

**Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa & Desenvolvimento**

Nádia Cristina Buso

**“Avaliação da Ação do Laser Arseneto de Gálio - 904nm no Processo de
Reparação do Tendão de Aquiles em Ratos”**

São José dos Campos, SP

2006

Nádia Cristina Buso

**“Avaliação da Ação do Laser Arseneto de Gálio - 904nm no Processo de
Reparação do Tendão de Aquiles em Ratos”**

Evaluation of the Gallium-arsenate Laser - 904 nm Action on the Repair
Process of Achilles Tendon in Rats

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Bioengenharia, como complementação dos
créditos necessários para obtenção do título
de Mestre em Engenharia Biomédica

Orientador: Prof. Dr. Antonio Guillermo
José Balbin Villaverde.

Co-orientador: Prof. Dr. Miguel Angel
Castillo Salgado.

São José dos Campos, SP

2006

B985a

Buso, Nádia Cristina

Avaliação da ação do laser Arseneto de Gálio- 904nm no processo de reparação do tendão de Aquiles em ratos/ Nádia Cristina Buso. São José dos Campos: UniVap, 2006.

82f.:il.; 30 cm.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Bioengenharia do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale da Paraíba, 2006.

1. Tendão do calcâneo 2. Terapia a Laser de Baixa Intensidade 3. Cicatrização I. Balbin Villaverde, Antonio Guillermo José, Orient. II. Salgado, Miguel Angel Castillo, Co-Orient. III. Título

CDU: 616-003.9

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processo fotocopiador ou transmissão eletrônica.

Aluna: *Nádia Cristina Buso*

Data: 31 de maio de 2006.

“AVALIAÇÃO DA AÇÃO DO LASER DE ARSENETO DE GÁLIO – 904NM NO PROCESSO DE REPARAÇÃO DO TENDÃO DE AQUILES EM RATOS”

Nádia Cristina Buso

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. **RENATA AMADEI NICOLAU** (UNIVAP)

Prof. Dr.. **ANTONIO G. J. BALBIN VILLAVARDE** (UNIVAP)

Prof. Dr. **MIGUEL A. C. SALGADO** (UNESP)

Prof. Dr. **ALEXANDRE SCHERMA** (UNITAU)

Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco
Diretor do IP&D - UniVap

DEDICATÓRIA

A Deus, por ter estado ao meu lado, dando-me forças para romper todas as barreiras que encontrei nesta etapa da minha vida;

Ao meu grande amor e companheiro Marcos, verdadeiro presente de Deus, que esteve ao meu lado auxiliando e apoiando todos os estágios deste trabalho.

À minha mãe Noédia cujo carinho me deu forças para continuar a desempenhar meu trabalho;

Ao meu irmão Rogério pelo apoio e compreensão;

À tia Nelly pelo carinho e apoio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Univap o apoio durante a elaboração deste trabalho;

À Secretaria do IP&D e Biblioteca Setorial;

Ao orientador Prof. Dr. Antonio Guillermo José Balbin Villaverde pelo apoio e ensinamento;

Ao co-orientador e amigo Prof. Dr. Miguel Angel Castillo Salgado por ajudar e acreditar em todas as etapas deste trabalho;

À doutoranda Ana Maria Barbosa pelo auxílio e colaboração, onde esteve presente desde o início deste trabalho;

Ao assistente do laboratório de histologia (UNESP) e amigo Walter Cruz, que realizou e ensinou todas as etapas dos procedimentos histológicos;

Aos veterinários Dr^a. Ana Paola Paglialunga e Dr. José Henrique de Andrade pelos ensinamentos e auxílios durante o experimento;

E a todos que de alguma forma colaborou para finalização deste trabalho.

RESUMO

O laser de baixa potência vem sendo usado para minimizar os efeitos maléficos da inflamação, bem como acelerar a cicatrização dos tecidos lesados, confirmando por análise histomorfométrica, o processo de cicatrização dos tendões pós-traumáticos. Existem muitas frustrações em cirurgia com a restauração da função normal de um tendão lesado, isso fez com que desenvolvesse trabalhos e técnicas diferenciadas para obter sucesso na reestruturação dos tendões. O objetivo deste estudo foi avaliar o processo de reparação de lesões em tendões de ratos submetidos à tenotomia total e tratados com sessões diárias de irradiação laser diodo AsGa (904nm). Foram utilizados 34 ratos albinos, machos, da linhagem *Wistar*, com peso aproximado de 350g, os quais foram submetidos à tenotomia do tendão de Aquiles da pata traseira direita. O tratamento com laser foi iniciado no pós-operatório com doses diárias de 4 J/cm², por um período de 05 a 15 dias, com método pontual, ficando a caneta do laser em contato direto com a pele do animal. Os animais foram divididos em três grupos: A, B e C; sendo que, em cada grupo foram divididos grupo controle e grupo tratado. Os animais do grupo A foram irradiados por 5 dias consecutivos, com 2 dias de intervalo, sendo sacrificados no 7º dia; os do grupo B foram irradiados por mais 5 dias consecutivos, com 2 dias de intervalo e sacrificados no 14º dia; e os do grupo C foram irradiados mais 5 dias consecutivos, com 2 dias de intervalo e sacrificados no 21º dia, realizando simulação do tratamento em clínica de fisioterapia. Todos os animais controle tiveram simulação da aplicação do laser com o aparelho desligado, passando pelo mesmo procedimento técnico dos animais tratados. Após o sacrifício, os tendões foram dissecados e extraídos, fixados em formol 10% e encaminhados para análise histológica por microscopia de luz, onde foi analisado o processo de reparação. Este estudo mostrou que o laser diodo AsGa interfere no processo inflamatório aumentando o número de fibroblastos nos períodos iniciais e acelerando a síntese do colágeno nos períodos tardios.

Palavras chaves: Laser Arseneto de Gálio, Tendão de Aquiles, Reparação tecidual.

ABSTRACT

The low-power laser has been used to minimize the inflammation malefic effects, as well as to speed up the healing of the injured tissue; what is verified by the analysis of the healing process of the post-traumatic tendon. Frustrations trying to recuperate the normal function of an injured tendon lead us to develop studies and specific techniques to obtain success on the tendon recuperation. This research aimed to evaluate the healing process of injured tendons of rats submitted to a total tenotomy and treated with daily session of diode laser irradiation GaAs – 904nm. Thirty-four albino rats were used, males, Wistar rats, weighing approximately 350g, which were submitted to a tenotomy of the Achilles tendon of the right rear paw. The treatment using laser began after the surgery with daily doses of 4 J/cm², for a period varying from 5 to 21 days, with punctual method and the pen of the laser in direct contact with the animal's skin. The animals were divided in three groups: A, B and C and each group subdivided in two: treated and control groups. Rats from group A were irradiated for 5 days in a row and sacrificed at the 7th day; rats from group B daily irradiated for 5 more days and sacrificed at the 14th day and finally; the rats from group C were irradiated for 5 more days and sacrificed at the 21th day. All the control animals went through for a simulation of laser application with the instrument off, following the same technical procedure than for the treated animals. After animals were sacrificed, their tendons were dissected and extracted, fixed in formaldehyde 10%. The tendon healing processes was observed by histological analysis using microscopy light. Results showed that the diode laser GaAs interfered in the inflammatory process increasing the number of fibroblasts along the early periods and speeding up the collagen synthesis at the later periods.

Key words: Gallium Arsenide Laser, Achilles Tendon, Healing.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	01
1.1 Colágeno.....	02
1.2 Tendão.....	05
1.3 Tendão de Aquiles.....	08
1.4 Reparação do tendão.....	09
1.4.1 Cicatrização extrínseca e intrínseca.....	12
1.5 Laser.....	14
1.5.1 Efeitos do laser de baixa potência.....	16
1.5.1.1 Efeitos primários ou diretos.....	16
1.5.1.2 Efeitos secundários ou indiretos.....	17
1.5.1.3 Efeitos terapêuticos.....	17
1.5.2 Laser arseneto de gálio (AsGa).....	18
2. Objetivo.....	24
3. Material e métodos.....	25
3.1 Animais.....	25
3.2 Aparelho laser.....	25
3.3 Grupos experimentais.....	26
3.4 Procedimento cirúrgico.....	27
3.5 Procedimento experimental.....	28
3.6 Sacrifício dos animais.....	29
3.7 Técnica histológica.....	29

3.8 Métodos de análise de fibroblastos, células inflamatórias, vasos sanguíneos e fibras de colágeno.....	30
3.9 Análise estatística.....	34
4. Resultados.....	35
4.1 Fibroblastos.....	38
4.2 Células inflamatórias mononucleares.....	39
4.3 Matriz de colágeno.....	40
4.4 Vasos sanguíneos.....	42
5. Discussão.....	44
6. Conclusões.....	50
Referências bibliográficas.....	51
Anexo A – Análise do número de fibroblastos.....	56
Anexo B – Análise da presença de células inflamatórias mononucleares.....	59
Anexo C – Análise da quantidade das fibras de colágeno.....	62
Anexo D – Análise da presença de vasos sanguíneos.....	65
Anexo E – Comitê de ética.....	68

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Forma do colágeno tipo I, cadeia peptídica tipo $\alpha 1$ e tipo $\alpha 2$. As cadeias são enroladas com giro à direita e forma alfa-hélice, mantida unida por pontes de hidrogênio... 03
- Figura 2:** Moléculas do colágeno que se agregam para formar fibrilas, fibras e feixes de colágeno..... 04
- Figura 3:** Fotomicrografia do tendão de calcâneo normal do rato. Corte transversal, aumento de 200x, corado com HE (Hematoxilina-Eosina). FB: fibroblastos e FC: fibras de colágeno..... 06
- Figura 4:** A organização da estrutura de tendão: das fibrilas de colágeno até o tendão inteiro..... 08
- Figura 5:** Interação do raio laser com o tecido biológico..... 16
- Figura 6:** Aparelho laser..... 26
- Figura 7:** (A) Dissecção do tendão; (B) Tenotomia do tendão; (C) Sutura cutânea após os procedimentos cirúrgicos..... 28
- Figura 8:** Esquema dos grupos que receberam radiação laser..... 28
- Figura 9:** Aplicação do laser AsGa na região lesada..... 29
- Figura 10:** Fotomicrografia da região de reparação do tendão, corado com HE, corte longitudinal, aumento de 400x: fibroblastos e fibras de colágeno..... 31
- Figura 11:** Fotomicrografia da região de reparação do tendão, corado com HE, corte longitudinal, aumento de 400x: células inflamatórias mononucleares..... 31
- Figura 12:** Fotomicrografia da região de reparação do tendão, corado com HE, corte longitudinal, aumento de 200x: vasos sanguíneos periféricos..... 32
- Figura 13:** Fotomicrografia para reconhecimento da região de reparação do tendão, corado com HE, corte longitudinal, aumento de 40x, 7º dia PO: tendão tenotomizado e área de reparação do tendão..... 32
- Figura 14:** Imagem da seleção das células pelo método Image Tool..... 33
- Figura 15:** Imagem da seleção do colágeno pelo programa LEICA (QWin Colour)..... 33
- Figura 16:** Fotomicrografia da região de reparação do tendão no 7º dia, corados com HE. Cortes longitudinais, aumento de 400x. A1: grupo controle e A2: grupo tratado: fibroblastos, fibras de colágeno e células inflamatórias mononucleares..... 35
- Figura 17:** Fotomicrografia da região de reparação do tendão no 14º dia, corados com HE. Cortes longitudinais, aumento de 400x. B1: grupo controle e B2: grupo tratado: fibroblastos, fibras de colágeno e células inflamatórias mononucleares..... 36

Figura 18: Fotomicrografia da região de reparação do tendão no 21º dia, corado com HE. Cortes longitudinais, aumento de 400x. C1: grupo controle e C2: grupo tratado: fibroblastos, fibras de colágeno e células inflamatórias mononucleares.....	37
Figura 19: Gráfico comparativo do número de fibroblastos nos diferentes tempos de sacrifício.....	39
Figura 20: Gráfico comparativo do número de células inflamatórias mononucleares nos diferentes tempos de sacrifício.....	40
Figura 21: Gráfico comparativo do percentual das fibras de colágeno nos diferentes tempos de sacrifício.....	41
Figura 22: Gráfico comparativo do número de vasos sanguíneos periféricos nos diferentes tempos de sacrifício.....	43

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Médias, erro padrão e análise de variância do número de fibroblastos encontrados ao 7º, 14º e 21º dias , nos grupos controle e tratado..... 38
- Tabela 2:** Médias, erro padrão e análise de variância do número de células inflamatórias mononucleares encontradas ao 7º, 14º e 21º dias , nos grupos controle e tratado..... 40
- Tabela 3:** Médias, erro padrão e análise de variância da porcentagem de colágeno (%) observadas ao 7º, 14º e 21º dias , nos grupos controle e tratado..... 41
- Tabela 4:** Médias, erro padrão e análise de variância do número de vasos sanguíneos observados ao 7º, 14º e 21º dias, nos grupos controle e tratados..... 42

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.

ATP – Adenosina-trifosfato
AsGa – Arseneto de Gálio
C – Celsius
CI – Células inflamatórias
cm² - Centímetro quadrado
FB - Fibroblastos
Fc – Fibras de colágeno
g – gramas
HE – Hematoxilina e eosina
HeNe – Hélio e Neônio
Hz – hertz
J – joules
K – kilo
mg – miligramas
MHz – Mega hertz
mJ – milijoules
mm² – milímetros quadrados
nm – nanômetros
ns – nanosegundos
PO – Pós-operatório
SA - sacrifício
V – volts
VSP – Vasos sanguíneos periféricos
W - watts
α - alfa
μm – micrometro
% - por cento
° - graus

1. Introdução

Nas últimas décadas, inúmeros trabalhos científicos foram publicados mundialmente sobre lesões de tendões. Sterling Bunnell em 1918, *apud* Fernandes (1993), afirma que: “Um dos problemas mais frustrantes em cirurgia é restaurar a função normal de um tendão lesado”.

As lesões de tendões são as maiores preocupações para os cirurgiões que irão reconstruí-los, segundo Goffi (1996), a sutura de um tendão é uma das mais decepcionantes intervenções cirúrgicas, isto se explica pelo deficiente conhecimento do mecanismo de cicatrização dos tendões e pela aderência que frequentemente se forma, impedindo a recuperação funcional. Vários anos se passaram e os pesquisadores ainda tentam descobrir a melhor forma de reabilitar as funções e melhorar a reparação de um tendão.

Diversos estudos são direcionados ao desenvolvimento de técnicas que visem otimizar o processo de reparação tendínea. Neste sentido, encontram-se técnicas com eletroterapia, ultra-terapêutico e recentemente terapia com o laser de baixa potência. A maioria dos estudos, desenvolvidos em modelos experimentais ou clínicos, sugerem que o laser de baixa potência desencadeia estimulação nos processos celulares e fisiológicos.

Conforme os estudos de Enwemeka et al. (1998), Reddy et al. (1998a), Machado et al. (2000), Oliveira (2002), Tavares (2002) e Matera et al. (2003), pode-se observar a modulação do processo de reparação do tendão com o uso do laser de baixa potência.

A terapia com laser de baixa potência é amplamente utilizada como coadjuvante em diversos tratamentos. Um dos efeitos obtidos é a aceleração da cicatrização de partes moles, com resultados satisfatórios no processo de regeneração de tendão. Apesar do processo de reparação do tendão ser bem estudado, existem algumas dúvidas a respeito do tempo de aplicação, da densidade de energia aplicada no tendão e tipo de aparelho laser utilizado. Este aspecto justifica o esclarecimento e elaboração de um protocolo que possa ser usado na

prática clínica, ajudando a promover um melhor processo de cicatrização do tendão (REDDY et al., 1998a).

1.1 Colágeno

Segundo Junqueira e Carneiro (2004), as fibras que predominam no tecido conjuntivo são as fibras de colágeno, sendo formadas por glicoproteínas estruturais compostas por aminoácidos específicos. O colágeno é um tipo de proteína abundante no organismo, que representa 30% do peso corpóreo seco.

Perez et al. (2005), afirmam que o colágeno é o agente responsável por manter a integridade, resistência do tecido quando lesado e a quantidade de fibras de colágeno na cicatrização.

As fibras de colágeno são flexíveis, têm grande força tensora e quando examinadas ao microscópio eletrônico, observa-se feixes finos, filamentosos e alongados de fibrilas de colágenos (ROSS et al., 1993).

Simões et al. (1996), argumentam que o elemento fundamental para o sucesso da cicatrização de uma ferida é a organização das fibras de colágeno e não a quantidade das fibras na lesão.

As fibrilas de colágeno são formadas pela junção de moléculas de colágeno dos tipos I, II, III, V e IX, sendo que o colágeno tipo I encontra-se em maior número e está distribuído por todo organismo, nas seguintes estruturas: ossos, dentina, tendões, cápsulas de órgãos e derme (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

As moléculas de colágeno são longas, constituídas por tríplice hélice de três cadeias de polipeptídios chamadas de cadeias alfas (α), fazendo com que haja distinção de um colágeno para o outro através de suas cadeias de polipeptídios, além das propriedades físicas, morfológicas, distribuição nos tecidos e funções (SAED et al., 1999).

De acordo com Parizotto (1998), a principal propriedade da molécula de colágeno é a estrutura triplíce hélice, organizada em espiral onde se enrolam por três sub-unidades de cadeias polipeptídicas chamadas α - hélices (Figura 1).

Portanto, a tríplíce hélice é constituída por duas cadeias peptídicas ($\alpha_1(\alpha_1)$ e $\alpha_2(\alpha_2)$), sendo diferentes das demais cadeias, os quais se enrolam formando cadeia peptídica chamada de alfa - hélice, unidas entre si por pontes de hidrogênio (VIDAL; MELLO, 1987).

