

WALDO LINO JÚNIOR

**EFEITO DO HÓLMIO YAG LASER SOBRE O
TENDÃO PATELAR DE RATOS APÓS 12 E 24
SEMANAS**

Campinas

2003

WALDO LINO JÚNIOR

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

**EFEITO HÓLMIO YAG LASER SOBRE O TENDÃO
PATELAR DE RATOS APÓS 12 E 24 SEMANAS**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Cirurgia, área de Cirurgia.

Orientador: Professor Doutor William Dias Belangero

Campinas

2003

49106800

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

L649e Lino Júnior, Waldo
Efeito do hólmio yag laser sobre o tendão patelar de ratos após 12 e
24 semanas / Waldo Lino Júnior. Campinas, SP : [s.n.], 2003.

Orientador : William Dias Belangero
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Laser. 2. Colágeno. 3. Tendões. 4. Cicatrizações de ferida. I.
William Dias Belangero. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	T1 UNICAMP
	L649e
V	EX
TOMBO BCI	557.35
PROC.	16-124/03
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	17/09/03
Nº CPD	

BIBID. 300929

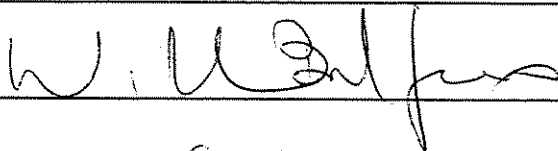
CM00188131-9

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador: Prof. Dr. WILLIAM DIAS BELANGERO

Membros:

1. Prof. Dr. William Dias Belangero



2. Prof. Dr. Guglielmo Mistrorigo



3. Prof. Dr. Alberto Cliquet Júnior



Curso de Pós-Graduação em Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 25/02/2003

DEDICATÓRIA

Essa tese representa o trabalho e o esforço de todos esses anos em que a Medicina participou e mudou profundamente as nossas vidas. Não foi apenas o trabalho de um homem se esforçando por uma vida digna, longe das pessoas queridas e só encontrando o carinho, a compreensão e o incentivo da mulher que o acompanhou.

Essa tese foi o resultado de noites inteiras trabalhando nos plantões da vida e seguindo no próximo dia, sem descanso, para assegurar o conforto, a educação e o bem estar dos que chegaram.

Essa tese se completou com o esforço mais recente de trabalhar, mesmo cansado e com mínima remuneração, no período noturno. Ela se completou com o amor e a profissão e nada pode se colocar entre a família e a dignidade, sem ser enfrentada com toda coragem e determinação.

Essa tese começou há muito tempo, precisamente na formatura, em 1958, na Faculdade de Ciências Médicas de Pernambuco. Foi abruptamente interrompida em 1962, com o meu nascimento, e só agora a completamos.

Essa tese não só é dedicada, mas pertence ao grande médico que é o meu pai e à sua inseparável companheira, que é a minha mãe maravilhosa. Eu apenas completei o que foi iniciado. Estamos apenas começando e muito mais há por vir. É um privilégio tê-los em minha vida. Muito obrigado.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. William Dias Belangero, orientador dessa tese que, a meu ver, deveria receber o título de domador. Com o seu exemplo, o Prof. Belangero conseguiu transformar a minha visão em relação ao sistema de graduação do nosso país, ou seja, de totalmente incrédulo passei a ser um dos seus mais fortes defensores. O Prof. Belangero não apenas orientou a tese em si, mas ensinou-me a ler, a avaliar a seriedade de um trabalho científico e a selecionar o que deve ser colocado em prática imediatamente. Obrigado por ter me aceito no meio acadêmico e por me orientar também como devo me portar. Espero ter aprendido a lição. Mais importante que tudo isso, porém, é que consegui um amigo a quem nunca vou esquecer;

Ao Departamento de Ortopedia e Traumatologia (DOT) da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), por ter possibilitado a realização desse trabalho;

Ao Centro de Bioterismo (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) por ter cedido os animais para o experimento;

Ao Laboratório de Investigação de Materiais Ortopédicos (LABIMO), coordenado pelo Prof. Dr. William Belangero, do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental (NMCE) da FCM-UNICAMP, pela realização de parte do trabalho experimental. Agradecimento especial às biólogas Nilza Alzira Batista e Ana Amélia Rodrigues, pela colaboração na realização desse trabalho;

Meu profundo reconhecimento pela chance que me foi concedida de aplicar a medicina de forma decente, sem diferenciação entre ricos e pobres. Esta chance me foi dada pela Real e Benemerita Sociedade Portuguesa de Beneficência de São Paulo, que também me confiou o cargo de chefe de equipe. Essa filosofia do hospital se deve, em grande parte, à visão social do Dr. Antonio Ermírio de Moraes, a quem tenho a honra de poder agradecer;

Ao Laboratório de Neurocirurgia do Hospital Beneficência Portuguesa de São Paulo, coordenado pelo Prof. Salomão Bernabou, pela gentileza em ceder o Laboratório para a realização dos procedimentos cirúrgicos experimentais;

À Sra. Vitória Régia Júlio, pela instrumentação nos procedimentos cirúrgicos e por sua dedicação absoluta;

À Pedagoga Sônia D. Rodrigues, pela colaboração na correção desse trabalho;

Ao Prof. Dr. Guglielmo Mistrorigo, que não só é um grande médico, mas também um grande homem. O Prof. Mistrorigo não só me defendeu nos momentos em que eu me encontrava mais fraco, mas também me valorizou frente aos seus pacientes. Por fim, mais que técnicas ortopédicas eu aprendi com o Prof. Mistrorigo a tocar a alma dos pacientes e a ser médico;

Ao Prof. Edmond Barras. Seria uma grande injustiça não agradecer àquele que mais ajudou no final da minha residência. Graças à sua competência, seriedade, determinação e habilidade possibilitou que eu fizesse a residência médica no Hospital Pitié Salpêtrière (Paris). O seu exemplo é muito difícil de seguir, talvez seja por isso que eu tenha me dedicado à artroscopia.

*Ainda que eu ande pelo vale das sombras da morte, não temerei mal algum, porque tu
estarás sempre comigo. A tua vara e o teu cajado me consolam.*

(Salmo 23)

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

1– Introdução	41
1.1 - Considerações gerais sobre a origem do laser.....	43
1. 2 - Princípios físicos do funcionamento do laser	44
1.2.1 – Espectro eletromagnético.....	47
1.2.2 – Propriedades da luz laser	47
1.2.3 – Potência da luz laser	48
1.2.4 – Modos de funcionamento do laser	49
1.3 – Interação da radiação laser com a matéria viva.....	49
1.3.1 – Tipos de laser	52
1.3.1.1 - Laser em estado sólido	52
1.3.1.2 – Laser em estado gasoso	53
1.3.1.3 – Laser de hólmio	53
1.4 – Características morfofuncionais dos tendões	54
1.5 - Os efeitos do laser de Ho:YAG sobre o colágeno	63
2 – Objetivo	73
2.1 – Objetivo geral.....	75

2.2 – Objetivos específicos.....	75
3 – Material e Método	77
3.1 – Material	79
3.1.1 – Animais utilizados.....	79
3.2 – Método.....	81
3.2.1 - Procedimento cirúrgico.....	83
3.2.2 – Sacrifício.....	89
3.2.3 - Análise macroscópica.....	89
3.2.4 - Análise microscópica.....	90
3.2.5 - Avaliação dos resultados.....	91
4 – Resultados	93
4.1 – Efeito do tipo de aplicação do laser sobre as dimensões dos tendões.....	95
4.1.1 – Efeito sobre o comprimento.....	95
4.1.1.1 – Grupo de 12 semanas de seguimento.....	95
4.1.1.2 – Grupo de 24 semanas de seguimento.....	96
4.1.2 – Efeito sobre a largura	99
4.1.2.1 – Grupo de 12 semanas de seguimento	99
4.1.2.1.1 – Largura na região proximal	99
4.1.2.1.2 – Largura na região distal	100

4.1.2.2 – Grupo de 24 semanas de seguimento.....	101
4.1.2.2.1 – Largura na região proximal.....	101
4.1.2.2.2 – Largura na região distal.....	102
4.2 - Efeito do tempo de seguimento.....	103
4.2.1 – Efeito do tempo de seguimento no comprimento dos tendões.....	103
4.2.2 – Efeito do tempo de seguimento sobre a largura dos tendões.....	105
4.2.2.1 - Largura na região proximal.....	105
4.2.2.2 - Largura na região distal.....	106
4.3 – Avaliação macroscópica.....	107
4.4 – Avaliação microscópica.....	109
5 – Discussão	119
6 – Conclusões	129
Referências Bibliográficas	133

LISTA DE ABREVIATURAS

μ	Micra
Å	Angstron
Ar	Argônio
C	Celsius
Ce	Cério
CEMIB	Centro de Bioterismo
cm	Centímetros
Co	Controle
CO ₂	Dióxido de carbono
D	Dalton
dp	dois pontos (Laser aplicado em dois pontos)
E	Energia
Er	Érbio
f	Frequência
H	Hidrogênio
HE	Hematoxilina-eosina
He-Ne	Hélio-neônio
Ho	Hólmio
Ho:YAG	Hólmio:Ítrio-Alumínio-Granada
Hz	Hertz
J	Joule
Kr	Criptônio
L-DP	Laser aplicado em dois pontos

L-CO	Laser aplicado de forma contínua
LASER	Light Amplification by the Stimulated Emission of Radiation
MASER	Microwave Amplification by the Stimulated Emission of Radiation
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
mm	milímetros
N	Newton
N ₂	Nitrogênio
Nd	Neodímio
Nd:Yag	Neodímio: Ítrio-Alumínio-Granada
nm	Nanômetro
OH	Hidróxido
Pm	Potência média
seg	segundos
Tm	Túlio
TM	Tricrômico de Masson
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
W	Watt
YAG	Ítrio-Alumínio-Granada
YLF	Fluoreto de Lítio-Ítrio
YVO	Ítrio-Vanádio-Oxigênio

TABELAS

Tabela 1	Distribuição dos ratos seguidos por 12 semanas	83
Tabela 2	Distribuição dos ratos seguidos por 24 semanas	85
Tabela 3	Apresentação do comprimento dos tendões após 12 semanas de seguimento: lado sem aplicação de laser, lado com aplicação de laser, aplicação contínua, aplicação em dois pontos e os respectivos deltas (diferenças).	95
Tabela 4	Apresentação do comprimento dos tendões após 24 semanas de seguimento: lado sem aplicação de laser, lado com aplicação de laser, aplicação contínua, aplicação em dois pontos e os respectivos deltas	97
Tabela 5	Apresentação da largura proximal dos tendões após 12 semanas de seguimento: lado sem aplicação de laser, lado com aplicação de laser, aplicação contínua, aplicação em dois pontos e os respectivos deltas	99
Tabela 6	Apresentação da largura distal dos tendões após 12 semanas de seguimento: lado sem aplicação de laser, lado com aplicação de laser, aplicação contínua, aplicação em dois pontos e os respectivos deltas	100
Tabela 7	Apresentação da largura proximal dos tendões (em milímetros) após 24 semanas de seguimento: lado sem aplicação de laser, lado com aplicação de laser, aplicação contínua, aplicação em dois pontos e os respectivos deltas	101
Tabela 8	Apresentação da largura distal dos tendões (em milímetros) após 24 semanas de seguimento: lado sem aplicação de laser, lado com aplicação de laser, aplicação contínua, aplicação em dois pontos e os respectivos deltas	102
Tabela 9	Valores do comprimento dos tendões (em milímetros) do lado com e sem a aplicação do laser e da diferença entre os comprimentos em função do tempo de seguimento	103

FIGURAS

Figura 1	Esquema básico de um laser (modificado de Cechini, 1995)	45
Figura 2	Espectro eletromagnético	47
Figura 3	O esquema apresenta a molécula do tropo colágeno formada por duas cadeias alfa 1 e uma cadeia alfa 2, com arranjo denominado de tripla-hélice. O esquema B ilustra as ligações intermoleculares (pontes de hidrogênio)	57
Figura 4	Disposição das moléculas de tropocolágeno para a formação de uma fibrila que, por sua vez, se unem em pacotes para a formação das fibras de colágeno.	57
Figura 5	Representação esquemática da formação do tendão desde a molécula do colágeno. (Modificado de Woo et al, 2000)	59
Figura 6	Corte longitudinal do tendão patelar do rato corado por hematoxilina eosina, onde observam-se as fibras de colágeno dispostas longitudinalmente, permeadas por células com forma de bastão e dispostas em colunas, seguindo o longo eixo do tendão. (Objetiva 20x)	61
Figura 7	Corte longitudinal do tendão patelar do rato corado pelo picrossírius, sob luz polarizada, onde observa-se a birrefringência das fibras de colágeno, dispostas longitudinalmente. (Objetiva 20x)	61
Figura 8	Tendão patelar normal do rato, observado com aumento de 8x. Nota-se o seu brilho e coloração característicos e pode-se observar a rica vascularização, com inúmeras anastomoses, tanto na sua porção proximal quanto distal, que correm no paratendão.	63

Figura 9	Equipamento de laser Ho:YAG utilizado	81
Figura 10	Aplicação do laser sobre o tendão patelar, imerso em solução salina	85
Figura 11	Detalhe da aplicação do laser, onde se nota a relação do tamanho do tendão com a ponteira	87
Figura 12	Aplicação do laser no tendão patelar na forma dois pontos	87
Figura 13	Aplicação do laser no tendão patelar na forma contínua	87
Figura 14	Apresentação do comprimento dos tendões do lado sem aplicação do laser e com aplicação do laser no grupo de animais com 12 semanas de seguimento	96
Figura 15	Apresentação do comprimento dos tendões do lado sem aplicação do laser e com aplicação do laser no grupo de animais com 24 semanas de seguimento	98
Figura 16	Apresentação dos valores da diferença entre os comprimentos, em função do tempo de seguimento.	104
Figura 17	Apresentação dos valores da diferença entre as larguras proximal dos tendões com ou sem a aplicação do laser, nos grupos de 12 e 24 semanas de seguimento.	105
Figura 18	Apresentação dos valores da diferença entre as larguras distal dos tendões com ou sem a aplicação do laser, nos grupos de 12 e 24 semanas de seguimento	106
Figura 19	Aspecto do tendão após 12 semanas	107
Figura 20	Aspecto do tendão após 24 semanas	107

Figura 21	Aspecto histológico do paratendão à esquerda, onde nota-se aumento do número de fibras e células e vasos. R, além de neoformação vascular. Verifica-se também fusão das fibras de colágeno no tendão, produzidas pelo calor. (HE, 12 semanas, L-DP, objetiva 20x)	111
Figura 22	Aspecto histológico do tendão à esquerda, com presença de grande quantidade de fibroblastos e fibras de colágeno de menor diâmetro. (TM, 12 semanas, L-DP, objetiva 20x)	111
Figura 23	Aspecto histológico do tendão, corte transversal, onde se observa as traves alargadas do tecido conjuntivo (setas), com presença abundante de vasos separando as fibras de colágeno (HE, 12 semanas, L-CO, objetiva 10x)	113
Figura 24	Detalhe da figura anterior (23), onde se observa grande quantidade de células (pontos escuros) permeando as fibras de colágeno (HE, 12 semanas, L-CO, objetiva 10x)	113
Figura 25	Aspecto histológico da porção média do tendão à esquerda, com área de calcificação (seta). Notar o grande número de células (pontos escuros) (Picrossírius, 12 semanas, L-DP, objetiva 10 x).	113
Figura 26	Aspecto histológico do mesmo campo da figura anterior, observado sob microscopia de luz polarizada. Nota-se a birrefringência das fibras de colágeno, com disposição aleatória. (Picrossírius, 12 semanas, L-DP, objetiva 10 x)	113
Figura 27	Aspecto histológico do tendão após 24 sem., onde se nota grande número de células com núcleo mais condensado e tendendo a formar colunas.(HE, 24 sem., L-CO, objetiva 20x).	115

Figura 28	Outra área da mesma lâmina da figura anterior, onde se nota maior quantidade de células em atividade metabólica mais intensa. (HE, 24 semanas, L-CO, objetiva 20x).	115
Figura 29	Aspecto histológico do tendão do grupo de 24 semanas, onde se notam fibras orientadas e células de aspecto semelhante ao lado não operado, tanto na quantidade como na morfologia (HE, 24 sem., L-DP, objetiva 20x).	115
Figura 30	Aspecto histológico do tendão da figura anterior, em corte transversal, onde se nota número regular de células. (TM, 24 semanas, L-DP, objetiva 20 x).	115
Figura 31	Aspecto histológico do tendão após 24 semanas, na coloração do picrossírius, sob microscopia de luz polarizada, onde se nota a birrefringência das fibras de colágeno, orientadas em relação ao longo eixo do tendão (Picrossírius, 24 semanas, L-DP, objetiva 20 x)	117
Figura 32	Aspecto histológico do mesmo campo da figura anterior, onde pode-se notar a presença de fibras de colágeno de menor diâmetro em outras direções. (Picrossírius, 24 semanas, L-DP, objetiva 20 x)	117

RESUMO

Os autores estudaram os efeitos do laser Hólmio:Ítrio-Alumínio-Granada (Ho:YAG) sobre as dimensões do tendão (comprimento e largura proximal e distal) e sobre a celularidade e arranjo das fibras de colágeno em 20 ratos adultos, machos, brancos (*Rattus Novergicus*) da variedade Wistar. Os animais foram divididos em dois grupos de acordo com o tempo de seguimento (12 e 24 semanas) e de acordo com a forma de aplicação do laser (contínua e em dois pontos). Utilizou-se aparelho de Laser de Hólmio (pulsátil, estado sólido, com ondas de 2,1 microns, com potência de 40 Watts, ponteira OmniTip de 30°). Após o sacrifício, foram comparadas, por meio de testes não paramétricos (considerando $p = 0,05$), as medidas do comprimento e da largura (proximal e distal) dos tendões do lado operado e do lado não operado. A medida do comprimento do lado operado foi significativamente maior nos dois grupos de seguimento, quando comparada com o lado não operado, porém, não houve diferença significativa dessas medidas em função do tipo de aplicação do laser. Do mesmo modo, a medida da largura, tanto na região proximal quanto distal, foram significativamente maiores no lado operado nos dois grupos de seguimento, sem apresentar diferença significativa em função do tipo de aplicação. Quando se compararam as medidas nos dois grupos de seguimento, o comprimento e a largura distal tenderam a ser maiores após 24 semanas, enquanto que a largura, na região proximal, foi significativamente maior nesse grupo. Quanto à avaliação microscópica subjetiva, tanto nos cortes longitudinais como transversais, pôde-se verificar aumento do número de fibroblastos, principalmente no grupo de 12 semanas. A concentração média de fibroblastos nos tendões com 24 semanas de seguimento foi considerada como intermediária entre o grupo de 12 semanas e os

tendões não operados. Na região entre os fascículos, o tecido conjuntivo era exuberante no grupo com 12 semanas, com neoformação vascular evidente. À microscopia de luz polarizada, no grupo com 12 semanas, foram encontradas regiões onde as fibras de colágeno apresentavam hialinização, mescladas com regiões onde as fibras estavam regeneradas, dispostas de forma não paralela com o longo eixo dos tendões. No grupo de 24 semanas, as fibras de colágeno se apresentavam com disposição regular e paralela ao longo eixo do tendão.

ABSTRACT

The authors have studied the effects of Holmium:Yttrium-Aluminum-Grenade (Ho:YAG) laser on tendon sizes (proximal and distal length and width) and on the cellularity and arrangement of collagen fibers in 20 Wistar variety, male, white, adult rats (*Rattus Novergicus*). The animals have been divided into two groups, according to the follow-up time (12 and 24 weeks) and pursuant to the for form of laser application (continuous or two-point). A Holmium laser (pulsed, solid state, 2.1 micron waves, 40 watts, OmniTip 30° tip) apparatus was used. After the animals were sacrificed, the proximal and distal length and width of the operated size of such rats were compared to those of the non-operated size by means of non-parametric testing (considering $p = 0,05$). The length in the operated size was significantly bigger for both follow-up groups, when compared to the length of the non-operated size, however there was no significant difference in such measures in function of the type of laser application. In the same manner, the width, both in the proximal and distal regions, was significantly bigger in the operated size in both follow-up groups, without showing any significant difference whatsoever in function of the type of application. When the measures in both follow-up groups were compared, distal length and width showed a trend to become bigger after 24 weeks, while width in the proximal region was significantly bigger in this group. As for the subjective microscopic evaluation, both in longitudinal and cross sections, it was possible to observe an increase in the number of fibroblasts, mainly in the 12-week group. The average fibroblast concentration in the tendon with 24-week follow-up was deemed to be intermediate between the 12-week group and non-operated tendon. The conjunctive tissue was exuberant in the region amidst the fasciculi for the 12-week group, with evident vascular neoformation. At the examination with polarized microscope, in the 12-week group, regions were found where collagen fibers showed hyalinization, mixed with regions where fibers were regenerated, arrange in a non-parallel pattern in relation to the long tendon axle. In the 24-week group, collagen fibers were regularly arranged, parallel to the tendon axle.

INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

1.1 – Considerações gerais sobre a origem do laser

LASER é uma sigla derivada das palavras “Light Amplification by the Stimulated Emission of Radiation” e o seu desenvolvimento foi consequência de uma série de descobertas na área da Física. Dentre essas descobertas pode-se citar a descrição do átomo, por Neil Bohr's (1913), e a hipótese lançada por Albert Einstein (1917) de que existiria um tipo especial de luz que poderia ser emitida por estímulo. Essa idéia, porém, ficou esquecida até depois da 2ª Guerra Mundial, quando Charles H. Townes da Universidade de Colúmbia, em 1951, desenvolveu um equipamento denominado Microwave Amplification by the Stimulated Emission of Radiation (MASER). (HECHT, 1988)

Posteriormente, por volta de 1957, Townes e Arthur Schawlow, dos Laboratórios da Bell Telephone, escreveram um artigo definindo as condições necessárias para amplificar a emissão de ondas da luz visível (SCHAWLOW e TOWNES, 1958). Na mesma época, Gorgon Gould, um recém graduado de 37 anos da Universidade de Colúmbia, publicou uma série de notas a esse respeito. Três décadas depois, Townes e dois soviéticos, Nikolai Basov e Aleksander Prokhorov, dividiram, em 1964, o prêmio da Física pelos estudos pioneiros sobre os princípios do maser/laser. (HECHT, 1988)

Entretanto, a criação do laser só veio a ocorrer em 16 de maio de 1960, quando Theodore Maiman, trabalhando no Laboratório de Pesquisa Hughes, em Malibu (Califórnia), observou que a excitação de um cristal sintético de rubi com lâmpada de “flash” fotográfica, emitia luz na faixa do visível com espectro de onda de 694 nanômetros (nm). (MAIMAN, 1960)

Logo após, surgiram trabalhos que passaram a aplicar o laser na área médica para o reparo de retinopatias periféricas e tratamento de tumores malignos (McGUFF et al., 1965; GOLDMAN et al., 1965)

Após o advento do laser de rubi, surgiram os laser de Hélio-Neônio (He:Ne) e de Dióxido de carbono (CO₂) (CECCHINI, 1995) A partir de 1965, vários outros tipos de laser foram desenvolvidos, como os de Argônio (Ar), Criptônio (Kr), Neodímio (Nd), Hólmio (Ho).

1.2 – Princípios físicos do funcionamento do laser

Teoricamente, cada molécula ou átomo pode apresentar diferentes estados de energia. Quando um átomo cai de um nível alto para um nível mais baixo, ele libera energia na forma de fótons, cujo comprimento de onda é função da diferença entre os dois níveis de energia e difere, portanto, de um átomo ou de uma molécula para outra. O princípio do laser é basicamente fornecer grande quantidade de energia para uma substância, criando, assim, uma população de átomos com um estado energético bastante elevado. Desse modo, um átomo com alto nível de energia libera espontaneamente um fóton, que pode atingir um outro átomo também com elevado nível de energia, liberando assim um outro fóton com o mesmo comprimento de onda e a mesma direção do primeiro fóton. Essa emissão de fótons estimulada é assim mantida pela fonte de energia e pela câmara óptica ressonante (O'BRIEN e MILLER, 1990). Sendo um dos espelhos da câmara óptica ressonante semitransparente, ou com um orifício, uma fração do campo eletromagnético atravessa essa região e se constitui no feixe laser, enquanto que a fração restante continua aumentando a intensidade do campo na câmara. A retirada da energia do meio ativo é um processo contínuo, mantido pelo ressonador óptico, que também tem a função de filtrar uma ou várias frequências do comprimento de onda da banda de emissão do meio ativo. (CECCHINI, 1995)

Do ponto de vista teórico, para que o laser possa ser emitido, há necessidade da presença de um meio ativo (cristal, gás ou outro material), de um mecanismo de bombeamento de energia (luz do “flash” ou de outra fonte) e de uma câmara ressonante. (Figura 1)

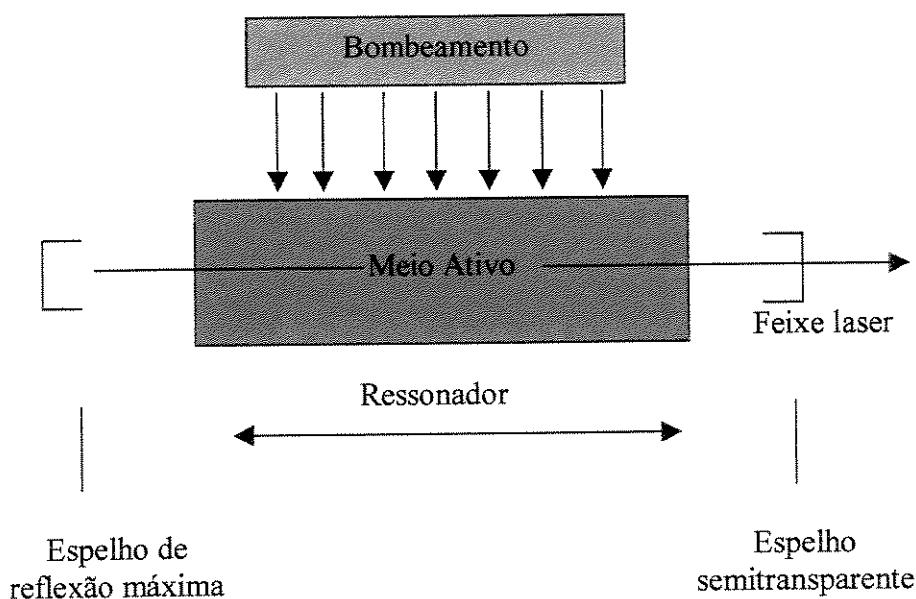


Figura 1: Esquema básico de um laser (Modificado de Cecchini, 1995)

O meio ativo é a base atômica ou molecular do sistema e pode ser de natureza sólida (laser de rubi, hólmio, neodímio, etc..), líquida (laser de corante orgânico) ou gasosa, que inclui a maioria dos tipos de laser (laser de gás carbônico, argônio, criptônio). O bombeamento consiste na transferência de energia (fótons) para o meio ativo. O tipo de bombeamento varia com o tipo do meio ativo: os laser de rubi, neodímio, hólmio e os de corante utilizam o bombeamento óptico com lâmpadas, enquanto que os laser gasosos utilizam bombeamento eletrônico com descargas elétricas. (CECCHINI, 1995)

O meio ativo está localizado em uma câmara denominada de “cavidade óptica ressonante”. Esse ressonador óptico é formado por dois espelhos refletores paralelos, colocados frente a frente. Os espelhos encaminham a onda eletromagnética em várias passagens de ida e volta sobre o meio ativo, amplificando o campo eletromagnético na câmara.

1.2.1 – Espectro eletromagnético

O espectro eletromagnético compreende ondas de comprimento longo (hertizianas), como as ondas de rádio, até ondas de menor comprimento, como a radiação ionizante dos Raios X e γ (gama). Nessa faixa situam-se as microondas, o infravermelho, o visível e ultravioleta. Essas radiações têm a mesma natureza, mas com quantidade de energia diferentes. A radiação luminosa abrange as freqüências do infravermelho, visível e do ultravioleta. A região do visível, que é observada pelo olho humano, tem comprimentos de onda que variam de 400 nm (violeta) até aproximadamente 700 nm (vermelho). Os pigmentos das células sensoriais da retina absorvem os comprimentos de onda de 447, 540 e 577 nm e o máximo da visão ocorre ao redor de 550 nm. (Figura 2)

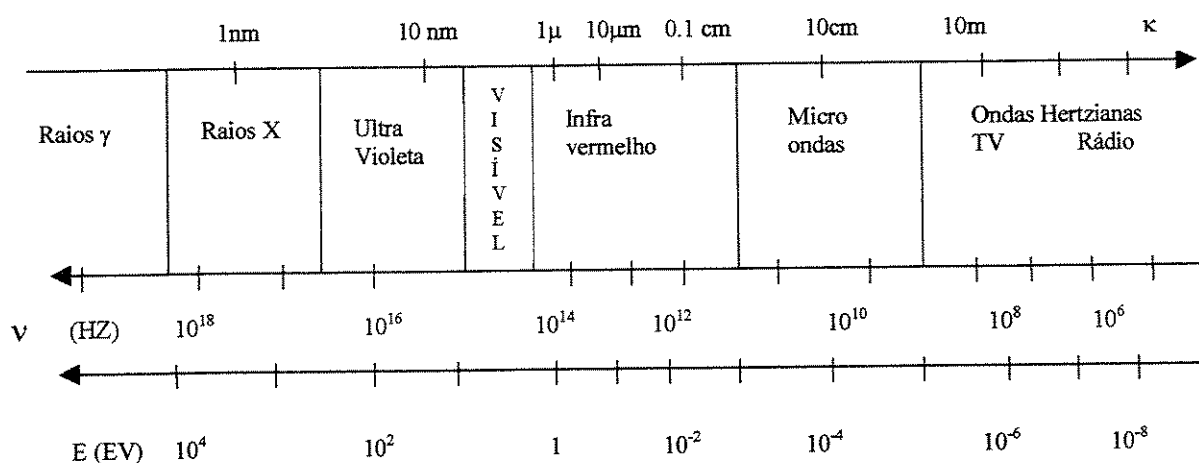


Figura 2: Espectro eletromagnético (Modificado de Cecchine, 1995)

1.2.2 – Propriedades da luz laser

As propriedades físicas importantes da luz laser que a diferem das demais fontes luminosas são a coerência, a monocromaticidade, a direcionalidade, a colimação e a brilhância.

A coerência é a propriedade mais bem conhecida e importante da radiação laser. Significa que as ondas estão em fase, isto é, seus picos e depressões estão paralelos

entre si. Tal característica não ocorre com a luz comum, onde diversas ondas são emitidas e cada uma delas tem seu comprimento de onda e frequência. Do ponto de vista da aplicabilidade médica, essa característica é importante, pois permite que se obtenham enormes concentrações de energia por unidade de superfície. (HECHT, 1988)

A monocromaticidade é caracterizada pela emissão de fótons com o mesmo comprimento de onda e, portanto, com uma única cor. Isso diferencia a luz laser da luz natural, que é constituída por uma mistura de vários comprimentos de onda, o que pode ser demonstrado por sua decomposição, quando atravessa um prisma. No entanto, a monocromaticidade nos raios laser não é absoluta, sendo que a maioria emite luz com variações de comprimento de onda, mas dentro de uma pequena margem. Essa maior especificidade do comprimento de onda também facilita a aplicação do laser, já que torna mais previsível o seu efeito em diferentes tecidos. (HECHT, 1988)

A direcionalidade e a colimação são resultados do efeito dos espelhos da câmara ressonante, que emitem luz paralela e, portanto, com pequena divergência. Essa propriedade dá lugar a muitas aplicações, como por exemplo, a sinalização de uma direção no espaço para alinhar elementos, ou a transmissão de energia luminosa à distância. (HECHT, 1988)

A brilhância é uma característica dependente das outras características, como a direcionalidade e a monocromaticidade que concentram grandes quantidades de energia por unidade de superfície, fazendo com que o laser apresente brilhância consideravelmente maior que a mais brilhante das fontes clássicas de luz não coerentes. (HECHT, 1988)

1.2.3 – Potência da luz laser

A potência do laser é medida em watt (W) (energia/unidade de tempo – Joule/segundo), mas do ponto de vista clínico, é importante que se conheça a quantidade de energia que pode atingir um determinado ponto, que é denominada de densidade de energia, ou irradiância (Joule/cm²). Quanto menor o diâmetro, maior a densidade de energia

e o diâmetro depende da distância focal das lentes, do modo de emissão e do comprimento de onda do laser.

1.2.4 – Modos de funcionamento do laser

A radiação laser pode ser contínua ou pulsada, dependente do tipo de bombeamento e da fonte de energia. Os laser gasosos são exemplos de laser que emitem, em geral, ondas contínuas. No entanto, quase todos os laser podem funcionar no modo pulsado. O laser pulsado tem duração que varia entre centenas de microssegundos a dezenas de milissegundos. Nesse caso, a potência média é calculada pela equação $P_m = Ef$, onde P_m é a potência média, E a energia e f a frequência de repetição dos pulsos (HECHT, 1988)

1.3 – Interação da radiação laser com a matéria viva

Quando a luz laser (energia) incide sobre um tecido, quatro fenômenos ópticos podem ocorrer: reflexão, transmissão, espalhamento e absorção. Assim, a parte da luz que é refletida pela superfície e a parte transmitida não interagem com o tecido. O feixe espalhado pode ser absorvido por uma área grande, produzindo efeitos mais difusos à distância. Por outro lado, a energia absorvida do laser, quando interage com os tecidos, pode ser transformada em energia térmica, sendo responsável pelo efeito específico (terapêutico) do laser no tecido. A resposta dependerá, por um lado, das características próprias do tecido e, por outro, do tipo do laser utilizado, em função do comprimento de onda, da potência e da duração da sua aplicação. Dessa forma, é importante que se conheçam os fatores que modificam, quantitativamente, essa absorção de energia. (BASS et al., 1992; CECCHINI, 1995)

Comprimentos de onda do infravermelho ou abaixo dele, emitidos pelo laser de CO₂ (10,65 µm) e pelo laser de Hólmio:Itró-Alumínio-Granada (Ho:YAG - 2,14 µm), são absorvidos principalmente por tecidos ricos em água. (MILLER e TRUHE, 1993; PICK,

1993) Laser próximos ao infravermelho e da luz visível, como o de Neodímio:Ítrio-Alumínio-Granada (Nd:YAG - 1.06 μm) e o de Argônio (Ar - 515 nm) são pouco absorvidos pela água, mas são rapidamente absorvidos por pigmentos como hemoglobina e melanina. Esses tipos de laser são muito eficientes em tecidos ricos em pigmentos, como a retina, a mucosa gástrica e as lesões cutâneas pigmentadas. Por outro lado, são muito pouco eficientes na cartilagem, nos ligamentos e no núcleo pulposo intervertebral. (KUTSCH, 1993; YARBOROUGH, 1992) Os laser do ultravioleta são absorvidos principalmente por proteínas e essa absorção ocorre por um mecanismo fotoquímico, no qual as ligações moleculares das proteínas são quebradas e o tecido é convertido em um plasma gasoso que, por sua vez, é expelido a uma velocidade supersônica.

As propriedades ópticas do tecido músculo esquelético têm sido estudadas com a espectrofotometria e o menisco humano tem pico de absorção entre 280 e 340 nm, que está na faixa do comprimento de onda da luz ultravioleta. Há também picos de absorção para a luz infravermelho em razão da presença de água. Assim, os laser de CO₂ e de Érbio:Ítrio-Alumínio-Granada (Er:YAG) podem ser bem absorvidos pelo menisco. O laser de Ho:YAG (2,1 μm) e do Nd:YAG (1,44 μm) podem ser utilizados para o corte e a ablação de menisco e da cartilagem hialina. (SHERK, 1993).

Três sistemas laser têm sido utilizados em cirurgia ortopédica: o laser do CO₂, o Nd:YAG e o Ho:YAG. O laser de CO₂ foi o primeiro a ser usado em cirurgia artroscópica no início dos anos 80, mas a necessidade de se manter as articulações distendidas com gás e o risco de enfisema subcutâneo e de sinovite induzida pelo CO₂ fizeram com que esse sistema perdesse popularidade. (MEDVECKY et al., 2001)

Posteriormente, foi introduzido o laser de Nd:YAG, que usava ponteira de safira e permitia o contato com o tecido, evitando assim o escape de energia em até 40%, nos procedimentos sem contato, e as lesões térmicas extensas produzidas ao redor da área atingida pelo laser. Para se evitar esse problema, foi introduzida uma ponteira com um cristal de safira sintético e fisiologicamente neutro, com grande resistência mecânica, baixa condutividade térmica e alta resistência à fusão (2030° - 2050° C). Assim, o cristal era aquecido pela luz laser e podia transferir o calor para o tecido com maior margem de

segurança e precisão, já que a perda de energia era menor que 5% e, com isso, a potência de saída do laser para se obter o efeito terapêutico era reduzida entre 75 a 90% da potência usada com as ponteiros que não faziam contato. (O'BRIEN e MILLER, 1990).

Com essa modificação, houve redução da lesão térmica nos tecidos adjacentes e a profundidade máxima atingida pelo laser passou a ser de 0,2 mm. A medida dessa profundidade é dada pela distância que ocorre 63% de absorção da sua luz emitida pelo laser. No caso do laser de Nd, que é um dos que têm maior comprimento de onda, a penetração também é grande, atingindo cerca de 1 mm, enquanto que com o laser de Ho a penetração é menor do que 0,5 mm. (MEDVECKY et al., 2001)

A extensão do efeito térmico do laser depende da densidade ou potência do laser, do tamanho da ponta da ponteira e da duração da aplicação. A potência de saída do laser é medida em W e a densidade é medida em Watt/cm² (W/cm²) e está diretamente relacionada com o efeito térmico produzido sobre o tecido. A área atingida pela luz do laser também é um fator importante e relacionado com a sua penetração. O efeito térmico pode ser maior, quanto maior for a potência empregada, ou quanto menor for o tamanho da área atingida. O fato do laser ser pulsado ou contínuo também é importante, visto que a difusão do calor para os tecidos vizinhos deve ser a menor possível, motivo pelo qual o laser de modo pulsado é preferido, pois permite o esfriamento do tecido de acordo com a frequência do pulso. No entanto, quando a frequência da emissão for muito rápida, o resfriamento pode não ocorrer de maneira adequada, acumulando-se calor sucessivamente, de forma que o resultado final pode ser semelhante ao do laser contínuo. (ARNOCZKY e AKSAN, 2000).

O'BRIEN e MILLER (1990) apresentaram as vantagens do uso do laser de Nd: YAG com a ponteira de safira, na realização de meniscectomia, por via artroscópica, em 15 pacientes. Os autores chamaram a atenção para as vantagens do laser, em relação aos métodos convencionais, principalmente no acesso à região do terço posterior do menisco medial. Do ponto de vista pós-operatório, não encontraram diferenças na evolução clínica dos pacientes tratados pelo laser e nem edema no pós-operatório. Os pacientes retornaram às suas atividades completas após 3 semanas. Entre os problemas técnicos observados, os autores chamaram atenção para possibilidade da quebra da ponteira de safira e do fato de

terem tido alguma dificuldade na passagem da fibra óptica através dos portais. Concluíram os autores que o laser Nd:YAG tinha vantagens sobre o bisturi convencional, eletrocautério e o laser de CO₂ e indicaram a expansão desse tipo de tratamento para a ressecção, por via artroscópica, do acrômio nas síndromes do impacto.

Em 1987, o Ho:YAG foi introduzido para as cirurgias artroscópicas, utilizando, pela primeira vez, a fibra óptica e um meio aquoso. Esse fato foi extremamente importante para que esse tipo de laser passasse a ser o de escolha nas cirurgias artroscópicas do aparelho locomotor (THABIT, 1998)

1.3.1 – Tipos de laser

1.3.1.1 – Laser de estado sólido

Apresentam como meio ativo um cristal, ou um vidro, e o bombeamento óptico é feito por lâmpadas, ou por outro laser.

Dentre os mais conhecidos temos o de rubi, desenvolvido por MAIMAN (1960), cuja emissão é da ordem de 694,3 nm e 692,8 nm. Foi usado, inicialmente, na oftalmologia, para o tratamento da retina, e na dermatologia, para tratamento de lesões ligamentares e tatuagens.

Os raios laser de Nd (Y₂ Al₅ O₁₂, Y Li F₄, Y Al O₃) são de estado sólido mais usados. Emitem fluorescência no infravermelho não visível em três comprimentos de onda (0,9 µm, 1,06 µm e 1,35 µm). O laser Nd:YAG é transmitido pela água e, por esse motivo, tem sido muito usado na oftalmologia (cirurgia de catarata).

O laser de érbio emite comprimento de onda da ordem de 2,94 µm e, por ser bem absorvido pela água, não é possível utilizar para a sua transmissão fibras ópticas de quartzo ou sílica, por terem alto teor de hidróxido (OH). Como esse laser é bem absorvido pela água e pela hidroxiapatita, tem sido utilizado para a ablação de tecidos duros, como esmalte, dentina e osso. (HIBST e KELLER, 1989)

1.3.1.2. Laser de estado gasoso

Apresenta como meio ativo um gás que é excitado por descargas elétricas.

