

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação

**Ação do Laser de Hélio-Neônio sobre o Processo de  
Reparo Tecidual: Um Estudo do Colágeno por  
Microscopia Eletrônica de Varredura, Microscopia  
de Força Atômica e Espectroscopia por  
Infravermelho.**

**NIVALDO ANTONIO PARIZOTTO**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação da UNICAMP como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Engenharia Elétrica.

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida por Nivaldo Antonio Parizotto e aprovada pela Comissão Julgada em 05 / 06 / 98.  
[Assinatura]  
Orientador

Campinas (SP)

-1998-



9978606

**NIVALDO ANTONIO PARIZOTTO**

**AÇÃO DO LASER DE HÉLIO-NEÔNIO SOBRE O  
PROCESSO DE REPARO TECIDUAL: UM ESTUDO DO  
COLÁGENO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE  
VARREDURA, MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA E  
ESPECTROSCOPIA POR INFRAVERMELHO.**

**ORIENTADOR: PROF. DR VITOR BARANAUSKAS**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**Campinas (SP)**

**-1998-**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

P219a Parizotto, Nivaldo Antonio  
Ação do laser de hélio-neônio sobre o processo de reparo tecidual: um estudo do colágeno por microscopia eletrônica de varredura, microscopia de força atômica e espectroscopia por infravermelho / Nivaldo Antonio Parizotto.--Campinas, SP: [s.n.], 1998.

Orientador: Vitor Baranauskas.  
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação.

1. Lasers na medicina. 2. Regeneração (Biologia). 3. Fotoquímica do laser. 4. Colágeno. 5. Nanoestrutura. 6. Microscopia de tunelamento de elétrons. 7. Microscopia eletrônica de varredura. I. Baranauskas, Vitor. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação. III. Título.

## ÍNDICE

Dedicatória .....	iv
Agradecimentos .....	v
Lista de Ilustrações .....	viii
Comissão Julgadora .....	x
Resumo .....	xi
Abstract .....	xii
<b>Capítulo 1 - Introdução</b> .....	<b>1</b>
Laser .....	3
Helioterapia .....	5
Desenvolvimento das Aplicações Biomédicas dos Laseres .....	6
Terminologia .....	8
Conceitos Físicos Básicos sobre Laser .....	9
Interação Laser-Matéria .....	16
Colágeno .....	21
O Processo de Reparo Tecidual .....	26
A Inflamação .....	27
Re-epitelização e Contração .....	30
Remodelamento da Matriz Extracelular .....	32
Laser na Cicatrização (Uma Revisão) .....	35
OBJETIVO .....	44
<b>Capítulo 2 - Métodos de Análise</b> .....	<b>45</b>
Microscopia Eletrônica de Varredura .....	45
Microscopia de Força Atômica .....	46
Metodologia de Análise por MFA .....	49
Cuidados Especiais nas Análises por MFA .....	51
Modos de Operação do MFA .....	52
MFA para Análises Biológicas .....	54

Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier ...	57
<b>Capítulo 3 - Validação do Método de Análise de MFA para Materiais Biológicos</b> .....	61
Análise do Colágeno Tipo I por Microscopia de Força Atômica: Estrutura Molecular e Ordem Molecular .....	62
Morfologia Sub-micrométrica de Superfícies de Cartilagens: Variação de Profundidades em Articulações Sujeitas a Diferentes Tensões de Compressão .....	72
Observação de Leveduras ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) Usadas em Biotransformação pela Microscopia de Força Atômica .....	79
Caracterização de Filmes de Langmuir-Blodgett Originário de Polianilina .....	89
Análise Nanoestrutural da Córnea do Rato .....	92
Ação das Micro-ondas de Uso Doméstico sobre a Nanoestrutura da Unha.....	95
<b>Capítulo 4 - Material e Métodos</b> .....	99
Animais .....	99
Cirurgia .....	100
Tratamentos .....	100
Sacrifícios .....	101
Preparo para Microscopia Eletrônica de Varredura .....	101
Leituras no MEV .....	102
Preparo para Microscopia de Força Atômica .....	102
Leituras no MFA .....	103
Espectroscopia de Infravermelho (FT-IR) .....	106
<b>Capítulo 5 - Resultados</b> .....	107
Microscopia Eletrônica de Varredura .....	107

Microscopia de Força Atômica .....	116
Espectroscopia por Infravermelho (FT-IR) .....	127
Observações finais .....	135
<b>Capítulo 6 - Discussão .....</b>	<b>136</b>
Microscopia Eletrônica de Varredura .....	141
Microscopia de Força Atômica .....	144
Espectroscopia por Infravermelho (FT-IR) .....	154
Considerações Finais .....	157
<b>Capítulo 7 - Conclusões e Considerações Finais .....</b>	<b>159</b>
<b>Capítulo 8 - Referências Bibliográficas .....</b>	<b>162</b>

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu irmão e amigo  
**Oswaldo Parizotto Junior** (*In Memoriam*),  
pela dedicação às coisas da natureza, que o levou a ser  
pesquisador e professor universitário notável.

## AGRADECIMENTOS

### Agradeço

ao meu orientador, Prof. Dr. Vitor Baranauskas, que me acolheu no laboratório do DSIF para a realização desta tese, fruto de uma série de idéias e curiosidades, que, com suas observações e sugestões, proporcionou condições para o avanço dos meus ideais e realização deste projeto. Pela sua amizade e companheirismo na atividades do dia-a-dia no laboratório e fora dele.

ao Prof. Dr. Ioshiaki Doi, que esteve temporariamente como orientador, e que por convivência no laboratório e amizade, se fez presente de alguma forma neste trabalho.

ao Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal, do Departamento de Biologia Celular (IB), que teceu uma série de comentários sobre o processo de reparo tecidual, a molécula de colágeno e a importância biológica desta proteína, assim como cedeu seu laboratório para o preparo das amostras, sem o qual este trabalho não poderia ser realizado.

ao Prof. Dr. Alberto Cliquet Junior, por mostrar as possibilidades de trabalho na UNICAMP, aos Profs. Drs. Sérgio Santos Mühlen e Eduardo Tavares da Costa, assim como os demais professores do DEB pelo incentivo.

ao Prof. Dr. Hernandes Faustino Carvalho, do Departamento de Biologia Celular, por ter dado algumas dicas no preparo das amostras para Microscopia Eletrônica de Varredura.

a funcionária Rita Helena B. Jacon, da Faculdade de Engenharia Mecânica, por ter me auxiliado na observação das amostras no Microscópio Eletrônico de Varredura

a Profa. Dra. Maria Alice da Cruz Hoffling, do Departamento de Histologia (Instituto de Biologia), por ter cedido o ponto crítico para o preparo das amostras.

as técnicas do Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia, por ter auxiliado no preparo das amostras no Ponto Crítico de CO<sub>2</sub>.

ao técnico Carlos Lambert Sales, do Laboratório do Prof. Dr. Gilberto de Mattos Gualberto do Instituto de Física "Gleb Wataghin", por ter auxiliado no preparo das amostras de Microscopia Eletrônica de Varredura, fazendo o "sputtering" de ouro.

a técnica D. Luiza Pogheti Burghi, do Laboratório de Colágeno, pelo auxílio técnico e dicas no preparo das lâminas histológicas, assim como a boa amizade.

ao técnico Mario Bianchi, do Laboratório de Colágeno, pelo auxílio técnico no desenvolvimento do trabalho, inclusive no cuidado com os animais no Biotério do DBC.

a Profa. Dra. Shirlei Maria Recco Pimentel, chefe do Departamento de Biologia Celular, que permitiu a utilização daquelas instalações para realização deste trabalho.

a Valéria do Carmo Barbosa e Roberto Zucchetti do laboratório de físico-química do Instituto de Química da Unicamp pela realização da espectroscopia infravermelha.

ao meu irmão Osvaldo Parizotto Júnior (*in memoriam*), pelo auxílio na interpretação dos espectros infravermelhos e pelas discussões tão valiosas do dia-a-dia, assim como ter tido o privilégio da sua amizade.

aos colegas e amigos do DSIF ao longo desta jornada, César Ramos Rodrigues, Marcelo Fukui, Marcelo Jara, Norian Marranghello, Alfredo Carlos Peterlevitz, Margareth Kazuiyo Kobayashi Dias Franco, Ilka Marinho, Eliane França, Wilfredo Machaca Luque e Carla de Freitas Galan, pela constante cooperação e um clima ameno de trabalho, com pronta solicitude, além de ótimas amizades. Agradecimento especial aos amigos Juan Carlos Alvarado Alcócer e Dahge Chiadin Chang, pelo apoio e auxílio no tratamento das imagens de AFM.

ao meu amigo e companheiro de sala Francisco José Arnold, assim como todos os colegas que cursaram junto comigo as disciplinas do Departamento de Engenharia Biomédica, pela convivência e boa troca de experiências naquele período.

as secretárias do DSIF, D. Edna Servidone e Raquel Brito, pela presteza nas necessidades burocráticas e pelo privilégio da ótima amizade.

ao PICD-CAPES, pelo apoio financeiro durante o desenvolvimento do projeto.

ao Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, pela concessão do afastamento temporário, que possibilitou a execução deste projeto.

ao colega Prof. Otávio Sampaio Correa Mariani, do DeFISIO-UFSCar, por assumir a disciplina sob minha responsabilidade no início desta jornada.

aos alunos do Curso de Fisioterapia da UFSCar, que me incentivaram a trilhar caminhos cada vez mais superiores.

aos meus pais, Oswaldo e Iria Parizotto, pela compreensão e apoio fundamentais durante todos os momentos mais críticos da minha vida. Pelo prazer de ser seu filho.

aos meus filhos, Livia, Matheus e Flora, pela força e apoio constantes que alavancaram a minha vontade de seguir em frente.

a Eunice Marta Maziero, pelo incentivo, compreensão e apoio extremamente importantes durante as principais etapas desta jornada.

Lista de Ilustrações	Página
Fig. 1- Desenho esquemático da produção do laser .....	12
Fig. 2- Princípio de funcionamento do MFA .....	50
Fig. 3- Imagem por MFA de fibrilas de colágeno do tendão .....	65
Fig. 4- Imagem por MFA mostrando agregação das fibrilas de colágeno no tendão .....	65
Fig. 5- Gráficos relacionando cortes axiais das fibrilas de colágeno evidenciando as bandas D e período espectral médio .....	66
Fig. 6- Corte longitudinal das fibrilas/período espectral típico .....	67
Fig. 7- Banda D e angulação em relação ao azimute na molécula do colágeno .....	67
Fig. 8- Imagem da triplíce hélice do colágeno .....	69
Fig. 9- Histogramas de alturas das fibrilas de colágeno .....	71
Fig. 10- Imagens po MFA de cartilagens de cão (talus e glenóide) .....	75
Fig. 11- Imagem por MFA de conjunto de células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de diferentes cepas .....	81
Fig. 12- Secções mostrando as dimensões diferentes das células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	82
Fig. 13- Imagens por AFM de células individualizadas de diferentes cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	83
Fig. 14- Poros nas membranas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de tres origens diferentes .....	84
Fig. 15- Imagem por MFA submolecular da manana (da membrana de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) .....	86
Fig. 16- Medidas C-C da manana na membrana celulósica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	87
Fig. 17- Imagem por MFA do brotamento da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (apresentação em topografia) .....	88
Fig. 18- Filme de Langmuir-Blodgett de polianilina (MFA) .....	91
Fig. 19- Imagem da córnea do rato (mostrando a organização estrutural) .....	93
Fig. 20- Imagem d córnea do rato em processo de degradação protéica .....	94
Fig. 21- Imagem da unha humana sob ação de micro-ondas .....	97
Fig. 22- Desenho esquemático das possibilidades mais comuns de erros de medida em MFA .....	104
Fig. 23- Fotomicrografia MEV de fibrilas de colágeno (2.200 X) 14 dias após tenectomia .....	109
Fig. 24- Fotomicrografia MEV de fibrilas de colágeno (2.200 X) 21 dias após tenectomia .....	110
Fig. 25- Fotomicrografia MEV de fibrilas de colágeno (2.400 X) 28 dias após tenectomia .....	112

Fig. 26- Fotomicrografia MEV de fibrilas de colágeno (5.400 X) 14 dias após tenectomia .....	113
Fig. 27- Fotomicrografia MEV de fibrilas de colágeno (10.800 X) 14 dias após tenectomia com grupos controle, 0,5 e 50 J/cm <sup>2</sup> .....	114
Fig. 28- Fotomicrografia MEV de fibrilas de colágeno mostrando fibroblasto em exocitose de colágeno (2.200 X) 14 dias .....	115
Fig. 29- Gráfico de força do MFA para baixa resolução .....	117
Fig. 30- Gráfico de força do MFA para alta resolução .....	117
Fig. 31- Imagens de MFA (3.000 X 3.000) 7 dias da tenectomia.....	119
Fig. 32- Imagens de MFA (3.000 X 3.000) 14 dias da tenectomia.....	120
Fig. 33- Imagens de MFA (10.000 X 10.000) 21 dias da tenectomia ...	121
Fig. 34- Imagens de MFA (3.000 X 3.000) 28 dias da tenectomia .....	122
Fig. 35- Imagens de MFA (10.000 X 10.000) 28 dias da tenectomia ...	123
Fig. 36- Imagens de MFA (30.000 X 30.000) 28 dias da tenectomia ...	124
Fig. 37- Secção longitudinal de uma fibrila de colágeno 14 dias após tenectomia e tratada com laser 0,5 J/cm <sup>2</sup> .....	125
Fig. 38- Imagem por MFA do autoenrolamento das fibrilas de colágeno (controle e irradiado com laser 5 J/cm <sup>2</sup> ) 14 dias (1.000 X 1.000) .	126
Fig. 39- Imagem topográfica das fibrilas de colágeno (5 J/cm <sup>2</sup> ) .....	126
Fig. 40- Espectros de transmitância de FT-IR do colágeno .....	128
Fig. 41- Espectros por reflectância de FT-IR do colágeno (14 dias) .....	130
Fig. 42- Espectros por reflectância de FT-IR do colágeno (28 dias) .....	131
Fig. 43- Espectros por reflectância de FT-IR do colágeno (zoom na região das amidas/28 dias) controle e laser 0,5 J/cm <sup>2</sup> .....	134

## Tabelas

Tabela I - Rugosidade média em cartilagens articulares de cães .....	76
Tabela II - Picos das bandas de amida I, II e III em amostras de colágeno do tendão do rato obtidos por FT-IR (14º dia ) .....	132
Tabela III - Picos das bandas de amida I, II e III em amostras de colágeno do tendão do rato obtidos por FT-IR (28º dia ) .....	133

A Comissão Julgadora

Prof. Dr. Vitor Baranauskas  
(Orientador)

Prof. Dr. Ioshiaki Doi

Prof. Dr. Alberto Cliquet Júnior

Prof. Dr. Antonio José Bucalon

Prof. Dr. Roberto Vilarta

**Resumo:** Este trabalho apresenta uma série de resultados referentes a utilização da Microscopia de Força Atômica (MFA) em aplicações na observação de materiais biológicos, comprovando sua eficácia como importante método para investigação de variados fenômenos. A estrutura molecular do colágeno do tendão de rato foi utilizado como modelo de reparação tecidual. Utilizou-se laser de HeNe (6 mW) como recurso no intuito de promover ou facilitar a cicatrização e se analisou por meio da MFA, Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR), estes últimos com objetivos de dar um panorama de menor ampliação do tecido em reparação e avaliar os aspectos das possíveis modificações bioquímicas na estrutura das moléculas de colágeno, respectivamente. A MEV mostrou evidências de melhor organização na reparação do tendão nos animais tratados com o laser de HeNe, acelerando-a em relação aos animais controle, não tratados. Os animais tratados pelo laser com diferentes doses, mostrou sinais de aceleração do processo na dependência da dose. As doses que foram mais eficientes foram  $5 \text{ J/cm}^2$ ,  $50 \text{ J/cm}^2$  e  $0,5 \text{ J/cm}^2$  considerados em ordem decrescente. Tais resultados foram corroborados com a MFA, repetindo as características de autoenrolamento, mesmo quando observado em resoluções maiores. Não houve modificações dignas de nota quando comparados os resultados obtidos com FT-IR. Provavelmente houve alguma falha na preparação das amostra para este objetivo, uma vez que as amostras eram as mesmas preparadas para análises no MFA. Os fenômenos como melhor organização das moléculas de colágeno, aumento do diâmetro das fibras, formação de feixes mais espessos e melhor direcionalidade azimutal foram algumas das evidências que apontam para uma atuação positiva do laser sobre o colágeno. Aparentemente o laser atua como um sinalizador na matriz extracelular para alterações da estrutura fibrilar, que ocorre a partir da interação do campo eletromagnético coerente com a molécula de colágeno. O aparecimento precoce da morfologia de ondulações e enrugamentos é mais uma evidência de modificação morfológica das fibras do tendão que tem sabidamente uma repercussão importante sobre o desempenho funcional desta estrutura corporal. (PARIZOTTO, NIVALDO A. - **Ação do Laser de Hélio-Neônio sobre o Processo de Reparo Tecidual: Um Estudo do Colágeno por Microscopia Eletrônica de Varredura, Microscopia de Força Atômica e Espectroscopia por Infravermelho.** - Tese de Doutorado)

**Palavras chave:** Microscopia de Força Atômica, Colágeno, Microscopia Eletrônica de Varredura, Laser de Baixa Intensidade, Reparo Tecidual, Nanoestruturas.

**Abstract:** Some works were seen results by use of Atomic Force Microscopy (AFM) in biological applications. This method of investigation has been approved in some kinds of biological analysis. The collagen molecular structure of rat tendon were used as a model of tissue repair. The HeNe laser (CW power = 6 mW) were applied to promote or stimulate the wound repair. We analysed this phenomenon by Atomic Force Microscopy, Scanning Electron Microscopy (SEM) and Infrared Spectroscopy (FT-IR). The SEM has low amplification in the image and can show the repair tissue and the FT-IR revealed the biochemical changes in the collagen molecule structure. The SEM image show best tendon repair in HeNe laser treated animals than controls, no treated, specially in the rate of organization. All treated groups exhibited faster tendon repair than for the control groups, but the dose of laser is very important in this way. The best doses were in decreasing order 5 J/cm<sup>2</sup>, 50 J/cm<sup>2</sup> and 0,5 J/cm<sup>2</sup>. These results were confirmed with AFM, which presents coiling format. In the results, FT-IR exhibits no differences in the groups of animals. The phenomena of best collagen molecule order, raise in fiber diameter, collagen bundle to grow thick and raise the azimuthal axis are several of evidence to support the idea of positive laser action in collagen molecule. Probably the laser radiation play as a signal in extracellular matrix for the fibrillar structural changes, that occur after the coherent electromagnetic field interaction with collagen molecules. The early appearing of crimped morphology represents a good evidence of structural changes in the tendon fibers that have a significant influence in the functional performance of this body structure. ( PARIZOTTO, NIVALDO A. - **The Helion Neon Laser Action on the Tissue Repair Process: A Collagen Study by Scanning Electron Microscopy, Atomic Force Microscopy and Infrared Spectroscopy**. Doctoral Thesis)

**Key words:** Atomic Force Microscopy, Collagen, Scanning Electron Microscopy, Low Level Laser Therapy, Tissue Repair, Nanostructures.

## INTRODUÇÃO

Uma enorme variedade de terapias tem surgido ao longo do tempo na medida que ocorrem avanços nas áreas de aplicações tecnológicas. Por exemplo temos a área de aplicações da eletricidade com objetivos terapêuticos e mais recentemente, as aplicações de laser. Estas terapias tem também sofrido grandes modificações em função da própria evolução tecnológica.

LASER é um apócrifo da versão em inglês de “amplificação de luz por emissão estimulada de radiação” e designa atualmente uma enorme série de dispositivos com emissão de radiação eletromagnética em

diversas faixas do espectro eletromagnético, indo dos raios X às microondas. Algumas características especiais tornam essa radiação laser diferente da radiação eletromagnética natural, como por exemplo a alta monocromaticidade, a coerência espacial e a polarização.

Após mais de 40 anos da concepção teórica do efeito laser por **Einstein** em 1917, somente em 1960 o primeiro laser foi construído por **Maiman**. Pouco tempo depois foi introduzido nas ciências da saúde. Inicialmente como instrumento cirúrgico para execução de cortes e evaporação de tecidos e posteriormente, após a observação de alguns efeitos não térmicos que estimulavam a cicatrização de tecidos, se iniciaram os estudos dos efeitos fotobiológicos ou não térmicos dos lasers.

Algumas investigações foram realizadas com objetivo de estudar os mecanismos que poderiam explicar como os lasers com baixa potência de emissão causam mudanças nas células, suficientes para alterar a atividade metabólica e provocar modificações nas respostas do organismo como um todo.

## LASER

Os princípios sobre os quais os lasers são baseados foram desenvolvidos no final do século passado por **Planck** e **Einstein**. Muitas especulações foram feitas sobre os conceitos de **Maxwell** por considerar as radiações eletromagnéticas como ondas. Baseado no conceito de **Planck** da energia quântica, **Einsten** publicou o artigo “Zur Quantum Theori der Strahlung”, em 1917, que destacou o princípio da emissão estimulada de fótons. Entretanto, somente após quarenta anos foi

construído o primeiro instrumento de amônia emitindo na faixa de microondas, chamado Maser (**Gordon, Zeiger e Townes, 1955**).

O primeiro laser foi construído em 1960 por **Maiman**, produzido com cristal de rubi, com um feixe intenso e visível, com uma pura cor vermelha ( $\lambda=694$  nm), por poucos milissegundos. As aplicações começaram a se desenvolver, especialmente após a obtenção de outros comprimentos de onda. Em 1961 foram desenvolvidos os lasers de Hélio-Neônio (HeNe) e o de Neodímio-Yttrium Aluminium Garnet (Nd:YAG), em 1962 apareceu o laser de Argônio (Ar) e posteriormente foram desenvolvidos o laser de Dióxido de Carbono (1964) e as fontes de lasers semicondutores, como o Arseneto de Gálio (GaAs). O laser de HeNe tornou-se o laser mais comumente empregado para realização das aplicações biomédicas com objetivos não térmicos, ou seja, laser de baixa intensidade.

Os primeiros trabalhos empregando lasers de baixa intensidade foram executados por **Mester (1968)**, que utilizou o termo “bioestimulação” para aqueles efeitos não térmicos, descritos anteriormente por **Tomberg (1964)**. Ele fez alguns experimentos *in vitro* observando o comportamento celular após a irradiação com potências reduzidas. Posteriormente, em experimentos conduzidos em animais *in vivo*, **Mester (1969)**, conseguiu a observação de aceleração da cicatrização de úlceras tórpidas ou aquelas com dificuldade de cicatrização, as quais se achavam resistentes aos tratamentos convencionais.

Até bem pouco tempo, a literatura sobre tratamentos com laser de baixa intensidade era escassa e muitos dos artigos que foram publicados não continham dados suficientes, especialmente sobre os parâmetros

físicos como densidade de potência, densidade de energia e outros, o que impossibilitava a reprodução das pesquisas destes investigadores. Por esse motivo, muitas informações ficaram dispersas, criando-se um ceticismo a respeito dos efeitos terapêuticos do laser.

**Basford (1986, 1989)** identificou vários trabalhos realizados com objetivos de investigar os efeitos atérmicos do laser, cujas especificações dos parâmetros de tratamento estavam inadequadas ou havia comprometimento do planejamento experimental, geralmente com a ausência de grupos de controle. Outra questão que se observou, notadamente nos trabalhos clínicos - é que os autores utilizaram estudos cego-simples - isto é, foram realizadas simulações da irradiação e os investigadores podiam distinguir entre os dados do grupo placebo e dos grupos tratados. O correto seria fazer estudos duplo-cego, onde o investigador que analisa os dados não sabe se são dos grupos tratados ou do placebo. Um editorial criticando esse tipo de abordagem foi publicado na revista *Pain* (**Devor, 1990**), no qual foi colocado em dúvida a eficiência em produzir analgesia com esse tipo de equipamento (lasers frios). Além disso, **Gam, Thorsen e Lonnberg (1993)** publicaram na mesma revista artigo contendo uma meta-análise sobre o efeito analgésico da terapia com laser de baixa intensidade sobre a dor músculo-esquelética, por meio de interpretação das escalas análogo-visuais de dor, sobre cujos resultados são expedidas conclusões desfavoráveis ao efeito de redução da dor. Entretanto, um aumento no número de artigos com melhor planejamento estrutural dos experimentos tem sido encontrados após estas discussões. Nos trabalhos sobre ação dos lasers em células, em modelos animais e até nas investigações clínicas tem sido observados os cuidados metodológicos para que se possa dar sustentação aos resultados, e

atualmente já é possível justificar as aplicações terapêuticas para algumas situações clínicas definidas.

## **Helioterapia**

Parece importante fazer um pequeno exercício de revisão histórica para justificar com maior propriedade a utilização dos lasers para a terapia. A idéia vem dos tempos mais antigos, quando os Fenícios e os Hebreus adoravam o “deus sol” e pediam a cura de diversas enfermidades. Se conseguiu verificar, já nesta época, a relação da luz do sol com os processos de cicatrização (**Licht, 1967**). Após o início do cristianismo nos tempos do grande império romano, com a modificação dos costumes para uma crença monoteísta, o emprego da Helioterapia tomou outros rumos. Os grandes médicos gregos e romanos como **Celsus** e **Galeno** conseguiram demonstrar que os banhos de sol tinham uma grande importância para a prevenção de doenças. **Heródoto** percebeu a importância do sol no crescimento e desenvolvimento dos ossos já no século VI D.C.

Após este período inicial, muitas idéias sobre as possibilidades terapêuticas da luz, nos seus diversos comprimentos de onda, foram propostas e testadas, algumas das quais são utilizadas até hoje como tratamento de rotina nos hospitais e clínicas do mundo todo. Dentre as principais, podemos destacar as seguintes: (i ) o efeito bactericida do Ultra-violeta, (ii) o tratamento do “lupus vulgaris” por actinoterapia e (iii) o estabelecimento de diferentes doses para Ultra-violeta. Mais recentemente, a utilização da terapia PUVA, ou seja, a ingestão oral de psoralen e a irradiação com ultra-violeta tipo A, tem se mostrado eficiente

em produzir reações citotóxicas nas lesões psoriásicas, e portanto, com boa eficácia no tratamento (**Baxter, 1994**). Não podemos nos esquecer dos efeitos nocivos da luz solar em algumas condições, especialmente como principal agente causal no câncer de pele, principalmente quando se abusa na exposição, já que parte da proteção exercida pela camada de ozônio na atmosfera para a penetração da luz, está reduzindo.