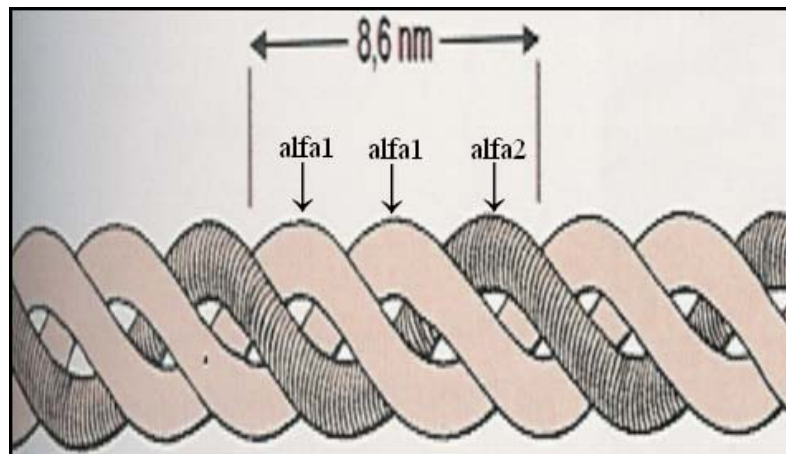


Figura 1 – Forma do colágeno tipo I, cadeia peptídica tipo α_1 e tipo α_2 . As cadeias são enroladas com giro à direita e forma alfa-hélice, mantida unida por pontes de hidrogênio. Fonte: Junqueira e Carneiro, (2004).

As fibrilas de colágeno apresentam polimerização de unidades moleculares alongadas chamadas de tropocolágeno (Figura 2) que formam três unidades arranjadas em tríplíce hélice (cadeias polipeptídicas), onde existe uma sequência de aminoácidos principais chamados de glicina, prolina, hidroxiprolina e hidroxilosina (ROSS et al., 1993). O aminoácido glicina está repetido a cada terceira posição da sequência da cadeia alfa-hélice (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

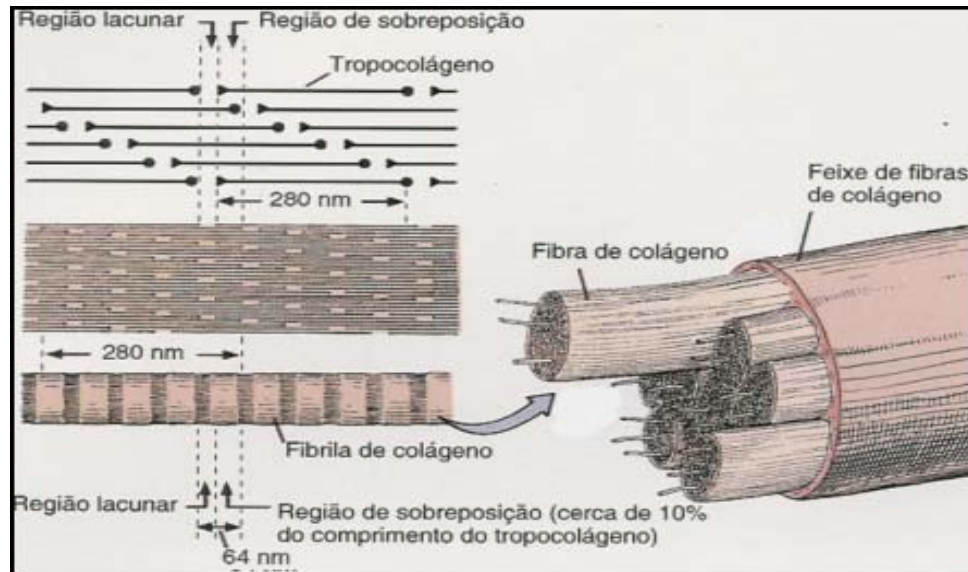


Figura 2 – Moléculas do colágeno que se agregam para formar fibrilas, fibras e feixes de colágeno. Fonte: Junqueira e Carneiro, (2004).

Reddy et al. (1998a) e Perez et al. (2005), afirmam que um fator importante para avaliar a produção de colágeno em uma reparação de tendão, é a concentração de hidroxiprolina, pois em estudos realizados por Reddy e Enwemeka (1996), observou-se que com o aumento de hidroxiprolina na síntese de colágeno, houve aumento de 14% no total do mesmo.

Na síntese do colágeno tipo I os tendões são representado por 80% de fibroblastos e outras células (SAED et al., 1999). Os fibroblastos são numerosos e apresentam forma estrelada e estão localizados entre os feixes de colágeno, sendo responsáveis pela síntese do colágeno, onde estão presentes os mastócitos e os macrófagos que são sintetizados no epitendão e paratendão. Os fibroblastos possuem formas alongadas com algumas reentrâncias citoplasmáticas correndo entre os feixes de colágeno que se encontram organizados no eixo longitudinal do tendão (ENWEMEKA, 1989). A síntese de colágeno envolve modificações bioquímicas da cadeia polipeptídica original, apresentando grande número de fases de transformação das estruturas envolvidas, com aumento da possibilidade de defeitos durante o processo de reparo, que pode se dar por falha enzimática ou processo patológico, levando a

uma lenta renovação de colágeno, obtendo complicação e desarmonia nos tendões, no qual é encontrado maior número de colágeno (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

1.2 Tendão

Os tendões consistem em feixes paralelos de fibras colágenas firmemente agrupadas, tendo entre as mesmas, fileiras de fibroblastos (ENWEMEKA, 2001). Estas células são fibroblastos quiescentes, denominados comumente fibrócitos, onde existem poucos vasos sanguíneos presentes nas bainhas conjuntivas, dando sustentação ao tendão (BIRK; TRELSTAD, 1986). Os tendões são providos de receptores sensitivos de Golgi, capazes de avaliar a tensão no tendão e transmitir esta informação ao sistema nervoso central (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Alguns tendões apresentam ainda sua própria bainha tendinosa, que consiste de duas camadas de tecido conjuntivo, uma dentro da outra, com um pequeno espaço separando a interna da externa, sendo que a interna está presa ao próprio tendão e a outra continua com o próprio tendão circunjacente. As duas superfícies de deslizamento são lisas e resistentes ao desgaste, pois se consistem de fibras colágenas e a fricção é minimizada pela presença de uma delgada camada viscosa de líquido sinovial (CORMAK; DAVID, 1984).

Para Raiser et al. (2003), os tendões são estruturas compostas de água, colágeno, proteoglicanos e fibroblastos, arranjados de forma ordenada. Fascículos, vasos sanguíneos e nervos rodeiam o endotendão e têm continuidade com a camada mais externa do tendão, o epitendão e o paratendão, formados de tecidos conjuntivos frouxos.

Junqueira e Carneiro (2004) afirmam que o tendão é formado de tecido denso modelado, composto de feixes de colágeno paralelos entre si e alinhados com fibroblastos, dando orientação às fibras do tendão e tornando-o resistente em resposta à força tensora. Os feixes de colágeno do tendão denominado feixes primários, se agrupam com feixes maiores

denominados feixes secundários, onde são envolvidos por tecido conjuntivo frouxo contendo vasos sanguíneos e nervos, dando o suprimento aos tendões (Figura 3).

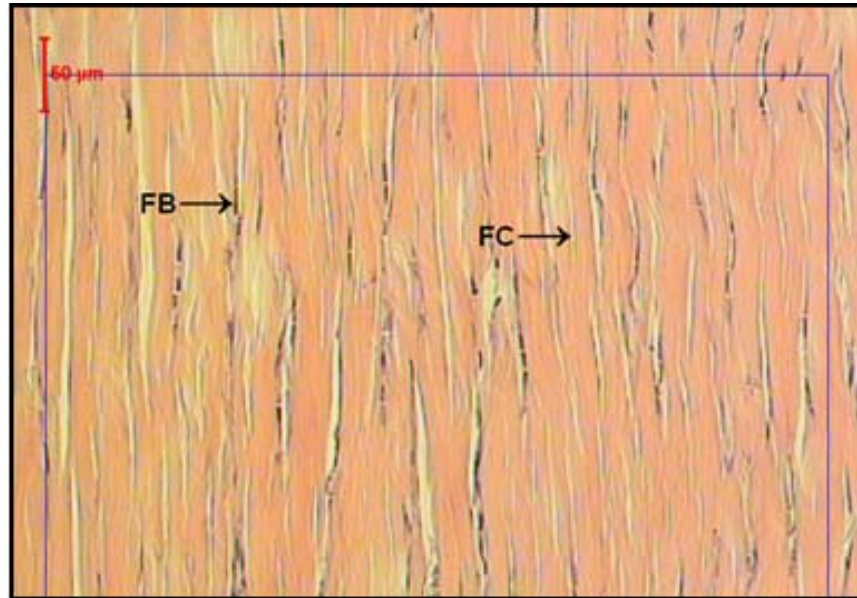


Figura 3 – Fotomicrografia do tendão de calcâneo normal do rato. Corte transversal, aumento de 200x, corado com HE (Hematoxilina-Eosina). FB: fibroblastos e FC: fibras de colágeno.

O tendão é formado por fibroblastos e matriz extracelular, onde estão imersas as proteínas fibrosas de colágeno e elastina. O colágeno é o maior componente da matriz extracelular, abrangendo cerca de 86% a 95% do peso úmido do tendão. No tendão as fibras de colágeno possuem uma disposição que é o resultado do seu processo de maturação, sendo usualmente organizadas em fascículos de fibras que contém unidades menores denominadas fibrilas. As fibrilas de colágeno são longas, cristalinas e extremamente alinhadas. O desenvolvimento desta estrutura é devido à adaptação funcional normal dos tendões (BIRK; TRELSTAD, 1986).

Birk et al. (1989), estudaram a junção de segmentos de fibrilas e o empacotamento de tendões de embriões de galinha de 14 dias, utilizando secções seriadas, microscopia eletrônica de transmissão e reconstituição de imagem por meio computacional. Foram achados segmentos de fibrilas nos canais extracitoplasmáticos, locais de polimerização do colágeno e

moléculas já polimerizadas. As fibrilas apresentaram comprimento médio variando entre 7 e 15 μm . Houve diferenças estruturais nos terminais dos segmentos das fibrilas, fazendo com que haja diferença em sua arquitetura, indicando que esses terminais são responsáveis pela formação das fibrilas de colágeno, tanto no desenvolvimento e crescimento do tendão, como no processo de reparo, tornando-se mais organizado o arranjo dos tendões.

Segundo Maffulli e Benazzo (2000), o tendão está coberto pelo epitendão, que é um tecido conjuntivo que contém os sistemas vasculares, linfáticos e inserções de nervos. O epitendão estende-se mais profundamente no tendão entre os tecidos terciários formando o endotendão. Mais superficialmente, o epitendão é rodeado pelo paratendão, um tecido conjuntivo livre que consiste essencialmente de fibras de colágeno e fibrilas, onde algumas fibrilas elásticas têm camada interna de líquido sinovial, possibilitando livre movimento do tendão contra os tecidos circunvizinhos (Figura 4). Ao redor do tendão também existe uma camada de líquido sinovial, mais presente em tendões que sofrem maior tensão mecânica, permitindo assim, melhor deslizamento durante o movimento de tração ou contração muscular.

A junção miotendínea é uma região anatômica altamente resistente, pois é onde há a junção músculo-tendão. Essa área contém fibras musculares e tecidos conjuntivos extracelulares (fibrilas de colágeno).

A junção osteotendínea é uma região onde o tendão insere no osso, apresentando tecido viscoelástico, onde transmite a força para o osso rígido.

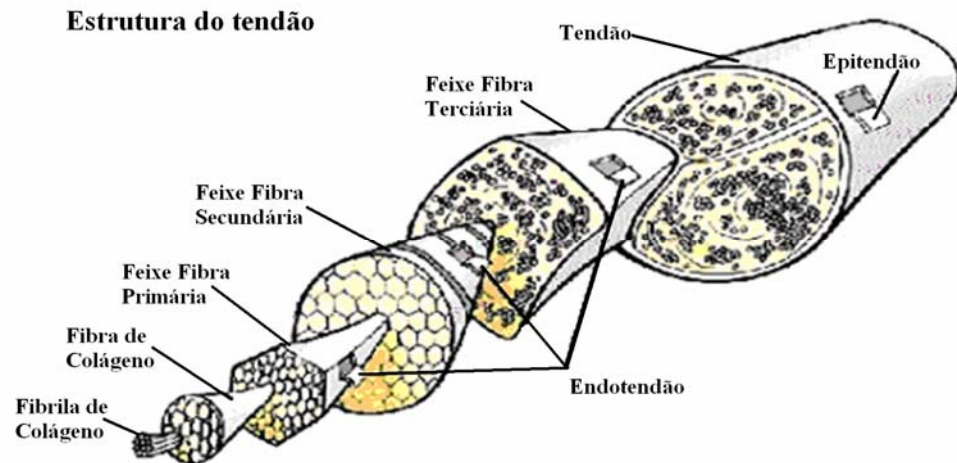


Figura 4 - A organização da estrutura de tendão: das fibrilas de colágeno até o tendão inteiro. Fonte: Józsa e Kannus, 1997.

Smith (1965) observou que o tendão apresenta escassa circulação sanguínea longitudinal. Isso pode ser comprovado devido à ausência de sangramento na secção do tendão.

1.3 Tendão de Aquiles

O tendão de Aquiles, também conhecido como tendão do calcâneo ou calcanear transmite força ao calcâneo para a flexão plantar do pé e também se acomoda lateral ou medialmente quando o calcâneo assume posição em varo ou valgo. Atua ainda na absorção de impactos durante a marcha, corrida e salto (MÜLLER et al., 2004).

Por ser o tendão mais grosso e mais forte do corpo humano, pela sua condição anatômica, foi adotado o nome Aquiles ou tendão de Aquiles no século XVII. Hipócrates, na primeira descrição registrada de uma lesão no tendão de Aquiles, concluiu que "este tendão, se cortado ou lesado, causa febre aguda, induz engasgamento, ocasiona desequilíbrio mental e sua evolução levaria a morte" (COUCH, 1936 *apud* PAAVOLA, 2001).

A junção dos músculos gastrocnêmio e sóleo forma três partes do tríceps sural, no entanto, com a junção destes dois músculos forma o tendão de Aquiles que se fixa no osso calcâneo do pé (MOORE; DALLEY, 2001).

O tendão de Aquiles nos animais mamíferos é formado por três músculos, que se inserem na tuberosidade do calcâneo, onde a massa muscular medial e lateral do músculo gastrocnêmio funde-se distalmente para formar um tendão espesso que se insere no *tuberculis calcis*. O músculo flexor digital superficial forma o segundo componente do tendão de Aquiles e um terceiro tendão é formado devido a junção dos músculos grácil, semitendinoso e bíceps femoral (EVANS; DE LAHUNTA, 1994).

Müller et al. (2004), comparando por análise macroscópica o ligamento patelar e o tendão do calcâneo, pode identificar a diferença no arranjo das fibras, onde no ligamento, existe um arranjo de fibras de colágeno regulares e irregulares, não permitindo grande elasticidade quando sofre tração. O tendão do calcâneo apresenta fibras de colágeno regulares, não promovendo deformidade no momento da tração do tendão, tendo a capacidade de absorver energia e resistência com maior elasticidade se comparado ao ligamento patelar.

A lesão do tendão do calcâneo ou Aquiles, é a mais comum entre atletas, como jogadores de futebol e bailarinas, devido ao mecanismo de estresse ocorrido diariamente (MELLO, 2004).

Cetti et al. (1993), Moore e Dalley (2001), Browner et al. (2003), afirmam que a ruptura do tendão do calcâneo ocorre após uma dorsiflexão forçada, arranque da marcha ou corrida, onde rapidamente o paciente tem a sensação de que levou um trauma direto na panturrilha, devido a forte dor que sente no local.

1.4 Reparação do tendão

Segundo Cormak e David (1984), a reparação do tendão não é efetuada pelos fibrócitos, mas sim pelos fibroblastos da bainha interna. Com ausência da bainha, isto ocorre pelo tecido conjuntivo frouxo circunjacente. Estas células crescem em direção ao interior da lesão e depositam novos feixes de fibras colágenas, restaurando assim a continuidade do tendão.

O processo de reparação do tendão pode prover uma arquitetura de um tendão normal, porém, dificilmente irá reproduzir a formação prévia ou retornará às suas propriedades mecânicas originais de deslizamento sobre os tecidos vizinhos do tendão (MACHADO et al., 2000).

Enwemeka (1989), afirma que por haver baixa vascularização, oxigenação e nutrição, o tendão possui baixa capacidade de regeneração. No entanto, diversos estudos demonstraram que quando o tendão lesado é estimulado por meios biofísicos apropriados este regenera adequadamente.

O processo de reparo tendíneo se dá em três fases sobrepostas: inflamatória, proliferativa e remodelamento (ENWEMEKA, 1989 e JÓZSA; KANNUS, 1997)

A fase inflamatória, ocorre do primeiro ao sétimo dia após a lesão, liberando no local mediadores químicos da inflamação, onde as células inflamatórias fazem a migração para o local da lesão. Os fibroblastos migratórios e os macrófagos desempenham um papel fagocitário. Os macrófagos são responsáveis por fagocitar e digerir partículas estranhas, removendo restos celulares e componentes extracelulares alterados durante o processo de cicatrização (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Os fibroblastos ficam dispostos radialmente em relação a direção das fibras do tendão e começam a sintetizar colágeno por volta do quinto dia após a lesão (MAFFULLI et al., 2002).

A fase proliferativa inicia-se do quinto ao vigésimo primeiro dia após lesão, com a chegada de fibroblastos e miofibroblastos. A migração e a proliferação dessas células é estimulada por fatores de crescimento liberados por plaquetas e macrófagos teciduais presentes no local da lesão (GOFFI, 1996).

Estudos relatam que o remodelamento inicia-se por volta do décimo quarto dia após a lesão e se estende por um período de um ano ou mais, sendo necessário cerca de oito meses para uma reconstrução parcial (GOFFI, 1996). Por volta do segundo mês as fibras de

colágeno são compactas e espessas. Após o quarto mês, o tendão tenotomizado apresenta fibras de colágeno bem organizadas, o tecido celular muda para tecido fibroso, com grande quantidade de fibras colágenas. A maturação do colágeno e o realinhamento linear são normalmente vistos por volta do 5° ao 6° mês após a lesão (JÓZSA; KANNUS, 1997). Os fibroblastos apresentam formas alongadas com algumas reentrâncias citoplasmáticas correndo entre os feixes de colágeno que se encontram organizados no eixo longitudinal do tendão (ENWEMEKA, 1989). Quando a cicatriz se encontra completamente madura, cerca de 3% de seus elementos são celulares (fibroblastos, miofibroblastos e macrófagos) e o restante é colágeno (JÓZSA; KANNUS, 1997).