O laser de Hélio:Neônio (He-Ne) emite em vários comprimentos de onda, sendo mais intenso em 632,8 nm (vermelho). É muito utilizado onde se necessita de laser de baixa potência, como para alinhamento, metrologia, holografia e apontadores.

Na área médica, é usado como bioestimulante, para o tratamento da dor, das disfunções articulares e na cicatrização de lesões cutâneas (KARU, 1989), graças ao seu efeito estimulante na produção de colágeno.

O laser de argônio apresenta emissão contínua, mais intensa, na faixa de 488 nm e 514,5 nm (azul, verde), e foi o primeiro a ser usado na área médica para tratamento das retinopatias diabéticas (CECCHINI, 1995)

O laser de CO₂ utiliza como meio ativo uma mistura de CO₂, N₂ (Nitrogênio) e He (Hélio), emitindo no infravermelho, com comprimento de onda de 10,6 µm. A sua transmissão é feita por um sistema de espelhos colocados em um braço articulado, o que acaba sendo pouco prático nos procedimentos cirúrgicos (O'BRIEN e MILLER, 1990; MEDVECKY et al., 2001) Devido ao seu comprimento de onda, é bem absorvido pela água, mas pouco absorvido por tecidos pigmentados. Tal qual o laser de argônio e rubi, o laser de CO₂ tem sido usado para remoção de tatuagens e para a remoção de papilomas, nódulos traumáticos, pólipos e carcinomas da laringe (CECCHINI, 1995).

1.3.1.3 - Laser de hólmio

As terras raras compõem a série dos lantanídeos da tabela periódica e a areia monazítica é a sua principal fonte. Encontram-se os seguintes elementos: neodímio, hólmio, érbio, túlio (Tm), cério (Ce), etc...

Das matrizes hospedeiras, ou meio ativo, a serem dopados com terras raras pode-se citar o YAG (Y₃ Al₅ O₁₂: ítrio, alumínio, granada), o YLF (Y Li F₄: fluoreto de

lítio-ítrio) e o YVO (Y V O₄: ítrio-vanádio-oxigênio). Dos raios laser dopados com terras raras existem o Nd:YAG, Er:YAG e Ho:YAG. A emissão do laser de hólmio é da ordem de 2,065 μm , proporcionando forte absorção pela água, o que torna esse tipo de laser ótimo para atuar superficialmente e com precisão. O laser de hólmio é um laser de estado sólido pulsado, que opera no comprimento de onda do infravermelho. Tem sido usado principalmente em cirurgias do aparelho locomotor, associado à artroscopia, experimentalmente, no tecido ósseo (BULCHET et al., 1992; BULCHET et al., 1993) e em cirurgias urológicas e ginecológicas (DUFFY et al., 1992; JONHSON et al., 1992-a; JONHSON et al. 1992-b; SPINDEL et al., 1992)

1.4 - Características morfofuncionais dos tendões

O tendão é um material extremamente complexo, formado por fibrilas de colágeno embebidas em uma matriz de proteoglicanos, associada a uma pequena quantidade de células. (WOO et al., 2000) O fibroblasto é a célula predominante nos tendões, localizado entre os feixes de fibrilas. O corpo dessas células tem a forma de bastões dispostos em colunas, quando observados à microscopia óptica em corte longitudinal do tendão. Já nos cortes transversais, as células aparecem como pontos escuros em forma de estrela entre os feixes de fibrilas do colágeno. O citoplasma dessas células apresenta coloração escura, quando coradas com corantes básicos, em que se vê um único núcleo e escasso citoplasma. Essas células são responsáveis pela produção do colágeno tipo I, que é o maior constituinte dos tendões (80%) (WOO et al., 2000).

Na classe das proteínas fibrosas, o colágeno é a proteína mais conhecida, talvez por sua ampla distribuição e por estar também associada a algumas doenças. Mas de 30% das proteínas do corpo humano são colágeno e são encontradas, principalmente, na pele, nos ossos, nos dentes, nos vasos sangüíneos, nos tendões, nas cartilagens e nas cápsulas articulares. A quantidade e a orientação das fibras de colágeno mudam principalmente durante o crescimento e o desenvolvimento do indivíduo, adquirindo uma situação metabolicamente estável na fase adulta, porém não inerte.

Os ossos e os tendões são as estruturas mais ricas em colágeno do tipo I. No caso dos ossos, 88% do seu peso seco (sem a porção mineral) constitui-se de colágeno, enquanto que no tendão calcâneo 86% é colágeno e 4,4% é elastina, que é um outro tipo de proteína fibrosa. (MONTGOMERY et al., 1994)

Quando as fibras de colágeno são aquecidas em ácido diluído, ocorre desnaturação irreversível e essas fibras transformam-se numa substância gelatinosa. A ultracentrifugação dessa solução separa essa mistura em três frações designadas por alfa, beta e gama. A fração alfa é a unidade polipeptídea básica que, quando ligada covalentemente em cruz, num dímero, forma a fração alfa e quando ligada em um trímero forma a fração gama. As cadeias alfa têm peso molecular aproximado de 97.000 dáltons (D) e diferem entre si pela composição de aminoácidos (cadeias alfa 1 e alfa 2), constituídas principalmente por glicina (33%), prolina (15%) e hidroxiprolina (15%). Cada cadeia alfa possui em torno de 1440 resíduos de amino-ácidos, um domínio carboxi-terminal (importante na formação da porção globular do trímero) e um domínio amino-terminal (importante na especificação da molécula e na associação de um trímero a outro)

Estudos do seqüenciamento de aminoácidos mostram que nas regiões mais polares da cadeia alfa, o tripeptídeo glicina-X-Y é repetido em seqüência sem parar (os símbolos X e Y correspondem a aminoácidos que não são a glicina). O tripeptídeo glicina-X-hidroxiprolina também é uma seqüência comum. Os resíduos de glicina são compactados firmemente por interações hidrofóbicas umas contra as outras no centro da tripla hélice e cada grupo glicina-NH forma uma ponte de hidrogênio (H) com o grupo carbonila do aminoácido na posição X da cadeia adjacente (ligações intermoleculares). O tropocolágeno tem a forma de tripla hélice e pode ser considerado um bastão com cerca de 3.000 x 15 Å. (Figura 3).

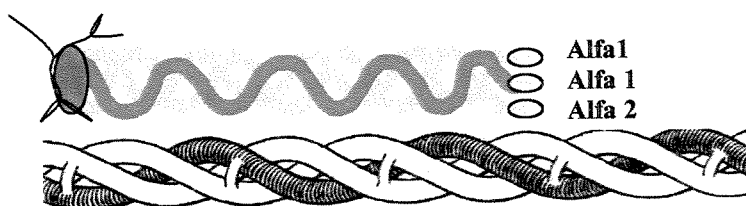


Figura 3: O esquema apresenta a molécula do tropo colágeno formada por duas cadeias alfa 1 e uma cadeia alfa 2, com arranjo denominado de tripla-hélice. O esquema B ilustra as ligações intermoleculares (pontes de hidrogênio).

Esses bastões (tropocolágeno) se alinham de forma paralela entre si, porém não se tocando nas extremidades, que são polares, para formar as microfibrilas. Essas regiões polares, quando observadas à microscopia eletrônica, correspondem às linhas escuras, verticais e perpendiculares às fibras de colágeno. Esse arranjo quaternário, responsável pela formação das fibrilas, constitui uma estrutura do tipo cristalina, muito estável e regular que necessita de grande quantidade de energia para ser rompida ou separada. (Figura 4)

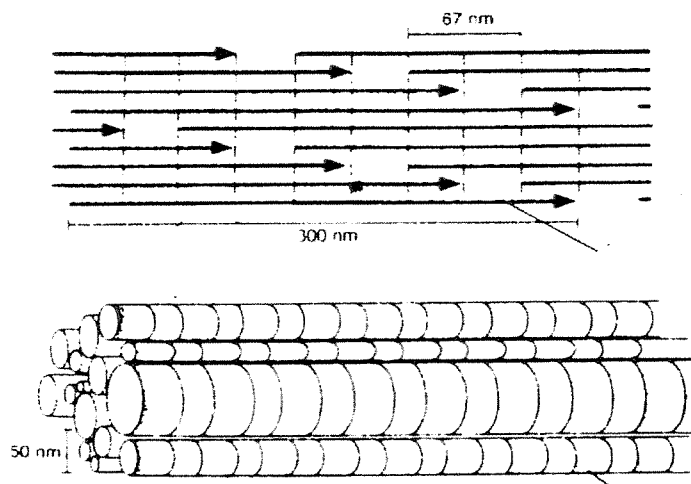


Figura 4: Disposição das moléculas de tropocolágeno para a formação de uma fibrila que, por sua vez, se unem em pacotes para a formação das fibras de colágeno.

As fibrilas permeadas pela matriz de proteoglicanos, glicoproteínas e água formam pacotes que se orientam, paralelamente, ao longo eixo do tendão para formar os fascículos (Figura 5)

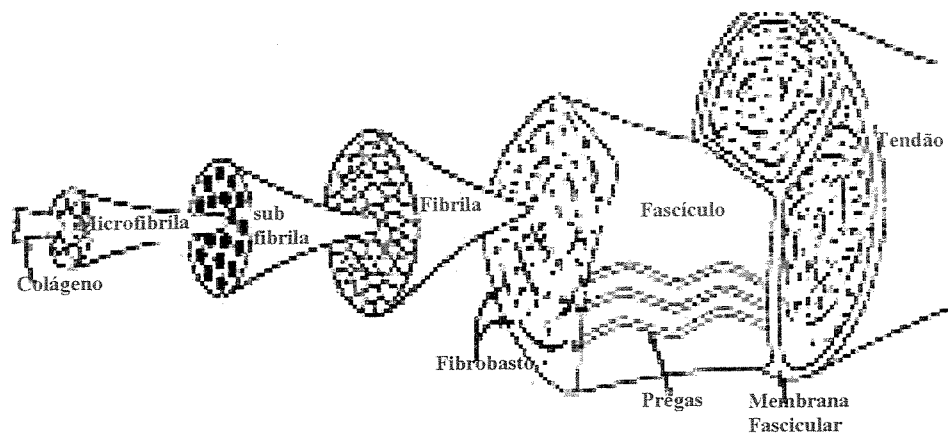


Figura 5: Representação esquemática da formação do tendão desde a molécula do colágeno. (Modificado de Woo et al., 2000)

Os fascículos, por sua vez, são unidos pelo tecido conjuntivo frouxo, que permite o movimento deles entre si e também a passagem das estruturas vâsculo-nervosas e linfáticas. (WOO et al., 2000).

Esse arranjo estrutural complexo das fibrilas de colágeno é, em última análise, o responsável pela resistência mecânica do tendão à tração. Essa resistência é dependente diretamente da quantidade de fibras, da orientação das mesmas e do grau de agregação molecular entre elas (WOO et al., 2000). (Figuras 6 e 7)

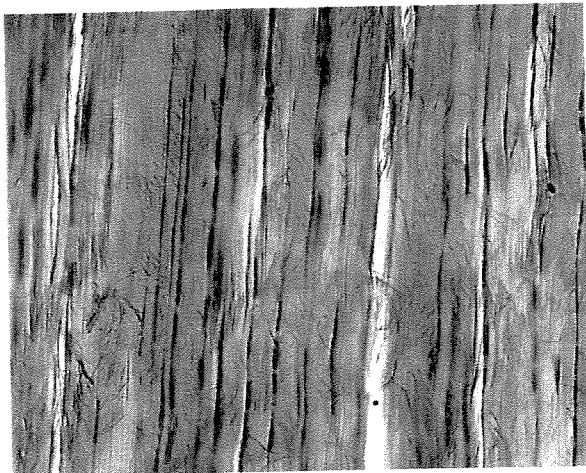


Figura 6: Corte longitudinal do tendão patelar do rato corado por hematoxilina eosina, onde se observam as fibras de colágeno dispostas longitudinalmente, permeadas por células com forma de bastão e dispostas em colunas, seguindo o longo eixo do tendão. (Objetiva 20x)

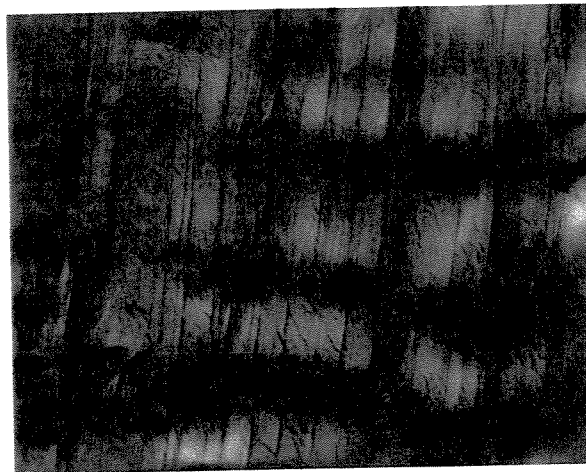


Figura 7: Corte longitudinal do tendão patelar do rato, corado pelo picrossírius, sob luz polarizada, onde se observa a birrefringência das fibras de colágeno, dispostas longitudinalmente. (Objetiva de 20x)

A principal função do tendão é transmitir a força gerada durante a contração muscular, para o segmento ósseo, no qual está inserido (D'ANGELO e FATTINI, 1995). Em geral, os tendões respondem melhor à tração, no entanto, nas regiões onde são submetidos a forças de compressão ocorre metaplasia para cartilagem ou tecido fibrocartilaginoso (WOO et al., 2000) Tal qual no osso, a estrutura dos tendões também é modulada por fatores bioquímicos e biofísicos. A quantidade e disposição das fibras de colágeno respondem não somente a estímulos mecânicos como também a estímulos piezoelétricos que são gerados no seu interior, sendo, portanto, considerados excelentes modelos biológicos para o estudo das adaptações bioquímicas, morfológicas e funcionais que ocorrem durante situações fisiológicas ou não fisiológicas. Em geral, o suprimento sanguíneo dos tendões provém de vasos do perimísio, dos pontos de inserção e origem no periósteo dos vasos do paratendão e mesotendão. Em tendões envolvidos por paratendão, os vasos podem penetrar em vários pontos da periferia e se anastomosarem com os capilares que correm longitudinalmente no tendão. (WOO et al., 2000) (Figura 8)

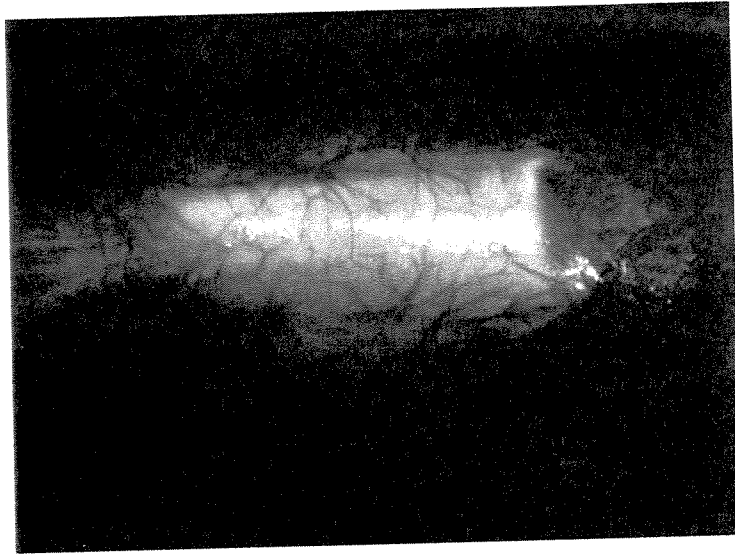


Figura 8: Tendão patelar normal do rato, observado com aumento de 8x. Nota-se o seu brilho e coloração característicos e pode-se observar a rica vascularização, com inúmeras anastomoses, tanto na sua porção proximal quanto distal, que correm no paratendão.

Os proteoglicanos correspondem, aproximadamente, a 1% a 5% do peso seco dos tendões. Eles são muito ávidos pela água, ligando-se a ela, mantendo-a presa dentro da sua estrutura. Além disso, tem sido demonstrado que a interação dos proteoglicanos com as fibras do colágeno é um importante regulador da formação e manutenção da sua estrutura. Atualmente sabe-se que a deficiência do proteoglicano *decorin* está relacionada com a redução da resistência à tração do tendão, já que esse proteoglicano previne o deslizamento entre as fibrilas de colágeno. (WOO et al., 2000)

1.5 – Os efeitos do laser de Ho:YAG sobre o colágeno

A capacidade do colágeno sofrer retração através de métodos térmicos e químicos já é conhecida desde 1871, embora publicações só tenham aparecido a partir de 1900. Historicamente, existem exemplos da aplicação desse efeito sobre o colágeno na preparação das cabeças pelos caçadores de cabeça da América do Sul e pelos curtidores de couro. (WALL et al., 1999)

A interação da energia laser com os tecidos ocorre a partir de efeitos fototérmicos, fotoquímicos, fotomecânicos e fotoacústicos (SHERK 1993; HAYASHI et al., 1996-a; ARNOCZKY e AKSAN, 2000; MEDVECKY et al., 2001). Esses efeitos são usados para se realizar a vaporização, coagulação, incisão, união, litotripsia e até bioestimulação em diferentes órgãos e tecidos. No aparelho locomotor, o laser, além da ablação, também tem sido aplicado para promover o encolhimento de tecidos ricos em colágeno (SHERK, 1993; HAYASHI et al., 1995; HAYASHI et al., 1996-a; HAYASHI et al., 1996-b; HAYASHI et al., 1997-a, HAYASHI et al., 1997-b; HAYASHI et al., 1999; SELECKY et al., 1999; ARNOCZKY e AKSAN, 2000; MEDVECKY et al., 2001; SHERK, 1993)

PARTRIDGE¹ foi o primeiro autor a descrever em 1948 a contração e o relaxamento do tendão da cauda do rato em água destilada acima de 60° C.

BANGA et al. (1954) estudaram esse fenômeno, em detalhe, nas fibras de colágeno isoladas da cauda do rato, utilizando a microscopia de luz polarizada e métodos enzimáticos. Os autores observaram que, submetendo tais fibras com 5 a 6 cm de comprimento em soluções de iodeto de potássio e iodeto de potássio com mercúrio a 40%, ocorria encolhimento da fibra de até 67% do seu comprimento inicial. Essa contração iniciava-se 20 a 30 segundos após a fibra estar exposta às soluções e parava em um ou dois minutos. A fibra era mantida tracionada por um peso de aproximadamente 70 a 80 mg e, após 20 a 25 minutos, iniciava um processo de alongamento que durava, aproximadamente, 60 minutos, quando então a fibra atingia entre 80 a 85% do seu comprimento original.

Os autores denominaram esse fenômeno de contração e relaxamento químico. A mesma fibra de colágeno submetida à água aquecida a 67° C apresentava contração após 7 a 10 segundos e relaxamento em 40 a 60 segundos. O encurtamento observado era semelhante ao obtido pelo método químico (em torno de 67%), mas após o relaxamento a fibra voltava ao seu comprimento inicial. As análises realizadas pela microscopia de luz

¹ PARTRIDGE, apud BANGA, I.; BALÓ, F. ; SZABO, D. Contraction and relation of collagen. *Nature*, 174:788, 1954.

polarizada e pelos métodos enzimáticos mostraram que tanto o calor quanto as soluções químicas produziam efeitos semelhantes.

A estabilidade térmica do colágeno foi posteriormente estudada por HALL e REED (1957). Esses autores partiram do pressuposto de que resíduos de hidroxiprolina estariam relacionados com a estabilidade térmica do colágeno. A idéia considerava que a hidroxiprolina poderia formar ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxil e de óxido de carbono, formando ligações do tipo éster entre as cadeias polipeptídeas, aumentando assim a estabilidade do colágeno. Os autores estudaram três grupos de pele retiradas do abdome de pessoas de diferentes idades. Um grupo denominado controle tinha reação à collagenase normal, o outro grupo tinha resistência à collagenase e o outro, sensibilidade à collagenase. Foi dosado o conteúdo de hidroxiprolina e foi medida a quantidade de calor para a produção do mesmo efeito em cada um dos espécimes. Os autores observaram que não havia relação entre o conteúdo de hidroxiprolina e a quantidade de calor necessário para o encolhimento. No entanto, no grupo 2 (collagenase resistente) a temperatura necessária foi a maior, enquanto que no grupo 3 (collagenase sensível) a quantidade de calor foi a menor. Concluíram que os níveis de hidroxiprolina não interferem e que, provavelmente, outros fatores, como a idade, pudessem ser mais importantes na determinação da estabilidade do colágeno.

