um retorno à harmonia e eficácia dos movimentos em um período de tempo mais curto que o habitual (sem ação de agentes externos). Tendo-se um bom reparo desse tipo de lesão, a probabilidade de reincidência do

trauma é bem menor.

O presente trabalho pesquisou os efeitos da LILT, da LEDT e do US no processo de reparo de lesão no tendão calcâneo.

- Quinto dia:

De acordo com os resultados obtidos nas tabelas 1, 2 e 3 de comparações múltiplas, pode-se perceber que no quinto dia, o grupo tratado com LED infravermelho (LEDIV) ao ser comparado com os grupos de LED vermelho (LEDV), laser vermelho (LV) e laser infravermelho (LIV), não apresentou uma diferença estatisticamente significativa em relação a seus valores de retardo óptico (OR), com $P > 0,05$. Tais dados levam à idéia de que com 5 dias de tratamento, os resultados obtidos em relação ao alinhamento das fibras de colágeno são os mesmos quando consideradas as terapias acima citadas. Já em relação aos grupos controle (GC) e ultra-som (US), essa diferença apresentou-se significativa e altamente significativa, com $P < 0,01$ e $P < 0,001$, respectivamente, mostrando uma grande eficácia dos tratamentos com LEDIV, LEDV, LV e LIV sobre essas duas modalidades.

Ao se comparar o grupo LEDIV com tendões normais, não lesados (GN), a diferença também não se apresentou significativa, com $P > 0,05$, elucidando uma grande eficácia desse recurso quando se almeja obter um bom alinhamento das fibras de colágeno, mesmo com apenas 5 dias pós lesão.

Ainda em relação ao quinto dia, pode - se perceber que o tratamento com LEDV não apresentou uma diferença significativa em relação aos valores de OR obtidos, quando comparado aos demais grupos (LV, LIV, US, GC), sendo $P > 0,05$. Fato este que mostra um alinhamento das fibras de colágeno próximo do processo normal de reparo tendíneo, sem a ação da aplicação de agentes externos.

Ao se comparar as médias dos OR obtidas em tendões não lesados (GN) com os demais grupos, nota-se que, com exceção do grupo LEDIV, a diferença entre eles mostrou-se

significativa, ou altamente significativa, $P < 0,05$ e $P < 0,001$, tornando possível perceber que ainda não se tem um processo eficaz de cicatrização da área lesada no quinto dia. Comparando-se o grupo US com os demais, tem-se uma diferença não significativa em relação aos grupos GC, LEDV e LV, com $P > 0,05$.

- Décimo dia:

Ao se analisar os resultados obtidos no décimo dia (tabelas 4, 5, e 6), têm-se uma diferença não significativa quando se compara os valores de OR do grupo LEDIV com os grupos LEDV, LV e LIV, $P > 0,05$. Desta forma é possível perceber que quando se almejam resultados semelhantes aos obtidos com a terapia com laser, tanto vermelho quanto infravermelho, em relação ao alinhamento das fibras de colágenos em lesões tendíneas, pode-se seguramente utilizar fototerapias à base de LEDs vermelho e infravermelho. Mesmo com diferenças em suas propriedades físicas, tais como a ausência de coerência e colimação de fontes à base de LED (Bagnato, 2002), percebe-se que igualando-se as doses e os comprimentos de onda, tem-se resultados semelhantes entre essas duas modalidades de fototerapia. Tal constatação vai em concordância com os estudos de Karu (1998), onde a autora defende que a característica mais importante da luz é seu comprimento de onda, o qual deve estar no espectro de absorção da molécula fotorreceptora alvo, conferindo uma maior eficácia ao tratamento.

Comparando-se os demais grupos do experimento com o grupo US, essa diferença torna-se altamente significativa, com $P < 0,001$, indicando uma extrema ineficácia desse recurso quando um bom alinhamento das fibras de colágeno é desejado no processo de reparo da lesão do tendão calcâneo. Essa diferença apresentou-se não significativa apenas ao se comparar o grupo US com o GC, onde se obteve um $P > 0,05$. Quando se compara o GN com os demais grupos, nota-se uma diferença altamente significativa apenas em relação aos grupos GC e US ($P < 0,001$), reforçando ainda mais o conceito de eficácia das fototerapias utilizadas

nesse experimento, e da ineficácia da terapia com US pulsado de baixa intensidade com os parâmetros em questão. O grupo US apresentou valores absolutos muito baixos de OR, principalmente no décimo dia, mostrando-se ainda pior do que o GC, o qual não recebeu qualquer tipo de tratamento.

Tal resultado negativo em relação à terapia com US de baixa intensidade encontra-se em discordância com diversos trabalhos publicados até o momento. Em um experimento realizado com tendão calcâneo de cachorros saudáveis após lesão cirúrgica, fez-se aplicações diárias (à partir do terceiro dia pós operatório) de US pulsado, intensidade de $0.5\text{W}/\text{cm}^2$, por 10 minutos, durante 10 dias consecutivos, resultando numa potencialização do reparo da lesão tendínea. (SAINI et al, 2002).