Kleinert et al. (1981), relatam que a fisiologia dos tendões é importante no mecanismo de nutrição e de reparação, devendo ser respeitada para que tenha uma boa evolução na cicatrização após a lesão. O tendão é nutrido pelo líquido sinovial, que funciona como lubrificante, e pelos vasos sanguíneos do epitendão e do sistema de vínculos.

Furlow (1976), ao estudar a cicatrização tendinosa, recomendava o fechamento meticuloso da bainha tendínea, restituindo assim a nutrição tendinosa e conseguindo a reparação do tendão.

Segundo estudos de Enwemeka (1989), através de análise de microscopia de luz pode ser observado, uma elevação do alinhamento das fibras de colágeno no eixo longitudinal do tendão após um período de 21 dias de reparo tecidual.

Goffi (1996) descreveu o processo da reparação do tendão entre dois cotos (extremidade dos tendões após a lesão), dividido por semana a partir do primeiro dia após a lesão:

- Primeira semana: evidenciou uma substância gelatinosa, translúcida que envolve as duas extremidades como edema, dentro da qual proliferam células jovens de tecido conjuntivo. O tecido conjuntivo se origina de fibroblastos que penetram nesta geléia e

formam, interiormente, fibras colágenas. Participam deste processo as células do endotendão, epitendão e paratendão. As fibras tendinosas já existentes não interferem no processo de reparação. Obtém-se uma união muito firme entre os cotos.

- Segunda semana: o edema do tendão aumenta ao máximo, nota-se muita vascularização e especialmente proliferação dos elementos celulares do tecido conjuntivo, que fazem uma ponte ainda frágil entre os cotos tendinosos. Neste tecido conjuntivo crescem fibras tendinosas, que se tornam bem visíveis no oitavo dia e entre o décimo e décimo quarto dia, elas atravessam a ponte de união.
- Terceira semana: produção de fibras tendinosas. A junção adquire uma firmeza definitiva, semelhante à do tendão.
- Quarta semana: o edema e a vascularização diminuem e o afrouxamento das aderências tendinosas permite um certo grau de deslizamento. No fim da quarta semana há uma boa resistência na união, ainda que um pouco diferente do normal.

Maffuli et al. (2002), afirmam que apesar do intensivo remodelamento do tendão nos primeiros meses após a lesão, a regeneração completa nunca será alcançada, pois as fibras de colágeno que substituem a lesão apresentam diâmetro menor resultando numa redução na força biomecânica do tendão.

Para Enwemeka (1989), as fases de proliferação e de remodelamento são importantes para uma melhor reparação tecidual onde haverá intensa proliferação celular (fibroblastos), síntese de fibrilas de colágeno e alinhamento das fibras no eixo longitudinal do tendão.

1.4.1 Cicatrização extrínseca e intrínseca

A cicatrização do tendão pode ocorrer por cicatrização extrínseca e intrínseca. O processo de cicatrização extrínseca ocorre através da obliteração do tendão e seu revestimento, obtendo uma fase de formação, similar àquelas associadas com a cicatrização de um ferimento. O processo consiste no espessamento e modificação das células do

epitendão, migração celular, fagocitose pelos macrófagos e migração de fibroblatos com formação do tecido tenosinovial, havendo a cobertura e cicatrização da lesão (POTENZA, 1962). A resposta extrínseca é a mais importante por promover um rápido preenchimento da lesão com o tecido de granulação (MAFFULLI et al., 2002).

O processo de cicatrização intrínseca ocorre através da síntese do fibroblasto próprio no interior da lesão até o final do revestimento do tendão (MAFFULLI et al., 2002). Ocorre no tecido tendíneo pela regeneração das células dos próprios cotos tendíneos, obtendo proliferação e síntese de colágeno tanto das camadas superficiais como profundas do tendão (MANSKLE; LESKER, 1984).

De acordo com Culp e Taras (1995), cicatrização do tendão, envolvendo extrínseca e intrínseca, ocorre da seguinte forma:

- Cicatrização extrínseca:

- proliferação de capilares sanguíneos e fibroblastos (0 a 4 dias);
- formação de fibras de colágeno (4 a 21 dias);
- término com processo de remodelação após 21 dias.

- Cicatrização intrínseca:

- proliferação e espessamento das células do epitendão (0 a 3 dias);
- formação de colágeno e neoformação vascular (5 a 7 dias), onde observa-se a presença de um calo fibroso no 10º dia;
- término com proliferação de fibroblastos do endotendão (14 a 21 dias).

Manske e Lesker (1984), demonstraram a capacidade da cicatrização intrínseca do tendão flexor dilacerado transversalmente, com ausência de fontes celulares extrínsecas, ausência de nutrição de vaso sanguíneo e fluido sinovial. Nesta situação, ocorre a cicatrização pela migração dos fibroblastos no epitendão e na área da lesão, removendo as células debridadas e fragmentos de colágeno ao mesmo tempo que sintetiza novo colágeno.

1.5 Laser

Laser (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*), que significa, Amplificação de Luz por Emissão Estimulada de Radiação, foi idealizado por Albert Einstein em 1917, quando expôs os princípios físicos da emissão estimulada. Desde o final da década de 1960, houve um grande avanço nos equipamentos de laser e em suas aplicações na área médica. Isso permitiu a evolução das cirurgias com lasers, possibilitando a primeira cirurgia oftálmica com sucesso, com a extirpação de um pequeno tumor na retina. Atualmente, o laser é usado para tratamento de afecções musculoesqueléticas, dor e inflamação. O laser é classificado em “alta potência” sendo destrutivo e “baixa potência” não destrutivo (VEÇOSO, 1993; GENOVESE, 2000; MATERA et al., 2003).

A radiação do laser é constituída por ondas eletromagnéticas, visíveis ou não de acordo com o comprimento de onda das mesmas. O laser é uma emissão de luz coerente, monocromática com grandes concentrações de energia, capaz de provocar alterações físicas e biológicas (VEÇOSO, 1993; GENOVESE, 2000).

Segundo Genovese (2000), a energia absorvida nos tecidos biológicos se transforma em outras formas de energia, atuando no interior dos tecidos e também propagando os seus efeitos para tecidos vizinhos.

Tatarunas et al. (1998), afirmam que aos lasers de baixa potência atribui-se efeito analgésico, antiinflamatório e cicatrizante, mas a interação da luz laser com a matéria viva é bastante complexa, porque a energia que é depositada nos tecidos pode sofrer absorção, reflexão, difusão e transmissão, apresentando diferença na cicatrização do tecido biológico dependendo da espécie animal e características da pele.

Para Cruañes (1984), a interação do laser no tecido biológico é chamado de “absorção seletiva”, por haver uma função “fotorreguladora” no tecido biológico, que a partir de certos

“fotorreceptores”, são capazes de absorver um fóton de determinado comprimento de onda, provocando transformação na atividade funcional e metabólica da célula.

Nos últimos anos tem-se constatado a ação da laserterapia sobre os tecidos biológicos, como por exemplo na aceleração do processo de cicatrização de feridas. Segundo Cruañes (1984), Veçoso (1993) e Genovese (2000) a energia do laser, após ter sido depositado no tecido, transforma-se em outro tipo de energia ou efeito biológico que provoca modificações ou efeitos no local da absorção e em sua volta chamados efeitos secundários, provocando resultados indiretos como: estímulo microcirculatório e estímulo ao trofismo celular.

Esses processos básicos podem ser entendidos da seguinte forma (Figura 5):

- 1) Reflexão e retroespalhamento – ocorre quando a radiação atinge a superfície do tecido biológico, fazendo com que parte desta radiação retorne na direção da fonte de excitação, sem interação com o tecido biológico.
- 2) Absorção – depende do comprimento de onda e da seção eficaz de absorção do tecido biológico para esse comprimento de onda.
- 3) Transmissão – radiação que consegue atravessar o tecido biológico.
- 4) Difusão – ocorre no interior do tecido biológico quando uma radiação laser o atravessa.

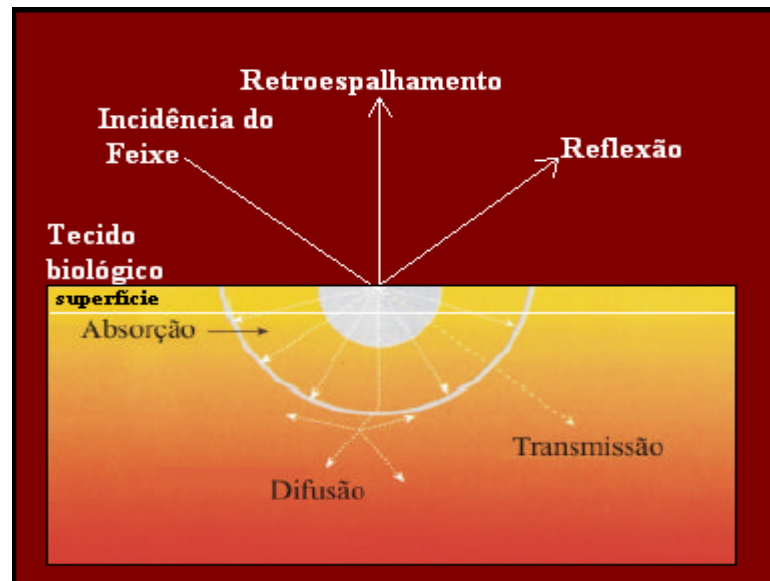


Figura 5 – Interação do raio laser com o tecido biológico. Fonte: Genovese (2000).

1.5.1 Efeitos do laser de baixa potência

Segundo Colls (1984) os efeitos do laser, são divididos em efeitos primários ou diretos, secundários ou indiretos e terapêuticos.

1.5.1.1 Efeitos primários ou diretos

Os efeitos primários ou diretos subdividem-se em efeitos bioquímicos, bioelétricos e bioenergéticos (GENOVESE, 2000).

- Bioquímico - divide-se em dois efeitos básicos:

- Liberação de substâncias pré-formadas: tais como histamina, serotonina e bradicinina (SILVEIRA; LOPES, 1991).

- Modificação das reações enzimáticas: proporciona modificações estimulatórias ou inibitórias em reações enzimáticas normais, tais como produção de ATP (Adenosina-trifosfato), síntese de prostaglandina e aumento da “lise” de fibrina, fator que determina importantes vantagens nos efeitos terapêuticos (MATERA et al., 2003).

- Bioelétrico: através da produção de ATP e mobilidade iônica potencializa a bomba de sódio e potássio.

- Bioenergético: o aporte energético da radiação laser tem a capacidade de normalizar o contingente energético, que coexiste com o contingente físico de cada indivíduo.

1.5.1.2 Efeitos secundários ou indiretos

- Estímulo à microcirculação: com a liberação da histamina estimulada pelo laser, ocorre a paralisação dos esfíncteres pré-capilares, como consequência, o fluxo sanguíneo aumenta.
- Estímulo ao trofismo celular: com o aumento na produção de ATP, a velocidade mitótica é também aumentada, o que proporciona em escala tissular o aumento da velocidade da reparação e também um melhor trofismo dos tecidos (CRUAÑES, 1984; ENWEMEKA et al., 1990; REDDY et al., 1998a).

1.5.1.3 Efeitos terapêuticos

- Efeito analgésico;
- Efeito antiinflamatório;
- Efeito antiedematoso;
- Efeito cicatrizante.

Estudos realizados com o laser de baixa potência para tratamento de dor e inflamação têm mostrado resultados positivos. A irradiação laser estimula as mitocôndrias celulares, provocando a produção de ATP intracelular, o que favorece a produção de ácido araquidônico e a transformação de prostaglandina em prostaciclina, o que justifica sua ação antiedematosa e antiinflamatória, além de promover um aumento da endorfina circulante (beta endorfina) proporcionando efeito analgésico (MATERA et al., 2003).

Cruañes (1984) e Porter (1992), relataram que o aumento de ATP mitocondrial e o incremento da síntese protéica são a base do efeito bioestimulante e estímulo do trofismo

celular, provocando aumento do número de fibroblastos, da síntese de colágeno, melhoramento da reepitelização e da divisão celular

Cruañes (1984), Enwemeka et al. (1990) e Reddy et al. (1998a), afirmam que o laser de baixa potência estimula a proliferação de fibroblastos e em consequência, promove uma maior produção de novas fibras de colágeno.

Cruañes (1984) e Colls (1984), recomendam a dose de 4 a 6 J/cm² para estimular os processos de reparação tecidual.

1.5.2 Laser arseneto de gálio (AsGa)

Laser de AsGa é uma radiação obtida através da estimulação de um diodo semicondutor, formado por cristais de arseneto de gálio; também conhecido como laser semicondutor ou laser diodo, apresenta comprimento de onda no infravermelho na faixa de 830nm até 904nm (BAXTER, 1994; GENOVESE, 2000).

O semicondutor ou diodo possui uma condutividade inferior a dos metais, e podem ser de três tipos: silício, germânio e arseneto de gálio. Quando ocorre a passagem da corrente elétrica através das substâncias selecionadas, são produzidas sucessivas combinações eletrolacunas com emissão de ftons. Este processo depende da intensidade da corrente elétrica, que tem de ser suficiente para a estimulação do diodo (BAXTER, 1994).

Colls (1984) e Enwemeka (2001), afirmam que o laser AsGa comparado com o laser Hélio-Neônio (HeNe), apresenta maior penetração da radiação no tecido biológico, havendo melhor distribuição no tendão, onde o índice de penetração é maior do que no tecido muscular.

O laser de baixa potência tem ação analgésica, antiinflamatória e antiedema sobre os tecidos, com melhor retorno às funções (MATERA et al., 2003).

Machado et al. (2000), afirmam que foi dada grande ênfase à aplicação de irradiação de laser de baixa potência com o objetivo de aumentar as reações celulares e bioquímicas para contribuir com uma reparação mais eficiente da ferida.

Cruañes (1984) cita que a terapia com laser AsGa apresenta influência no tempo de cicatrização do tecido lesado, tornando-o mais resistente do que o não estimulado com a terapia laser.

O laser AsGa apresenta um potencial terapêutico para lesões profundas dos tipos: articular, muscular, ligamentar e outras, com maior poder de penetração em humanos, em torno de 14 mm (VEÇOSO, 1993).

Gür et al. (2002) realizaram um estudo em setenta e cinco pacientes, portadores de fibromialgia, decorrente em pessoas sedentárias que apresentavam pontos de dor pelo corpo, (“tender point”). Os pacientes foram divididos em 3 grupos: o grupo 1 realizou tratamento com laser AsGa em onze pontos de dor, o grupo 2 controle (placebo) teve tratamento com o laser desligado nos onze pontos de dor e o grupo 3 teve tratamento com antidepressivo (amitripilina - 10mg). Após três semanas de tratamento, observou-se melhora gradativa nos pacientes tratados com laser AsGa.

Özkan et al. (2004), utilizaram o laser AsGa, 5 J/cm² para o tratamento de vinte e cinco pacientes com lesões de tendões flexores da mão em diferentes zonas. Os pacientes foram divididos de forma aleatória em grupos tratados e grupos placebo-controle e foram tratados por período de oito até vinte e um dias. Houve diminuição do edema já na primeira semana com uso do laser, sem apresentar diferença significativa na biomecânica e na dor entre os grupos, concluiu-se então da necessidade de estudos mais avançados para à aplicação em humanos.

Machado et al. (2000), fizeram análise da terapia com laser AsGa na reparação tendínea de eqüinos após indução de tendinite experimental. Foram utilizados dez eqüinos

com os tendões flexores superficiais de ambos os membros anteriores induzidos com injeção de colagenase. Após quarenta e oito horas da aplicação da colagenase, foram realizados exames ultra-sonográficos para avaliar as alterações ocorridas nos tendões, seguindo da utilização da laserterapia com dose diária de $8\text{J}/\text{cm}^2$, por período de quinze dias. Após esse período, realizaram análise ultra-sonográfica e exame histológico por microscopia de luz e não encontraram alteração relativa nos tendões, tanto no grupo tratado como no grupo controle. Os autores concluíram que o laser AsGa não interferiu na reparação tendínea.

Raiser et al. (2001), realizaram trabalho científico com a implantação de aloimplante ortotópico de tendão de Aquiles, conservados em glicerina a 98%, em quarenta e oito cadelas, por período de até seis meses, divididas em grupo controle e grupo tratado com laser arseneto de gálio – 904nm , $6\text{J}/\text{cm}^2$. Observaram que o grupo tratado, irradiado por período de dez dias, teve melhora no desempenho da deambulação e aumento no ângulo da articulação tibio-tarsiana. Mazzanti et al. (2004), em trabalho com homoimplante ortotópico no segmento tenopatelar, conservado em glicerina a 98%, em vinte e quatro cães divididos em grupo tratado e grupo controle por período de seis meses, recebendo tratamento de laser AsGa, $6\text{J}/\text{cm}^2$ por período de dez dias, observaram que o laser arseneto de gálio não interferiu no processo cicatricial nas áreas de anastomose do enxerto com o leito receptor. Isso contraria as observações de Raiser et al. (2001).

Enwemeka et al. (1998), relatam que a laserterapia acelera, aumenta e facilita a produção de colágeno no tendão de Aquiles em coelhos. O laser de baixa potência teve bons resultados na reparação tecidual em animais diabéticos, isso foi comprovado por um estudo realizado por Reddy et al. (2001), que usaram o laser HeNe e demonstraram aumento na produção de colágeno e conseqüentemente uma melhor contração da ferida comparado ao grupo controle.

Reddy et al. (1998a), demonstraram experimentalmente, que a laserterapia possui um efeito cicatrizante através da estimulação da matriz colagenosa. Utilizando vinte e quatro

coelhos da linhagem *Nova Zelândia*, foi realizada uma tenotomia no tendão de Aquiles, seguido de sutura. Os animais foram imobilizados e submetidos a uma dose de $1\text{J}/\text{cm}^2$ do laser HeNe (632,8nm) por quatorze dias no tendão de Aquiles. No décimo quinto dia os coelhos foram sacrificados e o tendão extraído para posterior análise bioquímica. Os autores observaram um aumento de 26% de colágeno quando comparado com o grupo controle.