Posteriormente, FLORY e SPURR (1958) e FLORY e WEAVER (1959), estudando o efeito do calor sobre o colágeno, sugeriram que a agressão térmica fazia com que o colágeno passasse da forma cristalina para a forma amorfa. Essa transição para o estado amorfo era decorrente da perda do arranjo estrutural do tropocolágeno, que perdia a sua bi-refringência ao exame por difração do raio-X.

Mais recentemente, ALLAIN et al. (1980), estudando os efeitos do calor (água aquecida) sobre o colágeno da pele do rato, concluíram que o encolhimento ocorria em função da perda da estrutura da tripla hélice do tropocolágeno pela desnaturação dessa proteína. O aquecimento seria responsável pela ruptura das ligações intramoleculares, sensíveis ao calor, com a preservação das ligações intermoleculares.

Seguindo essa linha de investigação, HAYASHI et al. (1995) realizaram estudo das propriedades mecânicas da cápsula articular fêmoro-patelar de coelhos *in vitro*. O objetivo dos autores, presente na introdução do artigo, era avaliar a possibilidade desse método de tratamento ser utilizado na correção das instabilidades multidirecionais e unidirecionais da articulação glenoumeral. Os autores chamaram a atenção para o fato de que o laser já vinha sendo utilizado para promover a “solda” de tecidos ricos em colágeno nas cirurgias oftalmológicas e chamava a atenção também para o fato de que o laser, quando utilizado de forma não ablativa, podia alterar as propriedades estruturais do colágeno, aumentando as ligações entre as fibrilas e as cadeias alfa do colágeno. A hipótese lançada era de que o uso do laser Ho:YAG, através de um procedimento por via artroscópica, poderia reduzir a redundância capsular e aumentar assim a estabilidade articular.

Para tanto, os autores utilizaram 12 coelhos adultos, dos quais retiraram, após o sacrifício, fragmentos com comprimentos de 5 x 20 mm da porção medial e lateral junto à articulação patelo femoral. Logo após a retirada, os espécimes foram colocados em solução de Ringer Lactato a 37° C e, posteriormente, foram divididos, aleatoriamente, em 4 grupos, sendo um grupo denominado de controle e três grupos submetidos ao laser Ho:YAG na potência de 5, 10 e 15 W.

Utilizando um equipamento especialmente desenvolvido para o ensaio, os autores aplicaram o laser a uma distância de 1.5 mm, a uma velocidade de 2 mm por segundo, em quatro passadas transversais ao longo eixo da cápsula e distantes entre si 2 mm. Todos os fragmentos foram testados mecanicamente, antes e após a aplicação do laser. A densidade de energia aplicada para o grupo de 5W foi de $68 \pm 13 \text{ J/cm}^2$, de $120 \pm 14 \text{ J/cm}^2$ para o grupo de 10 W e de $180 \pm 20 \text{ J/cm}^2$ para o grupo de 15 W.

A aplicação do laser resultou num encolhimento significativo em cada um dos grupos, quando comparados com o comprimento pré-laser, e houve correlação significativa entre a quantidade de energia e o encolhimento final. Houve redução significativa da rigidez do tecido antes e após a aplicação do laser nos grupos de 10 e 15 W e entre os três grupos, a rigidez foi significativamente menor nos grupos de 10 e 15 W, quando

comparados com o grupo de 5 W. Não houve, por outro lado, correlação entre as propriedades de relaxamento dos tecidos e a densidade de energia aplicada.

A carga necessária para fazer com que o espécime retornasse ao seu comprimento inicial, após a aplicação do laser, foi significativamente menor no grupo de 5 W. Os autores chamaram a atenção para o fato de que, apesar de ter se obtido significativo encolhimento da cápsula, as propriedades de relaxamento do tecido capsular não se alteraram após o laser. Essa propriedade está relacionada com a viscoelasticidade do tecido e é tempo-dependente. Chamaram também a atenção para o fato de que, quanto maior a energia aplicada, maior complacência capsular.

Por fim, os autores encorajam, em função dos resultados obtidos, o uso da energia a laser para o tratamento das instabilidades glenoumeral. No entanto, chamam a atenção para a necessidade de estudos *in vivo*.

Utilizando o mesmo material do estudo anterior, HAYASHI et al. (1996-a) apresentaram os resultados do estudo histológico e bioquímico dos fragmentos das cápsulas articulares submetidas ao laser Ho:YAG com 5, 10 e 15 W de potência. A análise histológica, realizada por microscopia óptica convencional, mostrou fusão do colágeno e alterações picnóticas nos fibroblastos. A área envolvida foi tanto maior quanto maior a energia dissipada pelo laser e, no grupo em que foi aplicado o laser com 5 W, as áreas ao redor do local de aplicação foram significativamente mais preservadas. A análise bioquímica avaliou o conteúdo do colágeno, através da dosagem da concentração de hidroxiprolina, e a quantidade de ligações não redutíveis, pela medida da concentração de hidroxilisilpiridinolina. Do ponto vista bioquímico, não foram observadas alterações significativas, ou seja, não houve diferença no conteúdo de colágeno tipo I entre os grupos e nem se verificaram alterações na quantidade de ligações não redutíveis. Os autores chamam a atenção para o fato de que há necessidade de estudos *in vivo* a fim de se determinar o efeito da resposta inflamatória e do processo de cicatrização induzido pela agressão térmica na cápsula articular.

Posteriormente, HAYASHI et al. (1996-b) estudaram *in vitro* a influência do laser de Ho:YAG sobre os fragmentos da cápsula articular da região parapatelar medial e

lateral de 6 coelhos recém-sacrificados. Os espécimes foram colocados em um dispositivo, de tal modo que o laser fosse aplicado sempre com a mesma distância (1,5 mm) e com a mesma velocidade (2 mm/seg.). Os segmentos de cápsula foram divididos em quatro grupos, em que se variou a quantidade de energia aplicada: 0,5 J pulsos/seg. (5 W), 1,0 J pulsos/seg. (10 W), 1,5 J 10 pulsos/seg. (15W) e um grupo-controle, em que o laser era aplicado desligado.

Segundo esses autores, o encolhimento da cápsula articular dos coelhos foi diretamente proporcional à quantidade de energia laser dissipada, de tal modo que, no grupo com 5 W, o encolhimento foi de 9%, com 10 W de 26% e com 15 W de 38%. Além disso, houve diminuição de 77% da rigidez da cápsula quando submetida a 10W, e de 90% quando submetida a 15W, sem, no entanto, alterar as propriedades viscoelásticas da mesma. (HAYASHY et al., 1995).

Análises morfométricas foram realizadas para determinar o diâmetro das fibrilas de colágeno e a porcentagem da área ocupada pelas fibrilas, num corte transversal, usando a microscopia eletrônica de transmissão (MET). Os resultados da MET mostraram alterações significantes da ultra-estrutura do colágeno nos grupos laser. No grupo-controle pôde-se observar fibrilas de colágeno de vários tamanhos, em contraste com o grupo laser em que houve aumento importante da seção transversal das fibrilas. As fibrilas começaram a perder as suas bordas, apesar de manterem a forma circular. Em algumas áreas do grupo de 15 W foram encontradas fibrilas com diâmetro extremamente aumentado. Nos cortes longitudinais, observaram-se aumento de diâmetro das fibrilas com perda das estriações transversas nos grupos tratados com laser. Houve relação entre a quantidade de energia e o aumento do diâmetro das fibrilas. Nesse estudo foram observadas delicadas subestruturas com arranjo concêntrico nos grupos tratados pelo laser. O modelo mais aceito para o arranjo do colágeno é de que ligações não covalentes (iônicas e hidrofóbicas) atuam primariamente para formar as fibrilas, enquanto que ligações covalentes estabilizam as fibras. Os mecanismos envolvidos na desestruturação e na reconstrução das fibrilas do colágeno, para se obter a sua forma tridimensional junto ao tecido conjuntivo fibroso, ainda não está muito bem definida. Embora as fibrilas percam a sua regularidade após o laser, os encontros desse estudo sugeriram que a posição das fibrilas, aparentemente, mantiveram-se.

Além disso, o laser afetou as interações entre as moléculas de colágeno, ou as cadeias alfa, que, por sua vez, alteraram a organização das fibrilas que, por sua vez, levaram à mudança estrutural das fibras de colágeno. O aumento do diâmetro das fibrilas e a perda das estriações poderiam justificar o encolhimento do tecido e as alterações das propriedades mecânicas observadas em estudos prévios realizados por esse mesmo grupo.

VANGSNESS et al. (1997) analisaram o efeito do calor produzido pelo laser, utilizando tendões calcâneos e patelares de cadáveres, tendo observado que, em temperaturas acima de 70° C, ocorria como efeito imediato a contração das fibras de colágeno e o aumento do seu diâmetro, com conseqüente encolhimento linear dos tendões. Esses autores, no entanto, interpretaram o fenômeno como secundário à ruptura das pontes intra e intermoleculares do colágeno, tendo concluído que o encolhimento era diretamente proporcional à quantidade de energia dissipada e que, após a aplicação do laser, os tendões patelares apresentaram redução da sua resistência em até 70%. Sugeriram então a necessidade de estudos *in vivo* com modelos animais para se analisar melhor a lesão e a possível recuperação ao longo do tempo.

Com relação às propriedades biomecânicas do colágeno submetido à aplicação do Ho:YAG, SELECKY et al. (1999) estudaram essas propriedades em fragmentos da porção inferior do complexo ligamentar glenoumeral de 20 cadáveres frescos, com idade entre 74 e 91 anos. O laser foi aplicado na potência de 10 W/10 Hz /5 segundos, a uma distância de 2.0 mm, o que gerava aproximadamente 13 J/cm², até se obter encolhimento de 10% do ligamento. Uma hora após o procedimento, os espécimes submetidos a laser e os controles eram avaliados através de testes mecânicos, em que se aplicava uma pré-carga e, posteriormente, 10 ciclos (1 ciclo/segundo) para se obter 10% de deformação. Posteriormente, mantendo-se uma pré-carga de 2 Newton (N), todos os espécimes foram submetidos à tensão até a ruptura. No grupo em que houve aplicação do laser, o módulo de elasticidade apesar de ter sido menor, não foi significativo. Por outro lado, a quantidade de energia necessária para a ruptura foi 17% menor no grupo com aplicação do laser. Os autores acreditaram que essa diferença significativa ocorreu devido às alterações do arranjo fibrilar. Face a esses resultados, teoricamente, pode-se-ia esperar que a cápsula da articulação glenoumeral, submetida ao tratamento com o laser, estaria apta a ser reabilitada

com a mesma rapidez e intensidade dos procedimentos com técnica convencional. Entretanto, os autores sugeriram que novos estudos deveriam ser feitos para se conhecer melhor a resposta cicatricial induzida pelo laser, que pode vir a influenciar as propriedades biomecânicas dos ligamentos glenoumerais.

Com relação aos efeitos térmicos do laser Ho:YAG *in vivo*, existem poucos estudos a esse respeito na literatura. O primeiro desses estudos foi realizado por HAYASHI et al. (1997-b), que avaliaram o efeito do laser Ho-YAG sobre as articulações patelo-femoral de coelhos, com seguimento de 0, 7 e 30 dias. Após 7 dias, foram observadas áreas de hialinização e proliferação fibroblástica ao redor e no interior das áreas submetidas ao laser. Após 30 dias, havia deposição irregular e desorganizada de fibras de colágeno e grande proliferação celular. Os autores identificaram na microscopia de luz polarizada aumento da seção transversal das fibras de colágeno e perda da periodicidade das estrias, por provável perda do arranjo em tripla hélice, como já relatado anteriormente. Houve também evidências que indicaram que as fibras de colágeno desnaturadas poderiam atuar como molde para a deposição das novas fibras.

Esse efeito do laser sobre o fibroblasto foi estudado em meio de cultura, podendo-se observar que, após 14 dias da aplicação do laser, a atividade de síntese do colágeno tinha aumentado 196% (em relação ao dia zero) e que essa atividade foi retornando gradualmente ao normal após 30 dias (HAYASHI et al., 2000). Esses mesmos autores estudaram também o efeito tardio do laser sobre a cápsula articular de coelhos, concluindo que, após 90 e 180 dias, o aspecto do tecido submetido ao laser era praticamente normal, exceto pelo aumento discreto do número de células (HAYASHI, 2000).

SCHULZ et al. (2001) estudaram *in vivo* os efeitos do laser Ho:YAG sobre a cicatrização e as propriedades mecânicas da retináculo medial parapatelar da cápsula articular de 45 coelhos, utilizando como controle o joelho contralateral. A potência utilizada foi de 10W/10 pulsos/segundo, que produzia energia entre 241 a 550 J. Após a aplicação do laser, houve redução em 30% da carga necessária para a ruptura da retináculo medial. Após 6 semanas, essa porcentagem passou a ser de 44% e após 12 semanas a carga necessária foi de apenas 16%, sendo os dois primeiros valores considerados

significativos. O modo de elasticidade foi de 83% do controle, imediatamente após a aplicação, 54% depois de 6 semanas e 85% após 12 semanas. Os autores concluíram que a aplicação do Ho:YAG produziu redução das propriedades biomecânicas da retináculo medial da cápsula articular logo após a aplicação e, principalmente, depois de 6 semanas. Somente após 12 semanas é que houve recuperação dessas propriedades, sem, no entanto, retornarem aos valores observados no lado controle. SCHULZ et al. (2001) concluíram, a partir dos resultados, que havia necessidade de se reduzir as tensões sobre a cápsula submetida ao laser por pelo menos 12 semanas, para que pudesse ocorrer recuperação da resistência e da rigidez do tecido.

As conclusões desse estudo estão também de acordo com os achados de SCHAEFER et al. (1997), que encontraram redução da rigidez do tendão patelar de coelhos e aumento significativo da seção transversa desse tendão, após 8 semanas da aplicação do laser.

Do ponto de vista clínico, o efeito da energia térmica gerada pelo laser parece ser útil e benéfico para o tratamento da frouxidão capsular e ligamentar. No entanto, existem dúvidas se o efeito final do calor (restauração da estabilidade articular) é produzido pela retração do colágeno ou se é pela proliferação desordenada de fibroblastos, que levariam à cicatrização e ao conseqüente espessamento da cápsula ou dos ligamentos. Além desse aspecto, deve-se considerar também que o calor produzido pelo laser pode destruir as terminações nervosas e as vias sensitivas eferentes da cápsula articular. Isso resulta na anestesia local ou regional, com perda do controle proprioceptivo dos movimentos articulares, que será tanto maior quanto maior for a área atingida pelo laser. Do ponto de vista clínico, esse efeito pode ser até certo ponto benéfico, pois tira agudamente a dor do paciente, mas também o reflexo muscular de proteção, permitindo o uso indevido da articulação que, a longo prazo, pode acarretar lesões irreversíveis.

A proposta desse estudo é analisar os efeitos do laser Ho:YAG, por ser hoje o mais utilizado no aparelho locomotor, em um modelo experimental, com a finalidade de se obter novas informações sobre o processo de reparação do colágeno a médio e a longo prazo.

OBJETIVO

2 - OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito da aplicação do laser Ho:YAG no tendão patelar do rato, em função da forma de aplicação (contínua ou em dois pontos) e do tempo de acompanhamento.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do laser sobre as dimensões do tendão (comprimento e largura proximal e distal);
- Avaliar o efeito do laser sobre a celularidade e o arranjo das fibras de colágeno.

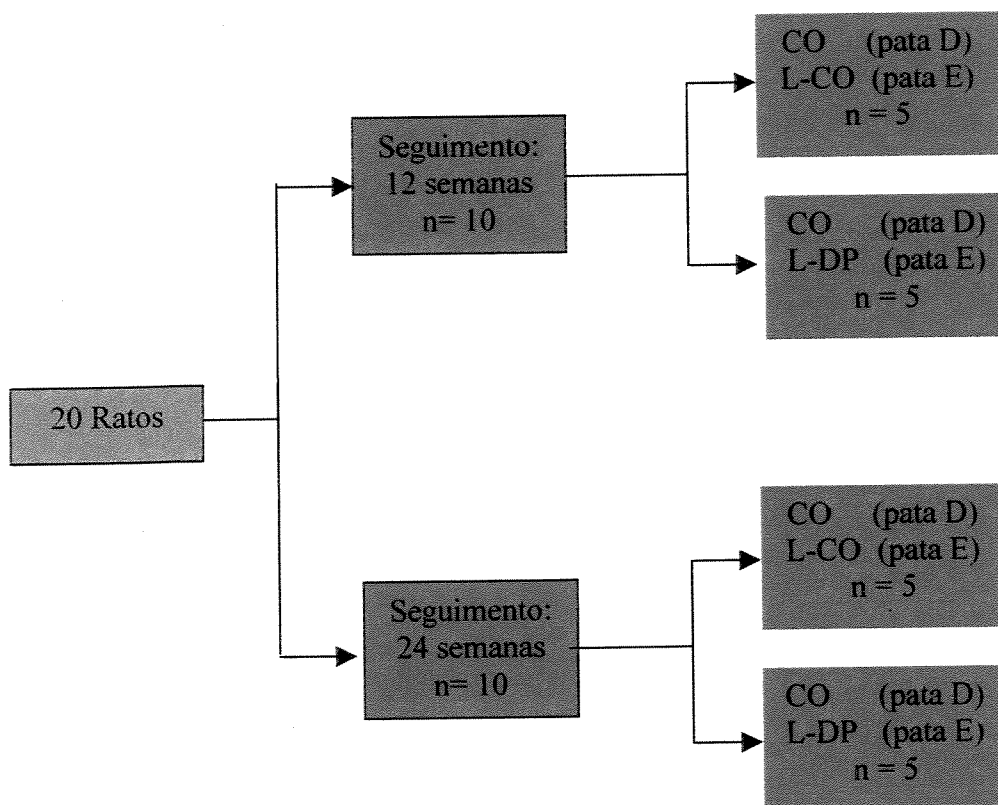
MATERIAL E MÉTODO

3 - MATERIAL E MÉTODO

3.1 – Material

3.1.1 - Animais utilizados²

Foram utilizados 20 ratos adultos, machos, brancos (*Rattus Novergicus*) da variedade Wistar. Todos os animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Os ratos foram divididos em grupos, de acordo com o tempo de seguimento de 12 e 24 semanas e de acordo com a forma de aplicação do laser, conforme esquema abaixo:



Legenda: CO = Controle
L-CO = Laser na forma contínua
L-DP = Laser em dois pontos

D = Direita
E = Esquerda
n = número

² O projeto de pesquisa foi devidamente aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisas na Experimentação Animal do Instituto de Biologia da UNICAMP, protocolo no. 194-1.

3.2 - Método

Foi utilizado um aparelho de laser Ho:YGA, marca Trimedyne® , Inc. 2801 Barranca, Irvine, CA 92714, modelo 40 Watt Holmium Laser, com as seguintes especificações: Fonte do laser pulsátil, estado sólido, com ondas de 2,1 microns (próximo ao infravermelho), potência de 40 watts, sistema de resfriamento próprio, com ar e água, raio de apontador ajustável, com 5 mW no máximo, vermelho, dimensões de 65cm x 83cm x 98 cm e peso de 250 Kg. O sistema de aplicação do laser é composto por uma fibra ótica de espelho de silício (protegido e envolvido por teflon) e um cabo de aplicação do tipo OmniTip de 30°. (Figura 9).



Figura 9: Equipamento de laser Ho:YAG utilizado no experimento

O aparelho foi ajustado à frequência de 19 Hz, potência de 25 W, tempo de aplicação de 0,5 segundos, energia a ser aplicada de 13,15 mJ e energia total de 0,0728 J.