Cunha et al (2001) compararam o efeito do ultra-som contínuo e pulsado por mensuração de birrefringência em ratos tenotomizados, frequência de 1.0 MHz, intensidade de $0,5\text{W}/\text{cm}^2$, por 5 minutos, em um período de 14 dias. Foi demonstrado que tratamento com ultra-som pulsado obteve-se melhor resultado de organização e agregação dos feixes colágenos no tecido reparado em comparação com o ultra-som de onda contínua o qual pareceu provocar uma pressão acústica forte, capaz o suficiente de causar uma pressão e dano local na formação de fibras colágenas em áreas de lesão do tecido.

Em uma pesquisa realizada por Yeung et al (2006), onde foram realizadas aplicações de US pulsado em tendões calcâneos lesados de cobaias, 3 vezes por semana, por 5 minutos, durante 2 semanas, obtiveram-se resultados que mostraram uma considerável eficácia do ultra-som pulsado na aceleração da cicatrização de tendões rompidos.

Koeke et al. (2005) demonstraram que o ultra-som com os seguintes parâmetros, 1MHz, $0,5\text{ W}/\text{cm}^2$, ciclo de trabalho 20%, modo pulsado, durante 5 minutos, é um método

eficiente na melhora macromolecular da organização estrutural do colágeno, uma vez que o processo de reparação do tendão foi acelerado através da possível biomodulação da inflamação, estimulação da proliferação fibroblástica e síntese de colágeno no local da lesão. Eles observaram através da análise da birrefringência do colágeno, em um certo grau de concentração, o estado de agregação, orientação e deposição das fibras colágenas no local da tenotomia.

Uma das hipóteses para os achados negativos do modelo experimental utilizado nesse projeto é a de que ao invés de tratar, o US estava proporcionando uma destruição tecidual, causada provavelmente por um aumento muito grande da temperatura, o que levou a uma desnaturação das fibras de colágeno ali depositadas para o reparo da lesão. Esse aumento de temperatura pode estar relacionado ao processo de geração desse tipo de onda mecânica: como não se têm um meio de resfriamento no cabeçote, os movimentos de compressão e descompressão do material piezoelétrico podem determinar uma elevação da temperatura local com o prolongado tempo de uso, suficiente para desnaturar as fibras colágenas, em formação.

Ao se comparar o grupo GC com os grupos LEDIV e LEDV, não se encontra uma diferença estatística significativa ou altamente significativa em relação aos valores de OR, levando a uma divergência quanto a real eficácia dessas modalidades de fototerapia, uma vez que esse resultado foi o mesmo obtido quando os grupos em questão foram comparados com tendões normais (GN). Para uma maior elucidação dessa divergência, fez-se uma comparação percentual (tabela 7) entre esses 3 grupos: LEDIV, LEDV e GC do décimo dia, tornando possível perceber a existência de uma diferença percentual considerável entre os grupos LEDIV e GC (33,8%), LEDV e GC (29,28%). Apesar de estatisticamente não ter sido comprovada uma diferença significativa, esses dados mostram que existe uma real vantagem

das aplicações de fototerapia em relação ao processo normal de cicatrização de lesões tendíneas (GC). A figura 23 esquematiza uma “linha do tempo” na qual é possível perceber ainda a existência de uma distância considerável entre o GN e os grupos LEDIV e LEDV em relação ao alinhamento perfeito e ideal das fibras de colágeno, no entanto, percebe-se também uma real vantagem em relação ao processo normal de cicatrização em relação à aplicação dessas modalidades fototerápicas. Tratamentos baseados na aplicação de LEDs tanto vermelho quanto infravermelho mostraram acelerar o processo de reparo da lesão tendínea, auxiliando no processo de deposição e alinhamento satisfatórios das fibras de colágeno pós lesão tendínea.

De uma maneira geral, os dados obtidos mostram que diferenças significativas em relação aos valores de OR entre os tratamentos com LEDT e LILT não são encontradas no décimo, apontando que a eficácia de ambos é a mesma quanto ao bom alinhamento e deposição de fibras de colágeno. Dessa forma, é possível o estabelecimento seguro de um protocolo de tratamento eficaz quando se almeja um bom processo de reparo de lesão tendínea utilizando-se terapia à base de LEDs.