Oliveira (2002), realizou trabalho de pesquisa com quarenta coelhos adultos lesionando por tenotomia o tendão de Aquiles da pata direita, separados em grupo tratado e grupo controle. O objetivo desse trabalho foi analisar a eficácia da radiação laser HeNe na cicatrização do tendão através das propriedades mecânicas de tração exercida sobre o tendão após o tratamento. Recebeu irradiação de laserterapia por oito dias consecutivos com dosagem de $5\text{J}/\text{cm}^2$ de forma pontual. Os animais foram sacrificados logo em seguida e submetidos a ensaios mecânicos de tração em máquina de ensaio de tração. Concluiu que a estimulação com o laser HeNe nos grupos tratados, diminui a resistência mecânica da cicatrização tendinosa em fases precoce do processo reparador. Também sugeriu que em uma fase precoce de tratamento com laser há diminuição de resistência, que está relacionada a alterações morfológicas e histoquímicas que posteriormente levam a reversão do processo inicial de enfraquecimento do tendão.

Enwemeka e Reddy (2000), em estudos realizados com a laserterapia, ultrassom terapêutico e eletroestimulação chegaram a conclusão que a laserterapia tem intensa estimulação na proliferação de fibroblastos e na concentração de síntese de colágeno no tecido lesado, isso vale tanto para o laser HeNe como para o laser AsGa, ambos com dose de $1\text{J}/\text{cm}^2$, que são similares em suas respostas de tratamento. Reddy et al. (1998b) realizaram a combinação de laser HeNe, $1\text{J}/\text{cm}^2$ e eletroestimulação com carga mecânica, acreditando que isso aceleraria experimentalmente a cicatrização do tendão de Aquiles tenotomizado de coelhos. Os tendões dos grupos de animais tratados e dos grupos de animais controles foram

imobilizados e tratados por período de cinco dias, os tendões dos grupos tratados receberam eletroestimulação com excitação elétrica induzida, promovendo contração do músculo tríceps sural e irradiação de laser $1\text{J}/\text{cm}^2$, concluindo que a combinação de laser e eletroestimulação com carga mecânica nos tendões aumenta a produção de colágeno. Gum et al. (1997), combinaram o uso simultâneo de ultra-som, estimulação elétrica e fotoestimulação com laser AsGa, $1\text{J}/\text{cm}^2$ em tendões de Aquiles de coelhos. Os tendões dos animais tratados apresentaram melhor resistência a tração quando comparados ao grupo de animais controle, aumento de colágeno, fibroblastos e matriz extracelular. Demir et al. (2004a) compararam o laser AsGa, $1\text{J}/\text{cm}^2$, com a eletroestimulação e comprovaram que a eletroestimulação apresentou melhores resultados na cicatrização das feridas em ratos do grupo de animais tratados comparados com o laser. Demir et al. (2004b), relatam a comparação entre o ultra-som e o laser AsGa, $1\text{J}/\text{cm}^2$ em ratos, onde o grupo tratado pelo laser teve maior eficácia na cicatrização da ferida, quando comparado com o grupo de animais controle e o grupo de animais tratados com o ultra-som.

Segundo Reddy (2003), o uso do laser AsGa em feridas induzidas na pele do dorso de ratos apresentou um aumento significativo de até 50% de colágeno em relação ao grupo controle e , levou a uma maior concentração de células reparadoras e contração das bordas das feridas.

Silveira e Lopes (1991), afirmam em um trabalho realizado com o laser AsGa, que com o uso da laserterapia desde o primeiro minuto da lesão induzida na pele do dorso de setenta e dois ratos , houve aumento no processo de degranulação dos mastócitos, levando a uma liberação de substâncias biologicamente ativas como a heparina e histamina, e aumentou assim, a proliferação de fibroblastos na área irradiada, e conseqüentemente de fibras colágenas, além de uma pequena infiltração leucocitária, sem ocorrer um processo inflamatório pleno.

Demir et al. (2004c), utilizaram o laser AsGa ($1\text{J}/\text{cm}^2$), contínuo e o ultrassom terapêutico de 1MHz contínuo, $0,5\text{W}/\text{cm}^2$ para comparação e associação dos aparelhos no processo de cicatrização do tendão de Aquiles em três grupos de vinte e oito ratos durante vinte e um dias, sacrificando os animais no quarto, décimo e vigésimo primeiro dia pós-operatório (PO). Foi analisada a evolução bioquímica e biomecânica do tendão, e observou-se diferença significativa entre os grupos de animais tratados e grupos controle. No grupo tratado, ocorreu aumento da produção de hidroxiprolina (aminoácido importante na síntese de colágeno) e melhora significativa na biomecânica do membro lesado. Na comparação do grupo dos animais tratados, utilizando o laser e o ultra-som terapêutico e associação dos dois aparelhos; não houve diferença significativa na produção de hidroxiprolina, assim como diferença na biomecânica na comparação da utilização dos dois aparelhos e mantendo um padrão estável entre os grupos.

Tavares (2002), desenvolveu um trabalho de pesquisa com quarenta ratos, realizando tenotomia de tendão de Aquiles em uma das patas do grupo de animais tratado e do grupo de animais controle. Fez irradiação do laser AsGa com dose de $4\text{J}/\text{cm}^2$ após quarenta e oito horas da lesão por quinze dias consecutivos. Demonstrou que a laserterapia beneficia a reparação do tendão, diminuindo o tempo de cicatrização, retornando mais rápido a função do tecido lesado e minimizando a presença de células inflamatórias na fase inicial da cicatrização.

Pugliese et al. (2003), realizaram um estudo com setenta e dois ratos, induzindo ferimentos padronizados na pele do dorso dos animais e utilizou-se terapia com laser arseneto de gálio alumínio por período de quatorze dias no grupo tratado, foi observado aumento da concentração das fibras de colágeno e elásticas, redução do edema e do processo inflamatório.

2. Objetivo

O presente trabalho teve como objetivo investigar o efeito do laser AsGa (904nm) com dose de $4\text{J}/\text{cm}^2$ no processo de reparação do tendão de Aquiles, considerando a contagem de células inflamatórias, fibroblastos, colágeno e vasos sanguíneos na fase inicial e tardia da reparação através de estudo histomorfométrico do microscópio óptico de luz.

3. Materiais e métodos

3.1 Animais

Foram utilizados 34 ratos albinos, machos, jovens, linhagem *Wistar*, com o peso aproximado de 350g, 3 meses de idade, provenientes do Biotério da Anilab (Animais de Laboratório) da cidade de Paulínia do Estado de São Paulo.

Os animais foram mantidos no Biotério do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba em gaiolas apropriadas de polietileno padrão, em grupos aleatórios de cinco a seis animais por gaiola, passando por um período de adaptação de cinco dias, mantidos em sala com temperatura e umidade constante (24°C - 60%) com ciclo claro/escuro de 12 horas, com água e ração *ad libitum*.

3.2 Aparelho laser

O equipamento utilizado no estudo experimental para estimulação do tendão foi o laser AsGa-904nm, Endophoton - modelo LLTO107 da marca KLD (Biosistemas Equipamentos Eletrônicos Ltda), o qual, possui caneta aplicadora de aço inox com controle de disparo do laser (Figura 6). Antes do início da estimulação, características como potência e tempo de emissão foram aferidos no Laboratório de Laser de Alta Potência no Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba sob responsabilidade do Prof. Dr. Egberto Munin.

O aparelho laser apresenta alimentação de 110 a 220 V – 50/60 Hz, e ajuste digital da densidade de energia em J/cm².

A caneta do laser é diodo pulsado 75W AsGa (invisível); comprimento de onda de 904nm; pico de potência 45W; potência média 40 mW; largura do pulso 100 ns; tipo do feixe divergente (8° x 25°) e área de emissão de 0,6cm².



Figura 6 – Aparelho laser.

3.3 Grupos experimentais

Os 34 animais foram aleatoriamente separados em seis grupos: A1, A2, B1, B2, C1 e C2.

Grupo A1 (n=5): animais controle, tenotomizados e com simulação de tratamento, sacrificados no 7º dia pós-operatório (PO).

Grupo A2 (n=5): animais tratados, tenotomizados e com aplicação do laser com dose 4 J/cm² por período total de 5 dias, sacrificados no 7º dia PO.

Grupo B1 (n=6): animais controle, tenotomizados e com simulação de tratamento, sacrificados no 14º dia PO.

Grupo B2 (n=6): animais tratados, tenotomizados e com aplicação do laser com dose 4 J/cm² por período total de 10 dias, sacrificados no 14º dia PO.

Grupo C1 (n=6): animais controle, tenotomizados e com simulação de tratamento, sacrificados no 21º dia PO.

Grupo C2 (n=6): animais tratados, tenotomizados e com aplicação do laser com dose de 4 J/cm² por período total de 15 dias, sacrificados no 21º dia PO.

Os animais não receberam nenhum tipo de imobilização, sendo posteriormente deixados livres nas gaiolas durante o período PO.

3.4 Procedimento cirúrgico

Foi realizado tenotomia total do tendão de Aquiles direito na região média do mesmo, entre a inserção do tendão e a junção miotendínea em todos os animais. Para realização deste procedimento, todos os animais receberam por via subcutânea, um pré-tratamento com atropina (analgésico), na dose de 0,04 ml para cada 100 g de peso corpóreo, aguardando repouso de 15 minutos para o procedimento anestésico (SCHANAIDER; SILVA, 2004). Foi administrada droga anestésica em associação por via intramuscular, cetamina (cloridrato)10% -10ml (Syntec) utilizando a dose de 0,1ml para cada 100 g de peso corpóreo e xilazina (cloridrato)2% - 10ml (Syntec) com dose de 0,1ml para cada 100 g (MASSONE, 1994), utilizando seringa de insulina de 1 ml para cada animal. Em seguida, realizou-se a tricotomia e limpeza da pele com álcool iodado 2% na região do tendão de Aquiles da pata direita do animal. Através de uma pequena incisão na pele, o tendão foi exposto (Figura 7A) e tenotomizado transversalmente na região média (Figura 7B). Posteriormente foi realizada a sutura cutânea com fio monofilamento de poliéster 6/0 (Prolene®) e assepsia com álcool iodado 2% (Figura 7C).

Após a cirurgia, os animais foram submetidos à profilaxia com uso de Pentabiótico (Fort Dodge®) de amplo-espectro, via intramuscular profunda em dose única de 0,02ml para cada 100g do peso corpóreo.

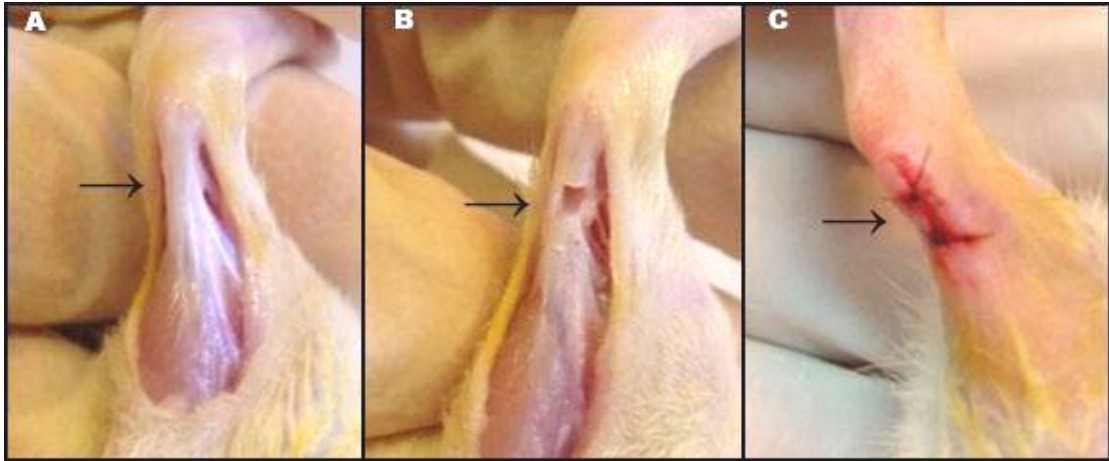


Figura 7 - (A) Dissecação do tendão; (B) Tenotomia do tendão; (C) Sutura cutânea após os procedimentos cirúrgicos.

3.5 Procedimento experimental

O procedimento experimental teve início no período da manhã e todos os animais tiveram a mesma manipulação. Para o procedimento terapêutico, os animais foram posicionados em uma mesa em decúbito ventral e imobilizados manualmente. As patas traseiras direitas foram imobilizadas, seguindo-se a aplicação do laser em contato direto com a ferida, na dosagem de 4 J/cm^2 por um período de 48 segundos, tempo selecionado automaticamente pelo aparelho laser (Figuras 8 e 9). Todos os animais tiveram a primeira aplicação do laser no PO.

Dias de aplicação do laser AsGa

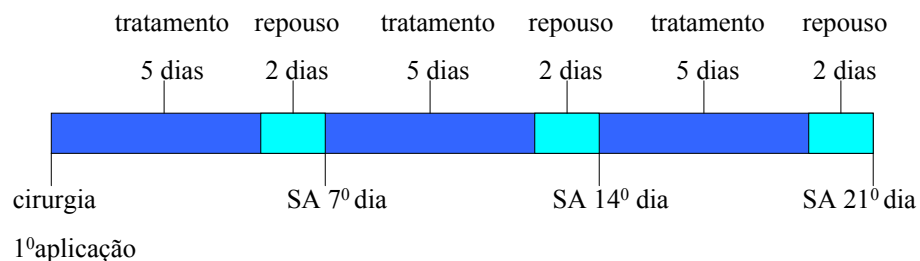


Figura 8 – Esquema dos grupos que receberam radiação laser. SA: sacrifício



Figura 9 – Aplicação do laser AsGa na região lesada.

3.6 Sacrifício dos animais

Os animais foram sacrificados ao 7º, 14º e 21º dia PO, utilizando o mesmo procedimento anestésico realizado na cirurgia. Depois de anestesiados, os animais receberam aplicação via intracardíaca de anestésico Tiopental Sódico (Cristália) na dose de 0,05ml para cada 100 g de peso corpóreo, seguido de aplicação do cloreto de potássio 19,1% (Equiplax) via intracardíaca com dose única de 0,4ml para cada 100 g de peso corpóreo.

A remoção dos tendões tenotomizados foi feita por dissecação, desde a inserção calcanear até a junção miotendínea. Os tendões foram fixados em solução de formol a 10% por vinte e quatro horas e posteriormente encaminhados para processamento histológico.

3.7 Técnica histológica

Os procedimentos laboratoriais para confecção do material histológico foram realizados no laboratório de histologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP.

Após fixação, os tendões foram desidratados e incluídos em parafina (Paraplast - Tissue Embedding Medium – Oxford – cod. 8889-501006), em seguida, foram confeccionados

os blocos para serem cortados no micrótomo (Mícron - HM 325), de forma semi-seriada com secções de 6µm de espessura e corados com HE (Hematoxilina de Harris - Merck - cod. 1.09253.1002 e Eosina 0,5% - Merck – cod. 1.09844.1000).

3.8 Métodos de análise de fibroblastos, células inflamatórias, vasos sanguíneos e fibras de colágeno.

Para o estudo e obtenção dos resultados foram selecionados aleatoriamente três cortes histológicos correspondentes à região mediana dos tendões de Aquiles, os resultados foram obtidos pela contagem das células e quantidade de colágeno presente em três áreas microscópico da reparação do tendão, não sobrepostas, dos cortes histológicos. Estes critérios de análise foram usados para todos os grupos (controle e tratado).

A análise histomorfométrica foi realizada com o microscópio LEICA DMIL associado ao “software” de imagens LEICA QWin Standard – versão 2.5 (Leica – “Imagem Processing and Analysis System”) como método de análise, utilizando a câmera CCD (JVC, modelo: TK-C1480e) para captar as imagens. A área utilizada para realizar a contagem das células e quantificar o colágeno foi de 42000µm². Foram identificados e contabilizados os fibroblastos e fibras de colágeno (Figura 10), células inflamatórias (Figura 11) e vasos sanguíneos periféricos (Figura 12), além do reconhecimento da região da reparação do tendão (Figura 13).

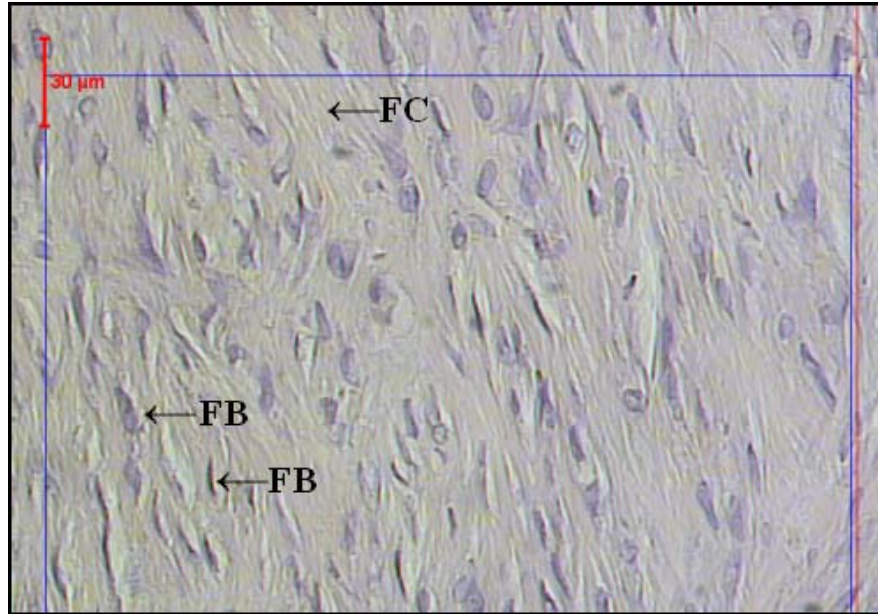


Figura 10 – Fotomicrografia da região de reparação do tendão, corado com HE, corte longitudinal, aumento de 400x. FB: fibroblastos FC: fibras de colágeno.

