

Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

Enio Thalles Batista de Faria

“Estudo dos efeitos da terapia com luz coerente e não coerente sobre a reparação tendínea através da Espectroscopia Raman e Análise Histopatológica”

Dissertação apresentada no programa de Pós-Graduação em Bioengenharia, como complementação dos créditos necessários para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica

São José dos Campos, SP
2006

Enio Thalles Batista de Faria

“Estudo dos efeitos da terapia com luz coerente e não coerente sobre a reparação tendínea através da Espectroscopia Raman e Análise Histopatológica”

Dissertação de Mestrado apresentada no programa de Pós-Graduação em Bioengenharia, como complementação dos créditos necessários para a obtenção do título de Mestre em Bioengenharia.

Orientadora (UNIVAP): Prof^a. Dr^a. Máira Regina Rodrigues.

Co-Orientadora (UNIVAP): Prof^a. Dr^a. Renata Amadei Nicolau.

Co-orientador (UNIVAP): Prof. Dr. Herculano da Silva Martinho.

São José dos Campos, SP
2006

F233e

Faria, Enio Thalles Batista de

Estudo dos efeitos da terapia com luz coerente e não coerente sobre a reparação tendínea através da Espectroscopia Raman e análise histopatológica / Enio Thalles Batista de Faria. São José dos Campos, 2006.
1 disco laser, color

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

1. Raman, espectroscopia 2. Tendões I. Rodrigues, Máira Regina, Orient. II. Nicolau, Renata Amadei, Co-Orient. III. Martinho, Herculano da Silva IV. Título

CDU:616.8

Autorizo exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução parcial ou total desta Dissertação desde que citada a fonte.

Enio Thalles B. de Faria

Aluno: Enio Thalles Batista de Faria

Data: 28 de novembro de 2006.

**“ESTUDO DOS EFEITOS DA TERAPIA COM LUZ COERENTE E NÃO COERENTE SOBRE
A REPARAÇÃO TENDÍNEA ATRAVÉS DA ESPECTROSCOPIA RAMAN E ANÁLISE
HISTOPATOLÓGICA”**

Enio Thalles Batista de Faria

Banca Examinadora:

Profª. Dra. **RENATA AMADEI NICOLAU** (UNIVAP)

Prof. Dr. **HERCULANO DA SILVA MARTINHO** (UNIVAP)

Prof. Dr. **ALFREDO MAURICIO BATISTA DE PAULA** (UNIMONTES)



Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco

Diretor do IP&D – UniVap

Dedicatória

Aos meus pais: Maria Celina Batista de Faria, a quem agradeço por ter me dado a oportunidade de seguir o caminho escolhido, permitindo que cada etapa da vida se transformasse em conquista e Adolar Vicente de Faria, de quem tenho muita saudade, mas que me provou que ser humilde não significa ser fraco.

Agradecimentos

A Deus Por ter mostrado o caminho a seguir, sendo meu mestre, me conduzido nas escolhas mais difíceis, iluminando cada passo dado.

A todos os componentes do Laboratório de Espectroscopia Biomédica – LEVB - IP&D - UNIVAP, em especial a Doutoranda Renata Andrade Bitar, por toda a ajuda, amizade e conhecimento compartilhado durante o processo de medidas.

Ao Laboratório de Análises Patológicas da Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES) nas Pessoas do Dr. Alfredo Maurício Batista de Paula e Eriuelton Pereira dos Santos.

A minha orientadora: Dr^a Máira Regina Rodrigues, por ter mostrando que com dedicação e esforço podemos realizar bons trabalhos.

Aos Co-Orientadores: Dr^a Renata Amadei Nicolau e Dr. Herculano da Silva Martinho, por terem sido fonte de sabedoria permitindo-me ousar nas minhas pretensões e pelo admirável exemplo de profissionalismo.

A eterna mestra: Dr^a Glória Maria Moraes Vianna da Rosa, por ter me apresentado ao mundo da pesquisa.

A Dr^a Ana Maria do E. Santo por toda atenção, carinho e amizade.

A Bibliotecária: Rúbia Gravito Carvalho Gomes, pelo exemplo de competência profissional e pela eterna amizade criada.

A Bióloga Ana Maria Barbosa, pelas histórias, pelo carinho e ensinamento.

A minha família que sempre me proporcionou adoráveis momentos de alegria e descontração, mostrando que é possível ser feliz nas coisas mais simples.

A Karla Velloso Cunha, minha noiva, que me ensinou o que é amar. Por ter compreendido as minhas faltas e respeitado os momentos de crises.

Aos novos amigos: Allison Brás, Danilo Barbosa, Darcy Neto, Geraldo Gutian e Márcio Kato, que nesses meses de convivência construímos não somente uma amizade, criamos uma cumplicidade ímpar e com alegria soubemos enfrentar cada obstáculos que surgia pela frente.

Aos graduandos em odontologia: Daniel Sonnewend e Jorge Luiz Reis de Oliveira, pela atenção e amizade.

Nota

Esta dissertação apresenta-se dentro das normas explicitadas pelo Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba - IP&D – UNIVAP, para obtenção do título de mestre em Ciências do Curso de Pós-Graduação em Bioengenharia. Para aproximar as expressões técnicas às normas lexicográficas, o texto foi adequado segundo os seguintes dicionários:

- Dicionário Contemporâneo de língua Portuguesa Caldas Aulete. Hamilcar de Garcia e Antenor Nascente, 5ª edição. Rio de Janeiro, 1987. Editora Delta.
- Mini Dicionário Aurélio Século XXI, Aurélio Buarque de Holanda Freire, 4ª edição. Rio de Janeiro, 2000. Editora Nova Fronteira.

Para as referências bibliográficas, foram adaptadas e simplificadas as normas da Associação Brasileira de Normas e técnicas, ABNT-NRB 06023/2000.

“Estudo dos efeitos da terapia com luz coerente e não coerente sobre a reparação tendínea através da Espectroscopia Raman e Análise Histopatológica”

Resumo

Estudos vêm sendo realizados utilizando a fototerapia em diferentes áreas da saúde, empregando tanto lasers quanto LED's de baixa potência. O principal benefício atestado para a laserterapia é a redução de processos algícos, remodelação de tecidos, dentre outros. Contudo, um número mínimo de estudos foi desenvolvido com o emprego da terapia com LED's. Nenhum trabalho foi publicado com terapia LED aplicada à reparação de tendões. Desta forma, o objetivo deste estudo foi o de investigar o efeito da terapia com laser ou LED no processo de reparação tendínea em ratos. Foram utilizados 48 ratos machos. A terapia com laser (780nm ou 904nm) ou terapia com LED (640 ± 20 nm) foi instituída após o procedimento cirúrgico de tenotomia e diariamente durante 7 e 15 dias. Para os diferentes comprimentos de onda utilizou-se a dose padrão de 4 J/cm². O sacrifício dos animais ocorreu aos 7 e 15 dias pós-operatório (PO), originando-se, assim, dois diferentes grupos de avaliação. Os tendões biopsiados foram analisados por espectroscopia Raman (ER), seguidamente analisados histologicamente. O tratamento do tecido tendinoso a base de LED se faz eficaz quando comparado aos tratamentos com lasers (904 nm e 780 nm) principalmente na fase inflamatória (1^a semana) quando avaliados fatores de remodelamento tecidual, maturação (fibroblastos) e tipo de fibras colágenas depositadas no processo de reparação tendínea. O laser AsGa (904 nm) comparado ao laser GaAlAs (780 nm), obteve melhores resultados com relação ao remodelamento e maturação tecidual. Na fase proliferativa, o laser (904 nm) e o LED demonstraram otimizar a síntese de colágeno tipo III. Nenhum dos subgrupos submetidos ao tratamento laser (904 nm e 780 nm), assim como o da terapia LED, obteve grau de remodelamento tecidual equivalente ao do grupo controle.

Palavras-chave: Espectroscopia Raman, Tendão, Laser, LED, Luz coerente, Luz não coerente, colágeno.

"Study on the effects of coherent and non-coherent light therapy on the tendon repairing by Raman Spectroscopy and histopathological analysis"

Abstract

Several studies related to the application of phototherapy in different fields of health have been accomplished. Low-level lasers as well as LEDs were used in these studies. The main benefits attributed to phototherapy are the reduction of the painful process and the remodeling of tissues, amongst others. However, a few studies in which LED therapy was used were developed. No works were released on LED therapy applied to the repairing of tendons. Thus, the objective of this study was to research out the effects of laser therapy or LED therapy on the process of tendon repairing in mice. Forty-eight male rats were used. Laser therapy (780 nm or 904 nm) or LED therapy (640 ± 20 nm) was applied after surgery procedures of tenotomy, and daily during 7 and 15 days. For the different wavelengths, the standard dose of 4 J/cm² was given. The animals were killed on the 7th and 15th days after surgery, thus arising two groups of evaluation. Tendons which suffered biopsy were analyzed using the Raman Spectroscopy (RE), and they were continuously analyzed on their histology. The therapy of the tendon tissue based on LED is more efficient when compared to those based on Laser (904 nm and 780 nm), mainly during the inflammatory phase (1st week), evaluating the factors of tissue remodeling, maturation (fibroblasts) and type of collagen fibres deposited during the process. The AsGa laser (904 nm) therapy showed better results than the GaAlAs laser (780 nm) therapy regarding the remodeling and tissue maturation. During proliferate phase, the laser at 904 nm and the LED therapies optimized the synthesis of type III collagen. All of the sub-groups submitted to the light therapy; laser at 904 nm and 780 nm and LED; showed higher degree of tissue remodeling than the group of control.

Key words: Raman spectroscopy, tendon, Laser, LED, coherent light, non-coherent light, collagen.

LISTA DE ABREVIATURAS

Å: Unidade de medida em Ångstron.

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

GaAs: Arseneto de Gálio.

ATP: Adenosina Trifosfato.

CARS: *Coherent Anti-Stokes Raman Scattering.*

CCD: *Charge Coupled Device.*

CEP: Comitê de Ética de Pesquisa.

DE: Densidade de Energia.

DP: Desvio Padrão.

ER: Espectroscopia Raman.

ES: *Escores.*

FT-IR: *Fourier Transform-Infrared Spectroscopy.*

FT-NIR: *FT- Near Infrared.*

FT-Raman: *Fourier Transform Raman Spectroscopy.*

GaAlAs: Arseneto de Gálio e Alumínio.

Hyp: *Hydroxyproline.*

InGaAs: Índio-Gálio-Arsênio.

IP&D: Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento.

IR: *Infrared.*

IV: Infravermelho.

HeNe: Hélio Neônio.

LASER: *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation.*

LED: *Light Emiting Diode.*

LEVB: Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica.

Nd:YAG: Neodímio: Ítrio-Alumínio-Granada.

P: Potência Média.

PC: Componentes Principais.

PCA: *Principal Component Analysis.*

Phe: Fenilalanina.

PO: Pós-operatório.

P-N: Positivo – Negativo.

Pro: Prolina.

S: Área do feixe.

seg: Segundos.

SERS: *Surface Enhanced Raman Scattering.*

SPSS: *Statistical Package for the Social Science*

Ti: Safira: Titânio-Safira.

TLBP: Terapia Laser de Baixa Potência.

Tyr: Tirosina.

UNIMONTES: Universidade Estadual de Montes Claros.

UNIVAP: Universidade do Vale do Paraíba.

UV: Ultravioleta.

VIS: Visível.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	(a) Reflexão, (b) Absorção, (c) Difusão e (d) Transmissão.....	04
Figura 2 -	Fibrila, fibra e fascículo de colágeno. Fonte: http://hjaldanamarcos.bravepages.com/unidades/unidad3/images/cola.JPG	09
Figura 3 -	(a) Fibrila de colágeno, (b) Organização das moléculas, (c) Molécula de colágeno, (d) Tríplice hélice, (e) Componentes das cadeias alfa.....	11
Figura 4 -	Ilustração esquemática de espectros típicos com luz espelhada: (a) Espalhamento <i>Rayleigh</i> - $\nu=0$. Espalhamento Raman: (b) <i>Stokes</i> - ν =negativo e (c) <i>Anti-Stokes</i> - ν =positivo.....	16
Figura 5 -	Espectro Raman esquemático mostrando os processos <i>Rayleigh (Le)</i> , <i>Anti-Stoke (Las)</i> e <i>Stoke (Ls)</i>	17
Figura 6 -	Esquema de BRUKER mostrando o sistema de coleta FT-Raman.....	19
Figura 7 -	Gaiola padrão de polietileno, etiquetada com balança de peso.....	24
Figura 8 -	Aparelho laser KLD, caneta aço inox com comprimento de onda de 904nm e par óculos para proteção.....	26
Figura 9 -	Aparelho laser MM Óptics com meio ativo de GaAlAs e caneta com comprimento de onda de 780nm.....	27
Figura 10 -	Aparelho LED Microdont, caneta com comprimento de onda de 640nm e par de óculos para proteção.....	28
Figura 11 -	Atropina (A), Cloridrato de cetamina 10% e cloridrato de xilazina 2% (B)	30
Figura 12 -	Tricotomia (A), incisão com exposição do tendão do calcâneo (B), tenotomia (C) e sutura(D).....	31
Figura 13 -	Pentabiótico (Fort Dodge®) de amplo-espectro.....	32
Figura 14 -	Caneta laser com <i>stopper</i> fixado (A), aplicação de laserterapia	

	com imobilização manual do animal (B).....	33
Figura 15 -	Equipamento FT-Raman <i>Spectrometer</i> RFS 100 - Bruker ®	35
Figura 16 -	Geometria de espalhamento de 180° do FT-Raman <i>Spectrometer</i> RFS 100 com porta amostras de alumínio.....	36
Figura 17 -	Ilustração do tendão, mostrando inserção miotendínea, área tenotomizada, 5 pontos de coleta de espectroscopia FT-Raman e inserção tendão-osso.....	37
Figuras 18 a 21 -	Interface entre o tecido conjuntivo fibroso denso ordenado típico do tecido tendíneo normal e a área de reparação tecidual pós- tenotomia. As setas negras indicam o local da avaliação do grau de remodelamento tecidual e da contagem de fibroblastos. Em detalhe, as setas brancas indicam o local da análise microscópica (Coloração Hematoxilina & Eosina e Tricrômio de Masson. Aumentos de 100X. Detalhes: aumento de 400X).....	39
Figuras 22 – 25 -	Gradação do grau de remodelamento do tecido fibroso da área em regeneração dos tendões tenotomizados. 22-Gradação +; 23-Gradação ++; 24- Gradação +++; 25- Gradação ++++ (Coloração Tricrômio de Masson. Aumento de 400X).....	41
Figura 26 -	Microscopia do tendão calcâneo de rato tratado com terapia LED (640nm), sacrificado no 7º dia PO, corado com Hematoxilina & Eosina (1A HE) e Tricromio de Masson (1A TM). Corte longitudinal com aumento de 400X.....	44
Figura 27 -	Microscopia do tendão calcâneo de rato tratado com terapia LED (640nm), sacrificado no 15º dia PO, corado com Hematoxilina & Eosina (1B HE) e Tricromio de Masson (1B TM). Corte longitudinal com aumento de 400X.....	45
Figura 28 -	Microscopia do tendão calcâneo de rato tratado com terapia <i>Laser</i> (780nm), sacrificado no 7º dia PO, corado com	

	Hematoxilina & Eosina (2A HE) e Tricromio de Masson (2A TM). Corte longitudinal com aumento de 400X.....	45
Figura 29 -	Microscopia do tendão calcâneo de rato tratado com terapia <i>Laser</i> (780nm), sacrificado no 15º dia PO, corado com Hematoxilina & Eosina (2B HE) e Tricromio de Masson (2B TM). Corte longitudinal com aumento de 400X.....	46
Figura 30 -	Microscopia do tendão calcâneo de rato tratado com terapia <i>Laser</i> (904nm), sacrificado no 7º dia PO, corado com Hematoxilina & Eosina (3A HE) e Tricromio de Masson (3A TM). Corte longitudinal com aumento de 400X.....	47
Figura 31:	Microscopia do tendão calcâneo de rato tratado com terapia LED (904nm), sacrificado no 15º dia PO, corado com Hematoxilina & Eosina (3B HE) e Tricromio de Masson (3B TM). Corte longitudinal com aumento de 400X.....	47
Figura 32 -	Microscopia do tendão calcâneo de rato do grupo controle, sacrificado no 7º dia PO, corado com Hematoxilina & Eosina (4A HE) e Tricromio de Masson (4A TM). Corte longitudinal com aumento de 400X	48
Figura 33 -	Microscopia do tendão calcâneo de rato do grupo controle, sacrificado no 7º dia PO, corado com Hematoxilina & Eosina (4B HE) e Tricromio de Masson (4B TM). Corte longitudinal com aumento de 400X.....	49
Figura 34 -	Microscopia do tendão calcâneo de rato do grupo controle + sacrificado no 15º dia PO, corado com Hematoxilina & Eosina (5B HE) e Tricromio de Masson (5B TM). Corte longitudinal com aumento de 400X.....	49

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Relação da quantidade de animais, grupos, procedimento cirúrgico, tratamento e sacrifício.....29
- Tabela 2** - Relação de grupos formados, tratamento, dose e tempo.....33
- Tabela 3** - Parâmetros do equipamento FT-Raman *Spectrometer*RFS 100..38
- Tabela 4** - Comparação dos resultados da contagem de fibroblastos nos tendões tenotomizados de animais controles e experimentais de acordo com o tipo de tratamento instituído.....52
- Tabela 5** - Comparação dos resultados da contagem de fibroblastos nos tendões tenotomizados de animais controles e experimentais nos momentos do primeiro e segundo sacrifícios.....52
- Tabela 6** - Comparação dos resultados do grau de remodelação tecidual nos tendões tenotomizados de animais controles e experimentais de acordo com o tipo de tratamento instituído.....53
- Tabela 7** - Comparação dos resultados do grau de remodelação tecidual nos tendões tenotomizados de animais controles e experimentais de acordo com o tipo de tratamento instituído.....53

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Espectros médio dos grupos: 1A, 1B, 2A, 2B, 3 A, 3B, 4A, 4B e 5B.....	54
Gráfico 2 - Dispersão binomial do PC4 versus PC1.....	55
Gráfico 3 - Dispersão binomial do PC3 versus PC1.....	55
Gráfico 4 - Dispersão binomial do PC4 versus PC2.....	56
Gráfico 5 - Dispersão binomial do PC2 versus PC4.....	56
Gráfico 6 - (A) Espectros médios dos grupos: 1A, 1B e controle. (B) Espectro dos colágenos tipos I e III.....	57

SUMÁRIO

	Pág
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	03
2.1 Biomodulação tecidual através de luz coerente e não coerente	03
2.2 Laser	03
2.3 LED	06
2.4 Fotobioestimulação	07
2.5 Tendão	08
2.5.1 Processo cicatricial tendinoso	12
2.6 Espectroscopia Molecular	14
2.7 Espectroscopia Raman	14
2.7.1 Espalhamento Raman	15
2.7.2 Polarizabilidade	17
2.7.3 Instrumentação em Espectroscopia Raman	18
2.7.4 Espectroscopia FT-Raman	18
2.7.5 Aplicabilidade da Espectroscopia Raman na área biológica	20
3. OBJETIVO	22
3.1 Objetivo geral	22
3.2 Objetivos específicos	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 Aspectos éticos	23
4.2 Tipo de pesquisa	23
4.3 Animais	24
4.4 Aparelhos	25
4.5 Grupos experimentais	28
4.6 Procedimento Cirúrgico	29
4.7 Intervenção terapêutica experimental	32
4.8 Sacrifício dos animais	34
4.9 Preparação das amostras para análise pela Espectroscopia Raman .	34
4.10 Realização da Espectroscopia	35

4.11 Procedimento pós Espectroscopia Raman	38
4.12 Avaliação microscópica	38
4.13 Análise por PCA (<i>Principal Component Analysis</i>) dos Espectros	41
4.14 Análise estatística da histopatologia	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1 Histopatologia	43
5.2 Espectroscopia Raman	54
7. CONCLUSÕES	65
7.1 Consideração final	65
8. REFERÊNCIAL BIBLIOGRÁFICO	67
ANEXO A	75

1. INTRODUÇÃO

São vários os estudos que buscam a minimização dos problemas na cicatrização tendinosa, dentre estes, as técnicas cirúrgicas empregadas possuem destaque segundo Strickland (1989). Em 1992, foi destacado por Enwemeka, a utilização das mobilizações e imobilizações nestes tratamentos sendo que, os recursos físicos para a aceleração do processo de reparação tecidual, foram destacados por Schimitt et al. (1993).

Estudos relacionados à cicatrização do tendão do calcâneo em animais vêm sendo realizados, tendo como objetivo elucidar através dos vários tipos de tratamento a reparação do tecido tendinoso (ENWEMEKA, 1992; GUM et al. 1997; REDDY, 1998 ; TAVARES, 2002).

Lizarelli, Lamano-Carvalho e Brentegani (1999 *apud* NICOLAU, 2001) relatam que dentre fenômenos existentes de interação luz e tecido biológico o mais interessante observado em organismos vivos é a do reparo tecidual, sendo este um mecanismo primário de sobrevivência.

Efeitos fotomoduladores são apontados como características da Terapia Laser de Baixa Potência (TLBP) segundo Nascimento (2001), Capon et al. (2001), Nicolau (2001) e Yu (2003).

A ação da luz sobre a regeneração de tecidos, em especial ao tecido tendinoso, foi tema de estudiosos que obtiveram resultados satisfatórios, principalmente com luz coerente - Laser (REDDY et al, 1998; GUM et al, 1997; BUSO, 2006).

Pesquisas tendo como base à luz, na área da saúde, têm aumentado nos últimos tempos. Diversidades nas características da luz dão origem a aparelhos que vêm sendo estudados promovendo interações relevantes nos tecidos biológicos.

Estudos apontam a ação da TLBP em tecidos biológicos, porém existem discordâncias de pesquisadores quanto à eficiência da laserterapia na biomodulação tecidual. Enquanto algumas pesquisas demonstram efeitos da TLBP como inibidor da sintomatologia dolorosa ou aceleração de reparo dos

processos cicatriciais, muitos autores apontam a necessidade do uso cauteloso da luz laser como biomodulador na aplicação clínica (WALKER et al., 2000; BABOVIC et al., 2001; STADLER et al., 2001).

Segundo Buso (2006), efeitos antiálgicos, bioestimulantes de trofismo celular, antiinflamatório, antiedematoso e normalizador circulatório podem ser esperados da terapia Laser. Assim, esta terapia pode ser empregada, como coadjuvante em tratamentos variados.

A característica que mais diferencia o LED do Laser é a coerência. Respostas biológicas são evidenciadas pela absorção da luz por moléculas foto-receptoras. Camadas superficiais de tecidos possuem respostas biológicas a luz não coerente (LED) (KARU, 2006).

Luz coerente e não coerente (Laser e diodos emissores de luz), possuindo mesmos parâmetros (comprimento de onda, intensidade e dose) fornecem a mesma resposta biológica (KARU, 2006).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biomodulação tecidual através de luz coerente e não coerente

A utilização da luz como tratamento fototerápico se dá a muitos anos. FINSEN, através da utilização da luz ultravioleta no tratamento do Lupus Vulga recebeu o Prêmio Nobel em 1903.

O emprego da luz tem sido motivo de interesse científico em diversas modalidades de diagnóstico e tratamento de doenças. Cada tipo de luz possui características físicas específicas que lhe conferem propriedades de interação com tecidos biológicos em várias áreas do conhecimento, dando ênfase na área biológica. Rubinov (2006) explicita que a interação da luz com os tecidos biológicos são dependentes de como esta se interage com os tecidos, ou seja, se esta interação se faz pela absorção por algum fotorreceptor, por eventos fotofísicos e fotoquímicos de interação da luz com a matéria biológica.

2.2 Laser

A luz *Laser* (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) tem como características principais a monocromaticidade (luz laser composta de fótons, todos da mesma cor e com o mesmo comprimento de onda) e coerência espacial e temporal (ondas sucessivas da radiação em mesma fase e tempo com os trens de onda com mesma direção e comprimento de onda). A laserterapia tem sido amplamente estudada na área biológica devido a resultados favoráveis após sua utilização na área da saúde. A aceleração dos processos cicatriciais vem sendo observada através da TLBP em estudos experimentais clínicos do profissional de Fisioterapia (ALBERG et al., 1984; SILVA et al., 1998; VERÇOSO, 1993).

De acordo com o comprimento de onda do Laser, situado na faixa do visível ou infravermelho, podem ocorrer diferentes eventos celulares (VEÇOSO, 1993; GENOVESE, 2000). Segundo Buso (2006), efeitos antiálgicos, bioestimulantes de

trofismo celular, antiinflamatório, antiedematoso e normalizador circulatório podem ser esperados da terapia laser.

A energia emitida pelo laser é absorvida e transformada através de efeitos bioquímicos e/ou biofísicos no tecido biológico, tendo então seu efeito terapêutico efetivo, podendo ainda ser propagada para tecidos vizinhos (GENOVESE, 2000).

Os efeitos da TLBP foram divididos em dois grupos por Colls (1984). O primeiro grupo foi denominado como sendo o de efeito primário ou direto (bioquímico, bioelétrico e bioenergético). O segundo grupo foi denominado de efeito secundário ou indireto, o qual promove estímulos como o da microcirculação e trofismo celular.

Efeitos analgésicos, antiinflamatórios e cicatrizantes são atribuídos à TLBP, sendo estes efeitos procedentes de uma complexa interação da luz com tecidos onde a energia depositada pode ser: (a) Refletida, ocorrendo quando parte da luz incidente retorna, sem haver interação com a matéria, em direção a sua fonte de excitação (Figura: 1(a)); (b) Absorvida, quando a o tecido biológico absorve a luz laser, sendo esta absorção dependente tanto do comprimento de onda emitido, como do coeficiente de absorção tecidual (Figura: 1(b)); (c) Difundida, quando a luz laser muda sua angulação no interior do tecido (Figura: 1(c)); e (d) Transmitida, ocorrendo quando a radiação laser consegue atravessar o tecido biológico (Figura: 1(d)) (TATARUNAS et al., 1998; GENOVESE, 2000).

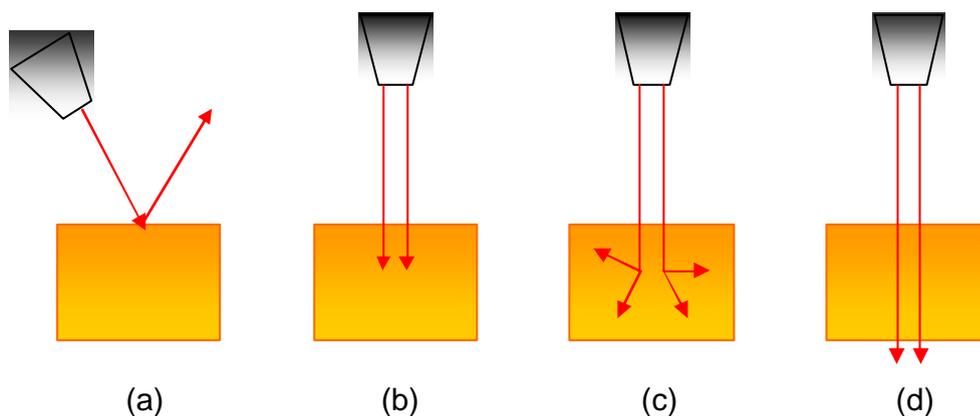


Figura 1: (a) Reflexão, (b) Absorção, (c) Difusão e (d) Transmissão.

Silva et al. (1998) e Herrero (1988) apontam que dentre os efeitos da laserterapia, o estímulo do reparo tecidual é o mais expressivo.

O laser de baixa potência, com comprimento de onda de 904nm, proporciona aumento da deposição de fibras colágenas tanto na fase inicial como na fase tardia no tratamento de ruptura total do tendão do calcâneo, acelerando o seu processo cicatricial (TAVARES; MAZZER; PASTORELLO, 2005).

O efeito cicatricial através da laserterapia é caracterizado por três fatores principais. O primeiro se dá pelo incremento na produção de ATP (KARU; PYATIBRAT; KALENDO, 1995). Este proporcionará um aumento da atividade mitótica, observado por Silva et al. (1998); Herrero (1998), além do aumento da síntese de proteínas (GRECCO et al., 1989; PASSARELLA et al., 1988). O segundo fator se dá pelo estímulo da microcirculação, melhorando o aporte de elementos nutricionais, associado ao aumento da velocidade mitótica, fazendo com que a multiplicação celular seja facilitada. O terceiro e último fator, até então observado, é a neoformação de vasos a partir dos já existentes, segundo Silva, (1998) e Colls (1984).

Rabelo (2003) verificou em seu experimento através de análise microscópica, que o processo de reparação tecidual foi estimulado nos grupos tratados com TLBP, comparados ao grupo controle.

A TLBP vem demonstrando resultados favoráveis na reparação tendínea pela deposição de fibras de colágeno na fase inicial e tardia, assim como minimização da presença de células inflamatórias na zona da lesão (TAVARES; MAZZER; PASTORELLO, 2005).

Em um estudo realizado por Reddy, Strehno-Bittell e Enwemeka (1998) foram utilizados 24 coelhos da raça Nova Zelândia, os quais foram separados em 2 grupos, tenotomizados (corte no tendão, com objetivo de dividi-lo em partes), suturados e um dos grupos tratados com laser de HeNe (632,8 nm), com dose diária de $1\text{J}/\text{cm}^2$, durante 14 dias. Os mesmos foram sacrificados no 15º dia e o tendão encaminhado para análise bioquímica. Os autores observaram um

aumento de 26% de fibras colágenas no grupo tratado com TLBP em relação ao grupo controle.

Tavares, Mazzer e Pastorello (2005) realizaram um estudo com ratos Wistar tratado com laser de GaAs (904nm, 4J/cm²) após tenotomia (tendão do calcâneo). Estes foram sacrificados em períodos distintos (8^o e 15^o dias) e os tendões submetidos à análise histológica por microscopia de luz. Foi verificada significância na deposição de fibras de colágeno no sítio da lesão na fase inicial e tardia, além da minimização de células inflamatórias na fase inicial do processo cicatricial no grupo tratado com TLBP quando comparado ao grupo controle.

2.3 LED

Uma das grandes novidades no mercado comercial é o LED (*Light Emitting Diode*), que apesar de ser bem difundido na vida moderna, vem sendo recentemente utilizado e investigado na área biológica. A emissão deste tipo de luz se faz de forma não coerente o que a difere da luz laser (ANDRADE et al., 2001).

Trata-se de um diodo emissor de luz, que quando energizado emite luz, monocromática, não coerente. É uma luz com alto grau de pureza que permite a sua utilização sem que haja a necessidade de filtros ópticos coletores. São semicondutores, tendo como característica principal, conduzir a corrente elétrica em um único sentido, apresentando duas regiões distintas, sendo a primeira receptora de elétrons denominada por “p” e a segunda doadora de elétrons, denominada por “n” (MEDEIROS, 2001).

O processo de emissão de luz pela aplicação de uma fonte elétrica é denominado “eletroluminescência”. A luz emitida se dá devido ao diodo (junção de P-N) energizado (REBELLO, 2005).

A luz é gerada através da recombinação de elétrons na região receptora, convertendo em fótons parte da energia elétrica fornecida, sendo a parte restante transformada em calor. Os materiais constituintes deste semicondutor são responsáveis pelo espectro de emissão do LED (STAHL et al., 2000)

Quando se analisa uma lâmpada convencional, verifica-se que a luz por ela emitida abrange quase em sua totalidade a parte espectral visível, enquanto que a luz LED emite apenas uma pequena banda espectral (KURACHI, 2001; STAHL et al, 2000).

Os aparelhos LED vêm conquistando mercado, assim como sendo cada vez mais estudados, tendo em vista o seu baixo custo, praticidade e baixo consumo de energia. Alguns fabricantes projetam aparelhos alimentados com pilhas eliminando cabos e aumentando a sua praticidade ou com suas bases alimentadas por fonte elétrica (ANDRADE et al., 2001).

Outras características se fazem interessantes, como a maior seletividade da luz, maior tempo de vida útil e menor consumo de energia (KURACHI et al., 2001, ANDRADE, 2001; MEDEIROS, 2001). Geralmente o nível de tensão da luz LED é de 1,6 a 3,3 V, sendo compatível com circuitos de estado sólido com potência de 10 a 150mW, tendo este um tempo de vida médio de 10.000 horas (NAKANURA, et al. 1994)

A variação térmica presente nos aparelhos LED é incapaz de causar maiores danos mesmo quando o aparelho é usados em tempos prolongados (ANDRADE et al., 2001).

2.4 Fotobioestimulação

A fotobioestimulação é usada por vários profissionais da área da saúde, dentre estes podemos citar os fisioterapeutas, que buscam tratar dores musculoesqueléticas agudas e crônicas; odontólogos, no tratamento de cicatrizações de ulcerações e inflamações orais; dermatologistas, em edemas, úlceras, queimaduras, dermatites, dentre outros. (KARU, 2006).

O processo de absorção de luz em um comprimento de onda específico pelo foto-receptor de uma molécula faz-se necessário para que tenhamos uma reação fotobiológica. Após a absorção da luz é produzido um estado eletronicamente excitado molecular, onde processos preliminares deste estado podem conduzir a um efeito biológico a nível celular. (KARU, 2006).

Uma luz que possui coerência elevada, ou seja, a fase de oscilações na onda eletromagnética permanece inalterada por muito tempo, é importante quando a fase de oscilação do elétron em uma substância excitada pela luz for longa e inalterada. A grande quantidade de átomos contidos em biomoléculas grandes faz com que a interação entre estes conduza a uma perda rápida da fase das oscilações do elétron. Este motivo revela que a coerência da luz pode não ser necessária uma vez que os efeitos fotoquímicos serão independentes desta característica (RUBINOV, 2006).

A fotobioestimulação tem como característica uma variedade de métodos com uso em várias fontes emissoras de luz. Além de serem usados em lasers, os diodos de GaAlAs são também usados em emissores de luz (LED). Os lasers possuem um comprimento de onda coerente longitudinal que os permite irradiar tecidos com maiores volumes, o que não ocorre com o LED, por possuir característica de coerência longitudinal demasiadamente pequena. A resposta tecidual ao tipo de terapêutica (luz coerente ou não coerente) a ser aplicada, é dependente da profundidade da camada do tecido que se quer irradiar. (KARU, 2006).

2.5 Tendão

Tendões, ligamentos e cápsulas articulares são encontrados no corpo humano. Estes são tidos como tecidos fibrosos densos especializados e altamente orientados, que assumem forma de folhetos, faixas e cordões fibrosos rígidos, embora flexíveis e complacentes, tendo como estrutura principal as fibras de colágeno. Possuem papel importante, pois proporciona a mobilidade e estabilidade do sistema músculo-esquelético. Estes tecidos possuem capacidade tênsil e deformação mínima, possuindo características diferentes em seu formato, tamanho, calibre e local, variando ligeiramente sua estrutura, composição e função. Existe uma íntima relação entre músculos ossos e tendões, uma vez que os tendões transmitem a força dos músculos aos ossos produzindo assim o movimento articular (WEISTEIN et al., 2000).

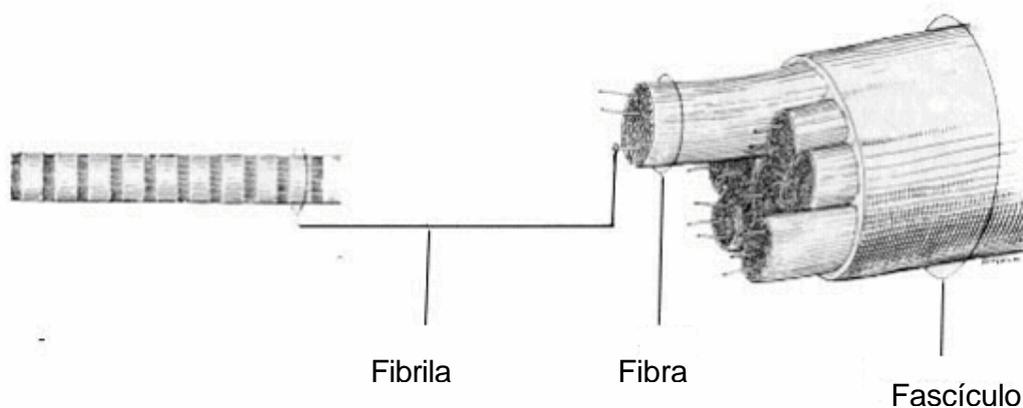


Figura 2: Fibrila, fibra e fascículo de colágeno.

Fonte:

<http://hjalданamarcos.bravepages.com/unidades/unidad3/imagenes/cola.JPG>

Muito resistentes e praticamente inextensíveis os tendões e aponeuroses são estruturas constituídas por tecido conjuntivo denso, rico em fibras de colágeno (SMITH, 1965).

São três as partes constituintes de um tendão: a substância própria do tendão tendo como principal constituinte o colágeno, a junção músculo-tendinosa e a inserção óssea. Tecidos conjuntivos circundam o tendão e são responsáveis pela diminuição da fricção no deslizamento do mesmo durante o movimento (WEISTEIN et al., 2000).

O mesotendão é a parte que liga o tendão aos tecidos conjuntivos vizinhos, sendo constituída de tecido conjuntivo elástico frouxo. O epitendão, que se liga à membrana sinovial, dá a característica esbranquiçada e brilhante à superfície tendinosa. O endotendão, que constitui o agrupamento das fibras tendinosas em uma membrana fina de tecido conectivo, possui vasos sanguíneos e vasos linfáticos. As fibrilas são as estruturas mais finas que constituem as fibras tendinosas (KASTELIC et al., 1978).

Uma característica do tecido tendínio é a sua má irrigação sanguínea longitudinal (SMITH, 1965).

Uma região altamente resistente é a junção miotendínea, contendo fibras musculares e tecidos conjuntivos extracelulares (fibrilas e colágeno). A região de inserção óssea é denominada como osteotendínea, com tecido viscoelástico que transmite forças de tensão do tecido muscular ao tecido ósseo (BUSSO, 2006).

Ligamentos e tendões são constituídos por material viscoelástico e tem como função suportar cargas tencionais. Estes tecidos são uma combinação de fluidos viscosos e elásticos, sendo que estas propriedades características que são modificadas em função do tempo (KASTELIC et al., 1978).

Constituído por fibroblastos e uma matriz extracelular, na qual são imersas proteínas fibrosas de colágeno, elastina, glicoproteínas, proteoglicanas e mucopolissacarídeos (CURRIER; NELSON; 1992).

As proteínas fibrosas de colágeno e elastina estão imersas na matriz extracelular do tendão, sendo que um percentual de 86% a 95% do peso úmido do mesmo é constituído por fibras colágenas. As fibrilas de colágeno são pequenas partículas longas, cristalinas e extremamente alinhadas que juntas dão origem às fibras de colágeno que por sua vez dão origem ao denominado fascículo (Figura: 2). A adaptação funcional se dá, organizando toda a estrutura do mesmo (BIRK; TRELSTAD, 1986).

Fibras de colágeno estão presentes no organismo humano de forma abundante compondo um total de 30% do peso corpóreo seco (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Elas possuem características flexíveis e são de fundamental importância no processo cicatricial, levando em consideração a sua forma de deposição, e não apenas a sua quantidade (SIMÕES et al., 1996).

Várias são as estruturas corporais que tem o colágeno do tipo I como o principal constituinte, dentre elas pode-se destacar osso, dentina, tendões, cápsulas de órgãos e derme (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

O colágeno é organizado em uma estrutura de tríplice hélice, de forma espiralada em três sub-unidades de cadeias polipeptídicas denominadas alfa-hélice (PARIZOTTO, 1998). A constituição da tríplice hélice se dá por duas cadeias peptídicas (alfa-1 e alfa-2), se diferenciando das demais cadeias, as quais se enrolam formando cadeias peptídicas chamadas de alfa-hélice, unidas entre si

por pontes de hidrogênio conforme podemos verificar na figura: 3 (VIDAL; MELLO,1987).

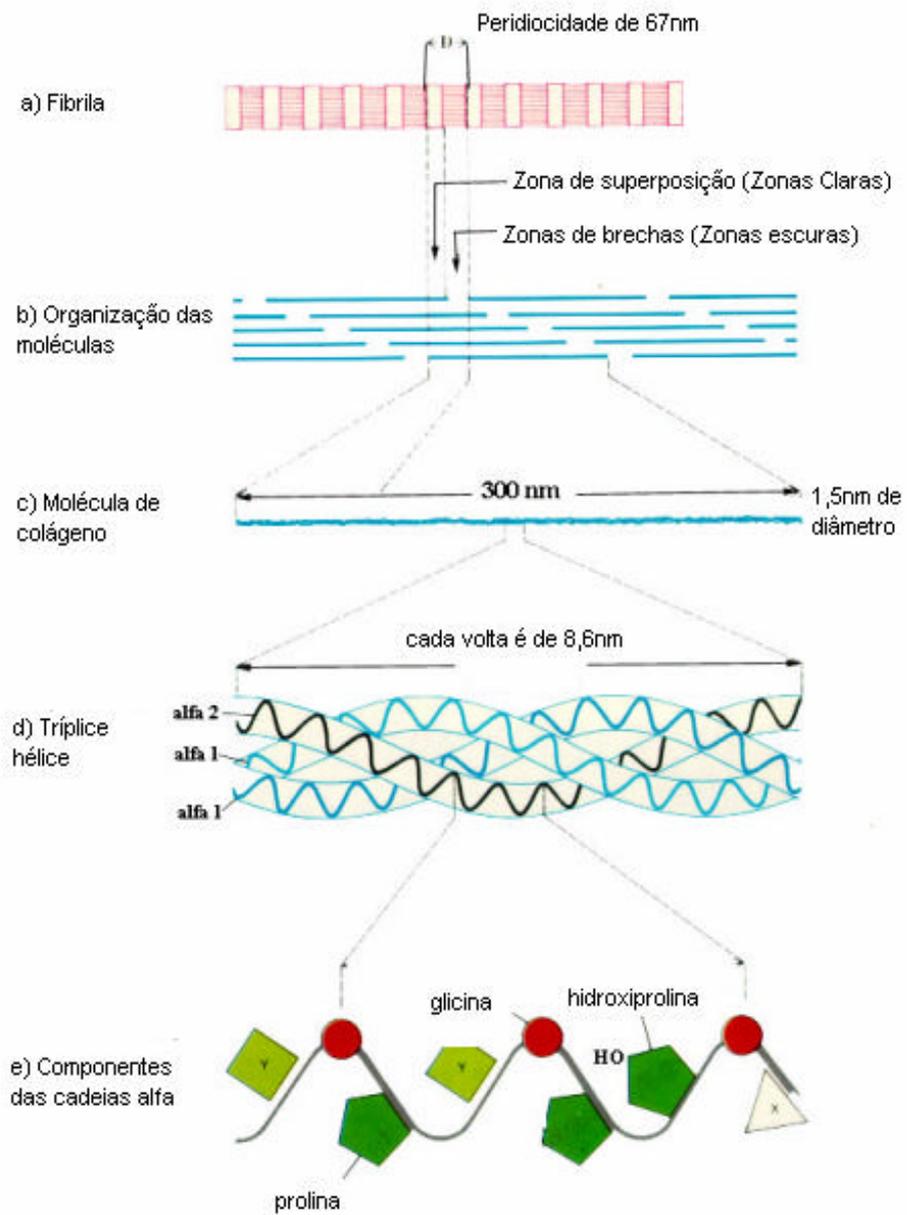


Figura 3: (a) Fibrila de colágeno, (b) Organização das moléculas, (c) Molécula de colágeno, (d) Tríplice hélice, (e) Componentes das cadeias alfa.

Fonte:

<http://hjalданamarcos.bravepages.com/unidades/unidad3/imagenes/cola.JPG>

Carlstedt (1987 *apud* Tavares 2002) relata que as propriedades físicas do colágeno são afetadas por muitos fatores como deficiência de vitamina C, antiinflamatórios não hormonais, gravidez e período de pós-parto, corticoterapias, tratamentos a base de glucocorticoides, imobilização, treinamento, envelhecimento, maturação, dentre outros.

O tendão do calcâneo, também conhecido como tendão de Aquiles, é uma estrutura de fundamental importância para o perfeito processo de deambulação humana, sendo anatomicamente uma estrutura espessa (BUSSO, 2006 *apud* PAAVOLA, 2001). Este tendão apresenta fibras colágenas depositadas de forma regular, o que resulta em ausência de deformidade no momento de tração promovida pelos músculos. A sua conformação física e molecular o torna um tecido com características de alto poder de absorção de energia, assim como elasticidade e resistência (MÜLLER et al., 2004).

2.5.1 Processo cicatricial tendinoso

Quando lesionado, um tecido faz com que o sistema onde ele se insere trabalhe pela sua regeneração, porém, o processo de reparação tendínea culmina em uma nova arquitetura tecidual, a qual dificilmente terá as mesmas características do tecido antes da lesão. As propriedades mecânicas originais de deslizamento sobre tecidos vizinhos possivelmente terão modificações significativas (MACHADO et al., 2000 *apud* BUSSO, 2006).

A limitada vascularização diminui a oferta nutricional e de oxigênio traduzindo em uma diminuída capacidade regenerativa. Estudos vêm demonstrando que quando este tecido é devidamente estimulado através de meios biofísicos, o processo de regeneração se dá de forma satisfatória (ENWEMEKA, 1989).

O primeiro estágio após um trauma tendíneo, é caracterizado por um processo de inflamação aguda que perdura por 1 a 3 dias. Neste estágio existe inicialmente uma resposta vascular onde ocorre um processo de vasoconstricção (por ação da noradrenalina e contração do endotélio) e conseqüente

vasodilatação. Durante este processo, células inflamatórias (neutrófilos e leucócitos) são atraídas para a área de lesão. A permeabilidade vascular, alterada pela ação da histamina, faz com que haja a formação de edema (BAXTER, 1994).

Enwemeka (1989) relata sobre a importância dos primeiros dias para a qualidade do processo de regeneração do tecido tendinoso. A aplicação da terapêutica indicada para cada grupo iniciou logo após a cirurgia, com intenção de aumentar o número de mastócitos no local da lesão, conforme descrito por Silveira e Lopes (1991).