3.2.1 - Procedimento Cirúrgico

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Laboratório de Neurocirurgia, coordenado pelo Prof. Salomão Bernabou, do Hospital Beneficência Portuguesa de São Paulo. Todos os animais foram anestesiados com 50mg/Kg de Pentobarbital sódico, injetado por via endovenosa caudal. Após se atingir o plano anestésico, eram submetidos à tricotomia das patas posteriores e assepsia das mesmas com solução alcoólica de iodo. O acesso cirúrgico era feito através de incisão parapatelar lateral com exposição de todo o tendão. No tendão do lado esquerdo aplicava-se o laser, com a articulação do joelho mergulhada em uma cuba com solução fisiológica para mimetizar o procedimento artroscópico (Figuras 10 e 11). A aplicação do laser era feita de forma contínua (L-CO) ou em dois pontos (L-DP), escolhendo-se aleatoriamente o rato. (Figuras 12 e 13) Em todos os ratos, o lado direito foi utilizado como controle. A distribuição dos animais e seus respectivos pesos estão apresentados nos Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 – Distribuição dos ratos seguidos por 12 semanas

Nº. do animal	Peso (g)	Tipo de aplicação do laser (L-CO ou L-DP)
1	396	L-CO
2	385	L-DP
3	373	L-DP
4	429	L-CO
5	386	L-DP
6	368	L-CO
7	426	L-DP
8	442	L-CO
9	426	L-DP
10	474	L-CO
Média	410,50	
Mediana	416,00	
Desvio-padrão	34,19	

Legenda: No. = número; g = g ramas; L-CO = Contínua; L-DP = Dois pontos

Tabela 2 - Distribuição dos ratos seguidos por 24 semanas

No do animal	Peso (g)	Tipo de aplicação do laser (L-CO ou L-DP)
25	453	L-CO
26	400	L-DP
27	387	L-CO
28	436	L-DP
29	407	L-CO
30	450	L-DP
31	470	L-CO
32	419	L-DP
33	436	L-CO
35	439	L-DP
Média	429,70	
Mediana	408,5	
Desvio-padrão	25,99	

Legenda: No. = número; g = g ramas; L-CO = Contínua; L-DP = Dois pontos

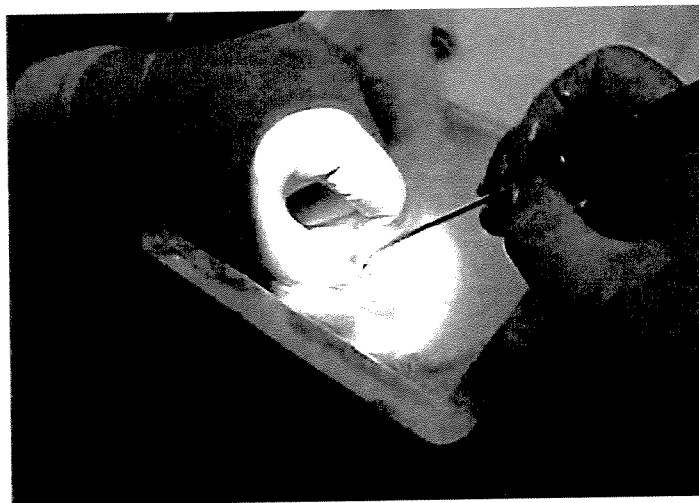


Figura 10: Aplicação do laser sobre o tendão patelar, imerso em solução salina.

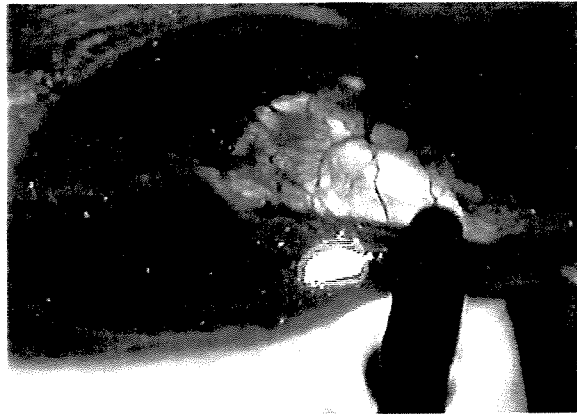


Figura 11: Detalhe da aplicação do laser, onde se nota a relação do tamanho do tendão com a ponteira

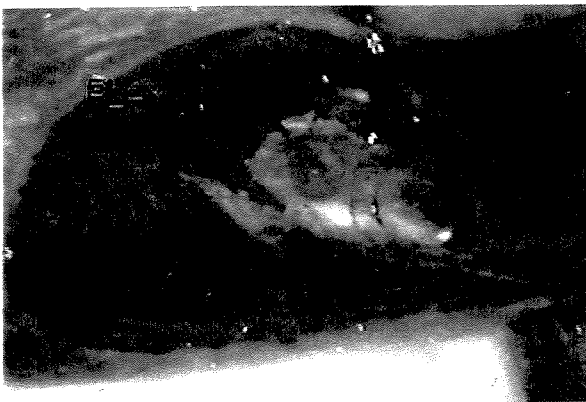


Figura 12: Aplicação do laser no tendão patelar na forma dois pontos (L-DP).

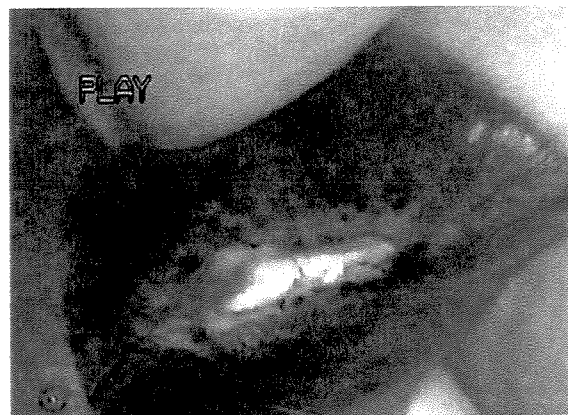


Figura 13: Aplicação do laser no tendão patelar na forma contínua (L-CO).

Todas as cirurgias foram realizadas pela mesma equipe, com os mesmos equipamentos e com a mesma potência do laser . Uma equipe formada por um cirurgião e um auxiliar realizava o acesso cirúrgico e transferia o animal para um recipiente com soro fisiológico, a fim de manter a articulação submersa nesse líquido. Outra equipe, formada por um cirurgião e um auxiliar, devidamente paramentados e protegidos com óculos especiais, faziam a aplicação do laser. Essa aplicação foi feita em todos os tendões pelo mesmo cirurgião a fim de reduzir as variáveis ligadas ao tempo de contato com o laser e a pressão deste sobre o tendão. O tempo de exposição do laser em cada procedimento (co ou L-DP) era de aproximadamente dois segundos para cada tendão. A cicatriz cirúrgica era então suturada com fio de nylon 3,0 pela primeira equipe e o animal era mantido aquecido até a recuperação anestésica. Após o procedimento cirúrgico todos os animais foram mantidos livres, sem nenhuma imobilização do membro, em gaiolas plásticas, com tampa de metal e maravalhas esterilizadas. A alimentação dos mesmo foi feita com ração industrial e água filtrada *ad libitum*.

3.2.2 - Sacrifício

Após decorrido o tempo de seguimento, os animais eram sacrificados com o aprofundamento da anestesia por éter etílico e após a parada cardiorespiratória expunham-se os tendões do lado direito e do esquerdo pelo mesmo acesso já realizado para a análise macroscópica.

3.2.3 – Análise macroscópica

Todos os tendões foram medidos com paquímetro da Mitutoyo Corporation (Tóquio – Japão) pelo mesmo indivíduo e com a mesma técnica. As medidas foram feitas simultaneamente no lado direito e esquerdo de cada animal. Media-se o comprimento do tendão (do pólo inferior da rótula até a sua inserção na tuberosidade anterior da tíbia) e da largura na sua porção proximal (P), logo abaixo do pólo inferior da rótula e na sua porção

distal (D), logo acima da tuberosidade anterior da tíbia, tomando-se o cuidado de manter a articulação do joelho esquerdo (operado) com a mesma flexão do joelho direito (controle).

3.2.4 - Análise microscópica

Após a obtenção das medidas, o fêmur era seccionado na sua porção distal e a tíbia na sua porção proximal, com cisalha. Esse material era fixado em solução de formaldeído a 10% por 24 horas e, em seguida, transferido para solução de álcool etílico a 70%. Após a fixação, seis tendões, sendo três com aplicação de forma contínua e três com aplicação em dois pontos, foram selecionados aleatoriamente de cada grupo (12 e 24 semanas). Esses tendões foram retirados pela secção dos mesmos no pólo inferior da rótula e junto à tuberosidade anterior da tíbia. Os tendões foram desidratados em solução de álcool a 70%, 80%, 90%, 100%, 100% e 100%, permanecendo uma hora em cada uma delas e, a seguir, foram submetidos à diafanização pelo xilol e incluídos em parafina a 60° C. Dos blocos de parafina foram obtidos cortes com 4 μ de espessura com micrótomo rotativo (modelo Leica RM 2155) para serem corados pela Hematoxilina e eosina, tricômico de Masson e picrossírius. Com a finalidade de se uniformizar as regiões do tendão a serem observadas, foram desprezados de cada bloco os primeiros dez cortes.

A avaliação foi feita em função da análise comparativa da quantidade de células e do arranjo e aspecto das fibras de colágeno (modificado de BELANGERO et al., 1993). Foi utilizado microscópio óptico (modelo Leica DML DC 300 F) com objetiva de 20x e o Programa “Imaging Processing Analysing System (Leica QWin)” para a captura das imagens. De cada lâmina foram selecionados cinco campos, que foram agrupadas em um banco de imagens para facilitar a comparação entre elas. Essa comparação foi feita entre os tendões de cada subgrupo (L-CO e L-DP) no mesmo grupo (12 e 24 semanas) e, posteriormente, entre os tendões de cada grupo (12 e 24 semanas), através da microscopia óptica e da microscopia de luz polarizada. Como controle foram selecionados, aleatoriamente, dois tendões que não receberam a aplicação do laser (lado direito) de cada um dos subgrupos, totalizando quatro tendões por grupo.

3.2.5 - Avaliação dos resultados

A análise dos resultados das medidas foi feita com a utilização de testes não paramétricos. Para avaliar a significância do efeito da aplicação do laser sobre as medidas do comprimento e da largura (região proximal e distal) dos tendões foi utilizado a prova U-de Mann Whitney. Para a comparação do efeito do tipo de aplicação do laser foi utilizado o teste de Wilcoxon. Na avaliação do efeito do tempo de seguimento foi utilizada também a prova de Mann Whitney. Para todos os testes, considerou-se $\alpha = 0,05$.

A avaliação das lâminas foi feita de forma subjetiva, não se utilizando testes estatísticos.

RESULTADOS

4 – RESULTADOS

4.1 - Efeito do tipo de aplicação do laser sobre as dimensões dos tendões

4.1.1 - Efeito sobre o comprimento

4.1.1.1 - Grupo de 12 semanas de seguimento

Na Tabela 3 e na Figura 14 são apresentados os valores do comprimento do lado sem aplicação de laser e do lado com a aplicação do laser (na forma contínua ou em dois pontos). Pode-se observar que, embora os valores dos comprimentos com aplicação de laser na forma contínua (L-CO) ou dois pontos (L-DP) sejam maiores, as diferenças não foram significativas.

Tabela 3 – Apresentação do comprimento dos tendões (em milímetros) após 12 semanas de seguimento: lado sem aplicação de laser, lado com aplicação de laser (L-CO e L-DP) e os respectivos deltas

Nº rato	Tendão sem laser	Tendão com laser			Delta	Delta	Delta
		Total	L-CO	L-DP	Total	L-CO	L-DP
1	11,7	11,7	11,7		0,0	0,0	
2	10,7	11,8		11,8	1,1		1,1
3	9,7	8,6		8,6	-1,1		-1,1
4	11,0	11,7	11,7		0,7	0,7	
5	9,6	10,6		10,6	1,0		1,0
6	10,8	12,0	12,0		1,2	1,2	
7	10,9	11,1		11,1	0,2		0,2
8	10,0	10,7	10,7		0,7	0,7	
9	11,7	11,7		11,7	0,0		0,0
10	11,8	11,0	11,0		-0,8	-0,8	
Média	10,79	11,09	11,42	10,76	0,73	0,36	0,24
Mediana	10,90	11,7	11,10	11,10	1,00	0,70	0,20
Desvio-padrão	0,81	1,00	0,54	1,30	0,65	0,77	0,89
P		0,29				0,82	

Legenda: No. = número; L-CO = Laser na forma contínua; L-DP = Laser em dois pontos; p = 0,05

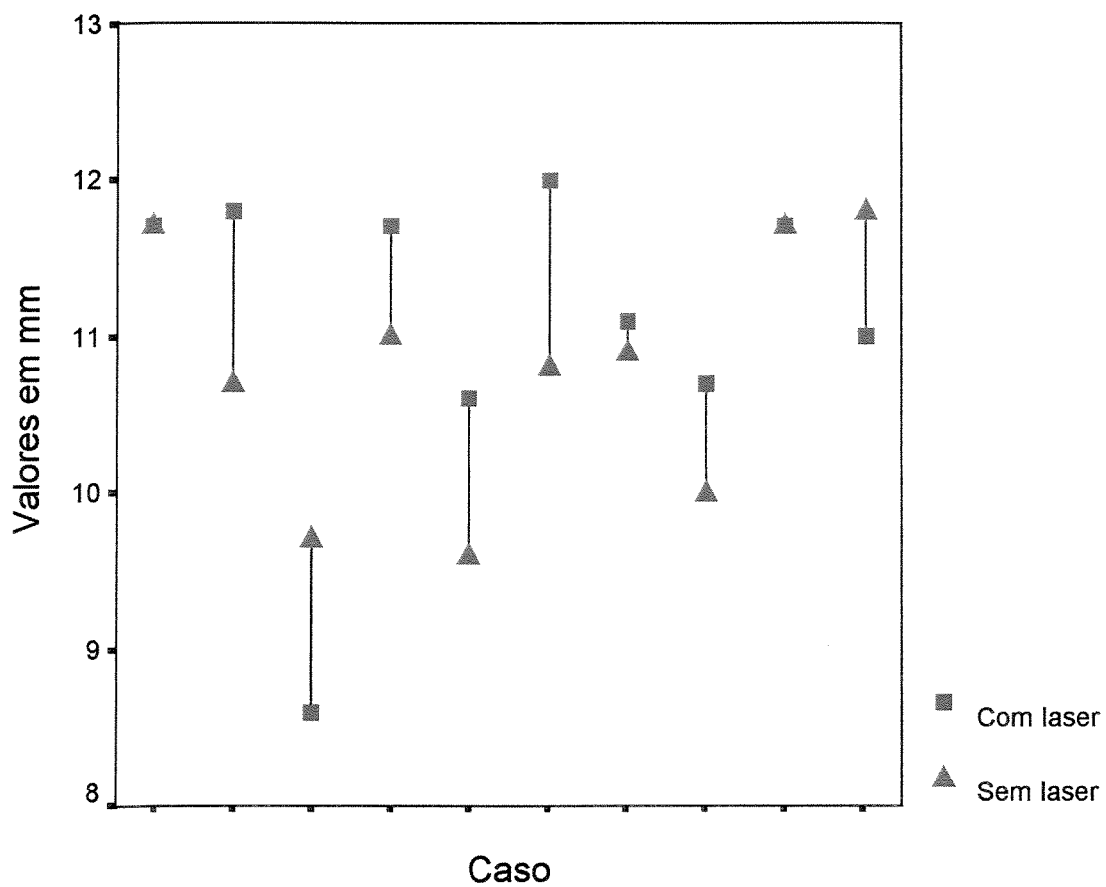


Figura 14: Apresentação do comprimento dos tendões do lado sem aplicação do laser e com aplicação do laser no grupo de animais com 12 semanas de seguimento

4.1.1.2 - Grupo de 24 semanas de seguimento

Na tabela 4 e na Figura 15 são apresentados os valores do comprimento do lado sem aplicação de laser e do lado com aplicação do laser contínuo ou em dois pontos.

Tabela 4 - Apresentação do comprimento dos tendões (em milímetros) após 24 semanas de seguimento: lado sem aplicação de laser, lado com aplicação de laser (L-CO e L-DP) e os respectivos deltas

Nº Rato	Tendão sem	Tendão com Laser			Delta	Delta	Delta
	Laser	Total	L-CO	L-DP	Total	L-CO	L-DP
11	10,7	11,9	11,9		1,2	1,2	
12	10,0	11,8		11,8	1,8		1,8
13	10,7	11,8	11,8		1,1	1,1	
14	10,7	10,6		10,6	-,1		-0,1
15	10,7	11,9	11,9		1,2	1,2	
16	10,7	11,7		11,7	1,0		1,0
17	9,7	10,7	10,7		1,0	1,0	
18	10,7	10,7		10,7	,0		0,0
19	9,7	11,9	11,9		1,0	1,0	
20	10,7	11,8		11,8	1,1		1,1
Média	10,43	11,36	11,4	11,32	0,93	1,10	0,76
Mediana	10,7	11,8	11,8	11,7	1,05	1,10	1,00
Desvio padrão	0,44	0,59	0,64	0,61	0,56	0,76	0,80
p	0,01					0,37	

Legenda: No. = número; L-CO = Laser na forma contínua; L-DP = Laser em dois pontos; p = igual ou menor que 0,05

Pode-se observar que os valores dos comprimentos com aplicação de laser no grupo com 24 semanas de seguimento (L-CO ou L-DP) são significativamente maiores do que aqueles sem aplicação. Esse perfil não é observado, quando se analisam os valores em relação a cada tipo de aplicação

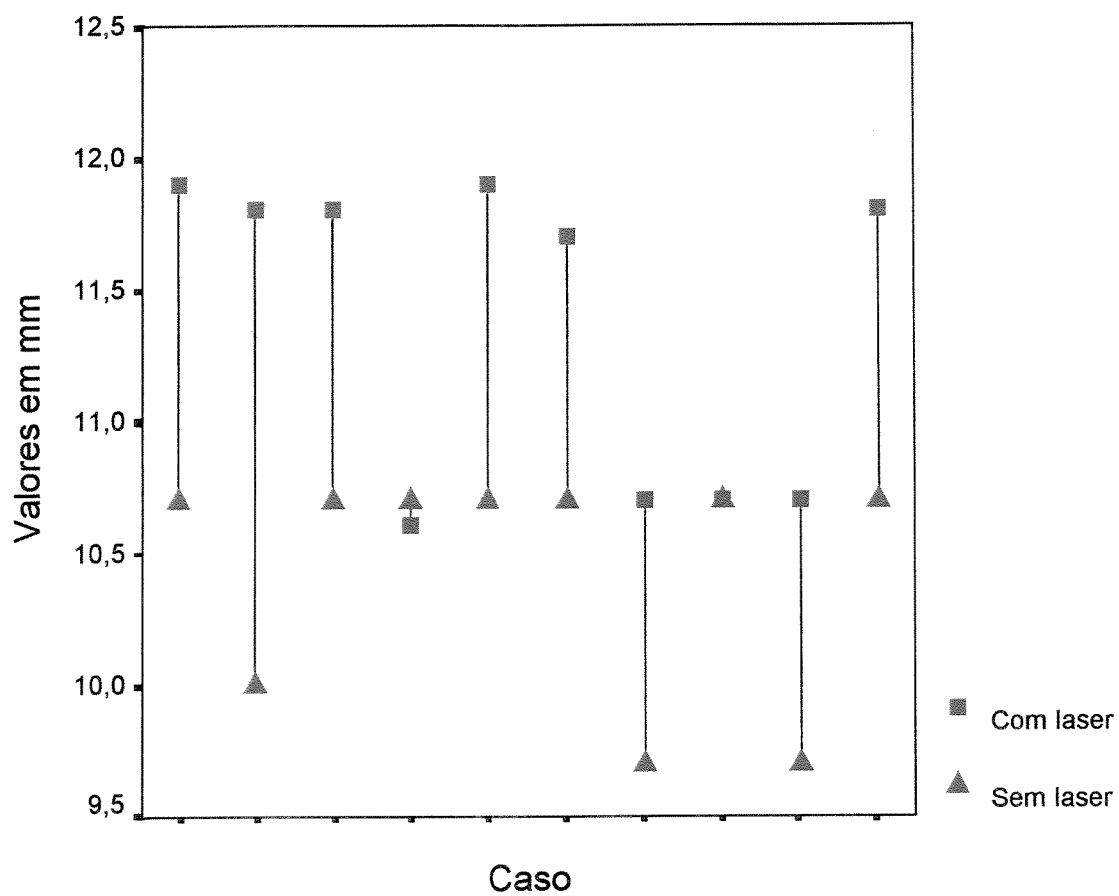


Figura 15: Apresentação do comprimento dos tendões do lado sem aplicação do laser e com aplicação do laser no grupo de animais com 24 semanas de seguimento

4.1.2 – Efeito sobre a largura

4.1.2.1 – Grupo de 12 semanas de seguimento

4.1.2.1.1 – Largura na região proximal

Tabela 5 - Apresentação da largura proximal dos tendões (em milímetros) após 12 semanas de seguimento: lado sem aplicação de laser, lado com aplicação de laser (L-CO e L-DP) e os respectivos deltas

No rato	Largura proximal sem laser	Largura proximal com laser			Delta		
		Total	L-CO	L-DP	Total	L-CO	L-DP
1	4,70	4,70	4,70		0,00	0,00	
2	4,40	5,40		5,40	1,00		1,00
3	3,20	4,70		4,70	1,50		1,50
4	5,30	4,60	4,60		-0,70	-0,70	
5	4,60	5,40		5,40	0,80		0,80
6	4,30	4,80	4,80		0,50	0,50	
7	4,20	4,50		4,50	0,30		0,30
8	4,30	4,70	4,70		0,40	0,40	
9	4,30	4,80		4,80	0,50		0,50
10	4,40	4,70	4,70		0,30	0,30	
Média	4,37	4,83	4,70	4,96	0,46	0,10	0,82
Mediana	4,38	4,7	4,70	4,80	0,45	0,30	0,80
Desvio-padrão	0,52	0,31	0,07	0,41	0,58	0,48	0,46
p	0,05					0,06	

Legenda: No. = número; L-CO = Laser na forma contínua; L-DP = Laser em dois pontos; p= igual ou menor que 0,05

Neste grupo de animais, os valores da largura na região proximal foram significativamente maiores nos animais com aplicação do laser. No entanto, não houve diferenças quanto ao tipo de aplicação.

4.1.2.1.2 – Largura na região distal

Tabela 6 - Apresentação da largura distal dos tendões (em milímetros) após 12 semanas de seguimento: lado sem aplicação de laser, lado com aplicação de laser (L-CO e L-DP) e os respectivos deltas

No rato	Largura distal sem laser	Largura distal com laser			Delta		
		Total	L-CO	L-DP	Total	L-CO	L-DP
1	4,40	4,60	4,60		0,20	0,20	
2	5,40	5,40		5,40	0,00		0,00
3	3,30	5,40		5,40	2,10		2,10
4	5,30	4,60	4,60		-0,70	-0,70	
5	4,60	4,70		4,70	0,10		0,10
6	4,30	5,00	5,00		0,70	0,70	
7	4,20	4,90		4,90	0,70		0,70
8	4,10	4,80	4,80		0,70	0,70	
9	4,30	5,30		5,30	1,00		1,00
10	4,70	4,70	4,70		0,00	0,00	
Média	4,46	4,94	4,56	4,36	0,48	0,18	0,78
Mediana	4,35	4,85	4,40	4,30	0,45	0,20	0,70
Desvio-padrão	0,60	0,32	0,46	0,75	0,75	0,58	0,84
p	0,05					0,31	

Legenda: No. = número; L-CO = Laser na forma contínua; L-DP = Laser em dois pontos; p = igual ou menor que 0,05

Neste grupo de animais, os valores da largura na região distal foram significativamente maiores nos animais com aplicação do laser. No entanto, não houve diferenças quanto ao tipo de aplicação.

4.1.2.2 – Grupo de 24 semanas de seguimento

4.1.2.2.1 – Largura na região proximal

Tabela 7 - Apresentação da largura proximal dos tendões (em milímetros) após 24 semanas de seguimento: lado sem aplicação de laser, lado com aplicação de laser (L-CO e L-DP) e os respectivos deltas

No rato	Largura proximal sem laser	Largura proximal com laser			Delta		
		Total	L-CO	L-DP	Total	L-CO	L-DP
11	4,30	5,40	5,40		1,1	1,1	
12	4,30	6,00		6,00	1,7		1,7
13	4,40	5,40	5,40		1,0	1,0	
14	4,40	5,40		5,40	1,0		1,0
15	3,30	4,40	4,40		1,1	1,1	
16	4,30	6,40		6,40	2,1		2,1
17	3,30	4,40	4,40		1,1	1,1	
18	4,40	5,40		5,40	1,0		1,0
19	4,30	4,30	4,30		,0	,0	
20	5,40	6,50		6,50	1,1		1,1
Média	4,24	5,36	4,78	5,94	1,12	0,86	1,38
Mediana	4,30	5,40	4,40	6,00	1,10	1,10	1,10
Desvio padrão	0,59	0,80	0,56	0,52	0,53	0,48	0,49
p		0,007			0,42		

Legenda: No. = número; L-CO = Laser na forma contínua; L-DP = Laser em dois pontos; p = igual ou menor que 0,05

Neste grupo de animais, os valores da largura na região proximal foram significativamente maiores nos animais com aplicação do laser. No entanto, não houve diferenças quanto ao tipo de aplicação.

4.1.2.2.2 – Largura na região distal

Tabela 8 - Apresentação da largura distal dos tendões (em milímetros) após 24 semanas de seguimento: lado sem aplicação de laser, lado com aplicação de laser (L-CO e L-DP) e os respectivos deltas

No rato	Largura Distal sem laser	Largura distal com laser			Delta		
		Total	L-CO	L-DP	Total	L-CO	L-DP
11	4,3	5,4			1,10	1,10	
12	4,3	4,3		4,3	0,00		0,00
13	4,4	5,4			1,00	1,00	
14	4,5	5,4		5,4	0,90		0,90
15	4,5	6,5	6,5		2,00	2,00	
16	4,4	5,4		5,4	1,00		1,00
17	3,3	5,4	5,4		2,10	2,10	
18	4,3	5,4		5,4	1,10		1,10
19	4,3	4,3	4,3		0,00	0,00	
20	5,4	7,5		7,5	2,10		2,10
Média	4,37	5,50	5,4	5,6	1,14	1,24	1,02
Mediana	4,35	5,40	5,4	5,4	1,05	1,10	1,00
Desvio-padrão	0,50	0,93	0,77	1,16	0,76	0,85	0,74
p	0,01					0,69	

Legenda: No. = número; gr = g ramas; L-CO = Laser na forma contínua; L-DP = Laser em dois pontos; p = igual ou menor que 0,05

Neste grupo de animais, os valores da largura na região distal foram significativamente maiores nos animais com aplicação do laser. No entanto, não houve diferenças em relação ao tipo de aplicação.

4.2 - Efeito do tempo de seguimento:

Como não houve diferenças significativas entre os tipos de aplicação do laser, esta variável não será considerada nesta fase da análise.

4.2.1 - Efeito do tempo de seguimento no comprimento dos tendões

Tabela 9 - Valores do comprimento dos tendões (em milímetros) do lado com e sem a aplicação do laser e da diferença entre os comprimentos em função do tempo de seguimento

Nº rato		Grupo de 12 semanas sem laser	Grupo de 12 semanas com laser	Diferença	Grupo de 24 semanas sem laser	Grupo de 24 semanas com laser	Diferença
1	11	11,7	11,7	0,0	10,7	11,9	1,2
2	12	10,7	11,8	1,1	10,0	11,8	1,8
3	13	9,7	8,6	-1,1	10,7	11,8	1,1
4	14	11,0	11,7	0,7	10,7	10,6	-,1
5	15	9,6	10,6	1,0	10,7	11,9	1,2
6	16	10,8	12,0	1,2	10,7	11,7	1,0
7	17	10,9	11,1	0,2	9,7	10,7	1,0
8	18	10,0	10,7	0,7	10,7	10,7	,0
9	19	11,7	11,7	0,0	9,7	11,9	1,0
10	20	11,7	11,8	-0,8	10,7	11,8	1,1
p intragrupo		0,29			0,01		
P entregrupos				0,07			

Pode-se observar que as diferenças nos comprimentos (ou alongamento) dos tendões dos animais com 24 semanas de seguimento foram significativamente maiores que as diferenças dos animais com 12 semanas de observação. A diferença de comprimento entre os grupos tendeu a ser maior no grupo de 24 semanas ($p = 0,07$). (Figura 16)

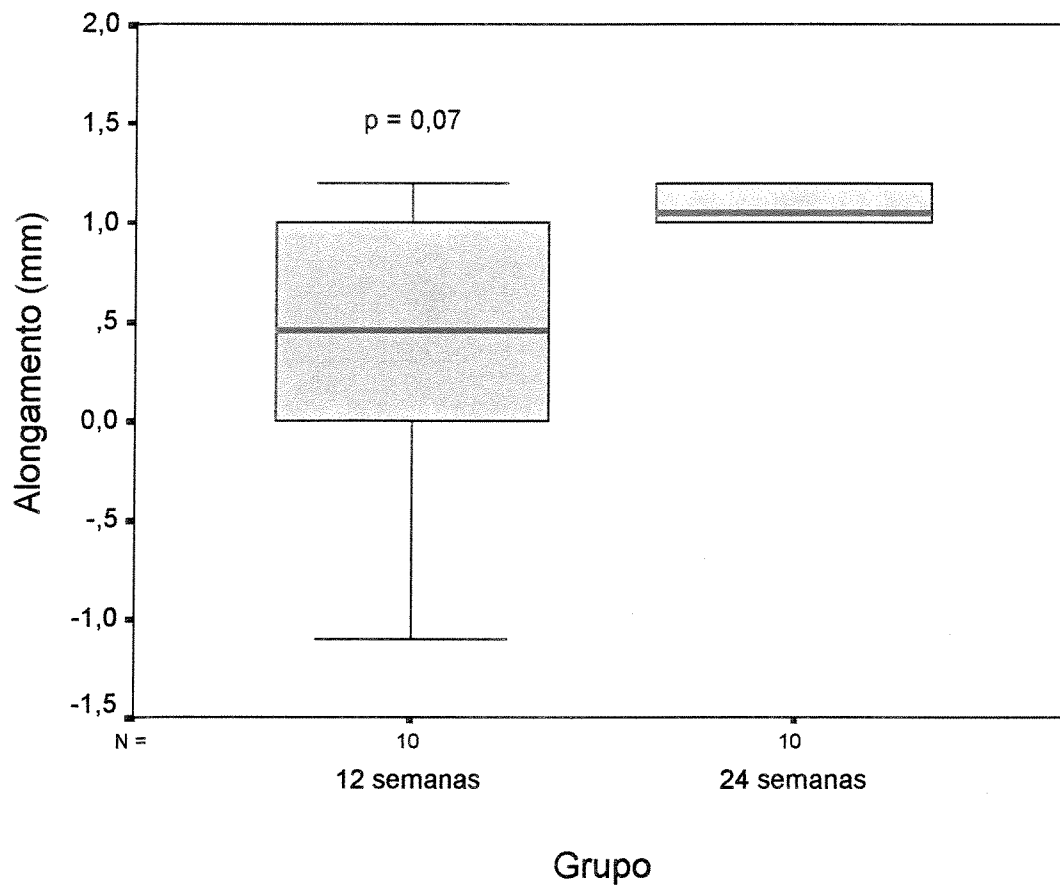


Figura 16: Apresentação dos valores da diferença entre os comprimentos, em função do tempo de seguimento.

4.2.2 - Efeito do tempo de seguimento sobre a largura dos tendões

4.2.2.1 - Largura na região proximal

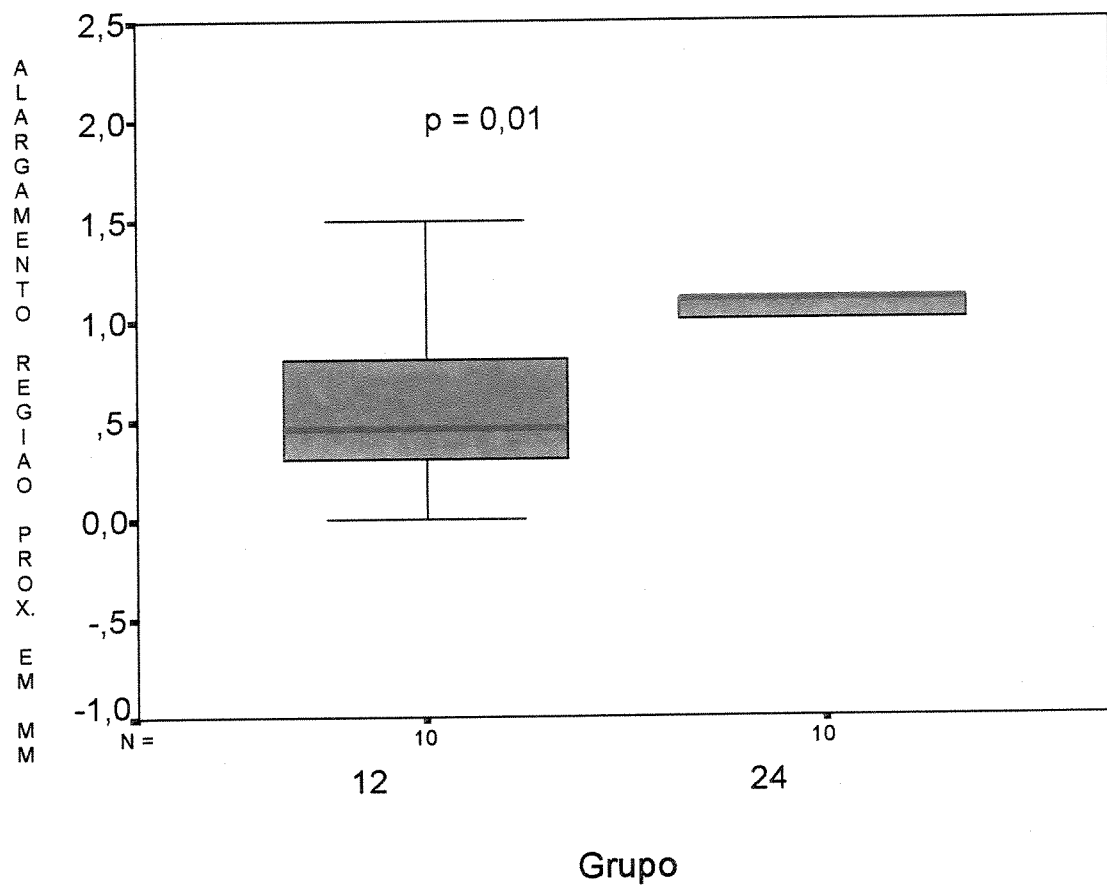


Figura 17: Apresentação dos valores da diferença entre as larguras proximal dos tendões com ou sem a aplicação do laser, nos grupos de 12 e 24 semanas de seguimento.

4.2.2.2 - Largura na região distal

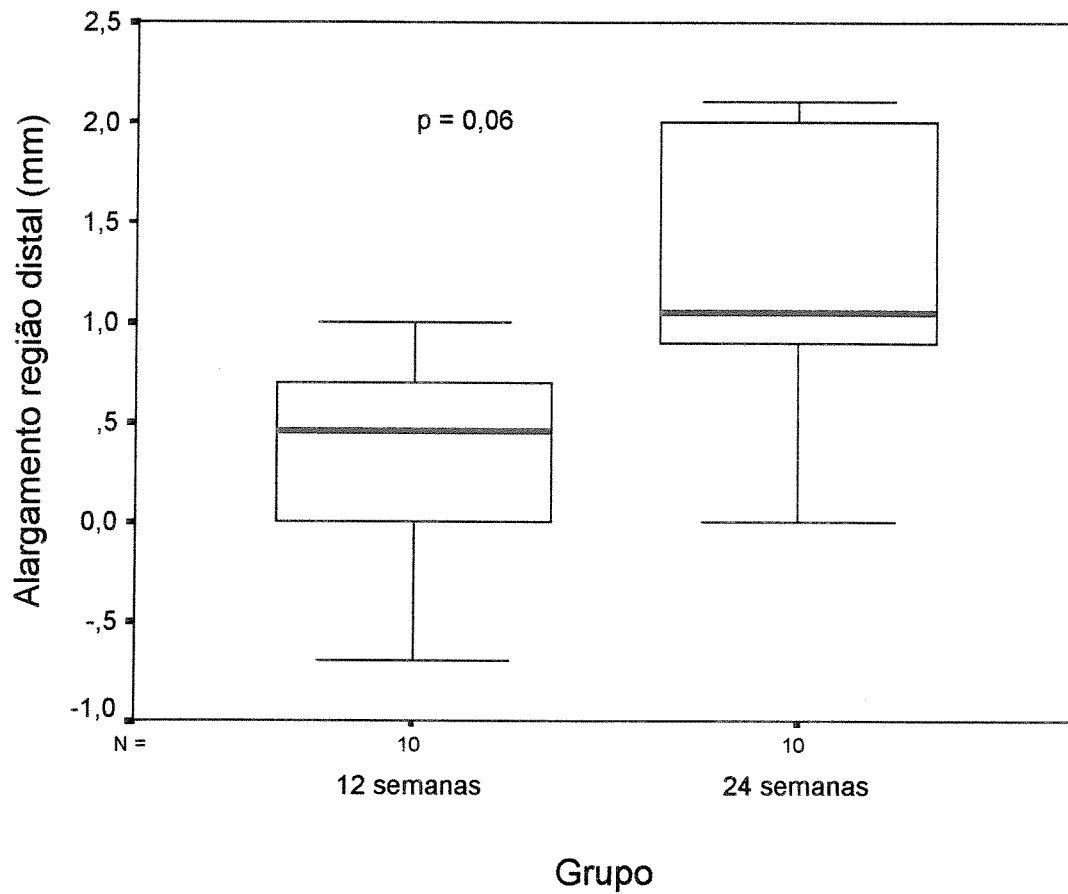


Figura 18: Apresentação dos valores da diferença entre as larguras distal dos tendões com ou sem a aplicação do laser, nos grupos de 12 e 24 semanas de seguimento.

4.3 - Avaliação macroscópica

Após 12 semanas, o aspecto do tendão era característico, com perda do seu brilho, coloração pouco amarelada e aumento de volume (Figura 19). No grupo de 24 semanas apesar do volume ser menor e o brilho mais evidente o aspecto do tendão era nitidamente diferente do lado não operado. (Figura 20)

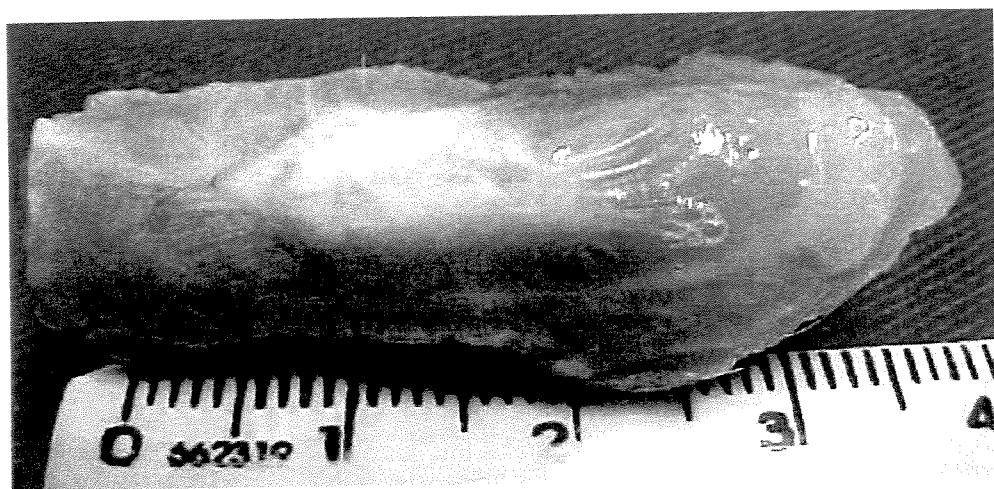


Figura 19: Aspecto do tendão após 12 semanas

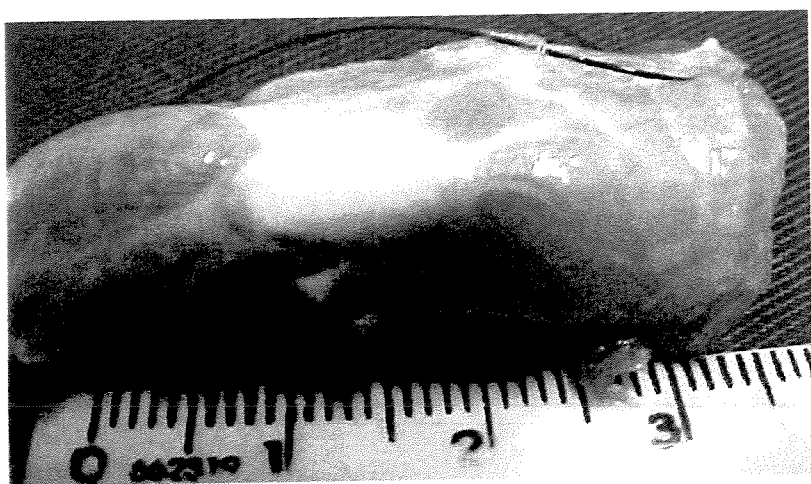


Figura 20: Aspecto do tendão após 24 semanas

4.4 - Avaliação microscópica

A avaliação microscópica foi feita analisando-se seis tendões: três com aplicação de laser na forma contínua (L-CO) e três em dois pontos (L-DP), escolhidos aleatoriamente de cada um dos grupos. Nos cortes histológicos, observou-se um padrão bastante regular e característico em cada grupo, não se observando, no entanto, diferenças entre os subgrupos.

A aplicação do laser produziu áreas de hialinização do colágeno e de proliferação dos fibroblastos. Periféricamente ao tendão (paratendão), no grupo de 12 semanas, era nítida a hiper celularidade e o aumento do número de fibras de colágeno. (Figura 21) Tanto nos cortes longitudinais como transversais, pôde-se verificar aumento do número de fibroblastos, que foi mais evidente no grupo de 12 semanas. A concentração média de fibroblastos nos tendões com 24 semanas de seguimento, foi considerada como intermediária entre o grupo de 12 semanas e o não operado. Em algumas áreas, tanto nas lâminas dos tendões com 12 e 24 semanas de seguimento, podia-se encontrar aglomerados de células arredondadas, com cromatina frouxa e grande volume citoplasmático. Na região entre os fascículos, o tecido conjuntivo era mais exuberante nos grupos com 12 semanas e com neoformação vascular mais evidente. Áreas de calcificação foram observadas nos cortes longitudinais nos grupos de 12 e 24 semanas, submetidos aos dois tipos de aplicação (L-CO e L-DP). Essas áreas foram, provavelmente, regiões onde ocorreram previamente necrose. Com relação às fibras do colágeno, no grupo com 12 semanas, áreas com hialinização ainda foram observadas, mescladas com áreas onde as fibras estavam dispostas de forma aleatória e não paralela com o longo eixo dos tendões. Nos grupos após 24 semanas, a disposição das fibras de colágeno tinham, aparentemente, aspecto mais próximo ao do lado não operado, inclusive à microscopia de luz polarizada. (Figuras 21 a 32)

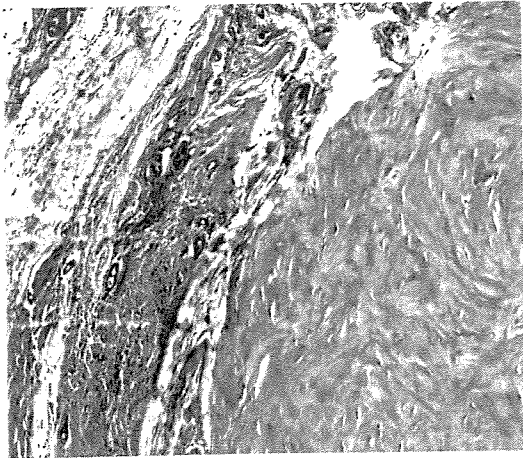


Figura 21: Aspecto histológico do paratendão à esquerda, onde nota-se aumento do número de fibras e células e vasos. R, além de neoformação vascular. Verifica-se também fusão das fibras de colágeno no tendão, produzidas pelo calor. (HE, 12 semanas, L-DP, objetiva 20x)

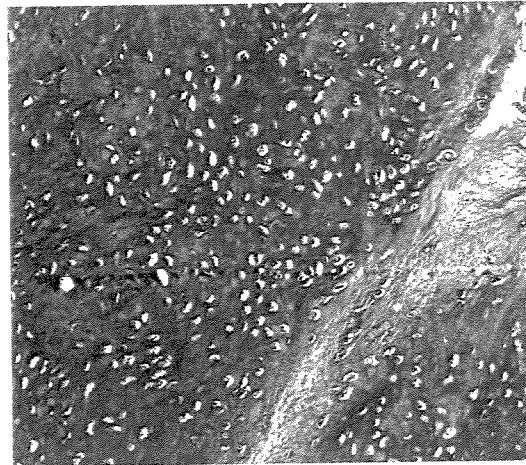


Figura 22: Aspecto histológico do tendão à esquerda, com presença de grande quantidade de fibroblastos e fibras de colágeno de menor diâmetro. (TM, 12 semanas, L-DP, objetiva 20x)

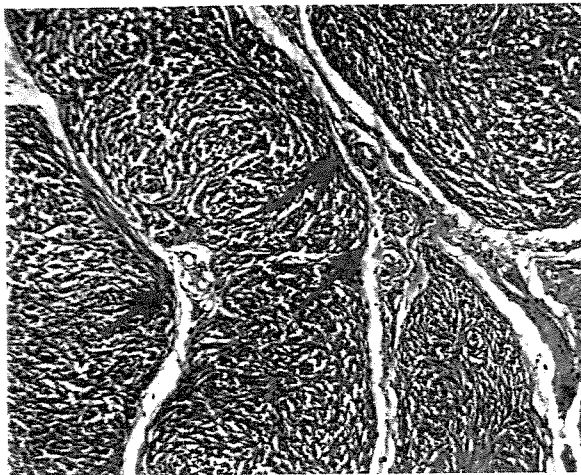


Figura 23: Aspecto histológico do tendão, corte transversal, onde se observa as traves alargadas do tecido conjuntivo (setas), com presença abundante de vasos separando as fibras de colágeno (HE, 12 semanas, L-CO, objetiva 10x)

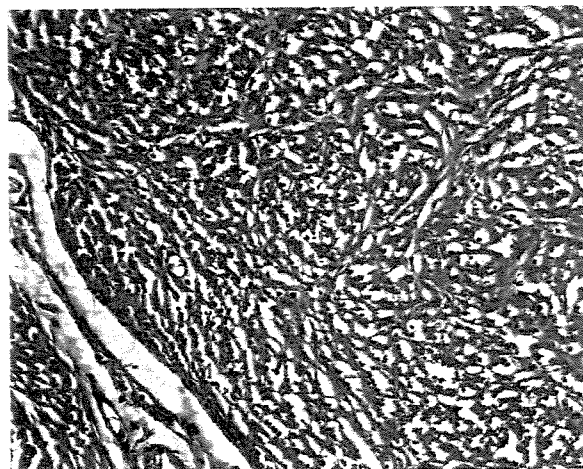


Figura 24: Detalhe da figura anterior (23), onde se observa grande quantidade de células (pontos escuros) permeando as fibras de colágeno (HE, 12 semanas, L-CO, objetiva 10x)

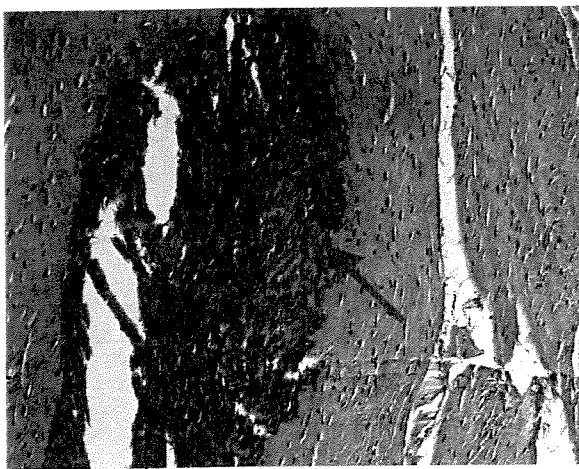


Figura 25: Aspecto histológico da porção média do tendão à esquerda, com área de calcificação (seta). Notar o grande número de células (pontos escuros) (Picrossírius, 12 semanas, L-DP, objetiva 10 x).

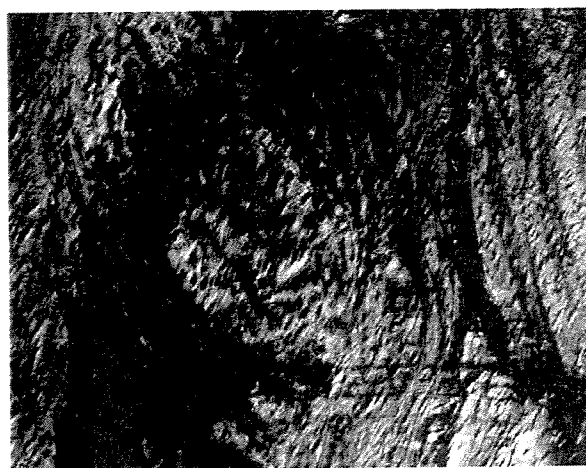


Figura 26: Aspecto histológico do mesmo campo da figura anterior, observado sob microscopia de luz polarizada. Nota-se a birrefringência das fibras de colágeno, com disposição aleatória. (Picrossírius, 12 semanas, L-DP, objetiva 10 x).

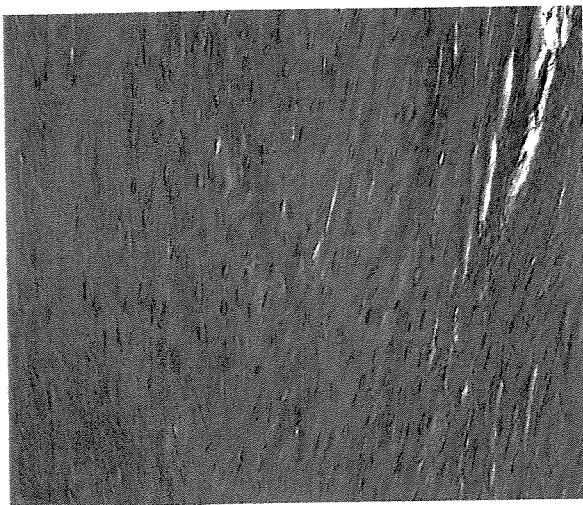


Figura 27: Aspecto histológico do tendão após 24 semanas, onde se nota grande número de células com núcleo mais condensado e tendendo a formar colunas. (HE, 24 semanas, L-CO, objetiva 20x).

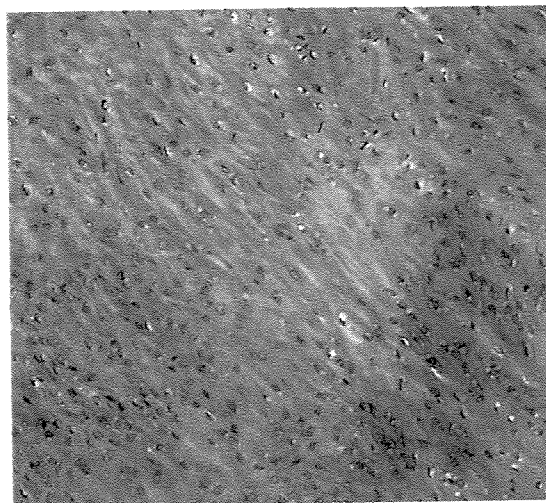


Figura 28: Outra área da mesma lâmina da figura anterior, onde se nota maior quantidade de células em atividade metabólica mais intensa. (HE, 24 semanas, L-CO, objetiva 20x).

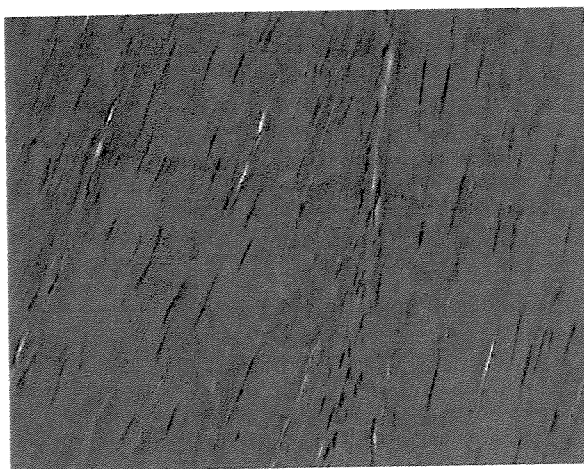


Figura 29: Aspecto histológico do tendão do grupo de 24 semanas, onde se notam fibras orientadas e células de aspecto semelhante ao lado não operado, tanto na quantidade como na morfologia (HE, 24 sem., L-DP, objetiva 20x).

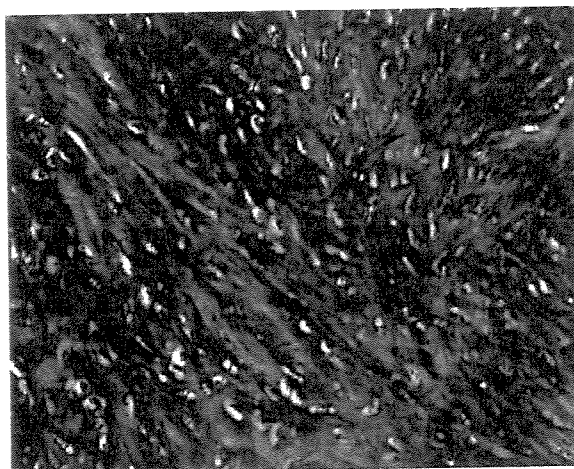


Figura 30: Aspecto histológico do tendão da figura anterior, em corte transversal, onde se nota número regular de células. (TM, 24 semanas, L-DP, objetiva 20 x).



Figura 31: Aspecto histológico do tendão após 24 semanas, na coloração do picrossírius, sob microscopia de luz polarizada, onde se nota a birrefringência das fibras de colágeno, orientadas em relação ao longo eixo do tendão (Picrossírius, 24 semanas, L-DP, objetiva 20 x)



Figura 32: Aspecto histológico do mesmo campo da figura anterior, onde pode-se notar a presença de fibras de colágeno de menor diâmetro em outras direções. (Picrossírius, 24 semanas, L-DP, objetiva 20 x)

DISCUSSÃO

5 - DISCUSSÃO

Desde que foi aprovado o uso clínico do laser de Ho:YAG (1989) (LYONS et al., 2001), tem crescido o número de publicações que estudam, em nível experimental e clínico, os efeitos do calor sobre as diferentes estruturas que compõem o aparelho locomotor, como a cápsula articular, ligamentos e tendões. Esses estudos vêm sendo realizados, tanto *in vitro* como *in vivo*, em diferentes espécies animais (boi, cão, rato, coelho, ovelha) e buscam compreender o processo de encolhimento e reparação que ocorre subsequentemente à aplicação do calor. (ABELOW, 1993; DILLINGHAM et al., 1993; SHERK, 1993; HAYASHI et al., 1995; HAYASHI et al., 1997-a; HAYASHI et al., 1997-b; NOTTAGE, 1997; SCHAEFER et al., 1997; HAYASHI et al., 1999; MEDVECKY et al., 2001; SCHULZ et al., 2001).

No entanto, ainda são poucos os estudos *in vivo* que avaliam os efeitos biológicos do calor sobre os tecidos ricos em colágeno, principalmente a médio e longo prazo (HAYASHI et al., 2000).

Dentre os efeitos que o calor pode produzir sobre o tecido conjuntivo denso, sabe-se que a quantidade de encolhimento depende de vários fatores, dentre eles a espécie animal e a quantidade e diâmetro das fibras do colágeno (BANGA et al. 1954; HALL e REED, 1957; RIGBY e SPIKES, 1960; SCHOBER et al. 1986; ALLAIN et al. 1980; HORGAN et al. 1990). No entanto, apesar dos estudos relatarem relação entre a quantidade de encolhimento e a quantidade de energia dissipada sob a forma de calor no tecido; até o momento, os resultados obtidos com esse método na clínica são pouco reprodutíveis (HAYASHI et al. 1995; HAYASHI et al. 1996-b; HAYASHI et al. 1997-a; SCHAEFER et al. 1997; HAYASHI et al. 1999) .

SCHAEFER et al. (1997) aplicaram o laser HO:YAG (10 Watts/10 Hz 300 J/cm²) em tendão patelar de coelhos *in vivo* e encontraram encolhimento de 6,7%, enquanto que BEREND et al. (1996), utilizando o mesmo equipamento e a mesma potência de laser, obtiveram 56% de encolhimento no tendão patelar do cães *in vitro*. Segundo SCHAEFER et al. (1997) essa diferença expressiva deve ter ocorrido porque, no estudo de BEREND et

al. (1996), a aplicação do laser foi realizada *in vitro*, não havendo assim limitação para o encolhimento.

Quando se atingem temperaturas entre 65°C a 75°C, o colágeno sofre desarranjo estrutural e morte celular, já que essa estrutura resiste até 40° C. Inicia-se então o processo de reparação, caracterizado, histologicamente, pela neovascularização e proliferação de fibroblastos (HAYASHI et al. 1997-b).

Na idealização do modelo experimental, o objetivo principal foi o de estudar o efeito do laser sobre o tendão patelar do rato, mantendo o animal sem imobilização por um período de 12 e 24 semanas. Apesar de não ter sido encontrado na literatura modelo semelhante em rato, optou-se por esse animal por dois motivos: primeiro porque é de linhagem isogênica e, segundo, porque é rotineiramente utilizado em laboratório e, portanto, bem conhecido do ponto de vista anatômico, metabólico e funcional. (FLECKNELL, 1987)

O tempo de seguimento proposto para o primeiro grupo foi baseado no fato de que, em geral, após 12 semanas as fibras de colágeno neoformadas já estão maduras e, portanto, não deveriam mais sofrer modificação estrutural. Segundo SCHULZ et al. (2001), que estudou o efeito do HO YAG laser sobre a cápsula articular do coelho, após 12 semanas há recuperação adequada da resistência e da rigidez do tecido. O autor recomenda inclusive que após esse período deve-se iniciar o processo de reabilitação na clínica. A observação, após 24 semanas, tem significado por representar quase a metade da vida útil do rato de laboratório e corresponder, na espécie humana, a aproximadamente 40 anos de vida. (FLECKNELL, 1987)

Apesar do laser de Ho:YAG estar sendo usado na clínica preferencialmente para o tratamento da frouxidão cápsulo-ligamentar do ombro (NOTTAGE 1997; SELECKY et al. 1999; LYONS et al., 2001; MEDVECKY et al. 2001; FAVORITO et al. 2002) optou-se pelo uso do tendão patelar por ser uma estrutura rica em fibras de colágeno do tipo I, orientadas preferencialmente ao seu longo eixo. Essa disposição das fibras de colágeno facilitou a observação da resposta térmica no momento da aplicação do laser, uma vez que resultava na redução do comprimento do tendão. Por outro lado, a resposta do

tecido conjuntivo denso ao calor é universal e, desse modo, não importa se a estrutura analisada tenha sido a cápsula ou o tendão.

Além disso, por estar o tendão patelar localizado abaixo do tecido celular subcutâneo, do ponto de vista anatômico, o acesso cirúrgico foi menos trabalhoso, menos mórbido e mais reprodutível.

Em um estudo semelhante realizado em coelhos, SCHAEFER et al. (1997) utilizaram marcas metálicas inseridas na patela e na tuberosidade anterior da tíbia para facilitar o procedimento de mensuração através de radiografias. Apesar de válido, esse recurso não foi utilizado no presente estudo, já que as mensurações foram feitas imediatamente após o sacrifício dos animais, utilizando-se os limites anatômicos proximal e distal do tendão, identificados facilmente pelo pólo inferior da rótula e pela tuberosidade anterior da tíbia, respectivamente.

A mobilização pós-operatória imediata foi importante no estudo para se avaliar a capacidade de remodelação do tendão após a agressão térmica. Com o encolhimento, o tendão patelar passou a ser solicitado por uma força de tração maior do que a habitual no pós-operatório imediato. Essa força foi gerada em parte pela posição em extensão do joelho que, no caso do rato, não é fisiológica, e pela contração fisiológica dos músculos flexores e extensores necessária para a deambulação. O alongamento resultante observado deve ter ocorrido em parte na porção viável do tendão pelo deslizamento dos fascículos e fibrilas entre si (relaxamento de tensão), que ocorre por ser esta uma estrutura viscoelástica. No entanto, acredita-se que a maior parte do alongamento deva ter ocorrido na porção desvitalizada do tendão durante o processo de reparação, principalmente porque já é bem conhecido o fato de que quanto maior o encolhimento, menor a resistência do tecido à tração mecânica (ARNOCZKY e AKSAN, 2000; HAYASHI et al., 1996; SCHULZ et al., 2001; MEDVECKY et al., 2001). Como a espessura do tendão patelar do rato é de 0,7 mm em média e, nas condições utilizadas o laser de Ho:YAG, a penetração varia de 0,3 mm a 0,5 mm, deve ter havido preservação da porção mais profunda do tendão, fator importante para manter a função articular, principalmente na fase inicial da reparação, além de funcionar como um molde para essa reparação.

Tanto a confiabilidade como a reprodutibilidade das medidas são críticas para a segurança das conclusões. Para reduzir o erro, essas mensurações foram realizadas sempre pelo mesmo indivíduo, de forma comparativa e com a mesma técnica e equipamento. A análise dos valores obtidos para o lado normal (não operado) em cada um dos grupos demonstrou que houve acurácia e reprodutibilidade das medidas, uma vez que os valores foram semelhantes entre si, com pequeno desvio-padrão (0,81 e 0,44 para 12 e 24 semanas, respectivamente).

A diferença observada entre a mediana das medidas do comprimento dos tendões não operados, nos dois grupos, pode ser explicada pelo fato de que os grupos foram formados por animais de idades diferentes (o primeiro com 10 semanas e o segundo com 15 semanas de vida). Essa diferença de idade, no entanto, não é significativa com relação às propriedades biológicas do colágeno, que nessa espécie só é considerado envelhecido quando esses animais atingem idade igual ou superior a 11 meses. (CHVAPIL e JENSOVSKY, 1963)

O equipamento de laser Ho:YAG utilizado nesse experimento foi o mesmo que se utiliza na prática clínica, mudando-se apenas a quantidade da energia térmica gerada, que foi adaptada do estudo de HAYASHI et al. (1996-a) em coelhos. Tanto o controle do tempo de aplicação como da distância da ponteira do laser em relação ao tendão foram feitos de forma visual pelo cirurgião, aliás como é feito nos procedimentos clínicos. Assim, tomou-se o cuidado de se fazer as aplicações estimando-se visualmente a quantidade de encolhimento, que resultava na retificação da atitude em flexão da pata posterior do rato.