Os resultados obtidos mostrando uma real eficácia em relação à fototerapia à base de LED para reparo de lesões, vão em concordância com o trabalho de Al-Watban (2006). Em seu estudo, ele utilizou 61 ratos Sprague-Dawley, tanto normais quanto diabéticos, nos quais realizou úlceras de formato oval com uma área de $131,3 \pm 19 \text{ mm}^2$ na região lombar. As lesões foram tratadas com aplicações policromáticas de LEDs de 510–543, 594–599, 626–639, 640–670, e 842–872 nm, potência de 272mW, densidade de potência de $13,6 \text{ mW/cm}^2$ e doses de 5, 10, 20 e 30 J/cm^2 . Os resultados mostraram, entre outras coisas, uma proliferação de fibroblastos durante a fibroplasia, e posteriormente, um acondicionamento dos mesmos em fibrilas de colágeno denso em sua forma mais madura, determinando uma melhor contração da ferida. Também percebeu-se uma melhor resposta inflamatória do organismo, facilitando a

formação e diferenciação dos fibroblastos. Esse estudo mostrou que a aplicação policromática de LEDs à 5 e 10 J/cm² parecem favorecer o reparo de úlceras diabéticas em ratos.

Em um experimento *in vitro*, Vinck *et al* (2003), utilizando cultura de fibroblastos obtidos de embriões de frango, fez aplicações de laser infravermelho, 830 nm, potência de 40mW, dose de 1J/cm², e LEDs de 950, 660, 570 nm, potências de 160-80, 80-15 e 10-0,2 mW, doses de 0,53; 0,53; 0,1 J/cm², respectivamente, e constatou um aumento na proliferação dos fibroblastos após aplicação dessas fototerapias. O autor relata ainda que tais resultados indicam um potencial benéfico do tratamento com LEDs para casos de úlceras cutâneas em humanos, caso sejam feitas aplicações com uma dosimetria adequada.

Whelan *et al* (2003), analisaram os níveis de fatores de crescimento fibroblástico básico (FGF-2) e fator de crescimento endotelial (VEGF) após aplicações de LED 880nm, dose de 4J/cm², em úlceras nos dias 0, 4, 7 e 14. Os resultados mostraram, principalmente do 4º. dia, índices significativos de FGF-2, apesar dos índices de VEGF terem sido semelhantes aos do grupo controle. O experimento mostrou um aumento relativo na taxa de cicatrização das úlceras, elucidando uma eficácia da terapia utilizada.

El Sayed & Dyson (1990) realizaram uma pesquisa utilizando 21 fotodispositivos (1 laser de 820 nm e 20 LEDs de 660, 870, 880, 940 e 950 nm) aplicados em feridas induzidas em ratos Wistar, cujos resultados demonstraram uma elevada degranulação em mastócitos, principalmente quando tratados com o conjunto múltiplo de diodos monocromáticos.

Corazza *et al* (2007), utilizando 120 ratos machos, realizou uma ferida circular no músculo quadríceps dos animais, tratando-os posteriormente com aplicações de LED vermelho (630nm), doses de 5 e 20J/cm², potência de 90mW, e laser vermelho (660nm), doses de 5 e 20 J/cm², potência de 40mW. As aplicações de fototerapia foram iniciadas 6 horas após a indução da lesão. Os resultados apontaram para um expressivo estímulo da angiogênese após aplicação de laser e LED vermelhos, principalmente com a dose de 5 J/cm².

A terapia à base de LEDs aplicada nos procedimentos desse projeto mostraram uma deposição e um alinhamento satisfatórios de fibras de colágeno durante o processo de cicatrização da lesão tendínea. Os resultados obtidos levam a crer que houve um aumento na velocidade de reparo do tecido tendíneo no sítio de lesão.

A eficácia da terapia à base de laser encontrada nos resultados dessa pesquisa pode também ser encontrada no trabalho de Fillipin, (2005). O autor utilizou um total de 32 ratos machos, Wistar, divididos em 4 grupos (controle, lesado, lesado + laser – 14 dias, lesado + laser – 21 dias), submetidos à lesão do tendão calcâneo através de impacto. Foram realizadas aplicações de laser de baixa de Ga-As, 904nm, 45mW potência, dose de $5\text{J}/\text{cm}^2$, por 35 segundos. Os resultados mostraram um aumento na concentração de fibras de colágeno, quando comparada com o grupo controle, e um aumento também significativo do estresse oxidativo no sítio de lesão. As aplicações de laser por 14 e 21 dias “aliviaram” anormalidades histológicas reduzindo a concentração de colágeno e prevenindo o estresse oxidativo. De uma maneira geral, a LILT reduziu anormalidades histológicas, concentração de colágeno, e estresse oxidativo.

Reddy, (1998) usou um total de 24 coelhos machos, de 10-12 semanas, os quais sofreram tenotomia do calcâneo direito através de um processo cirúrgico. O tratamento teve duração de 14 dias sendo realizado através de aplicações de laser He-Ne, 632,8nm, dose de $1\text{J}/\text{cm}^2$, aplicações diárias. As análises realizadas mostraram um aumento de 26% na concentração do colágeno, apontando para um processo de reparo tendíneo mais rápido, quando comparado ao grupo controle. De uma maneira geral, se pode concluir que o tratamento com laser facilita a produção e deposição de fibras de colágeno, através da modulação da síntese de colágeno, favorecendo o reparo tendíneo.