O tecido de granulação formado em 3 a 5 dias na fase proliferativa, característico do processo cicatricial, provém das células endoteliais vasculares, assim como da atuação fibroblástica que se inicia 24 horas após a agressão. Pode-se especificar quatro componentes específicos: angiogênese, proliferação e migração dos fibroblastos, deposição da matriz extracelular e remodelamento (TAVARES, 2002).

Durante o período da formação de tecido de granulação, os fibroblastos são denominados de miofibroblastos por possuírem características estrutural, funcionais, imunológicas e químicas diferentes. Estes aparecem num período médio de 5 dias após a lesão, e dentro de 21 a 60 dias sua população é diminuída reaparecendo apenas na fase de maturação que corresponde de 60 a 360 dias (BAXTER, 1994).

A migração e proliferação dos fibroblastos, parcialmente derivados dos macrófagos inflamatórios, são desencadeadas por fatores de crescimento e citocinas fibrogênicas (CONTRAN et al., 2000).

Pesquisa realizada por Gigante et al. (1996), distinguiu as fases do processo de cicatrização do tendão do calcâneo em ratos. Averiguou-se que a fase de inflamação aguda finaliza-se em torno do sétimo dia após a lesão, assim como a fase proliferativa (7 à 15-20 dias), é caracterizada pela angiogênese e posterior proliferação fibroblástica, desorganização da matriz, síntese de fibras de colágeno, sendo estas de diâmetro mais espessado (400 - 600 Å) do que na fase prévia, fibras elásticas imaturas em máxima concentração (30%) e fibras colágenas ao longo do eixo axial longitudinal do tendão com três semanas após a

lesão. A fase de remodelamento ocorre 21 dias após a lesão, sendo que com 6 a 8 semanas o tendão assume um aspecto normal havendo ainda a presença de fibras de colágeno relativamente imaturas. A fase de remodelamento é caracterizada por um aumento na organização da matriz, diminuição do número de células, retorno vascular e nervoso normal, diâmetro das fibras de colágeno de 800 – 1000 Å e considerável aumento na deposição de elastina pelas fibras elásticas.

Enwemeka (1989) rela que as fases importantes para uma melhor reparação tecidual se darão na proliferação e remodelamento, onde ocorre o processo de síntese de fibras de colágeno e alinhamento das mesmas no eixo longitudinal do tendão.

2.6 Espectroscopia molecular

A espectroscopia tem por objetivo determinar os níveis de energia de átomos e moléculas após a interação da radiação eletromagnética com a matéria. A partir das medidas que determinam as posições relativas dos níveis energéticos, teremos a diferença entre as mesmas. Para determinação da região espectral das moléculas, faz-se necessário observar-se os tipos de níveis energéticos envolvidos: vibracionais e/ou rotacionais e eletrônicos, sendo estes determinantes na mensuração das vibrações moleculares por variadas técnicas, onde podem ser citadas a Espectroscopia de Absorção Eletrônica, Espectroscopia de Fluorescência, Espectroscopia de Absorção no Infravermelho, Espectroscopia Raman entre outras (SALA, 1995).

2.7 Espectroscopia Raman

As técnicas que envolvem espectroscopia fornecem dados tidos como identificadores detalhados dos níveis de energia de cada material. Os espectros eletrônicos de Fluorescência são constituídos por bandas largas usualmente desestruturadas. A espectroscopia vibracional Raman se difere das demais por

proporcionar um melhor e mais rico detalhamento tido como uma “impressão digital” das moléculas, sendo provido de níveis de energia vibracional frente aos níveis de energia eletrônica (FARIA; SANTOS,1997).

Avanços tecnológicos significativos vêm sendo obtidos com a finalidade de aquisição de instrumentos cada vez mais sensíveis e de menor custo. A Espectroscopia Raman, que é utilizada na determinação da composição química de materiais diversos, por mais de 70 anos vem despertando o interesse de pesquisadores nas mais diversas áreas do conhecimento (ANGEL; CARRABBA; COONEY, 1995).

2.7.1 Espalhamento Raman

O fenômeno no qual a luz espalhada possui o mesmo comprimento de onda que a luz incidente sobre um material é denominado como espalhamento elástico ou *Rayleigh* (Figura: 4(a)). Porém, uma pequena proporção desta luz espalhada apresenta comprimento de onda diferente ao da luz incidente e a este fenômeno denominamos de espalhamento inelástico ou Raman. Nele, após a interação com luz incidente, a matéria é levada a um nível de energia excitado, o fóton espalhado perde energia, proporcionando o espalhamento em menores frequências. Estas frequências Raman são denominadas de Stokes (Figura: 4 (b)). Cada tipo molecular possui características próprias com relação à quantidade de energia para a sua excitação, sendo esta determinante na mudança de frequência. O espalhamento *Rayleigh* ou elástico é uma frequência conhecida que pode ser anulada com um filtro, isolando então as frequências espalhadas inelásticas identificando-as assim através do espectro Raman (BITAR, 2004).

No processo de espalhamento Raman a radiação que interage com a molécula é espalhada com frequência ligeiramente modificada, sendo esta correspondente à diferença de energia entre dois estados vibracionais. Pode também vir a acontecer à interação inelástica, levando a molécula a um nível de energia excitada e posteriormente ocasionando perda de energia do fóton, sendo este espalhado com frequências menores que a da luz incidente. Estas

freqüências Raman são denominadas de linhas *Stokes*. Quando temos matéria no estado excitado, a perda de energia pode ser ocasionada pela colisão da mesma com um fóton fazendo com que os elétrons sofram uma transição para um estado de energia mais baixa. No caso descrito estas freqüências Raman são denominadas de *Anti-Stokes* (Figura: 4(c)) (SALA, 1995).

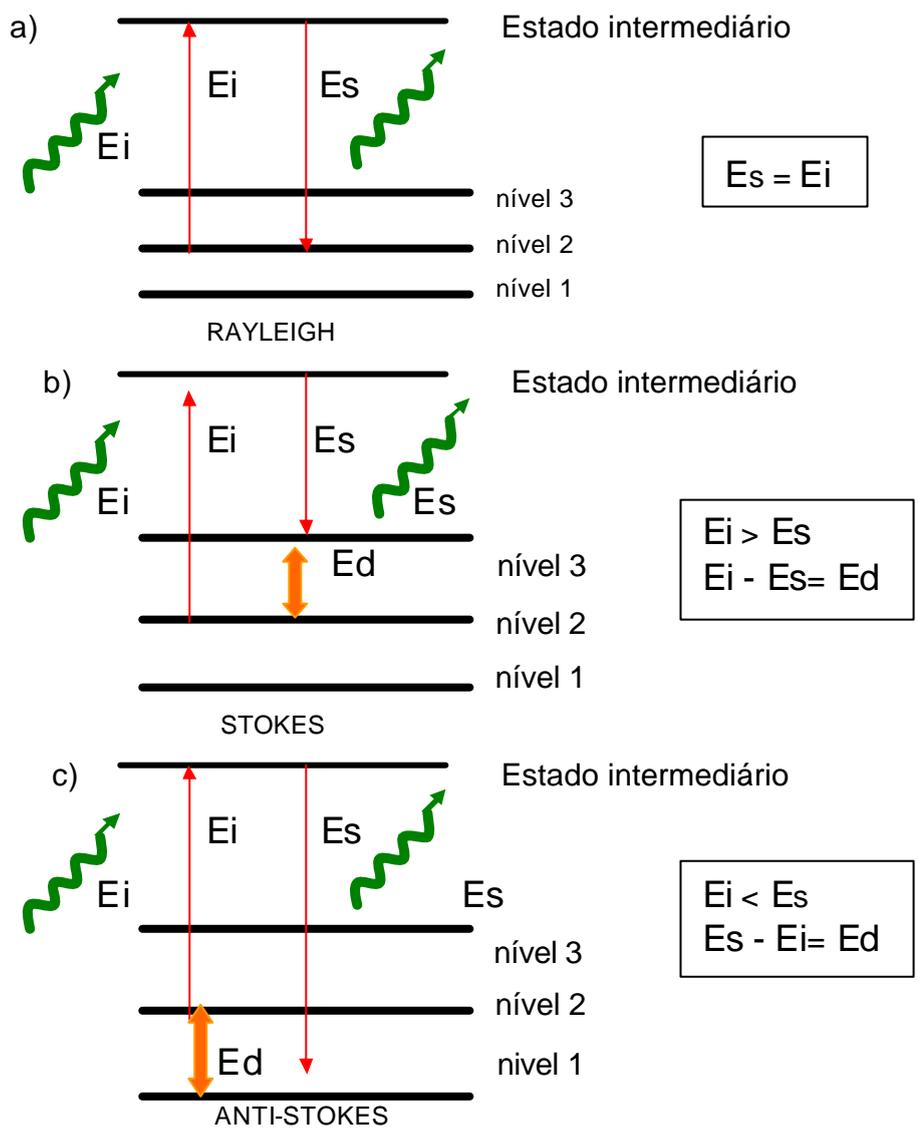


Figura 4: Ilustração esquemática de espectros típicos com luz espelhada: (a) Espalhamento Rayleigh - $E=0$. Espalhamento Raman: (b) Stokes - E =negativo e (c) Anti-Stokes - E =positivo

2.7.2 Polarizabilidade

A variação da polarizabilidade da molécula durante a vibração se faz necessária para um modo vibracional ser denominado como Raman ativo, ou seja, o momento de dipolo a ser considerado é induzido pela radiação eletromagnética. O feixe de luz monocromática polarizada produz um campo elétrico que oscila na mesma freqüência da onda passante, promovendo uma deformação da nuvem eletrônica molecular, a molécula então emite fótons para todas as direções como uma fonte de radiação própria (SALA, 1995).

A excitação elementar de cada amostra determina a freqüência Raman. Como podemos verificar na figura: 5, o espalhamento inelástico (Raman) ocorre quando a molécula muda a sua polarizabilidade por uma mudança do centro de sua carga (BITAR, 2004).

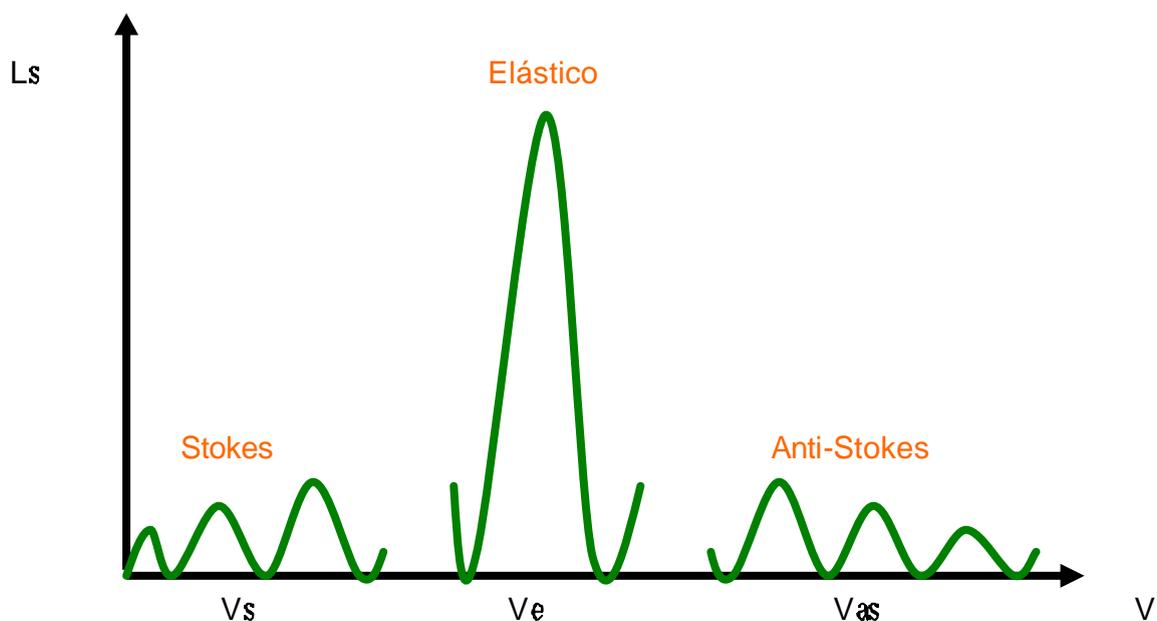


Figura 5: Espectro Raman esquemático mostrando os processos *Rayleigh* (L_e), *Anti-Stokes* (L_{as}) e *Stokes* (L_s)

Após o espalhamento da luz, esta é coletada, e posteriormente transformada em um espectro que demonstra as alterações de freqüência. Diferenças no grupo molecular podem ser visualizadas, uma vez que as bandas

são sensíveis às variações das estruturas moleculares (SILVEIRA JR., 2001; BALL, 2001).

2.7.3 Instrumentação em Espectroscopia Raman

A utilização de luz laser como fonte de excitação Raman é muito adequada devido às propriedades de coerência, monocromaticidade e polarização.

A classificação da Espectroscopia Raman pode ter como base sua fonte de luz, podendo ser ultravioleta (UV), visível (Vis) e Infravermelha (IV). Uma vez que as fontes de excitação no Infravermelho possuem a característica física de diminuir virtualmente a emissão de autofluorescência, esta tem sido a fonte mais utilizada nas áreas biológicas e biomédicas. Comumente, os lasers utilizados são os de Neodímio (Nd:YAG) e Titânio-Safira (Ti:Safira) (SALA, 1995).

Uma outra forma de classificação da Espectroscopia Raman se faz pela tecnologia empregada, podendo ser: Transformada de Fourier (FT-Raman) ou de sistemas dispersivos. Dentre as inúmeras vantagens do sistema FT-Raman, pode-se citar a capacidade de coletar vários comprimentos de onda em um curto espaço de tempo (*multiplex*), o mesmo não é possível no sistema dispersivo, porém este se popularizou após o sistema de CCD (*Charge Couple Device Detector*) que se traduz num alto ganho de eficiência quântica (SCHRADER, 1989; SCHRADER, 1995; SCHRADER; MOORE, 1997; SCHRADER et al., 1997).

2.7.4 Espectroscopia FT-Raman

Através da técnica de FT-Raman, as frequências do espalhamento Raman são agrupadas por um interferômetro, em um único sinal. Ele é composto por um separador de feixes que divide o espalhamento Raman em dois feixes ópticos, sendo que um é transmitido e o outro refletido. A sua estrutura é formada por lentes coletoras, prismas, espelhos e um detector de germânio com alta sensibilidade próxima ao infravermelho, sendo o aparelho refrigerado por nitrogênio líquido. O espalhamento elástico ou *Rayleigh* é eliminado através de um

filtro, não permitindo que este chegue ao detector, fazendo com que apenas o espalhamento inelástico ou efeito Raman seja detectado. Elementos ópticos que se movem, selecionando 90° ou 180° também fazem parte do equipamento, com a finalidade de posicionar a amostra de forma adequada (BRUKER, 1994).

A transformada discreta de Fourier Bi-dimensional é um forte instrumento matemático para processamento digital de imagens, transformando um dado que se encontra em domínio do tempo e espaço (x,y) em domínio da frequência (FONSECA NETO; ALCO CER, 1998).

Segundo Ferraro (1999) a técnica de FT-Raman é a técnica mais eficaz quando o material a ser analisado é constituído de matéria fluorescente ou de substâncias fluorescentes associadas (BRUKER, 1994). Com o uso do laser Nd:YAG a fluorescência é diminuída devido ao seu maior comprimento de onda (1.064nm), que traduz-se em menor energia e conseqüente redução nas transmissões eletrônicas (BITAR, 2004).

Finalmente, o espectro é produzido, a partir da radiação com a luz laser e posterior leitura do espalhamento inelástico ou Raman. São feitos espectros que funcionam como identificadores de cada molécula e estes são armazenados em um computador acoplado ao sistema FT-Raman (FERRARO, 1999).

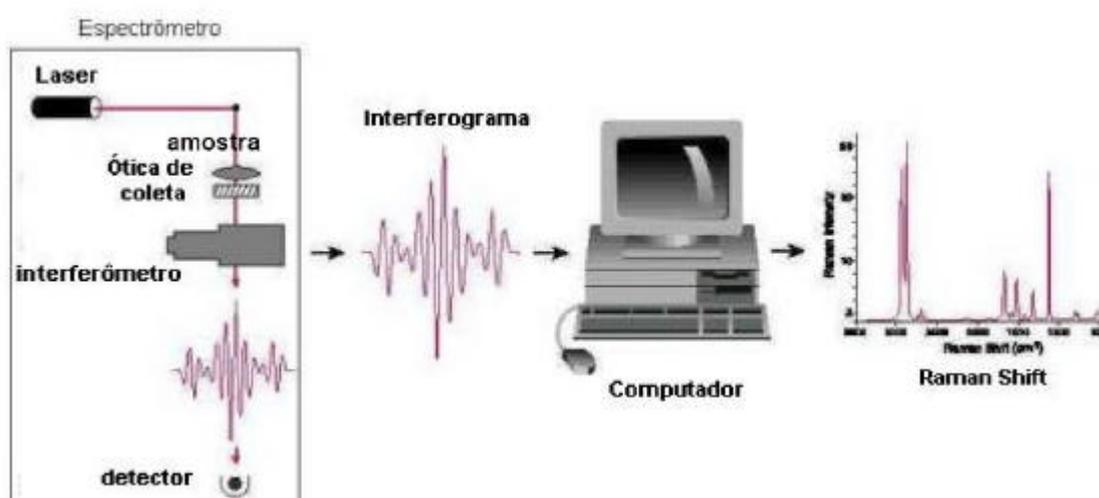


Figura 6: Esquema de BRUKER mostrando o sistema de coleta FT-Raman

A técnica necessária para o procedimento com o aparelho FT-Raman, traduz-se de forma simples, onde uma dada amostra é devidamente colocada em um suporte e posicionada no aparelho de forma a luz laser incidir (Site: Thermo Nicolet). Logo após, a luz espalhada, que possui uma grande gama de informações relacionadas à estrutura bioquímica molecular do tecido, é coletada e então através da transformada de Fourier os espectros são formados, possibilitando o direcionamento de estudos mais complexos em doenças que podem estar em seu estado inicial ou de desenvolvimento.

2.7.5 Aplicabilidade da Espectroscopia Raman na área biológica

A evolução de tratamentos, assim como diagnósticos na área da saúde, faz com que técnicas cada vez mais apuradas sejam essenciais na busca de soluções. A junção dos conhecimentos nas áreas Biológicas e Exatas faz com que a técnica de Espectroscopia Raman se traduza em um instrumento forte de análise, que propicia em um futuro, a detecção, monitoramento e estudo de doenças humanas *in vivo*, levando em consideração esta ser uma técnica que oferecer diagnóstico em tempo real (LONDON et al., 1992; FRANK et al., KELLER et al., 1994; FELD et al., 1995; MAHADEVAN-JANSEN; RICHARDS-KORTUM, 1996; MANOHARAN, 1998; HATA et al., 2000; PAPPAS, 2000; STONE et al., 2000; HAKA et al., 2002; MOLCKOVSKY et al., 2003; CROW et al., 2004; GNIADCKA et al., 2004; STONE et al., 2004).

Quando é buscado o ideal de uma técnica de diagnóstico, este se traduz como sendo duas de suas bases, características de menor caráter invasivo, bem como menor tempo de diagnóstico. Entretanto, quando se relata sobre análises histopatológicas, estas implicam em um tecido, que de forma cirúrgica foi retirado, para que se pudesse então proceder com a análise e posteriormente com o seu diagnóstico, que é dependente do grau de diferenciação celular, anormalidades celulares e nucleares, invasão, fibroses, dentre outros (CONTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000; HONDERMARCK et al., 2002).

A utilização da técnica de FT-Raman se deu na década de 80, quando em aplicações biomédicas (OZAKI et al., 1987; LAWSON et al., 1997).

Os microorganismos, as células vegetais e animais, humanos; ou até mesmo os fluidos corporais, se traduzem em espectros de alta especificidade quando se trata de FT-Raman no Infravermelho Próximo (FT-NIR Raman) e FT-Raman no Infravermelho (FT-IR). Os espectros extraídos nas condições acima descritas são capazes de discriminar diversos subgrupos e doenças, assim como propiciar o estudo da interação celular com diferentes drogas e estágios patológicos, traduzindo-se em um instrumento de alto poder na área biomédica (MAHADEVAN-JANSEN, 1995; MAHADEVAN-JANSEN; RICHARDS-KORTUM, 1996; MAHADEVAN-JANSEN et al., 1998; MANOHARAN, 1998).

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi investigar o efeito da luz coerente (laser) e não coerente (LED), no processo de reparação tendínea em ratos.

3.2 Objetivos específicos

- Análise pela Espectroscopia FT- Raman.
- Análise histopatológica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

Neste estudo foram seguidos as premissas da COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e protocolos aprovados pelo CRMV (Conselho Regional de Medicina Veterinária), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade do Vale do Paraíba (CEP – UNIVAP) sob protocolo Nº: L220/2005/CEP.

4.2 Tipo de pesquisa

A pesquisa estudada foi de caráter qualitativo e quantitativo, de modo experimental destinada a analisar, evidenciar e confirmar as variáveis de interesse no estudo dos animais a serem investigados.

4.3 Animais

Totalizaram nesta pesquisa um quantitativo de 48 ratos albinos, jovens, machos, pertencentes à linhagem Wistar, com peso médio de 250g, 2 ½ meses de idade, provenientes do biotério da Anilab (Animais de Laboratório), localizado na cidade de Paulínea no estado de São Paulo.

Os animais foram mantidos em gaiolas padrão de polietileno, devidamente etiquetados (Figura: 7).



Figura 7: Gaiola padrão de polietileno, etiquetada com balança de peso.

Os animais foram divididos aleatoriamente em grupos de 5 a 6 animais, sendo mantidos no biotério do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba (IP&D – UNIVAP). Estes foram mantidos em uma sala com temperatura e umidade constante (24°C – 60%) com ciclo de claro/escuro de 12 horas, com água e ração *ad libitum*. Foi respeitado, antes que se iniciasse a pesquisa, um período de ambientalização/adaptação de 7 dias.

4.4 Aparelhos

Com a intenção de estimular o tecido, foram utilizados 3 aparelhos, sendo 2 de luz coerente *laser* de baixa potência com comprimentos de onda (780nm e 904nm) e um aparelho de luz não coerente (LED – *Light Diode Estimulation*) com comprimento de onda de 640nm.

Beckerman et al., (1992 *apud* CANTÚ, 2004) relata que a distância entre a pele e o equipamento, a divergência do feixe, reflexão, transmissão, dispersão, absorção e profundidade do tecido que se deseja tratar são fatores importantes

que causam controvérsias a respeito da dosagem. Por estes motivos, no presente estudo, optou-se pela irradiação com contato da fonte de emissão de radiação e a pele do animal.

Seguindo Veçoso (1993) e Baxter (1994), o procedimento para aplicação da terapia se deu de forma pontual, onde o feixe emitido por cada aparelho, cobria por inteiro o sítio da lesão (faixa tenotomizada). As canetas foram posicionadas a 90° do eixo tendíneo com intenção de otimizar a aplicação evitando perdas de energia e melhor contato com a perna do animal.

Antes do início do experimento, características dos aparelhos como potência e tempo de emissão foram aferidos no Laboratório de Análise de Biomodulação Tecidual do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP) sob a responsabilidade da Prof^a. Dr^a. Renata Amadei Nicolau.

O primeiro equipamento foi um GaAs-904nm, Endophoton – modelo LLTO107 fabricado pela KLD (Biosistemas Equipamentos Eletrônicos LTDA), (Figura: 8), o qual possui caneta em aço inox com comprimento de onda de 904nm (invisível), pico de potência de 45W, potência média de 50mW e área do *spot* (S) de 0,3cm², com controle de disparo do laser.

Este aparelho possui alimentação de 110 a 220 V – 50/60 Hz, e ajuste digital de densidade de energia em J/cm².



Figura 8: Aparelho laser KLD, caneta aço inox com comprimento de onda de 904nm e par óculos para proteção.

O segundo equipamento é o *Twin laser* (Figura:9) que possui com meio ativo semiconductor de GaAlAs-780nm, com registro na ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária): 80051420007. Este é fabricado pela MM Optics LTDA, o qual possui caneta *laser* com comprimento de onda de 780nm, potência útil máxima de 70mW, área do *spot* (S) de 0,3cm², com controle de disparo do *laser*.

Este aparelho possui alimentação de 95 a 240 V – 50/60 Hz, com o tempo digital pré-programável, ponta de aplicação padrão e ajuste digital de densidade de energia em J/cm².



Figura 9: Aparelho laser MM Óptics com meio ativo de GaAIAs e caneta com comprimento de onda de 780nm.

O terceiro e último equipamento (Figura: 10), é um LED, fabricado pela Microdont, o qual possui caneta com o pico da banda de comprimento de onda em 640nm (visível - vermelho), potência média de 116mW e área do *spot* (S) de 0,5cm², com controle digital de disparo.

Este aparelho possui alimentação de 110 a 220 V – 50/60 Hz, e ajuste digital de densidade de energia em J/cm².



Figura 10: Aparelho LED Microdont, caneta com comprimento de onda de 640nm e par de óculos para proteção.

4.5 Grupos experimentais

Os 48 ratos foram divididos de forma aleatória em 8 grupos (Tabela: 1).

O grupo G5B trata-se de um grupo controle, formado pela dissecação do tendão do calcâneo da pata esquerda, que não sofreu procedimento cirúrgico e/ou qualquer tipo de tratamento, do grupo G4B.

Considerando que a densidade de energia indicada para biomodulação tecidual situa-se entre 4 e 6 J/cm² (CRUAÑES, 1984; COLLS, 1984), no presente estudo utilizou-se 4 J/cm² tanto para a terapia com laser quanto com LED. Para o cálculo de densidade de energia para as diferentes terapias empregou-se a equação abaixo:

$$DE \text{ (J/cm}^2\text{)} = \frac{P \text{ (W)} \times t \text{ (s)}}{\text{Área (cm}^2\text{)}}$$

Tabela 1: Relação da quantidade de animais, grupos, procedimento cirúrgico, tratamento e sacrifício.

Grupo (n=6)	Procedimento cirúrgico	Tratamento	Sacri�cio dias (PO)	
			7 ^o	15 ^o
G1A	Tenotomia	LED (640nm)	X	
G1B	Tenotomia	LED (640nm)		X
G2A	Tenotomia	Laser (780nm)	X	
G2B	Tenotomia	Laser (780nm)		X
G3A	Tenotomia	Laser (904nm)	X	
G3B	Tenotomia	Laser (904nm)		X
G4A	Tenotomia	*Controle negativo	X	
G4B	Tenotomia	*Controle negativo		X
G5B	–	**Controle		X

*Controle negativo: grupo submetido a tenotomia e simula o de tratamento obedecendo há um tempo médio. **Controle: grupo não submetido a tenotomia ou qualquer tratamento. PO: Pós Operatório.

4.6 Procedimento cirúrgico

O procedimento cirúrgico constou de uma tenotomia na porão média, entre a origem miotendínea e a inser o osteotendínea, na pata direita de todos os animais.

Para a realiza o da tenotomia, os animais receberam por via sub-cutânea, um pré-tratamento com atropina –analgésico (Figura: 11(A)), na dose de 0,04ml para cada 100g de peso corpóreo, na perna esquerda, aguardando repouso de 15 minutos para o procedimento anestésico. (SCHANAIDER; SILVA, 2004)

Foi administrada droga anestésica por via intramuscular, na perna esquerda, cloridrato de cetamina 10% (Syntec) (Figura: 11(B)), utilizando a dose de 0,1ml para cada 100g de peso corpóreo e Cloridrato de xilazina 2% (Syntec) (Figura: 11 (B)), com dose de 0,1ml para cada 100g (MASSONE, 1994), sendo que para cada animal, foi utilizada uma seringa de insulina de 1ml.

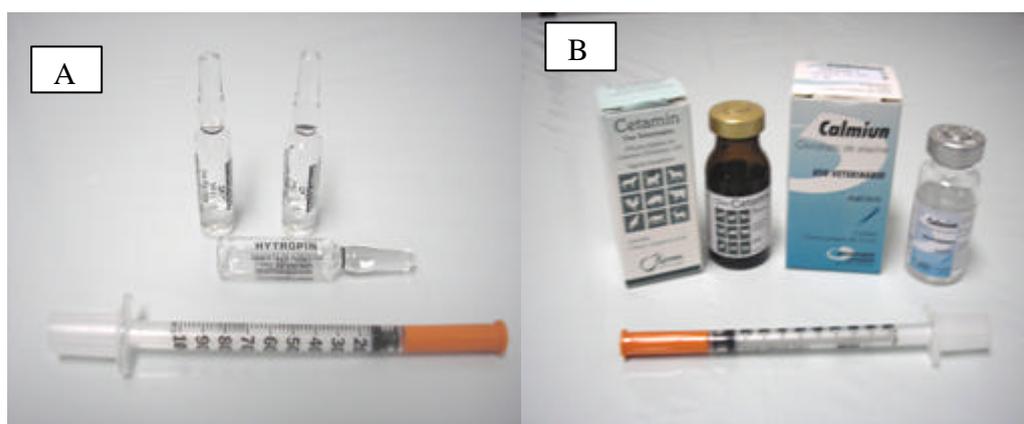


Figura 11: Atropina (A), Cloridrato de cetamina 10% e cloridrato de xilazina 2% (B).

Passados aproximadamente 10 minutos, o animal foi colocado em decúbito dorsal e foi realizado o processo de tricotomia (Figura: 12(A)). Depois de colocado o campo cirúrgico houve a limpeza com álcool iodado 2% na região posterior do terço distal da perna do rato (região referente ao tendão do calcâneo direito) e realizada uma incisão de aproximadamente 1cm (Figura: 12(B)), para exposição do tendão do calcâneo que posteriormente foi tenotomizado transversalmente (Figura: 12(C)). Dando prosseguimento foi realizada sutura cutânea (Figura: 12 (D)), com fio monofilamento, preto, estéril, não absorvível, classe II de *nylon 6-0* (Shalon®), e assepsia com álcool iodado 2%.

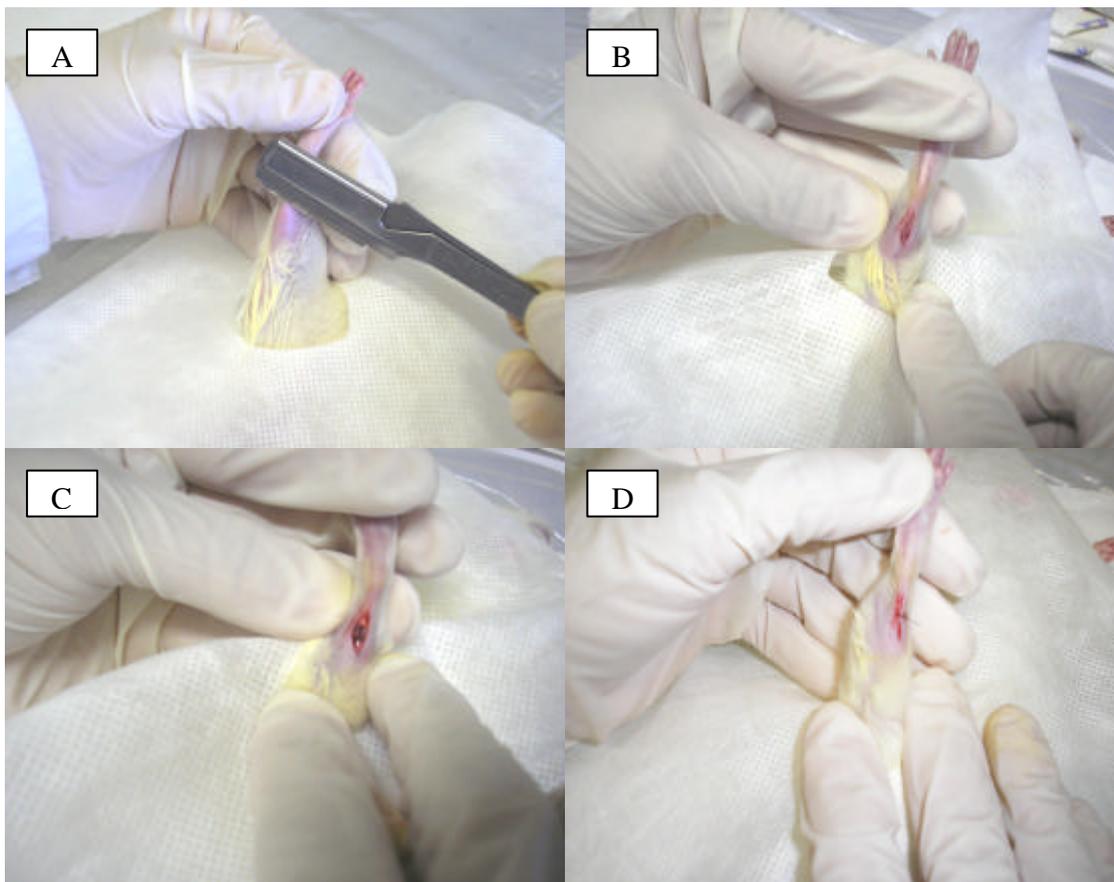


Figura 12: Tricotomia (A), incisão com exposição do tendão do calcâneo (B), tenotomia (C) e sutura (D).

Depois de terminado todo o procedimento cirúrgico, os animais foram submetidos à profilaxia com uso de Pentabiótico (Fort Dodge®) de amplo-espectro (Figura: 13), via intramuscular profunda, em dose única de 0,02ml para cada 100g do peso corpóreo.



Figura 13: Pentabiótico (Fort Dodge®) de amplo-espectro.

4.7 Intervenção terapêutica experimental

O tratamento de cada animal teve início meia hora após a finalização do procedimento cirúrgico de cada grupo (Tabela: 2). Após a primeira aplicação da terapia (LED, Laser ou simulação de terapia nos grupos controle) esta foi instituída a cada 24h, tendo-se o cuidado para que todos tivessem a mesma manipulação diária em mesmo horário.

Buscando uma homogeneidade na pressão exercida, foi desenvolvido um equipamento denominado como *stopper* (Figura: 14(A)), que se traduz em um aro de metal, sendo este fixado a cada caneta de forma alinhada a ponta da mesma.

Para a realização do procedimento terapêutico, os animais foram posicionados em decúbito ventral, numa bancada devidamente coberta de tecido não texturizado, com imobilização manual da pata direita para aplicação da terapêutica indicada (Figura: 14(B)), de forma pontual e em contato direto com a incisão. As canetas dos equipamentos foram posicionadas em uma base fixa.

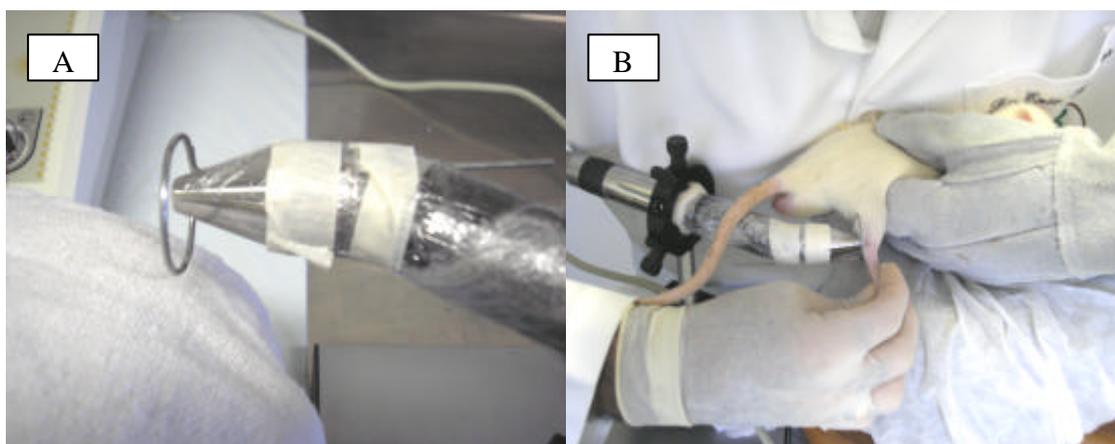


Figura 14: Caneta laser com *stopper* fixado (A), aplicação de laserterapia com imobilização manual do animal (B).

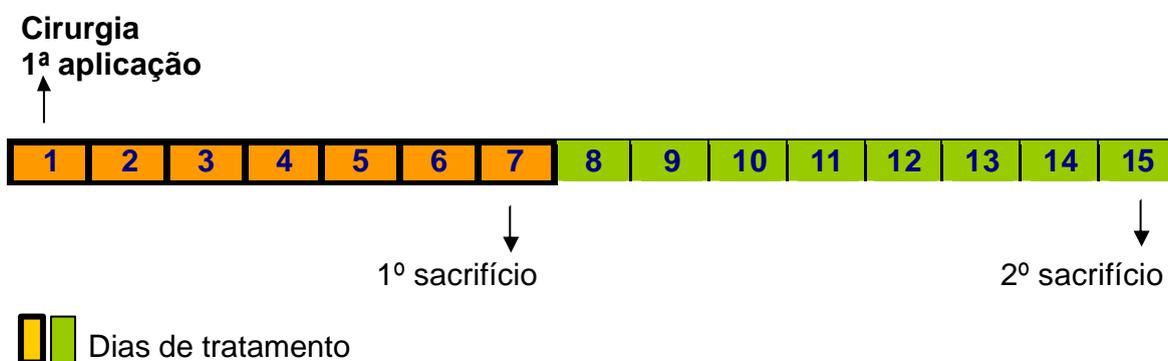
Tabela 2: Relação de grupos formados, tratamento, dose e tempo.

Grupo (n=6)	Tratamento	Dose (J/cm²)	Tempo (segundos)
G1A	LED (640nm)	4	17
G1B	LED (640nm)	4	17
G2A	Laser (780nm)	4	30
G2B	Laser (780nm)	4	30
G3A	Laser (904nm)	4	24
G3B	Laser (904nm)	4	24
G4A	*Controle negativo	-	24
G4B	*Controle negativo	-	24
G5B	**Controle	-	-

*Controle negativo: grupo submetido à tenotomia e simulação de tratamento obedecendo a um tempo médio. **Controle: grupo não submetido à tenotomia ou qualquer tratamento. PO: pós-operatório

4.8 Sacrifício dos animais

O sacrifício dos animais se deu seguindo o esquema abaixo:



Os animais foram sacrificados no 7º e 15º dia PO. Para tanto, foi utilizando o mesmo procedimento anestésico realizado na cirurgia da tenotomia.

Depois de anestesiados, os animais receberam aplicação via intracardíaca de anestésico Tiopental Sódico (Cristália), na dose de 0,05ml para cada 100g de peso corpóreo. Após 5 minutos, foi realizada a aplicação do cloreto de potássio 19,1% (Equiplax), via intracardíaca com dose única de 0,4ml para cada 100g de peso corpóreo.

4.9 Preparação das amostras para análise pela Espectroscopia Raman

Após o sacrifício, foi realizada a remoção por dissecação dos tendões da pata direita preconizando a primeira incisão na região osteotendínea, e a segunda incisão na inserção miotendínea. Os animais do grupo G4B tiveram os tendões da pata esquerda dissecados formando o grupo controle G5B. Após a dissecação, os tendões foram devidamente identificados e armazenados em tubos para criogenia Nalgene®, seguidamente acondicionados em nitrogênio líquido a 196°C, descongelados apenas no momento da realização da Espectroscopia FT-Raman no Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica (LEVB), sob responsabilidade do Dr. Herculano da Silva Martinho, situado no Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), na cidade de São José dos Campos, São Paulo.

4.10 Realização da Espectroscopia

Foi utilizado neste estudo o equipamento FT-Raman *Spectrometer* RFS 100 - Bruker ® Alemanha, instalado no LEVB (Figura: 15).



Figura15: Equipamento FT-Raman *Spectrometer*RFS 100 - Bruker ®.

As amostras foram descongeladas de forma individual, à temperatura ambiente, e conservadas em solução fisiológica a 0,9% (ASTER®) até o momento de ser posicionada no FT-Raman para coleta de espectros. Foi estipulado um tempo máximo de descongelamento de 20 minutos, com a finalidade de homogeneidade metodológica e para evitar desidratação das amostras.

Dentre os componentes do equipamento FT-Raman há um laser de alta intensidade com comprimento de onda de 1064nm, com potência máxima de 500mW, ajustável de acordo com as características de cada amostra. Para este experimento o *laser* Nd:YAG foi ajustado com a potência de 220mW para que não houvesse aquecimento ou degradação das amostras.

A geometria de espalhamento foi de 180° devido ao alto grau de rejeição contra o Espalhamento *Rayleigh* (Figura: 16).

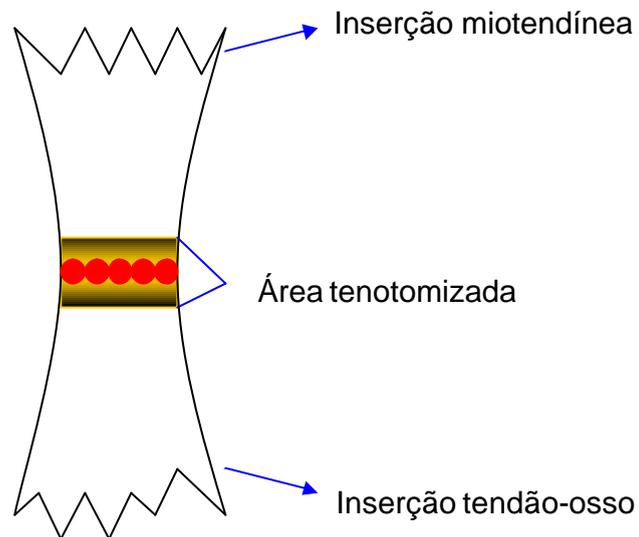


Figura 16: Geometria de espalhamento de 180° do FT-Raman *Spectrometer* RFS 100 com porta amostras de alumínio.

Os parâmetros do equipamento, tais como: potência do laser, abertura do feixe, transformada de Fourier, aquisição do espectro, gráfico em três dimensões, análises quantitativas e armazenamentos de dados em forma de bibliotecas, foram ajustados a partir do *software* OPUS versão 4.2 Copyright © *Bruker Optik* GmHb 1997-2002 instalado no FT-Raman *Spectrometer* RFS 100.

O procedimento com o aparelho FT-Raman *Spectrometer* RFS 100, se faz de forma simples e eficaz. Este equipamento é dotado de um compartimento para amostras de fácil acesso, sendo este fechado por uma portinhola que evita a interferência de luzes não desejadas. Engrenagens independentes possibilitam que o laser seja posicionado de forma ideal, a partir de um controle remoto conectado ao equipamento. As amostras foram colocadas em um porta-amostras

de alumínio (Figura: 16) seguidamente posicionadas no aparelho. Foram obtidos 5 espectros Raman extraídos a partir de 200 varreduras, em 5 pontos diferentes ao longo da área seccionada, com a tenotomia em procedimento cirúrgico já descrito (Figura: 17).



- Pontos onde foram coletados espectros Raman para posterior análise.

Figura 17: Ilustração do tendão, mostrando inserção miotendínea, área tenotomizada, 5 pontos de coleta de espectroscopia FT-Raman e inserção tendão-osso.

Os parâmetros do equipamento FT-Raman foram ajustados, conforme a tabela 3 para melhor aquisição dos espectros das amostras.

Tabela 3: Parâmetros do equipamento FT-Raman *Spectrometer* RFS 100.

Parâmetro de aquisição	
Espera antes das medidas	10 segundos
Espera para estabilização	5 segundos
Número de varreduras	200
Resolução	4 cm ⁻¹
Tempo Total de Varredura (médio)	30 segundos
Parâmetros ópticos	
Abertura do feixe do Laser	5.0 mm
Potência do Laser na amostra	220 mW

4.11 Procedimento pós Espectroscopia Raman

Depois de finalizadas as coletas dos espectros Raman de cada amostra, estas foram acondicionadas separadamente em frascos devidamente identificados contendo formol a 10% para fixação e encaminhadas para a análise histopatológica.

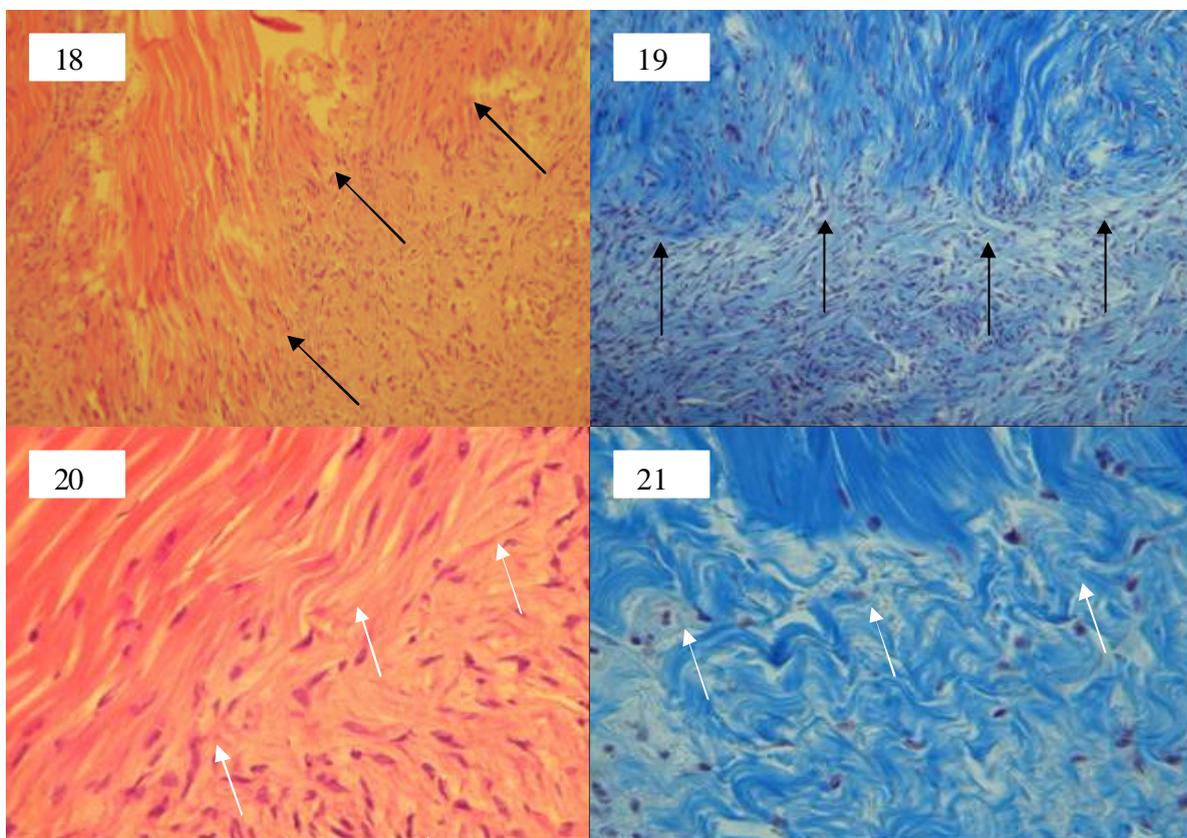
4.12 Avaliação microscópica

Para estudo histopatológico, as amostras foram enviadas para o Laboratório de Análises Patológicas da Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES) sob a responsabilidade do Patologista Dr. Alfredo Maurício Batista de Paula.