Esse critério pode ser questionado para se quantificar o encurtamento inicial e, indiretamente, a quantidade de tendão atingida pelo laser, já que dentre as várias determinantes citadas na literatura, para esses eventos, encontram-se a distância e o tempo de exposição ao laser como variáveis importantes (ARNOCZKY e AKSAN, 2000; MEDVECKY et al., 2001). Entretanto, nesse estudo, procurou-se reproduzir o que ocorre na prática clínica, em que o cirurgião tem apenas a sua experiência e o critério clínico e visual para estimar a quantidade de energia laser que deve ser aplicada e o encolhimento resultante.

A olho nu pôde-se observar nitidamente diferenças tanto no comprimento como na largura proximal e distal dos tendões entre o lado normal e o lado operado nos dois grupos de seguimento (12 e 24 semanas). Em contrapartida, todos os animais desses dois grupos mantiveram função normal e semelhante tanto do lado operado quanto do lado controle. Em geral, o processo de reparação e de neoformação das fibras de colágeno leva em média 12 semanas para se completar (SCHULZ et al., 2001). Após esse período, o tecido neoformado é considerado fisiologicamente maduro, ou seja, apto a exercer suas funções mecânicas. O fato de ter se encontrado maior comprimento do lado operado após 12 semanas, indica que há necessidade de imobilização pós-operatória imediata a fim de se manter o comprimento obtido pelo calor, que servirá de molde para a neoformação vascular e, principalmente, fibroblástica. Mesmo partindo de tendões com menor comprimento inicial (ratos com 10 semanas), após 24 semanas pôde-se observar que o lado operado havia se tornado significativamente mais longo, inclusive em relação ao grupo de 12 semanas.

Comparou-se a aplicação do laser de forma contínua com a forma em dois pontos porque há evidências na literatura de que a aplicação pontual produz a mesma quantidade de encolhimento que a aplicação contínua, permitindo porém que a recuperação do tecido seja mais rápida pela preservação de áreas íntegras entre os pontos de aplicação do calor. (MEDVECKY et al., 2001) De acordo com as considerações prévias, seria esperado que o alongamento final no grupo submetido à aplicação em dois pontos fosse menor. Entretanto, os resultados não confirmaram essa hipótese, pois não se observaram diferenças significativas em relação ao comprimento e à largura proximal e distal entre os dois tipos de aplicação. O reduzido tamanho da área central preservada em função do tamanho das ponteiros utilizadas pode ser uma possível explicação para esse fato. A outra hipótese pode estar relacionada com a redução do aporte sanguíneo para a porção central do tendão patelar, que provém principalmente das regiões proximal e distal, atingidas pelo calor em ambos os grupos. Essa redução deve ter diminuído, pelo menos temporariamente, a capacidade de regeneração dessa região. Esse resultado e as hipóteses levantadas podem colocar em xeque a aplicação do laser em dois pontos nesse modelo.

Como alternativa, em estudos futuros pode-se, eventualmente, comparar a aplicação em dois pontos ou contínua com uma aplicação do laser na porção central do

tendão. Nessas condições, as porções proximal e distal ficariam preservadas e a área viável remanescente seria maior do que a área atingida pelo laser. A princípio, essa opção não foi escolhida durante a elaboração do projeto porque se acreditava que a aplicação central poderia enfraquecer muito o tendão, acarretando a ruptura do mesmo durante o pós-operatório imediato, pela mobilização articular precoce. Corroborando essa hipótese, pode-se citar o estudo *in vitro* de VANGSNESS et al. (1996), no qual os autores analisaram a resistência mecânica do tendão patelar humano após a aplicação de laser de Ho:YAG na sua porção central. Durante os ensaios de tração, observaram que a ruptura ocorria exatamente na região atingida pelo laser.

Com relação às medidas da largura da porção proximal e distal dos tendões em ambos os grupos (12 e 24 semanas), verificou-se que foram significativamente maiores no lado operado e, tal qual ocorreu com o comprimento final, não houve diferença significativa da largura em função do tipo da aplicação. Esse achado está de acordo com os ensaios realizados *in vivo* no tendão patelar de coelhos (SCHAEFER et al., 1997). Sabe-se que o laser estimula neoformação de fibroblastos e, conseqüentemente, a deposição de fibras de colágeno. (HAYASHI et al., 1996-a; SCHULZ et al., 2001). A análise por microscopia óptica das lâminas mostrou que nessas regiões, mesmo após 12 semanas, havia ainda intensa proliferação fibroblástica e áreas de neoformação cartilaginosa, inclusive com calcificação. A evolução para calcificação denuncia que a agressão térmica deve ter sido além do necessário e deve ter acarretado necrose tecidual extensa. Nos grupos com 24 semanas de seguimento, o aspecto histológico era próximo do normal, com a presença de fibras orientadas em direção ao longo eixo do tendão e com número reduzido de células em relação ao grupo de 12 semanas. No entanto, também foram observadas áreas de cartilagem e cartilagem calcificada nesse grupo de seguimento (24 semanas). Por outro lado, a resposta fibroblástica exuberante e presente nos animais com 12 e 24 semanas mostra que houve agressão importante sobre o tendão e que apenas com o controle clínico é difícil reproduzir com segurança as lesões. As áreas de calcificação não eram esperadas e nem desejadas, principalmente porque não é possível estabelecer-se qual seria a evolução funcional desses tendões, caso os animais fossem mantidos vivos. Como houve mudança evidente do aspecto microscópico entre os dois grupos, seguimentos por períodos mais longos talvez

possam fornecer informações adicionais quanto ao processo de remodelação natural e contínuo que ocorre no tendão, quando submetido a esforços fisiológicos.

Corroborando de certo modo essas observações, observa-se na literatura que o laser vem sendo substituído pelos equipamentos de radiofrequência, que são mais baratos, mais fáceis de usar e transportar. Mas o motivo mais importante para essa substituição é que esses equipamentos permitem que o cirurgião tenha, durante o procedimento, a sensação do toque com a ponteira sobre o tecido, aumentando assim a sua sensação tátil e, conseqüentemente, dando-lhe maior controle sobre o procedimento. (WONG e WILLIAMS, 2001)

Do ponto de vista prático, todas essas conclusões são relevantes, apesar de não poderem ser repassadas diretamente para a clínica. Entretanto, elas podem servir como alerta para manter o espírito crítico do cirurgião na busca melhores resultados baseados nessas observações. De qualquer modo, as questões aqui levantadas só poderão ser respondidas mediante novos estudos experimentais e clínicos, com protocolos bem elaborados.

CONCLUSÕES

6 - CONCLUSÕES

Com relação ao efeito da aplicação do *Holmium Laser Trymedime* sobre as dimensões e sobre a celularidade e arranjo das fibras de colágeno do tendão patelar do rato, após 12 e 24 semanas de seguimento, pode-se concluir que:

- A medida do comprimento do lado operado foi considerada significativamente maior, quando comparada com o lado não operado, nos dois grupos de seguimento, porém não houve diferença significativa das medidas do comprimento em função do tipo de aplicação do laser.
- A medida da largura, tanto na região proximal quanto distal, foram significativamente maiores nos dois grupos, quando comparadas com o lado não operado, também sem diferenças em função do tipo de aplicação.
- Quando se compararam os dois grupos de seguimento, o comprimento, após 24 semanas, tendeu a ser maior do que o grupo de 12 semanas, do mesmo modo que a largura na região distal do tendão. A largura na região proximal, no entanto, foi significativamente maior após 24 semanas.
- Quanto à avaliação microscópica, tanto nos cortes longitudinais como transversais, pôde-se verificar aumento do número de fibroblastos, principalmente no grupo de 12 semanas.
- Com relação às fibras do colágeno, no grupo com 12 semanas foram encontradas áreas com hialinização, mescladas com áreas onde as fibras estavam dispostas de forma aleatória e não paralela com o longo eixo dos tendões. Nos grupos após 24 semanas, a disposição das fibras de colágeno tinham, aparentemente, aspecto mais próximo ao do lado não operado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências Bibliográficas

ABELOW, S.P. Use of lasers in orthopedic surgery: Current concepts. **Orthopedics**, 16: 551-6, 1993.

ALLAIN, J.C.; LE LOUS, M.; CONHEN-SOLAL, L. et al. Isometric tensions developed during the hydrothermal swelling of rat skin. **Connect Tissue Res** 7: 127-33, 1980.

ARNOCZKY, S.P.; AKSAN, A. Thermal modification of connective tissues: Basic science considerations and clinical implications. **J Am Acad Orthop Surg**, 8(5):305-13, 2000.

BANGA, I.; BALÓ, F.; SZABO, D. Contraction and relation of collagen. **Nature**, 174:788, 1954.

BASS, L.S.; MOAZAMI, N.; POCSIDIO, J.; OZ, M.C.; LoGEERFO, P. TREAT, M.R. Changes in type I collagen following laser welding. **Lasers Surg Med.**, 12:500-5, 1992.

BELANGERO, W.D.; KÖBERLE, G.; HADLER, W.A. Inflammatory reaction of rat striated muscle to particles of carbon fiber reinforced carbon. **Brazilian J Med Biol Res**, 26:819-26, 1993.

BEREND, M.E.; GLISSON, R.R.; SEABER, AV.; et al. Soft tissue shortening with the Ho:YAG laser: Experimental model and structural effects. **Trans Orthop Res Soc**, 21(1): 50, 1996.

BULCHET, M.B.; KUTSCHER, H.P.; KATTERSCHAFKA, T.; KISS, H.; SCHNEIDER, B.; ULLRICH, R. Erb:YAG and Hol: YAG laser ablation of meniscus and intervertebral discs. **Lasers Surg Med**, 12(4):375-81, 1992.

BULCHET, M.B.; KUTSCHERA, H.P.; KATTERSCHAFKA, T; KISS, H.; LANG, S. Ablation of polymethyl methacrylates by Ho:YAG, Nd:YAG and Er:YAG lasers. **Lasers Surg Med**, 13(6): 638-46, 1993.

CECCHINI, S.C.M. Estudo in vitro das aplicações do laser de hólmio:YLF em esmalte e dentina, visando a realização de cirurgia de acesso endodôntico e preparo cavitário. São Paulo (SP), 1995. (Dissertação – Mestrado - Universidade Estadual de São Paulo - USP).

CHVAPIL, M.; JENSOVSKY, L. The shrinkage temperature of collagens fibers isolated from the tail tendons of rats of various ages and from different places of the same tendon. **Gerontology**, 1:18-29, 1963.

DÂNGELO, J.G.J. ; FATTINI, C.A. Anatomia humana sistêmica e segmentar, 2. ed., São Paulo: Editora Atheneu, 1995, pág. 44.

DILLINGHAM, M.F.; PRICE, J.M.; FANTON G.S. Holmium laser surgery. **Orthopedics**, 16:563-6, 1993.

DUFFY, S.M.; SHARP, F.; STAMP, J. ; GINSBERG, R. Preliminary observations of holmium:YAG laser tissue interaction using human uterus. **Lasers Surg Med**, 12(2): 147-52, 1992.

FAVORITO, P.J.; LANGENDERFER, M.A.; COLOSIMO, A.J.; HEIDT, R.S.; CARLONAS, R.L. Arthroscopic laser-assisted capsular shift in the treatment of patients with multidirecional shoulder instability. **Am J Sports Med** 30 (3):322-8, 2002.

FLECKNELL, P.A. Laboratory animal anestesys. 2. ed., San Diego (California): Academy Press Limited, 1987.

FLORY, P.J. ; SPURR, O.K. Phase transition in collagen and gelatin systems. **J Am Hem Soc**, 80: 4836-45, 1958.

FLORY, P.J. ; WEAVER, E.S. Helix coil transition in dilute aqueous collagen solutions. **J Am Soc**, 82:4518-25, 1959.

GOLDMAN, L.; WILSON, R.; HORNBY, P.; MAYER, R. Laser radiation of malignancy in man. **Cancer**, 18(5): 533-45, 1965.

HALL, D.A.; REED, R. Hidroxyproline and thermal stability of collagen. **Nature**, 180: 243, 1957.

HAYASHI, K.; MARKEL, M.D.; THABIT II, G.; BOGDANSKE, J.J.; THIELKE, R.J. The effect of nonablative laser energy on joint capsular properties. **Am J Sports Med**, 23(4): 482-7, 1995.

HAYASHI, K.; THABIT III, G.; VAILAS, A.C.; BOGDANSKE, J.J.; COOLEY, A.J.; MARKEL, M.D. The effect of nonablative laser energy on joint capsular properties. An in vitro histologic and biochemical study using a rabbit model. **Am J Sports Med**, 24(5): 640-6, 1996a.

HAYASHI, K.; THABIT III, G.; BOGDANSKE, J.J.; MASCIO, L.N.; MARKEL, M.D. The effect of nonablative laser energy on the ultrastructure of joint capsular collagen. **Arthroscopy**. 12(4):474-81, 1996b.

HAYASHI, K.; THABIT III, G.; MASSA, K.L.; BOGDANSKE, J.J.; COOLEY, A.J.; ORWIN, J. et. al. The effect of thermal heating on the length and histologic properties of the glenohumeral joint capsule. **Am J Sports Med**, 25(1): 107-12, 1997 (a).

HAYASHI, K.; NIECKARZ, J.A.; THABIT III, G.; BOGDANSKE, J.J.; COOLEY, A.J.; MARKEL, M.D. Effect of nonablative laser energy on the joint capsule. An in vivo rabbit study using a holmium:Yag laser. **Lasers Surg Med**, 10:164-71, 1997b.

HAYASHI, K.; MASSA, K.L.; THABIT III, G.; FANTON, G.S.; DILLINGHAM, M.F.; GILCHRIST, K.W. et. al. Histologic evaluation of the glenohumeral joint capsule after the laser-assisted capsular shift procedure for glenohumeral instability. **Am J Sports Med.**, 27(2): 162-7, 1999.

HAYASHI, K.; HECHT, P.; THABIT III, G.; PETERS, D.M.; VANDERBY JR, R.; COOLEY, A.J., et al. The biologic response to laser thermal modification in an in vivo sheep model. **Clin. Orthop.**, 373:265-76, 2000.

HECHT, J. Understanding lasers. Texas(USA), Radio Shack - A Division of Tandy Corporation, 1988.

HIBST, R. ; KELLER, U. Experimental studies of the application of the Er:YAG laser on dental hard substances. I: Measurement of the ablation rate. **Lasers Surg Med**, 9(4): 338-44, 1989.

HORGAN, D.J.; KING, N.L.; KURTH, L.B., et al. Collagen crosslinks and their relationship to the thermal properties of call tendons. **Arch Biochem Biophys**, 281: 21-26, 1990.

JONHSON, D.E.; CROMEENS, D.M.; PRICE, R.E. Transurethral incision of the prostate using holmium:YAG laser. **Lasers Surg Med**, 12(4):364-369, 1992a.

JONHSON, D.E.; CROMEENS, D.M.; PRICE, R.E. Use of holmium:YAG laser in urology. **Lasers Surg Med**, 12(4):353-63, 1992b.

KARU, T. Photobiology of low-power laser effects. **Health Phys**, 56(5): 691-704, 1989.

KUTSCH, V.K. Lasers in dentistry: comparing wavelengths. **J Am Dent Assoc**, 124 (2): 49-54, 1993.

LYONS, T.R.; GRIFFITH, P.L.; SAVOIE, F.H.; FIELD, L.D. Laser-assisted capsulorrhaphy for multidirectional instability of the shoulder. **Arthroscopy**. 17(1):25-30, 2001.

MAIMAN, T.H. Stimulated optical radiation in rubi. **Nature**, 187 (4736): 493-4, 1960.

McGUFF, P.E.; DETERLING, R.A.; GOTTLIEB, L.S.; GAHIMI, H.D.; BUSHNELL, D.; ROEBER, F. Laser surgery malignant tumors. **Dis Chest**, 48(2): 130-9, 1965.

MEDVECKY, M.J.; ONG, B.C.; ROKITO, A.S.; SHERMAN, O.H. Thermal capsular shrinkage: Basic science and clinical applications. **Arthroscopy**. 17(6):624-35, 2001.

MILLER, M.M.; TRUHE, T. Lasers in dentistry: an overview. **J Am Dent Assoc**, 124 (2): 32-5, 1993.

MONTGOMERY, R; CONWAY, T.W.; SPECTOR, A.A. Bioquímica. Uma abordagem por casos. 5. ed., Porto Alegre: Artes Médicas, 1994.

NOTTAGE, W.M. Laser-assisted shoulder surgery. **Arthroscopy**, 13(5): 635-8, 1997.

O'BRIEN, S.J.; MILLER, D.V. The contact neodymium-yttrium aluminum garnet laser. A new approach to arthroscopic laser surgery. **Clin Orthop**, 252: 95-100, 1990.

PICK, R.M. Using lasers in clinical dental practice. **J Am Dent Assoc**, 124(2): 37-47, 1993.

RIGHY, B.F.; SPIKES, F.D. Hidroxyproline and the shrinkage temperature of collagen. **Nature**, 187: 150-1, 1960.

SCHAEFER, S.L.; CIARELLI, M.J.; ARNOCZKY, S.P.; ROSS, H.E. Tissue shrinkage with the holmium:yttrium aluminum garnet laser. A postoperative assessment of tissue length, stiffness and structure. **Am J Sports Med**, 25(6):841-8, 1997.

SCHAWLOW, A.L.; TOWNES, C.H. Infrared and optical masers. **Phys Rev**, 112:1940-9, 1958.

SCHOBBER, R.; ULRICH, F.; SANDER, T.; DÜRSELEN, H.; HESSEL, S. Laser-induced alteration of collagen substructure allows microsurgical tissue welding. **Science**: 1421-2, 1986.

SCHULZ, M.M.; LEE, T.Q.; SANDUSKY, M.D.; TIBONE, J.E.; McMAHON, P. The healing effects on the biomechanical properties of joint capsular tissue treated with Ho: YAG laser. An in vivo rabbit study. **Arthroscopy**, 17(4):342-7, 2001.

SELECKY, M.T.; VANGSNESS, T.; LIAO, W.L.; SAADAT, V.; HEDMAN, T.P. The effect of laser-induced collagen shortening on the biomechanical properties of the inferior glenohumeral ligament complex. **Am J Sport Med**, 27(2):168-72, 1999.

SHERK, H.H. The use of lasers in orthopaedic procedures. **J. Bone Joint Surg**, 75-A:768-76, 1993.

SPINDEL, M.L.; MOSLEM, A.; BHATIA, K.S.; JASSEMNEJAD, B.; BARTELS, K.E.; POWELL, R.C. et al. Comparison of holmium and flashlamp pumped dye lasers for use in lithotripsy of biliary calculi. **Lasers Surg Med**, 12(5): 482-9, 1992.

THABIT. G. The arthroscopic monopolar radiofrequency treatment of chronic anterior cruciate ligament instability. **Operative Techniques Sports Med**, 6:157-60, 1998.

VANGSNESS, C.T.; MITCHELL III, W.; NIMNI, M.; ERLICH, M.; SAADAT, V.; SCHMOTZER, H. Collagen shortening. **Clin Orthop Rel Res**, 337: 267-71, 1997.

WALL, M.S.; DENG, X.H.; TARZILLI, P.A.; DOLY, S.B.; O'BRIEN, S.J.; WARREN, R.F. Thermal modification of collagen. **J. Shoulder Elbow Surg**, 8(4): 339-44, 1999.

WONG, K.L.; WILLIAMS, G. Complications of thermal capsulorrhaphy of the shoulder. **J. Bone Joint Surg**, 83-A (Suppl. 2, part 2): 151-5, 2001.

WOO, S.L.Y.; AN, K.N.; FRANK, C.B.; LIVESAY, G.A. ; MA, C.B.; ZEMINSKI, J. et al. Anatomy, biology and biomechanics of tendon and ligament. **In**: BUCKWALTER, J.A.; EINHORN, T.A. e SIMON, S.R. Orthopaedic Basic Science. **Biology and Biomechanics of the Musculoskeletal System**. 2. ed., USA: American Academy of Orthopaedic Surgeons, 2000.

YARBOROUGH, J.M. Taking the confusion out of the matching medical lasers to applications. Understanding the principles of the laser-tissue interaction holds the key to choosing the right laser for the job. **Med Lasers**, 26(10):88-94, 1992.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE