

## Artigo original

# Efeito do laser terapêutico na cicatrização tendinosa: estudo experimental em ratos

## *Effect of therapeutic laser in tendon healing: experimental study in rats*

Marcelo Rodrigo Tavares, M.Sc.\*, Nilton Mazzer, D.Sc.\*\*, Mônica Pastorello, M.Sc.\*\*\*

\*Fisioterapeuta pela UNIFENAS,, Docente da Disciplina de Anatomia do Sistema Locomotor e Anatomia de Órgãos e Sistemas, Supervisor do Estágio em Traumatologia e Ortopedia do Curso de Fisioterapia – UNIFENAS – Campus Alfenas –MG,

\*\*Pós Doutor, Livre Docente – Professor Associado, Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor, FMRP –USP RP, \*\*\*Médica pela USP RP, Responsável pelo Setor de Patologia do Hospital da Clínicas da FMRP – USP

### Resumo

Este estudo experimental visa observar as alterações causadas pela irradiação do laser (904nm), no tendão calcâneo, em ratos. Foram utilizados 30 ratos, divididos em dois grupos, um com 20 e outro com 10 animais. Todos os animais foram submetidos à tenotomia do tendão calcâneo direito. O tratamento com laser foi iniciado após 24 horas em um dos grupos, com a dose de 4 J/cm<sup>2</sup>; e o outro grupo foi utilizado como controle. Os grupos foram divididos em subgrupos, e os animais, sacrificados em períodos distintos, no 8º e 15º pós-operatório. O tendão foi submetido à análise histológica pela microscopia de luz. Houve diferença, estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), entre controle e tratado, na deposição de colágeno e presença de células inflamatórias. Este estudo sugere que a terapia a laser, proporciona a aceleração da cicatrização na tenotomia calcânea em ratos, pelo aumento da deposição de colágeno, tanto na fase inicial, como na fase tardia do tratamento.

**Palavras-chave:** laser terapêutico, tenotomia, cicatrização.

### Abstract

The aim of this study was to observe the alterations caused by laser (904nm) in the calcaneal tendon of rats. Thirty rats were divided in 2 groups – one with 20 and other with 10 animals, all of them submitted to right calcaneal tendon tenotomy. One group started laser treatment at a dose of 4 J/cm<sup>2</sup> 24 hours after surgery, the other being used as control. Both groups were divided in subgroups, sacrificed at different times – on the 8<sup>th</sup> and 15<sup>th</sup> postoperative day, respectively. The tendon was submitted to histology analysis using light microscopy. There was a statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) between control and treated group in collagen deposition and presence of inflammatory cells. This study suggests that laser therapy accelerates healing in calcaneal tenotomy in rats by increase collagen deposition both in the early and late parts of the treatment.

**Key-words:** therapeutic laser, tenotomy, healing.

### Introdução

Vários estudos foram realizados, no sentido de minimizar os problemas da cicatrização tendinosa. Os que mais se destacam estão relacionados com a técnica cirúrgica empregada [1], mobilizações e imobilizações [2], utilização de recursos físicos para acelerar o processo de reparação tecidual [3-6].

A radiação a laser tem sido usada para acelerar os processos cicatriciais, tanto em estudos experimentais, quanto na prática fisioterapêutica [3,7,8].

Alguns autores [7-10] relatam que o efeito do laser terapêutico que mais se destaca é o cicatrizante. Este é caracterizado por três fatores principais:

a) Incremento à produção de ATP. Acredita-se que o laser eleva a produção de ATP [11], proporcionando um aumento da atividade mitótica [7-10] e um aumento da síntese de proteína, por intermédio da mitocôndria [12,13]. Tem-se, como consequência, o aumento da regeneração tecidual em um processo de reparo [7-10];

b) Estímulo à microcirculação, que aumenta o aporte de elementos nutricionais associado ao aumento da velo-

Recebido em 20 de março de 2004, aceito 15 de março de 2005.

**Endereço para correspondência:** Marcelo Rodrigo Tavares, Clínica de Fisioterapia - HUAV, Rua Geraldo Freitas da Costa, 120, 37130-000 Alfenas MG, Tel: (35)3299-3549, E-mail: marcelo.tavares@unifenas.br

cidade mitótica, facilitando a multiplicação das células [7,9];

c) Formação de novos vasos a partir dos pré-existentes [7-9,14,15].

Muitos autores [16-18] indicam a utilização do laser As-Ga para obter cicatrização dos tecidos.

Outros autores [5] demonstraram que o laser terapêutico He-Ne possui um efeito cicatrizante, através da estimulação da matriz colagenosa. Foram utilizados 24 coelhos da raça Nova Zelândia, com os quais realizou-se uma tenotomia no tendão de Aquiles, seguido de sutura. Os animais foram imobilizados e submetidos a uma dose de 1 J/dia do laser He-Ne (632,8 nm), por 14 dias, no tendão de Aquiles. No 15º dia os coelhos eram sacrificados e o tendão, excisado para posterior análise bioquímica. Observaram um aumento de 26% de colágeno, quando comparando com o grupo controle.

Baseado nestas evidências, o objetivo deste estudo foi analisar o efeito do laser terapêutico As-Ga na cicatrização do tendão calcâneo de ratos, através da microscopia de luz.

## Métodos

O aparelho de laser utilizado foi um modelo clínico portátil, de AsGa com comprimento de onda de 904 nm, e com pico de potência de 15 W, potência média de 3 a 7 mW, com a duração de pulso de 180 ns e frequência de 2000 Hz.

Foram utilizados 30 ratos albinos, machos, da linhagem Wistar, de idade adulta e peso variando de 200 a 250g. Durante o experimento, os ratos permaneceram em gaiolas de polietileno, contendo quatro animais cada, com condições de temperatura, iluminação e ventilação adequadas, e também com livre acesso à água e alimentação.

A anestesia de todos os grupos, foi realizada por inalação de éter etílico, em uma câmara de dessecação. Logo após, foi realizada a tricotomia na perna direita (região posterior) dos animais e, em seguida, foram realizadas as seguintes etapas: posicionamento do animal em decúbito ventral e fixação dos membros; anti-sepsia da pele com álcool iodado 4%; colocação de campos frenestrados; incisão longitudinal na região posterior do tendão calcâneo direito; isolamento e tenotomia total do tendão calcâneo direito na região intermédia (entre a junção miotendinosa e a inserção); fechamento da pele com sutura simples, com fio de poliéster / algodão 2-0; aplicação de álcool iodado sobre a sutura, sendo esta deixada sem curativos.

Após a cirurgia, os animais foram identificados e divididos aleatoriamente em dois grupos, um com tratamento a laser (grupo A) e outro para controle (grupo B), os quais, possuindo, respectivamente, 20 e 10 animais, subdivididos em dois subgrupos, com 10 animais (A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub>) e 5 animais (B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>).

O grupo A recebeu aplicações com o laser 24 horas após a cirurgia, com irradiações diárias por 7 dias consecutivos.

Os animais foram sacrificados no 8º e 15º dia pós-operatório e distribuídos nos grupos conforme a Tabela I.

**Tabela I** – Demonstra a divisão dos animais nos grupos, número de aplicações de laser e dia do sacrifício dos animais.

Grupos	N	AL	DS
A <sub>1</sub>	10	7	8º
A <sub>2</sub>	10	14	15º
B <sub>1</sub>	5	-	8º
B <sub>2</sub>	5	-	15º

N = número de ratos por grupo, AL = Aplicações do laser, DS = Dia do sacrifício do animal.

Os animais do grupo A, foram tratados com a dose de 4 J/cm<sup>2</sup>. O método usado foi o da aplicação direta pontual (de apenas um ponto no local da tenotomia) sobre a pele do animal. As radiações foram feitas na mesma hora do dia, observando o período de 24 horas entre as aplicações.

Cada animal foi sacrificado com dose excessiva do anestésico (éter etílico), por via respiratória. Posteriormente foi realizada a dissecação do tendão calcâneo, procurando-se preservá-lo ao máximo. Foi feito um corte rente ao osso calcâneo e outro na junção miotendinosa do músculo tríceps sural, no membro pélvico direito.

O tendão foi colocado em um cassete e mantido em álcool 70% para a fixação, com volume 10 vezes superior ao volume da peça. As lâminas dos tendões foram preparadas da seguinte forma: (a) descrição, (b) desidratação, (c) difusão com xilol, (d) impregnação com parafina, (e) inclusão e (f) microtomia.

Foram realizados cortes longitudinais do local da lesão, sendo estes cortes de cinco micras, corados por Hematoxilina de Harris/ Eosina-Floxina e Tricrômico de Masson.

As lâminas foram, então, analisadas por microscopia de luz e os resultados, registrados por uma análise semi-quantitativa da reação inflamatória, definida por: presença de células inflamatórias (macrófagos e leucócitos), fibroblastos, deposição de colágeno, neovascularização, presença de necrose e presença de microcalcificações, em graus que variam de: ausente (-), presença leve (+), presença moderada (++) e presença acentuada (+++). A presença de células inflamatórias foi classificada, também, em focal (F) e difusa (D) e a formação de novos vasos nunca era ausente e sim normal (N).

Os registros em cruzes (+), foram revertidos em valores numéricos, da seguinte maneira: 0 para (-), 1 para (+), 2 para (++) e 3 para (+++); foram também considerados valores intermediários, tais como: 0,5 para (-/+), 1,5 para (+/++) e 2,5 para (+++/+++).

A análise estatística foi feita através do teste de contraste de médias, onde a média de cruzes de cada variável foi comparada entre os grupos de tratamento e nos diferentes tempos de sacrifício. O teste *t student* foi realizado em relação à significância  $p < 0,05$ .

## Resultados e discussão

O laser AsGa 904 nm foi escolhido porque, além de possuir um maior poder de penetração, em torno de 1,4 milímetros (mm), o seu tamanho é reduzido, facilitando o manuseio. O custo do aparelho é menor (em relação aos outros presentes no mercado), ele é seguro e de simples aplicação [19].

A dose de 4 J/cm<sup>2</sup> foi utilizada por estar na faixa “3 à 6 J/cm<sup>2</sup>”, que é responsável pelo efeito cicatrizante [6,9,18,20].

Durante irradiação, a caneta do aparelho foi posicionada a um ângulo de 90°, em relação ao tendão do animal, procurando, portanto, diminuir o índice de dispersão das ondas eletromagnéticas [8]. A ponta da caneta esteve em contato direto com a pele, no sítio da lesão.

A aplicação do laser foi sempre realizada 24 horas após a lesão, com a intenção de iniciar o tratamento na fase aguda de cicatrização, portanto, observando os efeitos do laser AsGa nos eventos primários do reparo tendinoso.

No grupo tratado, houve radiação na fase aguda pelo período de 7 dias consecutivos (10 animais), e outros 10 animais foram mantidos, por mais sete dias, também consecutivos, conforme a tabela I. O tempo para intervenção laserterápica foi realizado considerando os eventos celulares e extracelulares, bem como as alterações ultra-estruturais do estágio inicial e tardio do processo de reparo [21,22].

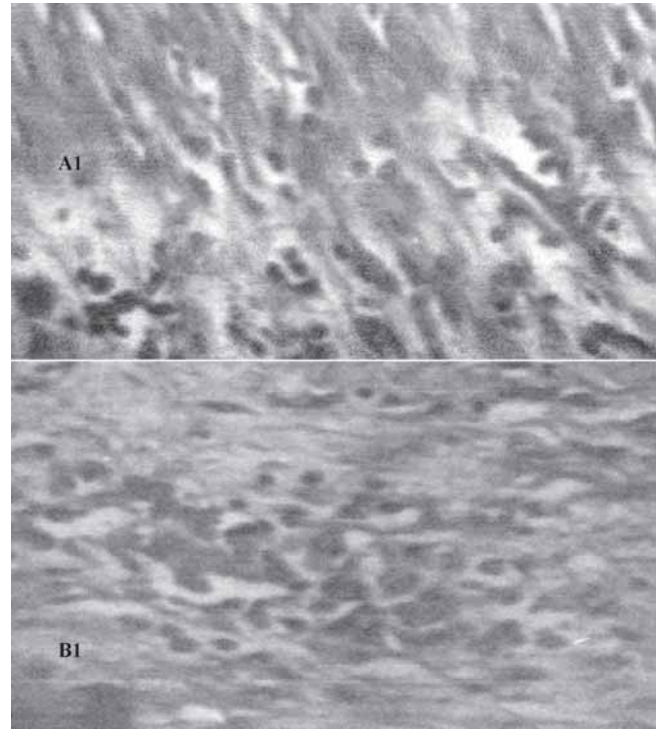
Optamos em sacrificar os animais 24 horas após a última aplicação de laser, portanto, no 8º dia pós-operatório (para analisar a fase inicial) e 15º dia pós-operatório (para analisar a fase tardia do processo de reparo tendíneo).

Houve diferença estatística muito significativa no contraste de médias da presença de células inflamatórias, entre os grupos controle (B<sub>1</sub>) e tratamento (A<sub>1</sub>) na fase inicial de reparo, prevalecendo uma maior quantidade de células inflamatórias no subgrupo B<sub>1</sub>. Na fase tardia não houve diferença estatística significativa, entretanto, em valores absolutos, no subgrupo A<sub>2</sub> verificou-se um índice maior de presença de células inflamatórias.

Verificamos, também, diferença estatística significativa no contraste de médias entre fase inicial (A<sub>1</sub>) e tardia (A<sub>2</sub>) de tratamento. Prevaleceu um índice maior de presença de células inflamatórias no subgrupo A<sub>2</sub>. No contraste de médias entre fase inicial (B<sub>1</sub>) e tardia (B<sub>2</sub>) do controle, não houve diferença estatística significativa, porém, em valores absolutos, observou-se um índice maior de presença de células inflamatórias no subgrupo B<sub>1</sub>.

Outros autores [18] também encontraram em seu experimento uma menor quantidade de infiltrado inflamatório, após a aplicação do laser. Entretanto, alguns autores [7-9,23] descrevem o efeito anti-inflamatório do laser, que encontramos em nosso experimento, ao menos na fase inicial da cicatrização.

**Figura 1** – Microscopia do tendão calcâneo de rato sacrificado no 8º PO, corados pela Hematoxilina-Eosina. Corte longitudinal, mostrando maior presença de colágeno no grupo tratado e menor presença de células inflamatórias também no grupo tratado. Aumento de 400x (A1= grupo tratamento e B1= grupo controle).



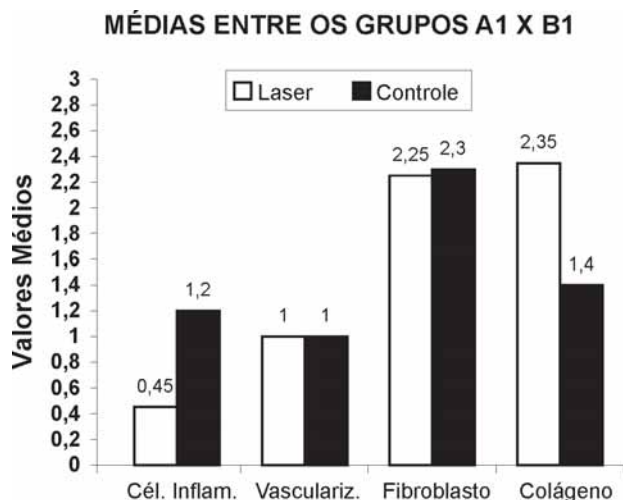
No contraste de médias entre o controle e o tratado na fase inicial e tardia, não houve diferença estatística significativa na neovascularização, com valores absolutos também iguais para A<sub>1</sub> e B<sub>1</sub>, e A<sub>2</sub> com maior vascularização do que B<sub>2</sub> (Figuras 1, 2, 3 e 4).

Comparou-se o grupo tratado na fase inicial e tardia, com relação a neovascularização, onde observou-se diferença estatística altamente significativa com prevalência de maior grau de vascularização no subgrupo A<sub>2</sub>. Nos subgrupos controle, não houve diferença estatística significativa, entretanto observou-se maior grau de vascularização no subgrupo B<sub>2</sub>.

Alguns autores [14] demonstraram que o laser promove a formação de novos vasos a partir dos pré-existentes no sítio da lesão, porém, há muitas variações em relação ao nosso experimento, como por exemplo, a dose utilizada, o tipo de laser, o animal e o tipo de tecido estudado. É importante ressaltar que outros autores [10,15] concordam com este efeito do laser.

Na comparação entre o controle e o tratado, com relação à presença de fibroblastos na fase inicial e tardia, não houve diferença estatisticamente significativa. Entretanto, houve uma pequena diferença em valores absolutos, com maior presença de fibroblastos nos subgrupos B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>.

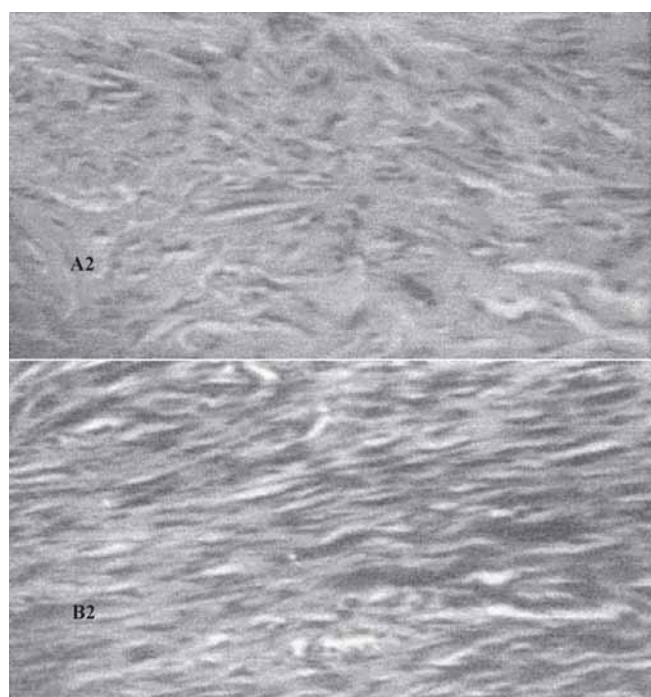
**Figura 2** – Comparação das médias entre os grupos A1 e B1 – Histograma ilustrando o comportamento das variáveis no 8° PO. Os resultados são obtidos através das médias de cada variável.



Em contraste, houve diferença estatística muito significativa, comparando-se a fase inicial e tardia do tratamento, com prevalência de maior quantidade de fibroblastos no subgrupo A<sub>1</sub>.

Já no grupo controle não houve diferença estatística significativa, porém, houve diferença em valores absolutos, sendo que o subgrupo B<sub>1</sub>, com maior presença de fibroblastos.

**Figura 3** – Microscopia do tendão calcâneo de rato sacrificado no 15° PO, corados por Tricrômico de Gomori. Corte longitudinal, mostrando maior presença de colágeno no grupo tratado. Aumento de 200x (A2 = grupo tratamento e B2 = grupo controle).



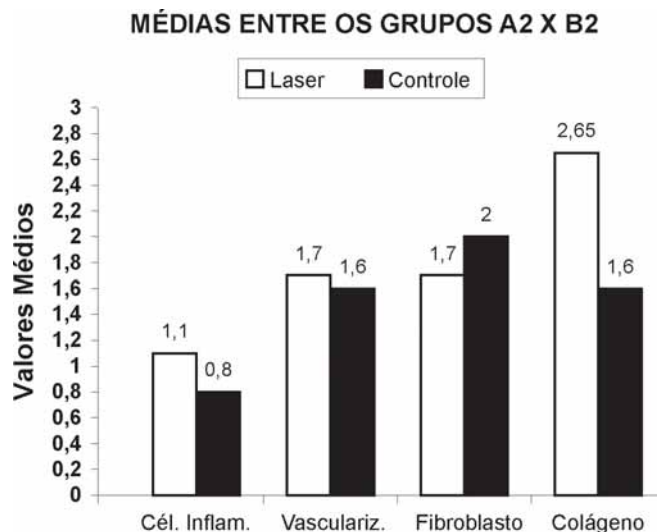
Um autor [10] afirma que o laser promove a multiplicação dos fibroblastos, o que, no entanto, não foi demonstrado em nosso experimento. Outros autores relatam a maior presença de fibroblastos na fase inicial do processo de reparo [22,24-26].

Com relação à presença de fibras de colágeno, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e tratamento na fase inicial de reparo. Também houve diferença estatística, altamente significativa, entre os grupos controle e tratado na fase tardia de reparo. Em ambos os casos, fase inicial e tardia, houve prevalência de presença de fibras colágenas no grupo tratado.

Na comparação do grupo tratado, entre fase inicial e tardia, não houve diferença estatística significativa. Isto ocorreu também na comparação do grupo controle entre fase inicial e tardia. Em ambos os casos, houve aumento de colágeno na fase tardia em valores absolutos.

Alguns autores [5] concluíram que o laser estimula a cura do tendão, através da produção aumentada de colágeno pela matriz colagenosa, porém, a dose utilizada foi menor, comparada com o nosso experimento. Vários outros autores concordam que o laser promove a deposição acelerada de fibras de colágeno na zona de lesão [10,15,25].

**Figura 4** – Comparação das médias entre os grupos A2 e B2 – Histograma ilustrando o comportamento das variáveis no 15° PO. Os resultados são obtidos através das médias de cada variável.



Foi constatada, também, a presença de células gigantes multinucleadas em dois animais. Isto se deve, provavelmente, à fusão de macrófagos, transformando-se em células epitelióides, que são o resultado de uma inflamação persistente [26]. A inflamação persistente pode ser explicada pela descarga de peso no membro lesado, já que os animais não foram imobilizados.

Encontramos, ainda, a presença de metaplasia cartilaginosa em dois animais, um no grupo controle e outro no grupo tratamento. Não encontramos na literatura nenhuma explicação para este fato.

Assim, pode-se ver que este estudo fornece evidências do efeito benéfico da irradiação por laser, com relação à cicatrização do tendão calcâneo em ratos. Embora os estudos em animais, como os delineados acima, efetivamente avancem, e diminuam a lacuna existente entre a pesquisa e a prática clínica, ainda restam alguns questionamentos a serem respondidos, tais como: dose ideal para um determinado tratamento; tipo de laser a ser utilizado; fase da inflamação ideal para a intervenção laserterápica e outros.

## Conclusão

Com base nos resultados encontrados, o laser AsGa 904nm, utilizado na dose de 4J/cm<sup>2</sup>, promoveu a deposição de colágeno no sítio da lesão na fase inicial e tardia. Além disso, minimizou a presença de células inflamatórias na zona de lesão, na fase inicial da cicatrização do tendão calcâneo de ratos.

## Referências

1. Strickland JW. Flexor tendon surgery. *J Hand Surg* 1989;14-b:261-72.
2. Enwemeka CS. Functional loading augments the initial tensile strength and energy absorption capacity of regenerating rabbit Achilles tendons. *Am J Phys Med Rehabil* 1992;71:31-8.
3. Albergel RP et al. Biostimulation of procollagen production by low energy lasers in human skin fibroblast cultures. *J Invest Dermatol* 1984;82:395-402.
4. Gum SL et al. Combined ultrasound, electrical stimulation and laser promote collagen synthesis with moderate changes in tendon biomechanics. *Am J Phys Med Rehabil* 1997;76:288-96.
5. Reddy GK, Stehno-Bittel L, Enwemeka CS. Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit Achilles tendons. *Lasers Surg Med* 1998;22:281-7.
6. 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* 1993;30:145-9.
7. Silva EC, Filho AH, Musskopf DE. Radiação Laser. In: Rodrigues EM. Manual de recursos terapêuticos. Rio de Janeiro: Revinter; 1998. p.17-35.
8. Veçoso MC. Laser em Fisioterapia. São Paulo: Lovise; 1993.
9. Colls J. La terapia laser hoy. Barcelona: Centro de Documentación Láser de Meditec; 1984.
10. Herrero C. Los efectos terapeuticos. *Boletim do Centro de Documentación Láser de Meditec* 1988;15-6:22-6.
11. Karu T, Pyatibrat L, Kalendo G. Irradiation with He-Ne laser increase ATP level in cells cultivated in vitro. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 1995;27:219-23.
12. Greco M et al. Increase in RNA and protein synthesis by mitochondria irradiated with Helium – Néon laser. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;163:1428-34.
13. Passarella S et al. Increase in the ADP/ATP exchange in rat liver mitochondria irradiated in vitro by hélium – neon laser. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;156:978-86.
14. Bibikova A, Belkin V, Oron U. Enhancement of angiogenesis in regenerating gastrocnemius muscle of the toad (*Bufo viridis*) by low-energy laser irradiation. *Anat Embryol* 1994;190:597-602.
15. González MV, Cruañas JC. Comportamiento de la luz en la interacción con los tejidos, en especial el laser de baja potencia. *Boletim do Centro de Documentación Láser de Meditec* 1988;15-16:6-21.
16. Longo L et al. Effect of diodes-laser silver arsenide-aluminium (Ga-Al-As) 904 nm on healing of experimental wounds. *Lasers Surg Med* 1987;7:444-7.
17. Anneroth G et al. The effect of low energy infra-red laser radiation on wound healing in rats. *J Oral Maxillofac Surg* 1988;26:12-7.
18. Tatarunas AC, Matera JM, Dagli MLZ. Estudo clínico e anatomopatológico da cicatrização cutânea no gato doméstico: utilização do laser de baixa potência GAAS (904 NM). *Acta Cir Bras* 1998;13:86-93.
19. Kolari PJ. Penetration of unfocused laser light into the skin. *Arch Dermatol* 1985;277:342-4.
20. Kana JS et al. Effect of low-power density laser radiation on healing of open skin wounds in rats. *Arch Surg* 1981;116:293-6.
21. Enwemeka CS. Inflammation, cellularity, and fibrillogenesis in regenerating tendon: implications for tendon rehabilitation. *Phys Ther* 1989;69:816-25.
22. Gigante A et al. Fibrillogenesis in tendon healing: an experimental study. *J Biol Res – Boll Soc. It Biol Sper Napoli* 1996;7-8:203-10.
23. Baxter D. Laserterapia de Baixa Intensidade. In: Kitchen S, Bazin S. Eletroterapia de Clayton. São Paulo: Manole; 1998. p.191-210.
24. Currier DP, Nelson RM. Dynamics of human biologic tissue. In: Enwemeka CS, Spielholz NI. Modulation of tendon growth and regeneration by electrical fields and currents. Philadelphia: F. A . Davis Company; 1992. p.231-54.
25. Baxter DG. Therapeutic lasers: theory and practice. New York: Churchill Livingstone;1994.
26. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Inflamação e reparação In: Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Patologia estrutural e funcional. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p.44 -77. ■