Para confecção das lâminas, as amostras foram incluídas em parafina, cortadas em micrótomo *American Optical* em cortes (4 cortes por animal) de 5 µm e coradas com H&E (2 cortes) e Tricrômico de Masson (2 cortes).

Para a morfometria, utilizou-se um microscópio óptico binocular Nikon[®], modelo YS100, com uma ocular com um retículo integrador milimetrado da Zeiss[®]. A análise foi realizada em 12 campos microscópicos, equivalente à uma área de 250 µm², por corte histológico. O local escolhido para morfometria, em todas as

amostras, foi no tecido em regeneração na porção mais proximal das margens do tecido tenotomizado (Figuras: 18 a 21).



Figuras 18 a 21: Interface entre o tecido conjuntivo fibroso denso ordenado típico do tecido tendíneo normal e a área de reparação tecidual pós-tenotomia. As setas negras indicam o local da avaliação do grau de remodelamento tecidual e da contagem de fibroblastos. Em detalhe, as setas brancas indicam o local da análise microscópica (Coloração Hematoxilina & Eosina e Tricrômico de Masson. Aumentos de 100X. Detalhes: aumento de 400X).

Nesse local foram realizadas a contagem de fibroblastos e a gradação do remodelamento do tecido em regeneração. Também foi analisada a ocorrência de focos de calcificações distróficas e de lesões celulares.

A gradação da remodelação tecidual na área tenotomizada foi realizada da seguinte forma:

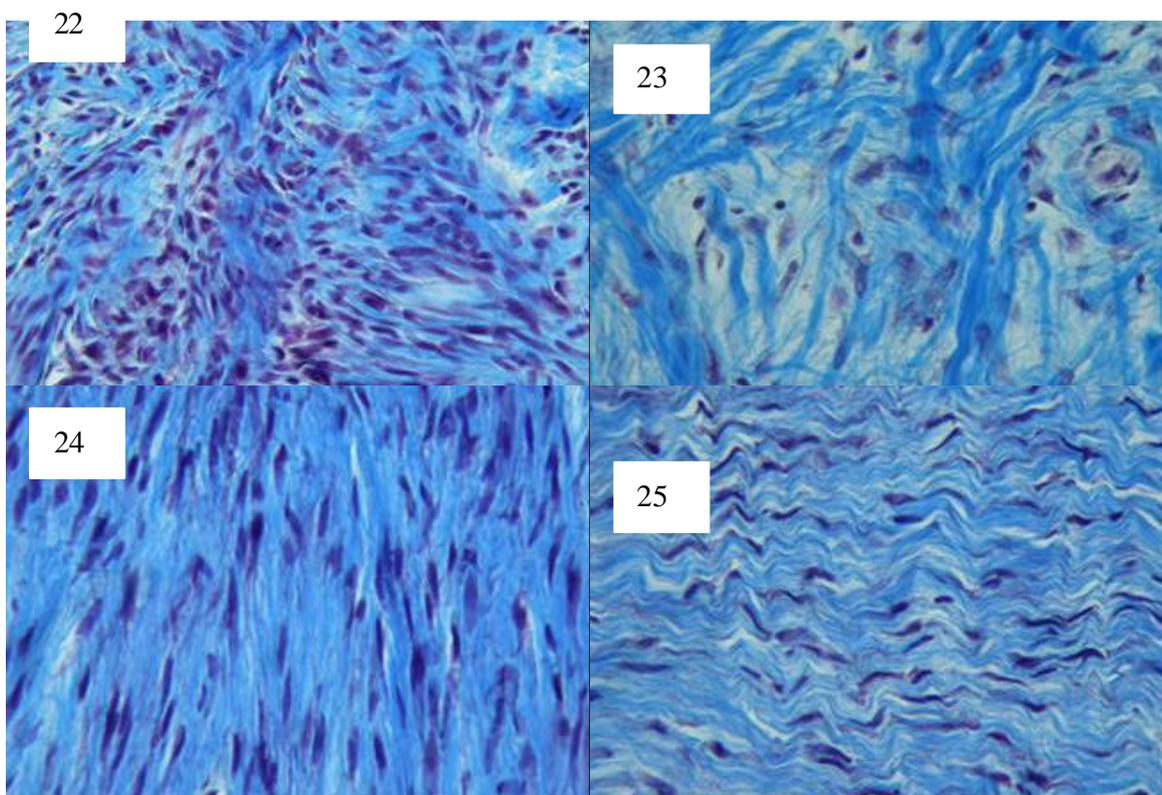
Grupo ⁺ = Ausência de remodelação. Quadro de hiper celularidade associado à presença de fibrilas colágenas delicadas e esparsas sem nenhuma

orientação específica com relação às margens da área tenotomizada. Abundante presença de substância fundamental amorfa. Presença de um infiltrado difuso de células inflamatórias crônicas e células fagocitárias (Figura: 22).

Grupo ⁺⁺ = Remodelação inicial. Quadro de hiper celularidade associadas à presença de fibras colágenas delicadas e espessas, já apresentando sinais de orientação (angulação de até 25°), segundo as margens da área tenotomizada. Diminuição da presença de substância fundamental amorfa. Presença de células inflamatórias crônicas e células fagocitárias (Figura: 23).

Grupo ⁺⁺⁺ = Remodelação intermediária. Celularidade próxima do normal associada à presença de fibras colágenas maduras, dispostas em feixes orientados com as margens da área tenotomizada (angulação 25° a 150°). Ocasional presença de células inflamatórias crônicas e ausência de células fagocitárias (Figura: 24).

Grupo ⁺⁺⁺⁺ = Remodelação completa. Quadro de celularidade normal associada à presença de feixes de fibras colágenas maduras, orientadas de forma paralela (angulação de 180°) com as margens da área tenotomizada. Ausência de células inflamatórias crônicas e de células fagocitárias (Figura: 25).



Figuras 22 - 25: Gradação do grau de remodelamento do tecido fibroso da área em regeneração dos tendões tenotomizados. 22-Gradação +; 23-Gradação ++; 24- Gradação +++; 25- Gradação ++++ (Coloração Tricrômio de Masson. Aumento de 400X).

4.13 Análise por PCA (*Principal Component Analysis*) dos espectros

Os espectros Raman obtidos das amostras de tendões de ratos foram analisados através de um método estatístico de análises de padrões denominado PCA (*Principal Component Analysis*) ou Análise de Componentes Principais muito utilizados em quimiometria. Esta técnica vem sendo utilizada com sucesso nas análises de alterações patológicas com a determinação de parâmetros ópticos de tecidos (OLIVEIRA, 2003).

Trata-se de um método muito útil, quando se possui um grande número de variáveis como nos dados que são disponibilizados através da Espectroscopia. Através desta análise é possível extrair-se as informações espectrais que são relevantes para caracterização do sistema.

Vários são os fatores que podem contribuir alterar bandas espectrais específicas ou até mesmo o espectro como um todo. Dentre estes pode-se citar o manuseio da amostra, variações no espectrômetro, ruídos de fundo, diferenças nos constituintes das amostras dentre outros. Devido aos fatores expostos, técnicas são utilizadas com a finalidade de analisar, selecionar e classificar as informações relevantes de um estudo. A PCA se traduz em uma técnica de compreensão dos dados analisados que separa informações significantes de ruídos ou artefatos, propiciando uma classificação amostral analisada de forma rápida e satisfatória. Trata-se de uma técnica que possibilita o reconhecimento de padrões assim como redução do número de variáveis, facilitando a análise (SILVEIRA-JUNIOR, 2001).

Nesta técnica é utilizado um conjunto de espectros, que são decompostos em componentes principais (PC). Cada PC corresponde a um vetor que contém um subconjunto de características espectrais. Com o intuito de se obter uma

melhor classificação das amostras, os PC's são cruzados, sendo calculados os coeficientes de escala ou *escores* (ES) para cada PC (NUNES, 2003).

Os vetores dos PC's sendo conhecidos fazem com que seja visível a importância de cada um deles na formação do espectro de uma amostra desconhecida. Esta informação pode então ser utilizada na classificação de espectros de categorias pré-determinadas (SILVEIRA-JUNIOR, 2001).

4.14 Análise estatística da histopatologia

Todos os dados que foram coletados na análise histopatológica, foram digitalizados no programa de estatística SPSS® (*Statistical Package for the Social Science*), versão 13.0, para Windows® e posteriormente submetidos a tratamentos estatísticos específicos.

A análise estatística teve como objetivo analisar possíveis relações entre as médias das contagens de fibroblastos sendo realizadas por meio de teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, sendo um teste que usa postos de dados amostrais de 3 ou mais populações independentes, usado para testar hipótese nula de que as amostras independentes provêm de populações com a mesma distribuição, foi também utilizado o teste de Mann-Whitney quando as variáveis qualitativas dicotômicas tinham variâncias heterogêneas. Para a análise do grau de remodelação do tecido cicatricial foram utilizados os testes não paramétricos de Kolmogorov-Smimov sendo este realizado com intenção de verificar se as variáveis quantitativas contínuas apresentavam distribuição normal. O nível de significância considerado nos testes estatísticos foi fixado em 5% ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A deambulação do animal foi preservada mesmo havendo sido realizado o processo cirúrgico de tenotomia de forma unilateral, não sendo observada claudicação, diminuição de força e/ou resistência.

A incisão realizada, para que se procedesse a tenotomia, na região cutânea, tornou-se imperceptível macroscopicamente no 7º dia P.O. em todos os animais tratados com luz.

Diferenças relacionadas ao diâmetro entre os tendões controle e tratados foram observados, sendo o de maior diâmetro os tendões submetidos á terapia a base de luz. Ainda verificando o diâmetro dos tendões, excluindo os grupos controle, foi possível observar que os tendões tratados com luz LED possuíam maior diâmetro.

5.1 Histopatologia

A gradação do remodelamento das fibras de colágeno e o número de fibroblastos nos tecidos tenotomizados apresentaram variações de acordo com os grupos analisados neste estudo.

A gradação do remodelamento das fibras de colágeno do grupo 1A (Figura: 26), mais freqüentemente observada, foi nas fases inicial (++) e intermediária (+++). Foi demonstrado nitidamente um quadro de hiper celularidade associado à presença de fibras colágenas delicadas e esparsas, já apresentando aspectos morfológicos indicativos de organização das fibras colágenas com angulação de até 25º comparada ao tecido tendíneo íntegro, próximo às margens tenotomizada. Notou-se uma diminuição da presença de substância fundamental amorfa e de células inflamatórias crônicas e células fagocitárias.

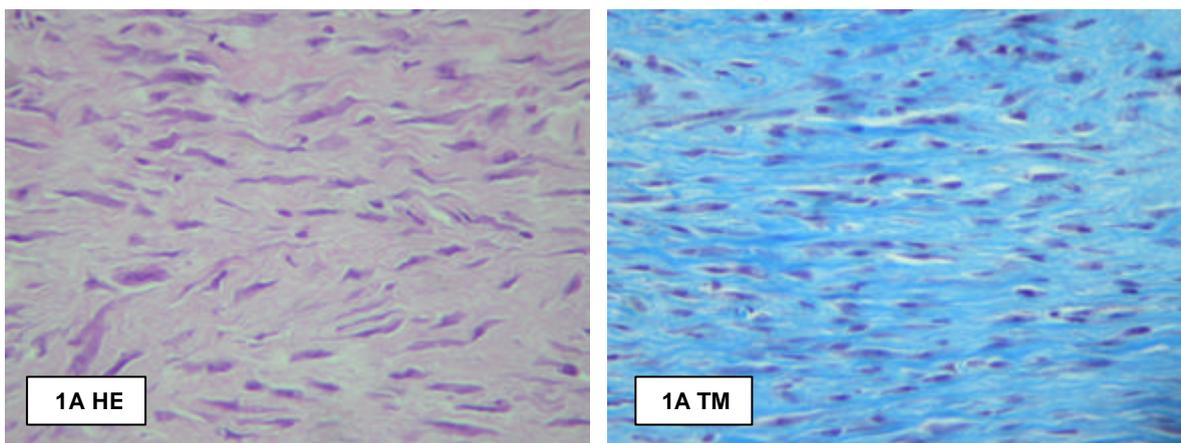


Figura 26: Microscopia do tendão calcâneo de rato tratado com terapia LED (640nm), sacrificado no 7º dia PO, corado com Hematoxilina & Eosina (1A HE) e Tricromio de Masson (1A TM). Corte longitudinal. Aumento de 400X.

No grupo 1B (Figura: 27) foi demonstrado que a gradação do remodelamento das fibras colágenas se encontrava entre fases intermediária (+++) e completa (++++). Foi percebido um quadro de celularidade (fibroblastos) próxima àquela encontrada no tecido tendíneo normal, associada à presença de feixes de fibras colágenas maduras, orientadas com as margens da área tenotomizada em uma angulação de 25° a 150°. Ocasional presença de células inflamatórias crônicas e ausência de células fagocitárias foram percebidas.

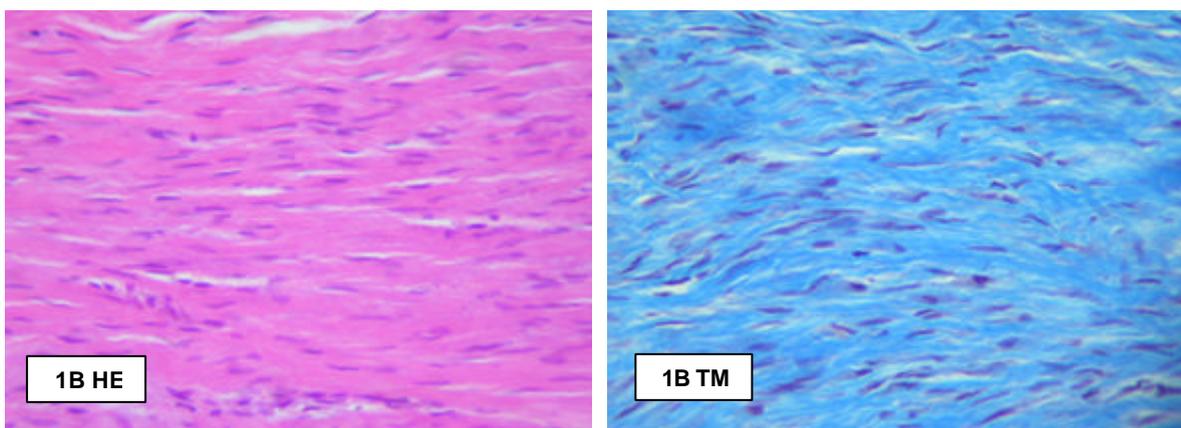


Figura 27: Microscopia do tendão calcâneo de rato tratado com terapia LED (640nm), sacrificado no 15º dia PO, corado com Hematoxilina & Eosina (1B HE) e Tricromio de Masson (1B TM). Corte longitudinal. Aumento de 400X.

Na análise histopatológica do grupo 2A (Figura: 28), foi encontrado um quadro microscópico de ausência de remodelação (+), demonstrando hiper celularidade associada à presença de fibrilas colágenas delicadas e esparsas sem nenhuma orientação específica com relação às margens da área tenotomizada. Abundante presença de substância fundamental amorfa e presença de um infiltrado difuso de células inflamatórias crônicas e células fagocitárias foram evidenciadas.

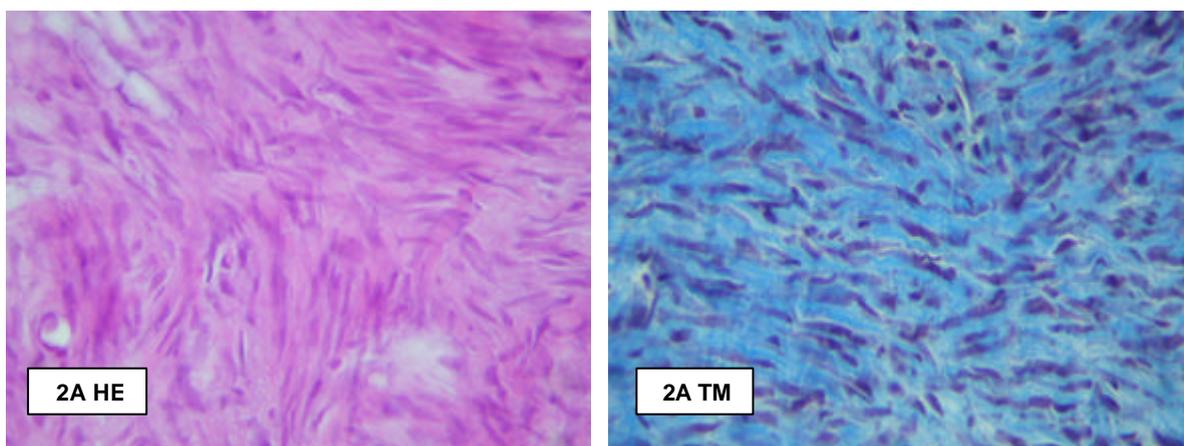


Figura 28: Microscopia do tendão calcâneo de rato tratado com terapia Laser (780nm), sacrificado no 7º dia PO, corado com Hematoxilina & Eosina (2A HE) e Tricromio de Masson (2A TM). Corte longitudinal com aumento de 400X.

O grupo 2B (Figura: 29), apresentou característica que o classifica entre remodelação inicial (++) a intermediária (+++). Celularidade próxima do normais associadas à presença de fibras colágenas delicadas e esparsas já apresentando sinais de orientação (angulação de até 25º), segundo as margens da área tenotomizada. Diminuição da presença de substância fundamental amorfa e presença de células inflamatórias crônicas forma notificadas.

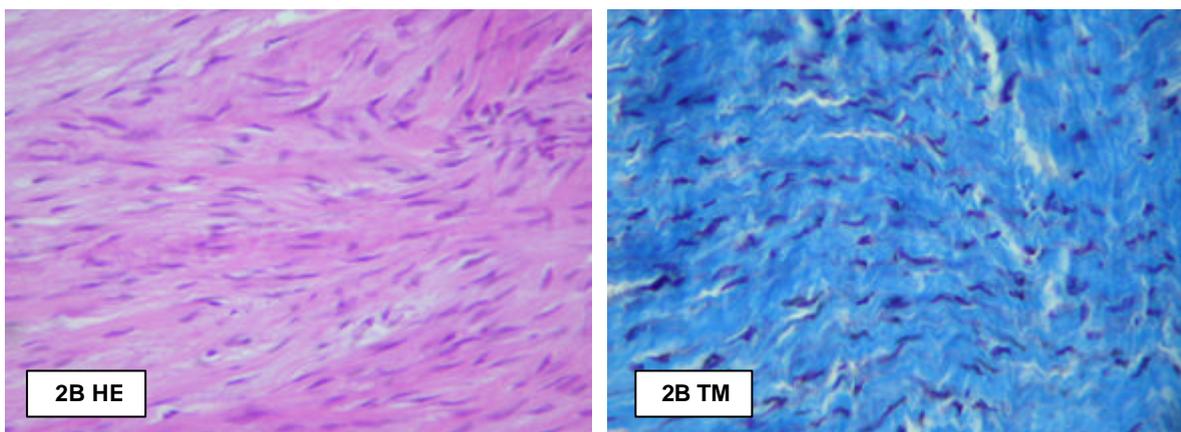


Figura 29: Microscopia do tendão calcâneo de rato tratado com terapia *Laser* (780nm), sacrificado no 15º dia PO, corado com Hematoxilina & Eosina (2B HE) e Tricromio de Masson (2B TM). Corte longitudinal. Aumento de 400X.

Averiguouse que no grupo 3A (Figura: 30) uma fase intermediária entre a ausência de remodelação (+) e remodelação inicial (++) . Foi percebido um quadro de hiper celularidade associadas à presença de fibras colágenas delicadas e esparsas já apresentando sinais de orientação (angulação de até 25º), segundo as margens da área tenotomizada. Notouse diminuição da presença de substância fundamental amorfa e presença de células inflamatórias crônicas e células fagocitárias.

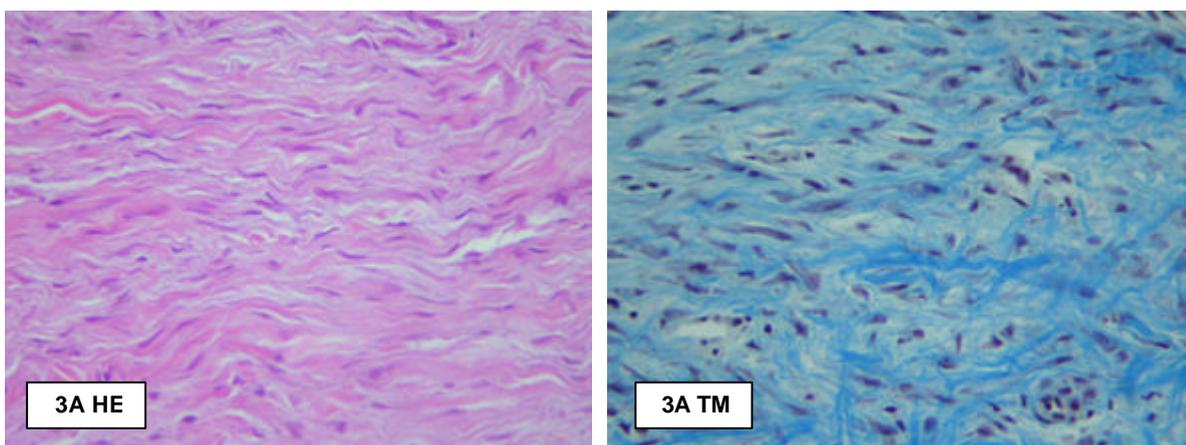


Figura 30: Microscopia do tendão calcâneo de rato tratado com terapia *Laser* (904nm), sacrificado no 7º dia PO, corado com Hematoxilina & Eosina (3A HE) e Tricromio de Masson (3A TM). Corte longitudinal. Aumento de 400X.

No grupo 3B (Figura: 31) notou-se uma fase de remodelação intermediária (+++), revelando celularidade próxima do normal associada à presença de fibras colágenas maduras dispostas em feixes orientados com as margens da área tenotomizada (angulação 25° a 150°). Além disso, foram percebidas células inflamatórias crônicas ocasionais e ausência de células fagocitárias.

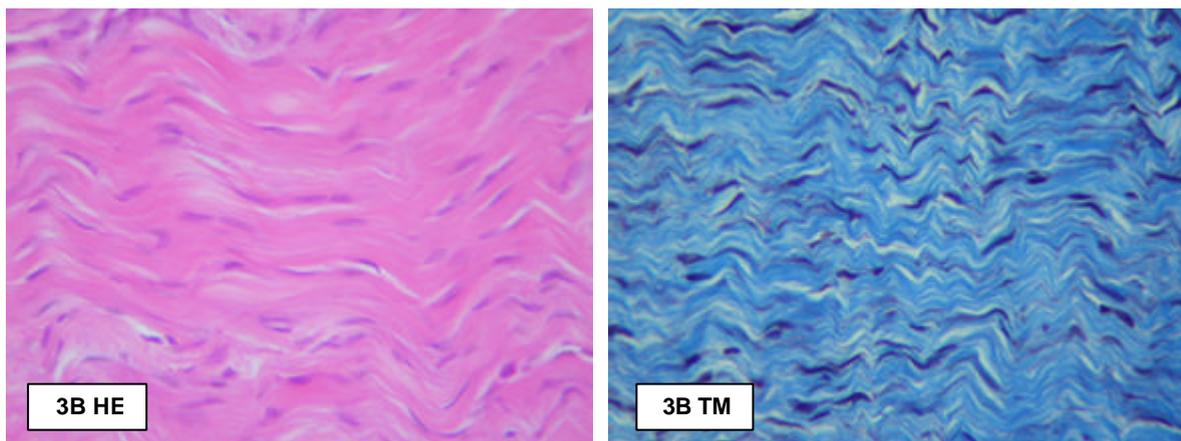


Figura 31: Microscopia do tendão calcâneo de rato tratado com terapia laser (904nm), sacrificado no 15º dia PO, corado com Hematoxilina & Eosina (3B HE) e Tricromio de Masson (3B TM). Corte longitudinal. Aumento de 400X.

O grupo 4A (figura: 32) apresentou características de transição entre as fases de ausência de remodelação (+) e remodelação inicial (++). Quadro de hiper celularidade associadas à presença de fibrilas colágenas delicadas e esparsas sem nenhuma orientação específica com relação às margens da área tenotomizada. Verificou-se, ainda, abundante presença de substância fundamental amorfa e presença de um infiltrado difuso de células inflamatórias crônicas e células fagocitárias.

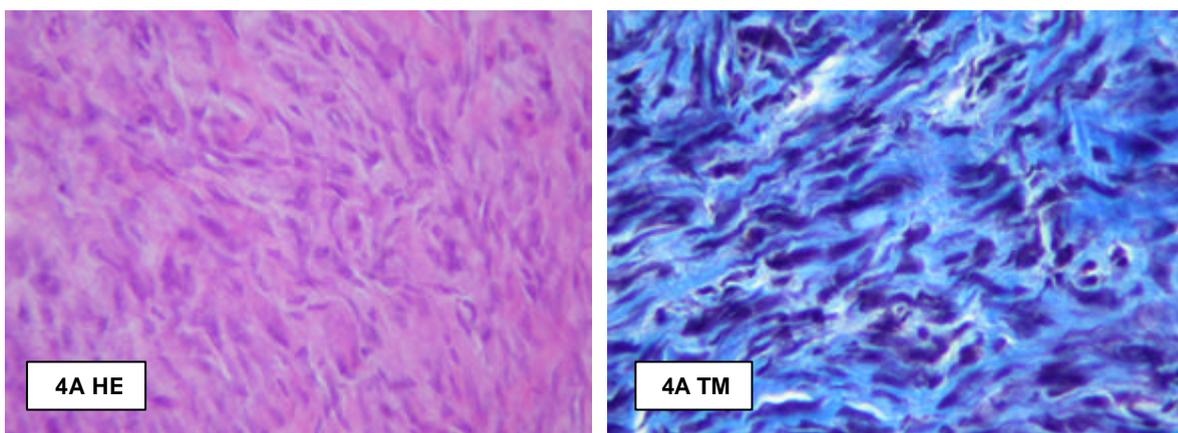


Figura 32: Microscopia do tendão calcâneo de rato do grupo controle, sacrificado no 7º dia PO, corado com Hematoxilina & Eosina (4A HE) e Tricromio de Masson (4A TM). Corte longitudinal. Aumento de 400X.

O grupo 4B (Figura: 33) apresentou-se na fase de remodelação inicial (++) . Foi notado um quadro de hiper celularidade associado à presença de fibras colágenas delicadas e esparsas já apresentando sinais de orientação (angulação de até 25º), segundo as margens da área tenotomizada.

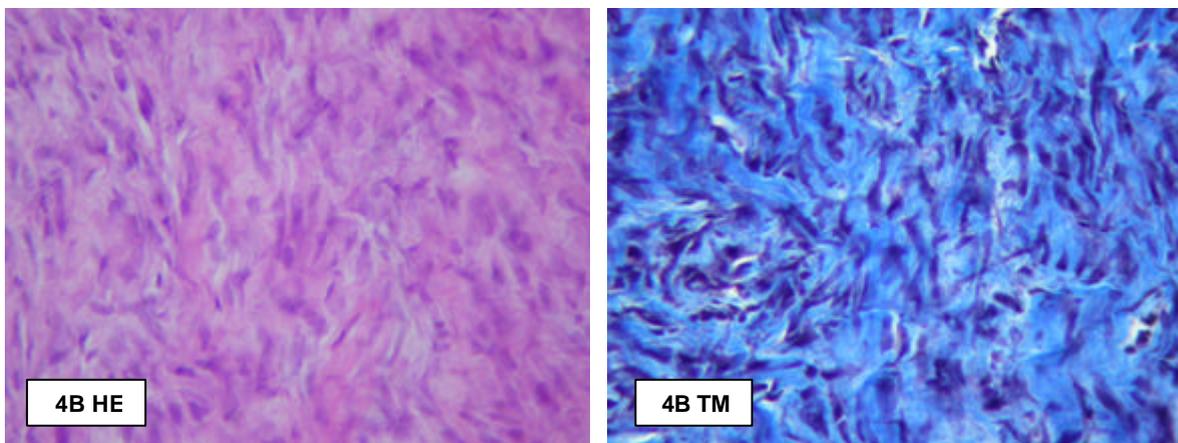


Figura 33: Microscopia do tendão calcâneo de rato do grupo controle, sacrificado no 7º dia PO, corado com Hematoxilina & Eosina (4B HE) e Tricromio de Masson (4B TM). Corte longitudinal. Aumento de 400X.

O Grupo 5B, por se tratar do grupo controle, possui aspectos morfológicos típicos de um tecido tendíneo normal. Notou-se um quadro de celularidade característico, com fibroblastos fusiformes apresentando citoplasma escasso e

núcleo único, achatado e hipercromático, associado à presença de feixes de fibras colágenas maduras orientadas de forma paralela (angulação de 180°) com as margens da área cirúrgica. Ausência de células inflamatórias crônicas e de células fagocitárias.

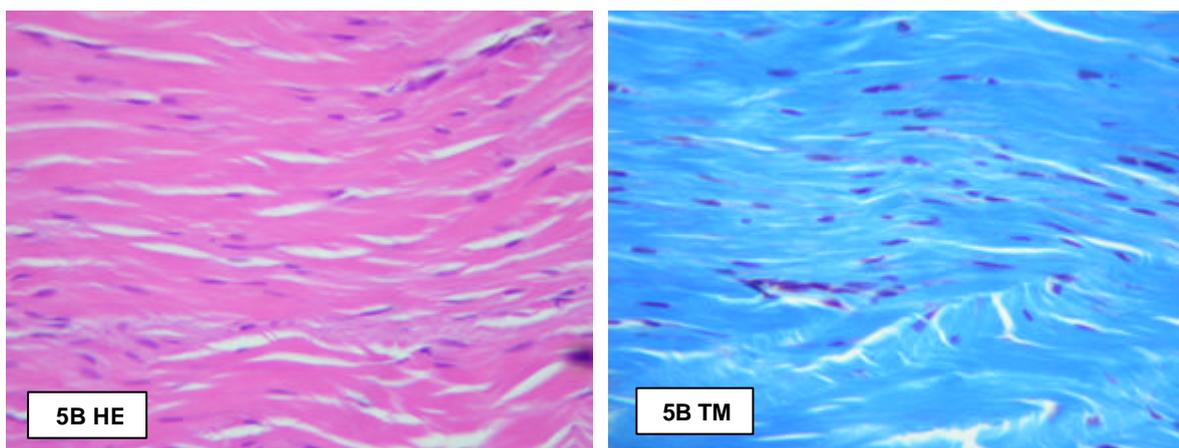


Figura 34: Microscopia do tendão calcâneo de rato do grupo controle + sacrificado no 15º dia PO, corado com Hematoxilina & Eosina (5B HE) e Tricromio de Masson (5B TM). Corte longitudinal. Aumento de 400X.

Foi averiguado, através da análise microscópica dos tecidos desse estudo, que não ocorreu à presença de calcificações distróficas em nenhuma das amostras. Além disso, ocorrências de áreas de hialinização também não foram observadas. Nos grupos tratados com LED e Laser (780 ou 940nm) haviam áreas de formação e deposição de colágeno e proliferação de fibroblastos. Nos animais com 7 dias PO, foi nítida a observação de uma hiper celularidade de fibroblastos jovens e uma discreta produção de fibras de colágenas jovens, sem nenhuma forma de organização. Nos grupos de animais sacrificados com quinze dias, fica evidente uma redução da proliferação celular fibroblástica e uma maior produção de componentes colagenosos da matriz extracelular dos tendões operados, com evidente organização.

Com relação a variável contagem de fibroblastos, para a avaliação de todos os grupos experimentais de acordo com o tratamento específico instituído, foi demonstrada uma redução do número de fibroblastos de forma estatisticamente

significativa entre o primeiro e segundo sacrifício dos animais tratados com Laser 904 nm (Tabela: 5).

Ainda com relação à variável contagem de fibroblastos, para a avaliação de todos os grupos experimentais e controle, no momento do primeiro sacrifício (7 dias PO), percebeu-se a presença de relações estatisticamente significativas entre os animais tratados com o LED e Laser 780nm ($p=0,001$) e entre os grupos LED e controle ($p=0,002$) (Tabela: 5).

Com relação às amostras no momento do segundo sacrifício (15 dias PO), observou-se diferenças significativas entre os grupos de animais tratados com LED e Laser 780 ($p=0,013$), Laser 780 e Laser 940 ($p=0,009$) e entre Laser 780 e grupo controle ($p=0,004$) (Tabela: 6).

Com relação à variável gradação do remodelamento tecidual, para a avaliação de todos os grupos experimentais de acordo com o tratamento específico instituído, foi demonstrada uma maior remodelação tecidual ($p<0,05$) entre o primeiro e segundo sacrifício dos animais tratados com Laser 780 nm (Tabela: 7).

Foi possível observar uma concentração de animais com melhor grau de remodelação tecidual logo no primeiro sacrifício (7^o dia PO) no grupo tratado com luz LED em comparação aos demais grupos (Tabela: 7).

Entretanto, quando a gradação da remodelação tecidual foi avaliada entre todos os grupos experimentais e controle, nos momentos do primeiro sacrifício (7^o dia PO) e segundo sacrifício (15^o dia PO), nenhuma diferença estatisticamente significativa foi demonstrada entre os grupos analisados, apesar dos grupos tratados com LED, em ambos os sacrifícios, possuírem melhor gradação de remodelamento tecidual em relação aos demais grupos (ANEXO: A).

Tabela 4: Comparação dos resultados da contagem de fibroblastos nos tendões tenotomizados de animais controles e experimentais de acordo com o tipo de tratamento instituído.

VARIÁVEL	LED			Laser 780 nm			Laser 904 nm		
	<u>1A</u>	<u>1B</u>	<u>p</u>	<u>2A</u>	<u>2B</u>	<u>p</u>	<u>3A</u>	<u>3B</u>	<u>p</u>
Contagem Média de Fibroblastos (dp)*	312,8 (85,9)	310,3 (36,2)	n.s.	628,2 (128,7)	484 (153,4)	n.s.	444,7 (49,6)	301,7 (31,6)	p<0,05

* Análise estatística realizada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. DP = desvio-padrão.

Tabela 5: Comparação dos resultados da contagem de fibroblastos nos tendões tenotomizados de animais controles e experimentais nos momentos do primeiro e segundo sacrifícios.

VARIÁVEIS	7º dia pós-operatório				15º dia pós-operatório			
	<u>1A</u>	<u>2A</u>	<u>3A</u>	<u>Controle</u>	<u>1B</u>	<u>2B</u>	<u>3B</u>	<u>Controle</u>
Contagem Média de Fibroblastos (dp)	312,8 (85,9)	628,7 (128,7) ^a	444,7 (49,6)	610 (176,6) ^b	310,3 (36,2)	484 (153,4)	301,7 (31,6)	285,3 (69,9)

Análise estatística realizada pelo teste ANOVA. DP = desvio-padrão. P<0,05: a= 1A vs 2A, b= 1A vs controle 7 dias.

Tabela 6: Comparação dos resultados do grau de remodelação tecidual nos tendões tenotomizados de animais controles e experimentais de acordo com o tipo de tratamento instituído.

VARIÁVEL	LED			Laser 780 nm			Laser 904 nm		
	1A – n=6	1B – n=6	p	2A – n=6	2B – n=6	p	3A – n=6	3B – n=6	p
Gradação da Remodelação Tecidual*									
+	01	0		06	0		03	01	
++	02	01	n.s.	0	04	p<0,05	02	02	n.s.
+++	03	02		0	02		01	01	
++++	0	03		0	0		0	02	

* Análise estatística realizada pelo teste não paramétrico Kolmogorov-Smirnov (KS).

Tabela 7: Comparação dos resultados do grau de remodelação tecidual nos tendões tenotomizados de animais controles e experimentais de acordo com o tipo de tratamento instituído.

VARIÁVEIS	7 dias pós operatórios					15 dias pós operatórios				
	1A – n=6	2A – n=6	3A – n=6	Controle	p	1B – n=6	2B – n=6	3B – n=6	Controle	p
Gradação da Remodelação Tecidual*										
+	01	06	03	02		0	0	01	01	
++	02	0	02	04	n.s.	01	04	02	03	n.s.
+++	03	0	01	0		02	02	01	02	
++++	0	0	0	0		03	0	02	0	

* Análise estatística realizada pelo teste não paramétrico Kolmogorov-Smirnov (KS).

5.2 Espectroscopia Raman

No Gráfico 1 observa-se o espectro médio para cada um dos grupos. Os modos vibracionais presentes constituem-se predominantemente como sendo os modos vibracionais do colágeno tipos I, conforme apresentado na tabela 8.

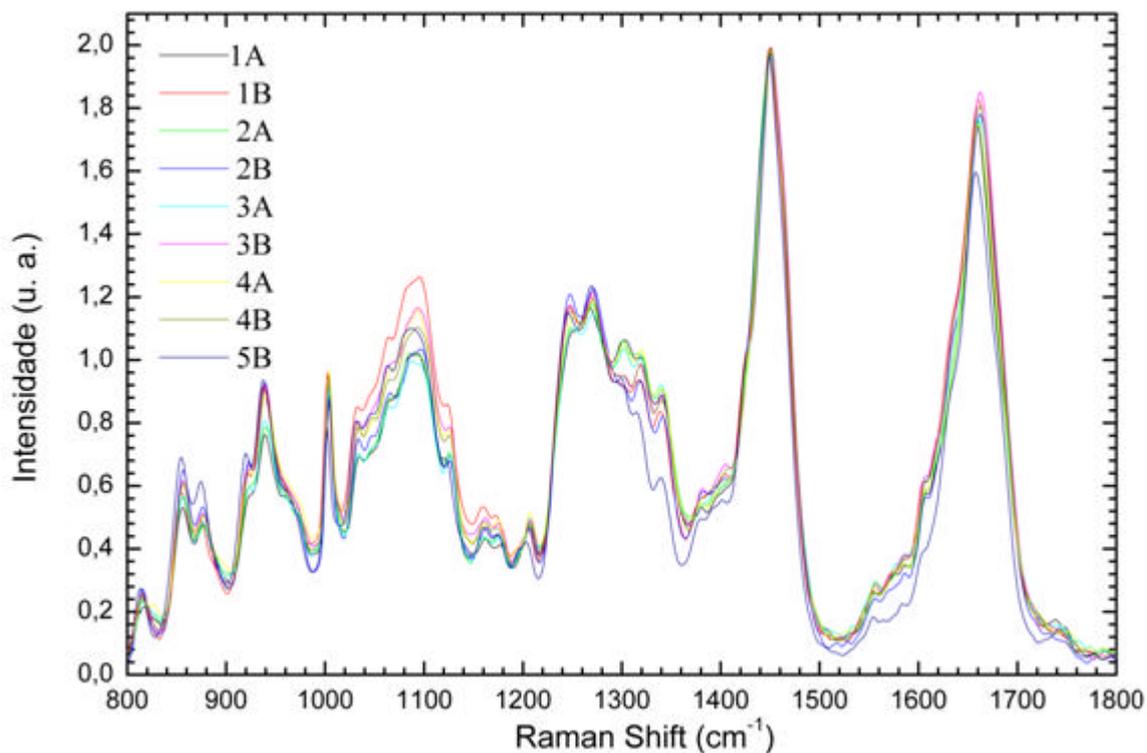


Gráfico 1: Espectros médio dos grupos: 1A, 1B, 2A, 2B, 3A, 3B, 4A, 4B e 5B.

Na tentativa de separar os espectros em função das suas características bioquímicas, foi realizado o teste estatístico de PCA. Os dados que aparecem nos gráficos 2 ao 5, apresentam as dispersões binomiais dos PC's.

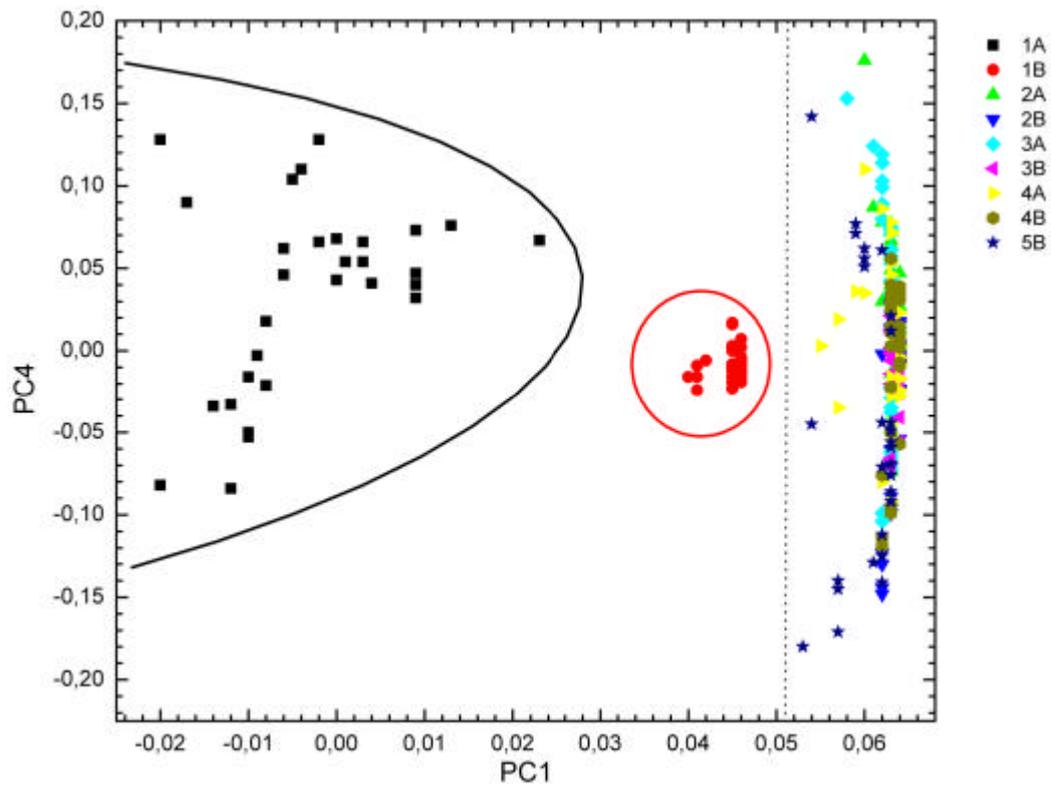


Gráfico 2: Dispersão do PC4 versus PC1.

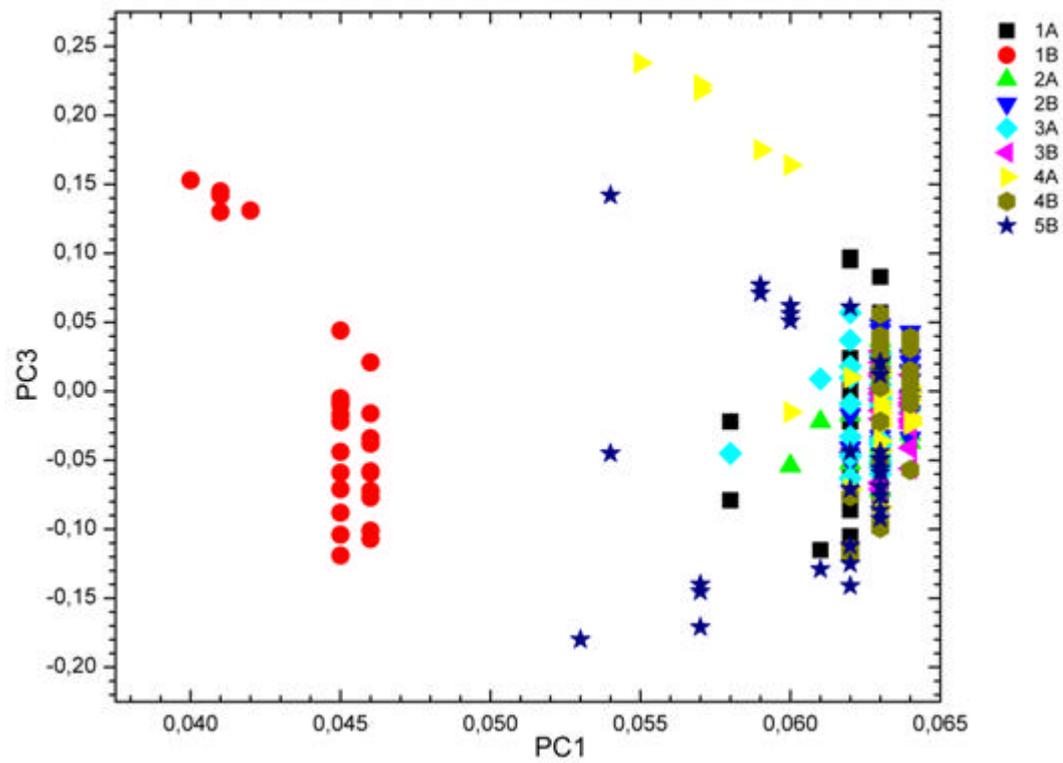


Gráfico 3: Dispersão do PC3 versus PC1.

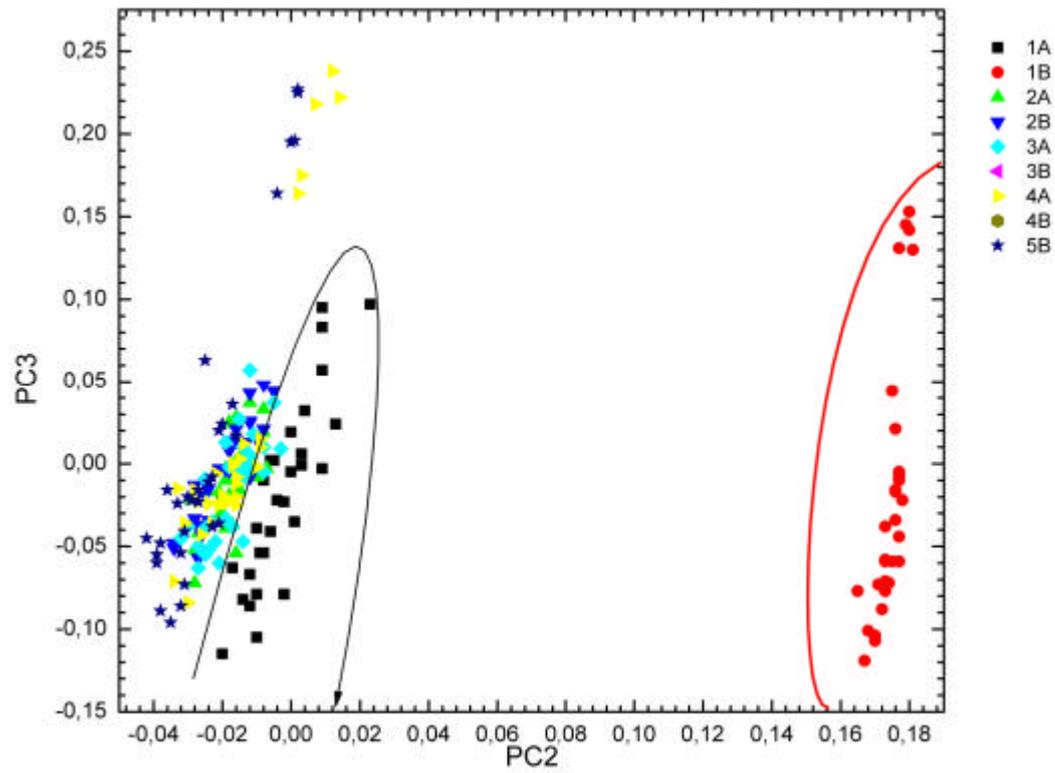


Gráfico 4: Dispersão do PC3 versus PC2.

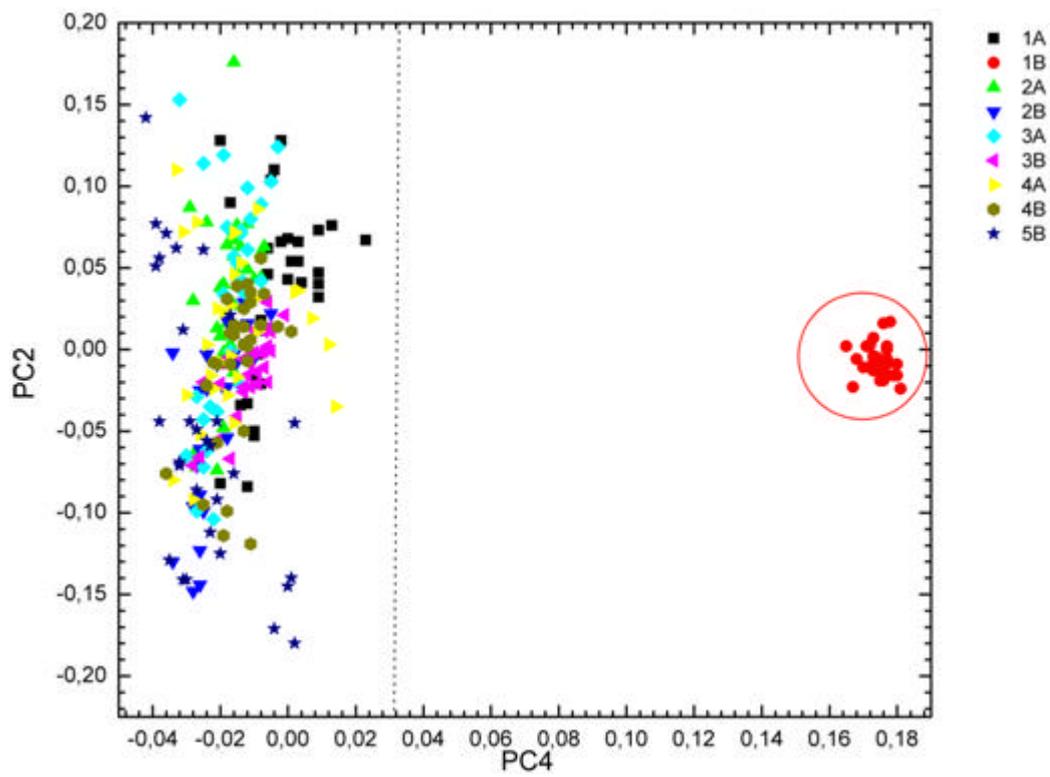


Gráfico 5: Dispersão do PC2 versus PC4.

Tendo em vista os PC's já expostos anteriormente, foi possível observar o agrupamento dos grupos tratados com LED (1A e 1B). No gráfico a seguir, podem ser observados os espectros médios destes grupos e do grupo controle (Gráfico: 6(A)), assim como também, espectros derivados do colágeno dos tipos I e III (Gráfico: 6 (B)).

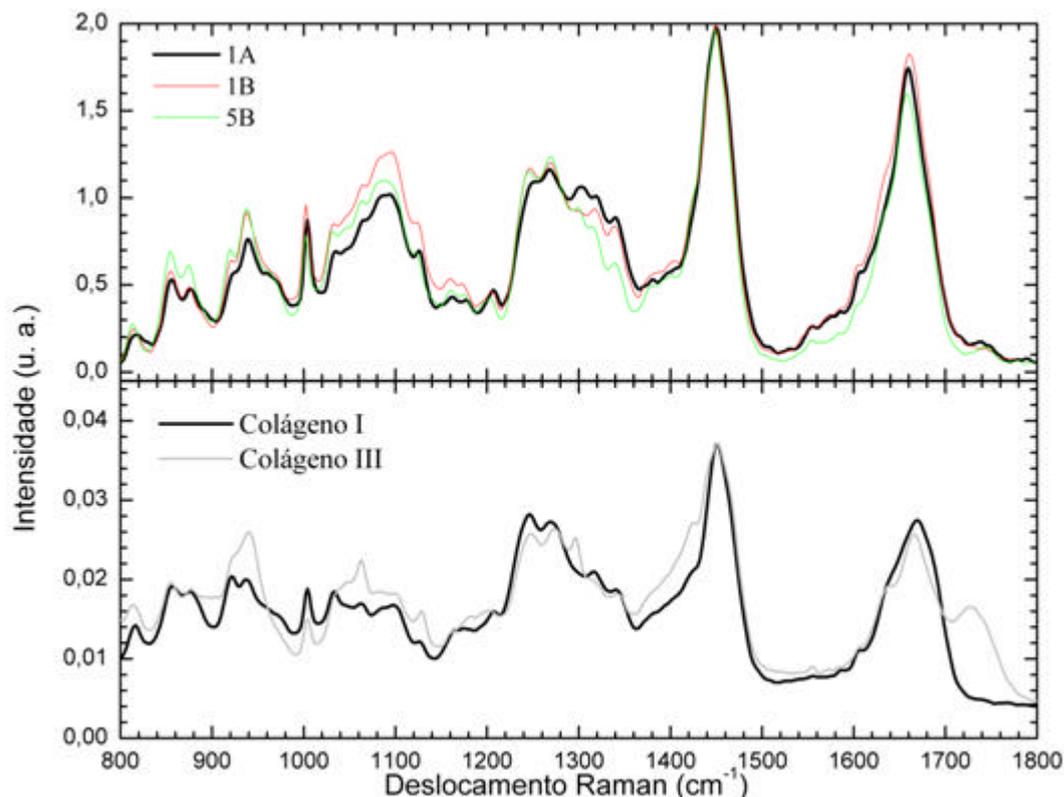


Gráfico 6: (A) Espectros médios dos grupos: 1A, 1B e controle. (B) Espectro dos colágenos tipos I e III.

Foi possível observar, pelos gráficos dispersivos (Gráficos: 2, 3, 4 e 5) que os grupos tratados com LED se destacaram dos demais, principalmente o sacrificado no 15º dia.

De acordo com os modos vibracionais do colágeno tipo I (ANEXO: A), e analisando o gráfico 6(A) com relação ao gráfico 6(B), observa-se que houve um aumento da intensidade espectral entre 1540 e 1620 cm^{-1} , região designada a Pro (*Proline*), Hyp (*Hydroxyproline*), Tyr (*Tyrosine*) e Phe (*Phenylalanine*).

O pico espectral em 1300 cm^{-1} que é característico do colágeno tipo III, é presente no tratamento LED 7º dia e diminuído no espectro referente ao tratamento LED 15º dia. É observado que a produção maior de colágeno tipo III se dá nos animais tratados até o 7º dia, enquanto a do colágeno tipo I é observado nos animais tratados até o 15º dia.

Observando os picos referentes à amida III (1247 cm^{-1} - 1270 cm^{-1}), é possível se averiguar que estes estão mais elevados no espectro referente ao LED 15º dia em relação ao espectro LED 7º dia. Estas mesmas características ocorrem quando compara-se os espectros do colágeno tipo I e III. É possível perceber que houve uma maior produção de colágeno do tipo I, melhorando assim a qualidade tecidual.

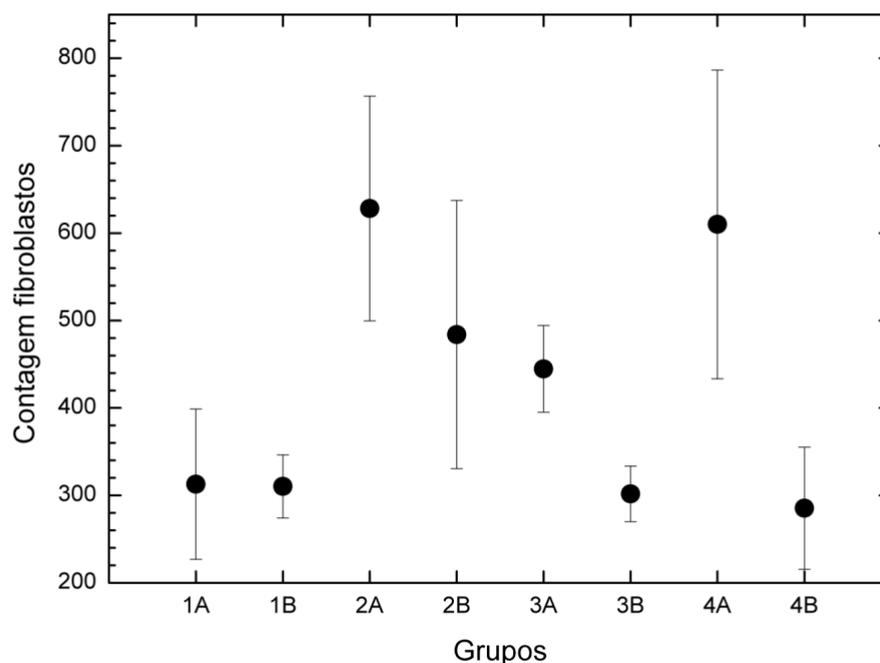


Gráfico 7: Exposição da contagem de fibroblastos relacionada aos grupos experimentais. 1A e 1B grupo LED), 2A e 2B (laser 780nm) 3A e 3B (laser 904nm) 4A e 4B (controle negativo).

Como podemos observar no gráfico 7, os grupos tratados com terapia LED (640 nm), obtiveram menores valores na contagem de fibroblastos logo no primeiro sacrifício quando comparados aos demais grupos. Contudo, não foram

observadas diferenças significativas entre os grupos de 7 e 15 dias (referentes ao 1º e 2º sacrifício) submetidos à terapia LED (Tabela: 4). Segundo Junqueira e Carneiro (2004) a fase inflamatória do tecido tendíneo se dá do 1º ao 7º dia, onde macrófagos removem restos celulares e componentes extracelulares alterados e os fibroblastos ficam dispostos radialmente em direção às fibras do tendão, sintetizando fibras colagenosas por volta do 5º dia da lesão. Este processo parece ter sido otimizado pela terapia LED, através dos resultados do grupo 1A, mantidos, em consequência, para o grupo 1B no que se refere ao número de fibroblastos.

Observou-se, através da análise de remodelação tecidual, que houve uma condição superior de reparação nos grupos LED (Gráfico: 8), culminando em um tecido maduro, quando comparados aos demais grupos deste experimento. A superficialidade do tendão do calcâneo pode ter sido fator importante no que se refere à absorção de luz, uma vez que Karu (2006) relata que camadas superficiais de tecidos possuem melhor resposta biológica à luz não coerente. Segundo a autora a absorção de fótons na região do vermelho do espectro eletromagnético por fotorreceptores (p.ex. citocromo c oxidase) culmina em aumento da concentração de ATP intracelular e, conseqüentemente, aumento da atividade metabólica tecidual. Estes dois eventos: reduções do número de fibroblastos e aumento da remodelação são inversamente proporcionais. Assim, este dado descarta a possibilidade de inativação de fibroblastos ou diminuição de quimiotaxia guiada por luz. O grupo LED apresentou número de fibroblastos inferior ao controle e grupos submetidos à terapia laser. O comprimento de onda do LED empregado é considerado adequado na biomodulação positiva durante o processo de divisão celular (KARU, 2006). Assim, o nível de potência empregado na terapia com LED provavelmente tenha sido responsável pela redução da divisão celular neste primeiro momento.

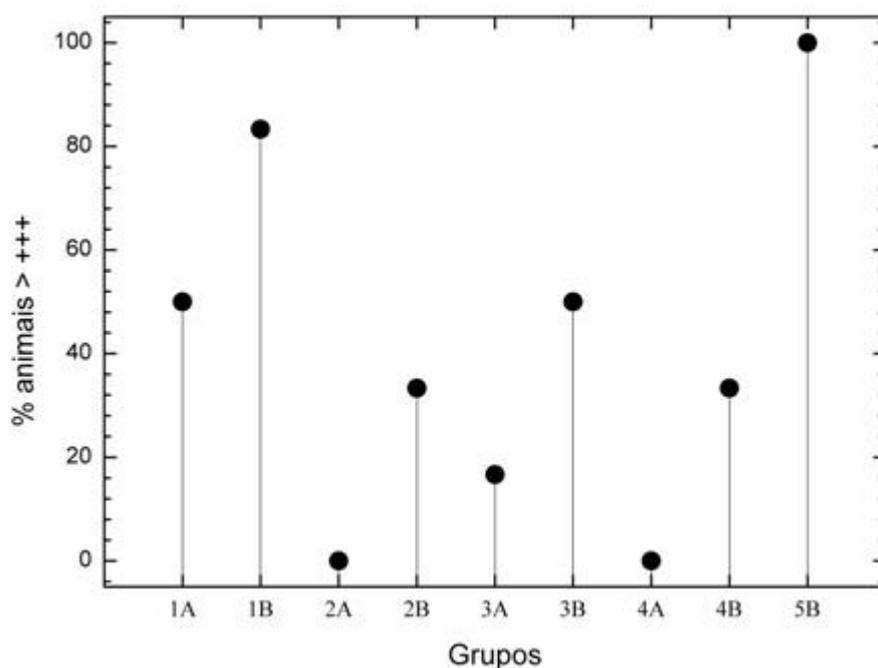


Gráfico 8: Porcentagem de animais dos grupos experimentais que possuíram remodelamento tecidual tendinoso com qualidade igual ou superior a +++.

Houve uma maior quantidade de animais apresentando melhor remodelamento tecidual nos grupos submetidos ao tratamento com terapia LED, como pode ser observado no gráfico 8. Ainda foi possível averiguar que os animais submetidos à terapia a base de luz, exceto o grupo 2A e 2B (laser – 780nm), apresentaram melhor remodelamento tecidual quando comparado aos grupos controle (gráfico: 8). Com base nos resultados obtidos foi possível apontar para a efetividade das terapias testadas e uma relativa dose dependência.

O grupo submetido à terapia laser (780 nm) apresentou resultados semelhantes ao grupo controle no que se refere à porcentagem de animais com qualidade de remodelamento tecidual igual ou superior a +++, tanto no primeiro quanto no segundo sacrifícios. Mester et al. (1985) relata que a radiação laser pode ser responsável por estimular ou inibir / diminuir as várias fases do processo de reparação tecidual, este fator está diretamente relacionado à dosagem. Assim,

a dose de 4 J/cm^2 possivelmente foi responsável pela desaceleração do processo de reparo.

Remodelamento tecidual do grupo LED em 7 dias foi semelhante ao do grupo laser 904 nm em 15 dias, ou seja, aceleração no processo de cura no grupo tratado com LED de forma precoce. O LED (luz não coerente) possui coerência longitudinal demasiadamente diminuída quando comparada à luz laser (luz coerente). A coerência se torna importante quando se pretende tratar tecidos volumosos (KARU, 2006). O tecido tendinoso encontra-se anatomicamente em superfície, sendo este recoberto apenas por tecido cutâneo e facias, talvez por este motivo o LED apresente resultados semelhantes aos encontrados em estudos empregando laser na região do vermelho do espectro eletromagnético (REDDY, STHEHNO-BITTELL, ENWEMEKA, 1998).

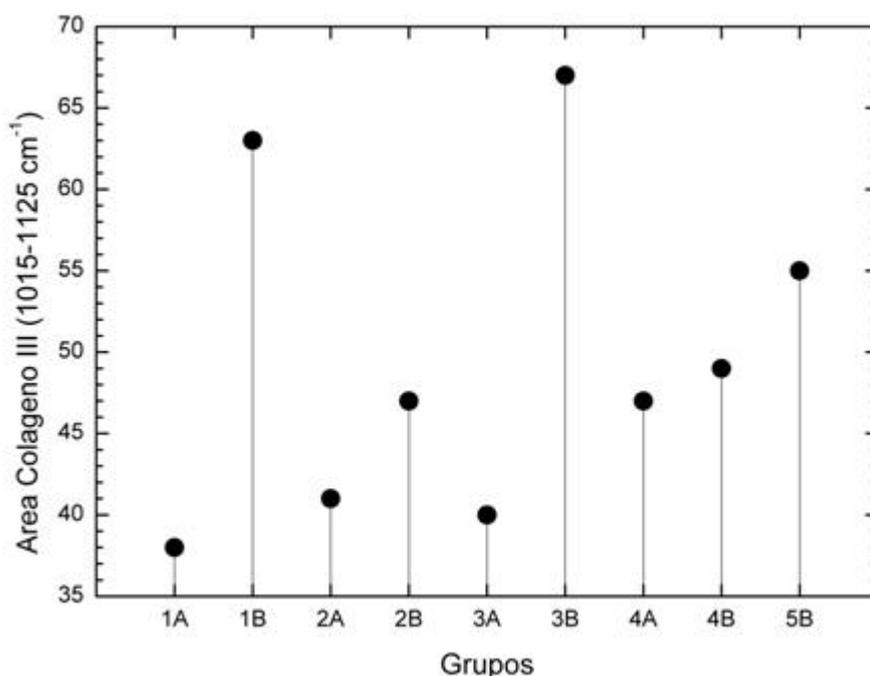


Gráfico 9: Quantidades relativas de colágeno III para os diferentes grupos através estimada pela área espectral entre $1015\text{-}1125 \text{ cm}^{-1}$.

O gráfico 9 demonstra que, com relação aos animais do primeiro sacrifício, o grupo submetido à terapia com LED apresentou menores valores de área de

colágeno III. No segundo sacrifício, apesar de ter havido aumento da presença de colágeno tipo III em todos os grupos submetidos a tratamento, os animais tratados com laser (780 nm) obtiveram menores valores, similares aos do grupo controle. Enwemeka (1992) relata que o pico de síntese de colágeno tipo III no processo de reparação tendínea se dá no 14º dia onde o colágeno do tipo I começará a predominar neste tecido por degradações colagenosas, resultando em um intenso remodelamento com lise de algumas fibras, agregação e aumento de novas fibras.

Entretanto, os espécimes submetidos à terapia laser (780 nm) no 2º sacrifício, não apresentaram diferença significativa com relação a síntese de colágeno (tipo I e III) e graduação do remodelamento tecidual quando comparado ao grupo controle negativo. ReddY et al. (1998); Demir et al. (2004) e Buso (2005) verificaram em seus estudos não haver diferença significativa quanto ao colágeno nas duas primeiras semanas do tratamento tendíneo com laser GaAs quando comparado a animais controle. Estes autores irradiaram os animais durante 21 dias, demonstrando que o tratamento de tenotomia pode ser dose dependente (número de sessões de irradiação), pois no presente estudo observou-se maturação de maior quantidade de colágeno nos grupos tratados com o mesmo comprimento de onda.

O gráfico 9 demonstra que os grupos 1A, 2A e 3A, submetidos à terapia com luz, apresentaram menor presença de colágeno do tipo III e conseqüente maior presença de fibras colagenosas do tipo I. Neste mesmo gráfico pode-se observar que os grupos submetidos à terapia laser 904nm e LED, do segundo sacrifício, apresentam maior presença de colágeno do tipo III, quando comparado ao grupo controle negativo (5B). Estudos realizados por Józsa e Kannus (1997), Robbins et al. (1994), Enwemeka (1992) e Kushner et al. (1991) demonstram que na fase proliferativa e angiogênica há presença predominante de colágeno do tipo III na matriz extracelular do tecido em formação, permitindo maior resitência durante o processo de cicatrização (Enwemeka et al., 1998). O aumento da presença de colágeno tipo III nos grupos tratados com luz pode ter sido causado, entre outros fatores, pelo aumento da microcirculação local, conforme atesta Smith (1965 *apud* Buso, 2006).

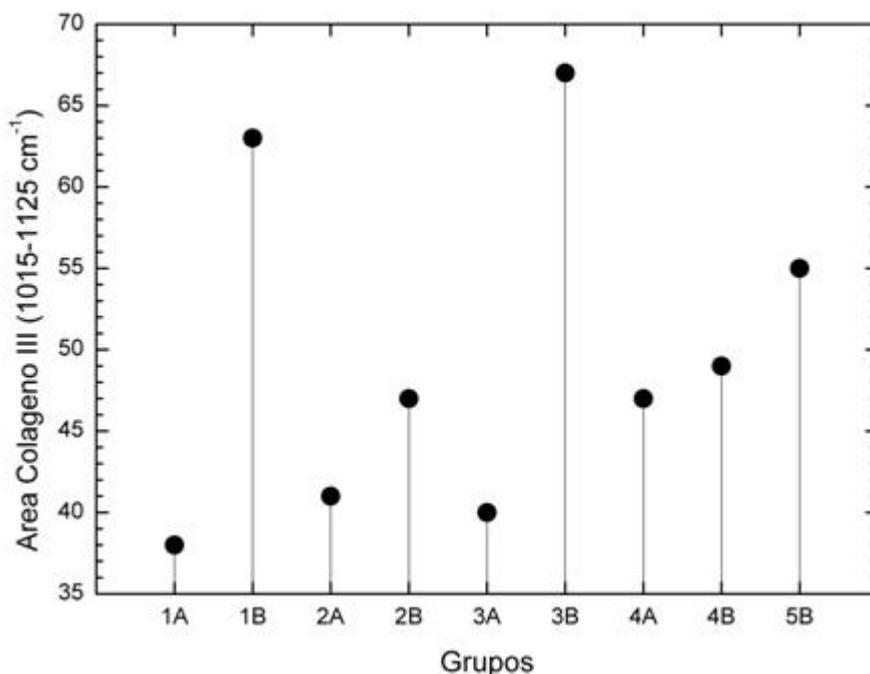


Gráfico 9: Quantidades relativas de colágeno III para os diferentes grupos através estimada pela área espectral entre 1015-1125 cm⁻¹.

O gráfico 9 demonstra que, com relação aos animais do primeiro sacrifício, o grupo submetido à terapia com LED apresentou menores valores de área de colágeno III. No segundo sacrifício, apesar de ter havido aumento da presença de colágeno tipo III em todos os grupos submetidos a tratamento, os animais tratados com laser (780 nm) obtiveram menores valores, similares aos do grupo controle. Corroborando com o presente estudo Enwemeka (1992) relata que o pico de síntese de colágeno tipo III, no processo de reparação tendínea, se dá no 14º dia. Neste momento o colágeno do tipo I tem predomínio devido a degradações colagenosas, resultando em um intenso remodelamento com lise de algumas fibras, agregação e aumento de novas fibras.

Entretanto, os espécimes submetidos à terapia laser (780 nm) no 2º sacrifício, não apresentaram diferença significativa com relação à síntese de colágeno (tipo I e III) e graduação do remodelamento tecidual quando comparado

ao grupo controle negativo. Reddy et al. (1998), Demir et al. (2004) e Buso (2005) verificaram em seus estudos não haver diferença significativa quanto ao colágeno nas duas primeiras semanas do tratamento tendíneo com laser GaAs quando comparado a animais controle. Estes autores irradiaram os animais durante 21 dias, demonstrando que o tratamento de tenotomia pode ser dose dependente (número de sessões de irradiação), pois no presente estudo observou-se maturação de maior quantidade de colágeno nos grupos tratados com o mesmo comprimento de onda.

7. CONCLUSÕES

Através da análise histológica e por espectroscopia Raman conclui-se que:

- Os grupos tratados com LED (640 ± 20 nm) apresentaram remodelação tecidual, maturação (fibroblastos) e tipo de fibras colágenas depositadas no processo de reparação tendínea superiores aos demais grupos tratados com luz, principalmente na fase inflamatória (1ª semana). Contudo, os níveis de remodelamento e maturação tecidual tendíneo são superiores pós-terapia com laser em 904nm, em relação à terapia com laser em 780nm.

- Na fase proliferativa (2ª semana) as terapias com laser em 904nm e LED (640 ± 20 nm), levaram à otimização da síntese de colágeno tipo III.

7.1 Consideração final

As terapias a base de luz coerente e não coerente podem ser utilizadas como coadjuvante de outros tratamentos, sempre que se fizerem necessários efeitos por estes já conhecidos como os de reparação tecidual, antiinflamatório, dentre outros.

REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

- ALBERGEL, R.P. et al. Biostimulation of procollagen by low energy lasers in human skin fibroblast culture. **J. Invest. Dermatol.**, v.82, p.395-402.1984.
- ANDRADE, M.F.; RASTELLI, A.N.S; SAAD, R.S; SAAD, J.R.C. Avaliação de capacidade de polimerização de um novo dispositivo a base de LED á bateria. **J Am Dent Assoc**, v.4, p.372-376, 2001.
- ANGEL, S. M.; CARRABBA, M.; COONEY, T.F. The utilization of diode lasers for Raman spectroscopy, **Spectrochim. Acta A. Mol Spectrosc.**, n.51, p. 1779-1799, 1995
- BABOVIC, S.; TREVINO, M.; PETTY, P. Experimental model for the long-term effects of laser resurfacing. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.28, p.138-140, 2001.
- BALL, D.W. Rayleigh and Raman Scattering. **Spectroscopy**, v.16,n.2, p.28-31, 2001.
- BAXTER, D. Laserterapia de Baixa Intensidade. In: KITCHEN, S.; BAZIN, S. **Eletroterapia de Clayton**. São Paulo, Manole. 1988. Cap.13,p.191-210.
- BAXTER, D.G. **THERAPEUTIC Lasers: Theory e and Praticce**. New York, Churchill Livingstone. 1994.
- BIRK, D.E.; TRELSTAD, R.L. Etracellular compartments in tendon morphogenesis: Collagen fibril , bundle, and macroggregate fomation. **The Journal of Cell biology**, v.103,p.231-240, 1986.
- BITAR, R.A. **Estudo de tecido mamário humano por espectroscopia FT-Raman**. 2004. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba.
- BRUKER. Operational procedures for the Bruker FRA 106 FT-Raman Acessory and the RFS 100 FT-Raman Spectrometer. **FT-Raman User's Manual**. Version 1.0, p.2-22, 1994.
- BUSO, N.C. **Avaliação da ação do laser arseneto de gálio - 904nm no processo de reparação do tendão de Aquiles em ratos**. 2006. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba.
- CANTÚ, N. **Comparação dos efeitos do laser de baixa potência HeNe e AsGaI na regeneração do músculo tibial anterior em rato**. 2004. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba.

CAPON, A. et al. Laser assisted skin closure (LASC) by using a 815-nm diode-laser system accelerates and improves wound healing. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.28,p.168-175, 2001.

CONTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia Estrutural e Funcional**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2000.1485p.

CONTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. Inflamação e Reparação. In: _____ . **Robbins: Patologia Estrutural e Funcional**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2000. Cap. 3, p.44-77:

COOLS, J. **La terapia laser hoy**. Barcelona: Centro de Documentación Láser de meditec; 1984.

CROW, P.et al. The use of Raman spectroscopy to identify and characterize transitional cell carcinoma in vitro. **Bju Internacional**, v.9, n. 93, p.1232-1236, 2004.

CRUAÑES, JC. **La terapia Láser, hoy**. Barcelona. Centro Documentación Láser de Meditec, 1984.p.164.

CURRIER, D.P.; NELSON, R.M. Dynamics of Biologic Tissue. In: ENWEMEKA, C.S.; SPIELHOLZ, N.I. **Modulation of Tendon Growth and Regeneration by Eletrical Fields and Currents**. Philadelphia, F.A. Davis Company, 1992. cap. 3, p.231-254.

DEMIR, H; BALAY, H; KIRNAP, M. A comparative study of the effects of eletrical stimulation ans laser treatment on experimental wound healing in rats. **Journal of rehab.**, v.41, n.2, p. 147-154, 2004.

DUARTE, J. **Comparação qualitativa e quantitativa da detecção de anticorpos anti-toxoplasma gondii da classe IgG em soros de gatos domésticos através da análise sorológica via ELISA e biópsia óptica**. 2002. 60 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba.

ENWEMEKA, C. S. Attenuation and penetration of visible 632,8nm and invisible infra-red 904nm light in soft tissures. **Laser Therapy**, v.13, p.95-101, 2001.

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

ENWEMEKA, C.S. Functional loading augments the initial tensile strength and energy absorption capacity of regenerating rabbit Achilles tendons. **Am. J. Phys. Med. Rehabil.**,v.71, p.31-38, 1992.

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

FARIA, D.L.A.; SANTOS, L.G.C.A. A demonstraç o sobre o espalhamento inelástico da luz: repetindo o experimento de Raman. **Química Nova**, v.3, n.20, p.319-323, 1997.

FELD, M. S., et al. Detection a characterization of human tissue lesions with near infrared Raman spectroscopy. **Proc. SPIE 2388**,p. 99-104, 1995.

FERRARO, JR. History of Fourier Transform infrared spectroscopy. **Spectroscopy**, v.14,n.2,p.28, 1999.

FONSECA NETO, J.; ALCOCER, P.R.C. Compressão de Imagens Médicas Utilizando a Técnica JPEG-DPCM. In: FÓRUM NACIONAL DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA EM SAÚDE, 4., 1998. Curitiba: [s.l.], 1998. p. 411-412.

FRANK, C.J. et al. Characterization of human breast biopsy specimens with near-IR Raman spectroscopy. **Anal Chem.**,n.3, p.319-326, 1994.

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

GIGANTE, A. et al. Fibrillogenesis in tendon healing: an experimental study. **J. Biol. Res. – Boll Soc. It. Biol. Sper.** Napoli,v.7-8, n.72, p.203-210, 1996.

GNIADHECKA, M. et al. Melanoma diagnosis by Raman spectroscopy and neural network: Structure alterations in proteins and lipids in intact cancer tissue. **J. Invest Dermatol.** v.2, n. 122, p.443-449, 2004.

GONZÁLEZ, M.V.; CRUA NAS, J.C. Comportamiento da la luz en la interaccion con los tejidos, en especial el laser4 de baja potencia. **Boletim do centro de Documentación Laser de Meditec**, n. 15-16, p.6-21, 1998.

GRECO, M. et al. Increase in RNA and protein synthesis by mitochondria irradiated with Helium – N on laser. **Biochem Biophys Res Commun**; v.163, p.1428-1434; 1989.

GUN, S.L. et al. Combined ultrasound, electrical stimulation and laser promote collagen synthesis with moderate changes in tendon biomechanics. **Am. J. Phys. Med Rehabil.**, v.76,p.288-296, 1997.

HAKA, A.S. et al. Identifying microcalcifications in benign and malignant breast lesions by probing differences in their chemical composition using Raman spectroscopy. **Cancer Res.** v.62,n.18,p.5375-5380, 2002.

- HATA, T.R. et al. Non-invasive Raman spectroscopy detection of carotenoids in human skin. **J. Invest. Dermatol.**, v.115, n.1, p.441-448, 2000.
- HERRERO, C. **Los efectos terapeuticos**. Boletim do centro de documentação laser de meditec; v.15, p.22-26, 1988.
- HONDERMARCK, H. et al. Functional proteomics of breast cancer for signal pathway profiling and target discovery. **J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia**, v.7, n.4, p.395-405, 2002.
- IKOMA T. et al. Physical Properties of Type I Collagen Extracted From Fish Scales of *Pagrus major* and *Oreochromis niloticas*. **Inter. Journal of Biological**, v. 32 p. 199-204, 2003.
- JÓZSA, L.; KANNUS, P. **Human tendons: Anatomy, physiology and pathology**. Human kinetics, 1997.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. In: tecido conjuntivo. **Histologia Básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p.92-124.
- KARU, T.; PYATIBRAT, I.; KALENDO, G. Irradiation with He-Ne laser increase ATP level in cells cultivated in vitro. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v.27, p.219-223, 1995.
- KASTELIC, J.; GALESKI, A.; BAER, E. The Multicomposite structure of Tendon. **Connective Tissue Research**, v.6, n.1, p.11-23, 1978.
- KELLER, S. et al. Application of near-infrared-Fourier transform Raman spectroscopy in medical research. **J. Raman Spectrosc.**, v.25, n.7-8, p.663-671, 1994.
- KOGELNIK, H; PORTO, SPS. Continuous Helium-Neon Red Laser as a Raman Source. **Journal of Optical Society of America**, v.53, n.12, p.1446-1447, 1963.
- KURACHI, C.; TUBOY, A.M.; MAGALHÃES, D.V.; BAGNATO, V.S. Hardness evaluation of a dental composite polymerized with experimental led-based devices. **Dental Materials**, v.17, p.309-315, 2001..
- KUSCHNER, SH; ORLANDO, CA; MCKELLOP, HA; SARMENTO, A. A comparasion of the healing properties of rabbit Achilles tendon injuries at different levels. **Clinical Orthopaedics and related research**, n.272, p.268-273, 1991.
- LAWSON, EE. et al. Applications of Raman Spectroscopy to Skin Research. **Skin Research and Tecnology**, v.3, n.3, p.147-157, 1997.
- LONDON, S.J. et al. A prospective study of benign breast disease and the risk of breast cancer. **JAMA**, v.267, n.7, p.941-944, 1992. Erratum in: **JAMA**, v.267, n.13, p.1780. Apr 1, 1992.

- MAHADEVAN-JANSEN, A. et al. Near infrared Raman spectroscopy for the detection of cervical precancers. **Appl. Spectroscopy**, 1995.
- MAHADEVAN-JANSEN, A et al. Near-infrared spectroscopy for in vitro detection of cervical precancers. **Photochem. Photobiol.**, v.68, n.1, p.123-32, 1998.
- MAHADEVAN-JANSEN.; RICHARDS-KORTUM, R. Raman spectroscopy for the detection of cancer and precancer. **J. Biomed. Optics.**, v.1, n.1, p.31-71, 1996.
- MANOHARAN, R. Raman spectroscopy and fluorescence photon migration for breast cancer diagnosis and imaging. **Photochemistry and Photobiology**. n.67, p.15-22, 1998.
- MANOHARAN, R.; WANG, Y.; FIELD, M.S. Histochemical analysis of biological tissues using Raman spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A**. n.52, p.215-249, 1996.
- MASSONE, F. Anestesiologia Veterinária : **Farmacologia e Técnicas**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. 107p.
- MEDEIROS, I.S. **Dispositivos LED para polimerização de resinas compostas dentais: comparação com outra fonte de luz**. 2001. Dissertação (Mestrado em Ciências e Engenharia de Materiais) – Interunidades em Ciências e Engenharia de Materiais, Universidade de São Paulo, 2001.
- MESTER, E; MESTER, AF; MESTER, A. The biomedical effects of laser application. **Laser Surg. Med.**, v.5, p.31-39, 1985.
- MOLCKOVSKY, A. et al. Diagnostic potencial of near-infrared Raman spectroscopy in the colon: differentiating adenomatous from hyperplastic polyps. **Gastrointestinal Endoscopy**. v.3, n.57, p.396-402, 2003.
- MÜLLER, SS.; 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.
- NAKAMURA, S.; MUKAI, T.; SENOH, M. Candelaclass high brightness InGaN/AlGaIn double hetero structure blue-light-emitting diodes. **Appl Phys Lett**, v.64, p.1687-1689. 1994.
- NASCIMENTO, PM. **Efeito da variação da intensidade e do comprimento de onda do laser não cirúrgico em feridas cirúrgicas em dorso de ratos: estudo histológico**. 2001. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica), Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2001..
- NICOLAU, RA. Efeitos do laser de baixa potência (AsGaAl) em tecido ósseo de rato submetido à lesão, analisado por histomorfometria óssea. 2001. Dissertação

(Mestrado em Engenharia Biomédica) Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2001.

NUNES, L.O. Estudo do carcinoma basocelular *ex vivo* por espectroscopia FT-Raman. 83f. 2003. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Instituto de pesquisa e Desenvolvimento - Universidade do Vale do Paraíba.2003.

OLIVEIRA, A.P. **Estudo da Espectroscopia Raman em carcinogênese induzida na mucosa jugal de hamsters**. 65f. 2003. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento – Universidade do Vale do Paraíba. 2003.

OZAKI, Y. et al. Raman Spectroscopy study of cataract formation: Emory mouse cataract. **Applied Spectroscopy**, v.41,n.4, p.597-605, 1987.

PAPPAS, D. Raman spectroscopy in bioanalysis, **Talanta**, n.51,p.131-144, 2000.

PARIZOTTO, N.A. **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**. 134f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, Universidade Estadual de Campinas. 1998.

PASSARELLA, S. et al. Increase in the ADP/ATP exchange in rat liver mitochondria irradiated *in vitro* by Hélio – Neon laser. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.156, n.2, p.978-986, Oct. 1988

RABELO, S.B. **Efeito da fotoestimulação com laser de baixa potência na cicatrização de feridas em ratos portadores de Diabetes induzido**. 2003. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica)- Instituto de pesquisa e Desenvolvimento - Universidade do Vale do Paraíba.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.

RAMAN, C.V.; KRISHNAN, K.S. A new type of secondary radiation. **Nature**, n.121, p.501, 1928.

REBELLO, M.L. **Estudo comparativo de três sistemas de cura da resina composta para colagem de bráquete: resina ativada quimicamente, luz alógena e luz emitida por diodo (LED's), quando submetidas ao teste de resina a tração**. 2005. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba.2005.

REDDY, G.K.; STEHNO-BITTEL, L.; ENWEMEKA, C.S. Laser photostimulation of colla gen production in healing rabbit Achilles tendons. **Laser in Surgery and Medicine**. v.22, p.281-287.1998.

ROBBINS, SL; CONTRAN; KUMAR. Inflamação e reparação. In: _____. **Patologia Estrutural e Funcional**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. p.45-83.

RUBINOV, A.N. **Physical Mechanisms of Biological Effect of Coherent and Noncoherent Light**. 2006. Disponível em: <http://www.laser.nu/llt/llt_editorial13.htm>. <Acesso em: 05 set. 2006.

SALA, O. **Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho**. São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista, 1995. 224p.

SCHANAIDER, A.; SILVA, P. C. Uso de animais em cirurgia experimental. **Acta Cir. Bras**. v. 19, n. 4, p. 441-447, 2004.

SCHARADER, B. **Infrared and Raman Spectroscopy**. New York: VCH Publishers, 1995. Cap.4.

SCHARADER, B. **Raman/ Infrared Atlas of Organic Componds**. [s.n.], 1989. 1118p.

SCHIMITT, I. et al. Os efeitos da radiação laser arseneto de gálio (AsGa) sobre a regeneração de tendões em cães. **Braz.J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.30, n.2, p.145-149, 1993.

SCHRADER, B; MOORE, DS. **LASER-BASED MOLECULAR SPECTROSCOPY FOR CHEMICAL ANALYSIS: Raman scattering process, IUPAC Recommendations**. 1997. Disponível em: <<http://www.iupac.org/reports/V/spectro/partXVIII.pdf>> Acesso em: 27/08/2006.

SILVA, E.C, et al. **Radiação laser**. In: RODRIGUES EM. Manual de recursos terapêuticos. Rio de Janeiro: Revinter; 1998.p.17-35.

SILVEIRA JR. L. **Correlação entre a técnica de Espectroscopia Raman e a análise histopatológica das placas ateromatosas em artérias coronárias humanas**. 2001. 109f. Tese (Doutorado) – Departamento de Fisiologia Experimental – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP). 2001.

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. Brás. Cirur.**, v.86, n.6, p.303-305. 1996.

SMITH, J.W. Blood dupply of tendons. **Am. J. Surg.**, v.109, p.272-276, 1965.

STADLER, I. et al. 830-nm irradiation increases the wound tensile strength in a diabetic murine model. **Laser in Surgery and Medicine**, v.28, p.220-226, 2001.

STAHL, L.; ASHWORTH, S.H.; JANDT, K.D.; MILLS, R.W. Light-emitting diode (led) polymerization of dental composites: flexural properties and polymerization potential. **Biomaterials**, v.21, p.1379-1389, 2000.

STONE, N. et al. Raman spectroscopy for identification of epithelial cancers. **Faraday Discussions**, n.126, p.141-157, 2004.

STONE, N. et al. Raman spectroscopy for early detection of laryngeal malignancy: preliminary results. **Laryngoscope**. v.110, n.1, p.1756-63, 2000.

STRICKLAND, J.W. Flexor tendon surgery. **J. Hand Surgery**. v.14-b, p.261-272, 1989.

TATARUNAS, A.C.; MATERA, J.M.; DAGLI, M.L.Z. Estudo clínico e anatopatológico da cicatrização cutânea do gato doméstico: utilização do laser de baixa potência GaAs (904nm). **Acta Cir. Brás.**, v.13, p.8693, 1998.

TAVARES, M.R.; **Efeito do Laser Terapêutico na Cicatrização Tendinosa: Estudo Experimental em Ratos**. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia - Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de química de São Carlos da Unidade de São Paulo) Ribeirão Preto – SP. 2002.

TAVARES, M.R.; MAZZER, N.; PASTORELLO, M. Efeitos do laser terapêutico na cicatrização tendinosa: estudo experimental em ratos. **Fisioterapia Barsil**. v.6, n.2, p.96-100, 2005.

THERMO NICOLET. **Introduction to Raman Spectroscopy – A Brief History of Raman Spectroscopy**, Madison – USA. Disponível em: <http://www.thermonicolet.com> Acesso em: 08 set. 2006.

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.

WALKER, M.D. et al. Effect of low-intensity laser irradiation (660 nm) on a radiation-impaired wound-healing model in murine skin. **Laser in Surgery and Medicine**, v.26, p.41-47, 2000.

WEISTEIN et al. **Ortopedia de Turek: princípios e suas aplicações**, 5ª ed. São Paulo: Manole, 2000.

WOODWARD, L.A. The Raman effect. In: SZYMANSKI, H.A. **Raman Spectroscopy, theory and practice**. New York: Plenum Press. p.1-43, 1967.

YU, H.S. et al. Helium-Neon Laser irradiation Stimulates migration and proliferation in melanocytes and induces repigmentation in segmental-type vitiligo. **Journal Invest. Dermatol** v.120, n.1, p.56-64, Jan 2003.

ANEXO A

Modos vibracionais de Raman para o colágeno tipo I atribuídos a derme de porco e dos peixes *P.*

Majore O. nilóticas. Fonte: IKOMA, et al; 2003.

<i>Porcine dermis</i>	<i>Assignment</i>
1670 s	?(C=C); amida I
1640 sh	?(C=C); amida I
1605 m	Phe, Tyr
1586 m	Pro, Hyp
1451 s	d(CH ₂)
1421 m, sh	?s(COO ⁻)
1379 w	d(CH ₂)
1340 w, sh	Yw (CH ₂)
1319 m	Yt(ch ₂)
1270 s	d(NH ₂); amida III
1247 s	d(NH ₂); amida III
1206 m, sh	Hyp, Tyr
1164 w	-NH ₃ ⁺ -
1123 w, sh	
1093 m	?(C-N)
1062 m	Ligação de carboxila OH
1034 s	Phe
1004 s	Phe
972 w, sh	
958 w, sh	?(C-C) do resíduo
936 m, sh	?(C-C) da espinha dorsal da proteína
921 s	?(C-C) do anel da Pro
884 s	?(C-C) do anel da Hyp
858 s, sh	?(C-C) do anel da Pro
816 s	?(C-O-C); ?(C-C) da espinha dorsal

?: *Stretching coordinate*; d: *deformation coordinate*; Yw: *Wagging coordinate*; Yt: *Twisting coordinate*; s: Forte; m: média; w: Fraca; sh: ombro; vw: muito fraca. Fonte: Ikoma, et al., 2003.