Demir, (2004) desenvolveu um trabalho comparativo entre os efeitos do laser, do us e laser + us em reparo do tendão calcâneo. Um total de 84 ratos machos, saudáveis, divididos

em 3 grupos (laser, us, laser+us) de 28 animais, foi submetido à lesão parcial longitudinal dos tendões calcâneos direito e esquerdo, sendo o esquerdo tratado e o direito usado como controle. O tratamento começou 24h após a lesão, tendo uma duração de 9 dias. O US utilizado apresentava potência de $0.5\text{W}/\text{cm}^2$, frequência de 1MHz (modo contínuo), por 5 minutos. O laser de baixa intensidade foi o de Ga-As, comprimento de onda de 940nm, 6mW de potência, dose de $1\text{J}/\text{cm}^2$, frequência de 16Hz, duração de 1 minuto no modo contínuo. O grupo controle recebia o mesmo tratamento, porém com os aparelhos desligados. Os resultados encontrados apontaram para uma significância estatística não relevante entre os grupos tratados e controle, mesmo havendo um aumento da velocidade no processo de reparo tendíneo. Em relação ao tratamento combinado, não houve constatação de efeitos cumulativos positivos em relação aos tratamentos isolados com us e laser.

O uso de laser de baixa intensidade no tratamento de lesões tendíneas apresentou significativa confiabilidade nos trabalhos realizados por Reddy et al, (1998) e Enwemeka (1992), onde foram constatados aumentos na produção de fibras de colágeno no citoplasma de fibroblastos de tendões. Enwemeka & Reddy (2000) observaram também um aumento de 30 a 40% na força tênsil dos tendões lesados após 14 dias de tratamento.

Ao utilizar laser Ga-As, potência média de 3,7 mW e dose de $4\text{J}/\text{cm}^2$, no processo cicatricial de tendões tenotomizados de ratos durante 7 e 14 dias após a lesão, Tavares (2002), constatou um aumento na concentração de fibras de colágeno e uma menor presença de células inflamatórias.

Carrinho *et al* (2006) utilizando lasers com doses de 3 e $10\text{J}/\text{cm}^2$, comprimentos de onda de 685 nm e 830 nm, tratou 48 animais tenotomizados por 13 dias. Os resultados mostraram uma eficácia de todos os diferentes grupos de tratamento em relação à aceleração do reparo da lesão tendínea, principalmente no grupo tratado com laser 685 nm, $3\text{J}/\text{cm}^2$.

No entanto, em contrapartida com os achados acima citados e com os resultados obtidos no presente estudo, Lowe *et al* (1998), utilizando 50 ratos machos Balb/c, aleatoriamente divididos em 5 grupos onde um grupo não recebia qualquer tipo de tratamento, e os outros 4 recebiam irradiações prévias de 20 Gy de raio-X por 72h, realizou úlceras na região dorsal dos animais, tratando-as com aplicações de laser. Os parâmetros utilizados foram de 890 nm, potência de 300 mW, doses de 0.18, 0.54 e 1.45 J/ cm², três vezes por semana. Os resultados não constatarem um efeito estimulatório satisfatório no reparo de úlceras cutâneas, achando-se um efeito inibitório com aplicação da dose de 1.45 J/ cm².

Fazendo uma análise comparativa entre as médias dos valores absolutos de OR obtidos nos experimentos (Apêndice 1), percebe-se que entre os grupos tratados com laser, os melhores resultados foram obtidos com as aplicações do comprimento de onda de 685 nm. Já entre os grupos tratados com LED, obteve-se o contrário, sendo os melhores resultados obtidos com aplicações infravermelhas, 880 nm.

Levando-se em consideração a ausência de padronização dos protocolos utilizados nos diversos trabalhos aqui citados, e a diversidade de resultados obtidos, já que cada autor utilizou diferentes padrões de comparação e análise, fica muito difícil afirmar com absoluta certeza que tratamentos fototerápicos têm 100% de eficácia em casos de reparo de lesões tendíneas. Porém, baseados nos resultados obtidos no presente experimento, acredita-se que terapias à base de luz têm uma real eficácia em aplicações clínicas na prática fisioterápica, mesmo havendo ainda a necessidade de maiores pesquisas na área para um estabelecimento mais maduro e seguro de parâmetros como comprimento de onda, potência, dose, tempo e frequência de aplicações.

Capítulo 4

CONCLUSÕES E SUGESTÕES

CONCLUSÕES

- Fototerapias à base de LEDs mostraram-se eficazes no processo de reparo de lesão tendínea, apresentando resultados semelhantes à terapia laser de baixa intensidade (LLLT).
- Os resultados mostraram que a natureza do estímulo interfere no processo de reparo tecidual quando as doses energéticas são igualadas.
- Tratamentos fototerápicos mostraram-se mais eficazes e não lesivos quando comparados aos baseados em onda mecânica, como no caso do LIPUS.
- A pesar da ausência de coerência da luz LED, o tratamento de lesão tendínea com esse recurso apresentou resultados satisfatórios, podendo seguramente substituir tratamentos baseados em aplicações da luz laser.
- Uma melhor organização e alinhamentos das fibras de colágeno com dose de $6\text{J}/\text{cm}^2$ foram conseguidos através de aplicações de laser 685nm e LED 880 +/- 5nm.

SUGESTÕES

- Induzir lesões com maior grau de complexidade em tendão calcâneo e tratar com fototerapia baseada na luz LED para testar sua eficácia.
- Realizar ensaios mecânicos para avaliar a eficácia do tratamento à base de LEDs em relação à resistência tênsil do tendão.
- Igualar todos os parâmetros de irradiação (potência, dose, comprimento de onda) e fazer uma análise comparativa entre laser e LED em tratamentos fototerápicos para lesões em tecidos moles.
- Montar um modelo experimental que determine parâmetros ótimos para aplicações de tratamentos à base de LIPUS, sem que haja efeitos indesejáveis como, por exemplo, a destruição de fibras de colágeno ali depositadas pela ação do aquecimento do transdutor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGAIBY, A. D. et al (2000) Laser modulation of angiogenic factor production by T-lymphocytes. **Laser in Surgery and Medicine**, V. 26, n. 4, p. 357 – 363.

ALMEIDA-LOPES, L.; RIGAU, J.; ZÂNGARO, R. A.; GUIDUGLI-NETO, J.; JAEGER, M. M. (2001) Comparison of low level laser therapy effects on cultured humans gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. **Laser in Surgery and Medicine**, v. 29, p. 176 – 184.

ALMEKINDERS, L. C.; DEOL, G. (1999) The effects of aging, antiinflammatory drugs, and ultrasound on the in vitro response of tendon tissue. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 27, n.4, p. 417 – 421.

AL-WATBAN, A. H. F. (2006) Polychromatic LED in Oval Full-Thickness wound Healing in Non-diabetic an Diabetic Rats. **Photomedicine and Laser Surgery**, V. 24, n. 1, p. 10 – 16.

BAGNATO, V. S. (2002). **Uso de LEDs (Light Emitting Diodes) para terapia bioestimuladora**. BR n. PI0200200-0, 23 jan. 2002, 14 out. 2003.

BARRY, N.M.; MCGUIRE, J.L. (1996) Overuse Syndromes in adult athletes. **Musculoskeletal Medicine**, v. 22, n. 3, p. 515-529.

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

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

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

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

CARRINHO, P. M. *et al* (2006) Comparative study using 685 – nm and 830 – nm lasers in the tissue repair of tenotomized tendond in the mouse. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 24, n. 6, p. 754 – 758.

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

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

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

CORAZZA, A. V.; JORGE, J.; KURACHI, C.; BAGNATO, V. S. (2007) Photobiomodulation on the angiogenesis of skin wound in rats using different light sources. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 25, n. 2, p. 102 – 106.

COTRAN, R. S. et al. (2000) Robbins – Patologia Estrutural e Funcional. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. 6ª ed. 1251p.

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

CUNHA, A.; PARIZOTTO, N. A.; VIDAL, B. C. (2001) The effect of therapeutic ultrasound on repair of the Achilles tendon (tendon calcaneus) of the rat. **Ultrasound Med Biol**, v.27, n.12, p. 1691-1696.

DANHOF, G. (2000) Biological effects of the laser beam. In: Simunovic, Z. (Ed.), **Laser in Medicine and Dentistry: basic up-to-date clinical application of low energy level laser therapy LLLT**. Croatia: Rijeka; Vitgraf. P. 127 – 152.

DEMIR, H. *et al* (2004) Comparison of the effects of laser, ultrasound, and combined laser + ultrasound treatments in experimental tendon healing. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 35, n. 1, p. 84 – 89.

DYSON, M. (1987) Mechanisms involved in therapeutic ultrasound. **Physioterapy**, v. 73, n. 3, p. 116-120.

EL SAYED, S. O.; DYSON, M. (1990) Comparison of the effect of multiwavelength light produced by a cluster of semiconductor diodes and of each individual diode on mast cell number and degranulation in intact and injured skin. **Lasers in Surgery and Medicine**, New York, v. 19, n. 6, p. 559-568.

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

ENWEMEKA, C. S. (1992) Ultrastructural morphometry of membrane-bound

intracytoplasmic collagen fibrils in tendon fibroblasts exposed to He-Ne laser beam. **Tissue and Cell**, v. 24, n.4, p. 511-523.

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

ENWEMEKA, C. S.; SPIELHOLZ, N. I. (1992) Modulation of tendon growth and regeneration by electrical fields and currents. In: Currier, D. P.; Nelson, R. M. **Dynamics of Human Biological Tissues**. Philadelphia: F. A. Davis Company, cap. 3, p. 231 – 254.

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

FILLIPIN, L. I. *et al* (2005) Low-level laser therapy (LLLT) prevents oxidative stress and reduces fibrosis in rat traumatized Achilles tendon. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 37, n. 4, p. 293 – 300.

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

GIGANTE, A.; SPECCHIA, N.; RAPALI, S.; VENTURA, A.; DE PALMA, L. (1996) Fibrillogenesis in tendon healing: an experimental study. **J. Biol. Res.** V. 7, n. 8, p. 203 – 210.

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

GONZÁLEZ, M. V.; COLLS, J. C. (1988) Comportamiento de la luz en la intereccion con los tejidos, en especial el láser de baja potencia. **Bol. Centro Documentación Láser**, v. 15 – 16, p. 6 – 21.

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

GUYTON, A. C. **Tratado de fisiologia médica**. 10 ed. Rio Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

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

JÓZSA, L.; KANNUS, P. (1997) Human tendons. **Human Kinetica**. United States of America.

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

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

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

KARU, T. I. (1987) Photobiological fundaments of low-power laser therapy. **IEEE journal of Quantum electronics QE**, v. 23, n. 10, p. 1703 – 1717.

KARU, T. I. (1995) Mechanisms of interaction of monochromatic visible light cell. **Proceedings of Effects of Low Power Light on Biological Systems**, v. 2630, p. 2 – 9.

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

KARU, T. I. (2000) 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.

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

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

KHAN, K. M. *et al.*, (1999) Histopathology of common tendinopathies. **Injury Clinic**, v. 27, n. 6, p. 393 – 408.

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

KITCHEN, S. S. & PARTRIDGE, C. J. (1990) A review of Therapeutic Ultrasound. Part I: Background and Physiological Effects. **Physiotherapy**, v. 76, n. 10, p. 593-599.

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

KOEKE, P. U.; PARIZOTTO, N. A.; CARRINHO, P. M.; SALATE, A. C. B. (2005)

Comparative study of the efficacy of the topical application of hydrocortisone, therapeutic ultrasound and phonophoresis on the tissue repair process in rat tendons ultrasound.

Ultrasound Med Biol, v. 31, n. 3, p. 345–350.

KUSCHNER, S. H.; ORLANDO, C. A.; MCKELLOP, H. A.; SARMIENTO, A. (1991) A comparison of the healing properties of rabbit Achilles tendon injuries at different levels.

Clinical Orthopaedics and Related Researchs, n. 272, p. 268 – 273.

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

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

LARSEN, A.; KRISTENSEN, G.; THORLACIUS-USSING, O.; OXLUND, H. (2005) The influence of ultrasound on the mechanical properties of healing tendons in rabbits. **Acta Orthopaedica**, v. 76, n. 2, p. 225 – 230.

LOW, L.; REED, A. (2001) **Eletroterapia Explicada: Princípios e Prática**. 3º. ed., Barueri – SP: Manole.

LOWE, A. S. *et al* (1998) Effect of low intensity monochromatic light therapy (890 nm) on a radiation – impaired, wound – healing model in murine skin. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 23, p. 291 – 298.

LU, H.; QIN, L.; FOK, P.; CHEUNG, W.; LEE, K.; GUO, X.; WONG, W.; LEUNG, K. (2006) Low-intensity pulsed ultrasound accelerates bone-tendon junction healing: a partial patellectomy model in rabbits. **American Journal Of Sports Medicine**, v. 34, n. 8, p. 1287 -

1296.

LUBART, R.; LAVIE, R.; FRIEDMANN, M.; SINYKOV, M.; SHAINBERG, H.; BREITBART, H.; GROSSMAN, N. (2000) UVA and visible light-induced reaction 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.

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

MAILLET, H. (1987) **O laser – princípios e técnicas de aplicação**. São Paulo – SP: Ed. Manole.

MAITI, S. K.; KUMAR, N.; SINGH, G. R.; HOQUE, M.; SINGH, R. (2006) Ultrasound therapy in tendinous injury healing in goats. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v. 53, p. 249.

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

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

MANTEIFEL, V.; BAKEEVA, L.; KARU, T. (1997) 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.

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

NG, C.O.Y.; NG, G.Y.F.1; SEE, E.K.N.; LEUNG, M.C.P. (2003) Therapeutic ultrasound improves strength of Achilles tendon repair in rats. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 29, n.10, p. 1501-1506.

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

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

PARIZOTTO, N. A.; BARANAUSKAS, V. (1998) Hidrogen bonding of collagen molecule stimulated by He-Ne laser in the regenerating of tendon. In: **Proceeding 2nd World Association of Laser Therapy**. Kansas City, Missouri, USA, September 2 – 5, p. 64 – 65.

PASSARELLA, S.; CASAMASSIMA, E.; MOLINARI, S.; PASTORE, D. (1984) Increase of proton electrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by He-Ne laser. **FEBS**, v. 175, n.1, p. 95 – 99.

PEREIRA, A.N.; EDUARDO, C.P.; MATSON, E.; MARQUES, M.M. (2002) 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.

POSTACCHINI, F.; DE MARTINO, C. (1980) Regeneration of rabbit calcaneal tendon maturation of collagen and elastic fibers following partial tenotomy. **Connective Tissue Research**, v. 8, p. 41 – 47.

REDDY, G. K.; STEHNO-BITTEL, L.; ENWEMWKA, C. S. (1998) Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit achilles tendons. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 22, n. 5, p. 281-187.

REED, B.; ZARRO, V. (1990) 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.

REYNOLDS, N. L.; WORREL, T. W. (1991) Chronic Achilles peritendinitis: etiology, pathophysiology and treatment. **JOSPT**, v. 13, n. 4, p. 171 – 176.

ROCKIND, S.; NISSAN, M.; LUBART, R.; AVRAM, J.; BARTAL, A. (1988) The in vivo nerve response to direct low-energy laser irradiation. **Acta Neurochir**, v. 94, p. 74 – 77.

SAINI, N. S.; ROY, K. S.; BANSAL, P. S.; SINGH, B.; SIMRAN, P. S. (2002) A preliminary study on the effect of ultrasound therapy on the healing of surgically severed achilles tendons in five dogs. **Journal of veterinary medicine. A Physiology, pathology, clinical medicine**, v. 49, n. 6, p. 321 – 328.

SALATE, A.C. B. (2005) **Estudo dos efeitos do laser de baixa intensidade na angiogenese em ruptura parcial do tendao calcaneo de ratos**. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos - SP: UFSCar.

SALOMÃO, O.; CARVALHO, A. E.; FERNANDES, T. D.; TRALDI, I. H.; CARVALHO, J. N. (1993) Lesões tendíneas no pé e no tornozelo do esportista. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 28, n. 10, p. 731 – 736.

SANDOVAL-ORTIZ, M. C.; CARRINHO, P. M.; SANTO, A.; GONÇALVES, R. (2001) Laser de baixa intensidade: princípios e generalidades – Parte 1. **Fisioterapia Brasil**, v. 2, n.

1, p. 221 – 240.

SILVA, O. L. Estudo do Mecanismo da Ação do Ultrassom na Estimulação do Tecido Ósseo. Dissertação (mestrado) – Área de Interunidades em Bioengenharia EESC/FMRP/IQSC – Universidade de São Paulo.

SOMA, C. A.; MANDELBAUM, B. R. (1995) Repair of acute Achilles tendon ruptures. **Orthopedic Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 239 – 47.

STARKEY, C. Ultrassound. In: **Therapeutic Modalities**. 2. Ed. Philadelphia: F. A. Davis, cap. 6, p. 269-302, 1999.

STOLIK, S.; DELGADO, J. A.; PÉREZ, A.; ANASAGASTI, L. (2000) Measurement of the penetration depths of red and near infrared light in human “ex vivo” tissues. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 57, p. 90 – 93.

STOLINSK, C. (1995) Disposition of collagen fibrils in human tendons. **J. Anat.**, v. 186, p. 577 – 583.

TAGUCHI, Y. (1991) Thermographic changes following laser irradiation for pain relief. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, april, p. 143 – 146.

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.

TER HAAR, G. (1987) Physics of Therapeutic Ultrasound. **Physiotherapy**, v. 73, n. 3.

TER HAAR, G.; DANIELS, S.; EASTAUGH, K. C.; HILL, C. R. (1982) Ultrasonically induced cavitation in vivo. **The British Journal of Cancer**, v. 45, supl. 5, n. 151.

TILLMAN, L. J.; CUMMINGG, G. S. (1992) 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.

TUNER, J.; HODE, L. (1998) It's all in the parameters: a critical analysis of some well-known negative studies on low level laser therapy. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v. 16, n. 5, p. 245 – 248.

TUNÉR, J.; HODE, L.(1999) **Low level laser therapy. Clinical practice and scientific background**. Sweden: Prima Books.

VIDAL, B. C. (1987 a) Matrix extracellular. In: Vidal, B. C.; Mello, M. L. S. **Biologia Celular**, Rio de Janeiro e São Paulo: Atheneu, cap. 19, p. 273 – 304.

VIDAL, B. C. (1987 b) Métodos em Biologia Celular. In: Vidal, B. C.; Mello, M. L. S. **Biologia Celular**.Rio de Janeiro e São Paulo: Atheneu, cap. 2, p. 5 – 40.

VIDAL, B. C.; CARVALHO, H. F. (1990). Agregation state on molecular order of tendons as a function of age. **Matrix**, v. 10, p. 48 – 57.

VILLARTA, R.; VIDAL, B. C. (1989) Anisotropic and biomechanical properties of tendons modified by exercise and denervation: aggregation and macromolecular order in collagen bundles. **Matrix**, v. 9, p. 55 – 61.

VINCK, E. M.; CAGNIE, B. J.; CORNELISSEN, M. J.; DECLERCQ, H. A.; CAMBIER, D. C. (2003) Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. **Laser in Medical Science**, v. 18, n. 2, p. 95-99.

WELLS, P. N. T. (1997) Biomedical Ultrasonics. London: Academic Press, 635p.

WHELAN, H. T. *et al* (2003) Effect of NASA light emitting diode irradiation on molecular

changes for wound healing in diabetic mice. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, v. 21, n. 2, p. 67-74.

WHELAN, H. T. et al. (2001) Effect of NASA light-emitting diode irradiation on wound healing. ***Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery***, New York, v. 19, n. 6, p. 305-314.

WILDEN, L.; KARTHEIN, R. (1998) 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. 6, n. 3.

WILLIAMS, A. R. (1987) Production and Transmission of Ultrasound. ***Physiotherapy***, v. 73, n. 3, p. 113-116.

XAVIER, C.; DUARTE, L. R. (1983) Estimulação Ultrassônica do Calo Ósseo. ***Revista Brasileira Ortopédica***, v. 18, n. 3, p. 73-80.

YEUNG, C.K. et al. (2006) Pulsed ultrasound treatment accelerates the repair of Achilles tendon rupture in rats. ***Journal of Orthopaedic Research***, v. 24, n. 2, p. 193 – 201.

YOUNG, S. R.; DYSON, M. (1978) Macrophage responsiveness to therapeutic ultrasound. ***Ultrasound in Medicine and Biology***, v.16, n. 8, p. 809-816.

ZISKIN, C. M.; NCDIARMID, T.; MICHLOVITZ, S. L. (1999) Therapeutic Ultrasound. In: Michlovitz, S. L. ***Thermal Agents in Rehabilitation***. 3. Ed. Philadelphia: F. A. Davis Company, p. 169-207.

APÊNDICES

Apêndice A - Valores das Médias e dos Desvios Padrão do retardo óptico (OR, em nm) das fibras de colágeno dos tendões calcâneos dos animais, obtidos através de um alinhamento do eixo longo dos tendões à 45° em relação ao polarizador.

SUBGRUPO	N	MÉDIA - ME	DESVIO PADRÃO - DP
LEDIV – 10	20	40,38	12,26
LEDIV – 5	20	37,67	7,46
LV – 5	20	27,31	6,59
LV – 10	20	32,94	4,45
LIV – 5	20	31,25	4,45
LIV – 10	20	39,87	6,05
LEDV – 5	20	31,64	3,99
LEDV – 10	20	37,80	6,90
GC – 10	20	26,73	6,04
GC – 5	20	18,67	2,40
US – 10	20	15,68	3,60
US – 5	20	18,47	2,42
GN (ou GCp)	20	60,70	3,30

Apêndice B - Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal.

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

Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal nº 013/2006

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos – CEEA/UFSCar – na sua 7ª. Reunião, ocorrida em 20/06//2006, **APROVOU** o trabalho intitulado Estudo comparativo de sistemas a base de Lasers, LEDs e Ultra-som (US) de baixa intensidade no reparo tecidual em tendão calcâneo, elaborado por Jéssica Lucia Neves Bastos e Carlos Dias Maciel, procedente da Universidade de São Paulo/Bioengenharia. Protocolo CEEA nº 013/2006.

São Carlos, 3 de agosto de 2006.

Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal

Apêndice C - Parâmetros de Biossegurança para uso do laser/LED.

As fontes de lasers são divididas em quatro grupos, conforme o tipo de lesão que provocam nos olhos. Os quatro grupos são numerados de I a IV.

CLASSE I - Trata-se de lasers de potência baixa, cujo perigo é moderado, porém não é aconselhável olhar diretamente para nenhum tipo de laser.

CLASSE II - Emitem radiação visível de baixa potência e provavelmente não prejudicam os olhos se não forem olhados diretamente durante mais de 0,25s ; 0,25s é o tempo de rejeição do olho à luz, que no caso é o tempo que o olho leva para piscar. Nas regiões visível e infravermelha próxima os lasers do grupo II emitem de 1uW a 1mW, aproximadamente conforme o comprimento de onda que varia de 400nm a 700nm. As classificações deixam uma margem de segurança razoavelmente grande, mas não convém olhar diretamente para o feixe emitido pelos lasers do grupo II.

CLASSE IIIa e IIIb - Provocam lesão no olho em menos de 0,25s. Os do grupo IV são os que apresentam níveis de radiação muito perigosos por reflexão difusa. Além disso, vários lasers do grupo IV chegam a produzir fogo ou emitir tanta potência que conseguem vaporizar qualquer material que usamos para bloquear o feixe, colocando no ar certos compostos químicos perigosos, como o de berílio, por exemplo. Com exceção dos lasers do grupo I, todos os outros precisam receber etiqueta de identificação para estabelecer o grupo a que pertencem.

No presente trabalho, foram tomadas todas as medidas de segurança como uso de óculos protetores para evitar danos aos olhos durante as aplicações da terapia tanto a laser (LILT) quanto LEDT, uso de um envoltório de filme plástico para evitar contaminação da ponteira aplicadora, e calibragem dos equipamentos antes e depois de todos os procedimentos.