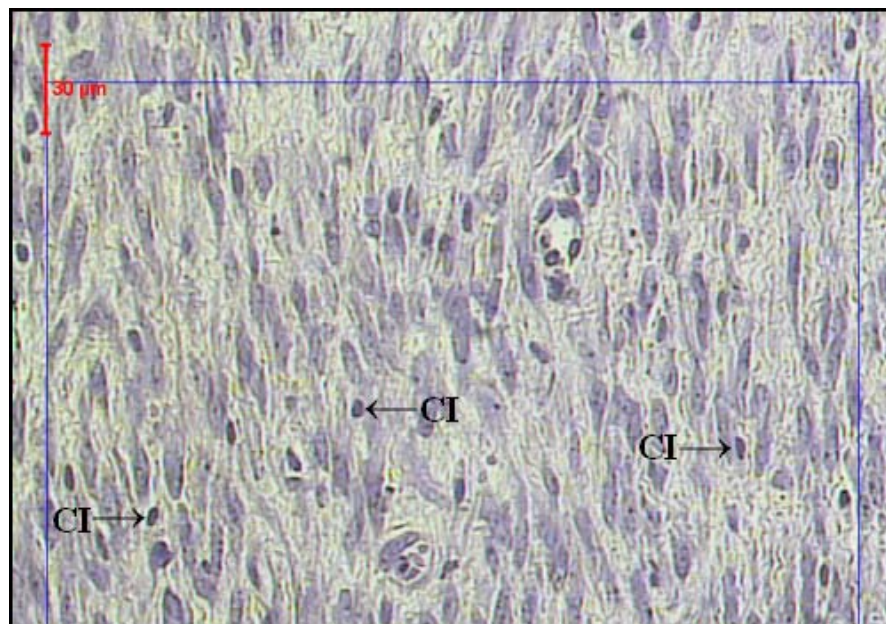


Figura 11 – Fotomicrografia da região de reparação do tendão, corado com HE, corte longitudinal, aumento de 400x. CI: células inflamatórias mononucleares.

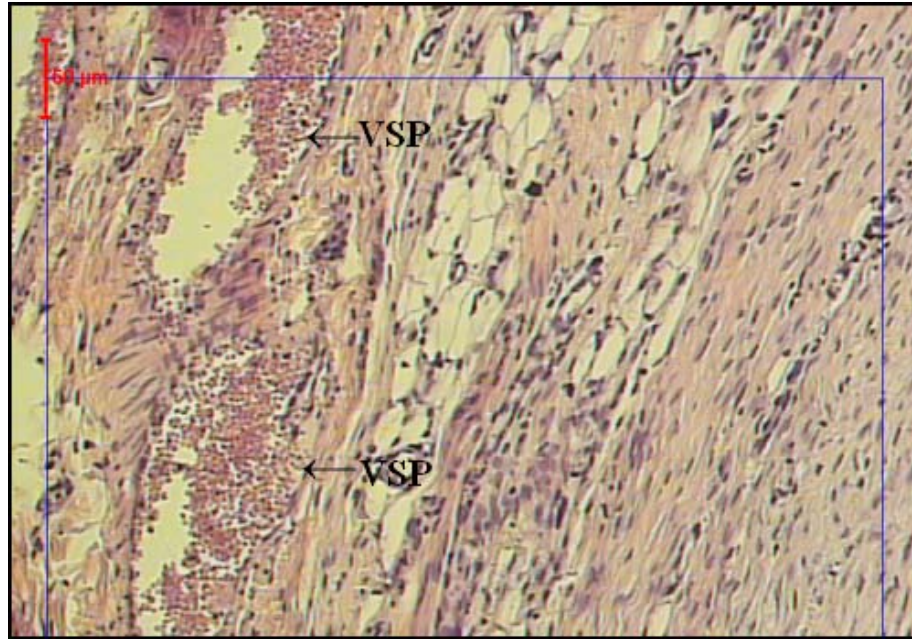


Figura 12 – Fotomicrografia da região de reparação do tendão, corado com HE, corte longitudinal, aumento de 200x. VSP: vasos sanguíneos periféricos.

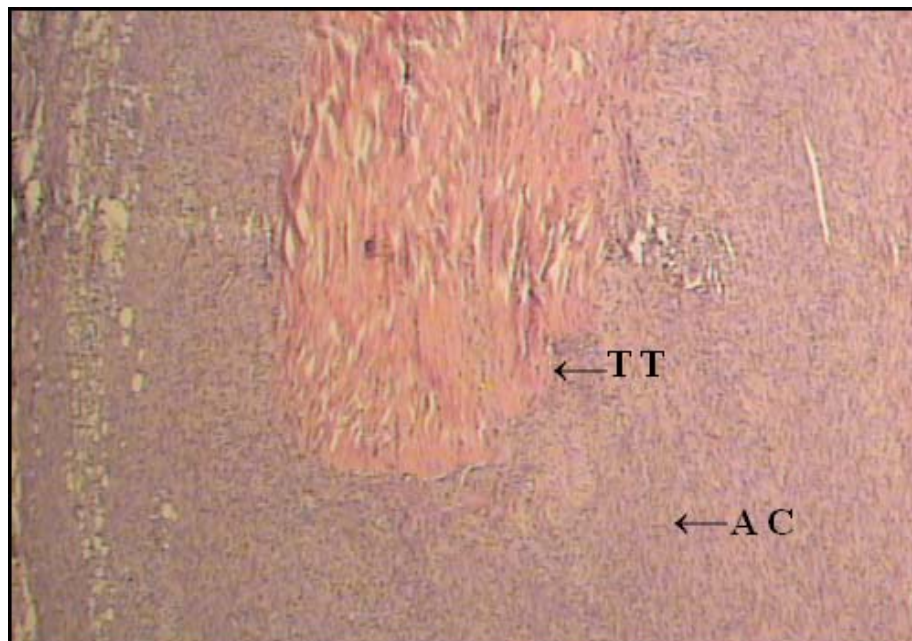


Figura 13 – Fotomicrografia para reconhecimento da região de reparação do tendão, corado com HE, corte longitudinal, aumento de 40x, 7º dia PO. TT: Tendão tenotomizado; AC: Área de reparação do tendão.

No programa Image Tool foi possível realizar a contagem das células pelo método de ponto. Cada ponto vermelho demarca uma célula considerada para análise (Figura 14).

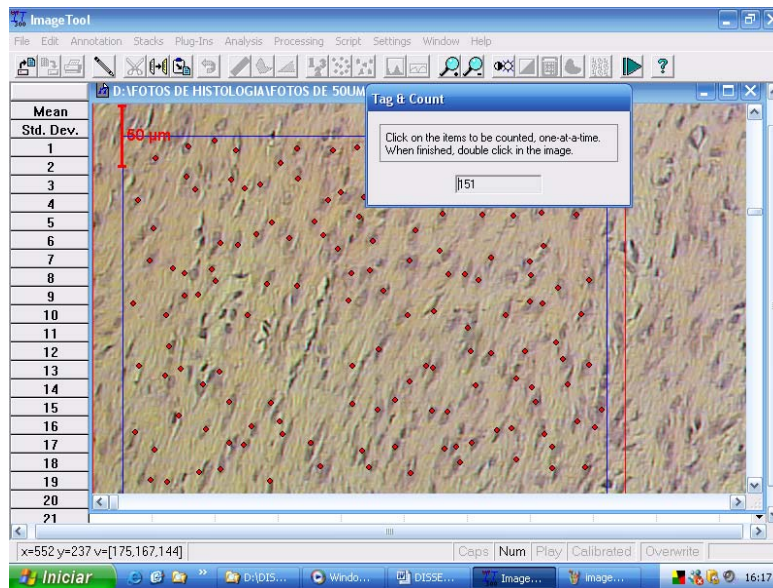


Figura 14 – Imagem da seleção das células pelo método Image Tool.

O programa QWin Color (Ferramenta do LEICA) permite realizar a seleção das cores que serão pigmentadas, realizando o cálculo em porcentagem da área demarcada. Neste caso, a cor azul distinguiu as fibras de colágeno das outras estruturas não selecionadas (Figura 15).

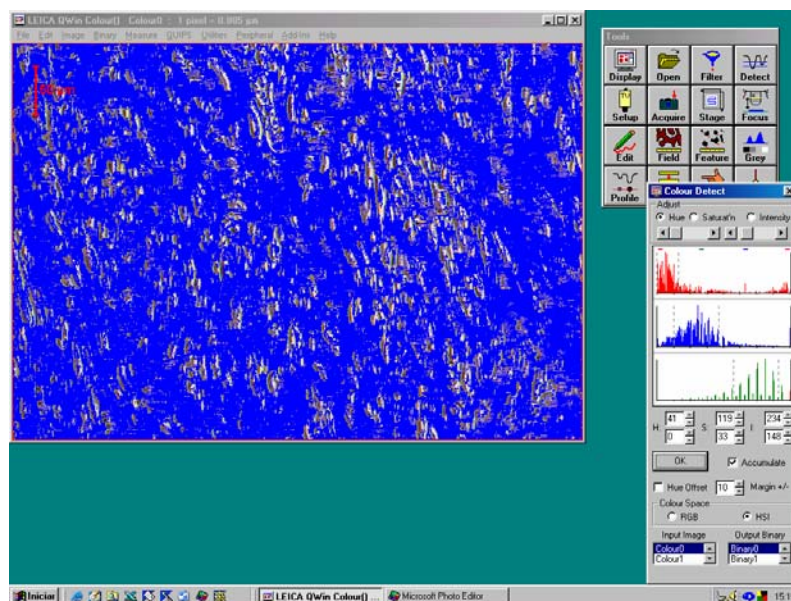


Figura 15 – Imagem da seleção do colágeno pelo programa LEICA (QWin Colour).

3.9 Análise estatística

Os valores obtidos foram tabelados e testados utilizando o teste *t-Student* para análise de variância, com nível de significância estatística de 5 por cento ($p < 0,05$), (FONSECA, 1992; TRIOLA, 1999; MARTINS, 2001).

Para a realização dos testes estatísticos utilizou-se o software InStat[®] versão 3.0.

Os valores obtidos no procedimento experimental para cada grupo de animais foram expressos através de suas médias (\bar{x}) e desvio padrão (s) conforme apresentado nos anexos A, B, C e D.

4. Resultados

Os resultados observados nos vários parâmetros selecionados encontram-se relacionados nos anexos A, B, C e D. Os valores das médias, erro padrão e análise de variância nos vários grupos e períodos experimentais encontram-se resumidos nas tabelas 1 a 4. As figuras 16, 17 e 18, ilustram os resultados observados nos períodos de 07, 14 e 21 dias da reparação tecidual após a tenotomia total do tendão de Aquiles.

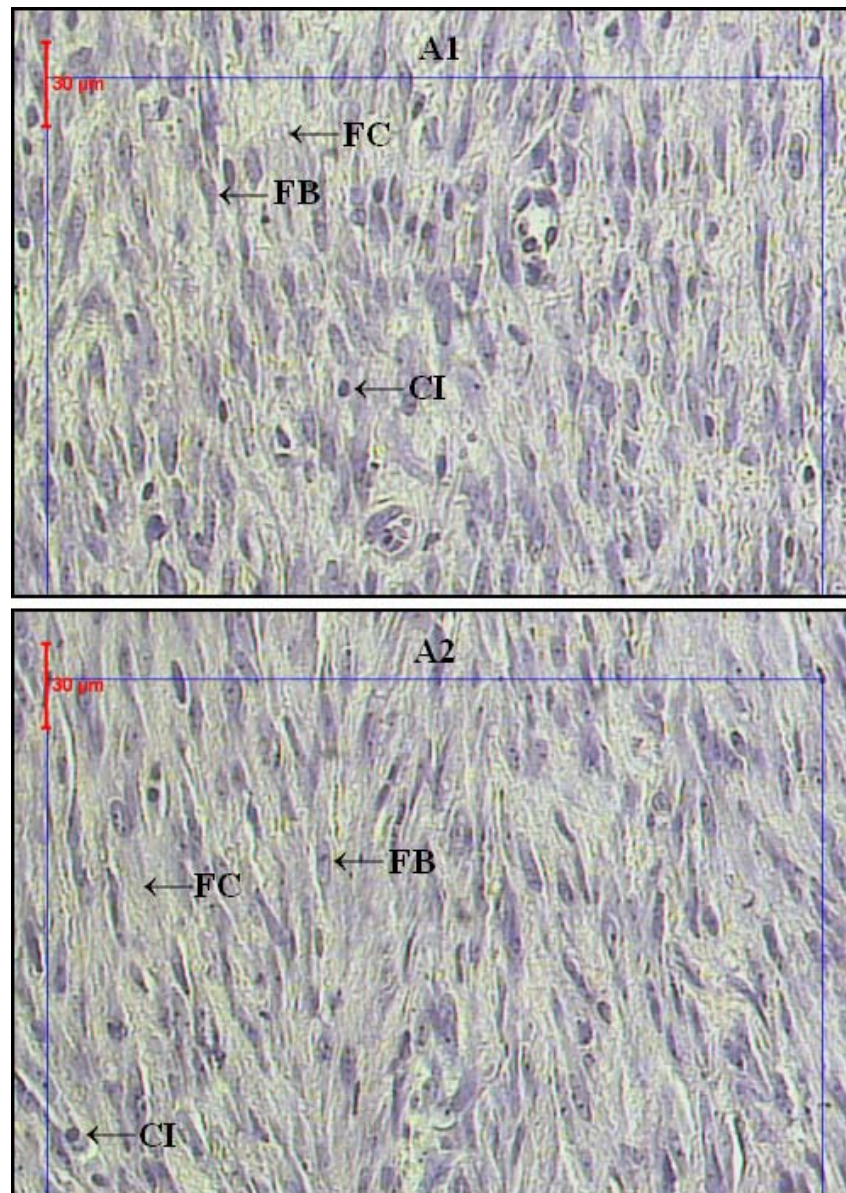


Figura 16 – Fotomicrografia da região de reparação do tendão no 7º dia, corados com HE. Cortes longitudinais, aumento de 400x. A1: grupo controle e A2: grupo tratado – FB: fibroblastos; FC: fibras de colágeno; CI: células inflamatórias mononucleares.

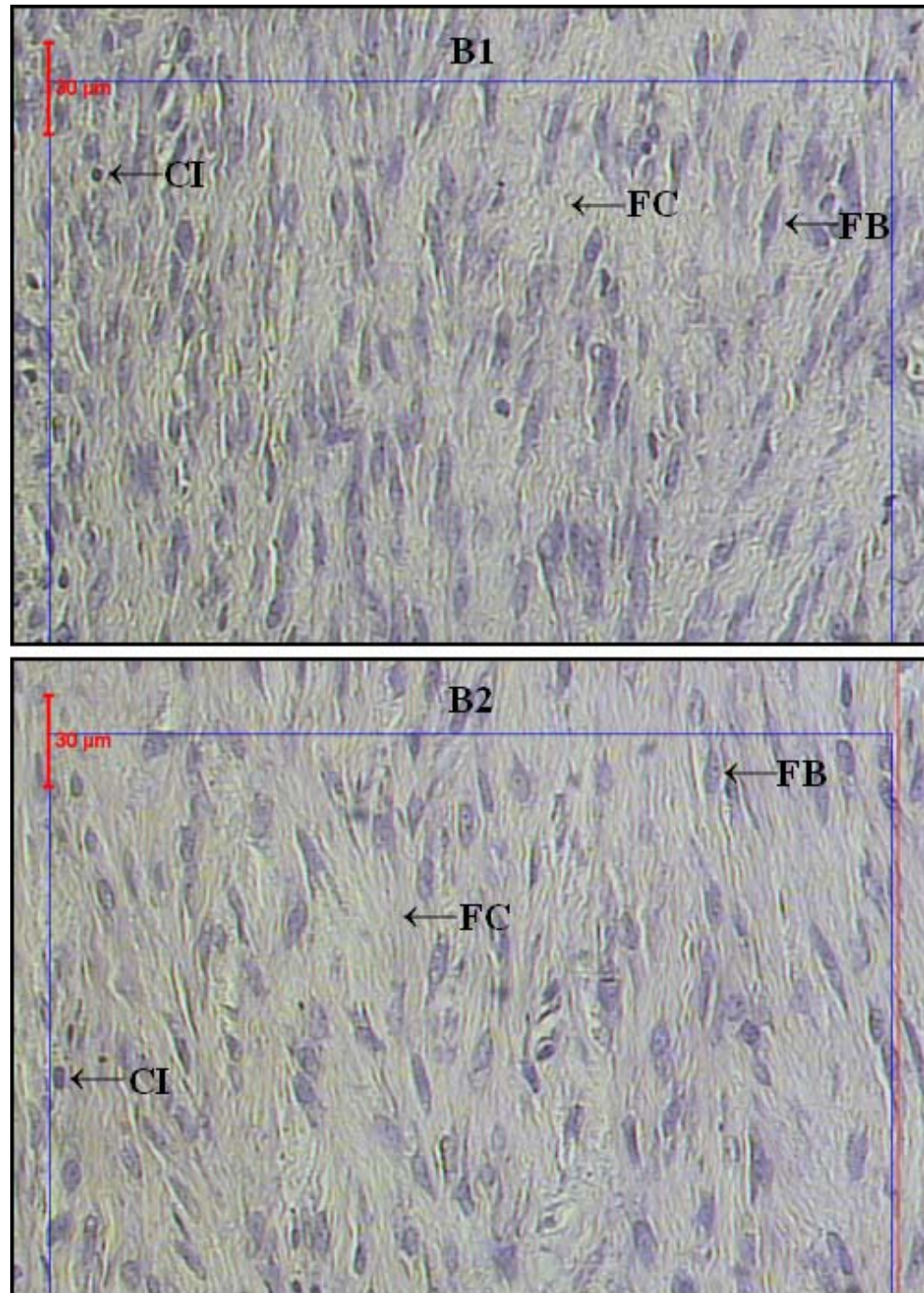


Figura 17 – Fotomicrografia da região de reparação do tendão no 14^o dia, corados com HE. Cortes longitudinais, aumento de 400x. B1: grupo controle e B2: grupo tratado – FB: fibroblastos; FC: fibras de colágeno; CI: células inflamatórias mononucleares.

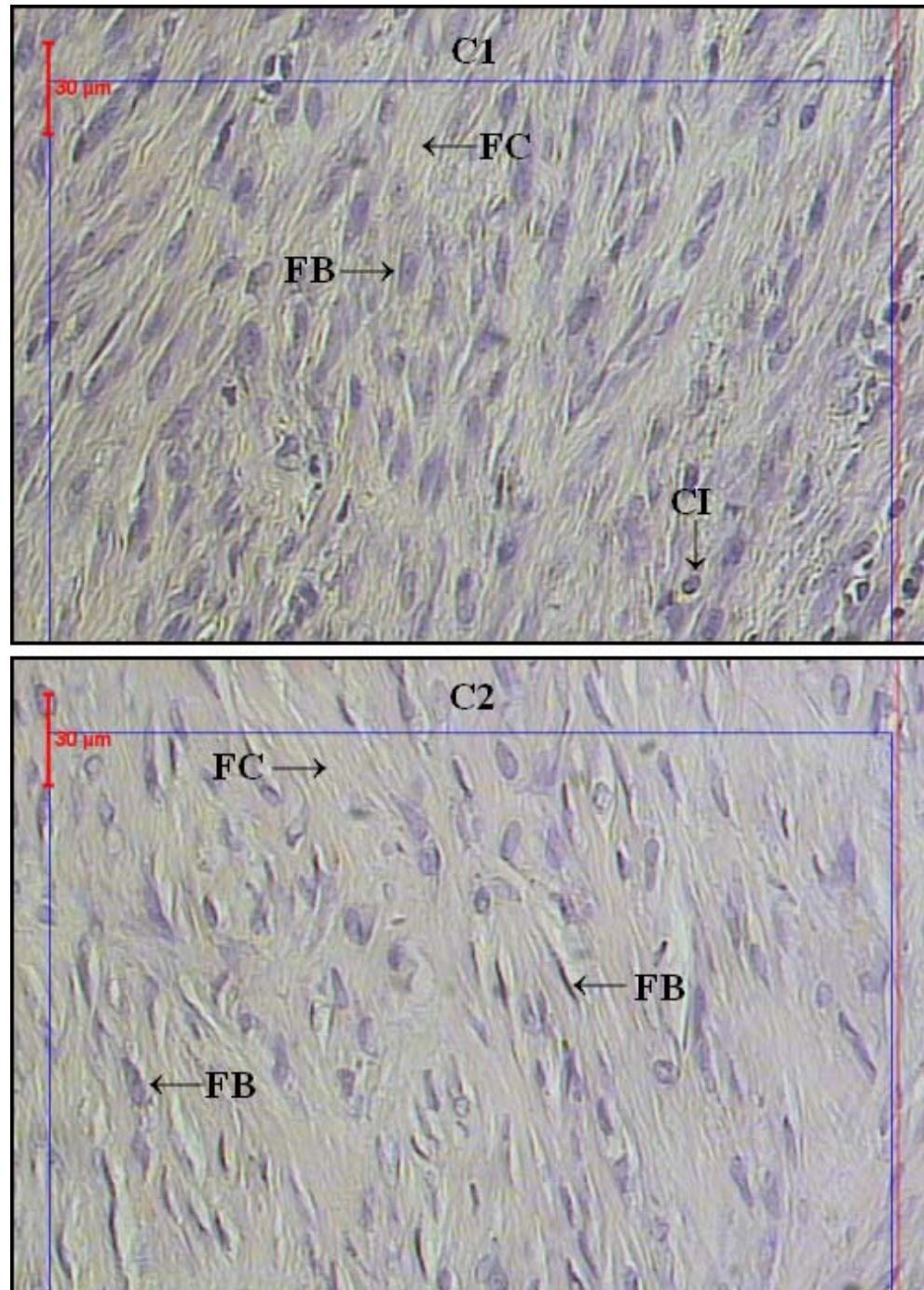


Figura 18 – Fotomicrografia da região de reparação do tendão no 21^o dia, corado com HE. Cortes longitudinais, aumento de 400x. C1: grupo controle e C2: grupo tratado – FB: fibroblastos; FC: fibras de colágeno; CI: células inflamatórias mononucleares.

4.1 Fibroblastos

Os resultados da contagem do número de fibroblastos dos animais controle e tratados, ao 7º, 14º, e 21º dia, encontram-se na tabela 1 e estão apresentados graficamente na figura 19. O número de fibroblastos foi maior no 7º dia em ambos os grupos controle e tratado. Valores menores foram encontrados no 21º dia, com menor número da média no grupo tratado. No 14º dia foram observados resultados intermediários, entretanto foram mais numerosos no grupo controle ($103,3 \pm 1,7$) do que no grupo tratado ($96,7 \pm 2,0$). A análise de variância mostrou que as diferenças foram estatisticamente significantes em todos os períodos analisados.

Tabela 1: Médias, erro padrão e análise de variância do número de fibroblastos encontrados ao 7º, 14º e 21º dias, nos grupos controle e tratado.

	<u><i>Fibroblastos</i></u>		
	Controle	Tratado	
<i>7º dia</i>	132,7 ± 5,2	166,8 ± 5,9	p=0,0027**
<i>14º dia</i>	103,3 ± 1,7	96,7 ± 2,0	p=0,0193*
<i>21º dia</i>	92,2 ± 3,4	72,9 ± 3,3	p=0,0016**

* significante, ** muito significante

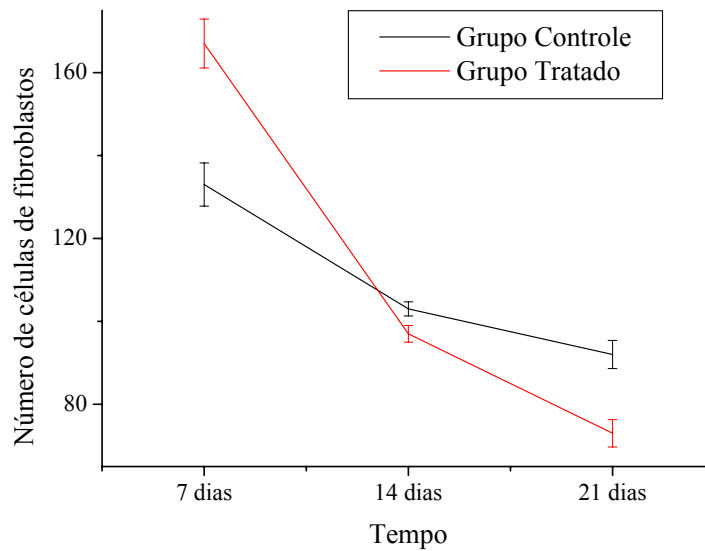


Figura 19 – Gráfico comparativo do número de fibroblastos nos diferentes tempos de sacrifício.

4.2 Células inflamatórias mononucleares

Os resultados da análise do número de células inflamatórias mononucleares dos animais controle e tratado, nos períodos de 07, 14 e 21 dias, encontram-se na tabela 2 e estão apresentados graficamente na figura 20. O número de células inflamatórias foi maior ao 7º dia em ambos os grupos controle e tratados, com médias de $6,0 \pm 0,3$ e de $3,5 \pm 0,4$ respectivamente. Valores menores foram encontrados ao 21º dia para ambos os grupos, com valores de $1,4 \pm 0,1$ no grupo controle e de $0,1 \pm 0,03$ no grupo tratado. Em todos os períodos o grupo tratado sempre apresentou médias menores do que os animais do grupo controle. A análise de variância mostrou que as diferenças foram estatisticamente significantes em todos os períodos analisados.

Tabela 2: Médias, erro padrão e análise de variância do número de células inflamatórias mononucleares encontradas ao 7º, 14º e 21º dias , nos grupos controle e tratado.

<i>Células Inflamatórias Mononucleares</i>			
	Controle	Tratado	
7º dia	6,0 ± 0,3	3,5 ± 0,4	p=0,0009**
14º dia	3,1 ± 0,4	1,7 ± 0,2	p=0,0119*
21º dia	1,4 ± 0,08	0,1 ± 0,03	p=0,0001**

* significante, ** muito significante

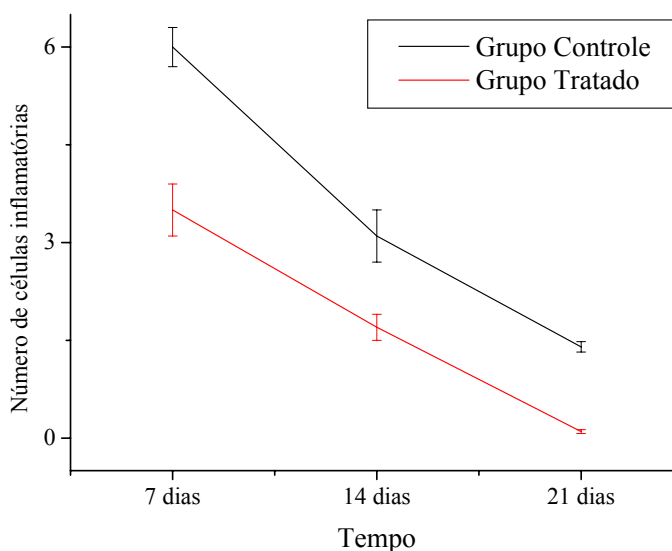


Figura 20 – Gráfico comparativo do número de células inflamatórias mononucleares nos diferentes tempos de sacrifício.

4.3 Matriz de colágeno

Os resultados da análise da quantidade de colágeno dos animais controle e tratados encontram-se na tabela 3 e figura 21.

A quantidade de colágeno presente na área de reparação ao 7º dia foi semelhante em ambos os grupos, entretanto foi maior no grupo tratado no 14º e 21º dias, com médias de 59,4 ± 1,3 e 66,1 ± 2,5, enquanto nos controles foi de 54,6 ± 1,7 e de 56,0 ± 1,5 respectivamente

para os períodos referidos. A análise de variância mostrou que as diferenças foram estatisticamente significantes apenas no último período do experimento.

Tabela 3: – Médias, erro padrão e análise de variância da porcentagem de colágeno (%) observadas ao 7º, 14º e 21º dias, nos grupos controle e tratado.

<u>Colágeno (%)</u>			
	Controle	Tratado	
7º dia	58,7 ± 2,1	58,3 ± 1,9	p=0,9451 ^{ns}
14º dia	54,6 ± 1,7	59,4 ± 1,3	p=0,0508 ^{ns}
21º dia	56,0 ± 1,5	66,1 ± 2,5	p=0,0066 ^{**}

^{ns} não significante, ^{**} muito significante

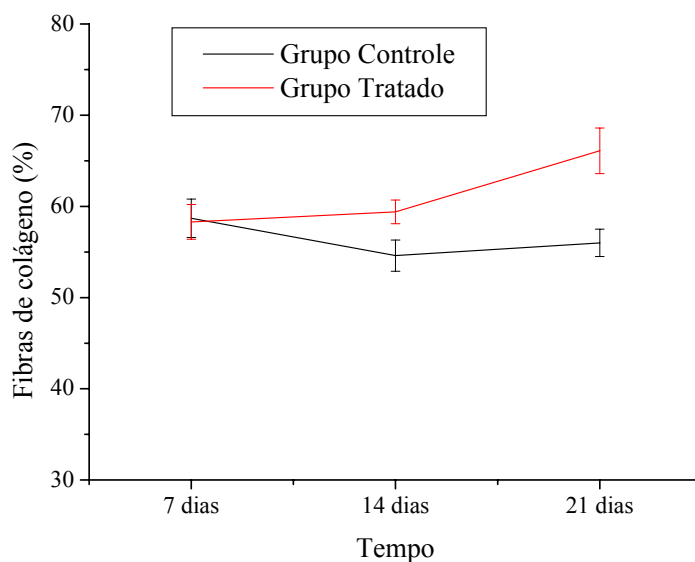


Figura 21 – Gráfico comparativo do percentual das fibras de colágeno nos diferentes tempos de sacrifício.

4.4 Vasos sanguíneos

Os resultados da análise do número de vasos sanguíneos periféricos dos animais controle e tratado encontram-se na tabela 4 e figura 22. O número de vasos sanguíneos periféricos encontrados na área de cicatrização apresenta-se um pouco maior nos animais controle ao 7° e 21° dia, com valores de $39,7 \pm 2,7$ e $42,5 \pm 1,3$ respectivamente, e menos freqüente nos animais tratados com freqüência de $36,5 \pm 1,9$ e $39,2 \pm 2,7$ nos mesmos períodos experimentais. A análise de variância mostrou que as diferenças não foram significativas em nenhum período analisado.

Tabela 4: Médias, erro padrão e análise de variância do número de vasos sanguíneos observados ao 7°, 14° e 21° dias, nos grupos controle e tratados.

<u><i>Vasos Sanguíneos</i></u>			
	Controle	Tratado	
<i>7° dia</i>	$39,7 \pm 2,7$	$36,5 \pm 1,9$	$p=0,3946^{ns}$
<i>14° dia</i>	$37,8 \pm 1,4$	$38,5 \pm 2,3$	$p=0,8595^{ns}$
<i>21° dia</i>	$42,5 \pm 1,3$	$39,2 \pm 2,7$	$p=0,1957^{ns}$

^{ns} não significante

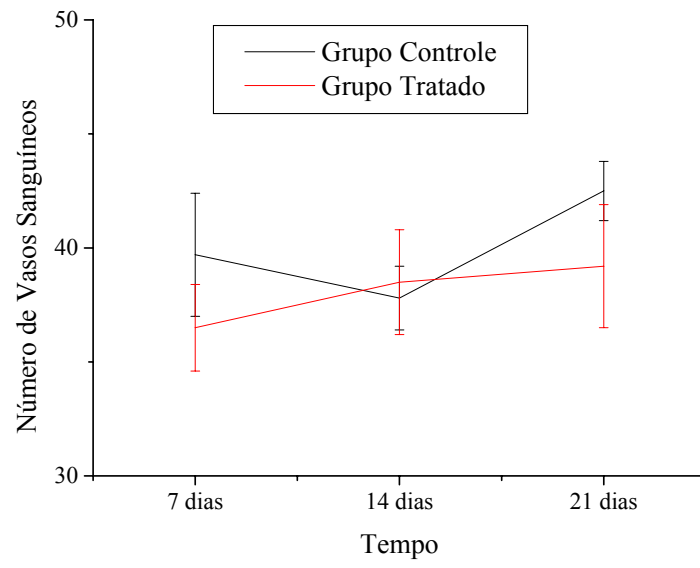


Figura 22 – Gráfico comparativo do número de vasos sanguíneos periféricos nos diferentes tempos de sacrifício.

5. Discussão

Estudos experimentais sobre a reparação do tendão de Aquiles, após tenotomia total, utilizando o modelo experimental foram descritos por Enwemeka (1989), Gun et al. (1997) e Reddy et al. (2001), ao promoverem na porção média do tendão de Aquiles de animais, uma incisão transversal no tendão dissecado.

No presente trabalho, utilizou-se o modelo experimental de tenotomia induzida em tendões de Aquiles de ratos, para investigar o efeito do laser AsGa no processo de reparação tecidual.

As aplicações do laser na medicina têm aumentado nos últimos anos, diversos tipos de aparelhos lasers com diferentes comprimentos de onda vem sendo estudados, promovendo várias reações fototérmicas nos tecidos biológicos. Alguns autores como Baxter (1994); Enwemeka et al. (1998); Reddy et al. (1998a) observaram que o uso de intensidades relativamente baixas é capaz de modular determinados processos biológicos, em especial a fotobiomodulação no processo de reparação do tecido. Vários estudos foram feitos *in vitro* e *in vivo*, mais faltam modelos e métodos que possam ser facilmente e frequentemente reprodutíveis (BAXTER, 1994).

A maior parte dos estudos desenvolvidos em modelos experimentais ou clínicos sugere que o laser de baixa potência desenvolve processos celulares e fisiológicos promovendo a regeneração de diferentes tecidos biológicos.

Desenvolvendo alguns estudos específicos, descobriu-se que a radiação laser pode tanto estimular as várias fases da cicatrização, como inibi-las, dependendo da dosagem (MESTER et al., 1985). Assim também, utilizando-se doses apropriadas do laser de baixa potência, pode-se inibir e diminuir a fase inflamatória da cicatrização dos tecidos e desenvolver efeitos biomoduladores nas células envolvidas nas fases proliferativas e de remodelação tecidual (BAXTER, 1998).

Utilizou-se neste estudo, o aparelho laser AsGa com um comprimento de onda maior que o do laser HeNe (aparelhos terapêuticos). Segundo estudo feito por Enwemeka (2001), o laser AsGa, quando comparado com o laser HeNe, apresenta maior penetração no tecido biológico, com aumento diferencial em tendão, onde o índice de penetração é maior do que no músculo.

O aparelho laser AsGa foi previamente calibrado, utilizando neste experimento dose de 4 J/cm², pico de potencia pulsada de 45W, comprimento de onda de 904nm com área do feixe de 0,6 cm² e tempo de aplicação de 48 segundos, selecionado automaticamente pelo aparelho, sendo semelhantes aos utilizados em uso clínico e outras pesquisas. O presente trabalho foi desenvolvido com base nos trabalhos dos seguintes autores, Tatarunas et al. (1998), Enwemeka, (2001), Tavares (2002) e Matera et al. (2003).

Optou-se por utilizar o laser AsGa por períodos de 5 dias consecutivos, com intervalos de descanso de 2 dias, com intuito de simular a rotina de atendimento em clínicas de fisioterapia. A aplicação do laser teve início logo após a cirurgia, induzindo o aumento dos mastócitos no local da lesão. Isso foi observado no trabalho realizado por Silveira e Lopes (1991), onde afirmam que o laser AsGa – 904nm aumenta o número de mastócitos em degranulação nas primeiras horas após a lesão, favorecendo a migração de fibroblastos. Enwemeka (1989) também afirma que os primeiros dias são importantes para a qualidade da regeneração tendinosa.

O tratamento na fase aguda no processo de cicatrização do tendão foi realizado por um período de 7 dias, considerando a presença de células responsáveis pelo processo de cicatrização já nos primeiros dias após a lesão, e o tempo da intervenção fisioterapêutica baseou-se no estágio inicial do processo de reparação (ENWEMEKA, 1989).

O procedimento para aplicação do laser AsGa foi de forma pontual, onde o feixe cobriu toda a região da lesão. A caneta emissora foi posicionada a 90° do eixo do tendão para evitar perdas de energia e proporcionou-se contato com a pele do animal, como citado por

Baxter (1994). Assim, a aplicação do laser de forma não invasiva permite atuar sobre tecidos lesados localizados em regiões profundas (MESTER et al., 1985).

Embora não haja um padrão de potência e técnica de emprego para tratamento da lesão do tendão, o laser terapêutico pode ser usado como coadjuvante de outros tratamentos, sempre que se necessite de um efeito antiálgico (alívio da dor), efeito bioestimulante do trofismo celular (reparação celular), efeito antiinflamatório, antiedematoso e normalizador circulatório (redução de edema e de hiperemia).

No entanto, é desejável que a cicatrização tendinosa ocorra mais rápido possível e sem seqüelas de aderências conjuntivas, para que seja restaurada a capacidade de deslizamento dos tendões dentro das estruturas que os mantêm fixos, sem limitações dos movimentos. De forma que, as clínicas e pesquisadores aumentem a procura por métodos de estimulação da reparação dos tendões, sendo um dos caminhos, o emprego de recursos biomoduladores, como o laser AsGa.

No presente trabalho utilizou-se como modelo biológico experimental o rato, pois os níveis de pesquisa exigidos para a avaliação de tratamentos antes de sua indicação para seres humanos devem ser respeitados. Este animal permite a obtenção de resultados em períodos de tempo mais curtos, devido seu metabolismo bastante acelerado em relação aos demais animais de experimentos. Além disso, selecionou-se rato macho devido às prováveis interferências nas variações do ciclo hormonal ocorridos na fêmea.

O tendão selecionado foi o calcâneo conhecido como tendão do calcâneo ou tendão de Aquiles, devido à facilidade do acesso, pois é superficial à pele, apresenta forma anatômica ampla, reduzindo o trauma cirúrgico e permitindo facilidade na execução da técnica experimental.

Muitos estudos experimentais sobre o processo de reparação tendínea foram realizados, através da tenotomia induzida, com o objetivo de investigar a influência de agentes

físicos sobre o tecido (BIRK; TRELSTAD, 1986; ENWEMEKA et al., 1998; REDDY et al., 1998b; MACHADO et al., 2000; MATERA et al., 2003; OLIVEIRA, 2002; TAVARES, 2002).

Os ratos com lesão unilateral foram colocados para deambular na primeira semana, e observou-se que se locomoviam normalmente sem claudicação, apresentando força e resistência com a pata lesada na hora da manipulação para aplicação do laser. Isso ocorreu tanto nos animais tratados como nos animais controles. No final do 7º dia do pós-operatório, os animais tratados apresentavam pêlo na lesão cutânea, sendo imperceptível a incisão.

Verificou-se a diferença do diâmetro entre o tendão controle e o tratado, onde o diâmetro do tendão tratado era maior que do tendão controle, cujas alterações regrediram com o decorrer dos dias. Na realização da dissecação do tendão na primeira semana, houve dificuldade na dissecação da pele com o tendão, devido rigidez do tecido cutâneo. Houve diminuição do nódulo e da aderência nas semanas seguintes. Apesar da falta de imobilização e do afastamento dos cotos tendíneos, houve possibilidade da reparação do tendão tenotomizado, também observado por Reddy et al. (1999).

Neste trabalho, optou-se pelo 7º dia PO para análise inicial do processo de reparação do tendão, e 14º e 21º dias PO para análise tardia do processo de reparação. As análises quantitativas foram empregadas por serem bem aceitas entre os patologistas.

Na análise das médias entre o grupo controle e o grupo tratado, achou-se diferença significativa. Ocorreu aumento na proliferação de fibroblastos na primeira semana do grupo tratado, com diminuição na segunda e na terceira semana PO. Acredita-se que o laser tenha interferido no aumento da proliferação dos fibroblastos na fase inicial do tratamento, com diminuição de seu número na segunda e terceira semanas, talvez em consequência do estímulo, a síntese de colágeno tenha apresentado em maior número nas últimas semanas. Isto pode ser analisado a partir dos valores contidos nas Tabelas 1 e 3 e Figuras 18 e 20.

Resultados também obtidos por Enwemeka e Reddy (2000), que ao avaliar o uso do ultra-som, da eletroestimulação e do laser, observaram que a laserterapia estimula a síntese de fibroblastos em fase inicial da cicatrização.

Na análise da síntese de colágeno não houve diferença significativa entre os grupos controle e grupos tratados nas fases iniciais, porém, houve diferença significativa na terceira semana de tratamento com aumento de fibras de colágeno no grupo tratado comparado ao grupo controle. Reddy et al. (1998a), Demir et al. (2004a) e Demir et al. (2004c), observaram aumento gradativo de colágeno com o uso do laser AsGa em seus estudos de regeneração tecidual no mesmo tempo de tratamento proposto.

Houve diferença significativa nos números em todas as fases da reparação de células inflamatórias mononucleares, sendo maiores valores encontrados nos grupos controle, ao passo que nos grupos tratados com laser, houve um decréscimo significativo do número de células inflamatórias mononucleares desde a primeira semana de tratamento, sendo praticamente nulo o número de células inflamatórias na última semana do experimento, o que sugere a possibilidade de uma modulação interna do processo inflamatório no local da lesão.

Os vasos sanguíneos periféricos não apresentaram diferença entre os dois grupos: tratado e controle, nas duas primeiras semanas; já na última semana do tratamento, os grupos tratados apresentaram aumento do número de vasos periféricos, beneficiando o processo de cicatrização do tendão, uma vez que nesta fase (proliferativa) a escassez de aporte sanguíneo pode comprometer o processo (SMITH, 1965).

Reddy e Enwemeka (1996), Enwemeka (2001), Pugliese et al. (2003), observaram aceleração na formação de fibrila, fibras de colágeno, estimulação na cicatrização do tecido muscular e uma grande diminuição na resposta inflamatória em tendões tenotomizados tratados com laser. Reddy et al. (1998a) concluíram que a estimulação com irradiação do laser em tendões de Aquiles acarreta na tensão elástica bem como aumento na produção de

colágeno. Diante destas considerações e dos achados bibliográficos, foi possível verificar que muitos dos resultados reportados por outros autores são similares aos do trabalho desenvolvido.

Através da análise de trabalhos desenvolvidos com o uso contínuo do ultra-som terapêutico na reparação de tendão, pode-se observar na terceira semana de tratamento, que o número de fibroblastos é maior que a quantidade de fibras de colágeno no grupo tratado. Podendo-se afirmar, que a laserterapia estimula a síntese de colágeno na fase inicial da reparação do tendão.

Outros trabalhos revelam que a estimulação elétrica em combinação com a estimulação do laser em tendões de coelhos tenotomizados apresenta tensão máxima, elasticidade do tendão e produção de colágeno quando comparados com grupos controle (REDDY et al., 1998b). Portanto pode-se observar na literatura que os efeitos do laser AsGa na prática clínica apresenta eficácia no processo de reparação tendinosa. Os estudos histológicos enriquecem o esclarecimento da possível relação do laser AsGa com a reparação do tendão.

A determinação do tempo, dose e mecanismos que influenciam a proliferação de fibroblastos, deposição de colágeno maduro e recuperação funcional dos tendões reparados, também são fundamentais para que se obtenha um eficiente efeito do laser AsGa, adequando diferentes dosagens e períodos de tratamento, onde auxiliarão melhores programas de tratamento no reparo tendíneo.

6. Conclusões

- O número de fibroblastos foi maior no grupo tratado da primeira semana do período experimental e o número de células inflamatórias foi menor nos animais tratados nos três períodos experimentais;
- A quantidade de colágeno foi maior nos animais tratados gradativamente na segunda e terceira semana dos períodos experimentais; O número de vasos sanguíneos presentes perifericamente na área lesada foi levemente maior nos grupos tratados. O número dos vasos sanguíneos mostrou-se semelhantes entre os grupos controle e tratado, mostrando ser independente da ação do laser;

O uso do laser AsGa evidenciou nos animais tratados, uma diminuição do processo inflamatório a partir da primeira semana do PO, estimulando a proliferação de fibroblastos inicialmente e aumentando a síntese de colágeno posteriormente.

Referências Bibliográficas

- BAXTER, D. **Therapeutic lasers: theory and practice**. New York: Churchill Livingstone, 1994.
- BAXTER, D. Laserterapia de baixa intensidade. In: **Eletroterapia de Clayton**. São Paulo: Manole, 1998. p. 191-210.
- BIRK, D. E.; TRELSTAD, R. L. Extracellular compartments in tendon morphogenesis: Collagen fibril, bundle, and macroaggregate formation. **The Journal of Cell biology**, v. 103, p. 231-240, 1986.
- BIRK, D. E.; ZYCBAND, E. I.; WINKELMANN, D. A.; TRELSTAD, R. L. Collagen fibrillogenesis *in situ*: Fibril segments are intermediates in matrix assembly. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 86, p. 4549-4553, 1989.
- BROWNER, B. D.; JUPITER, J. B.; LEVINE, A. M.; TRAFTON, P. G. **Traumatismos do sistema músculo esquelético. Fraturas, luxações, lesões Ligamentares**. São Paulo: Manole, 2003. v. 2, p. 2394-2395.
- CETTI, R.; CHRISTENSEN, S. E.; EJSTED, R.; JENSEN, N. M.; JORGENSEN, U. Operative versus nonoperative treatment of Achilles tendon rupture – A prospective randomized study and review of the literature. **The American Journal of Sports Medicine**, v.21, n.6, p. 791-799, 1993.
- COLLS, J. **La terapia laser hoy**. . Barcelona. Centro de Documentación Laser de Meditec, 1984. p. 54-60-83.
- CORMACK, H; DAVID, H. **Tecido conjuntivo denso, cartilagem, osso e articulação**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,1984. p. 133-135.
- CRUAÑES, J. C. **La terapia láser, hoy**. Barcelona. Centro Documentación láser de Meditec, 1984. p. 164.
- CULP, R. W.; TARAS, J. S. Indications and techniques for early postoperative motion after repair of digital flexor tendon particularly in zone II. **Rehabilitation of the Hand: Surgery and Therapy**, v. 26, p. 417-431, 1995.
- DEMIR, H.; BALAY, H.; KIRNAP, M. A comparative study of the effects of electrical stimulation and laser treatment on experimental wound healing in rats. **Journal of Rehab.**, v. 41, n. 2, p. 147-154, 2004a.
- DEMIR, H.; YARAY, S.; KIRNAP, M.; YARAY, K. Comparison of the effects of laser and ultrasound treatments on experimental wound healing in rats. **Journal of Rehab.** v. 41, n. 5, p. 721-729, 2004b.
- DEMIR, H.; MENKU, P.; KIRNAP, M.; CALIS, M.; IKIZCELI, I. Comparison of the effects of laser, ultrasound, and combined laser + ultrasound treatments in experimental tendon healing. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 35, p. 84-89, 2004c.

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

ENWEMEKA, C.S.; RODRIGUEZ, O.; MENDONSA, S. The biomechanical effects of low - intensity ultrasound on healing tendons. *Ultrasound Medical Biology*, v.16, p. 801-807, 1990.

ENWEMEKA, C. S.; REDDY, G. K.; BITTEL, L. S. *Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit achilles tendons. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 22, p. 281-287, 1998.

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

ENWEMEKA, C. S. Attenuation and penetration of visible 632.8nm and invisible infra-red 904nm light in soft tissues. **Laser Therapy**, v. 13, p. 95-101, 2001.

EVANS, H. E.; DE LAHUNTA, A. **Miller guia para dissecação do cão**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. 206p.

FERNANDES, C. H. **Resultados das tenorrafias em flexores dos dedos da mão, na zona II, submetidos à movimentação precoce passiva assistida**. 1993. 90f. Dissertação (Mestrado em Ortopedia e Traumatologia) – Escola Paulista de Medicina de São Paulo.1993.

FONSECA, J. S.; MARTINS, G. A. **Curso de estatística**. 3. ed. São Paulo: Atlas, 1992. 267p.

FURLOW, L. T. Role of tendon tissues in tendon healing. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 57, p. 39-49, 1976.

GENOVESE, J. W. **Laser de baixa intensidade**. 8. ed. São Paulo: Lovise, 2000. p. 78-86.

GOFFI, F. S. **Técnica cirúrgica – Bases anatômicas, fisiopatologias e técnicas da cirurgia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 126-252.

GUM, S. L.; REDDY, G. K.; STEHNO-BITTEL, L.; ENWEMEKA, C. S. Combined ultrasound, electrical stimulation and laser promote collagen synthesis with moderate changes in tendon biomechanics. **American Journal of Physical Medicine Rehabilitation**, v.74, n. 4, p. 288-296, 1997.

GÜR, A.; KARAKOE, M.; NAS, K.; CEVIK, R.; SARAC, A. J.; ATAOGU, S. Effects of low power laser and low dose amitriptyline therapy on clinical symptoms and quality of life in fibromyalgia: a single-blind, placebo-controlled trial. **Rheumatol Int.**, v. 22, p. 188-193, 2002.

JÓZSA, L.; KANNUS, P. **Human tendons**. Champaign, Illinois: Human Kinetics, 1997. p.576.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. In: **TECIDO CONJUNTIVO. Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p.92-124.

- KLEINERT, H. E.; SCHEPEL, S.; GILL, T. Flexor tendons injuries. **Surg Clin of North Americana**, v. 61, n. 2, p. 267- 286, 1981.
- MACHADO, M. V. M.; VULCANO, L. C.; HUSSNI, C. A.; ALVES, L. G. Efeito da laserterapia em tendinite experimental no tendão flexor digital superficial em eqüinos: Estudo histológico e ultrasonográfico. **Archives of Veterinary Science**, v. 5, p. 111 – 115, 2000.
- MAFFULLI, N.; BENAZZO, F. Basic Sciences of Tendons. **Sports Medicine and Arthroscopy Review**, v. 8, p. 1-5, 2000.
- MAFFULLI, N.; MOLLER, H. D.; EVANS, C. H. Tendon healing: Can it be optimised? **Br J Sports Med**, v. 36, p. 315-316, 2002.
- MANSKLE, P. R.; LESKER, B. S. Histologic evidence of intrinsic flexor tendon repair in various experimental animals: an in vitro study. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n. 182, p. 297-304, 1984.
- MARTINS, G. A. **Estatística geral e aplicada**. São Paulo: Atlas, 2001. 417p.
- MASSONE, F. **Anestesiologia Veterinária : Farmacologia e Técnicas**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. 107p.
- MATERA, J. M.; TATARUNAS A. C.; OLIVEIRA S. M. O uso do laser arseneto de gálio (904nm) após excisão artroplastica da cabeça do fêmur em cães. **Acta Cirurgia Brasileira**; v. 18, n. 2, p. 102-106, 2003.
- MAZZANTI, A.; RAISER, A. G.; PIPPI, N. L.; BARROS, C. S. L.; BRONDANI, J. T.; MARIN, A.; SILVA, T. R.; HILLE, R.; SALBEGO, F. Z.; STIEVEN, D.; ROHDE, R.; DALMOLIN, F. Homoimplante ortotópico conservado, associado à terapia “soft laser” na reparação tenopatelar em cão. **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, p. 429-437, 2004.
- MELLO, R. A. F. Avaliação morfométrica do tendão de Aquiles por ultra-sonografia. **Rev. Radiol. Bras.**, v. 38, n. 1, p. 60, 2004.
- MESTER, E.; MESTER, A. F.; MESTER, A. The biomedical effects of laser application. **Laser Surg. Med.**, v. 5, p. 31-39, 1985.
- MOORE, K. L.; DALLEY, F. **Anatomia orientada para a clínica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. P. 518-519.
- MÜLLER, S. S.; SILVARES, P. R. A.; PEREIRA, H. R.; SILVA, M. A. M.; SARDENBERG, T.; LEIVAS, T. P. Análise comparativa das propriedades mecânicas do ligamento da patela e do tendão do calcâneo. **Acta Ortop. Brás.**, v. 12, n. 3, p. 134-140, 2004.
- OLIVEIRA, P. V. **Estudo mecânico do efeito do laser HeNe em cicatrização de tendão de Aquiles de coelho**. 2002. 96f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) - Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão.2002
- ÖZKAN, N.; ALTAN, L.; BINGOL, U.; AKLN, S.; YURTKURAN, M. Investication of the supplementary effect of GaAs laser therapy on the rehabilitation of humanan digital flexor tendons. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v. 22, n. 2, p. 105-110, 2004.

PAAVOLA, M. **Achilles tendon overuse injuries : Diagnosis and treatment.** Academic Dissertation, University of Tampere, Medical School, Finland, 2001.

PARIZOTTO, N. A. **Ação do laser de hélio-neônio sobre o processo de reparo tecidual: Um estudo do colágeno por microscopia eletrônica de varredura, microscopia de varredura, microscopia de força atômica e espectroscopia por infravermelho.** 1998. 134f. Tese (Doutorado) -Faculdade de Engenharia Elétrica e da Computação, Universidade Estadual de Campinas.1998.

PEREZ, A. C.; MATOS, D.; MONTERO, E. F. S.; SOUZA, H. S.; BARBOSA, F.C.P.; SAAD, F.; DIP, N. Effects of sodium hyaluronate and carboxymethylcellulose membrane on collagen and fibroblast formation in bowel suture healing: experimental study in rats. **Acta Cir. Bras.**, v. 20, n. 1, p. 15-21, 2005.

PORTER, M. Therapeutic lasers. *Equine Veterinary Science*, v.12, p.49-56, 1992

POTENZA, A. D. Tendon healing within the flexor digital sheath in the dog. **Journal Bone Joint Surgery**, v. 44-A, n. 1, p. 49-64, 1962.

PUGLIESE, L. S.; MEDRADO, A. P.; REIS, S. R. A.; ANDRADE, Z. A. The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. **Pesq. Odontol. Bras.**, v. 17, n. 4, p. 307-313, 2003.

RAISER, A. G.; PIPPI, N. L.; ZINN, L. L.; SILVEIRA, D. S.; BORDIN, A. I.; BAIOTTO, G. C.; RIOS, M. V. Aloimplante ortotópico de tendão calcâneo conservado em glicerina a 98% em cães. Influência da imobilização e da radiação laser arseneto de gálio. **Vet. Not.**, v.7, n. 1, p. 1-15, 2001.

RAISER, A. G.; PIPPI, N. L.; GRAÇA, D. L.; SILVEIRA, D. S.; BORDINI, I.; BAIOTTO, G. C. O fio de poliamida como substituto de perda segmentar do tendão calcâneo comum em cães. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v. 1, n. 1, p. 23-29, 2003.

REDDY, G. K.; ENWEMEKA, C. S. A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues. **Clin. Biochem.**, v. 29, p. 225-229, 1996.

REDDY, G. K.; STEHNO-BITTEL, L.; ENWEMEKA, C. S. Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit Achilles tendons. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 22, p. 281-287, 1998a.

REDDY, G. K.; GUM, S.; STEHNO-BITTEL, L.; ENWEMEKA, C.S. Biochemistry and biomechanics of healing tendon: Part II. Effects of combined laser therapy and electrical stimulation. **Medicine and Science in Sports and Exercise**. v. 30, n. 6, p. 794-800, 1998b.

REDDY, G. K.; BITTEL, L. S.; ENWEMEKA, C. S. Matrix remodeling in healing rabbit Achilles tendon. **Wound Repair and Regen**. v. 7, n. 6, p. 518-527, 1999.

REDDY, G. K.; STEHNO-BITTEL, L.; ENWEMEKA, C. S. Laser photostimulation accelerates wound healing in diabetic rats. **Wound Repair and Regen**. v. 9, n. 3, p. 248-255, 2001.

- REDDY, G. K. Comparison of the photostimulatory effects of visible He-Ne and infrared Ga-As lasers on healing impaired diabetic rat wounds. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 33, p. 344-351, 2003.
- ROSS, M. H., REITH, E. J., ROMRELL, L. J. In: TECIDO CONJUNTIVO. **Histologia – texto e atlas**. 2. ed. São Paulo: Panamericana. 1993. P. 85-103.
- SAED, G.M.; ZHANG, W.; CHEGINI, N.; HOLMDAHL, L.; DIAMOND, M. P. Alteration of type I and III collagen expression in human peritoneal mesothelial cells in response to hypoxia and transforming growth factor - β_1 . **Wound Repair and Regen.**, v. 7, n. 6, p. 504-510, 1999.
- SCHANAIDER, A.; SILVA, P. C. Uso de animais em cirurgia experimental. **Acta Cir. Bras.**, v. 19, n. 4, p. 441-447, 2004.
- SILVEIRA, J. C.; LOPES, E. E. Alguns aspectos do comportamento do mastócito sob ação do raio laser de GaAs – 904nm (Estudo experimental em cobaias – *Cavia Porcellus*). **Arq. Cent. Estud. Curso Odontol.**, v. 28, n. 1/2, p. 73-96, 1991.
- SMITH, J. W. Blood supply of tendons. **Am. J. Surg.**, v. 109, p. 272-276, 1965.
- SIMÕES, M. L.; MARQUES, L. O.; ADUR, R. C.; CAVAZZANA, W.; LIMA, E. B. Sutura x não sutura do peritônio e a formação de aderência: estudo experimental em ratos. **Rev. Bras. Cirur.**, v. 86, n. 6, p. 303-305, 1996.
- TATARUNAS, A. C.; MATERA, J. M.; DAGLI, M. L. Z. Estudo clínico e anatomopatológico da cicatrização cutânea do gato doméstico: utilização do laser de baixa potência GaAs (904nm). **Acta Cir. Brás.**, v. 13, p. 86-93, 1998.
- TAVARES, M.R. **Efeito do Laser Terapêutico na Cicatrização Tendinosa: Estudo Experimental em Ratos**. 2002. 53f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) - Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão.2002.
- TRIOLA, M. F. **Introdução à estatística**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 1999. 410p.
- VEÇOSO, M. C. **Laser em fisioterapia**. São Paulo, Lovise, 1993. p. 38-60.
- VIDAL, C. B.; MELLO, M.L.S. Matrix Extracelular. In: **Biologia celular**. Rio de Janeiro: Atheneu. 1987. p.. 273-304.

Anexo A - Análise do número de fibroblastos

Neste anexo são apresentados os resultados da proliferação de fibroblastos obtidos para cada grupo de animais em termos de suas médias (\bar{X}) e de seu desvio padrão (s). Os dados estão apresentados nas tabelas a seguir:

Quadro AI.1– Grupo animais tratados com laser AsGa, após 7 dias.

	Animal A	Animal B	Animal C	Animal D	Animal E
	176	162	157	182	189
	187	165	141	188	192
	188	149	153	172	177
	188	184	148	178	172
	198	150	160	169	164
	178	134	148	149	169
	181	148	163	145	176
	174	157	143	166	187
	171	159	149	149	171
Média de cada animal	182,4	156,5	151,4	166,5	177,5
Média do grupo = 166,9			Desvio padrão = 13,2		

Quadro AI.2 – Grupo animais controle, após 7 dias.

	Animal A	Animal B	Animal C	Animal D	Animal E
	120	113	130	133	158
	110	118	133	139	150
	116	135	135	132	141
	138	124	115	143	147
	120	113	124	138	142
	135	128	119	147	153
	118	120	139	141	161
	132	133	132	134	149
	113	134	122	140	154
Média de cada animal	122,5	124,3	127,7	138,6	150,6
Média do grupo = 132,8			Desvio padrão = 11,7		

Quadro AI.3 – Grupo animais tratados com laser AsGa, após 14 dias.

	Animal A	Animal B	Animal C	Animal D	Animal E	Animal F
	106	101	103	108	106	107
	116	92	87	118	98	96
	104	90	89	95	91	92
	87	88	86	87	102	98
	115	97	88	105	89	103
	101	84	90	103	93	91
	89	98	101	101	98	99
	114	103	93	99	83	83
	108	86	91	83	97	89
Média de cada animal	104,4	93,3	92,0	99,9	95,3	95,4
Média do grupo = 96,7			Desvio padrão = 4,6			

Quadro AI.4 – Grupo animais de controle, após 14 dias.

	Animal A	Animal B	Animal C	Animal D	Animal E	Animal F
	101	104	106	127	126	107
	95	113	115	98	127	97
	113	112	100	101	118	109
	94	106	98	104	85	102
	98	101	93	95	101	99
	93	92	102	105	98	95
	97	115	99	108	115	102
	93	107	110	97	107	88
	101	110	103	101	99	97
Média de cada animal	98,3	106,7	102,9	104,0	108,4	99,6
Média do grupo = 103,3			Desvio padrão = 4,0			

Quadro AI.5 – Grupo animais tratados com laser AsGa, após 21 dias.

	Animal A	Animal B	Animal C	Animal D	Animal E	Animal F
	53	72	89	81	73	89
	58	91	85	86	82	74
	48	64	86	81	78	79
	80	68	68	68	84	75
	58	70	61	70	79	76
	55	85	70	79	69	83
	56	75	79	80	78	78
	61	86	77	81	80	69
	63	69	81	75	72	84
Média de cada animal	59,1	75,5	77,3	77,9	69,2	78,5
Média do grupo = 72,9			Desvio padrão = 7,6			

Quadro AI.6 – Grupo animais de controle, após 21 dias.

	Animal A	Animal B	Animal C	Animal D	Animal E	Animal F
	65	104	108	103	91	107
	87	87	98	95	89	97
	79	80	78	89	104	109
	72	114	103	97	88	102
	72	73	85	93	90	99
	103	91	92	99	83	95
	99	85	107	109	93	102
	70	77	95	99	87	88
	58	101	101	92	102	97
Média de cada animal	78,3	90,2	96,3	97,3	91,9	99,5
Média do grupo = 92,3			Desvio padrão = 7,6			

Anexo B - Análise da presença de células inflamatórias mononucleares.

Neste anexo são apresentados os resultados da presença de células inflamatórias obtidos para cada grupo de animais em termos de suas médias (\bar{X}) e de seu desvio padrão (s). Os dados são apresentados nas tabelas a seguir:

Quadro AII.1 – Grupo animais tratados com laser AsGa, após 7 dias.

	Animal A	Animal B	Animal C	Animal D	Animal E
	5	3	3	2	4
	6	5	4	3	6
	3	5	3	3	3
	4	5	2	2	4
	2	6	3	4	3
	3	3	1	1	5
	5	3	3	3	3
	4	5	3	2	5
	4	4	4	1	4
Média de cada animal	4,0	4,3	2,9	2,3	4,1
Média do grupo = 3,5			Desvio padrão = 0,9		

Quadro AII.2 – Grupo animais de controle, após 7 dias.

	Animal A	Animal B	Animal C	Animal D	Animal E
	6	6	5	5	6
	3	3	7	7	7
	4	7	6	8	4
	8	5	4	6	8
	5	4	6	7	6
	8	3	3	5	9
	6	7	8	5	6
	8	5	9	8	7
	5	6	7	6	8
Média de cada animal	5,9	5,1	6,1	6,3	6,8
Média do grupo = 6,1			Desvio padrão = 0,6		

Quadro AII.3 - Grupo animais tratados com laser AsGa, após 14 dias.

	Animal A	Animal B	Animal C	Animal D	Animal E	Animal F
	1	2	3	1	2	3
	0	3	2	1	3	2
	1	2	1	2	2	2
	0	1	0	2	0	3
	3	3	3	3	2	2
	3	2	2	3	1	1
	0	3	4	1	1	2
	0	2	3	1	2	3
	2	1	1	1	1	1
Média de cada animal	1,1	2,1	2,1	1,7	1,5	2,1
Média do grupo = 1,8			Desvio padrão = 0,4			

Quadro AII.4 – Grupo animais de controle, após 14 dias.

	Animal A	Animal B	Animal C	Animal D	Animal E	Animal F
	3	2	5	3	3	4
	5	3	4	4	2	3
	5	5	2	4	3	4
	7	4	3	2	2	2
	5	3	0	3	1	3
	5	2	3	2	1	4
	4	4	4	4	3	2
	5	2	2	2	2	3
	6	2	3	2	3	2
Média de cada animal	5,0	3,0	2,9	2,9	2,2	3,0
Média do grupo = 3,2			Desvio padrão = 0,9			

Quadro AII.5 - Grupo animais tratados com laser AsGa, após 21 dias.

	Animal A	Animal B	Animal C	Animal D	Animal E	Animal F
	0	1	0	0	1	1
	0	0	1	1	0	0
	0	0	0	1	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	1
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
Média de cada animal	0	0,11	0,11	0,22	0,11	0,22
Média do grupo = 0,1			Desvio padrão = 0,1			

Quadro AII.6 – Grupo animais de controle, após 21 dias.

	Animal A	Animal B	Animal C	Animal D	Animal E	Animal F
	1	1	2	1	1	2
	1	2	1	1	1	1
	1	3	1	2	0	1
	3	2	2	0	1	1
	0	3	1	3	2	1
	3	1	0	2	2	3
	1	2	1	1	1	2
	1	1	2	2	2	3
	3	1	2	2	0	2
Média de cada animal	1,5	1,7	1,3	1,5	1,1	1,8
Média do grupo = 1,5			Desvio padrão = 0,3			

Anexo C - Análise da quantidade das fibras de colágeno.

Neste anexo são apresentados os resultados da presença de colágeno obtidos para cada grupo de animais em termos de suas médias (\bar{X}) e de seu desvio padrão (s). Os dados são apresentados nas tabelas a seguir:

Quadro AII.1 - Grupo animais tratados, após 7 dias.

	Animal A	Animal B	Animal C	Animal D	Animal E
	55	58	65	64	59
	49	50	56	61	53
	55	57	60	57	54
	49	48	66	55	63
	66	53	68	62	65
	57	50	62	56	62
	62	48	59	61	66
	56	48	58	64	62
	59	52	60	62	63
Média (%) de cada animal	56,7	51,7	61,8	60,4	61,0
Média do grupo = 58,3%			Desvio padrão = 4,2		

Quadro AIII.2 – Grupo de animais de controle, após 7 dias.

	Animal A	Animal B	Animal C	Animal D	Animal E
	70	59	47	53	59
	67	60	47	60	61
	70	57	47	60	58
	70	55	56	59	64
	67	58	50	59	61
	69	56	52	60	58
	48	56	51	62	63
	53	55	54	64	66
	54	58	54	59	65
Média (%) de cada animal	63,1	57,3	51,2	59,9	62,0
Média do grupo = 58,7%			Desvio padrão = 4,8		

Quadro AIII.3 – Grupo de animais tratados, após 14 dias.

	Animal A	Animal B	Animal C	Animal D	Animal E	Animal F
	56	60	57	59	71	55
	56	52	58	53	62	53
	53	51	72	59	71	53
	63	59	55	64	67	51
	61	45	53	65	64	53
	64	64	73	61	59	54
	56	65	60	47	64	66
	55	50	66	63	57	61
	66	50	57	61	61	64
Média (%) de cada animal	59,3	55,5	61,3	59,3	64,3	56,9
Média do grupo = 59,4%			Desvio padrão = 3,2			

Quadro AIII.4 – Grupo de animais de controle, após 14 dias.

	Animal A	Animal B	Animal C	Animal D	Animal E	Animal F
	62	51	44	43	46	60
	54	53	52	56	49	61
	54	58	53	59	52	59
	62	52	55	63	52	51
	64	46	55	61	40	53
	60	46	58	62	45	56
	50	62	65	65	46	47
	49	50	63	66	49	48
	56	43	63	64	55	48
Média (%) de cada animal	57,0	51,5	56,7	60,1	48,4	54,1
Média do grupo = 54,6%			Desvio padrão = 4,2			

Quadro AIII.5 – Grupo de animais tratados, após 21 dias.

	Animal A	Animal B	Animal C	Animal D	Animal E	Animal F
	59	70	71	58	56	65
	71	81	69	67	58	59
	78	71	63	66	55	54
	63	76	66	56	58	71
	69	71	71	68	52	65
	71	65	60	71	47	72
	65	79	69	85	61	70
	71	62	72	68	47	68
	72	79	78	55	64	59
Média (%) de cada animal	68,8	72,9	69,1	66,3	54,8	64,9
Média do grupo = 66,1			Desvio padrão = 6,2			

Quadro AIV.6 – Grupo de animais de controle, após 21 dias.

	Animal A	Animal B	Animal C	Animal D	Animal E	Animal F
	61	56	41	58	53	65
	63	59	44	59	51	64
	54	56	49	59	54	63
	46	52	50	58	50	61
	56	62	55	56	51	62
	58	61	56	60	52	62
	50	51	52	60	56	54
	63	46	58	62	54	55
	60	54	54	55	54	58
Média (%) de cada animal	56,9	55,5	51,1	58,8	53,3	60,7
Média do grupo = 56,0%			Desvio padrão = 3,6			

Anexo D - Análise da presença de vasos sanguíneos.

Neste anexo são apresentados os resultados da presença de vasos congestionados e capilares obtidos para cada grupo de animais em termos de suas médias (\bar{X}) e de seu desvio padrão (s). Os dados são apresentados nas tabelas a seguir:

Quadro AIV.1 - Grupo animais tratados com laser AsGa, após 7 dias.

	Animal A	Animal B	Animal C	Animal D	Animal E
	35	30	34	29	39
	41	31	49	32	37
	39	41	38	30	43
Média de cada animal	38,3	34,0	40,3	30,3	39,6
Média do grupo=36,5			Desvio padrão=4,2		

Quadro AIV.2 - Grupo animais de controle, após 7 dias.

	Animal A	Animal B	Animal C	Animal D	Animal E
	35	29	45	52	38
	37	36	38	45	43
	42	28	41	48	39
Média de cada animal	38,0	31,0	40,3	48,3	40,0
Média do grupo=39,7			Desvio padrão=6,2		

Quadro AIV.3 - Grupo animais tratados com laser AsGa, após 14 dias.

	Animal A	Animal B	Animal C	Animal D	Animal E	Animal F
	43	49	34	30	34	36
	39	53	38	28	41	41
	41	35	33	29	42	47
Média de cada animal	41,0	45,6	35,0	29,0	39,0	41,3
Média do grupo=38,5			Desvio padrão=5,8			

Quadro AIV.4 - Grupo animais de controle, após 14 dias.

	Animal A	Animal B	Animal C	Animal D	Animal E	Animal F
	34	41	34	43	29	38
	38	38	44	39	35	40
	41	35	41	45	31	36
Média de cada animal	37,6	38,0	39,6	42,3	31,6	38,0
Média do grupo=37,8			Desvio padrão=3,5			

Quadro AIV.5 - Grupo animais tratados com laser AsGa, após 21 dias.

	Animal A	Animal B	Animal C	Animal D	Animal E	Animal F
	37	29	34	52	37	48
	32	35	39	45	34	43
	34	33	43	54	39	39
Média de cada animal	34,3	32,3	38,6	50,3	36,6	43,3
Média do grupo=39,2			Desvio padrão do grupo=6,6			

Quadro AIV.6 - Grupo animais de controle, após 21 dias.

	Animal A	Animal B	Animal C	Animal D	Animal E	Animal F
	38	39	39	49	46	45
	40	50	43	38	39	39
	41	43	34	53	48	41
Média de cada animal	39,6	44,0	38,6	46,6	44,3	41,6
Média do grupo=42,5			Desvio padrão=3,1			

Anexo E - Comitê de Ética



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVAP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo n.º L096/2005/CEP, intitulado “*Avaliação do laser Arseneto de Gálio - 904nm no processo de cicatrização do tendão de Aquiles em ratos*”, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Antonio Balbin Villaverde, está de acordo com a Lei 11977/2005 (SP); os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA/1991), e as Normas Para a Prática Didático-Científica da Vivisseção de Animais (Lei 6638/1979) sendo, portanto, **aprovado** por esta Comissão de Ética em Pesquisa.

Informamos que o pesquisador responsável por este Protocolo de Pesquisa deverá apresentar a este Comitê de Ética um relatório das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação.

São José dos Campos, 21 de março de 2006.

PROF. DR. LANDULFO SILVEIRA JUNIOR
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVAP