

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

Heliadora Leão Casalechi

**“Efeito da Terapia com LED de Baixa Potência Sobre o Processo de Reparação
do Tendão de Aquiles em Ratos”**

**São José dos Campos, SP
2008**

Heliadora Leão Casalechi

**“Efeito da Terapia com LED de Baixa Potência Sobre o Processo de Reparação
do Tendão de Aquiles em Ratos”**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientadores: Prof^a. Dra. Renata Amadei Nicolau
Prof. Dr. Landulfo Silveira Júnior

São José dos Campos, SP
2008

C33a

Casalechi, Heliadora Leão

Avaliação da ação do LED no processo de reparação do tendão de Aquiles em ratos/ Heliadora Leão Casalechi. Orientador: profa. Dra. Renata Amadei Nicolau; Co-orientador, Prof. Dr. Landulfo Silveira Junior. São José dos Campos: UniVap, 2008.

1 Disc laser. Color

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Biomédica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale da Paraíba, 2008.

1. Tendão do calcâneo 2. Terapia com laser de baixa intensidade 3. Tecidos/regeneração I. Nicolau, Renata Amadei, Orient. II. Silveira Júnior, Landulfo, Orient. III. Título

CDU:616.75

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



Aluno: Heliadora Leão Casalechi

Data: 06 / 06 /2008

HELIODORA LEÃO CASALECHI

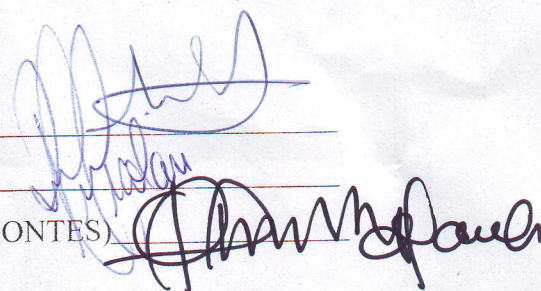
“EFEITO DA TERAPIA COM LED DE BAIXA POTÊNCIA SOBRE O PROCESSO DE REPARAÇÃO DO TENDÃO DE AQUILES EM RATOS”

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. **LANDULFO SILVEIRA JUNIOR** (UNIVAP)

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

Prof. Dr. **ALFREDO MAURÍCIO B. DE PAULA** (UNIMONTES)



Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco

Diretor do IP&D – UniVap

São José dos Campos, 06 de junho de 2008.

Este trabalho é dedicado as pessoas mais importantes e mais amadas de minha vida, meus pais Victor Hugo e Fiorita. Sem eles a realização deste trabalho não seria possível.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, por me guiar e dar forças nos momentos difíceis de minha vida.

Agradeço aos meus pais pelo alto investimento em meus estudos; e acima de tudo pelo amor, confiança, apoio e dedicação em todos os momentos de minha vida.

Agradeço ao meu irmão Vitor que além de ser meu grande amigo e companheiro muito me ajudou no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço ao meu namorado Júlio que esteve ao meu lado auxiliando e me apoiando em todos os estágios deste trabalho.

Agradeço a Prof. Dra. Renata Amadei Nicolau pela confiança, paciência e principalmente pelos ensinamentos passados ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Landulfo Silveira Júnior pela orientação, incentivo e confiança.

Agradeço ao Prof. Dr. Alfredo Maurício Batista de Paula pelo carinho, acolhimento, compreensão e por acreditar neste trabalho.

Agradeço a todos os membros do Laboratório de Biomodulação Tecidual pela amizade e contribuição direta ou indiretamente neste trabalho.

Agradeço a direção aos mestres e funcionários do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento pela dedicação, esforço e amizade.

E a todos aqueles que de alguma forma colaboraram para a elaboração deste trabalho e não foram citados nominalmente.

“Efeito da Terapia com LED de Baixa Potência Sobre o Processo de Reparação do Tendão de Aquiles em Ratos”

RESUMO

O processo de reparação dos tendões dificilmente irá reproduzir a formação prévia ou retornará às suas propriedades mecânicas originais. Dentre os estudos que estão relacionados ao desenvolvimento de técnicas terapêuticas que tentam otimizar o processo de reparação tendínea, a maior parte dos estudos realizados sugere que a radiação eletromagnética pode desencadear a modulação de processos fisiológicos. Os LEDs atualmente estão sendo introduzidos comercialmente como alternativa de baixo custo para as terapias que utilizam laser de baixa potência. O objetivo deste estudo foi investigar o efeito da terapia com o LED (640 ± 20nm) no processo de reparação do tendão de Aquiles de ratos. Foram utilizados 30 ratos albinos, machos da linhagem *Wistar*, com peso aproximado de 350g, os quais foram submetidos à tenotomia total do tendão de Aquiles da pata traseira direita. O tratamento com o LED foi iniciado no pós-operatório (PO) com doses diárias de 20 J/cm² por um período de 7 a 21 dias, com método pontual, ficando a caneta do LED em contato direto com a pele do animal. Os animais foram divididos em seis grupos C1, L1, C2, L2, C3 e L3; sendo que os grupos C foram controles e os grupos L tratados por 7, 14 e 21 dias consecutivos. Todos os grupos foram sacrificados no 7^o, 14^o e 21^o dia PO. Os animais controle tiveram simulação da aplicação do LED com o aparelho desligado. Após o sacrifício os tendões foram dissecados e extraídos, fixados em formol a 10% e encaminhados para análise histológica por microscopia de luz, onde o processo de reparação foi analisado. A média obtida através da análise de remodelação tecidual pelo grupo submetido à terapia com LED, sacrificado no 7^o dia PO, foi muito próxima a obtida pelo grupo controle sacrificado no 14^o dia PO. Já o grupo tratado com LED sacrificado no 14^o dia PO apresentou média semelhante à obtida pelo grupo controle sacrificado no 21^o dia PO. Enquanto nos grupos sacrificados no 21^o dia PO a média do grupo LED praticamente atingiu o grau máximo de remodelação, previamente estabelecido, com qualidade bem superior se comparada à média do grupo controle. Os resultados sugerem que a qualidade da remodelação dos grupos tratados pelo LED seja atingida mais rapidamente que a dos grupos que não passaram por tratamento. Em suma, com o emprego da terapia com LED, nos parâmetros testados, a qualidade do tecido reparado foi superior ao grupo controle em todos os tempos experimentais, com celularidade significativamente menor em 7 dias para o grupo irradiado. Este dado aponta para aumento da atividade de síntese de colágeno, provavelmente relacionada à redução do processo inflamatório nos primeiros momentos da reparação, atestado pela superioridade da qualidade de remodelação nos grupos tratados.

Palavras-Chave: Tendão de Aquiles, LED (*Light Emitting Diode*), Reparação tecidual.

“The Effects of Low Level LED on the Repair Process of Achilles Tendon Therapy on Rats”

ABSTRACT

It is very difficult for the recovery tendon process to reproduce the previous formation or regain its original mechanical properties. Among the studies related to the development of therapeutic techniques that try to optimize the repair of tendons process, part of studies made suggest that the electromagnetic process can trigger the modulation of physiological processes. Nowadays, LEDs are being used commercially as a low cost alternative for therapies that use low level laser. The objective of this study was to investigate the effect of LED (640 ± 20nm) therapy in the recovery process of rats. Thirty albino male *Wistar* rats, weighing 350g were submitted to total tenotomia of the right hind leg Achilles tendon. The treatment with LED was initiated after the surgery with daily doses of 20 J/cm² for a period of 7 to 21 days, with a punctual method, in which a LED pen stays in direct contact with the animal's skin. The animals were separated into six groups C1, L1, C2, L2, C3 and L3; in which groups C were the control, and groups L treated for 7, 14, and 21 consecutive days. All groups were sacrificed on the 7th, 14th and 21st after surgery days. The control animals were submitted to a simulated LED radiation with the machine turned off. After the sacrifice, the tendons were dissected, extracted and fixed in formaldehyde at 10 % and sent to histological analysis by light microscope, where the recovery process was analyzed. The average obtained in the tissue remodeling analysis in the group treated with the LED therapy, on the 7th day after surgery, was very similar to the result obtained in the control group on the 14th day after surgery. On the other hand, the group treated with the LED therapy, on the 14th day after surgery presented an average similar to the control group on the 21st day after surgery. In the in groups on the 21st day after surgery the average of the LED group almost reached the maximum remodeling previously established, with a higher quality when compared to the average of the control group. The results suggest that the remodeling quality of the groups treated with LED may be achieved more quickly than in the groups that did not undergo the treatment. To summarize, with the use of LED therapy in the tested parameters the quality of the regenerated tissue was superior to the control group in all experimental phases with a significantly lower cellularity on the 7 days for the irradiated group. This information points to the increase of activity in the collagen synthesis, probably related to the reduction in the inflammatory process in the first moments of regeneration. This would attest to the superiority of the quality of remodeling in the treated groups.

Key Words: Achilles Tendon, LED (*Light Emitting Diode*), Tissue Recovery.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Moléculas de colágeno que se agregam para formar, fibrilas, fibras e feixes de colágeno. Fonte: Junqueira e Carneiro ⁹ ,	3
Figura 2: Processo de síntese do colágeno.....	4
Figura 3: Estrutura do tendão.	6
Figura 4: Anatomia do tendão de Aquiles.....	8
Figura 5: Incisão cutânea (A), exposição do tendão (B), secção total do terço médio do tendão (C) e sutura da pele (D).	18
Figura 6: Posicionamento do LED (A). Aplicação do LED com imobilização manual (B).	19
Figura 7: Gradação do remodelamento do tecido fibroso da área em regeneração dos tendões tenotomizados. Grau + (A); Grau ++ (B); Grau +++ (C); Grau ++++ (D). (Coloração Hematoxilina e Eosina. Aumento de 400X).	21
Figura 8: Local da contagem de fibroblastos. Coloração Hematoxilina e Eosina. Aumentos de 40X (A), 100X (B)	22
Figura 9: Local da contagem de fibroblastos. (Coloração Hematoxilina e Eosina. Aumento de 400X).....	22
Figura 10: Fotomicrografias do tendão calcâneo de rato, sacrificado no 7º dia PO, corado com Tricromio de Masson, grupo C1 (A) e grupo L1 (B). (Aumento de 400X).	23
Figura 11: Fotomicrografias do tendão calcâneo de rato, sacrificado no 14º dia PO, corado com Tricromio de Masson, grupo C2 (A) e grupo L2 (B). (Aumento de 400X).	24
Figura 12: Fotomicrografias do tendão calcâneo de rato tratado, sacrificado no 21º dia PO, corado com Tricromio de Masson, grupo C3 (A) e Hematoxilina e Eosina, grupo L3 (B). (Aumento de 400X).	25
Figura 13: Comparação dos resultados do grau de remodelação entre os grupos controle e LED, obtidos através das médias dos dois corantes, nas três diferentes fases observadas. Apresentação do percentual de variação entre os grupos controle e LED.	25
Figura 14: Comparação entre grupos tratados e controles quanto à contagem de fibroblastos nos tecidos tendíneos.	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Relação da quantidade de animais, grupos, tratamento e sacrifício.....	17
Tabela 2: Médias, erro padrão e análise de variância do número de fibroblastos encontrados ao 7º, 14º e 21º dias, nos grupos controle e LED.	26

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

GaAs – Arsenieto de Gálio;

Er:YAG – Érbio: Ytrio, Alumínio e Granada;

GaAlAs – Arsenieto de Gálio e Alumínio;

H&E – Hematoxilina e Eosina;

HeNe – Hélio Neônio;

LED – Light Emitting Diode;

J – Joules;

Nd:YAG – Neodímio: Ytrio, Alumínio e Granada;

PO – Pós-operatório;

TLBP – terapia com laser de baixa potência;

α – alfa;

λ – comprimento de onda.

SUMÁRIO

1 Introdução	1
2 Revisão Bibliográfica	3
2.1 Colágeno	3
2.2 Tendão	5
2.3 Tendão de Aquiles	7
2.4 Processo de Reparação Tendinoso	8
2.5 Terapia com Laser de Baixa Potência (luz coerente)	11
2.6 Terapia com LED (Light Emitting Diode) de Baixa Potência.....	12
3 Objetivos	15
3.1 Objetivo Geral	15
3.2 Objetivos Específicos	15
4 Material e Métodos	16
4.1 Grupos Experimentais	16
4.2 Procedimento Cirúrgico	17
4.3 Terapia com LED	18
4.4 Sacrifício dos Animais	19
4.5 Técnica Histológica	20
4.6 Análise histopatológica	20
4.7 Análise estatística	22
5 Resultados	23
5.1 Análise qualitativa da remodelação tecidual.....	23
5.2 Análise quantitativa	25
6 Discussão	27
7 Conclusões	32
7.1 Considerações finais.....	32
Referências	33
Apêndice A – Análise da qualidade da remodelação do tecido tendíneo	39
Apêndice B – Análise do número de fibroblastos	40
Anexo A – Resultados da análise estatística do número de fibroblastos	41

1 Introdução

Nos últimos anos foram publicados muitos trabalhos científicos relacionados a lesões de tendões com intuito de otimizar a reparação desse tecido. Segundo Goffi , a lesão em tendões é motivo de preocupação para os cirurgiões em procedimentos de reconstrução, quando a presença de sutura de um tendão pode ocorrer aderência que frequentemente impede que o tendão recupere sua função. A utilização de recursos fisioterápicos para a aceleração do processo de reparação tecidual teve destaque em 1993, por Shimitt , em estudo que mostrou os efeitos da radiação laser sobre a regeneração de tendões de cães. Vários anos se passaram e as pesquisas ainda buscam a melhor forma de reabilitar as funções e melhorar a reparação de um tendão.(1,2)

Dentre os estudos que são direcionados ao desenvolvimento de técnicas terapêuticas que tentam otimizar o processo de reparação tendínea, encontram-se técnicas que utilizam eletroterapia, ultra-terapêutico e recentemente terapia com radiação eletromagnética na região do visível e infravermelho. A maior parte dos estudos realizados sugere que a radiação eletromagnética coerente (laser de baixa potência) pode desencadear a modulação de processos fisiológicos.

O alto custo dos aparelhos que emitem a radiação laser incentiva pesquisas para a investigação dos efeitos de fontes luminosas alternativas como o LED (*Light Emitting Diode*). Segundo Soley e Clark ,a irradiação com luz não coerente é de menor custo e costuma mostrar eficácia similar a dos lasers. Vinck et al. , obtiveram resultados satisfatórios em seu estudo e sugerem efeitos benéficos adquiridos com o LED em diferentes tipos de lesões cutâneas. (3,4,5)

Os efeitos estimulantes produzidos pelo laser de baixa potência em tecidos biológicos foram atribuídos a sua coerência por Boulton. A luz transmitida pelo LED, ao contrário do laser, não é coerente. Contudo estudos mais recentes Pontinem e Whelan, afirmam que a coerência da luz não é responsável pelos efeitos de terapias com laser de baixa potência, pois esta propriedade se perde nas primeiras camadas de tecido biológico. (6,7,8)

Atualmente os LEDs estão sendo introduzidos comercialmente como uma alternativa para as terapias que utilizam laser de baixa potência e sabe-se que a atividade do LED influencia no processo de cicatrização de ferimentos.

(5)

O presente estudo foi realizado devido à escassez de trabalhos com o uso do LED na cicatrização tendínea e pela necessidade de terapias alternativas para auxílio deste processo.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Colágeno

O tecido conjuntivo é composto predominantemente por fibras de colágeno, que são formadas por glicoproteínas estruturais compostas por aminoácidos específicos. Essas fibras de colágeno estão presentes no organismo humano de forma abundante e compõem o total de 30% do peso corpóreo seco.(9)

O colágeno é o agente responsável por manter a integridade e a resistência do tecido quando lesado, suas fibras possuem características flexíveis e são de fundamental importância no processo cicatricial, quando levado em consideração sua forma de deposição e não apenas sua quantidade (10,11)

As fibrilas de colágeno são formadas pela junção de moléculas de colágeno dos tipos I, II, III, V e IX, o colágeno do tipo I é encontrado em maior número e está distribuído por todo o organismo em estruturas como ossos, dentina, derme, cápsulas de órgãos e tendões.(9) A figura 1 mostra a organização das fibrilas para formar o feixe de fibras do colágeno.

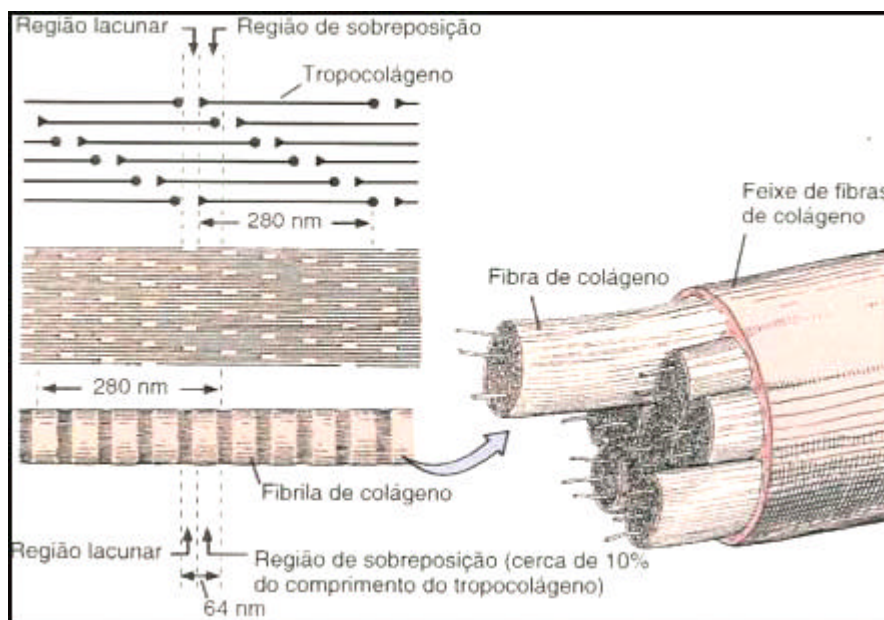


Figura 1: Moléculas de colágeno que se agregam para formar, fibrilas, fibras e feixes de colágeno.

Fonte: (9)

A principal propriedade da molécula de colágeno é a estrutura tríplice hélice, organizada em espiral onde se enrolam por três subunidades de cadeias polipeptídicas chamadas α - hélice, (12) mostrada na figura 2. A tríplice hélice é constituída por duas cadeias polipeptídicas $\alpha - 1$ e $\alpha - 2$ unidas por pontes de hidrogênio, este tipo de cadeia permite que haja distinção de um colágeno para outro, além das propriedades físicas, morfológicas, funções e distribuições nos tecidos. (13,14)

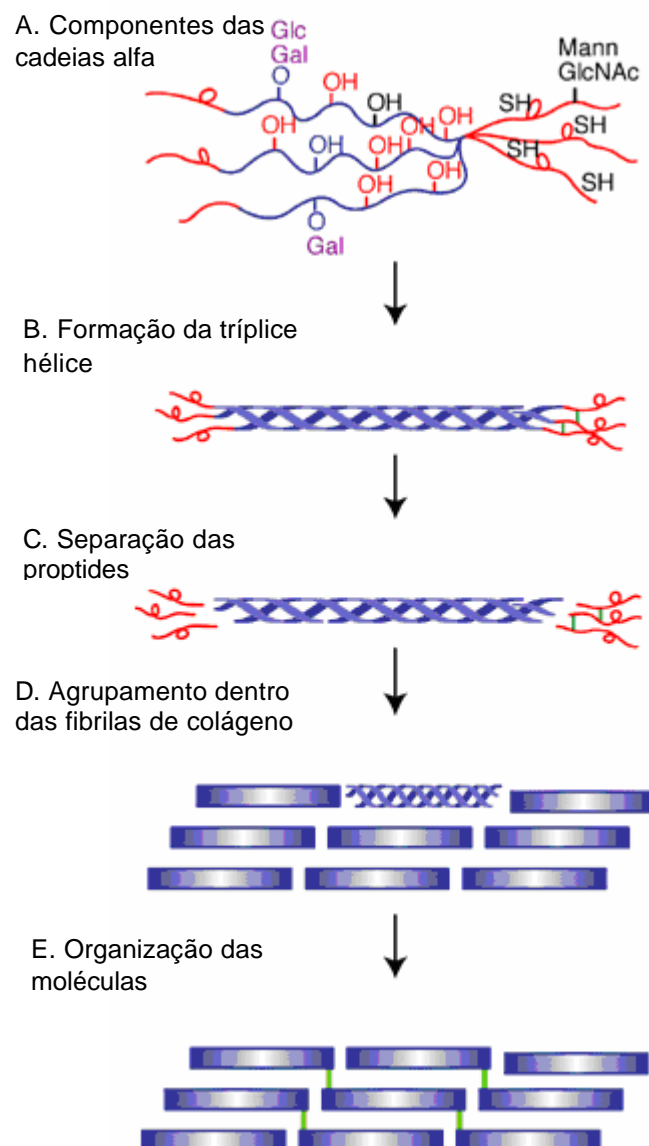


Figura 2: Processo de síntese do colágeno.

Fonte: <http://www-ermm.cbu.cam.ac.uk/05008987h.html>¹⁵, adaptada pela autora.

A síntese do colágeno tem como responsáveis os fibroblatos, que são numerosos e estão localizados entre os feixes de colágeno, onde estão

presentes mastócitos e macrófagos. Estes fibroblastos possuem forma alongada com algumas reentrâncias citoplasmáticas correndo entre os feixes de colágeno.(16) Os fibroblastos são de máxima importância nos processo de reparação de feridas.(17)

De acordo com Junqueira e Carneiro (9), a síntese do colágeno envolve modificações bioquímicas da cadeia polipeptídica longitudinal, apresentando grande número de fases de transformação das estruturas envolvidas, com aumento da possibilidade de defeitos durante o processo de reparo, que pode ser por falha enzimática ou processo patológico, levando a uma lenta renovação do colágeno.

O colágeno é a principal proteína estrutural do corpo e o maior componente da matriz extracelular do tendão.(18)

2.2 Tendão

Os tendões são estruturas compostas por fibroblastos e matriz extracelular, onde estão imersas as proteínas de colágeno e elastina, arranjados de forma ordenada¹⁹. Para Junqueira e Carneiro (9) o tendão é formado por tecido denso modelado, composto de feixes de colágeno paralelos alinhados com fibroblastos, orientando as fibras do tendão e tornando-o resistente em resposta a força tensora. Os feixes de colágeno do tendão denominados feixes primários, se agrupam com feixes maiores denominados feixes secundários, onde são envolvidos por tecido conjuntivo frouxo contendo poucos vasos sanguíneos e nervos, dando suprimento aos tendões.

Em 1965, Smith observou uma característica importante dos tecidos tendíneos, a escassez de circulação sanguínea longitudinal, que pode ser comprovada na ausência de sangramento na secção de um tendão. (20)

O colágeno é o maior componente da matriz extracelular, e abrange cerca de 90% do peso úmido do tendão. No tendão, as fibras de colágeno possuem uma disposição que é o resultado do seu processo de maturação, sendo usualmente denominadas de fascículos de fibras que contêm unidades menores denominadas fibrilas. As fibrilas de colágeno são longas, cristalinas e extremamente alinhadas, juntas dão origem as fibras de colágeno que por sua vez originam o fascículo. O desenvolvimento dessa estrutura é devido à

adaptação funcional normal dos tendões²¹. Na síntese do colágeno tipo I os tendões são representados por 80% de fibroblastos e outras células, os fibroblastos são sintetizados no epitendão e no paratendão onde estão presentes mastócitos e macrófagos. Estes fibroblastos se encontram no eixo longitudinal do tendão. (14,16)

Os tendões são providos de receptores sensitivos de Golgi, capazes de avaliar a tensão no tendão e transmitir essa informação ao sistema nervoso central.(9)

O tendão esta coberto pelo epitendão, que é um tecido conjuntivo que contém os sistemas vasculares, linfáticos e inserções de nervos. O epitendão se estende mais profundamente no tendão entre os tecidos terciários formando o endotendão, como mostra a figura 3. Mais superficialmente, o epitendão é rodeado pelo paratendão, um tecido conjuntivo livre que consiste essencialmente de fibras de colágeno e fibrilas, onde algumas fibrilas elásticas têm camada interna de líquido sinovial, possibilitando livre movimento do tendão contra os tecidos circunvizinhos. Ao redor do tendão também existe uma camada de líquido sinovial, mais presente em tendões que sofrem maior tensão mecânica, permitindo assim, melhor deslizamento durante o movimento de tração ou contração muscular. (22)

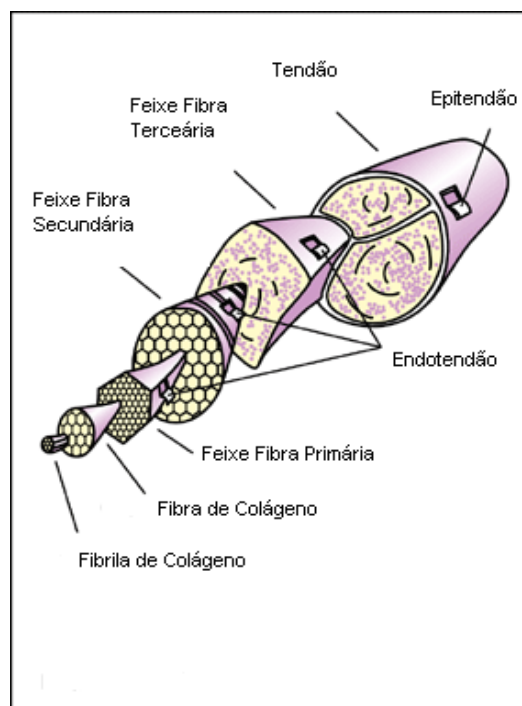


Figura 3: Estrutura do tendão.

Fonte: <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/05008975h.htm>¹⁵, adaptada pela autora.

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.(23) A junção miotendínea é uma região anatômica altamente resistente, pois é onde ocorre a fusão do músculo com o tendão, nesta área estão presentes fibras musculares e tecidos conjuntivos extracelulares. A região de inserção óssea é denominada como osteotendínea, com tecido viscoelástico que transmite forças de tensão do tecido muscular ao tecido ósseo.(24)

2.3 Tendão de Aquiles

O tendão de Aquiles, também conhecido como tendão do calcâneo ou calcanear transmite força ao calcâneo para a flexão plantar do pé, e também se acomoda lateral ou medialmente quando o calcâneo assume posição em varo ou valgo. Apresenta fibras colágenas depositadas de forma regular o que resulta em ausência de deformidade no momento de tração promovida pelos músculos, sua conformação física e molecular o torna um tecido com características de elasticidade e resistência. Atua ainda na absorção de impactos durante a marcha, corrida ou saltos.(25) É uma estrutura de fundamental importância para o perfeito processo de deambulação humana. (26)

Nos animais mamíferos o tendão de Aquiles é formado por três músculos, que se inserem na tuberosidade do calcâneo, onde a massa muscular medial e lateral do músculo gastrocnêmio funde-se distalmente para formar um tendão espesso que se insere no tuber calcis. O músculo flexor digital superficial forma o segundo componente do tendão de Aquiles e um terceiro tendão é formado devido à junção dos músculos grácil, semitendinoso e bíceps femoral.(27) Segundo Moore (28), o tendão de Aquiles é formado pela junção dos músculos gastrocnêmio e sóleo, que se fixa no osso calcâneo do pé, como apresenta a figura 4.



Figura 4: Anatomia do tendão de Aquiles.

Fonte: <http://d.yimg.com/origin1.lifestyles.yahoo.com/ls/hehelthwise/nr55552004.jpg>.²⁹
adapatada pela autora.

A lesão do tendão de Aquiles é a mais comum entre atletas, como jogadores de futebol e bailarinas, devido ao mecanismo de estresse ocorrido diariamente.(30) A ruptura do tendão de Aquiles ocorre após uma dorsiflexão forçada, arranque de marcha ou corrida onde rapidamente o paciente tem a sensação que levou um trauma direto na panturrilha, devido a forte dor que sente no local.(31)

2.4 Processo de Reparação Tendinoso

Para Machado,(32) o processo de reparação do tendão pode promover a arquitetura de um tendão normal, porém, dificilmente ira reproduzir a formação prévia ou retornará às suas propriedades mecânicas originais de deslizamento sobre os tecidos vizinhos. Enwemeka (16) afirmou que por haver baixa vascularização, oxigenação e nutrição, o tendão possui baixa capacidade de regeneração. Apesar do intensivo remodelamento do tendão nos primeiros meses após a lesão, a remodelação completa nunca será alcançada, pois as fibras de colágeno que substituem a lesão apresentam diâmetro menor resultando numa redução da força biomecânica do tendão.(33) No entanto, muitos estudos mostram que quando o tendão lesado é estimulado por meios fisioterápicos apropriados este se regenera adequadamente.

Culp e Taras (34) descreveram os processos de cicatrização do tendão extrínseca e intrínseca da seguinte forma:

Na cicatrização extrínseca ocorre a proliferação de capilares sanguíneos e fibroblastos, formação de fibras de colágeno e o término com o processo de remodelação. Já na cicatrização intrínseca ocorre proliferação e espessamento das células do epitendão, formação de colágeno e neoformação vascular, onde se observa a presença de um calo fibroso, e o término com proliferação de fibroblastos do endotendão.

O processo de reparo tendíneo acontece em três fases sobrepostas, inflamatória, proliferativa e de remodelamento.(16) Na fase inflamatória ocorre à forma de cicatrização extrínseca, que acontece do primeiro ao sétimo dia após a lesão, e libera no local os mediadores químicos da inflamação, onde as células inflamatórias fazem a migração para o local da lesão. Os fibroblastos migratórios e os macrófagos desempenham um papel fagocitário. Os macrófagos são responsáveis por fagocitar e digerir partículas estranhas, removendo restos celulares e componentes extracelulares alterados durante o processo de cicatrização⁹, havendo cobertura da lesão (35) De acordo com Goffi (1), a fase proliferativa inicia-se do quinto ao vigésimo primeiro dia após a lesão, com a chegada de fibroblastos e miofibroblastos. É quando ocorre a cicatrização de forma intrínseca com a síntese do fibroblasto no interior da lesão até o final do revestimento do tendão,(33) obtendo proliferação e síntese de colágeno tanto das camadas superficiais quanto das camadas profundas do tendão.(36) A migração e proliferação dessas células são estimuladas por fatores de crescimento liberados por plaquetas e macrófagos teciduais presentes no local da lesão. Goffi (1), também afirma que o remodelamento tem início por volta do décimo quarto dia após a lesão e se estende por um período de um ano ou mais, sendo necessário cerca de oito meses para uma reconstrução parcial.

Por volta do segundo mês as fibras de colágeno são compactas e espessas. Após o quarto mês o tendão tenotomizado apresenta fibras de colágeno bem organizadas, o tecido celular muda para tecido fibroso, com grande quantidade de fibras colágenas. A maturação do colágeno e o realinhamento linear são normalmente vistos por volta do quinto ao sexto mês após a lesão. Quando a cicatriz se encontra completamente madura, cerca de 3%

de seus elementos são celulares (fibroblastos, miofibroblastos e macrófagos) e o restante é colágeno (37)

Enwemeka (16), afirma que as fases de proliferação e remodelamento são importantes para uma melhor reparação tecidual onde há intensa proliferação celular (fibroblastos), síntese de fibrilas de colágeno e o alinhamento das fibras no eixo longitudinal do tendão. De acordo com Maffulli et al. (33), a resposta extrínseca é a mais importante, se comparada à intrínseca, porque promove um rápido preenchimento da lesão com tecido de granulação.

Segundo Kleinert (38), a nutrição dos tendões é importante para a reparação, devendo ser respeitada para que tenha uma adequada evolução na cicatrização após a lesão. O tendão é nutrido pelo líquido sinovial, que funciona como um lubrificante, e pelos vasos sanguíneos do epitendão.

Existem três critérios fundamentais para a obtenção de um bom resultado funcional, primeiro a facilitação da movimentação precoce, segundo o restabelecimento do movimento de deslizamento do tecido e terceiro a retomada da função de suporte de força tensora (39)

Síntese Temporal do Processo de Reparação Tendinosa:

1º ao 7º = Fase Inflamatória

5º ao 21º = Fase Proliferativa

A partir do 14º = Fase de Remodelamento

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

?

Lesão



Cicatrização extrínseca



Cicatrização intrínseca



Sobreposição dos dois tipos de cicatrização (extrínseca e intrínseca)

Diversos estudos visam ao desenvolvimento de técnicas a fim de otimizar o processo de reparação tendínea. A qualidade da recuperação tecidual está diretamente relacionada à efetiva reabilitação funcional do indivíduo. Assim, o desenvolvimento de equipamentos e técnicas terapêuticas tem sido amplamente investigado em na área da Saúde e Engenharia Biomédica. Encontram-se técnicas que utilizam eletroterapia, ultra-terapêutico e recentemente terapia com laser de baixa potência (TLBP).

2.5 Terapia com Laser de Baixa Potência (luz coerente)

A TLBP é uma modalidade de tratamento clínico que não produz efeito térmico sobre os tecidos, portanto, os efeitos biológicos não podem ser atribuídos ao aumento de calor. A intensidade dos efeitos depende do metabolismo celular ou da condição clínica tecidual antes da irradiação. A radiação emitida por um laser tem como características o paralelismo de suas ondas (coerência) e a distribuição espectral estreita com o mesmo comprimento de onda (monocromaticidade) (40)

A TLBP exhibe bons resultados, dentre eles a cicatrização de feridas, melhora na regeneração de nervos, melhora na regeneração neovascular, e na indução de formação óssea.(41) Estudos demonstram resultados favoráveis também no processo de 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.(42)

Em estudo realizado, quarenta coelhos adultos sofreram tenotomia do tendão de Aquiles e foram divididos em dois grupos, o grupo tratado recebeu irradiação com laser HeNe (632,8 nm) durante o processo de cicatrização do tendão, concluiu-se que a estimulação com o laser diminuiu a resistência da cicatriz nos coelhos do grupo tratado quando comparados ao grupo controle .(43)

Um estudo comparativo entre TLBP, ultra-som terapêutico e eletroestimulação, indica que a TLBP causa intensa estimulação sobre atividade celular (número de fibroblastos e síntese de colágeno) no tecido lesado. (44) Em outro estudo comparativo, que utilizou TLBP no processo de reparação de tendão de Aquiles, analisou-se a evolução bioquímica e

biomecânica do tendão, sendo que no grupo tratado ocorreu aumento significativo da produção de hidroxiprolina (aminoácido importante na síntese do colágeno) e melhora da biomecânica do membro lesado (45)

Em um estudo onde coelhos tenotomizados receberam TLBP, observou-se aumento de 26% de fibras colágenas no grupo tratado em relação ao grupo que não recebeu a terapia. (42) Em feridas cutâneas induzidas no dorso de ratos, o grupo tratado com TLBP, apresentou um aumento significativo de até 50% de colágeno em relação ao grupo controle, além de apresentar maior concentração de células reparadoras e contração das bordas das feridas (46) Em estudo semelhante, com feridas cutâneas, Pugliese ,concluiu que a TLBP aumenta a concentração das fibras colágenas e elásticas reduz o edema e o processo inflamatório. (47)

Ao trabalhar com homioimplante ortopédico no seguimento tenopatelar de cães Mazzati (48) observaram que a TLBP não interferiu no processo cicatricial nas áreas de anastomose do enxerto com o leito receptor, não havendo diferença significativa entre os grupos com e sem laser. A utilização da TLBP na reparação tendínea de eqüinos, após indução de tendinite experimental, também não apresentou resultados significativos quando comparado ao grupo controle (32)

Considerando, as vantagens atribuídas à TLBP sobre as terapias convencionais (ultra-som, crioterapia, eletroestimulação, entre outras) no que se refere à otimização do processo de reparação de lesões tendíneas, os estudos empregando novos equipamentos a base de luz têm sido encontrados. A investigação da similaridade dos efeitos de novas terapias com fontes de luz, quando comparadas aos efeitos atestados do laser, viabilização o desenvolvimento comercial de equipamentos economicamente mais acessíveis. Norteados por este objetivo, recentemente têm sido desenvolvidos estudos empregando a terapia com LEDs em alta intensidade.

2.6 Terapia com LED (Light Emitting Diode) de Baixa Potência

Segundo alguns autores, a terapia com LED em baixa potência pode gerar efeitos semelhantes aos obtidos com a TLBP. O aumento da atividade

celular, tanto em divisão como em síntese, têm sido relacionados ao comprimento de onda e com a dose, e não especificamente à fonte de luz.(49)

Os LEDs são diodos emissores de luz, que ao serem energizados emitem luz monocromática e não coerente. Permitem sua utilização sem a necessidade de filtros ópticos e, em virtude de serem dispositivos semicondutores, apresentam grande eficiência de conversão de energia elétrica em óptica, dissipando pouca potência. Tem como característica principal a condução da 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”.(50) Quando polarizados adequadamente estes dispositivos semicondutores emitem luz na faixa visível ou invisível, dependendo de seus componentes.(51)

O processo de absorção luminosa por um cromóforo tecidual está relacionado ao comprimento de onda do fóton. Este deve possuir um pacote energético específico para que promova reações moleculares. Quando ocorre a absorção de fótons por um cromóforo, um estado molecular eletronicamente excitado se estabelece, resultando em aumento ou redução de atividade celular. A fotobiomodulação tem como característica a possibilidade de aplicação em vários métodos terapêuticos empregando diferentes fontes emissoras de luz (49)

Os diodos de GaAIAs, além de serem usados em lasers, também são usados em emissores LEDs. Os lasers, principalmente na região do infravermelho próximo, podem penetrar mais profundamente um tecido, quando comparados aos LEDs, em função de sua menor divergência. A resposta tecidual ao tipo de luz terapêutica (coerente ou não coerente) a ser aplicada, é dependente da profundidade da camada do tecido que se quer irradiar. (52) Esta dependência ocorre também em função do comprimento de onda da luz, devido aos cromóforos e centros espalhadores da radiação presentes nos tecidos.

Atualmente os LEDs estão sendo introduzidos comercialmente como uma alternativa para as terapias que utilizam laser de baixa potência. É sabido que a atividade do LED influencia o processo de cicatrização de ferimentos⁵². De acordo com Brancalion (53), este tipo de irradiação é freqüentemente utilizado em lesões de pele.

Em estudos recentes, alguns autores como Pöntinem e Whelan concluem que a coerência da luz não é responsável pelos efeitos da TLBP, já que esta propriedade se perde nas primeiras camadas do tecido biológico. Discordando, o estudo de Boulton atribui os efeitos acima mencionados à coerência do laser o que o diferencia do LED. (7,8,6)

O baixo custo da irradiação com luz não coerente e sua eficácia similar a dos lasers foi demonstrada por Soler e Clark em estudos com lesões cutâneas. Resultados satisfatórios também foram obtidos por Vinck com o LED em estudo com cultura de fibroblastos. (3,4,5)

Trelles (54), utilizaram a terapia com LED ($\lambda=633$ nm) para auxiliar a cicatrização de ferida cutânea a laser Er: YAG, e relatam que após a primeira sessão do tratamento os pacientes apresentaram pouca ou nenhuma dor, e no décimo quinto dia essas feridas já estavam completamente reparadas e com mínimo tecido cicatricial quando comparados ou controle. A utilização do LED representa uma recente, não invasiva intervenção terapêutica para o tratamento de feridas, infecções e isquemias. (54,55)

Sheiko , concluíram que a fototerapia, que inclui a exposição ao LED vermelho, potencializou o efeito de um anti-tumor, reduziu seus efeitos colaterais e preveniu metástases. (56)

Um estudo mostrou que a utilização do LED ($\lambda=642$ nm) pode ser eficiente para prevenção da geração de cáries, e a terapia teve efeito bactericida combatendo 100% das bactérias *Streptococcus mutans* presentes⁵⁷.

As terapias que utilizaram o LED vermelho, emitindo no visível, obtiveram excelentes resultados, como cicatrização acelerada e sem dor de feridas cutâneas. (54)

Ainda que vários estudos atestem o efeito benéfico da terapia com LED, nenhum estudo com tendões lesionados, tratados com LED, foi publicado em revista internacional até o momento. O desenvolvimento desta terapia poderia contribuir nos sistemas de atenção a saúde pública, reduzindo o processo de reabilitação de pacientes através de uma terapia de baixo custo.

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

O objetivo do trabalho foi investigar o efeito da terapia com LED no processo de reparação do tendão de Aquiles de ratos.

3.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos foram avaliar qualitativamente a remodelação tecidual e avaliar quantitativamente o número de fibroblastos através da análise histopatológica de tecidos tendíneos submetidos à fototerapia com LED.

4 Material e Métodos

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 número: A042/CEP/2006.

Foram utilizados 30 ratos, albinos, machos, jovens, linhagem *Wistar*, com o peso aproximado de 350g, 3 meses de idade, provenientes do Biotério da Anilab (Animais de Laboratório) da cidade de Paulínia do estado de São Paulo.

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

O equipamento utilizado no estudo foi um LED (640 ± 20nm), modelo Star Red LED[®] (Microdont), com potência de 100 mW, área igual a 0,5 cm² de diâmetro em contato direto com a pata do animal. O tempo empregado foi de 120 s, obtendo-se uma dose final de 20 J/cm² por aplicação pontual transcutânea. Antes do início dos experimentos, o equipamento de LED foi aferido usando um medidor de potência (Model 13 PEM 001/J, Mellers Griot, Netherlands).

4.1 Grupos Experimentais

Os 30 animais foram aleatoriamente separados em seis grupos C1, L1, C2, L2, C3 e L3.

Grupo C1 (n=5): animais tenotomizados, sem tratamento (controle), sacrificados no 7^o dia pós-operatório (PO).

Grupo L1 (n=5): animais tenotomizados, tratados com LED (20J/cm²) por 6 dias, sacrificados no 7^o dia PO.

Grupo C2 (n=5): animais tenotomizados, sem tratamento (controle), sacrificados no 14^o dia PO.

Grupo L2 (n=5): animais tenotomizados, tratados com LED (20J/cm²) por 13 dias, sacrificados no 14^o dia PO.

Grupo C3 (n=5): animais tenotomizados, sem tratamento (controle), sacrificados no 21^o dia PO.

Grupo L3 (n=5): animais tenotomizados, tratados com LED (20J/cm²) por 201 dias, sacrificados no 21^o dia PO.

A tabela 1 demonstra a relação dos grupos com os dias de sacrifício respectivamente.

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

Grupo (n=5)	Tratamento	Sacrifício dias (PO)
C1	Controle	7 ^o dia
L1	LED (640nm)	7 ^o dia
C2	Controle	14 ^o dia
L2	LED (640nm)	14 ^o dia
C3	Controle	21 ^o dia
L3	LED (640nm)	21 ^o dia

4.2 Procedimento Cirúrgico

Foi realizada tenotomia total do tendão de Aquiles direto da região média do mesmo, entre a inserção do tendão e a junção miotendínea em todos os animais. Para a realização deste procedimento, todos os animais receberam por via subcutânea, um pré-tratamento com atropina (analgésico), na dose de 0,04 mL para cada 100 g de peso corpóreo, aguardando repouso de 15 minutos para o procedimento anestésico⁵⁸. A droga anestésica foi administrada em associação por via intramuscular, cetamina (cloridrato) 10% - 10 mL (Syntec) utilizando a dose de 0,1 mL para cada 100 g de peso corpóreo e xilazina (cloridrato) 2% -10 mL (Syntec) com dose de 0,1 mL para cada 100 g⁶⁰ com a utilização de seringa de insulina de 1 mL para cada animal. Em seguida foi realizada a tricotomia e limpeza da pele com álcool iodado 2% na região do tendão de Aquiles da pata direita do animal. O tendão foi exposto através de

uma incisão de 1 cm na pele e tenotomizado transversalmente na região média. Posteriormente foi realizada a sutura cutânea com fio monofilamento de poliéster 6/0 (Prolene®) e a assepsia com álcool iodado a 2%^{24,59}. Como demonstrado na figura 5.

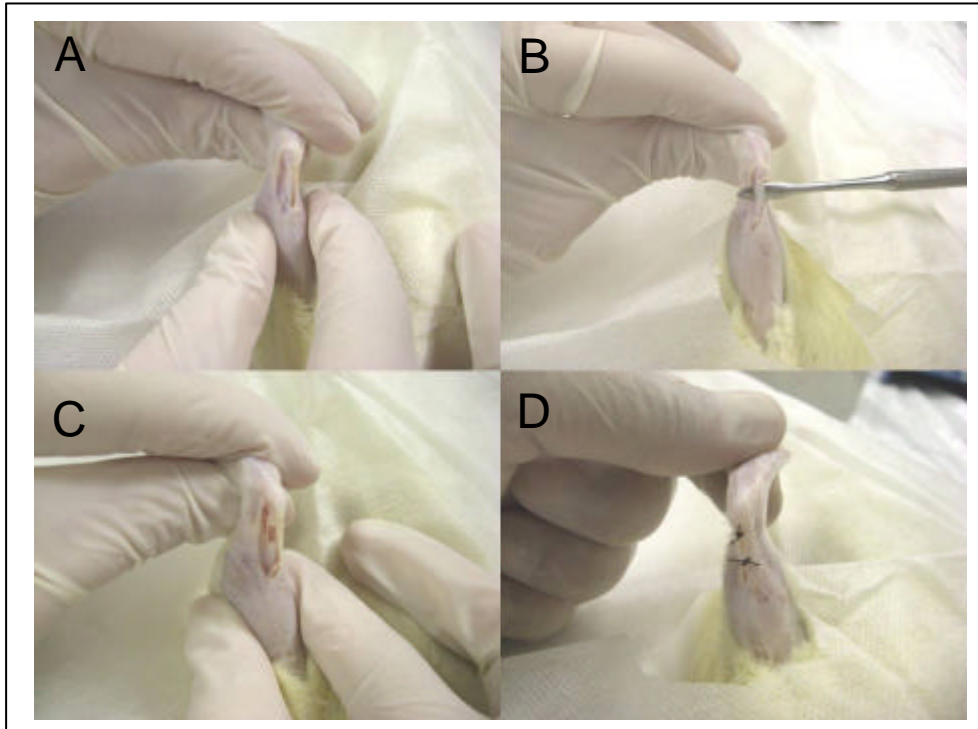


Figura 5: Incisão cutânea (A), exposição do tendão (B), secção total do terço médio do tendão (C) e sutura da pele (D).

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

4.3 Terapia com LED

O procedimento terapêutico teve início uma hora após o procedimento cirúrgico e se repetiu a cada 24 horas. Todos os animais receberam a mesma manipulação. Para o procedimento terapêutico, os animais foram posicionados em uma mesa em decúbito ventral e imobilizados manualmente. As patas traseiras direitas receberam a aplicação do LED transcutaneamente em contato direto com a ferida de forma pontual, formando um ângulo de 90° em relação à ferida (figura 6), na dosagem de 20 J/cm² por um período de 120 s. Todos os

4.5 Técnica Histológica

Após fixação, os tendões foram desidratados, clareados e inclusos em parafina, em seguida foram confeccionados os blocos para serem cortados em micrótomo semi-automático, de forma semi-seriada com secções de 5 µm de espessura, 8 cortes por amostra, para serem corados 4 cortes com Tricrômico de Masson, 4 cortes com Hematoxilina e Eosina (H&E).

4.6 Análise histopatológica

Análise qualitativa da remodelação tecidual

A partir dos cortes corados com Tricrômico de Masson e H&E realizou-se a análise qualitativa da remodelação do tecido tendíneo.

O local escolhido para a análise da remodelação, em todos os cortes, foi na região de regeneração, ou seja, na porção mais proximal das margens do tecido tenotomizado.

A gradação da remodelação tecidual na área tenotomizada foi realizada seguindo os seguintes parâmetros. (59)

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 7 A).

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 7 B).

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 7 C).

Grupo ⁺⁺⁺⁺ = Remodelação completa. Quadro de celularidade normal associada à presença de feixes de fibras colágenas maduras, orientadas de forma paralela (ângulo de 180°) com as margens da área tenotomizada. Ausência de células inflamatórias crônicas e de células fagocitárias (Figura 7 D).

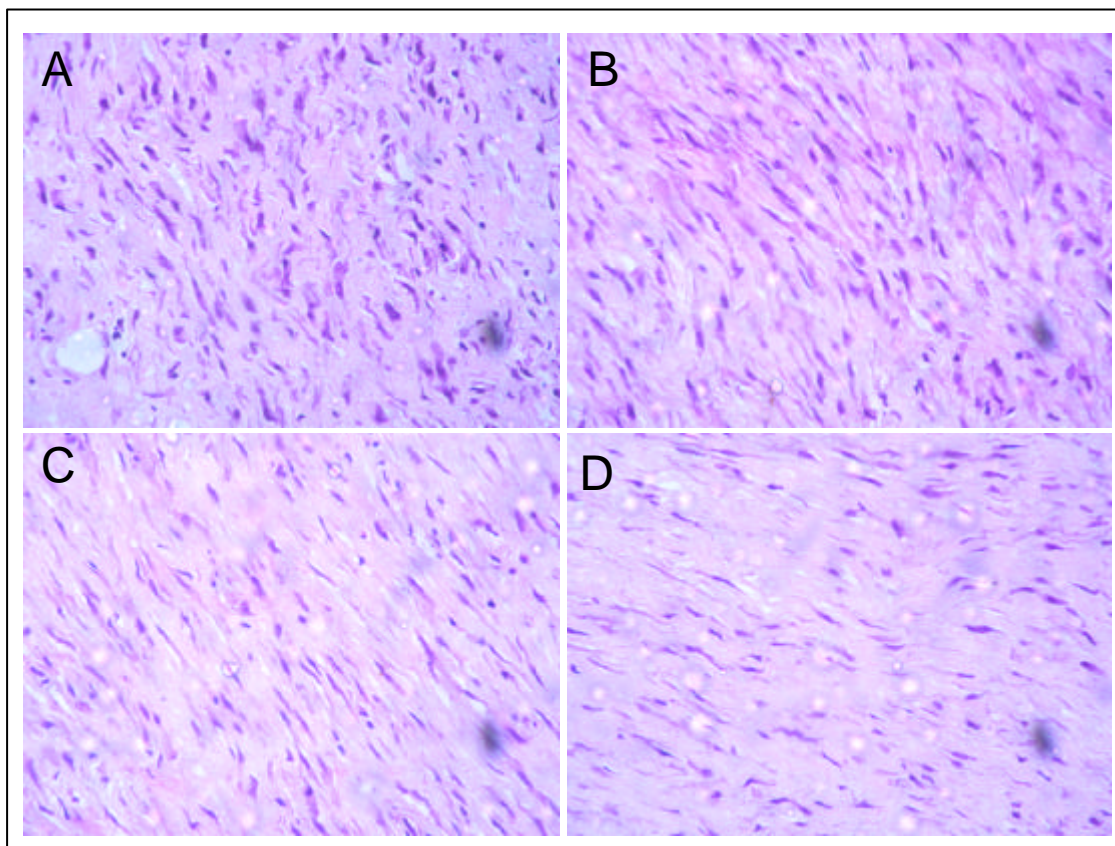


Figura 7: Gradação do remodelamento do tecido fibroso da área em regeneração dos tendões tenotomizados. Grau + (A); Grau ++ (B); Grau +++ (C); Grau ++++ (D). (Coloração Hematoxilina e Eosina. Aumento de 400X).

Análise quantitativa da remodelação tecidual

Para a análise quantitativa realizou-se a morfometria para contagem de fibroblastos, 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 a uma área de 250 μm^2 , por corte histológico corado com H&E. O local escolhido para a

contagem de fibroblastos foi o mesmo utilizado para a análise de remodelação do tecido em regeneração (Figura 8 e 9).

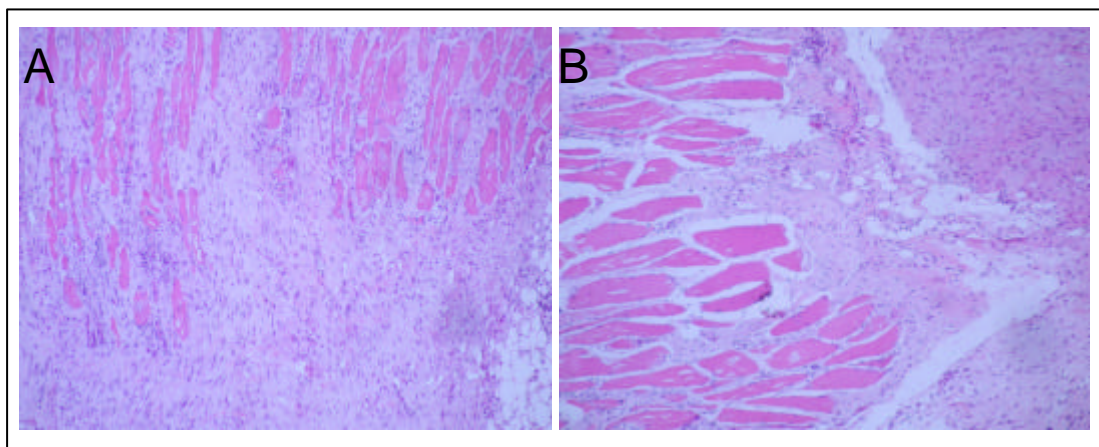


Figura 8: Local da contagem de fibroblastos. Coloração Hematoxilina & Eosina. Aumentos de 40X (A), 100X (B)

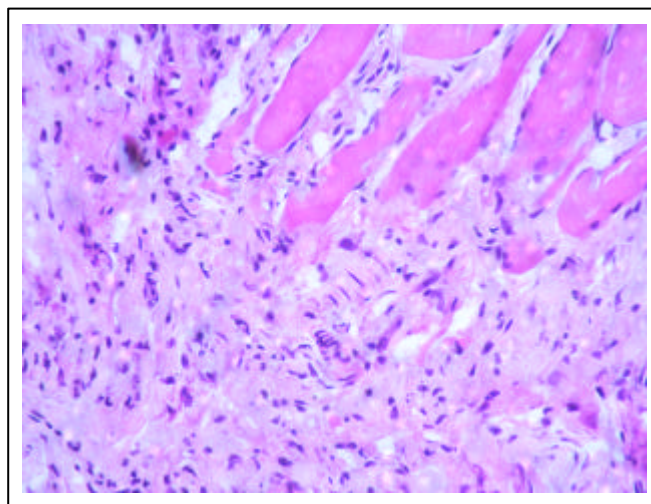


Figura 9: Local da contagem de fibroblastos. (Coloração Hematoxilina e Eosina. Aumento de 400X)

4.7 Análise estatística

Os dados obtidos da análise quantitativa foram avaliados quanto ao coeficiente de variação e a distribuição amostral para determinação do teste estatístico considerando o nível de significância estatística de 5% ($p < 0,05$)⁶¹. Realizou-se a análise estatística do número de fibroblastos dos grupos tratados e não tratados. A análise foi realizada tanto intra como inter grupos, buscando-se diferenças entre os mesmos. Para tal utilizou-se o teste de ANOVA, com pós-teste de Bonferroni. O nível de significância foi de 5% ($p < 0,05$). O programa empregado foi GraphPad Prism[®], versão 2.0.

5 Resultados

5.1 Análise qualitativa da remodelação tecidual

Na análise histopatológica do grupo C1 a gradação de remodelamento das fibras de colágeno mais observada estava na fase de ausência de remodelação (+) e em um caso na fase de remodelação inicial (++) . O grupo C1 apresentou um quadro de hiper celularidade associado à presença de fibrilas de colágeno delicadas e esparsas sem orientação específica quando relacionadas às margens da área da lesão. Foi evidenciada a presença de substância fundamental amorfa e de um infiltrado difuso de células inflamatórias crônicas e fagocitárias (figura 10 A).

O grupo L1 apresentou gradação de remodelamento das fibras de colágeno principalmente na fase de remodelação inicial (++) . Foi possível observar um quadro de hiper celularidade associado à presença de fibras colágenas delicadas e esparsas, mas com sinais de orientação em relação às margens da área da lesão. Houve diminuição de substância fundamental amorfa e de infiltrado difuso de células inflamatórias crônicas e fagocitárias. (figura 10 B).

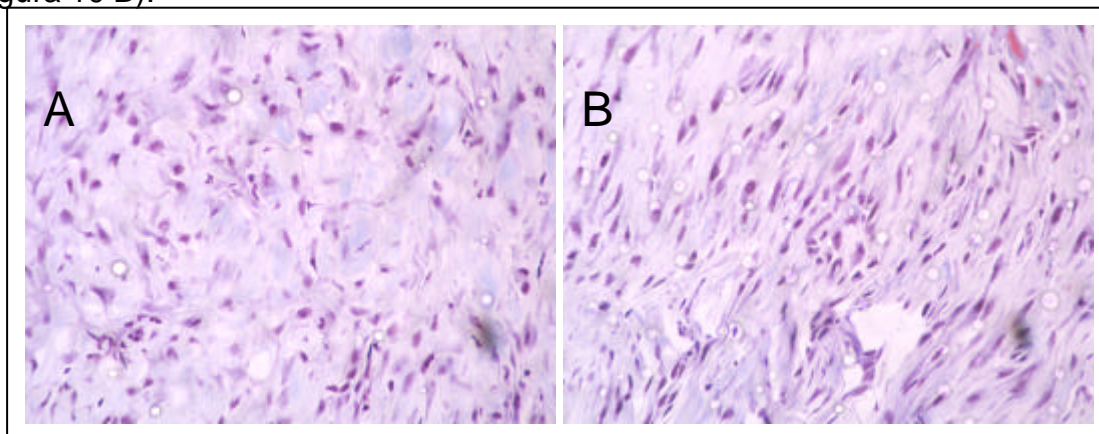


Figura 10: Fotomicrografias do tendão calcâneo de rato, sacrificado no 7º dia PO, corado com Tricromio de Masson, grupo C1 (A) e grupo L1 (B). (Aumento de 400X).

No grupo C2 a gradação de remodelamento das fibras de colágeno mais observada estava na fase de remodelação inicial (++) . Observou-se um quadro de hiper celularidade associado à presença de fibras de colágeno delicadas e esparsas que apresentavam sinais de orientação de acordo com as margens da área da lesão (figura 11 A).

A gradação de remodelamento das fibras de colágeno do grupo L2 frequentemente observada estava na fase de remodelação intermediária (+++). Apresentou celularidade próxima do normal com a presença de fibras de colágeno maduras dispostas em feixes orientados com as margens da área da lesão. Foram observadas células inflamatórias crônicas ocasionais (figura 11 B).

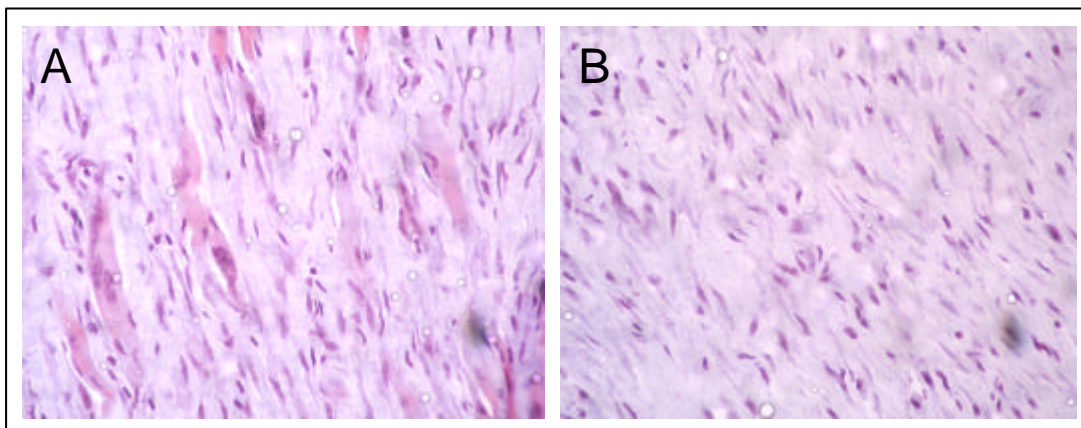


Figura 11: Fotomicrografias do tendão calcâneo de rato, sacrificado no 14º dia PO, corado com Tricômio de Masson, grupo C2 (A) e grupo L2 (B). (Aumento de 400X).

O grupo C3 apresentou gradação de remodelamento de fibras de colágeno principalmente na fase de remodelação intermediária (+++) e em um caso na fase de remodelação completa (++++)). Observou-se um quadro de celularidade próximo ao normal com presença de fibras de colágeno maduras dispostas em feixes orientados de acordo com as margens da área de lesão (figura 12 A).

No grupo L3 a gradação de remodelamento de fibras de colágeno apresentou fase de remodelação completa (++++)). Foi possível observar um quadro de celularidade normal associado a presença de feixes de fibras colágenas maduras orientadas em relação com as margens da área da lesão (figura 12 B).

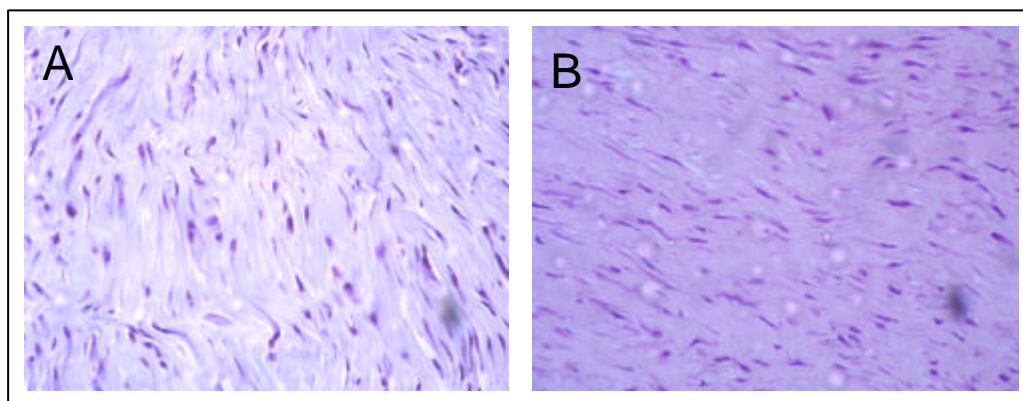


Figura 12: Fotomicrografias do tendão calcâneo de rato tratado, sacrificado no 21º dia PO, corado com Tricromio de Masson, grupo C3 (A) e Hematoxilina e Eosina, grupo L3 (B). (Aumento de 400X).

O gráfico abaixo, (figura 13), apresenta a comparação dos resultados da gradação do remodelamento tecidual dos tendões entre os grupos controle e LED nas três diferentes fases observadas.

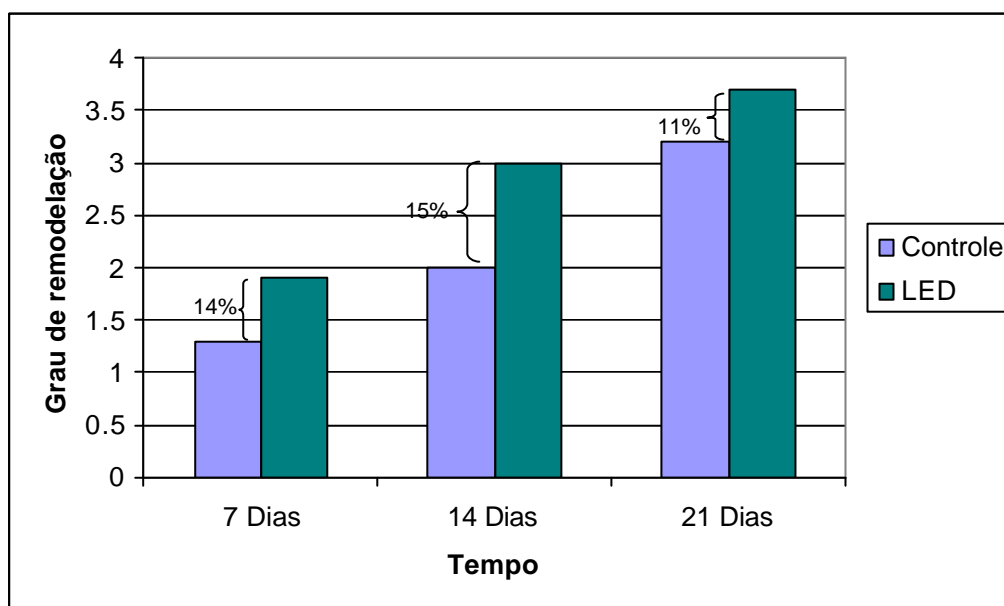


Figura 13: Comparação dos resultados do grau de remodelação entre os grupos controle e LED, obtidos através das médias dos dois corantes, nas três diferentes fases observadas. Apresentação do percentual de variação entre os grupos controle e LED.

5.2 Análise quantitativa

Na avaliação intra-grupos, os grupos (controles e tratados) apresentaram diferença estatística significativa quanto ao número de fibroblastos com o passar do tempo [C1 vs C2 ($p < 0,01$), C1 e C3 ($p < 0,001$) e

L1 e L3 ($p < 0,05$]). Na avaliação inter-grupos observou-se diferença estatística entre os grupos C1 e L1 ($p < 0,01$).

Os resultados da contagem do número de fibroblastos animais controle e LED ao 7º dia, 14º dia e 21º dia, encontram-se na tabela 2 e estão graficamente representados na figura 14. Valores menores foram encontrados no 21º dia, com menor número da média no grupo LED (L3). No 14º dia foram observados valores intermediários, com menor número da média no grupo LED (L2) e grupo sacrificado no 7º dia apresentou os maiores valores, com menor número da média também no grupo LED (L1).

Tabela 2: Médias, erro padrão e análise de variância do número de fibroblastos encontrados ao 7º, 14º e 21º dias, nos grupos controle e LED.

Contagem de Fibroblastos		
	Controle	LED
7º dia	201,5 ± 6,3 ^a	167,6 ± 5,3 ^c
14º dia	166,5 ± 11,5	160,1 ± 1,4
21º dia	161,6 ± 1,2 ^b	138,8 ± 1,4 ^b

$p < 0,05$ = a (7º dia vs 14º dia), b (7º dia vs 21º dia), c (controle vs LED).

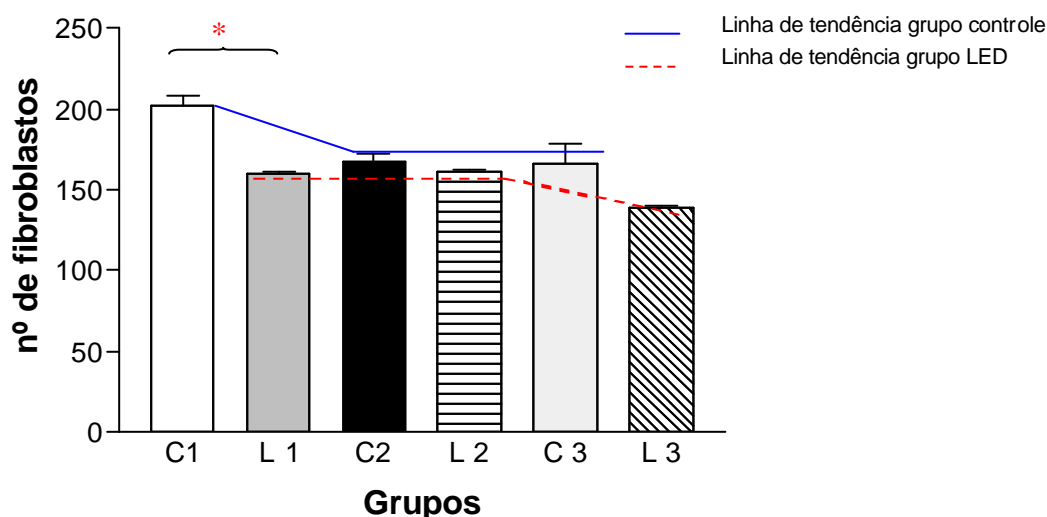


Figura 14: Comparação entre grupos tratados e controles quanto à contagem de fibroblastos nos tecidos tendíneos.

6 Discussão

A principal motivação desse estudo foi a constante busca pela otimização do tempo do processo de reparação tendínea e sua qualidade. Diversos estudos apontam avanços tecnológicos promissores na área de fototerapia com fontes luminosas, coerentes ou não⁵⁹. Porém, essa área é controversa posto que alguns estudos apresentem resultados conflitantes, justificando a necessidade de identificar os melhores parâmetros a serem utilizados na prática clínica. (32,42,45,48,41)

Diversos estudos com LED *in vitro* foram realizados, apontando para uma similaridade de seus efeitos para com a laserterapia. Contudo, há de se ressaltar as diferenças existentes em sistemas *in vivo* quando comparados aos empregados em meios de cultura, tais como presença de sistema sanguíneo, linfático, entre outros aspectos podem conduzir à diferentes reatividades entre fótons e o tecido. Logo, este estudo utilizou ratos machos adultos jovens, em fase de crescimento, para evitar interferências como climatério e idade. (62) A utilização de ratos para estudos da remodelação tendínea é freqüente, uma vez que as respostas do tecido tendíneo desses mamíferos às injúrias se assemelham às encontradas em humanos.(24,59) O tendão selecionado foi o calcâneo, conhecido como tendão de Aquiles, devido à facilidade do acesso, pois é superficial a pele e apresenta forma anatômica ampla, o que permite facilidade da execução da técnica cirúrgica.(24,59) A metodologia de irradiação primou por padrões recomendados. Sendo que esta ocorreu de forma pontual, cobrindo o feixe toda a área lesionada. A caneta emissora foi posicionada a 90° do longo eixo do tendão, em contato com a pele do animal (trancutaneamente). Segundo autores, estes cuidados permitem que a energia depositada penetre no tecido com menos perda por reflexão especular. (24,63,64)

O tecido tendinoso possui má capacidade regenerativa devido à escassez de vascularização, oxigenação e nutrição. Esses fatores são muito importantes na reparação do tecido, para a evolução adequada da cicatrização após a lesão.(16,20,38) Logo, um fator relevante deste estudo é a utilização de uma luz não coerente como auxiliar no processo de reparação tendínea, este

tipo de fonte luminosa tem características semelhantes às de fontes luminosas coerentes, como os lasers, mas são de baixo custo. (3,4,7,49,52)

Este trabalho mostra, através da análise de remodelação tecidual, que houve uma condição superior de reparação nos grupos tratados com LED, resultando em um tecido mais maduro, quando comparado com os demais grupos desse experimento. Concordando com resultados obtidos por Faria (59) em estudo similar com LED (4 J/cm²).

A média obtida através da análise de remodelação tecidual pelo grupo submetido à terapia com LED, sacrificado no 7º dia PO, foi muito próxima àquela obtida pelo grupo controle sacrificado no 14º dia PO. Já o grupo tratado com LED sacrificado no 14º dia PO apresentou média semelhante à obtida pelo grupo controle sacrificado no 21º dia PO. Enquanto nos grupos sacrificados no 21º dia PO a média do grupo LED praticamente atingiu o grau máximo de remodelação, previamente estabelecido, com qualidade bem superior se comparada à média do grupo controle. Os resultados sugerem que a qualidade da remodelação dos grupos tratados pelo LED seja atingida mais rapidamente que a dos grupos que não passaram por tratamento, embora as diferenças entre os grupos não tenha sido estatisticamente significativa. Corroborando com trabalhos anteriores que afirmam que a TLBP otimiza o processo de reparação tecidual de tendões.(24,43,44,45,59)

A maior diferença de média de remodelação entre grupos com mesmo dia de sacrifício foi nas primeiras fases (7º e 14º dia PO), nas quais os grupos tratados com LED apresentaram média expressivamente superior do grau de remodelação, acordando com Enwemeka (16), que afirmou que os primeiros dias são importantes para a qualidade da reparação tendinosa.

Os efeitos da TLBP na qualidade da remodelação do tendão podem ser atribuídos à intensa estimulação na formação de fibroblastos, na concentração de síntese de colágeno no tecido lesado e no aumento da produção de hidroxiprolina (aminoácido importante na síntese do colágeno), como observados em trabalhos anteriores.(44,45) Alguns autores observaram aceleração na formação de fibrilas, fibras de colágeno, estimulação na cicatrização do tecido muscular e uma grande diminuição da resposta inflamatória em tendões tenotomizados tratados com TLBP.(47,65,66) Esta melhoria da qualidade da reparação do tecido, pode promover melhora

significativa na biomecânica do membro acometido, no desempenho da deambulação e um aumento no ângulo da articulação^{45,67} de indivíduos tratados com terapia LED.

O processo de reparação do tecido tendíneo acontece em três fases sobrepostas, inflamatória, proliferativa e de remodelação.(1,9,16,33) Este estudo demonstrou a presença de um maior número de fibroblastos em ambos os grupos sacrificados no 7º dia PO (controle e tratado). É sabido que até o 7º dia a lesão se encontra na fase inflamatória onde ocorre a forma de cicatrização extrínseca, havendo proliferação de capilares sanguíneos e de fibroblastos que fazem migração para o local da lesão.(9,16,34) Nas fases de proliferação e de remodelação ocorre o tipo de cicatrização intrínseca, onde há a síntese do fibroblasto para a formação de colágeno(1,33,36), isso pode explicar a diminuição gradativa do número de fibroblastos nos grupos sacrificados no 14º e 21º dias PO.

Alguns estudos específicos descobriram que a TLBP pode estimular ou inibir as várias fases da cicatrização de acordo com a dosagem. Assim, com a utilização de doses apropriadas, a TLBP pode diminuir a fase inicial do processo de reparação dos tecidos e desenvolver efeitos biomoduladores nas células envolvidas com fases posteriores à inflamatória (fase proliferativa e fase de remodelação).(66,68) Assim, o presente estudo avaliou os efeitos da terapia com LED (radiação eletromagnética não coerente), com intuito de verificar se esta terapia era tão efetiva quanto à obtida com TLBP. O que não foi verificado, pois os resultados encontrados no presente estudo demonstram terapia com LED produz aceleração do processo de cicatrização após tenotomia total. O que constitui a contemplação de efeitos esperados para a radiação eletromagnética na região do vermelho, difundida no interior de tecidos lesionados⁵². Entre os grupos estudados a maior diferença encontrada, em relação ao número de fibroblastos, aparece quando se compara o grupo C1 com o grupo L1, ambos sacrificados no sétimo dia PO. O grupo estimulado com o LED mostrou diminuição significativa do número de fibroblastos, discordando de alguns autores que descreveram o aumento desse número como efeito da TLBP.(5,59,69) Fatores importantes são citados como possíveis responsáveis por esse aumento do número de fibroblastos na fase inicial de reparação do tecido, entre eles a dose se destaca. Provavelmente os

resultados obtidos estejam relacionados à elevada dose utilizada no presente estudo (20 J/cm^2), norteando novas pesquisas neste sentido.

Segundo Almeida, a densidade de potência influencia o crescimento celular, o que corrobora com os resultados obtidos por Hourel, o qual observou efeito estimulatório da TLBP nas células que receberam dose igual a 5 J/cm^2 , enquanto as células que receberam dose de 16 J/cm^2 apresentaram efeito inibitório na proliferação e atividade do fibroblasto. Igualmente aos resultados encontrados no presente trabalho, onde houve diminuição significativa do número de fibroblastos após irradiação com dose igual a 20 J/cm^2 . Esta diferença significativa no número de fibroblastos só esteve presente entre os grupos controle e tratado na fase inicial da reparação (C1 e L1), o que pode sugerir pouca influência da terapia em fases tardias, suprimindo a necessidade de tratamento com LED após 7 dias. Este aspecto proliferativo poderia ser considerado negativo caso a remodelação não tivesse se apresentado superior nos grupos irradiados em relação ao controle. (70,17)

Diante dos achados bibliográficos foi possível verificar que muitos dos resultados reportados por outros autores são similares aos do trabalho desenvolvido. Isso nos permite afirmar que os resultados obtidos pela fotobiomodulação, com a utilização de uma fonte emissora de luz não coerente, são semelhantes aos obtidos com a utilização dos vários tipos de laser de baixa potência, os quais possuem coerência, mas que se perde com o decorrer da profundidade do tecido.

Faria, em estudo que comparou a utilização do LED com um laser de baixa potência (sem variação de parâmetros), observou maior eficácia do LED na reparação tecidual de tecido tendinoso em comparação ao laser. Portanto, pode-se observar que os efeitos do LED na prática experimental apresentam eficácia no processo de reparação tecidual de tendões. Os estudos histológicos aumentam o esclarecimento da relação de efeito entre o LED e o reparo do tecido tendíneo, permitindo a afirmação que este pode ser empregado na prática clínica. (59)

Os resultados deste estudo mostram que os efeitos da irradiação com LED otimizam o processo de cicatrização do tecido tendinoso, o que sugere, uma alternativa de baixo custo para a TLBP. A determinação do tempo de

tratamento, dose e mecanismos que influenciem na recuperação funcional dos tendões reparados são de fundamental importância para eficácia do tratamento com o LED, onde, o estabelecimento de protocolos adequados auxiliará no processo de reparo tendíneo.

7 Conclusões

Através dos resultados encontrados observou-se que o efeito da terapia com LED no processo de reparação do tendão de Aquiles de ratos:

- Otimizou a qualidade da remodelação do tecido tendíneo em todos os grupos tratados, apresentando expressiva diferença em relação aos grupos controle;

- Apresentou diferença significativa entre os diferentes dias de sacrifício, com redução gradual do número de fibroblastos em ambos os grupos e entre os grupos sacrificados no sétimo dia PO, com destaque para os grupos C1 e L1 que foram estatisticamente diferentes.

7.1 Considerações finais

Considerando os resultados obtidos através deste estudo, novas investigações podem ser realizadas, visando, estudo de novas doses de irradiação, diferentes comprimentos de onda e outras formas de tratamento e também a possibilidade do emprego desse tipo de terapia utilizando o LED em aplicações clínicas.

Referências

1. GOFFI, F. S. **Técnica cirúrgica-Bases anatômicas, fisiopatologias e técnicas da cirurgia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1996. p.126-252.
2. SCHIMITT, I. Os efeitos da radiação laser arseneto de gálio (AsGa) sobre a regeneração de tendões em cães. **Braz. J Vet Res Anim Sci**, v.30, p.145-149, 1993.
3. SOLEAR, A. M.; ANGELL-PETERSEN, E.; WARLOE, T. Photodynamic therapy of superficial basal cell carcinoma with 5-aminolevulinic acid with dimethylsulfoxide and ethylenediaminetetraacetic acid: a comparison of two light sources. **Photochem Photobiol**, v.71, p.724-729, 2000.
4. CLARK, C.; BRYDEN, A.; DAWE, R. Topical 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy for cutaneous lesions: outcome and comparison of light sources. **Photodermatol Photoimmunol Photomed**, v.19, p.134-141, 2003.
5. VINCK, E. M.; CAGNIE, B. J.; CORNELISSEN, M. J.; DECLERCQ, H. A.; CAMBIER, D. C. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. **Laser in Medical Science**, v.18, n.2, p.95-99, 2003.
6. BOULTON, M.; MARSHALL, J. He-Ne laser stimulation of human fibroblast proliferation and attachment in vitro. **Lasers in the Life Sciences**, v.1, p.125-134, 1986.
7. PONTINEN, P. Laseracupuncture. In: Simunovic Z (ed.) **Lasers in Medicine and Dentistry**. Part One: Basic Science, and Up-to-date Clinical Application of Low Energy-Laser Laser Therapy LLLT. 1ed. Rijeka: Vitgraf, 2000. p.455-475.
8. WHELAN, H. T.; HOULE, J. M.; WHELEAN, N. T.; DONOHOE, D. L.; CWIKLINSKI, J.; SHMITD, M. H.; GOULD, L.; LARSON, D.L.; MEYER, G. A.; CEVERINI, V.; STINSON, H. The NASA Light-Emitting Diode medical program – Progress in space flight terrestrial applications. **Space Technology and Applications International Forum**, p.37-43, 2000.
9. JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **TECIDO CONJUNTIVO**. Histologia básica. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p.92-124.
10. PEREZ, A. C.; MATOS, D.; MONTERO, E. F. S.; SOUZA, H. S.; BARBOSA, F. C. P.; SAADE, F.; DIP, N. Effects of sodium hyaluronate and carboxymethylcellulose membrane on collagen and fibroblast formation in bowel suture healing: experimental study in rats. **Acta. Cir. Bras.**, v. 20, n. 1, p. 15-21, 2005.

11. SIMÕES, ML; MARQUES, LO; ADUR, RC; CAVAZZANA, W; LIMA, EB. 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.
12. 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.** 1998. 134f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, Universidade Estadual de Campinas, 1996.
13. VIDAL, CB; MELLO, MLS. Matrix Extracelular. In: **Biologia celular.** Rio de Janeiro: Atheneu. 1987.p.273-304.
14. SAED, G.M.; ZHANG, W.; CHEGINI, N.; HOLMDAHL, L.; DIAMOND, M. P. Alteration of tipe I and III collagen expression in human peritoneal mesothelial cells in response to hypoxia and transforming growth factor - β 1 . **Wound Repair and Regen.**, v. 7, n. 6, p. 504-510, 1999.
15. **EXPERT Reviews in Molecular Medicine 2005**, Published by Cambridge University Press. Disponível em: <<http://www-ermm.cbu.cam.ac.uk/0500h.htm>>. Acesso em: 14 jan. 2008.
16. ENWEMEKA, C. S. Inflammation cellularity and fibrillogenesis in regeneration tendon: Implications for tendon rehabilitation. **Physical therapy**, v.69, n.10, p.816-825, 1989.
17. HOURELD, N. N.; ABRAHAMSE, H. Laser light influences cellular viability and proliferation in diabetic-wounded fibroblast cells in a dose- and wavelength-dependent manner. **Lasers Med Sci**, v.23, n. 1, p. 11-18, 2006.
18. CARRINHO, P. M.; RENNO, A. C. M.; KOEKE, P.; SALATE, A. C. B.; PARIZOTTO, N. A.; VIDAL, B. C. Comparative study using 685-nm and 830-nm Lasers in the tissue repair of tenotomized tendons in mouse. **Photomed Laser Surg**, v. 24, n. 6, p. 754-758, 2006.
19. RAISER, A. G.; PIPPI, N. L.; GRAÇA, D. L.; SILVEIRA, D. S.; BORDIN, A. I.; BAIOTTO, G. C.; RIOS, M. V. O fio de poliamida como substituto de perda segmentar do tendão calcâneo comum em cães. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v.1, n. 1, p. 23-29, 2003.
20. SMITH, JW. Blood dupply of tendons. **Am. J. Surg.**, v.109, p.272-276, 1965.
21. BIRK, D. E; TRELSTAD, R. L. Extracellular compartment in tendon morphogenesis: Collagen fibril, bundle, and macroaggregate formation. **The Journal of Cell Biology**, v.103, p.231-140, 1986.
22. MAFFULLI, N.; BENAZZO, F. Basics Science of Tendons. **Sports Medicine and Arthroscopy Review**, v.8, p.1-5, 2000.

23. WEISTEIN . **Ortopedia de Turek: princípios e suas aplicações**, 5.ed. São Paulo: Manole, 2000.
24. 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.2006.
25. MULLER, S. S.; SILVARES, P. R. A.; PEREIRA, H. R.; SILVA, M. A. M.; SARDENBERG, T.; LEIVAS, T. P. Análise comparativa das propriedades mecânicas do ligamento da patela e do tendão calcâneo. **Acta. Ortop. Brás.**, v.12, n.3, p.134-140, 2004.
26. PAAVOLA, M. **Achilles tendon overuse injuries** : Diagnosis and treatment. Academic Dissertation, Medical School, University of Tampere, Finland, 2001.
27. EVANS, H. E.; DE LAHUNTA, A. **Miller guia para dissecação do cão**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. 206p.
28. MOORE K. L, DALLEY, F. **Anatomia orientada para a clínica**. 4. ed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 518-519.
29. **Calf Muscles**, Published by Lifestyles Yahoo. Disponível em: <<http://d.yimg.com/origin1.lifestyles.yahoo.com/ls/hehelthwise/nr55552004.jpg>>. Acesso em: 10 jan. 2008.
30. MELLO, R. A. F. Avaliação morfométrica do tendão de Aquiles por ultrasonografia. **Rev. Radiol. Bras.**, v.38, n.1, p.60, 2004.
31. BROWNER, B. D.; JUPITER, J. B.; LEVINE, A. M.; TRAFTON, P. G. **Traumatismos do sistema musculo esquelético. Fratura, luxações lesões ligamentares**. São Paulo: Manole, 2003. v.2, p.2394-2395.
32. MACHADO, M. V. M.; VULCANO, L. C.; HUSSNI, C. A.; ALVES, L. G. Efeito da laserterapia em tendinite em tendão experimental no flexor digital superficial em eqüinos: Estudo histológico e ultrasonográfico. **Archives of Veterinary Science**, v.5, p.111-115, 2000.
33. MAFFULLI, N.; MOLLER, H. D.; EVANS C. H. Tendon healing: Can it be optimised? **Br J Sports Med**, v.36, p.315-316, 2002.
34. CULP, R. W.; TARAS , J. S. Indications and techniques for early postoperative motive after repair of digital flexor tendon particulary in zone II. **Reabilitation of the Hand: Sugery and therapy**, v.26, p.417-431, 1995.
35. POTENZA, A. D. Tendon healing within the flexor digital sheath in the dog. **Journal Bone Joint Surgery**, v.44-A, n.1, p.49-64, 1962.

36. MANSKLE, B. R.; LESKER, B. S. Histologic evidence of intrinsic flexor tendon repair in various experimental animals: in vitro study. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n.182, p.297-304, 1984.
37. JÓZSA, L.; KANNUS P. **Human tendons**. Champaign, Illinois: Human Kinetics, 1997. p.576.
38. KLEINERT, H. E.; SCHEPEL, S.; GILL, T. Flexor tendon injuries. **Surg Clin of North Americana**, v.61, n.2, p.267-286, 1981.
39. ELWKIL, T. F. An in-vivo experimental evaluation of He-Ne laser photostimulation in healing Achilles tendons. **Lasers Med Sci**, v. 22, p. 53-59, 2006.
40. SANTOS, F. C.; GRELET, M.; AGUILAR, R.; JAMUR, N. C.; PINTO, J. A.; FOMIN, D. S. Estudo comparativo histológico na prega vocal após incisão com instrumental a frio e com laser de CO2 em modelo animal. **Rev. Brás. Otorrinolaringol.** v.69, n.6, p.753-9, 2003.
41. NISSAN, J.; ASSIF, D.; GROSS M.D.; YAFFE, A., INDERMAN, I., Effect of low intensity laser irradiation on surgically created bony defects in rats. **Journal of Oral Rehabilitation**, v.33, n.8, p.619–924, Aug. 2006.
42. 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.
43. OLIVEIRA, P. V. **Estudo mecânico do efeito do laser HeNe em cicatrização de tendão de Aquiles de coelho**. 2002. 96f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) - Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão.2002.
44. ENWEMEKA, C. S.; REDDY, G. K. The biological effects of laser therapy and other physical modalities on connective tissue repair processes. **Laser Therapy**, v. 12, p. 22-30, 2000.
45. DEMIR, H.; MENKU, P.; KIRNAP, M.; CALIS, M.; IKIZCELI, I. Comparison of the effects of laser, ultrasound, and combined laser + ultrasound treatments in experimental tendon healing. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 35, p. 84-89, 2004.
46. REDDY, G. K.; STEHNO-BITTEL, L.; ENWEMEKA, C. S. Laser photostimulation of colla gen production in healing rabbit Achilles tendons. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.22, p.281-287, 1998.
47. PUGLIESE, L. S.; MEDRADO, A. P.; REIS, S. R. A.; ANDRADE, Z. A. The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. **Pesq. Odontol. Bras.**, v. 17, n. 4, p. 307-313, 2003.

48. MAZZANTI, A.; RAISER, A. G.; PIPPI, N. L.; BARROS, C. S. L.; BRONDANI, J. T.; MARIN, A.; SILVA, T. R.; HILLE, R.; SALBEGO, F. Z.; STIEVEN, D.; ROHDE, R.; DALMOLIN, F. Homoimplante ortotópico conservado, associado à terapia “soft laser” na reparação tenopatelar em cão. **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, p. 429-437, 2004.
49. KARU, T. I. **Cellular mechanism of low power laser therapy**. Simunovic, 2 ed. Lasers in Medicine and Dentistry. Vitagraf Rieka, 2003. p.79-100.
50. 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.
51. ZANIN, I. C. J.; GONÇALVES, R. B.; BRUGNERA, A. JR.; HOPE, C. K.; PRATTEN, J. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: in vitro study. **J Antimicrob Chemother**. v.56, n.2, p.324-330, 2005.
52. KARU, T. **Cellular mechanisms of low-power laser therapy**. Advanced Energy Medicine. 2006. Disponível em <http://www.tinnitus.us/tinakarupresentation.html> Acesso em: 22 ago. 2007.
53. BRANCALEON, L.; MOSELEY H. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. **Lasers Med Soci**, v.17, p.173-186, 2002.
54. TRELLES, M.; ALLONES, I.; MAYO, E. Er.YAG Laser Ablation of Plantar Verrucae with Red LED Therapy-Assisted Healing. **Photomed Laser Surg**, v.24, n.4, p.494-498, 2006.
55. DESMET, K. D.; PAZ, D. A.; CORRYJ. J.; ELLS T. J.; RILEY, M. T.; HENRY, M. M.; BUCHMANN, E. V., et al. Clinical and experimental applications of NIR-LED photobiomodulation. **Photomed. Laser Surg**. v.24, n.2, p.121-128, 2006.
56. SHEIKO, E. A.; SHIKHLYAROVA, A. I.; KURKINA, T. A. Low-Energy Red Light Radiation Improves Antitumor Activity of Cyclophosphamide. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v.138, n.6, p.590-592, 2004.
57. BEVILACQUA, I. M.; NICOLAU, R. A.; KHOURI, S.; BRUGNERA, A. JR.; TEODORO, G. R.; ZÂNGARO, R. A. The impact of photodynamic therapy on the viability of *Streptococcus mutans* in a planktonic culture. **Photomed. Laser Surg**. v.25, n.6, p.513-518, 2007.
59. FARIA, E. T. B. **Estudo dos efeitos da terapia com luz coerente e não coerente sobre a reparação tendínea através da espectroscopia Raman e análise histopatológica**. 2006. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba.2006.

60. MASSONE, F. **Anestesiologia Veterinária: Farmacologia e Técnicas**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. 107p.
61. MARTINS, G. A. **Estatística geral e aplicada**. São Paulo: Atlas, 2001. 417p.
62. NICOLAU, R. A.; JORGETTI, V. ; RIGAU, J.; PACHECO, MARCOS T. T. ; REIS, L. M.; ZÂNGARO, R. A. Effect of low-power GaAlAs laser (660 nm) on bone structure and cell activity: an experimental animal study. **Lasers in Medical Science, London**, v. 18, n. 2, p. 89-94, 2003.
63. BAXTER, D. **Therapeutic lasers: theory and practice**. New York: Churchill Livingstone, 1994.
64. MESTER, E.; MESTER, A. F.; MESTER, A. The biomedical effects of laser application. **Laser Surg. Med.**, v. 5, p. 31-39, 1985.
65. REDDY, G. K.; ENWEMEKA, C. S. A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues. **Clin. Biochem.**, v. 29, p. 225-229, 1996.
66. ENWEMEKA, C. S. Attenuation and penetration of visible 632.8nm and invisible infra-red 904nm light in soft tissues. **Laser Therapy**, v.13, p.95-101, 2001.
67. 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.
68. BAXTER, D. Laserterapia de baixa intensidade. In: **Eletroterapia de Clayton**. São Paulo: Manole, 1998. p. 191-210.
69. SAYGUN, I.; KARACAY, S.; MUHITTIN, S.; URAL, A. U.; SENCIMEN, M.; KURTIS, B. Effects of laser on the release of basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin like growth factor-1 (IGF-1), and receptor of IGF-1 (IGFBP3) from gingival fibroblasts. **Lasers Méd. Sci.** on line first 2007.
70. ALMEIDA, L. L.; RIGAU, J.; ZÂNGARO, R. A.; GUIDGLINETO, J.; JAEGER, M. M. Comparacion of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. **Lasers in Surgery and Medicine** v.29, n.2, p.179-184, 2001.

Apêndice A – Análise da qualidade da remodelação do tecido tendíneo

Neste apêndice são representados os resultados da gradação da qualidade do remodelamento obtida para cada grupo de animais.

Quadro A: Gradação da análise qualitativa

Grupos	Lâmina	HE	Tricrômico
C1	R1	+	++
	R2	+	+
	R3	+	+
	R4	++	+
	R5	+	+
L1	R6	++	++
	R7	++	++
	R8	++	++
	R9	++	++
	R10	+	+
C2	R11	++	++
	R12	++	++
	R13	++	++
	R14	++	++
	R15	ns	ns
L2	R16	+++	+++
	R17	+++	+++
	R18	+++	+++
	R19	+++	+++
	R20	+++	+++
C3	R21	+++	+++
	R22	+++	+++
	R23	ns	ns
	R24	++++	+++
	R25	+++	+++
L3	R26	++++	++++
	R27	+++	+++
	R28	++++	+++
	R29	++++	++++
	R30	++++	+++

+ = Ausência de remodelação, ++ = Remodelação inicial, +++ = Remodelação intermediária, ++++ = Remodelação completa, ns = não significativa.

Apêndice B – Análise do número de fibroblastos

Neste anexo são representados os resultados da proliferação de fibroblastos obtidos para cada grupo de animais em termos de suas médias e desvio padrão (DP). Os dados estão apresentados na tabela a seguir.

Quadro B: Proliferação de fibroblastos.

Ratos	Grupo					
	Controle 1	LED 1	Controle 2	LED 2	Controle 3	LED 3
1	219,08	173,92	135,67	158,92	163,42	136,25
2	212,58	175,50	186,92	158,08	159,50	140,75
3	198,50	157,83	181,00	165,00	-	136,17
4	193,17	151,75	162,58	161,50	159,58	143,50
5	184,25	179,08	-	156,92	163,75	137,33
Média	201,52	167,62	166,54	160,08	161,65	138,8
DP	6,36	5,39	11,52	1,44	1,17	1,44

Anexo A – Resultados da análise estatística do número de fibroblastos

Neste anexo são representados os resultados da análise estatística do número de fibroblastos, obtidos nos grupos tratados e não tratados, através do teste de ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Quadro A I: Dados gerais.

X Labels		A	B	C	D	E	F
Ratos		Controle 1	LED 1	Controle 2	LED 2	Controle 3	LED 3
X	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
1	1	219.1	173.9	135.7	158.9	163.4	136.3
2	2	212.6	175.5	186.9	158.1	159.5	140.8
3	3	198.5	157.8	181.0	165.0		136.2
4	4	193.2	151.8	162.6	161.5	159.6	143.5
5	5	184.3	179.1		156.9	163.8	137.3

Quadro A II: Tabela de resultados.

X Labels		A	B	C	D
Parameter		Value	Data Set-B	Data Set-C	Data Set-D
X		Y	Y	Y	Y
1	Table Analyzed				
2	dados gerais				
3	One-way analysis of variance				
4	P value	P<0.0001			
5	P value summary	***			
6	Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			
7	Number of groups	6			
8	F	14.67			
9	R squared	0.7693			
10					
11	ANOVA Table	SS	df	MS	
12	Treatment (between columns)	10270	5	2055	
13	Residual (within columns)	3081	22	140.1	
14	Total	13350	27		
15					
16	Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	P value	95% CI of diff
17	Column A vs Column B	33.90	4.529	P < 0.01	9.269 to 58.53
18	Column A vs Column C	34.97	4.405	P < 0.01	8.848 to 61.10
19	Column A vs Column D	41.43	5.536	P < 0.001	16.80 to 66.06
20	Column A vs Column E	39.95	5.033	P < 0.001	13.83 to 66.08
21	Column A vs Column F	62.72	8.379	P < 0.001	38.09 to 87.35
22	Column B vs Column C	1.074	0.1352	P > 0.05	-25.05 to 27.20
23	Column B vs Column D	7.532	1.006	P > 0.05	-17.10 to 32.16
24	Column B vs Column E	6.053	0.7625	P > 0.05	-20.07 to 32.18
25	Column B vs Column F	28.82	3.850	P < 0.05	4.185 to 53.45
26	Column C vs Column D	6.458	0.8135	P > 0.05	-19.67 to 32.58
27	Column C vs Column E	4.980	0.5951	P > 0.05	-22.56 to 32.52
28	Column C vs Column F	27.74	3.495	P < 0.05	1.617 to 53.87
29	Column D vs Column E	-1.479	0.1862	P > 0.05	-27.60 to 24.65
30	Column D vs Column F	21.28	2.844	P > 0.05	-3.347 to 45.92
31	Column E vs Column F	22.76	2.867	P > 0.05	-3.363 to 48.89

Quadro A III: Teste de normalidade.

X Labels		A	B	C	D	E	F
Ratos		Controle 1	LED 1	Controle 2	LED 2	Controle 3	LED 3
X		Y	Y	Y	Y	Y	Y
1	Number of values	5	5	4	5	4	5
2							
3	Minimum	184.3	151.8	135.7	156.9	159.5	136.2
4	25% Percentile						
5	Median	198.5	173.9	171.8	158.9	161.5	137.3
6	75% Percentile						
7	Maximum	219.1	179.1	186.9	165.0	163.8	143.5
8							
9	Mean	201.5	167.6	166.5	160.1	161.6	138.8
10	Std. Deviation	14.21	12.05	23.04	3.223	2.339	3.220
11	Std. Error	6.355	5.389	11.52	1.441	1.170	1.440
12							
13	Lower 95% CI	183.9	152.7	129.9	156.1	157.8	134.8
14	Upper 95% CI	219.2	182.6	203.2	164.1	165.3	142.8
15							
16	Normality Test						
17	KS distance	0.1840	0.2996	0.2348	0.2410	0.3016	0.2760
18	P value	P > 0.10	P > 0.10	P > 0.10	P > 0.10	P > 0.10	P > 0.10
19	Passed normality test (*=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
20	P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns
21							
22	Coefficient of variation	7.05%	7.19%	13.84%	2.01%	1.45%	2.32%
23	Geometric mean	201.1	167.3	165.3	160.1	161.5	138.8