### **Desenvolvimento das Aplicações Biomédicas dos Laseres.**

Os oftalmologistas foram os primeiros da área de saúde a se utilizarem dos laseres. As primeiras aplicações foram em cirurgias de descolamento de retina, por mecanismo de fotocoagulação. Outra área que passou a utilizar os laseres para tratamento foi a oncologia. Pulsos de laser foram utilizados em tumores malignos para destruí-los. Resultados variados foram obtidos com este tipo de terapia nos tumores. Operando em modo contínuo, o laser de CO<sub>2</sub> provou ser um dos mais adequados para cirurgias ablativas nas áreas de neurocirurgia, dermatologia e cirurgia plástica.

Atualmente, várias enfermidades tem sido tratadas rotineiramente com bons resultados nas áreas de oftalmologia (tumores, retinopatia diabética, glaucoma e descolamento de retina), dermatologia e cirurgia plástica (angioma cavernoso, sarcoma de Kaposi, tumores vasculares malignos, condiloma acuminata, remoção de tatuagem, angiomas de face). Os laseres mais empregados atualmente são os de CO<sub>2</sub>, Nd-YAG e o de Argônio. A ativação de um corante por intermédio de um outro laser tem

sido empregada como método para ajustar o comprimento de onda do laser para as condições do tecido a ser irradiado. Na área de ginecologia, o laser de CO<sub>2</sub> tem sido usado para tratar câncer pré-invasivo de vulva, da vagina e cérvix.

Muitas aplicações diagnósticas com laser tem surgido, como fluxímetro doppler a laser, a espectroscopia a laser e a holografia. Uma dessas aplicações se refere a possibilidade do estudo de potenciais evocados somatossensoriais produzidos por estímulos com laser de CO<sub>2</sub>, operando em regime pulsado, com potência média de 100 mW e larguras de pulso entre 1 e 10 ms (frequência entre 1 e 10 Hz). Os pulsos de laser foram sincronizados com o disparo de um osciloscópio, onde foram registrados os sinais, após sua amplificação e filtragem. A vantagem desta técnica se refere ao fato de ser não invasiva, simples e não causar qualquer dor ou desconforto ao paciente (**Bastos et al., 1994 e Pagan et al., 1994**).

Uma forma bastante importante de manipulação das condições biológicas são as micromanipulações de cromossomos, possíveis graças ao uso de microfios de laser, com cujos movimentos podem ser cortados pequenos *pedaços* de cromossomos sob microscopia e transladado para outras células (**Kasuya e Tsukakoshi, 1988**).

Um dos tratamentos mais interessantes que surgiu com o advento do laser foi a terapia foto-dinâmica ou terapia fotorreativa (do inglês, **PDT**). Esta terapia consiste em injetar derivados da hematoporfirina D e estimular sua introdução nas células, substância esta que penetra com intensidade muito maior nas células neoplásicas (cancerígenas). E com a ação do laser de baixa intensidade, muitas vezes com potências menores que 1 W, se consegue estimular reações fototóxicas intra-celulares e proporcionar a liberação de grande quantidade de O<sub>2</sub> na sua forma simples, o que destrói

as células. O interessante é que destrói apenas as células neoplásicas cujos citoplasmas estavam cheios de hematoporfirina D (**Marcus e Dugan, 1992; Stern et al., 1993**).

## TERMINOLOGIA

A introdução do laser na prática clínica e cirúrgica teve um paralelismo com o desenvolvimento da tecnologia do laser. Porém o maior número de aplicações foram com os lasers de alta energia, especialmente para aplicações cirúrgicas. Os efeitos biológicos dos lasers de baixa potência não foram estudados nos momentos iniciais, porque eles foram utilizados apenas como “miras” para os lasers cirúrgicos que trabalham na faixa do infravermelho, portanto invisíveis. Desta forma, os efeitos ficaram “escondidos” nas observações após as cirurgias. Este tipo de laser não teve um tratamento específico e isolado dos dados, tendo sido relegado a um segundo plano. Posteriormente, alguns autores começaram a perceber a possibilidade de observar efeitos fotobiológicos provocados por esses lasers de baixa potência. Em seguida, houveram tentativas de utilização do feixe de laser de HeNe para substituir as agulhas de acupuntura, com sucesso, e atualmente, com vantagens sobre as tradicionais agulhas devido a possibilidade de transmissão do vírus HIV e da hepatite B (**Kroetlinger, 1980**).

É muito comum a utilização de diversos termos para designar os lasers de baixa potência. Os mais utilizados são “soft-laser”, laser frio, de baixa energia, “mid-laser”, laser biológico, laser terapêutico, laser não-cirúrgico. Muitos destes termos são inadequados por se referirem à saída de potência do equipamento. O que deve definir a nomenclatura é o

mecanismo de interação com os tecidos. A interação pode ser foto-térmica ou foto-química. No caso do laser utilizado neste trabalho, as reações esperadas são do tipo foto-químicas.

O termo que atualmente mais tem sido utilizado foi proposto por **Ohshiro e Calderhead (1988)** - “low (reactive) level laser therapy” (LLLT), levando em consideração a reação entre o laser e o tecido biológico irradiado. Assim, também é correto se usar o termo “laserterapia de baixa intensidade” (LTBI).

Para um dado comprimento de onda, a densidade de energia é o fator mais importante na determinação da reação tecidual. Portanto, denominação como “terapia por laser de baixa energia” pode não ser o termo mais adequado, uma vez que para uma energia incidente de 4 J, pode-se considerar baixa energia, mas se for focalizada numa área como  $0,02 \text{ cm}^2$  com lentes, poderá resultar uma densidade de energia de  $200 \text{ J/cm}^2$ , que pode ser considerada fora da faixa terapêutica.

É freqüente a utilização do termo bioestimulação, derivado do efeito de aceleração da cicatrização de feridas. Como observado mais recentemente, é importante ter cautela para utilização deste termo, uma vez que alguns processos sofrem inibição por ação do laser. Portanto o termo foto-biomodulação nos parece mais adequado por definir com maior clareza os efeitos nos tecidos.

## CONCEITOS FÍSICOS BÁSICOS SOBRE LASER

Ao nos referirmos ao termo “radiação eletromagnética”, uma série de conceitos devem ser colocados em evidência. O espectro eletromagnético contém comprimentos de onda cada vez menores à

medida que aumentamos a frequência. A relação entre a frequência e o comprimento de onda pode ser sumarizada no espaço livre pela equação

$$\lambda = c/f \quad (1)$$

onde  $\lambda$  é o comprimento de onda (em metros),  $c$  é a velocidade da luz (em metros por segundo) e  $f$  é a frequência (em Hertz).

A porção do espectro eletromagnético na qual opera a grande maioria dos lasers é bastante pequena e está na faixa do Raios X, ultravioleta, visível, infravermelho e microondas. A luz tem duas teorias aceitas, a ondulatória (**Maxwell**) e a quântica (**Planck**). A combinação das flutuações dos campos elétrico e magnético ocorrem de forma perpendicular à propagação da radiação. **Planck e Einstein** propuseram a idéia de que a onda transporta “quanta” de energia, ou seja, pacotes chamados fótons. Os fótons de um determinado comprimento de onda particular da luz tem uma energia quantal discreta e invariável, que pode ser calculada pela frequência inerente ( $f$ ) e a constante de **Planck** ( $h$ ). A fórmula para isto é

$$E = hf \quad (2)$$

onde  $E$  é a energia do fóton (em Joule).

Dado que o comprimento de onda e a frequência são relacionados no espaço livre, como descrito na equação (1), uma simples substituição resulta no seguinte:

$$E = hc/\lambda \quad (3)$$

onde  $E$  = energia do fóton (J)

$h$  = constante de **Planck**

$c$  = velocidade da luz (m/s)

$\lambda$  = comprimento de onda (m).

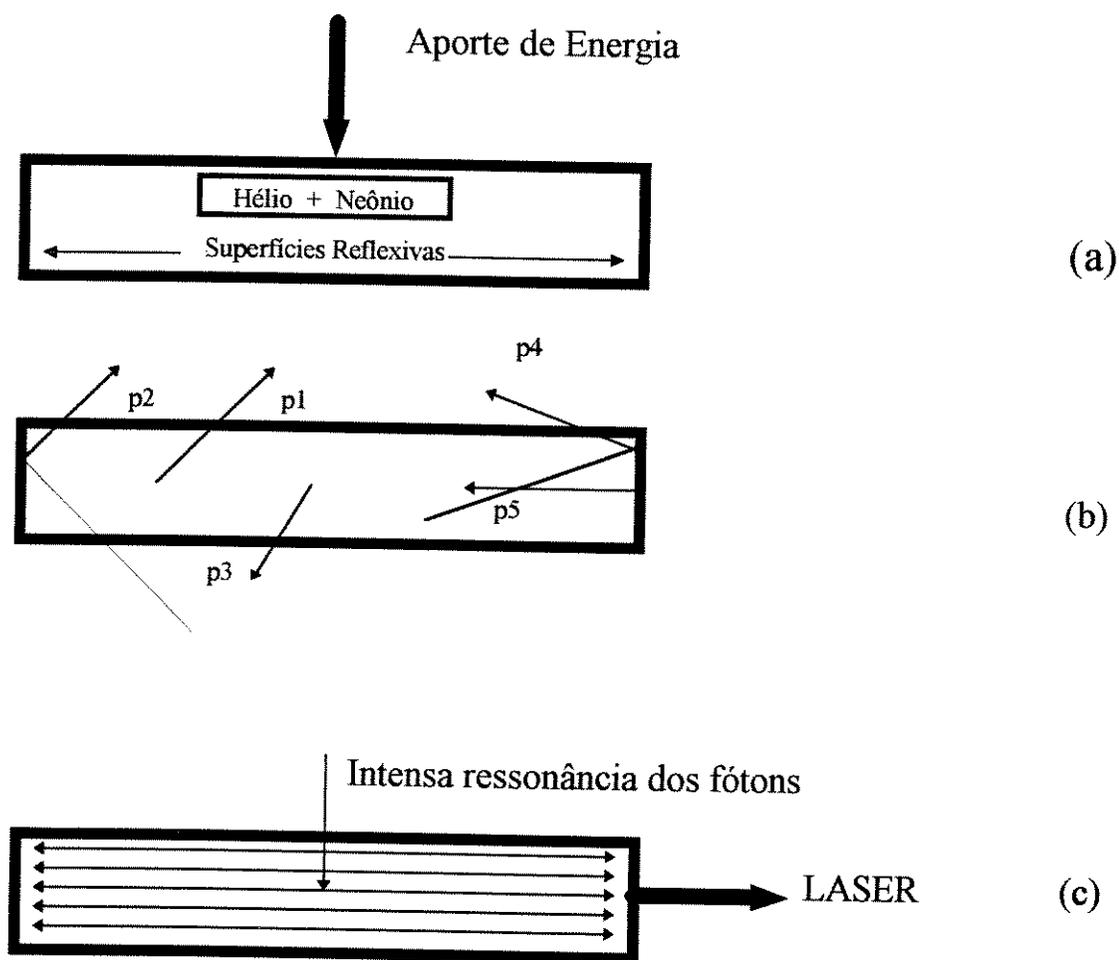
Analisando estas equações podemos observar que associado aos menores comprimentos de onda da luz estão fótons carregando maiores quantidades de energia. É importante notar que os lasers empregados em fotobiomodulação carregam relativamente pouca quantidade de energia, em geral na faixa de 1-3 eV/fóton.

Um sistema de produção de laser deve conter um meio que permita ser ativado, aumentando sua energia a níveis elevados por excitação externa (uma fonte de tensão). No caso do laser de HeNe, a mistura gasosa é ativada por elevação na tensão nos eletrodos e por estar numa cavidade ressonante óptica, com espelhos ajustados para refletirem a maior parte dos fótons, eles são amplificados e saem por uma janela espectral como um feixe bastante fino e muito direcional, com as ondas em fase e coerentes no tempo e espaço. Inicialmente os átomos de neônio são excitados (é o meio ativo da mistura)[Figura 1a]. O hélio funciona como um gás tampão, assistindo a excitação dos átomos de neônio e resfriando o processo. A emissão espontânea de radiação dos átomos de neônio aparece por um estado de instabilidade inerente.

Entretanto, o ritmo de suprimento de energia para os átomos de neônio dentro do meio é maior do que aquilo que é dissipado pelo processo de emissão espontânea. Após um curto período, a maioria dos átomos de neônio estará em elevado estado energético. Esta condição é conhecida como *inversão de população*, onde a maioria dos átomos de neônio está voltando ao seu estado de repouso e poucos estão com altos níveis de energia.

A maioria dos fótons produzidos pelos átomos de neônio durante os estágios iniciais (predominantemente) da emissão espontânea como os

fótons mostrados em p1 e p3 [Figura 1b] são perdidos. Entretanto, alguns fótons que batem nas superfícies reflexivas (espelhos) refletirão de acordo com os princípios físicos, no qual o ângulo de reflexão é igual ao ângulo de incidência (como os fótons p2, p4 e p5). Porém, apenas os fótons como p5 que conseguem se alinhar aos espelhos conseguem sair na forma amplificada, ou seja, como laser [Figura 1c].



**Figura 1** - Desenho mostrando a seqüência de eventos para produção de laser de Hélio-Neônio. **a.** Ativação inicial do meio por fonte de energia externa. **b.** Emissão espontânea de fótons. **c.** Emissão estimulada com intensa ressonância.

A luz que sai do tubo onde havia a mistura de hélio-neônio tem cor vermelha intensa e alta direcionalidade, e ainda conta com algumas características próprias dos lasers como coerência temporal e espacial, monocromaticidade, colimação e polarização [Figura 1c].

A seguir, uma breve explicação sobre as características que diferenciam a luz comum, ordinária, da luz que se consegue com uma câmara ressonante óptica, ou seja, o laser e sua importância para as aplicações biológicas.

### **Monocromaticidade**

A monocromaticidade é a característica física que confere a cor específica para cada tipo de laser, ou melhor, para cada material excitado, para que o mesmo entre em estado laser e emita um comprimento de onda definido. No caso do HeNe este comprimento de onda é 632,8 nm, e se encontra na cor vermelha. Outra fonte muito utilizada para fazer tratamentos fotoinduzidos com baixa energia é o laser de Arseneto de Gálio (GaAs) com comprimento de onda que varia dependendo do dopante empregado entre 770 a 904 nm.

### **Colimação**

A característica de colimação se dá de forma diferente para cada tipo de laser empregado e é bastante intensa no caso do laser de HeNe e pouco intensa no laser de GaAs, no qual pode variar de 3 a 30° sem o uso de acessórios ópticos. No laser de HeNe esse valor raramente ultrapassa de 1 a 2°, caso não esteja se utilizando de fibra óptica ou sistema de lentes divergentes ou convergentes.

## Coerência

A coerência da radiação se refere à sincronia inerente das ondas no tempo e espaço. Uma lâmpada comum não exhibe o fenômeno de coerência, uma vez que ao produzir emissão espontânea de luz, esses raios deixam a fonte de maneira desordenada, com direções e sentidos diversos, caminhando cada raio para um local diferente. A coerência proporciona à radiação um único caminho para o qual todas as ondas caminham de forma ordenada e em fase, quando analisada do ponto de vista ondulatório, ou seja, à medida que estamos na região da crista de uma onda qualquer, estaremos no mesmo ponto de todas as ondas vizinhas. Isto implica que os fótons estão em fase e que as ondas se encontram de forma unidirecional, sem abertura do feixe. O significado biológico da coerência não é completamente esclarecido. Trabalhos como de **Karu (1987)** e **Young et al. (1989)** sugerem não haver efeitos especiais relativos a coerência da radiação quando usados em culturas celulares, bactérias e macrófagos, células tipo fibroblasto, respectivamente. Por outro lado, **Paschoal (1991)** tenta demonstrar a importância da coerência da luz no processo de cicatrização. Com um sistema experimental desenvolvido anteriormente no mesmo laboratório (**Cotta, 1987**), o autor faz irradiação de pele de ratos anteriormente lesadas com Nitrogênio líquido, e avalia, em diferentes tempos, por microscopia óptica, a qualidade da cicatrização nos animais tratados com laser diretamente ou com redução da coerência. Pelos resultados apresentados, houve influência do fator coerência da radiação na qualidade da cicatrização produzida, tendo obtido os melhores resultados os animais tratados com laser com elevado grau de coerência.

## Polarização

O termo polarização freqüentemente é associado a coerência e atualmente não se sabe o seu grau de significado biológico. A luz polarizada tem seu campo elétrico orientado no plano numa direção preferencial. Existem recursos que fazem ocorrer modificações nos planos de polarização da luz e provocam formas complexas de polarização como circulares ou elípticas. Outras características físicas parecem ser importantes quando se utiliza laser para atividades terapêuticas. Uma das mais importantes é a potência da fonte de luz e sua respectiva densidade de potência. A potência em termos radiométricos, significa a saída de luz do tubo medido em Watts (W). Os lasers mais usados estão na faixa de potência entre 1 e até 100 mW. A *densidade de potência* é também chamada de *irradiância*. Significa a potência de saída distribuída numa certa área e geralmente é dado em  $W/m^2$  ou mesmo  $mW/cm^2$ , mais usualmente. Os lasers podem ser emitidos de forma contínua ou pulsada. O HeNe é normalmente emitido de forma contínua e geralmente o GaAs é emitido de forma pulsada. O modo transversal de emissão (TEM) se refere à característica do feixe quando se faz uma secção transversal e se observa a projeção que aparece num anteparo. O mais comumente encontrado é o  $TEM_{00}$ . O feixe tem normalmente um perfil gaussiano com uma distribuição de valores de potências entre um máximo (geralmente no centro geométrico do feixe) e valores decrescentes à medida que nos afastamos do centro.

## INTERAÇÃO LASER-MATÉRIA

Quando da publicação dos primeiros trabalhos sobre a ação dos lasers de potências reduzidas em materiais biológicos, muitas hipóteses foram sugeridas para explicar os fenômenos observados. Até hoje se encontram explicações nos livros-texto sobre a teoria do Bioplasma. A idéia contida reza que os organismos vivos teriam um “plasma” distribuído pelo corpo, que contaria com um comportamento coletivo. Ou seja, aquela coleção de partículas positivas e negativas sob certas condições de concentração e de interação de energia, reagiria de maneira global, independente das condições do local a ser estimulado. Muitos autores tentam utilizar este mesmo leque de explicações para uma série de eventos como a fotografia Kirlian, radiações mitogênicas, acupuntura e até para campos eletromagnéticos nos organismos biológicos (Zon, 1980). Entretanto tais concepções podem ser descartadas, dado que do ponto de vista experimental, a maior parte das idéias não são aceitáveis, podem ser rebatidas com conceitos teóricos mais atuais e em acordo com a teoria física atualmente aceita, inclusive na área de física de plasmas (Quickenden e Tilbury, 1986).

Atualmente, tem sido amplamente estudado os mecanismos de interação do laser com os tecidos considerando-o como uma fonte de luz e analisando o seu comportamento óptico com a matéria orgânica, principalmente a interação com substâncias fotossensíveis (chamados fotorreceptores primários), capazes de modificarem suas estruturas, reagindo sob ação da luz, ou mesmo catalisando certos tipos de reação (fotorreceptores secundários). Algumas das substâncias fotoativas desenvolvem espécies de oxigênio muito reativas (superóxidos, hidroxila e oxigênio simples) que estão envolvidas no processo de

fotoenvelhecimento, cujo mecanismo de ação, principalmente em interação com a radiação ultravioleta A e B, já é conhecido, e necessita de antioxidantes para o seu controle, assim como proteção a estes comprimentos de onda na pele (Carbonare e Pathak, 1992).

Numa revisão importante, Cheong, Prahl e Welch (1990) fazem uma compilação compreensiva da literatura publicada sobre as propriedades ópticas dos tecidos biológicos (absorção, atenuação total, atenuação efetiva e espalhamento["scattering"], anisotropia). Alguns modelos são propostos como mais adequados para tratar o fenômeno de interação da luz com os diversos tecidos biológicos, em função das suas diferentes características de inhomogeneidades. O modelo de Kubelka-Munch para absorção é um método muito usual quando se assume haver um espalhamento isotrópico, limites estreitos e irradiância difusa do laser no tecido. O grande problema é que este modelo falhou na previsão em algumas medidas experimentais macroscópicas (dimensão de irradiação infinita, sinal de reflexão difusa e dificuldade de obter irradiância uniformemente difusa). Medidas desta natureza são extremamente importantes para a correta determinação da dosimetria.

Na mesma revisão, os autores fornecem uma longa tabela contendo: tipo de tecido testado, comprimento de onda, parâmetros ópticos medidos, tipo de preparação, geometria da amostra e quais os modelos teóricos empregados para explicação.

Ao se utilizar laser, deve-se levar em consideração que a irradiância do feixe tem uma distribuição gaussiana (tridimensional) no modo transversal  $TEM_{00}$  e o espalhamento da luz pode determinar a absorção pelos diferentes cromóforos, nos tecidos tipicamente pigmentados. Neste sentido, o trabalho de Grossweiner et al. (1990) aplica o modelo de

Monte Carlo e consegue uma boa concordância com os resultados experimentais, para 633 e 1064 nm.

Outro modelo amplamente empregado para discutir a penetração na pele é chamado de difusão dos fótons. **Schmitt et al. (1990)** descrevem um modelo em que a luz vai sendo transportada pelas várias camadas de tecido de espessuras conhecidas e vai sofrendo desvios do feixe principal, colimado, o que vai determinar as absorções nos diferentes pontos dos tecidos. Os resultados experimentais ficaram bastante próximos das previsões teóricas, tanto para camada simples, como para multicamadas de tecidos. Os experimentos foram realizados por medidas de densidade óptica por fotopletismografia em peles intactas.

Análise comparativa de diferentes modelos foi realizada por **Flock et al. (1989a, 1989b)**, cujas observações mostraram que os cálculos de distribuição dos fluxos de luz nas faixas do vermelho e infravermelho próximo em tecidos de mamíferos, assim como a profundidade de penetração efetiva e a reflectância difusa dos dois modelos de transferência de radiação estudados (teoria da difusão e simulação de Monte Carlo) foram comparadas para um meio semi-infinito. Além das medidas teóricas e simulações realizadas, medidas comparativas em “fantomas” foram feitas num arranjo experimental, para comprimento de onda de 633 nm, onde o “fantoma” era constituído de uma mistura aquosa de Intralipid, uma emulsão de fosfolípidos e diferentes misturas de tinta preta da Índia. Houve uma boa concordância dos dados experimentais com a previsão de resultados de profundidade do fluxo em função do diâmetro do feixe de luz incidente, da absorção óptica e do espalhamento.

Outros trabalhos foram realizados fazendo uso destes modelos, com experimentos voltados para o estudo específico do laser de HeNe, devido ao seu emprego nas terapias fotodinâmicas. O trabalho de **Bolin et al.**

(1987) escolheu o músculo estriado como tecido para estudo e mostrou que a distribuição tridimensional da luz ao atravessar o tecido forma um modelo geométrico esférico e concêntrico no plano, e isto vai caminhando para o interior da amostra, está na dependência da não homogeneidade do tecido e penetra na faixa de 1,8-2,3 mm.

A acuidade das medidas para os modelos propostos está intimamente relacionada aos níveis de anisotropia que apresentam os tecidos e as aproximações que se faz para cada tipo de situação e característica de tecido, fornece o perfil das transmissões de laser e possíveis reflexões e espalhamentos (Yoon, Prahl e Welch, 1989). É muito importante o conhecimento do albedo (fração de difusão da luz) dos diferentes tecidos para planejar de forma adequada as doses de laser a serem introduzidas e o que elas causariam nos tecidos alvo. Para determinação do coeficiente de extinção, de absorção e a distribuição angular do espalhamento, Marchesini et al. (1989) utilizaram tecidos humanos *in vitro* para comprimento de onda de 633 nm, assim como Moes et al. (1989) o fizeram para “fantomas” (espécies de materiais para simulação dos tecidos).

Uma série de considerações foram feitas por Van Gemert et al. (1989) e Wilson e Jacques (1990) sobre como tratar os tecidos humanos, especialmente a pele com as suas diversas camadas, para fins de planejamento dosimétrico de laser nas suas aplicações biomédicas, tanto com finalidades diagnósticas, terapêuticas ou cirúrgicas. Estes autores ressaltam haver uma janela óptica na faixa que vai de 600 nm até 1300 nm, sendo que a absorção nos tecidos acontece por meio dos cromóforos naturais como o pigmento heme da hemoglobina, mioglobina e bilirrubina, o pigmento citocromo da cadeia respiratória na mitocôndria, o pigmento

melanina e outras substâncias que fazem fotorreações, presentes nos tecidos. Estes seriam os fotorreceptores primários.

Por outro lado, os fotorreceptores (ou fotoceptores) ditos secundários, absorveriam a energia entregue aos tecidos por intermédio dos campos eletromagnéticos, acontecendo uma espécie de ressonância desses campos com as biomoléculas, alterando cargas específicas nas membranas e nas superfícies das proteínas. Tal fenômeno provocaria modificações na conformação molecular ou configuração espacial dessas substâncias, o que desencadearia diferentes respostas. O laser funcionaria como uma fonte de sinal eletromagnético, que por ser uma excitação coerente, provocaria uma mensagem mais clara, sem ruídos (**Charman, 1990**).

A hipótese com a qual estamos trabalhando é que a molécula de colágeno seria uma importante fonte de transformação, uma vez que as propriedades de piezoelectricidade e piroelectricidade já foram demonstradas (**Athenstaedt, 1974; Fukada, 1974; Liboff e Furst, 1974**). Haveria, portanto, grande probabilidade desta importante biomolécula ser uma espécie de fotorreceptor secundário e produzir reações fotoinduzidas.

## COLÁGENO

O colágeno é uma proteína que responde a cerca de 30% do peso corporal do homem e a mais encontrada no mundo animal. Ela participa da matriz extracelular dos animais multicelulares e é a mais abundante nos tecidos conjuntivos fibrosos.

Esta proteína provê parte da estrutura dos (a) tendões e ligamentos, (b) pele e fáscias, c) membranas de filtração (glomérulos), (d) matriz para reforço do esqueleto (associado aos minerais como ossos e dentina), (e) regiões sob pressão e lubrificadas por proteoglicanas (cartilagens e disco intervertebral) e (f) outros tecidos especiais devem ser fortes ou ter propriedades incomuns como córnea (transmissão de luz) e válvulas cardíacas (resistência à fadiga).

A principal propriedade da molécula de colágeno a estrutura em tríplice hélice organizada em espiral enroladas por três sub-unidades em cadeias polipeptídicas, chamadas  $\alpha$ -hélices. Para as cadeias  $\alpha$ , os monômeros se ligam seqüencialmente formando resíduos laterais. O monômero é secretado no espaço extracelular, onde eles se associam por meio de ligações cruzadas laterais para formar as fibras com estruturas mais complexas como super-hélices. As moléculas de colágeno mais comuns contém 1050 resíduos de aminoácidos e tem um comprimento de cerca de 300 nanômetros (Eyre, 1980). O protocolágeno, na forma de monômero tem cerca de 1,5 nanômetros de largura e uma periodicidade longitudinal de cerca de 64 nanômetros, que se referem ao arranjo da agregação com  $\frac{1}{4}$  da dimensão do comprimento (White, Handler e Smith, 1973).

O empacotamento das moléculas aparentemente é quase-hexagonal no sentido transversal, com apêndices entre elas formando as ligações cruzadas (“cross links”), possivelmente nas regiões dos carbonos nas posições  $\alpha$  (Kajava, 1991). Desta forma, se pode aceitar a hipótese de haver uma espiral das microfibrilas se enrolando sobre elas próprias no sentido azimutal (Fraser, MacRae e Miller, 1987).

A síntese de colágeno normalmente é mais intensa pelo fibroblasto, mas outras células podem ser ativadas para executar esta função, como os macrófagos, os mastócitos e algumas vezes, células indiferenciadas. A deposição e agregação no meio extracelular depende de pH neutro, sendo o procolágeno um polímero do tipo  $(X-Pro-Gly)_n$ , onde X é a prolina, alanina ou outro aminoácido, mas não Glicina (**White, Handler e Smith, 1973**). A organela intracelular responsável pela síntese de colágeno é o retículo endoplasmático rugoso, por tradução de um RNA mensageiro. Cada cadeia sintetizada tem extremidades peptídicas maiores do que as respectivas cadeias  $\alpha$  e são denominadas pro- $\alpha$ . A hidroxilação da prolina e da lisina é iniciada durante a transcrição e a adição de hexoses pode ser iniciada no retículo endoplasmático rugoso e terminada no Golgi (**Vidal, 1977a**).

Há um efeito hidrofóbico que força as moléculas de água para fora dos espaços intermoleculares, nas regiões não polares das moléculas de tropocolágeno, durante a agregação. A água está presente entre as triplas hélices, o que proporciona certa quantidade de moléculas de água nas fibrilas. A maior parte das moléculas de água são forçadas para fora das fibrilas quando elas são empacotadas na forma hexagonal. As cadeias laterais, com pontes de hidrogênio (doador-aceptor), pode ter contato com as partes não polares da molécula e formar pontes de hidrogênio com a água (**Kajava, 1991**).

Segundo os trabalhos de **Vidal e colaboradores (1964, 1970, 1977b, 1980, 1984)**, a modificação dos meios de embebição dos feixes de colágeno permite estudar as suas propriedades ópticas como a birrefringência intrínseca. Modificações foram encontradas nas curvas de birrefringência, as quais foram relacionadas ao grau de agregação

ordenada lateralmente das fibras, a sua estrutura primária e a participação das proteoglicanas. Diferenças nos estados organizacionais de um mesmo tipo de colágeno podem ser encontradas em função da idade e da localização topográfica. Por isso, o aumento da birrefringência de forma e intrínseca está relacionado ao aumento de ligações cruzadas entre as fibrilas de colágeno, aumentando a cristalinidade e a agregação ordenada do colágeno tipo I.

Para aumentar a birrefringência do colágeno pode-se utilizar de corantes que se ligam de forma orientada às fibras. Esses mesmos corantes podem conferir aos feixes de colágeno uma capacidade dicróica (Vidal, 1977a). O dicroísmo linear é uma anisotropia de absorção que se manifesta em estruturas que absorvem luz polarizada dependentemente da direção do azimute e do vetor elétrico da luz.

Foi estudado a junção de segmentos de fibrilas e o empacotamento de tendões de embriões de galinha de 14 dias utilizando secções seriais, microscopia eletrônica de transmissão e reconstituição de imagem por meio computacional. Foram achados segmentos de fibrila nos canais extracitoplasmáticos, locais da polimerização do colágeno, assim como moléculas já polimerizadas, ou seja, empacotadas. O comprimento médio das fibrilas observada por meio das secções consecutivas variou entre 7 e 15  $\mu\text{m}$ . As diferenças estruturais nos terminais dos segmentos das fibrilas reflete na sua arquitetura, indicando que esses terminais são os precursores na formação das fibrilas de colágeno, tanto no desenvolvimento e crescimento do tendão, como no processo de reparo. Os possíveis rearranjos ao nível dos tecidos provocados pelo reparo dos tendões se tornam mais prováveis quando existe a presença de material jovem na

matriz extracelular, assim como células, determinantes precoces da organização e arranjo da matriz (Birk et. al., 1989).

**Raspanti, Ottani e Ruggeri (1990)** examinaram duas diferentes classes de fibrilas, a) as da região mais interna, onde acredita-se ocorrerem as maiores cargas e estresse de tração ao longo do eixo longitudinal, e b) aquelas da região mais periférica, ou próximas do peritendão. As diferenças investigadas foram (1) distribuição dos tecidos, (2) orientação prevalente, (3) diâmetro médio, (4) distribuição dos diâmetros e (5) arquitetura subfibrilar. As diferenças principais foram na morfologia fibrilar e na organização subfibrilar, compostas por fibrilas grossas e heterogêneas, empacotadas de forma compacta e apertadas, em arranjo paralelo das moléculas na região central, enquanto que as regiões periféricas mostraram fibrilas de pequeno diâmetro, uniformes e com arranjo helicoidal das moléculas. Os autores fazem sugestões sobre o comportamento funcional sobre esses tecidos em situação de requerimentos biomecânicos e concluem sobre uma correlação causal entre a subestrutura e função das fibrilas de colágeno nos tendões.

**Ramachandran, Bansal e Bhatnagar (1973)** estudaram a possibilidade estrutural de formação de pontes de hidrogênio adicionais através dos grupos  $\gamma$ -hidroxila na estrutura em tríplice hélice das moléculas de colágeno, utilizando para isso os resíduos de hidroxiprolina, que parece ser importante elemento para estabilização das cadeias de aminoácidos, no protocólágeno. As moléculas de água auxiliam a estabilização por formar parte da ponte de hidrogênio tendo como acceptor o oxigênio da água, com comprimento de 28,2 nm. Aparentemente, os prótons do grupo amino podem estar implicados na formação das pontes de hidrogênio, especialmente quando a prolina está na terceira posição em relação a

glicina, na seqüência Gli-X-Pro-, quando o protocólágeno houvesse sido hidroxilado.

Estudos mostraram ser de grande importância a presença de pontes dissulfeto (S-S) na molécula de colágeno para a estabilização da estrutura secundária (**Chvapil, 1980**). A associação dos mecanismos de estabilização como as pontes de hidrogênio e dissulfeto, conferem à molécula características mecânicas melhores, determinando aos tecidos onde as moléculas estão inseridas, resistência à tração, especialmente nas ocasiões onde houve renovação das moléculas por mecanismo de cicatrização (**Zedfelt, 1980**).

Foi feito um estudo da importância da biodisponibilidade de oxigênio na matriz extracelular de diversos tecidos, mostrando que há moléculas associadas ao colágeno, como o keratam sulfato (KS) e condroitin sulfato (CS) -espécies de glicosaminoglicanos- que são mais ou menos sensíveis a falta de oxigênio para as atividades metabólicas. A taxa de KS/CS é tido como indicador da disponibilidade de oxigênio. Portanto, uma grande ligação existe entre a biossíntese de KS e CS e a via glicolítica do metabolismo, cuja função é doar oxigênio para a realização das atividades metabólicas em situações de rotina e também ocasiões patológicas como a fibrose, cicatrização e outras onde haja um rápido reaproveitamento e deposição dessas moléculas na trama de colágeno (**Scott, 1992**). **Nemetschek et. al. (1983)** realizaram medidas histomecânicas e espectro de difração de pequenos ângulos induzindo transformações moleculares mecanoquimicamente em moléculas de colágeno. Sob condições isométricas, uma transformação instantânea de regiões intermitentes foi observada, levando a um aumento do período de fibrilas adjacentes, não obstante a existência de regiões estruturadas na mesma fibrila, que foi

correlacionada com um retardo no aumento da tensão na fibra. As transformações determinadas pelo registro mecânico isométrico agem como uma espécie de acoplamento mecânico nas pontes de hidrogênio intermoleculares no colágeno.

**Boki et. al. (1993)** utilizaram o método de adsorção de nitrogênio para estudar fibras de colágeno não tratadas e tratadas com diferentes tempos de hidróxido de cálcio, o qual é um indutor do processo de calcificação no colágeno. Pôde-se calcular a distribuição de poros e correlacioná-los com os diferentes tempos dos tratamentos alcalinos. Os volumes diferenciais de microporos foram maiores nas fibras tratadas.

## **O PROCESSO DE REPARO TECIDUAL**

Um interessante aspecto da fisiologia animal é chamado de cicatrização ou reparo tecidual. Envolve diversas reações que fazem parte de um complexo processo biológico, que tem como objetivo a preservação do indivíduo.

Normalmente se inicia com uma lesão ou alteração das condições corporais com algum tipo de agente agressor. As reações geralmente observadas fazem parte de uma atividade inata. As reações geralmente associam eventos de natureza imunitária, fatores químicos e celulares.

A seqüência de eventos que tem como objetivo imediato o fechamento do ferimento ou o reparo dos tecidos envolvidos, pode ser dividida em três fases:

- 1- Inflamação,
- 2- Re-epitelização e contração,
- 3- Remodelamento da matriz.

Não há uma delimitação temporal precisa entre essas fases. Há freqüentemente uma intersecção, o que dificulta a observação experimental.

A seguir serão descritos alguns dos principais eventos, humorais ou celulares, do processo de reparo tecidual.

### **A Inflamação**

Nosso organismo está constantemente exposto a bactérias, vírus e demais agentes patogênicos, sendo muitos deles causadores de processos infecciosos específicos. Felizmente o corpo humano sadio possui a capacidade de resistir a quase todos os tipos de micro-organismos ou toxinas que possam afetar tecidos e órgãos. A esse processo de defesa mais elementar dá-se o nome de inflamação que manifesta-se por alterações locais e sistêmicas. A prostração, astenia, cefaléia e febre são manifestações sistêmicas e o calor, rubor, dor e edema são as locais.

Em condições normais há um equilíbrio entre as pressões de filtração e reabsorção atuando sobre o endotélio capilar, através do qual se dá um controle fisiológico do volume do líquido intersticial. Na inflamação a pressão hidrostática se eleva e a pressão coloidosmótica do sangue se abaixa formando o edema, ou exsudato inflamatório. Esse líquido que extravasa apresenta uma elevada concentração protéica e uma grande tendência à coagulação devido a sua riqueza em fibrinogênio (**Baxter, 1994**).

Denomina-se agente flogógeno todo aquele capaz de induzir resposta inflamatória, que será diretamente proporcional à intensidade da lesão tecidual causada pelo mesmo. Após sua atuação observa-se uma vaso-constricção arteriolar transitória produzindo uma isquemia local (redução ou ausência de sangue). Assim inicia-se a denominada “reação

vascular” da inflamação. Segue-se uma vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular ocasionando a exsudação plasmática e transmigração celular.

A primeira fase ou fase imediata da reação vascular, é também denominada histamina-dependente por apresentar a histamina como principal mediador químico. Possui duração de aproximadamente 2 horas e ocorre predominantemente nas vênulas devido a uma contração de suas células endoteliais, criando poros através dos quais se processa a migração celular. Essa fase pode ser subdividida em duas. A subfase inicial ou inespecífica ocorre devido alterações nos componentes protéicos teciduais. A consequência principal dessa subfase é a oportunidade do plasma extravasado entrar em contato com o tecido lesado. A partir daí inicia-se a segunda subfase onde há liberação de histamina pelos mastócitos através da ativação da “cascata de complementos”. Associa-se a uma discreta ação da serotonina, liberada pela degradação de plaquetas que também compõem o exsudato (**Robbins, Cotran e Kumar, 1994**).

A segunda fase da reação vascular, ou histamina-independente, mantém-se enquanto existir a inflamação, e é neste momento que os leucócitos iniciam o processo de transmigração. É mediada por várias substâncias químicas como a bradicinina, peptídeos básicos dos neutrófilos e prostaglandinas, liberadas em consequência da lesão celular (**Roitt, Brostoff e Male, 1985**). Com essa transmigração, entra em ação o sistema imunitário. Ele divide-se em imunidade adquirida e imunidade inata. A primeira é formada por linfócitos T e B, produzidos por tecidos linfóides, que atacam e destróem os organismos e toxinas específicos. Os linfócitos B produzem anticorpos que são imunoglobulinas específicas que agem direta, ou indiretamente através do complemento, neutralizando ou

destruindo os antígenos. O complemento possui também um efeito intensificador da inflamação promovendo a liberação da histamina pela ativação de mastócitos e basófilos. Provoca ainda quimiotaxia de neutrófilos. Já os linfócitos T, liberam linfocinas que atuam na rejeição de órgãos transplantados, e além disso secretam também a chamada interleucina-2 que potencializa a ação dos linfócitos B.

A imunidade inata é formada pelos neutrófilos polimorfonucleares, basófilos polimorfonucleares, eosinófilos polimorfonucleares e monócitos, células da série branca do sangue. São produzidos na medula óssea e defendem o corpo contra micro-organismos através da fagocitose. Os polimorfonucleares neutrófilos e monócitos são encontrados em maior porcentagem e são as principais células fagocitárias. Os neutrófilos são células adultas e os monócitos são células imaturas que intensificam sua capacidade de defesa no momento que penetram nos tecidos, denominando-se macrófagos. Apresentam sua produção e liberação pela medula aumentada durante a inflamação por substâncias denominadas, respectivamente, fator estimulante de colônias e fator indutor de leucocitose. Essas substâncias são liberadas do foco inflamatório pelos macrófagos teciduais. No momento em que as células fagocitárias penetram no tecido lesado inicia-se a fagocitose que deve ser seletiva quanto ao material que será digerido. As partículas com superfície áspera ou uma forte carga elétrica tornam-se mais sujeitas à fagocitose. Além disso, as substâncias naturais do corpo possuem revestimentos protéicos que repelem os fagócitos. Os macrófagos e neutrófilos também contêm agentes bactericidas que são letais àquelas bactérias que possuem “capas” protetoras ou outros fatores que impedem sua destruição por fagocitose (Robbins, Cotran e Kumar, 1994).

Muitas substâncias químicas liberadas pela fonte de inflamação atraem os neutrófilos e macrófagos sendo denominadas agentes quimiotáticos. Essas substâncias incluem algumas toxinas bacterianas, produtos degenerativos dos próprios tecidos inflamados e vários produtos da reação da cascata do complemento. A quimiotaxia depende de um gradiente de concentração e é maior próximo à sua origem, o que causa um movimento direcional dos leucócitos (Clark, 1985).

### Re-epitelização e Contração

Neste estágio, o processo pode ser chamado de proliferativo, uma vez que há uma fibroplasia importante e angiogênese (neoformação de vasos na região). Existe uma regulação intratecidual e também extratecidual do processo de fibroplasia. Um grupo de substâncias tecido-específicas chamadas *chalone*s estão envolvidas no controle dos eventos celulares em circunstâncias normais por inibição do crescimento de novas células. No caso de haver um ferimento ou ruptura dos tecidos, cessa a produção destas substâncias e o tecido adjacente normal passa a proliferar, até que se cicatrize a região, para que então passe novamente a produzir estas substâncias. Isto funciona como controle da proliferação tecidual (Bullough e Lawrence, 1961).

Existem muitos fatores de crescimento liberados pelas plaquetas que tem importante papel na proliferação de células e matriz extracelular. Alguns já são conhecidos como: fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador (TGF- $\alpha$ ), fator de crescimento do fibroblasto (FGF), fator de crescimento epidermal (EGF) e o fator de crescimento neural (NGF), com a participação dos macrófagos na fase mais tardia do processo, liberando estas substâncias (Karu, 1989).

Há citação de trabalhos que demonstram haver taxas de mitose 17 vezes maiores após 48 horas do início da cicatrização com perda do ritmo diurno deste processo (**Baxter, 1994**). Durante a granulação (termo utilizado para definir a fase de início da proliferação) os fibroblastos adquirem características ultraestruturais, funcionais, imunológicas e químicas que distinguem dos fibroblastos teciduais normais. Estes fibroblastos transformados passam a se chamar miofibroblastos.

Tais células retraem seus retículos endoplasmáticos e corpos de Golgi para áreas circunvizinhas ao núcleo e desenvolvem numerosos aglomerados de filamentos de actina com arranjo paralelo ao longo eixo da célula, de forma parecida com as células musculares. O núcleo sofre indentações e são estabelecidas conexões intercelulares entre as novas células (**Baxter, 1994**).

Os miofibroblastos são capazes de se moverem e se contraírem, contribuindo para a contração da região cicatricial. Além disso, podem ainda secretar uma variedade muito grande de moléculas. Não obstante a secreção do colágeno em grande quantidade, estas células podem secretar fibronectina nas fases iniciais, elastina, ácido hialurônico, glicosaminoglicanas e mucopolissacarídeos. O ácido hialurônico dá lugar a uma polimerização pela presença da glicosaminoglicana, um dissacarídeo não sulfatado, e posteriormente, durante esta fase proliferativa, a matriz com fibronectina e ácido hialurônico é seguida por uma matriz com mais proteoglicanas, que incita a deposição de colágeno, para aumentar a resistência à tração e a elasticidade.

A formação de novos vasos no tecido cicatricial é uma necessidade imperiosa, dado que por meio deles que haverá disponibilidade de oxigênio e nutrientes aos tecidos em regeneração. No momento da revascularização, a fibronectina é o componente predominante na matriz

extracelular e age como sistema guia. Após o restabelecimento do suprimento de oxigênio e nutrientes na região, cessam os estímulos para neovascularização. Os linfáticos são restabelecidos nos tecidos de granulação e são essenciais para uma drenagem apropriada do fluido edematoso.

### **Remodelamento da Matriz Extracelular**

O processo de reparo tecidual acontece como consequência da destruição produzida pela inflamação. O organismo tenta realizar ações concatenadas no sentido de reconstituir a morfologia dos tecidos envolvidos e dar o maior nível possível de funcionalidade para estes tecidos. Significa que há respostas diferentes aos distintos graus de lesão produzidos. Normalmente há um equilíbrio entre formação de colágeno e a sua degradação. Uma das formas de dar funcionalidade aos tecidos atingidos é a recuperação ou a substituição por células do mesmo tipo que havia antes da lesão. Nesse sentido, o trabalho desenvolvido por **Parizotto (1987)** analisando a recuperação funcional dos músculos cujos nervos haviam sido submetidos a diferentes tipos de lesão, se aproximaram bastante da situação fisiológica quando tratados por estímulos elétricos controlados. Os parâmetros observados se referiam as características dinâmicas da contração muscular como tempo de contração, tempo de relaxamento, coeficiente abalo/tétano, voltagem limiar, voltagem máxima, frequência para fusão tetânica, potenciação pós-tetânica e índice de fadiga tetânica. Nesta situação, o objeto de estudo foi a interação nervo-músculo. Porém outras estruturas corporais tem sido estudadas como modelos experimentais de reparo tecidual. Para analisar a participação do colágeno,

**Vidal (1964)** propõe o tendão como modelo mais adequado, uma vez que a pele não tem uma organização estrutural com um direcionamento preferencial das fibras de colágeno tipo I, além disso há também a presença de colágeno tipo III e de uma forma reticular. Portanto, neste trabalho, o modelo de colágeno tipo I no tendão Aquiliano do rato foi o escolhido, por ser o que mais se tem estudado e nos fornecer um ótimo padrão de análise da estrutura molecular.

Alguns trabalhos foram revistos para concatenar os dados existentes na literatura, sobre o estado atual desses estudos, especialmente o papel desempenhado pelo colágeno no reparo tecidual.

**Matthew e Moore (1991)** mostram a distribuição de diâmetros das fibrilas de colágeno do tendão extensor do rato subsequente a tenotomias parciais sucessivas por meio de morfometria por microscopia eletrônica de transmissão. Encontrou-se uma redução do diâmetro das fibrilas que podem ser explicadas por um mecanismo de síntese de novas moléculas, e por solicitação de carga sobre as fibras, há um amadurecimento dessas fibras e por conseqüência, um aumento dos seus diâmetros. Outro mecanismo proposto se refere a possibilidade de algumas substâncias poderem atuar como inibidores do processo de fibrilogênese, entre as quais estão o dermatam sulfato, ácido hialurônico, condroitin sulfato e fibronectina.

Foi verificado ainda por eles uma distribuição unimodal inicialmente nas áreas de não lesão mas tornou-se multimodal 240 dias após a operação. A área de lesão primária e a área de lesão secundária exibiram um aumento da freqüência de fibrilas de diâmetro pequeno entre 40 e 60 dias após a cirurgia. Eles sugerem que estas observações podem estar relacionadas com o estresse aplicado.

**Danielsen (1981)** utiliza uma metodologia *in vitro* para estudar fibras reconstituídas em relação ao aspecto ultra-estrutural. As fibras reconstituídas mostraram um ganho mecânico significativo relativo ao processo de maturação, conhecido por aumentar a performance mecânica durante a maturação *in vivo*. Uma correlação dos processos *in vitro* e *in vivo* é sugerido pelas observações dos tecidos reconstituídos. Também é sugerido uma possível influência da quantidade de ligações cruzadas intermoleculares no ganho de força durante o processo de maturação do colágeno.

**Liu, Rangayyan e Frank (1991)** propõem um método computacional para análise estatística em imagens, usando uma abordagem de escala-espaco, para avaliar objetivamente o grau de lesão e os níveis de cicatrização em ligamentos, para utilizá-lo como forma de preconizar os melhores tratamentos. Informações como áreas de cobertura e orientação espacial das fibrilas de colágeno podem prover informações importantes sobre a estrutura interna dos tecidos ligamentares. As imagens dos ligamentos são pré-processadas por uma seqüência de filtros, cujas funções são segundas derivadas de uma função Gaussiana bidimensional com diferentes escalas. São feitos mapas de estabilidade e padrões lineares são capturados. Com isso, as distribuições de orientação das fibrilas de colágeno são extraídas por análise estatística das imagens.

Os tendões tem uma capacidade intrínseca de participar do processo de reparo. Observações histológicas evidenciaram no estudo de **Manske e Lesker (1984)**, realizado *in vitro*, uma capacidade intrínseca de cicatrização, por exclusão das células que regularmente participam do reparo tecidual, especialmente os fibroblastos, em explantes de tendões flexores de diversos animais experimentais (coelho, cão, galinha e

macaco). A participação do epitendão e do endotendão contribui para a organização dos eventos do reparo dos tendões de formas diferenciadas nas diferentes espécies estudadas pelos investigadores. Todo o processo de reparo pode ser disparado da própria estrutura do tendão, por meio de ativação da proliferação celular e migração, fase inicial do reparo tecidual, através de uma capacidade inerente do tecido tendinoso.

A organização molecular dos feixes de colágeno está intimamente ligada às funções de transdutor (Vidal, 1969) e à atividade piroelétrica e piezoelétrica das moléculas (Athenstaedt, 1974; Fukada, 1974 e Liboff e Furst, 1974), que de alguma forma, determina a hierarquização da ordem estrutural macromolecular. Vidal (1969) propõe que a cristalinidade observada nos arranjos moleculares de colágeno seja uma característica fundamental que funcionaria como mecanismo homeostático, e por meio de realimentação atuaria sobre a própria organização estrutural. Outro aspecto importante estudado foi o fato de que o exercício, ou seja, a atuação mecânica do músculo sobre os tendões, levaria a uma melhor agregação das moléculas de colágeno, determinando como consequência, um melhor desempenho mecânico desses tendões (Vilarta e Vidal, 1989).

## LASER NA CICATRIZAÇÃO (UMA REVISÃO)

Muitos trabalhos tem surgido ao longo do tempo, especialmente após algumas revisões que criticavam a ausência de fundamentação para uma série de efeitos divulgados e atribuídos ao laser de baixa potência, cujos autores não tinham detalhes sobre os parâmetros físicos dos experimentos, o que dificultava a replicação dos trabalhos. Mas os críticos destes resultados não repetitivos organizaram uma série de sugestões para

que os trabalhos subseqüentes não incorressem nos mesmos erros. Os parâmetros mínimos necessários para repetir as condições experimentais foram delineados. Portanto, a seguir serão relacionados e comentados os principais trabalhos publicados nas principais revistas especializadas seguindo tais padrões dosimétricos. São trabalhos experimentais *in vitro* e *in vivo*, assim como trabalhos clínicos, voltados para o problema da cicatrização.

### **Cultura celular**

Dentre os protocolos experimentais utilizados, estão as culturas de células e de tecidos. Normalmente são conduzidos sob condições assépticas para evitar o risco de contaminação. As culturas são mantidas num meio de crescimento suplementado por soro rico em proteínas e antibióticos. Para manter a população celular da cultura sob controle, amostras são tomadas para realização de subculturas e ajustar o número de células (concentração). São analisadas sob microscopia óptica, com contador de células (Hallman et al., 1988), ligação com radioisótopos (Ohta et al., 1987) ou microscopia eletrônica, para verificar alterações ultraestruturais (Bosatra et al., 1984).

O laser mais utilizado nos trabalhos de cultura de células e tecidos foi o de HeNe, geralmente especificando dose e demais parâmetros de irradiação (Mester et al., 1978; Abergel et al., 1984, 1987; Bosatra et al., 1984; Lam et al., 1984, 1986; Dyson e Young, 1986; Tocco et al., 1985; Balboni et al., 1986; Boulton e Marshall, 1986; Hallman et al., 1988; Karu, 1988; Quarto et al., 1988; Colver et al., 1989; Riceviuti et al., 1989; Pourreau-Schneider et al., 1990). Os trabalhos produzidos no início da década de 80 proporcionaram as bases para os demais

investigadores escolherem seus protocolos experimentais. Associações com outros tipos de laser (**Dyson e Young, 1986**) foram utilizadas, especialmente com GaAs. A utilização do laser semiconductor de Arseneto de Gálio-Alumínio (GaAlAs), mais popular na prática clínica estimulou alguns autores a escolher este tipo de laser para estudos em culturas (**Abergel, Lyons e Castel, 1987; Ohta et al., 1987; Inoue, Nishioka e Hukuda, 1989; Young, Bolton e Dyson, 1989**).

Uma grande variação de doses é encontrada nos trabalhos citados. Dificuldade de aplicação das informações colhidas nos experimentos para situações clínicas é uma constante nestes trabalhos, apesar de alguns autores esboçarem algumas idéias sobre as possíveis participações das células ou tecidos estudados no desempenho *in vivo*. Os tempos de tratamentos variam de 20 segundos a 15 minutos de exposição, em aplicações simples ou períodos de 3 dias. As distâncias utilizadas entre a fonte de laser e as culturas celulares nos trabalhos citados estiveram entre o mínimo de 1 mm (**Lam et al., 1984**) e 70 cm (**Tocco, Le Borgne de Kaouel e Aubert, 1985**). As diferenças nos parâmetros de tratamentos e protocolos levaram a diferentes resultados, o que eleva o grau de ceticismo a respeito da terapia por laser de baixa intensidade, assim como dificulta a comparação dos resultados, tornando tais resultados com valor limitado.

Uma boa parte dos trabalhos publicados sobre as investigações em culturas celulares apresentam evidências de grande variedade de mecanismos biológicos envolvidos e que podem ser estimulados pela irradiação do laser de baixa intensidade. O efeito mais reportado é a proliferação de células, especialmente quando foram utilizados fibroblastos (**Hardy et al., 1967; Abergel et al., 1984; Boulton e Marshall, 1986**).

Usando fibroblastos embrionários e adultos de pele humana, **Bulton e Marshall (1986)** demonstraram um aumento na proliferação celular após irradiação com laser de HeNe. Os autores admitem que seus resultados foram inesperados e bastante significantes, mas não conseguiram explicar os mecanismos envolvidos. Entretanto, resultados reportando que não houve alteração na taxa de proliferação dos fibroblastos são encontrados (**Glassberg et al., 1988; Hallman et al., 1988; Colver et al., 1989**). Nenhum dos autores descarta a possibilidade de estimulação do processo de proliferação induzido por laser, mas alertam para o fato de que provavelmente se deva aos parâmetros físicos utilizados para conseguir sucesso nos tratamentos propostos.

Não é apenas por mecanismo de indução da proliferação que o laser pode atuar. Outros mecanismos alternativos são sugeridos para explicar a aceleração do processo de cicatrização. Os fibroblastos são responsáveis pela produção de colágeno, que é um importante componente da cicatrização. Utilizando marcadores radioativos como indicadores da produção de colágeno, vários autores (**Castro et al., 1983; Abergel et al., 1984; Lam et al., 1984; Lyons et al., 1987**) observaram que a irradiação laser com diferentes comprimentos de onda (HeNe e GaAlAs) estimula a produção de colágeno pelos fibroblastos. Os autores sugerem como explicação para este fato que pela via da expressão genética, alterações nos níveis transcricionais e translacionais poderiam ocorrer.

Os miofibroblastos são fibroblastos modificados e estão diretamente envolvidos na granulação dos tecidos. A irradiação com laser de HeNe transforma os fibroblastos em miofibroblastos (**Pourreau-Schneider et al., 1990**).

Outros aspectos da estrutura celular e do metabolismo foram investigados para verificar a possível participação na aceleração do reparo

tecidual. **Bosatra, Jucci e Olliano (1984)** observaram sinais evidentes de síntese protéica, especialmente do colágeno, por observação dos níveis de RNA mensageiro do procolágeno tipo I e tipo III, notadamente 17 dias após o tratamento com laser. **Tocco, Le Borgne de Kaouel e Aubert (1985)** também observaram um aumento no retículo endoplasmático rugoso, sugerindo um processo de estimulação do metabolismo de proteínas correlacionado com um aumento das dimensões e número de mitocôndrias das células irradiadas.

No aspecto do metabolismo, a irradiação de mitocôndrias isoladas induziu modificações na homeostasia celular, levando a uma cascata de reações, para as quais **Karu (1988)** sugere que componentes da cadeia respiratória (citocromos, citocromo-oxidase e flavina-oxidase) são fotoceptores primários ou cromóforos, portanto absorvem a luz laser em comprimentos de onda adequados. A ativação dos componentes da cadeia respiratória responsáveis pelo mecanismo de transporte de elétrons, altera as características da atividade de oxidação-redução no citoplasma, levando a um aumento da síntese de adenosina tri-fosfato (ATP) (**Passarella et al., 1984**). Este mecanismo acoplado aos carreadores da membrana como sódio e potássio, altera o fluxo de cálcio entre a mitocôndria e o citoplasma, que modula a atividade proliferativa da célula.

Entretanto, a cascata de reações afeta o metabolismo celular e o desenvolvimento por interferir nos níveis de nucleotídeos cíclicos (**Silveira et al., 1989; Franco, Silveira e Parizotto, 1997**). Tais componentes levam a iniciação da síntese de DNA. **Karu (1988)** acredita que a luz visível pode mediar a regulação do metabolismo celular por esta via.

Fatores liberados pelos monócitos podem induzir proliferação de células da linhagem dos fibroblastos (**Young, Bolton e Dyson, 1989**). Células da linhagem branca do sangue, como monócitos e macrófagos tem

um papel central na mediação da imunidade corporal e nas respostas inflamatórias, especialmente na liberação de fator de crescimento dos polipeptídeos (FCP) e citocinas. Quando ocorre um trauma, as vias homeostáticas são ativadas e tais substâncias tem sido associadas a imunidade e ao reparo tecidual. Um estudo recente provou que há um envolvimento do FCP no reparo tecidual ativado pelo laser (**Shields et al., 1991**).

### **Cicatrização em Modelos Animais**

Os estudos da ação do laser no processo de reparo tecidual em modelos animais tem uma grande variação de protocolos empregados e também dos modelos escolhidos. A grande maioria dos investigadores utilizaram o modelo de pele, principalmente empregando como animal de investigação o rato, o que não é bom sinal. Isto se deve principalmente as facilidades na manipulação destes animais e o baixo custo, além do controle mais ameno por parte das sociedades protetoras de animais. Para trabalhar com modelo de pele, o porco deve ser o animal de escolha (**Hunter et al., 1984**), mas devido as dificuldades de sua manutenção, este modelo é freqüentemente rejeitado (**Basford, 1986**). A pele do rato não tem grandes similaridades com a pele humana, o reparo se dá mesmo nas piores condições, a trama de colágeno da pele é composta de variações de diferentes tipos de colágenos. Estes fatos fazem da pele um modelo de difícil análise.

Os primeiros estudos foram realizados no final dos anos 60 e estão sumarizados no artigo de **Mester e Jaszszagi-Nagy (1973)**, utilizando como modelos ratos e camundongos. Vários radioisótopos foram injetados que poderiam se incorporar ao processo de reparo tecidual, especialmente

a glicina-C14 e prolina-H3. As irradiações foram realizadas com laser de rubi com doses de 4 J/cm<sup>2</sup> e aplicadas após diferentes tempos de evolução do processo, ou seja, após momentos distintos a partir da inoculação. Os animais foram sacrificados e examinados quanto a captação dos aminoácidos ligados aos isótopos radioativos. Conclui-se que há um processo que os autores chamaram de bioestimulação devido ao fato dos eventos bioquímicos acelerarem-se durante o processo de reparo tecidual. Os parâmetros de irradiação usados não são claramente definidos e difícil de serem reproduzidos. Vários outros trabalhos foram realizados pelo grupo húngaro e são sumarizados nos artigos de revisão de **Mester, Mester e Töth (1984)** e **Mester, Mester e Mester (1985)** mostrando diversos aspectos do processo de reparo tecidual, nas suas diversas fases e abordando com distintas metodologias.

A fotobiomodulação da cicatrização freqüentemente é analisada sob o ponto de vista da contração da ferida *per se* e eventualmente outras variáveis são incluídas para facilitar as mensurações. No trabalho de **Lievens (1985)**, foi conduzida uma investigação sobre a ação do laser na motricidade do sistema linfático e a cicatrização de uma incisão abdominal em camundongos. A artéria, a veia e o vaso linfático principais foram cortados e examinados por mais de seis meses após a cirurgia. Por uma técnica de microscopia por transiluminação, o investigador pode fotografar e filmar, para estudar a microcirculação. O mesmo estudo também mostrou que a adesão da cicatriz do tecido subjacente e o edema foram modificados sob ação do laser. Os parâmetros não foram bem especificados, mas o laser empregado foi o de HeNe associado com infravermelho, pulsado a 700 Hz.

A sobrevida de fatias da pele cuidadosamente retiradas cirurgicamente foi estudada por **Ohshiro (1991)**, estimuladas por

irradiação de laser de baixa intensidade. Os estudos foram conduzidos na região dorsal de camundongos, tendo os grupos experimentais recebido laser antes e após a elevação da pele e a respectiva sutura. Os resultados evidenciaram bem a aceleração do processo de cicatrização.

**Lyons et al. (1987)** determinaram a influência do laser na elevação do conteúdo de colágeno após duas semanas seguintes à irradiação, mostrando ainda aumento considerável na tensão de ruptura de cicatrizes uma ou duas semanas depois de irradiadas. **Abergel et al. (1987)** também encontraram resultados semelhantes em camundongos, cujas cicatrizes foram submetidas a tensão de ruptura e observado a acumulação de colágeno. Eles mostraram ainda elevação nos níveis de procolágeno em pele de porco irradiada com laser.

**Braverman et al. (1989)** registraram uma grande diferença na tensão de ruptura em todos os grupos tratados (tanto com laser de GaAs ou HeNe) tanto no lado tratado como na cicatriz do lado não tratado, em relação aos animais não submetidos ao tratamento. Com base nestes dados, os investigadores concluíram que a irradiação pode causar a liberação de fatores sistêmicos que poderiam ter influenciado o lado não tratado. Entretanto, não há relato de mudança no tempo de cicatrização.

A possibilidade de angiogênese como um efeito sistêmico após a irradiação com laser foi demonstrado por **Hickman e Dyson (1988)**. Outras modificações não específicas no metabolismo é discutida por **Zarbovic et al. (1991)** que observaram maior velocidade de cicatrização em camundongos irradiados, submetidos ou não a hepatectomia (retirada do fígado). A composição de lipoproteínas diminuiu nos animais operados, enquanto nenhuma diferença foi detectada naqueles não operados.

Tendões também foram investigados sob ação de laser. O reparo de tendões foi acompanhado por **Enwemeka et al. (1990)** com resultados

muito promissores, tendo sido observado principalmente a velocidade de cicatrização. Diferenças nas dimensões das fibras colágenas foram detectadas por meio de morfometria sob microscopia eletrônica de transmissão, mostrando uma distribuição de diâmetros diferenciados em função das doses de laser aplicadas. As fibras colágenas do grupo de coelhos tratados com laser a 4 e 5 mJ/cm<sup>2</sup> foram as mais espessas. **Enwemeka et al. (1990)** determinaram alterações ultraestruturais e biomecânicas fotoinduzidas por laser nos tendões de coelhos e sugerem que o aumento da síntese de fibrilas de colágeno provavelmente aconteça as expensas da maturação precoce dessas fibrilas.

## OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi analisar a influência do Laser de HeNe ( $\lambda=632,8$  nm) sob o processo de reparo tecidual, em diferentes tempos de evolução, investigando com Microscopia Eletrônica de Varredura, Microscopia de Força Atômica e Espectroscopia Infravermelho - Transformada de Fourier quanto aos aspectos morfológicos e bioquímicos do colágeno tipo I, no tendão de rato, especialmente relativo à fotoativação produzida e as alterações moleculares processadas nos animais *in vivo*.

Como objetivo paralelo, houve um treinamento na utilização da Microscopia de Força Atômica para análise de materiais biológicos e também no uso da Espectroscopia Infravermelho - Transformada de Fourier para detecção de alterações nas ligações químicas e observações das diferentes assinaturas de alguns dos compostos orgânicos mais importantes, cujas participações são fundamentais nos processos biológicos.

## **MÉTODOS DE ANÁLISE**

Neste capítulo serão descritos os métodos de análise utilizados para o desenvolvimento deste trabalho, alguns mais comuns como o caso da Microscopia Eletrônica de Varredura, e outros mais recentes como a Microscopia de Força Atômica e a Espectroscopia de Infravermelho acoplado ao microscópio óptico.

### **MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA**

O Microscópio Eletrônico de Varredura é um instrumento já bastante conhecido e utilizado para análise de ultraestrutura dos mais diversos materiais.

A preparação das amostras para observação neste tipo de instrumento requer certos cuidados como a secagem do material (no caso de materiais biológicos), a metalização e geralmente, antes mesmo de

executar tais passos, uma criofatura do material se faz necessário para expor as regiões mais internas da amostra para observação.

É considerado uma espécie de análise de superfície, com uma resolução que pode variar em decorrência da qualidade de preparo da amostra até da qualidade do equipamento empregado.

## MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

O Microscópio de Força Atômica (MFA) é um instrumento de análise de superfícies cujo desenvolvimento derivou do Microscópio de Tunelamento de Elétrons (MTE) (Binnig, Quate e Gerber, 1986). O MTE faz uma leitura da corrente de tunelamento que acontece entre uma ponta de prova e a amostra, determinado pela função de trabalho da estrutura atômico-molecular da amostra e da forma e a espessura da ponta de prova (Quate, 1986; Laiho, Tevola e Snellman, 1987). A dificuldade de utilização deste tipo de microscopia se dá pelo fato de que apenas materiais condutores e semicondutores podem ser observados. Seguindo esta idéia, surgiu uma modificação da técnica, que por meio de uma ponta de prova montada num substrato com a estrutura tipo microviga com constante elástica conhecida, chamada “cantilever”, pode-se fazer esta ponta varrer a superfície da amostra e recolher dados por interferometria a laser, que processados via computador, formam uma imagem para ser analisada.

As forças interatômicas que aparecem entre uma ponta fina de uma sonda e a superfície de uma amostra estão na ordem de  $10^{-7}$  a  $10^{-9}$  N, e são descritas pelo potencial de Lennard-Jones,

$$U(r) = -U_0[(r_0/z)^{12} - (r_0/z)^6] \quad (4)$$

onde  $z$  é a distância entre os átomos,  $U_0$  e  $r_0$  são respectivamente a energia e a distância de equilíbrio entre os átomos que estão interagindo. As interações resultantes entre os átomos da ponta de leitura e os da amostra em equilíbrio variam o seu caráter de atrativa para repulsiva quando a distância entre eles se torna menor que  $r_0$ .

Quando aproximamos a ponta do MFA aos átomos da camada atômica mais externa, a sobreposição das nuvens eletrônicas provoca o surgimento de uma força repulsiva forte, que é proporcional a densidade eletrônica total. As forças dispersivas de longo alcance, do tipo van der Waals, assim como as forças de Coulomb e as interações entre os dipolos, são as responsáveis pela parte atrativa do potencial de Lennard-Jones.

São estas forças atrativas e repulsivas que podem ser registradas ao realizarmos uma varredura da ponta sobre a amostra. Dados sobre a topografia em escalas bastante reduzidas e outras informações podem ser obtidos e muitas vezes, características peculiares das amostras podem ser detectadas por este tipo de análise de superfície. Os dados podem ser tratados para redução de interferências e ruídos por meio de filtros digitais especiais, assim como possibilita o estudo de áreas restritas da amostra (Morris, 1994).

Pode-se trabalhar sob duas formas de captação de imagens: as microscopias de força atômica por contato e por não-contato, utilizando-se as interações repulsivas e atrativas, respectivamente.

Uma série de trabalhos teóricos tem sido realizados para calcular as forças atrativas entre objetos macroscópicos de diferentes geometrias. Talvez a descrição teórica mais precisa a esse respeito relata que as interações mecânicas podiam ser explicadas com base nas flutuações do

campo eletromagnético. Constantes dielétricas complexas entre os materiais estudados, dependentes da frequência do campo eletromagnético, foram os constituintes mais importantes das equações deduzidas.

O importante é mencionar que os resultados teóricos foram bastante concordantes com os dados experimentais obtidos posteriormente num aparelho desenvolvido para medir as forças entre objetos macroscópicos. Forças na ordem de  $10^{-8}$  N com distâncias entre centenas de nanômetros até menos que 30 nm.

Os resultados obtidos para vários tipos de materiais, considerando que o sistema possa ser aproximado para uma interação do tipo esfera-plano, apresentaram muito boa correlação quando calculados através da equação,

$$F(z) = 2\pi R_0 B / 3z^3 \quad (5)$$

onde  $B$  é uma constante, e está relacionada com a constante dielétrica dos materiais estudados.

Normalmente, os resultados obtidos pela MFA por contato apresentam melhor resolução do que as imagens por não-contato, e o registro das variações das forças repulsivas é tão simples quanto o das forças atrativas. O microscópio operando no modo contato têm analogia com o perfilômetro, instrumento utilizado para medidas da topografia de superfícies.

A grande vantagem na utilização do MFA é a grande sensibilidade do método para forças bastante pequenas, com alta precisão na detecção das corrugações nas superfícies analisadas. As forças obtidas pelas pontas de prova do MFA estão três a quatro ordens de grandeza menores que

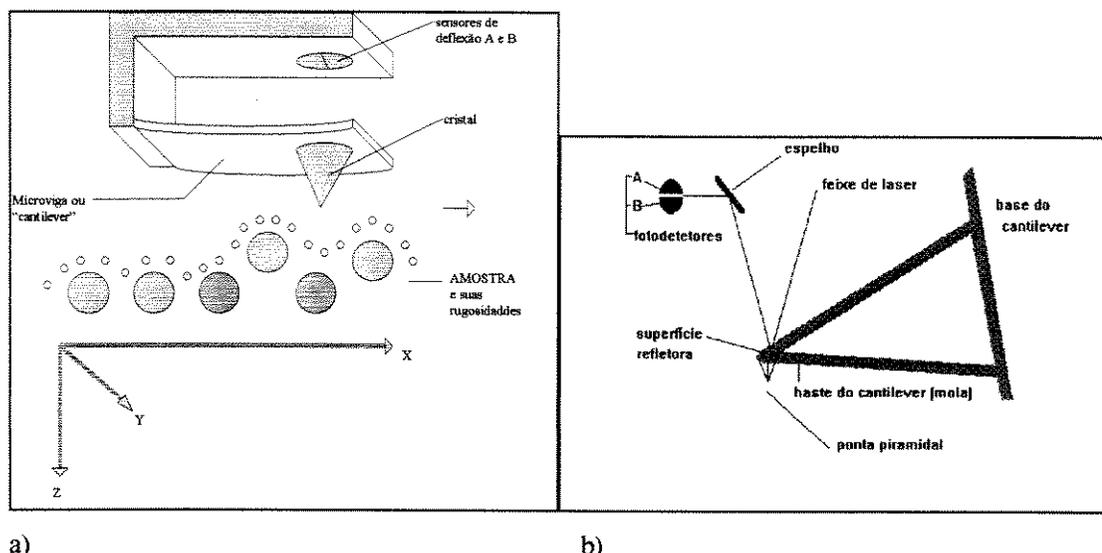
aquelas conseguidas com os perfilômetros, que estão na ordem de  $10^{-5}$  N. Isto permite que materiais com baixos limites de deformação plástica possam ser analisados de forma não destrutiva por MFA por contato. Isso inclui especialmente os materiais biológicos. As resoluções verticais conseguidas por MFA também são bem maiores que aquelas obtidas pela Microscopia Eletrônica de Varredura ou por Interferometria Óptica.

### **Metodologia de Análise por MFA.**

A formação da imagem do MFA pressupõe varreduras de linhas seqüenciais da região da amostra previamente escolhida ou ao acaso, que no seu trajeto pode encontrar vários tipos de situações como elevações na topografia ou vales (buracos). O deslocamento da ponta sobre a amostra é realizado por cerâmicas piezoelétricas estrategicamente colocadas, que produzem um deslocamento da amostra em relação à ponta que se encontra fixada.

A interferometria óptica utilizando um laser se dá pôr meio da incidência de um feixe sobre uma superfície polida do “cantilever”, que reflete para um espelho, cujo foco está concentrado entre dois fotodetetores (A e B) (vide Figura 1). O ajuste do feixe entre os fotodetetores se dá por meio de uma relação de paralelismo. Com isso, calibramos o microscópio com os parâmetros escolhidos como a constante elástica do “cantilever”, em função de maior ou menor sensibilidade na análise.

A sensibilidade do MFA para deflexões da microviga ou “cantilever” na direção  $z$  ( ou seja, altura, que se situa na ordem de ângstrons) define parte da amplificação. A constante elástica da microviga, portanto, determina a sensibilidade do equipamento nas análises pelo



**Figura 2** - Princípio de funcionamento do microscópio de força atômica: a) a microviga se desloca para uma direção e varre a amostra rugosa, reproduzindo o deslocamento numa imagem construída digitalmente; b) características da microviga ou “cantilever”, onde ocorrem os ajustes do feixe de laser na superfície polida, refletindo nos fotodetectores (A e B) e ajustada a relação de paralelismo.

deslocamento do sistema de mola. O deslocamento é dado pela fórmula de

**Hook:**

$$Z = F/K \quad (6)$$

onde  $Z$  é o deslocamento vertical,  $F$  é a somatória das forças atuantes na direção vertical e  $K$  é a constante elástica do “cantilever” escolhido.

Originalmente os “cantilevers” eram corroidos a partir de silício oxidado usando máscaras fotográficas para definir a ponta de prova. As pontas atualmente utilizadas são produzidas por colagem de um fragmento de diamante com formato piramidal na extremidade da microviga ou por processo de microfabricação de dispositivos eletrônicos depositados na microviga de  $\text{Si}_3\text{N}_4$  (Albrecht e Quate, 1988). Este método resulta em

pontas bastante finas, com raio menor que 30 nm. Mais recentemente se idealizou as chamadas superpontas (do inglês, “supertips”) que são mais alongadas e finas, conferindo melhoria na qualidade das imagens obtidas (Keller e Chih-Chung, 1992).

Com os “cantilevers” microfabricados pelo processo de microeletrônica, se conseguiu redução na sua massa, o que possibilitou detecção de deslocamentos na amostra bastante pequenos e portanto aumentou a sensibilidade do equipamento, capacitando-o a medir forças da ordem de até  $10^{-18}$  N. Isto significa que há sensibilidade suficiente para detecção das forças interatômicas (eletrostáticas) e de van der Waals (Morris, 1994).

### **Cuidados Especiais nas Análises por MFA.**

Um dos principais problemas encontrados para analisar materiais pela MFA se refere ao controle da força aplicada sobre a amostra durante as medidas, adequando-a aos diferentes ambientes de trabalho da ponta (célula líquida, vácuo) e também devido a qualidade da ponta (geometria). Isso tem resultado no surgimento de alguns tipos de imagens fantasmas, mas se houver uma escolha cuidadosa da ponta quanto a otimização do método de preparação das amostras e do tipo adequado de constante elástica do “cantilever”, pode-se conseguir imagens bastante precisas, inclusive analisando processos fisiológicos em tempo real.

Como um método para análise de superfície, o MFA necessita de certos cuidados no preparo das amostras. Substratos especiais com

estrutura conhecida como o grafite altamente orientado (HOPG), a mica e lâminas de vidro são os mais utilizados para investigação.

O conhecimento prévio da possível rugosidade da superfície a ser analisada evita o comprometimento da qualidade da análise (Morris, 1994).

A morfologia da superfície da amostra pode determinar leituras equivocadas pelo sistema de análise por MFA. Alguns exemplos deste tipo são as amostras com pontas muito agudas, aparência muito irregular de algumas corrugações e também as arestas que se iniciam ou terminam abruptamente podem aparecer no sentido da varredura da ponta sobre a amostra. Às vezes pode haver falsa interpretação em relação a forma correta da superfície.

Para evitar esse tipo de situação, devemos escolher as regiões menos irregulares das amostras, limpar bem, evitar poeira e outros contaminantes, e além disso, um bom ajuste e calibração do equipamento pode evitar forças excessivas sobre as amostras (especialmente as biológicas) que possam ultrapassar as forças interatômicas e levar a ponta mergulhar na amostra.

Um bom sistema de isolamento contra ruídos externos e vibração na base do equipamento deve ser utilizado, especialmente ao se captar imagens com resoluções submoleculares ou atômicas.

O ajuste da frequência de varredura está ligado também à qualidade da imagem e tem relação com possíveis ruídos e ressonâncias do “cantilever” com o material a ser analisado.

## **Modos de Operação do MFA**

Sob condições ideais, as forças medidas pelo MFA estão na faixa entre  $10^{-13}$  -  $10^{-4}$  N e podem ser medidas também com resolução espacial lateral na ordem de ângstrons.

O MFA pode operar com diferentes métodos, sempre levando em conta a interação da ponta com a amostra e vice-versa. O contraste depende das propriedades mecânicas da superfície a ser analisada e da ponta de prova. Para materiais duros quando comparados com a ponta de prova, o MFA pode realizar boas imagens da topografia da amostra. Por outro lado, se o material é mais mole que a ponta de prova, a imagem pode ser modificada por fatores que dependem das propriedades elásticas da superfície. Em situações extremas, pode haver deslocamento ou danos à amostra (Morris, 1994).

Tais cuidados são de vital importância quando se pretende realizar imagens de materiais biológicos. Se forem feitas imagens em condições ambientais normais (na presença do ar atmosférico), a condensação capilar eleva a força empregada na ordem de  $10^{-7}$  -  $10^{-6}$  N (Weisenhorn et al., 1989). Para isso se conta com a técnica de tomada de imagens em meio líquido, denominada técnica da célula líquida.

Os modos de operação para realização das imagens pelo MFA são:

- a) *Imagem por força constante*: durante o processo da varredura, a força entre a ponta de prova e a amostra se mantém constante por meio de uma alça de realimentação. Os deslocamentos da ponta são amplificados para gerar a imagem. Este é o modo mais usual de operação.

- b) *Imagem por altura constante*: neste caso a ponta de prova é posicionada próxima da amostra e no processo de varredura, as deflexões do “cantilever” são medidos e amplificados para produzir a imagem. Devido a ausência da alça de realimentação, este modo de operação permite altas frequências de varredura.
- c) *Modo espectroscópico*: a curva força/distância é medida a cada ponto da amostra. É pouco utilizado.
- d) *Modo gradiente de força constante*: este é um método usado para detectar forças atrativas de pequena amplitude. Neste caso, o “cantilever” é excitado por uma frequência ressonante e as interações entre a ponta e a amostra altera essa frequência de ressonância. Pode ser usado para detectar pequenas forças em célula líquida.

### **Análise de MFA para Amostras Biológicas.**

Muitos trabalhos tem surgido utilizando o MFA para análise de materiais biológicos, sobre os quais faremos uma revisão da literatura a seguir.

Algumas células já foram objetos de análise por MFA. **Butt et al.(1990)** preparou *Halobactéria*, células de alguns plantas, hemácias e células sanguíneas da série branca e realizou imagens de grandes dimensões dessas estruturas, demonstrando o potencial do instrumento para a observação da topografia das células, com a oportunidade da

combinação de imagens de maior resolução, podendo analisar situações em tempo real que ocorrem na membrana celular.

Foram feitas preparações de flagelos de *Halobacteria* nadando em mica, na tentativa de fixar as estruturas celulares. Diferentes métodos foram utilizados para facilitar a fixação. No primeiro **Jaschke, Butt e Wolff (1994)** lavaram bastante com  $8 \text{ mmol.l}^{-1}$  de acetato de magnésio, no segundo, as células adsovidas foram colocadas em água destilada e no terceiro, o choque osmótico foi realizado por redução na concentração salina. Conseguiram determinar o diâmetro médio dos flagelos em 11 nm (desvio padrão  $\pm 4 \text{ nm}$ ) e a periodicidade de uma subestrutura variando de 50 a 100 nm.

**Lacapere, Stokes e Chatenay (1992)** observaram cristais tridimensionais da enzima Ca-ATPase, que participa da bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático, com MFA. Foram realizadas imagens dos cristais secos em mica ou grafite. Dados como a espessura do cristal foram obtidos mas não a periodicidade, porque ao secar o material, sabia-se que este parâmetro seria destruído pela preparação. Porém foram obtidas imagens dos cristais hidratados com resolução semelhante às preparações secas (pouca), nas quais se pode observar a membrana com os cristais, revelando certas dificuldades para trabalhar com o instrumental.

As estruturas cristalinas da hidroxiapatita e da brushita -dois cristais biológicos- foram analisadas com MFA para identificar os planos de orientação preferencial sobre vários substratos (**Siperko e Landis, 1994**). Sobre substrato de vidro, dois planos cristalinos foram identificados. Os planos [001] e [110] estão de acordo com os valores de espaçamentos publicados previamente como dados cristalográficos. Nas imagens em escala atômica pode-se mostrar diferenças entre os depósitos em vidro ou

mica. Nas imagens em escala maior houve possibilidade de mostrar diferenças nos depósitos minerais quando comparados os diferentes substratos utilizados, mica, vidro e ouro, sugerindo que a estrutura final dos cristais podem ser influenciadas pelos substratos, quando determinadas pelo MFA.

Proteínas ligadas à membrana foram observadas em meio líquido e suas propriedades estruturais foram determinadas (Egger et al.,1990). Medidas das características de empacotamento das moléculas foram realizadas e comparadas com o modelo estrutural proposto, aproximando-se dos parâmetros medidos na difratometria de raios X, levando a concluir que efetivamente estava sendo observado moléculas individuais da membrana com resolução sub-molecular e sob condições fisiológicas.

Foi testado a possibilidade da utilização da Microscopia de Força Atômica para detecção de antígenos marcados com imunocomplexos de ouro. Imagens de alta resolução da superfície celular foram conseguidos por Neagu et al. (1994). Para isso, foram empregados linfócitos ligados ao anti-CD3 conjugado com isotiocianato de fluoresceína, como anticorpo secundário, juntamente com partículas coloidais de ouro. Ao aplicar prata na solução, houve um aumento na incorporação dos marcadores. Foi utilizada a combinação do MFA com um Microscópio Óptico invertido para correlacionar os resultados.

Imagens em meio líquido tem sido utilizado por muitos investigadores. Para observar a erosão hidrolítica de polímeros biodegradáveis, Shakesheff et al. (1994) empregaram MFA em ambiente aquoso. Os estudos revelaram que a morfologia da superfície do polímero analisada com resolução comparável à microscopia eletrônica de varredura sob vácuo, e demonstraram a influência de uma variedade de fatores,

incluindo a cristalinidade do polímero e o pH do ambiente aquoso sobre a cinética de degradação das várias misturas poliméricas analisadas.

**Radmacher et al. (1994)** observaram as forças de adesão e a elasticidade das moléculas de lisozima adsorvida sobre mica com MFA em solução tampão. O pH do tampão foi determinante na estabilidade das imagens. Eles obtiveram mapas das interações ponta-amostra por registro das forças laterais. As curvas de forças mostraram que a adesão da ponta na lisozima foi menor do que na mica. As propriedades viscoelásticas da lisozima puderam ser calculadas pela análise dessas forças.

## ESPECTROSCOPIA INFRA-VERMELHO

A espectroscopia infra-vermelho é um método físico-químico para estudo das interações energéticas dos compostos químicos, por meio de uma fonte de luz de frequência fixa (normalmente um laser de HeNe) que promove um interferograma através do movimento de um espelho e pode ser analisado por um sistema de detecção térmica [Deutério Triglicina Sulfato - DTGS](**Perkins, 1986**).

A grande vantagem na utilização deste sistema espectroscópico consiste na obtenção de uma grande relação sinal/ruído, conseguindo-se assim espectros de ótima qualidade em curtos períodos, além de poder analisar materiais na suas formas naturais, escolher a região a ser analisada por meio de microscopia de luz acoplada (**Perkins, 1987**).

A manipulação dos dados ao nível computacional é bastante interessante devido ao fato de que o espectro é tomado pela decomposição matemática por intermédio da transformada de Fourier. Portanto, várias

operações podem ser processadas rapidamente para se obter resultados qualitativos, quantitativos e comparativos, aplicando-se primeiras, segundas ou terceiras derivadas ou fazendo deconvoluções dos espectros, além de outras menos comuns. Por isso este método é bastante conhecido por espectroscopia infra-vermelho por transformada de Fourier (FT-IR).

Uma série de trabalhos com materiais biológicos tem sido realizados para detecção dos espectros. Vale ressaltar aqueles que analisam proteínas. **Kirsch e Koenig (1989)** investigaram influência da variação da temperatura na estrutura secundária de  $\gamma$ -globulina, quimotripsina, albumina sérica e  $\beta$ -lactoglobulina em solução aquosa e verificaram um aumento de proteínas com  $\alpha$ -hélice nas temperaturas baixas e intermediárias.

A atividade biológica das proteínas é primariamente determinada pela composição e sequência dos aminoácidos, que por sua vez determinam as estruturas primária, secundária e terciária. A estrutura secundária de uma proteína é estabilizada parcialmente pela presença de interações intra-moleculares por meio de pontes de hidrogênio, envolvendo grupos carbonila, amida e N-H.

**Kondyurin, Kozulin e Mikov (1991)** propuzeram um método para determinação das constantes de força inter-moleculares em polímeros, relacionando a manifestação de bandas espectrais de pontes de hidrogênio determinadas por FT-IR e a sua dependência com a temperatura. O método se baseia no tratamento das linhas do espectro como osciladores, com suas frequências vibracionais determinadas pelas ligações N-H e C=O, que aparecem com maior evidência.

A assinatura vibracional da albumina em solução aquosa como representante das proteínas com  $\alpha$ -hélice foi conseguida por **Jakobsen e Wasacz (1990)** por FT-IR e também por espectroscopia Raman. Os

espectros foram conseguidos por deconvolução da região entre 1800 e 1100  $\text{cm}^{-1}$ , tratando as linhas de absorção de forma relativa a outras que se mantinham constantes. Alterações conformacionais foram detectadas nas proteínas adsovidas por qualificação experimental das vibrações dos grupos amida I e amida III.

Também utilizando a deconvolução dos espectros, **Abbot, Wu e Kleiman (1990)**, detectaram absorbância na região espectral da amida I, com uma banda adicional na  $\alpha$ -hélice, com o uso da segunda derivada, para a hemoglobina. O pico de absorção da carbonila-amida estava em 1654 e 1651  $\text{cm}^{-1}$  para a região da  $\alpha$ -hélice.

Vários métodos de preparação podem ser utilizados para as amostras. Diluição em solução aquosa, blocos do material sólido, filmes são alguns dos métodos mais empregados. A ausência de necessidade de modificações importantes nas amostras que o método é não destrutivo.

Trabalhos com materiais retirados de biopsias de tecidos humanos foram realizados por **Wong e Rigas (1990)**. Eles retiraram um pedaço de tecido do final do intestino (cólon) que continha células cancerosas, cortaram o tecido como se faz numa preparação normal para análise histológica a fresco, seccionaram com cortes de 5  $\mu\text{m}$  de espessura pela técnica de congelamento (criostato) e submeteram a dois experientes patologistas e tomaram algumas secções para análise com FT-IR. Os investigadores conseguiram diferenciar espectros do tecido normal circunvizinho do tecido neoplásico. Sabe-se que a água interfere na obtenção dos espectros, mas utilizando-se  $\text{D}_2\text{O}$  pode-se separar ou subtrair as bandas de energia da água.

Utilizando o mesmo critério de preparação do trabalho anterior, **Wong, Wong e Fung (1993)** estudaram tecidos humanos do epitélio cervical (cérvix da vagina), onde é muito frequente o aparecimento de

células neoplásicas a partir de certa idade, nas mulheres, por FT-IR, e conseguiram definir espectros diferenciados para o tecido conjuntivo normal, o tecido epitelial normal e o tecido maligno. A banda de frequência estudada foi de 1200 a 1500  $\text{cm}^{-1}$ , tendo sido definidos quantidades diferentes de glicogênio para os distintos tecidos, aumento de pontes de hidrogênio nos grupos diéster, modificação do pico de estiramento simétrico do fosfato do grupo fosfodiéster dos ácidos nucleicos, redução das pontes de hidrogênio C-OH dos carboidratos e proteínas nos tecidos malignos como fruto da fosforilação e estiramento das pontes de hidrogênio do grupo amida, nos segmentos de  $\alpha$ -hélice foram reduzidos enquanto aumentaram as lâminas  $\beta$ .

Portanto, parece ser possível analisar o colágeno em forma de lâminas ou filmes pouco espessos, secos como método de preparo para FT-IR. Espectro do colágeno tipo I foi conseguido por **Okada et al. (1990)** comparando diversos tipos de preparação e verificando as modificações ocorridas nos respectivos espectros. Os autores prepararam várias proteínas sólidas na forma de a) filme sólido, b) método da reflectância difusa, c) método do disco de KBr (transparente ao IR) e d) método micro-infravermelho (uso do microscópio acoplado). Além do colágeno tipo I, analisaram lisozima da clara de ovo e citocromo *c* do coração de cavalo e concluíram que o método que menos interferia no espectro conseguido foi a microespectroscópico, permitindo análises dos grupos amida I e II, o que permitiu inferir sobre a estrutura secundária dessas proteínas.

## **VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA PARA MATERIAIS BIOLÓGICOS.**

Este capítulo tem por objetivo a apresentação de uma série de experimentos realizados com amostras de origem biológica, no sentido de demonstrar a validade da análise com microscopia de força atômica como método fidedigno para mensurações e observações micromorfológicas.

Alguns dos trabalhos que serão sumarizados a seguir foram apresentados em congressos ou submetidos para publicação. Por se tratarem de diferentes temas, serão descritos separadamente.

### **Análise do Colágeno Tipo I por Microscopia de Força Atômica: Estrutura Molecular e Ordem Molecular.<sup>1</sup>**

Sabe-se que o colágeno é um importante componente da matriz extracelular e que existe um largo espectro de comunicações entre as células e as moléculas da referida matriz. Os processos fisiológicos ocorrem em consonância com as estruturas existentes nos tecidos e necessitam deste substrato para a realização do desenvolvimento, crescimento, reação aos agentes agressores, remodelação e reparação.

Esta proteína representa cerca de 30% entre as proteínas totais do corpo e cerca de 6% do peso corporal. O aminoácido glicina está sempre presente, contribuindo com um terço dos aminoácidos totais da estrutura molecular do colágeno, estabelecido da seguinte forma: *gli - X - Y*, onde *X* e *Y* podem ser substituídos por vários outros aminoácidos, formando o monômero, que se liga sequencialmente de forma polimérica, por intermédio de ligações peptídicas, fazendo aparecer os resíduos laterais. Na matriz extracelular, além do colágeno, existe um complexo macromolecular no qual tomam parte as proteoglicanas e as glicoproteínas estruturais, que colaboram com as propriedades biofísicas do feixe de fibras como uma estrutura unificada e de ação integrada (**White, 1973**).

O processo de síntese do colágeno está vinculado aos fibroblastos, células que contém a maquinaria metabólica necessária para formação de hidroxí-aminoácidos e realização das ligações peptídicas. O polipeptídeo precursor é chamado de procolágeno, que sofre uma reação enzimática

---

<sup>1</sup> Síntese dos trabalhos publicados: Baranauskas, V.; Vidal, B.C. e Parizotto, N.A. - Observation of geometric structure of collagen molecules by atomic force microscopy. **Applied Biochem. Biotechnol.** 69: 91- 97, 1998 e apresentado no **5th International Congress on Cell Biology**, Madrid (Espania), por Vidal, B.C., Baranauskas, V. and Parizotto, N.A. - "Atomic Force Microscope analysis on tendon collagen type I: Molecular structure and molecular order."

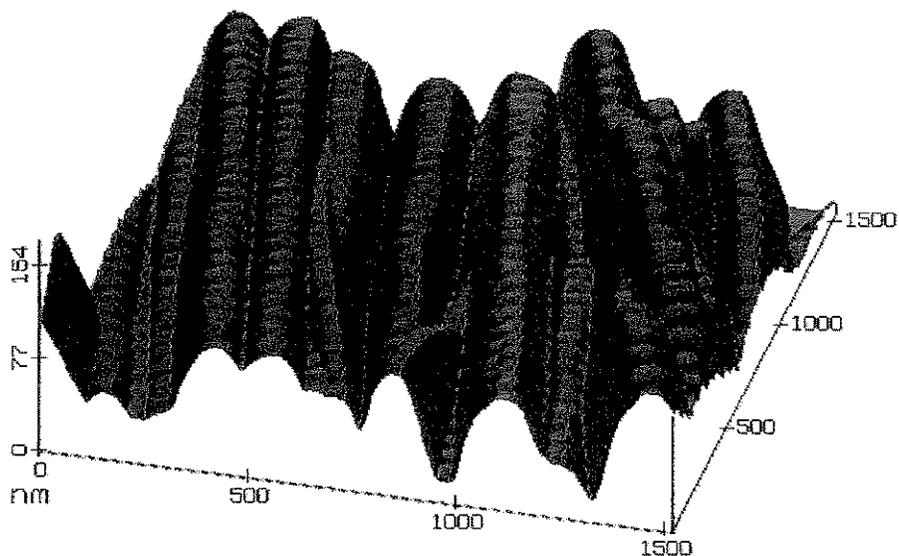
que requer a presença de  $O_2$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $\alpha$ -cetogluturato e um agente redutor que provavelmente seja o ácido ascórbico (Scott, 1992).

O conhecimento da estrutura de moléculas biológicas e suas derivações é fundamental para a elaboração de modelos adequados sobre a participação nos processos fisiológicos. Muito do conhecimento atual sobre o colágeno foi obtido a partir de observações realizadas com o uso de microscópios ópticos, eletrônicos e difratômetros de raios X. Entretanto, estas técnicas tem algumas limitações inerentes. No microscópio óptico ou o de elétrons, a observação de detalhes das superfícies biológicas usualmente utiliza processamento químico das amostras como fixação, coloração e/ou algum tipo de cobertura (tipo “spoutering”). Portanto pode haver a desnaturação do material e uma alteração na interpretação dos resultados. Além disso, o microscópio óptico está limitado a ampliações maiores que a metade do comprimento de onda da luz e o microscópio de elétrons, a metade do comprimento de onda do elétron. Na difratometria de raios X, a imagem obtida por padrão de interferência do comprimento de onda é complicada e exige transformações geométricas que embaraçam a interpretação computacional. Finalmente, a microscopia eletrônica e a difratometria de raios X necessitam da observação dos espécimes em ambiente de vácuo. O MFA, desenvolvido por **Binnig, Quate e Gerber (1986)** abriu a perspectiva de uma nova ferramenta no sentido de suplantando as dificuldades e limitações mencionadas, especialmente para análise de materiais biológicos (**Hansma et al., 1988**).

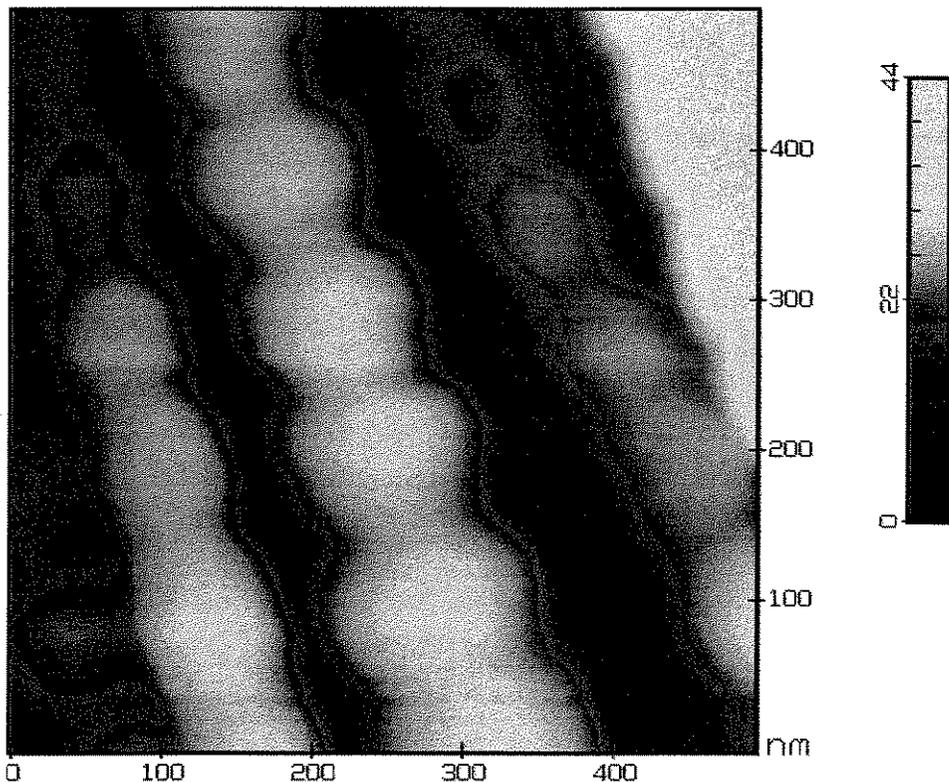
Com amostras preparadas a partir de tendões retirados de *Rattus norvegicus albinus*, da linhagem Wistar, com 90 dias de vida, os tendões de Aquiles dos animais foram submetidos a fixação com formaldeído a 10% e cortados com espessura de 6  $\mu m$ , montados em lâminas de vidro de

pequenas dimensões e posteriormente colados no porta-amostras. Utilizou-se para as análises, um MFA (*Nanoscope II - Digital Instruments Inc., Santa Barbara, CA, USA*) montado com ponta de diamante em “cantilever de  $\text{Si}_3\text{N}_4$  microfabricado (*Park Scientific Instruments, Mountain View, CA, USA*). Diferentes “cantilevers” foram utilizados para as variadas resoluções obtidas. Para imagens de dimensões maiores (tomadas com a cabeça grande), o “cantilever” de 200  $\mu\text{m}$  foi empregado, sendo sua constante elástica de 0.12 N/m e para as imagens de dimensões menores, ou seja, com maior resolução, os “cantilevers” de 100  $\mu\text{m}$  e constante elástica de 0.58 N/m foram os escolhidos. As imagens foram tomadas com frequência de varredura de 1.02 Hz para as menores resolução e 2.02 Hz para aquelas de maior resolução, em temperatura ambiente (293°K). A calibração da força de referência da ponta sobre a amostra variou de 15 a 30 nN, para prevenir a sua penetração, pois sabe-se que as fibras de colágeno são moles e colantes. Para a apresentação das imagens, empregou-se filtro passa-baixas e nas imagens com resolução submolecular, processou-se com transformada rápida de Fourier bidimensional.

A estrutura típica das fibrilas de colágeno pode ser observada na forma tridimensional pelo MFA (Figura 3). Nota-se um arranjo bem organizado das fibrilas e uma boa orientação uniaxial. Observações usuais de microscopia eletrônica de varredura não conseguem a boa resolução em profundidade como ocorre nas imagens vistas por meio de MFA. As dimensões das microfibrilas que compõem as fibrilas de colágeno foram medidas no sentido do seu eixo de orientação (figura 4) e sua periodicidade foi calculada pela transformada de Fourier, como demonstra as figuras 5 e 6. O período espectral médio medido na maioria das microfibrilas se mostrou variar entre 59.4 e 61.7 nm, corroborando

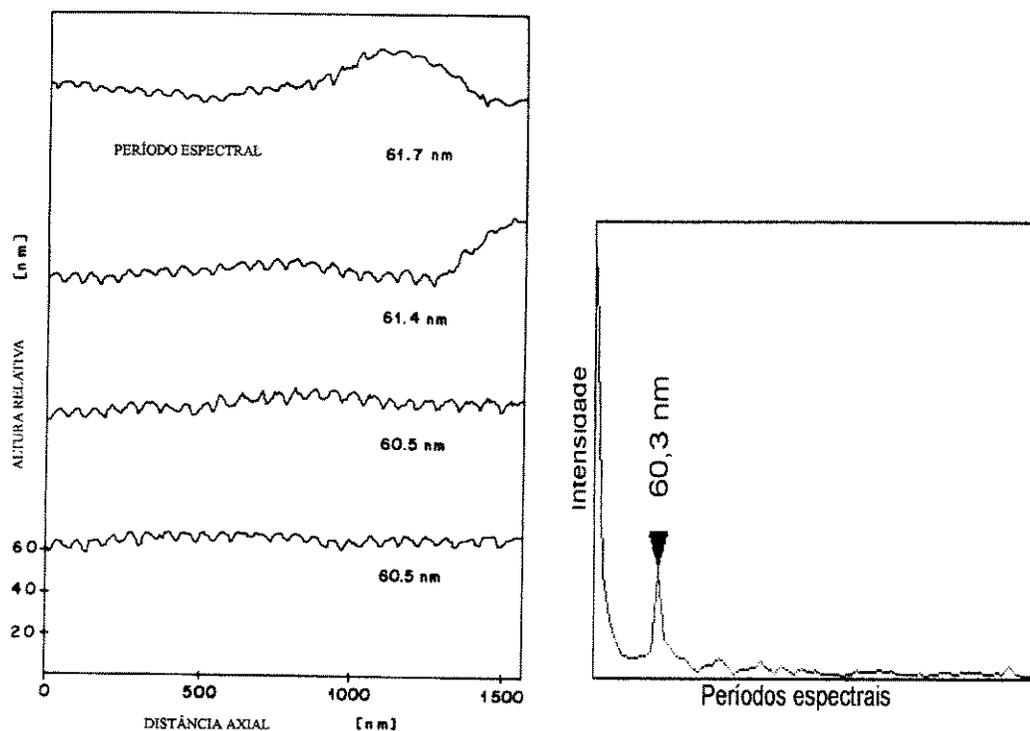


**Figura 3** - Imagem obtida por microscopia de força atômica de moléculas de colágeno, onde se nota no sentido longitudinal das fibrilas a rugosidade característica atribuída a banda D, assim como a distribuição dos perfis das fibras e o modo de agregação entre elas.



**Figura 4** - Imagem obtida por microscopia de força atômica de moléculas de colágeno do tendão de rato, onde se nota no sentido longitudinal das fibrilas, sua agregação com as fibrilas adjacentes e um ordenamento muito forte das estruturas.

achados de Fraser et al. (1983) e Fraser, MacRae e Miller (1987), que para o tendão da cauda do rato, calculou valores na ordem de 67.5 nm. O diâmetro nas secções radiais das fibrilas variou de 124 a 170 nm, principalmente devido as alturas das fibras medidas.



A)

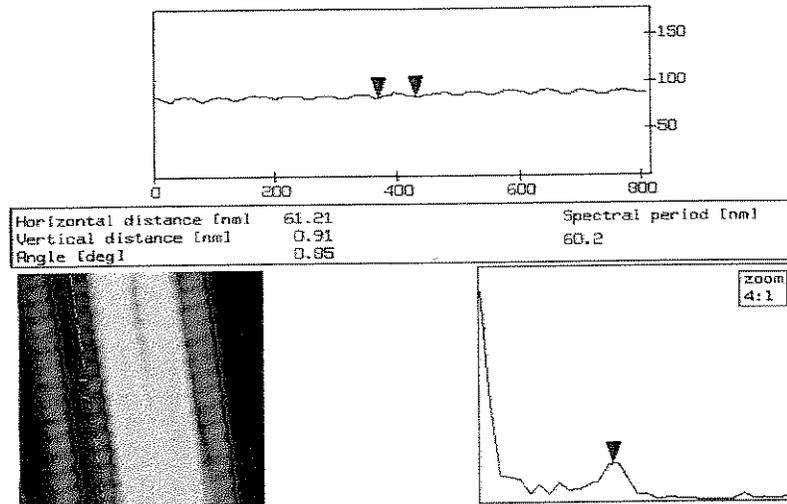
B)

**Figura 5** - Gráfico demonstrativo A) Corte axial de fibrilas de colágeno com seus respectivos períodos espectrais relativos a banda D de uma série de fibrilas de colágeno; B) Transformada Rápida de Fourier acusando valor médio de cerca de 60,3 nm., obtido por intermédio de processamento computacional da imagem de MFA

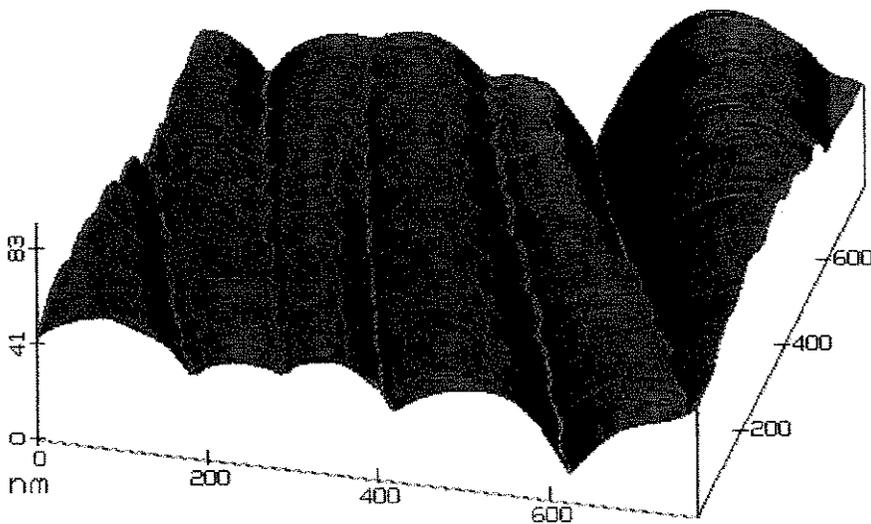
. Na Figura 7, pode ser observado a aparência das fibrilas, que ao serem medidas pela secção radial, o aspecto das alturas torna-se um fator importante, uma vez que as superfícies expostas das fibrilas são diferentes.

A estrutura helicoidal pode ser caracterizada pelas medidas dos ângulos entre a direção axial e a direção das microfibrilas associado aos dados obtidos nas bandas radiais. O valor absoluto destes ângulos variou

na faixa de 84 a 89 graus, mas o ângulo entre as microfibrilas adjacentes foram complementares, indicando que uma microfibrila tem rotação horária e a adjacente tem rotação no sentido anti-horário. Isto está ilustrado na Figura 7.



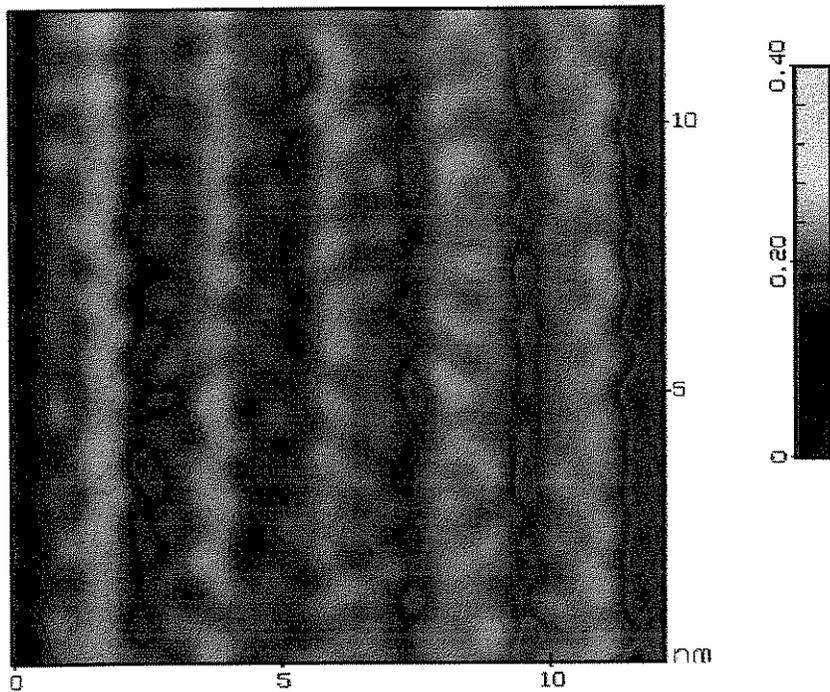
**Figura 6** - Corte longitudinal da fibrila de colágeno (com a fotografia ao lado) mostrando um período espectral típico da molécula.



**Figura 7** - Imagem obtida por microscopia de força atômica de moléculas de colágeno, onde se nota no sentido longitudinal das fibrilas a rugosidade característica atribuída a banda D bastante evidente nesta amplificação e a organização das moléculas com angulação típica entre as fibrilas, formados entre a direção das microfibrilas e a direção axial principal que girou em torno



colágeno no osso, observando períodos de 0.93 nm e 8.58 para as cadeias de polipeptídeos e de macromoléculas de colágeno, respectivamente, além



**Figura 8** - Imagem submolecular obtida com microscopia de força atômica da molécula do colágeno retirado do tendão de rato. Nota-se a estrutura helicoidal típica da molécula, analisada de maneira direta, sob condições de redução máxima de ruídos. A imagem foi tratada com filtro transformada rápida de Fourier bidimensional e passa-baixa para eliminação dos sinais ruidosos.

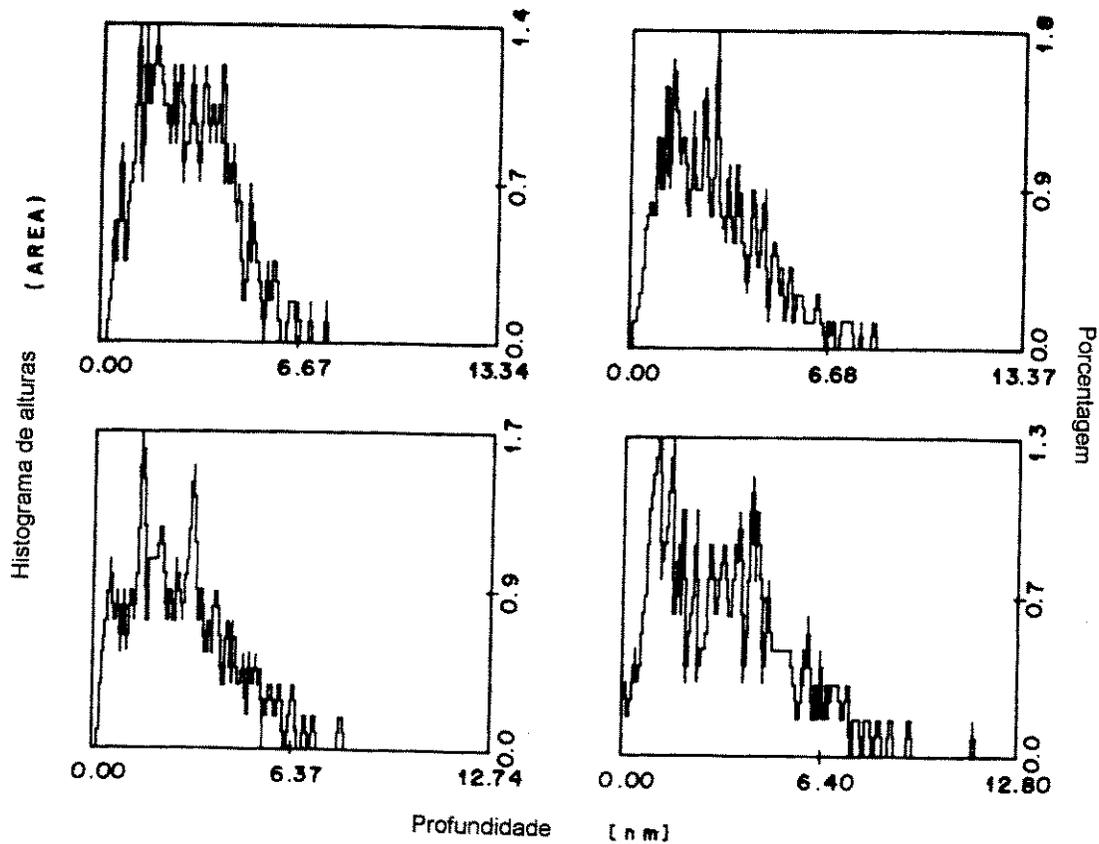
da dimensão molecular de 1.5 nm. Entretanto, considerando a natureza das diferentes estruturas (osso e tendão) e também que a medida da difração de raio X é a média obtida da interferência de muitas moléculas, pode-se supor que as medidas se ajustam ao modelo molecular do colágeno (**Jones e Miller, 1991**).

Está ilustrado na figura 7 que a direção do enrolamento das moléculas adjacentes estão em sentidos contrários. Isto certamente é um fator importante para as ligações cruzadas (“cross link”). A distância transversal intermolecular tem um período de 2.21 nm, cujas separações tem uma distância de 0.61 nm entre as moléculas. O padrão molecular

sugere a presença de estruturas hexagonais, com distância entre os vértices da cadeia entre 0.2 e 0.35 nm. Comparando com dados das distâncias interatômicas entre C - C (1.20 a 1.54 nm), ou C - N (1.15 a 1.47 nm) ou C - O (1.13 ou 1.43 nm), pode-se concluir que estas imagens são de duas ou mais ligações ou há a nuvem eletrônica de outro átomo presente nas proximidades. Pode-se sugerir ainda que estas imagens são devido aos resíduos de aminoácidos envolvidos nas ligações não helicoidais dos polipeptídeos. Nas observações ao microscópio eletrônico, a incubação com ácido fosfotúngstico mostra-se aumentar o período se forem observadas as mesmas amostras com difração de raio X, como mostra a investigação de **Nemetschek et al. (1983)**, sugerindo que os resíduos de hidroxiprolina da cadeia  $\alpha_2$  (I) seria ligado com pontes de hidrogênio com as moléculas de água. No modelo de **Ramachandran, Bansal e Bhatnagar (1973)**, as ligações de H podem levar a um encurtamento da molécula de colágeno, incluindo o ângulo com o eixo da hélice. Neste modelo, a dimensão da microfibrila normal (sem tratamentos) foi de 67 nm para o tendão da cauda do rato. Os valores obtidos por nós está por volta de 61 nm. Estes dados podem fornecer características da organização da ordem molecular para utilização nos diversos processos fisiológicos, onde os mecanismos são dependentes da estrutura do colágeno (**Eyre, 1980**). A possibilidade de mostrar a modificação da birrefringência por ação dos mucopolissacarídeos no arranjo molecular do colágeno (**Vidal, 1964**) e também pela inclusão de proteoglicanas na sua estrutura foi proposto por **Vidal e Mello (1984)**, assim como o fator idade influenciando o estado de agregação e a ordem molecular no tendão do rato (**Vidal e Carvalho, 1990**).

Portanto, pode-se concluir que o MFA se mostrou bastante eficaz na caracterização da estrutura molecular do colágeno, chegando a resoluções

bastante elevadas, evidenciando as fibrilas e microfibrilas, assim como as cadeias polipeptídicas. Observou-se um empacotamento das moléculas



**Figura 9** - Histogramas de alturas das fibrilas de colágeno relativo a pequenas áreas (idênticas) tomadas das regiões das fibrilas de colágeno, mostrando homogeneidade na distribuição característica da molécula em relação as alturas e profundidades quando submetidas a uma varredura por MFA.

numa estrutura helicoidal com uma orientação predominante azimutal. As estruturas das fibrilas tem uma segmentação periódica e as bandas puderam ser medidas, caracterizando as macromoléculas. As bandas observadas correspondem as linhas de contraste vistas no microscópio eletrônico, com amostras coradas com ácido fosfotúngstico denominadas banda D. Os achados mais interessantes se referem as imagens submoleculares, mostrando a natureza de tríplice hélice enrolando-se com as cadeias polipeptídicas para formar as macromoléculas de colágeno,

derivado de modelos medidos por difração de raio X. As medidas das dimensões moleculares foram realizadas pela transformada rápida de Fourier no sentido do eixo mais longo das moléculas e também na secção radial. A medida radial indicou espaçamento intermolecular com uma distância pico a pico de 2,21 nm e um diâmetro molecular da fibra de 1.43 nm. Entre as medidas axiais se obteve valores de 1.15 nm e 8.03 nm, provavelmente correspondendo ao período relativo a presença das cadeias polipeptídicas e a uma cadeia simples, respectivamente. O espaçamento intermolecular de 2,21 nm sugere que as hélices não são empacotadas de maneira muito compactas por forças de van der Waals que agem nas cadeias laterais, o que leva a uma estrutura que se aproxima de um empacotamento aproximadamente hexagonal, com distância intermolecular justamente nos valores do diâmetro da molécula. Por outro lado, as moléculas são separadas por grandes distâncias devido aos complexos peptídeo-água-peptídeo presentes nestes agregados.

### **Morfologia Sub-micrométrica de Superfícies de Cartilagens: Variação de Profundidades em Articulações Sujeitas a Diferentes Tensões de Compressão.<sup>2</sup>**

## **INTRODUÇÃO**

---

<sup>2</sup> Trabalho publicado nos *Anais da X Reunião Anual da FESBE*, Caxambú (MG), 1993, por Parizotto, N.A.; Baranauskas, V. e Vilarta, R. - "Morfologia sub-micrométrica de superfícies de articulações: Variação de profundidades em articulações sujeitas a diferentes tensões de compressão."

Processos de lubrificação e nutrição em articulações são dependentes da interação do líquido sinovial com a superfície cartilaginosa. Foram analisados os perfis topográficos de superfícies cartilaginosas sujeitas *in vivo* a diferentes níveis de tensão de compressão, com objetivo de estabelecer relações entre características funcionais articulares e variações de profundidade das micro-rugosidades.

As cartilagens articulares estão entre as estruturas corporais que mais suportam carga. As propriedades mecânicas deste tecido são derivadas das suas estruturas e das propriedades das macromoléculas que o constituem. Há frequentemente uma forte correlação entre estrutura e função nos tecidos orgânicos. Na cartilagem, o colágeno presente na sua estrutura serve como um meio para uma fase aquosa que em associação com agregados de macromoléculas, as proteoglicanas, regulam as propriedades viscoelásticas e a capacidade de recuperação do tecido. Adaptações fisiológicas acontecem quando se submete o esqueleto a alterações de demanda mecânica, o que pode comprometer as características das cartilagens articulares.

Orientação nas populações celulares podem ser ativadas sujeitando as células a tensões mecânicas (Buck, 1980) proporcionando modificações nas suas atividades metabólicas (DeWitt et al., 1983). Na cartilagem, agregação molecular do colágeno se relaciona com a exposição sistemática a forças compressivas. Em contraste com os ossos, a cartilagem é um tecido bastante hidratado (Maroudas et al., 1986) com uma mistura de mucopolissacarídeos e solução aquosa de ácido hialurônico. O gradiente de concentração das proteoglicanas parece estar relacionado diretamente com as forças de compressão na cartilagem, aparecendo as maiores

concentrações nas regiões do interior das articulações e menores nas laterais e regiões superficiais (Liphshitz, Etheredge e Glimcher, 1976).

Longmore e Gardner (1975) sugerem uma relação morfo-funcional dos diferentes níveis de contornos ou perfis da cartilagem articular onde as ondulações quaternárias seriam responsáveis pela adsorção do complexo proteína-hialuronato na superfície articular, atuando como lubrificante, através do banho pelo líquido sinovial.

O objetivo deste trabalho foi detectar as diferenças nos perfis das superfícies de cartilagens articulares sujeitas *in vivo* a diferentes tensões de compressão e estabelecer possíveis relações entre estas características funcionais e a morfologia das micro-rugosidades.

## MATERIAL E MÉTODOS

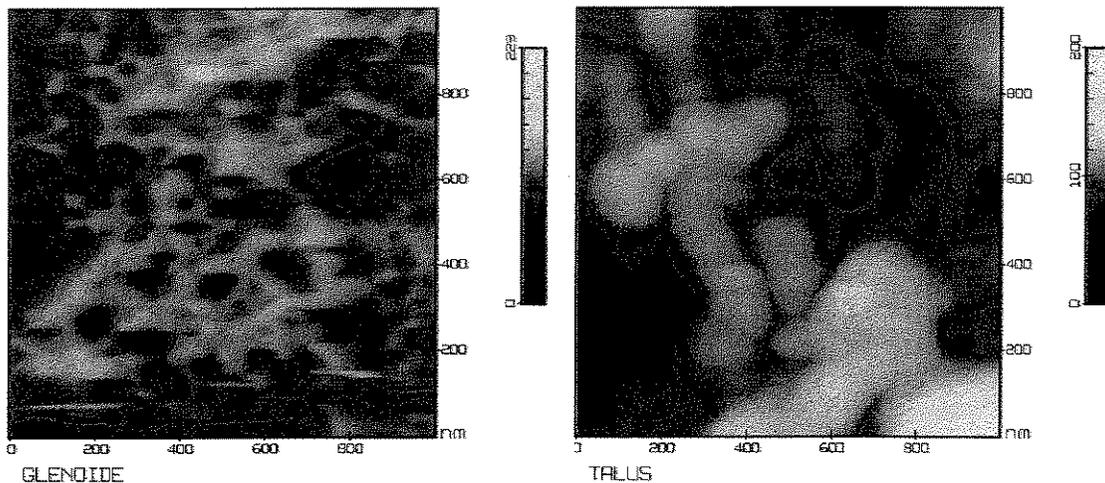
O material da amostra foi extraído de articulações de cães, sendo o côndilo femural a cartilagem representante das articulações submetidas a baixa tensão de compressão e a tróclea talar foi a representante das articulações sujeitas a alta tensão de compressão. Foi considerada na avaliação das tensões de compressão a análise vetorial das forças atuantes *in vivo* no animal em posição quadrúpede. As cartilagens foram dissecadas e escolhida a face de maior interação nos movimentos articulares e portanto com probabilidade do aparecimento das maiores tensões de compressão. Elas foram lavadas em soro fisiológico e conservadas em câmara úmida a 4°C até que fossem submetidas ao ponto crítico de CO<sub>2</sub> e montadas nos porta-amostras para análise no MFA.

Foi utilizado o microscópio de força atômica (Nanoscope II - Digital Instrum. Inc.) operando em modo altura, com forças calibradas entre 14 e

21 nN, fazendo uso de *cantilevers* triangulares, cujas constantes elásticas eram de 0.12 ou 0.32 N/m. Utilizou-se de frequências de varreduras entre 2 e 4 Hz, atentando para a qualidade das imagens e evitando o aparecimento de ruídos. Parte das cartilagens foram submetidas previamente ao ponto crítico de CO<sub>2</sub>, a uma digestão enzimática por hialuronidase.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados indicam diferenças marcantes nos perfis das superfícies das cartilagens dos cães submetidas a diferentes tensões de compressão. Observa-se no talus, rugosidades de dimensões maiores que no côndilo (Figura 10), com excessão nas varreduras próximas de 10  $\mu\text{m}^2$ , consideradas grandes em função da possibilidade de resolução do



**Figura 10** - Imagem da cartilagem articular de cão submetida a diferentes tensões de compressão, sendo a da esquerda referente a amostra da cavidade glenóide e a da direita o côndilo talar. Pode ser observada a diferença entre as profundidades das rugosidades entre elas pela observação da escala do lado direito de cada imagem.

equipamento (Ver valores na tabela I). Acreditamos que o aparecimento de rugosidades de dimensões menores no talus em relação ao côndilo, se deva a perda de detalhes no instante da varredura com dimensões tão grandes para observação de rugosidades de dimensões tão pequenas.

Pode-se observar na tabela I que há variação entre 45% a 66% entre os valores de rugosidade do talus em relação ao côndilo, dependendo das dimensões das varreduras utilizadas.

A eliminação da camada de ácido hialurônico por digestão enzimática pela hialuronidase parece não ter comprometido as características da organização e orientação das fibrilas de colágeno e da

**Tabela I** - Valores de rugosidade média das cartilagens articulares de cães sujeitas a diferentes tensões de compressão sem e com digestão enzimática por hialuronidase. Valores médios dados em  $\mu\text{m}$  referente a  $n = 25$ .

Cartilagens sem Digestão	Côndilo*	Talus*	Côndilo**	Talus**
Valor médio ( $\mu\text{m}$ )	106,7	162,9	18,2	9,1
Desvio Padrão	22,3	29,1	6,6	3,7
Cartilagens com digestão	Côndilo***	Talus***	Côndilo****	Talus****
Valor médio ( $\mu\text{m}$ )	27,5	50,9	70,4	101,1
Desvio Padrão	5,1	15,4	16,6	22,9

**Obs:** As regiões articulares do côndilo e talus foram submetidas a diferentes dimensões de varredura pelo MFA, onde \* equivale a varredura de 1.500 nm, \*\* equivale a varredura de 10.000 nm, \*\*\* equivale a varredura de 1.000 nm e \*\*\*\* equivale a varredura de 2.400 nm.

matriz de sustentação. **Aspden e Hukins (1989)** comentam que a pressão exercida na região cartilaginosa sob estresse acontece na superfície mais externa, ou seja, no gel de proteoglicanas, passando pela organização das fibrilas de colágeno, transferindo para a matriz onde estão as fibrilas de colágeno organizadas mais fortemente (próximo do osso subcondral). Mas esta forma de organização está claramente ligada aos mecanismos de lubrificação e filtração sobre a superfície articular, a partir do líquido sinovial (**Volpi e Katz, 1991**). Os mecanismos de filtração de macromoléculas de grandes dimensões estão intimamente relacionados com a perda dos mucopolissacarídeos e a penetração de ácido hialurônico nas rugosidades da superfície articular (**Maroudas e Bullough, 1968**).

As dimensões das rugosidades observadas por MFA se ajustam ao modelo de rugosidade de ordem estrutural quaternária (**Longmore e Gardner, 1975**), onde acredita-se ocorrer fenômenos de filtração e concentração do líquido sinovial nas superfícies cartilaginosas sob ação de forças que apareçam a partir da superfície da cartilagem em contraposição.

Este mecanismo parece ser o responsável não só pela filtração de macromoléculas do líquido sinovial com objetivos de lubrificação, e portanto os movimentos contarão com deslizamentos mais suaves, mas também parte da atividade nutricional, especialmente das regiões mais externas ou superficiais. **Hou et al. (1992)** demonstraram o aumento da concentração de macromoléculas próximo da superfície articular, formando um fino filme lubrificante nos sítios de interação das forças de compressão. **Walker et al. (1968)** foi o primeiro a propor a teoria chamada de lubrificação auxiliar (do inglês “boosted lubrication”), cujo componente solvente do líquido sinovial (a água) flui para a cartilagem

articular sob contato. De acordo com a hipótese, juntamente com o mecanismo de filtração (do inglês “entrapment”), a concentração das macromoléculas se deve a rugosidade das superfícies das articulações.

Nossos resultados demonstram que a rugosidade observada na topografia das superfícies articulares está ligada às cargas que estas cartilagens suportam *in vivo*, havendo uma relação direta, ou seja, maior o suporte de carga e estresse articular, maiores as dimensões dessas rugosidades. Provavelmente ocorra um arranjo na organização das fibrilas de colágeno na superfície, uma vez que após a digestão enzimática, as ondulações tiveram dimensões menores que as cartilagens não digeridas, mostrando a importância da camada de proteoglicanas no processo de lubrificação. **Aspden e Hukins (1989)** descreveram a forma de calcular o estresse e a compressão em superfícies hemisféricas e demonstraram que dentro de limite fisiológicos, a fração-volume de colágeno e o grau de orientação das fibrilas tem força suficiente para suportar a pressão na superfície e compara com a pressão exercida pela camada de gel de proteoglicanas nos tecidos não comprimidos.

Pode-se concluir que há um arranjo fibrilar do colágeno nas superfícies das cartilagens que depende das forças atuantes na articulação, portanto determinam o perfil topográfico e aparentemente a adaptação das superfícies articulares. Este arranjo está relacionado a possibilidade de desempenho funcional de melhor qualidade, como nutrição da superfície da cartilagem articular, lubrificação e filtração das macromoléculas.

### **Observação de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) usadas em biotransformação pela Microscopia de Força Atômica<sup>3</sup>.**

Biotransformação são reações catalizadas por enzimas e/ou microorganismos. Este conceito pode ser estendido ao recente uso de anticorpos (Pollack, Jacobs e Schultz, 1986) e RNA (Prudent, Uno e Schultz, 1994) em catálises. A principal aplicação de enzimas e microorganismos em síntese orgânica é a geração de centros quirais a partir de centros pró-quirais.

Tais reações usando compostos organometálicos, são as vezes inviáveis devido ao custo (Kagan et al., 1982). O produto obtido com a reação é uma adequação para a síntese de vários produtos químicos importantes (Mori, 1989), usados em essências (Young e Ward, 1991), nos alimentos (Van der Shaft et al., 1992) e na indústria farmacêutica (Bare et al, 1991).

O fermento de pão (*Saccharomyces cerevisiae*) é um microorganismo que não é caro e os químicos orgânicos não necessitam de conhecimentos específicos para sua manipulação. Geralmente, cepas de *S. cerevisiae* usadas em biotransformação são de origem industriais.

---

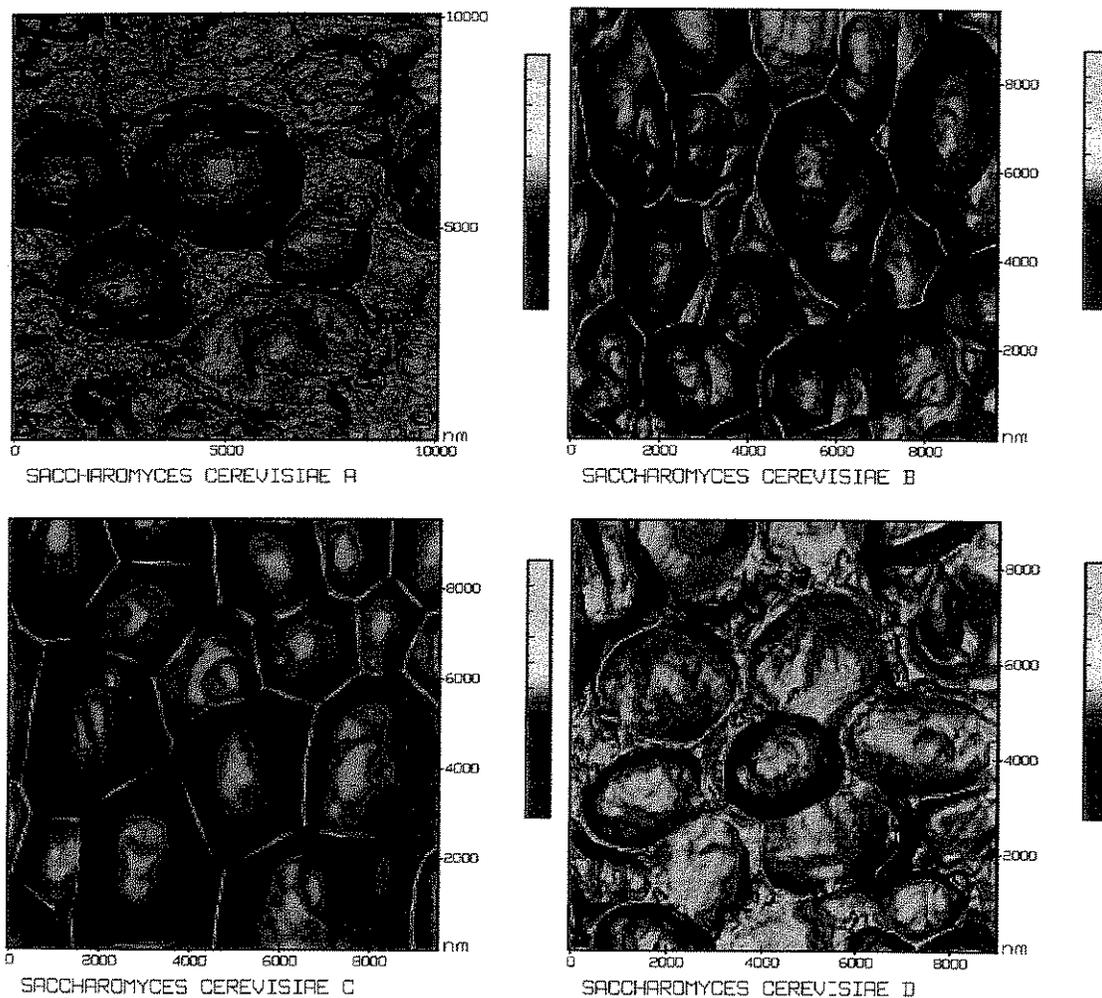
<sup>3</sup> Trabalho publicado por Pereira, RS; Parizotto, NA e Baranauskas, V - Observation of Baker's yeast strains used in biotransformation by atomic force microscopy. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 59(2): 135-143, 1996.

Entretanto, muitas das informações conhecidas acerca da bioquímica destes microorganismos foram obtidos de cepas laboratoriais. Pouco se conhece atualmente da bioquímica das cepas *Saccharomyces* industriais (Russel, Jones e Stewart, 1986).

Recentemente foi demonstrado que células de diferentes origens são bioquimicamente diferentes e podem ter uma grande influência sobre as reações executadas por essas células vivas, produzindo diferentes resultados. Provavelmente existam diversas cepas com aspectos morfológicos diferentes. No sentido de avaliar a morfologia destas células foi empregado o microscópio de força atômica (Binning, Quate e Gerber, 1986). Esta técnica moderna é um equipamento potente que permite o estudo de materiais biológicos com alta resolução e provou ser simples, direta e não destrutiva.

As diferentes cepas de fermentos (*Saccharomyces cerevisiae*) foram obtidos da Fermipan (Holanda), Itaiquara (Brasil), Nishin Seifun Co. (Japão) e Fleischman (Brasil). A suspensão de estoque foi preparada pela adição de 1,0 g de fermento seco e 3,5 g de fermento misturado a 10 ml de água bidestilada e deionizada, conservada em temperatura ambiente. Uma amostra da suspensão foi colocada sobre uma lâmina de vidro e seca por 6 horas em estufa a 28°C. As células foram contadas sob microscopia óptica comum (Carl Zeiss) usando uma câmara de Neubauer. Utilizou-se para as análises, um MFA (*NanoScope II - Digital Instruments Inc., Santa Barbara, CA, USA*) montado com ponta de diamante em “cantilever” de  $\text{Si}_3\text{N}_4$  microfabricado (*Park Scientific Instruments, Mountain View, CA, USA*). As imagens foram tomadas com a cabeça grande, usando o “cantilever” triangular de 200  $\mu\text{m}$ , sendo sua constante elástica de 0.06 N/m. As imagens foram tomadas com frequência de varredura de 8,68 ou 19,53 Hz, em temperatura ambiente (293°K). A calibração da força de

referência da ponta sobre a amostra esteve cerca de 15-18 nN, para prevenir a sua penetração nas células, pois sabe-se que estes microorganismos tem uma membrana mais rígida que a membrana de outras células, mas mesmo assim são razoavelmente moles.



**Figura 11** - *Imagens de Saccharomyces cerevisiae* obtidas por microscopia de força atômica observando conjuntos de células crescidas a partir de diferentes cepas. Pode se evidenciar diferenças na estrutura exterior das membranas das células assim como as suas características morfológicas. (Amplificação de 10.000 X 10.000 nm)

As Figuras 11 a 15 apresentam imagens com as micrografias dos quatro tipos de fermentos (*Saccharomyces cerevisiae*) analisados pelo MFA. Este instrumento foi escolhido porque este tipo de célula pode ser vista sem o uso de métodos convencionais usados em microscopia

eletrônica. Um dos métodos mais comuns usados para preparar biomoléculas para MFA é a imobilização de biomateriais (Yang et al., 1993). Apesar das células poderem ser imobilizadas por meio de atração eletrostática (Roberts et al., 1994) ou no barato suporte de crisotila

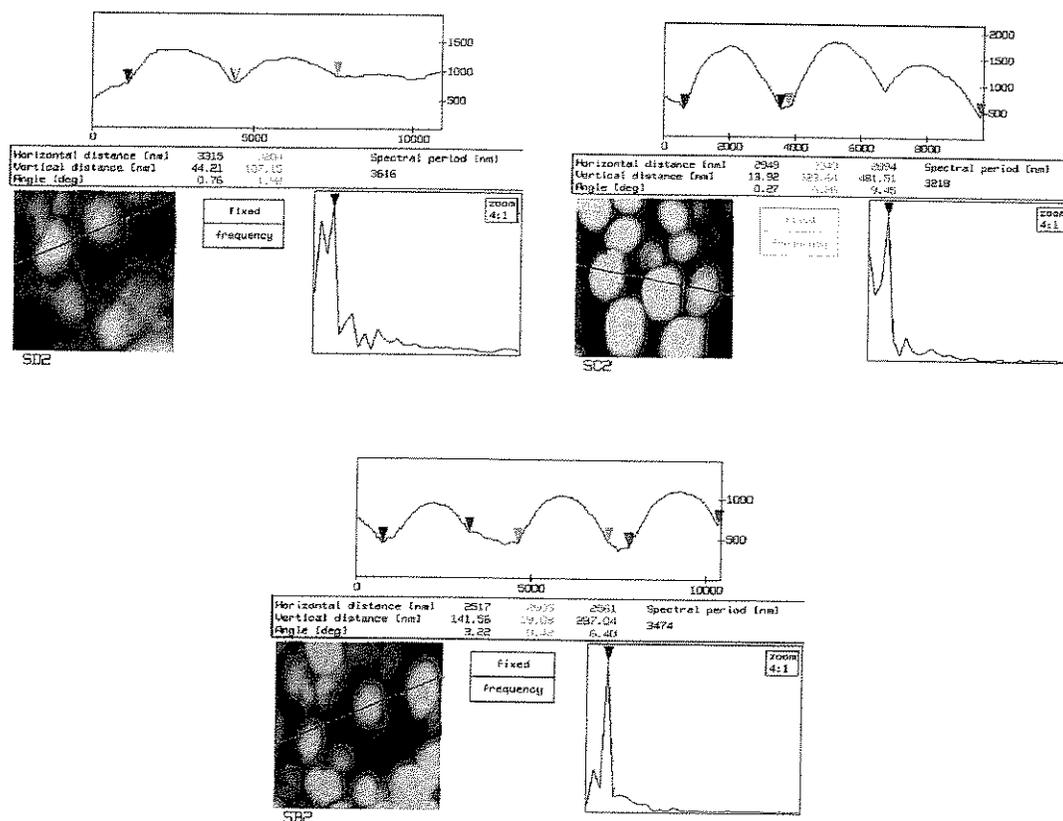
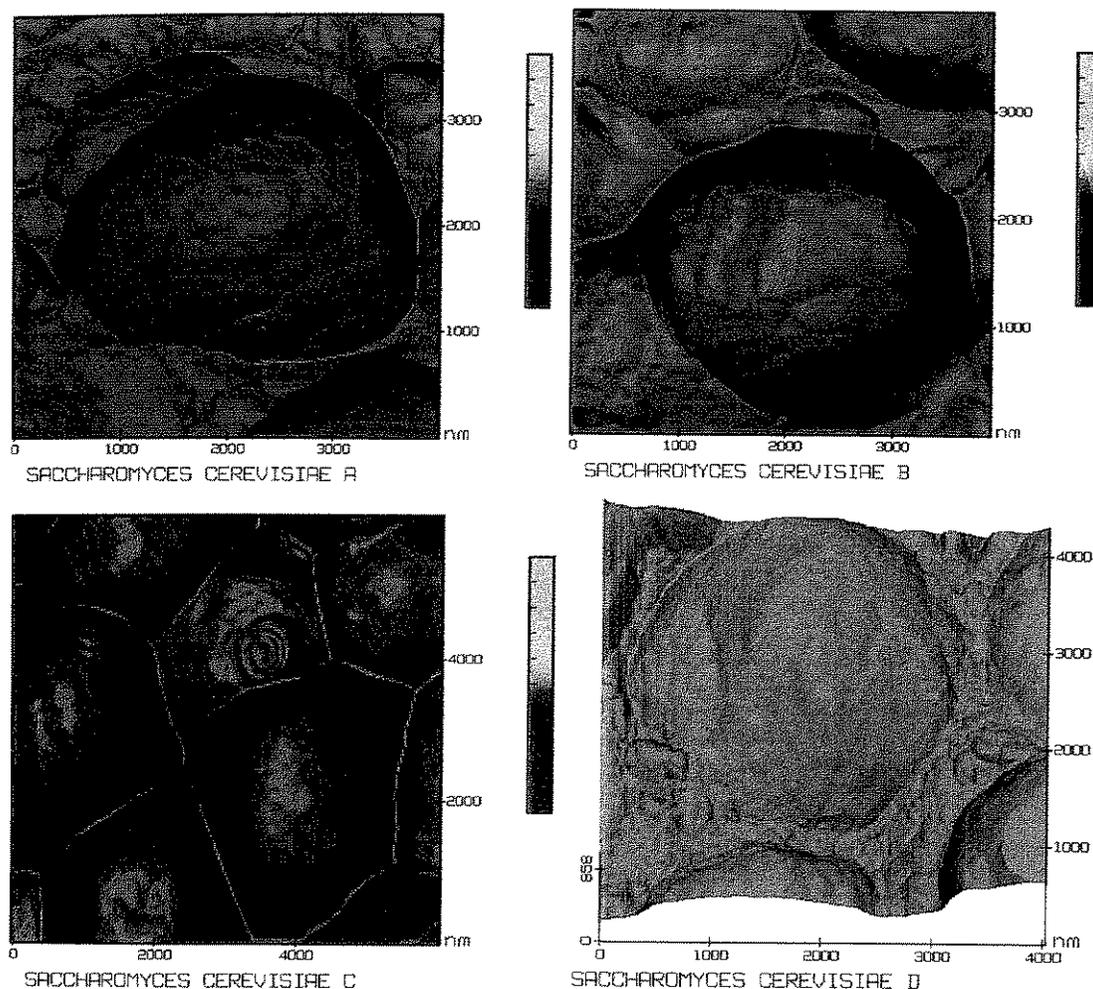


Figura 12 - Imagens das células vivas de *Saccharomyces cerevisiae* das cepas B, C e D mostrando os perfis das secções mostradas na imagem, onde aparece as dimensões das células (cores correspondentes nas medidas abaixo) e as medidas médias (período espectral pela transformada rápida de Fourier) respectivamente de 3.474, 3.218 e 3.616 nm.

(Sorrilha et al., 1992), nós preferimos evitar os métodos descritos. Apenas secamos as células por seis horas a 28°C de temperatura. É importante ressaltar que as células se mantiveram vivas durante o processo de observação, o que não acontece quando se observa as células

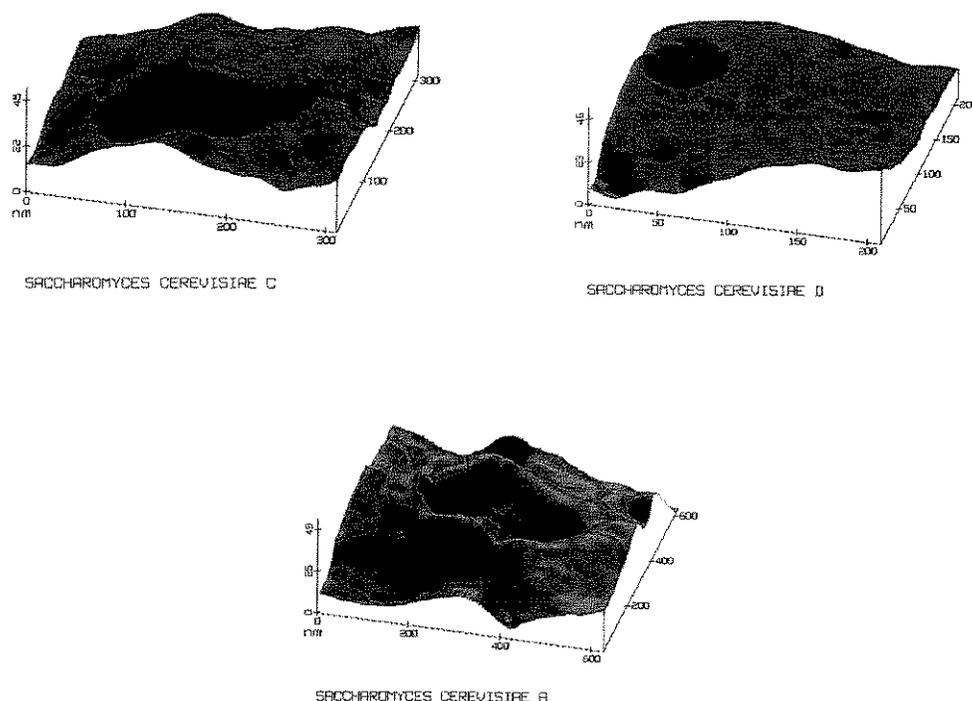




**Figura 13** - *Imagens obtidas por MFA de Saccharomyces cerevisiae de diferentes cepas (A, B, C e D), mostrando individualmente algumas das células e suas características morfológicas.*

sob microscopia eletrônica. Outro aspecto que se deve enfatizar é que com MFA, podemos gerar imagens até de escala molecular, algo impossível em microscopia eletrônica. Apesar destas vantagens, o MFA tem alguns problemas, como por exemplo a deformação da membrana celular causada pela ponta de prova (Morris, 1994). Isso pode ser resolvido ao se utilizar métodos para dar maior rigidez à membrana celular ou quando as células tenham parede celular. É o caso do fermento (*Saccharomyces cerevisiae*), que já conta com uma rigidez natural (Brady et al., 1994),

consequentemente não se torna necessário o uso de métodos para tornar mais rígida a amostra, tornando possível imagens de alta resolução como as apresentadas aqui. Não achamos nenhuma imagem de parede celular realizada com MFA até o presente momento.



**Figura 14** - *Imagens tridimensionais de grande resolução (200 X 200 nm a 600 X 600 nm) obtida por MFA de poros das membranas celulósicas de Saccharomyces cerevisiae. Pode-se observar as diferenças das dimensões dos poros, o que aparentemente tem significado sobre a atividade de biotransformação desta células.*

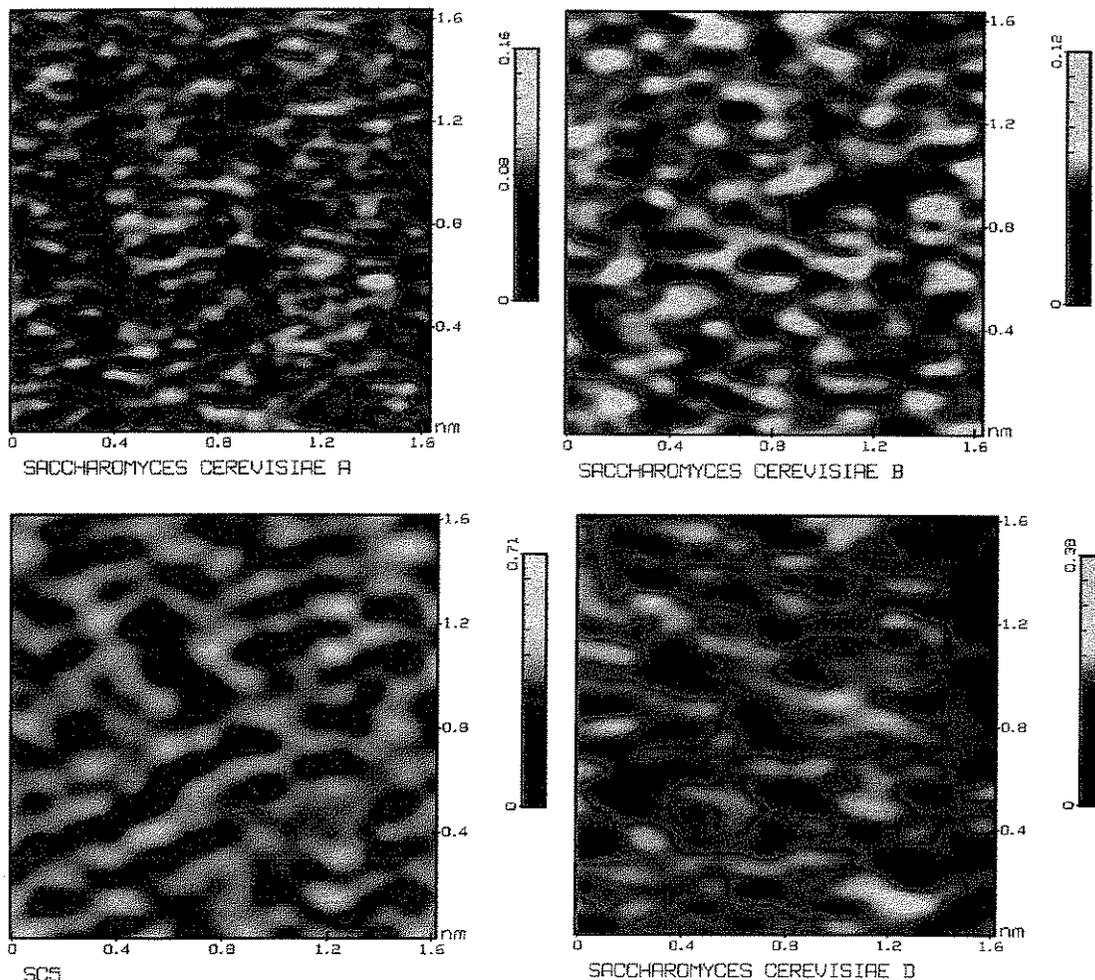
As imagens de *S. cerevisiae* mostradas são consistentes com aquelas observadas em microscopia eletrônica, incluindo dimensões e formato das células (Dziezak, 1987). As figuras de 11 a 13 mostram que estas células tem diferenças morfológicas evidentes. Em todas as imagens, A e C são as cepas holandesa e japonesa, respectivamente, e as imagens B e D são as de origem brasileira.

A superfície externa (parede celular) destes microorganismos é composta de polissacarídeos como manana (31%), quitosan (28,8%) e quitina (2%) (Mori, 1989), que não permitem a passagem de moléculas para fora. O influxo de substrato ocorre por intermédio de poros na parede polissacarídica. O diâmetro destes poros variam de célula para célula e eles podem exercer uma importante influência sobre o ritmo das reações de biotransformação. O diâmetro dos poros das células japonesa e holandesa são tres a quatro vezes maiores que das cepas brasileiras. Provavelmente o influxo de substrato poderia ser na mesma proporção (figura 14). Este pode ser um dos fatores, além da produção de NAD(P)H, que estariam contribuindo para as cepas holandesa e japonesa terem maior poder de redução.

A figura 14 mostra que a cepa japonesa tem uma superfície rugosa e pode ser observada uma protuberância que é uma provável comunicação com a molécula de ATPase com o lado externo ou um “termossensor” que proporcionam a estas células sensibilidade à variações de temperatura externa, como postulado anteriormente (Pereira, 1995). Na figura 16 podemos observar um provável brotamento, se comparado às figuras geralmente observadas com microscopia eletrônica (Dziedzic, 1987). Leves diferenças na morfologia dos brotamentos podem ser devido aos diferentes tipos de cepas utilizadas.

Nossos resultados da figura 15 e 16 demonstram que estes carboidratos são candidatos interessantes para serem estudados pelo MFA. As dimensões e formas destas estruturas podem ser difíceis de serem determinadas por outro método biofísico (Morris, 1994). Na atualidade, é limitado o número de estudos de polissacarídeos com MFA. A camada externa da parede celular de *S. cerevisiae* consiste de manana, polímero do

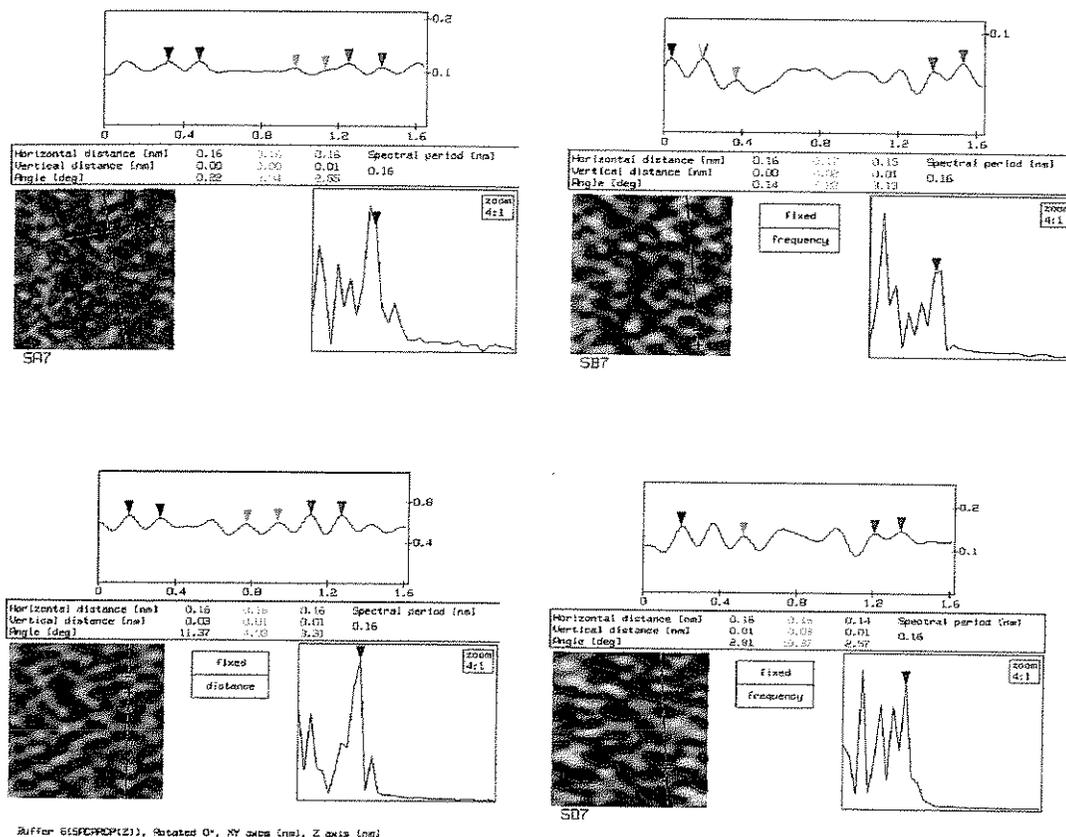
monômero manose, ligado a proteínas (Brady et al.,1994). A figura 15 apresentam micrografias com grande resolução. Em todas as



**Figura 15** - Imagem de resolução submolecular (1,6 X 1,6 nm) da membrana celulósica de *Saccharomyces cerevisiae* mostrando a rede estrutural da membrana, com aparecimento do polissacarídeo manana, das proteínas quitosan e quitina

imagens, as estruturas em foco são prováveis moléculas de açúcar (0,1 nm = 1 Angstrom). Particularmente na figura 15 (superior direito), pode ser visualizada no centro da imagem, uma estrutura que se aproxima de uma “conformação de cadeira” do anel aromático, como é conhecido este tipo de estrutura em bioquímica e química orgânica (Solomons, 1995).

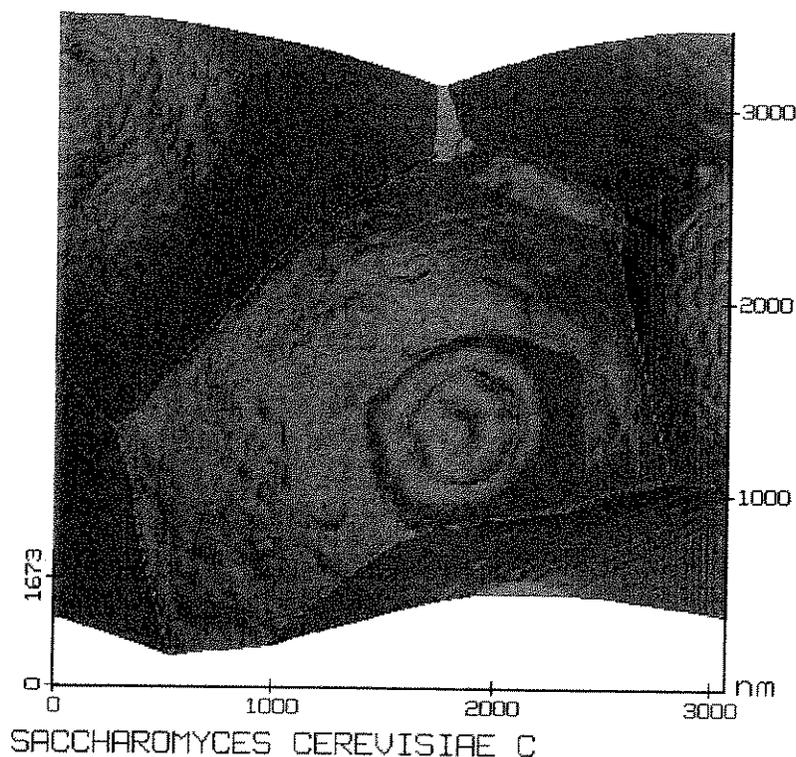
Um dos problemas mais sérios na geração de imagens de alta resolução no ar, como apresentado aqui, é a contaminação da ponta de prova (Morris, 1994). Esta questão se resolve realizando imagens em



**Figura 16 -** Imagens obtidas por MFA da membrana celulósica de *S. cerevisiae* com grande resolução sobre as quais se realizaram medidas das distâncias intratômicas C-C nas diversas cepas, apresentando repetição dos dados (0,16 nm) e provavelmente sobre os mesmos componentes da estrutura da manana.

célula líquida. Não houve contaminação nos nossos experimentos devido ao fato de termos extraído bastante da água presente. O tempo de secagem foi longo o suficiente (seis horas) com uma temperatura não muito elevada (28°C). A parede celular tende a reter alguma água no interior da células por meio das hidroxilas presentes nos polissacarídeos. As células foram hidratadas e continuaram a crescer e dividir-se. Pudemos observar o seguinte fato que demonstra as condições fisiológicas das células. Realizada a análise, foi distanciado a ponta de prova da amostra, mas permaneceu o material no porta-amostras. Após 24 horas, o “cantilever”

estava submerso e aderido na amostra, a ponta foi perdida e claramente houve um crescimento na altura da amostra. Ao microscópio óptico, pudemos observar células em franca divisão.



**Figura 17** - Imagem obtida por MFA de uma célula de *Saccharomyces cerevisiae* em processo de reprodução por brotamento. O broto foi varrido pela ponta de prova do MFA no momento que acontecia sua evolução e a transformação em futura célula isolada (inteira). (Amplificação de 3.000 X 3.000 nm)

A partir das imagens da figura 15, podem ser medidas as distâncias entre dois átomos adjacentes presentes na parede celular destes micróbios. Foi observado uma distância média de 0,16 nm (= 1,6 Angstroms), que é coerente com as medidas realizadas por difração de raios X, para as ligações carbono-carbono, que é de 0,153 nm.

Os resultados confirmam a hipótese inicial de que células providas de diferentes cepas apresentam diversidade morfológica. Entre elas estão o diâmetro dos poros, que podem exercer influência direta no ritmo de reações de biotransformação. Portanto, a técnica de MFA associada com

avaliações bioquímicas podem ser usadas para identificar o tipo de célula mais adequada para o uso em biotransformação, obtendo resultados muito reprodutíveis.

### **Caracterização de Filmes de Langmuir-Blodgett Originário de Polianilina<sup>4</sup>.**

Filmes de Langmuir-Blodgett condutores foram fabricados a partir de polianilina que foi dopada por ácidos. No sentido de otimizar as condições experimentais para a formação de monocamadas de Langmuir estáveis e sua transferência subsequente para substratos sólidos, a polianilina foi dissolvida em dez combinações diferentes de solução de clorofórmio. Foram utilizados os seguintes agentes para processamento: ácido cânfora-sulfônico, ácido dodecil benzenosulfônico e ácido toluenosulfônico, assim como os solventes N-metil pirrolidina e m-cresol. Devido as subfases ácidas empregadas, os filmes depositados foram totalmente dopados, cuja confirmação se deu pela aparição de uma banda polarônica no espectro de absorção de UV-Visível. O pico de absorbância aumentou linearmente com o número de camadas depositadas, indicando que uma multicamada adequada foi formada. Quando analisado pela microscopia de força atômica, os filmes de polianilina mostraram uma

---

<sup>4</sup> Trabalho publicado por Riul Jr., A; Mattoso, LHC; Telles, GD; Hermann, PSP; Colnago, LA; Parizotto, NA; Baranauskas, V; Faria, RM e Oliveira Jr., ON - Characterization of Langmuir-Blodgett films of parent polyaniline. *Thin Solid Films* 284-285: 177-180, 1996.

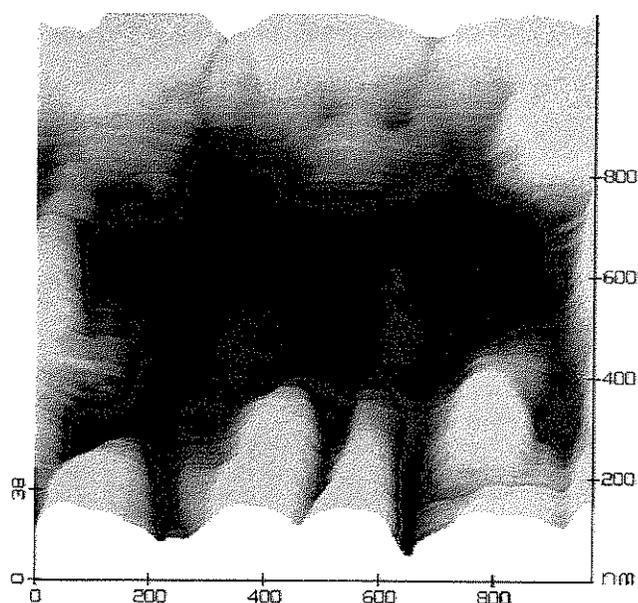
estrutura fibrilar com as dimensões das fibrilas variando de cerca de 60 a 160 nm.

O uso de ácidos funcionalizados para processar filmes de polianilina foi demonstrado por **Heeger et al. (1993)** o que tornou possível a difusão de monocamadas de Langmuir deste polímero em subfases ácidas (**Riul Jr. et al., 1995**). Apesar do sucesso obtido na transferência de multicamadas de Langmuir-Blodgett de polianilina para substratos de vidro, tornou-se claro que a qualidade do filme depende fortemente das condições experimentais adotadas para o processamento do polímero e também da difusão da monocamada. Para otimizar as condições empregadas, boa qualidade de filmes de Langmuir-Blodgett tipo Z foram fabricadas e caracterizadas pela espectroscopia de UV-Visível, microscopia de força atômica e medidas de condutividade elétrica.

A síntese da polianilina foi realizada a partir de excesso de anilina (monômero) de acordo com procedimentos descritos anteriormente (**Matoso, MacDiarmid e Epstein, 1994**). As monocamadas de Langmuir foram difundidas a partir de dez soluções de clorofórmio sobre superfícies de subfases ácidas pH=2 preparadas previamente. O volume de solução espalhada variou de 300 a 1200 µl dependendo do tipo de solução. A velocidade da barreira de compressão foi de 30 mm min<sup>-1</sup>. A pressão da superfície da monocamada foi medida com a placa de Wilhelm enquanto o potencial de superfície foi monitorado com uma ponta de Kelvin. Os filmes foram depositados sobre lâminas de vidro hidrofílica ou ITO (vidro coberto com óxido índio estanho) usando o método de imersão vertical, com uma velocidade de imersão de 0,5 - 5 mm min<sup>-1</sup>. A pressão de superfície foi mantida em 18 mN m<sup>-1</sup> para filmes contendo polianilina com ácido cânfora-sulfônico e entre 12-15 mN m<sup>-1</sup> para os filmes contendo m-

cresol. Os filmes foram montados em uma mesa anti-vibração em sala limpa.

A espectroscopia de UV-Visível dos filmes de Langmuir-Blodgett depositados foram realizados num espectrofotômetro Hitachi U2000 de duplo feixe; as medidas do potencial de superfície foram obtidas com uma ponta Trek, modelo 320; a condutividade foi medida com a técnica das quatro pontas de van der Pauw; as imagens de microscopia de força atômica foram realizadas com modo contato ou repulsivo, usando ponta de prova montada em “cantilever” de  $\text{Si}_3\text{Ni}_4$  com constante elástica de  $0,58 \text{ N m}^{-1}$ , com frequência de varredura de  $4,5 \text{ Hz}$  e uma variação de forças entre  $7$  e  $14 \text{ nN}$ , num MFA *NanoScope II* (Digital).



**Figura 18** - Imagem de um filme de Langmuir-Blodgett de polianilina obtido por Microscopia de Força Atômica. Nota-se estruturas fibrosas organizadas com direção preferencial das fibras. (Amplificação de  $1.000 \times 1.000 \text{ nm}$ )

Os resultados da microscopia de força atômica indicaram estruturas fibrilares com orientação preferencial (figura 18). As fibrilas tinham alturas

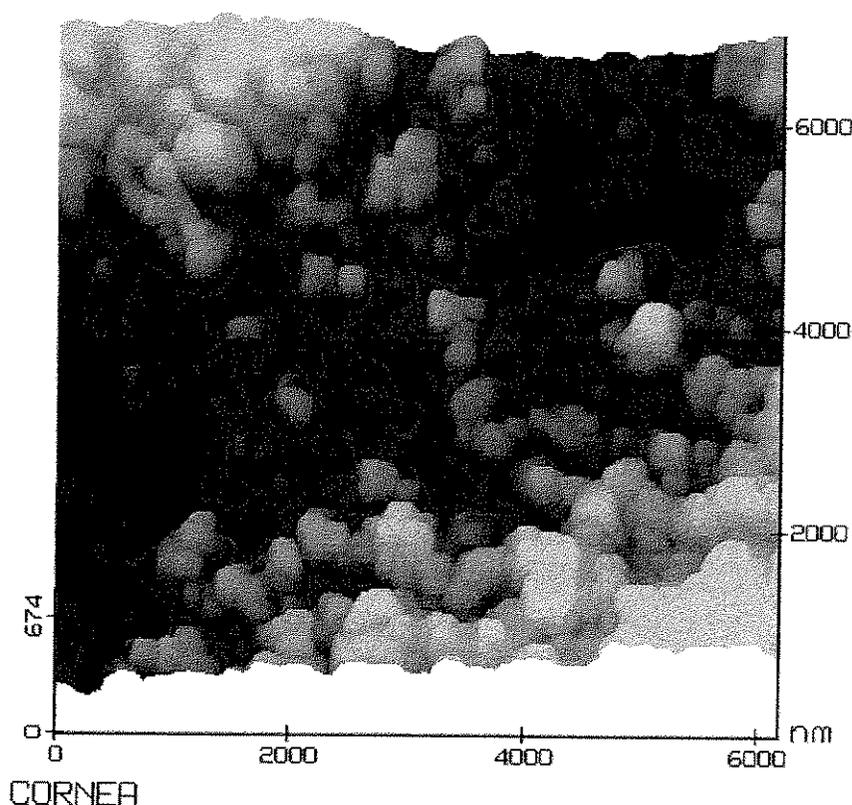
regulares variando entre 60 e 160 nm e também entre 1 e 10 nm, dependendo da região da amostra analisada. Em trabalho prévio, **Mantovani et al. (1990)** realizaram uma análise de filmes de polianilina na forma de livre espalhamento, por intermédio de microscopia de tunelamento de elétrons e encontrou alturas da mesma ordem (de 10 a 140 nm) que os encontrados por nós. A porosidade, entretanto, foi muito maior que aquela encontrada por nós, onde as alturas dos vales variou de 0,5 nm a 70 nm. Estes resultados parecem ser consistentes com filmes de polianilina com morfologia mais compacta e menos porosa quando produzidos com a técnica de Langmuir-Blodgett.

### **Análise nanoestrutural da córnea do rato<sup>5</sup>.**

A estrutura do colágeno admite modificações quando aplicada aos diferentes tecidos. A estas diferentes características biotopoquímicas se atribuiu uma classificação em diferentes tipos de colágeno (**Vidal, 1977a**). Na córnea, o colágeno tipo VI é aquele encontrado mais frequentemente e tem uma distribuição com características definidas por uma angulação entre as diferentes camadas de fibras, de tal maneira que não haja mudança de direção no caminho óptico da luz que entra no olho.

Foram preparadas córneas retiradas de ratos albinos (*Rattus norvegicus*) e umedecidas com soro fisiológico até a fixação da amostra no porta-amostra. Após este procedimento, as córneas foram analisadas

em diferentes tempos de degradação do colágeno, com temperatura ambiente de 21° C e baixa umidade sob microscopia de força atômica previamente calibrado. As forças utilizadas no microscópio foram da ordem de 20 nN. Os ajustes de aproximação da ponta na amostra foram realizados com a maior rapidez possível, para evitar que os processos de degeneração ocorressem.

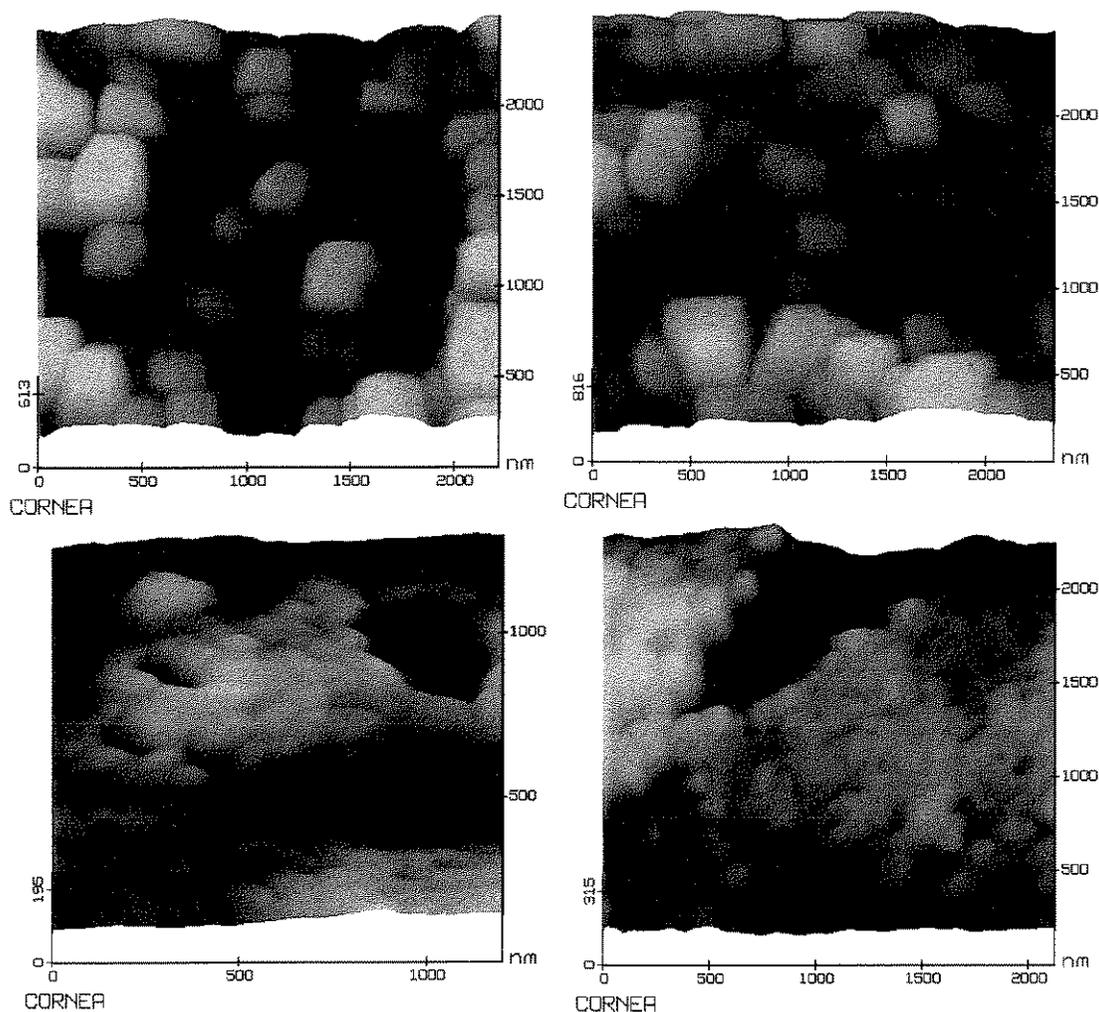


**Figura 19** - Imagem da córnea do rato obtida por microscopia de força atômica com baixa amplificação (6.000 X 6.000 nm) para observação da estrutura organizacional das moléculas de colágeno obtida imediatamente após a retirada da córnea do animal e submetida a hidratação com soro fisiológico durante o período de colagem da amostra no porta-amostras. Pode ser observada a estrutura quadriculada das diversas camadas componentes da córnea.

A imagem que aparece na figura 19, obtida sem muita resolução para microscopia de força atômica, demonstra uma boa organização

<sup>5</sup> Trabalho realizado no laboratório do DSIF, atualmente está sendo preparado para publicação.

estrutural, típica para este tipo de colágeno e nas condições onde ele está sendo aplicado pelo organismo.



**Figura 20** - *Imagens da superfície da córnea de rato submetida a processo de degradação protéica pelo tempo em temperatura ambiente. Observa-se a nanoestrutura organizada no início do processo, antes da degradação (imagens superiores) e a desorganização progressiva a medida da evolução após 25 minutos (imagens inferiores).*

Em condições de manutenção da integridade da estrutura da córnea, por meio de instilação constante de soro fisiológico, as imagens são sugestivas de ordenação das moléculas de colágeno, o que não ocorre ao se deixar de umedecer a membrana. Pode-se observar que se consegue

analisar a estrutura organizada das fibras de colágeno na córnea, com clara disposição em sentido preferencial e regiões mais profundas, relativas a angulação com as camadas subjacentes.

Na figura 20 se observa as alterações decorrentes do processo de degradação das moléculas colagênicas, com o aparecimento claro de grumos e modificações da organização estrutural.

Aos 25 minutos, houve ainda condições de tomada das imagens varrendo a ponta de prova sobre a amostra, mas após este prazo, a ponta passou a apresentar dificuldades de varrer a amostra, dando sinais de aumento da aderência sobre a superfície da membrana.

### **Ação das Micro-ondas de uso doméstico sobre a nanoestrutura da unha<sup>6</sup>.**

A unha tem em sua composição uma série de componentes orgânicos, entre os quais a quitina, o quitosan, gorduras e proteínas como o colágeno.

O colágeno é responsável pela organização da matriz extracelular e perfaz cerca de 30 % da estrutura da unha. Em condições de elevação da temperatura, a molécula de colágeno se funde com as moléculas não colagênicas e forma pontes de hidrogênio em grandes quantidades, no entanto altera a sua organização e características morfológicas.

---

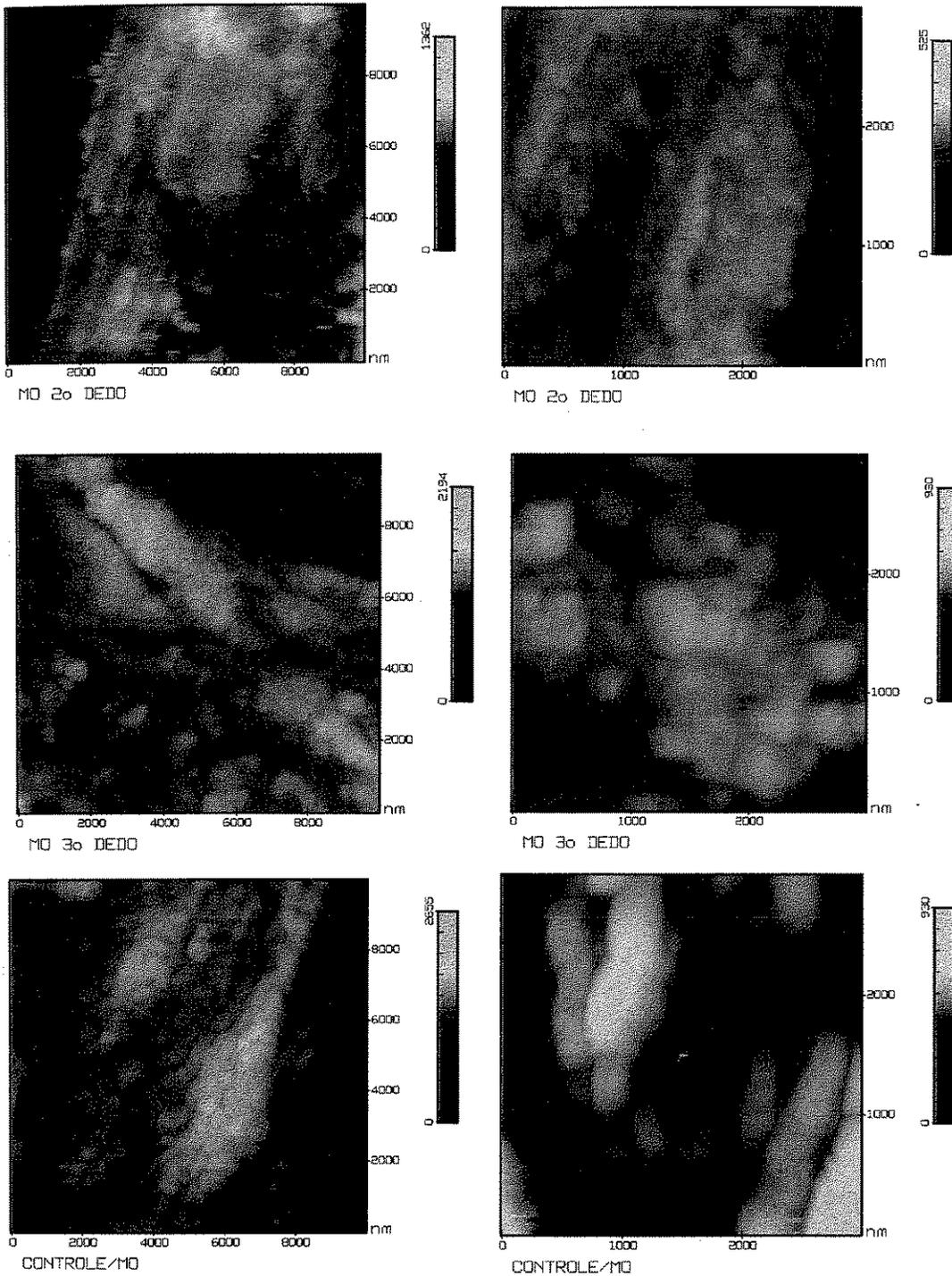
<sup>6</sup> Trabalho realizado no DSIF e ainda não publicado. (Em fase de preparação)

A partir de um caso de exposição acidental de um indivíduo do sexo feminino ao micro-ondas doméstico, cujo sistema de segurança ao abrir a porta não funcionou, obtivemos amostras das unhas deste, ajustamos ao porta-amostras e levamos para análise ao microscópio de força atômica, previamente calibrado. Utilizamos força ajustada para 30 nN e pudemos observar que no material mais duro, o cantilever que melhor se ajustou foi o de constante de mola de 0,54 N/m, de formato triangular, com comprimento de 100  $\mu\text{m}$ .

Na observação das características clínicas da lesão, alguns detalhes chamaram a atenção. O dedo indicador (2º dedo) da mão direita foi o mais atingido, seguindo-se pelo 3º dedo, e pelo 4º dedo, além do polegar (1º dedo) que apresentaram lesões visíveis a olho nu. A mão esquerda da vítima acidental não apresentou alterações visíveis, uma vez que não foi aparentemente exposta. Dentre os resultados clínicos das lesões, observou-se a presença de lesão do nervo mediano e ulnar, além das queimaduras de pele. Não se pode precisar o tempo de exposição.

Na microscopia de força atômica, fizemos análise das unhas de todos os dedos, além da unha do pé da mesma pessoa, para termos um controle de uma parte não exposta as micro-ondas.

São apresentadas a seguir algumas das imagens obtidas, comparando-as com a unha do pé, que serviram como controle.



**Figura 20** - *Imagens da estrutura morfológica de unhas de um indivíduo exposto acidentalmente a micro-ondas doméstico, mostrando as modificações como fusão das fibras e desorganização aparente das moléculas que compõem a unha (4 imagens superiores). Na parte inferior estão as imagens de uma unha do mesmo sujeito não exposta, que serviu como controle. As imagens da esquerda são de menor resolução (8.000 X 8.000) e da direita de maior resolução (3.000 X 3.000).*

Podemos notar o grau de degradação térmica que sofreram as moléculas de colágeno na superfície da unha, assim como outras moléculas não colagênicas aí presentes. Quando comparamos a unha controle (imagens de grande e pequena ampliação) com aquelas que sofreram a influência das microondas, é aparente a modificação da forma da proteína, dando uma noção de aumento na frequência de aparecimento desta estrutura bioquímica na sua forma enovelada, globular. Difere portanto da forma fibrilar característica do colágeno em condições naturais. Desta forma, se observam muitas alterações no arranjo estrutural, reduzindo as possibilidades de arranjos organizados e fibrilares, com feixes compactos de fibrilas.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Serão descritos a seguir quais as características dos animais de experimentação empregados no trabalho, os procedimentos para análise das amostras colhidas, incluindo os métodos de preparo e os ajustes dos equipamentos utilizados.

### **ANIMAIS**

Foram utilizados 48 ratos albinos (*Rattus norvegicus*) da raça Wistar, machos, com três meses de idade e 250 gramas de peso corporal, provenientes do Biotério Central da UNICAMP e acomodados no Biotério do Departamento de Biologia Celular. Os animais receberam água e ração balanceada "*ad libitum*" durante todo o período experimental, assim como se mantiveram em condições de temperatura e iluminação controladas, em ciclo de 12 horas e ambiente sob limpeza constante.

## CIRURGIA

Os animais foram submetidos a uma tenectomia (retirada de parte do tendão) em procedimento cirúrgico asséptico, sob anestesia por inalação por éter etílico, quando se retirou cerca de 6 mm. do tendão de Aquiles do lado esquerdo, suturando a pele com fio catagute #3.0, reabsorvível. Após o procedimento cirúrgico, os animais recuperados da anestesia retornaram às gaiolas e se aguardou diferentes tempos de recuperação da lesão tendinosa, sendo o sacrifício dos animais após 7, 14, 21 e 28 dias.

## TRATAMENTOS

Foram utilizadas três doses de Laser HeNe,  $\lambda = 632.8$  nm., com potência de 6 mW, diâmetro do feixe de 1 mm. e emissão contínua, sendo as densidades de energia de 0.5, 5.0 e 50.0 J/cm<sup>2</sup>. Os tratamentos foram realizados em dez sessões durante 12 dias, com um intervalo de 2 dias após a quinta sessão, diariamente, por fotoestimulação transcutânea,

irradiando a região cicatricial na forma de varredura. O início das aplicações de Laser ocorreu 24 horas após a tenectomia.

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais. Um grupo controle, sobre o qual foram realizados todos os procedimentos de tratamento, mas o equipamento de laser estava desligado. Os outros três grupos foram chamados de experimentais, tendo como objetivo para este procedimento a análise das diferentes doses de laser (0.5, 5.0 e 50.0 J/cm<sup>2</sup>).

## SACRIFÍCIOS

Os animais foram sacrificados 7, 14, 21 e 28 dias após a tenectomia, sujeitos a observações a cada dois dias sobre o estado da recuperação funcional, especialmente os movimentos da pata operada durante a marcha. O sacrifício se deu por inalação excessiva de éter etílico, realizado após a retirada das amostras de tendões por dissecação e lavados em solução fisiológica (solução salina a 0.9 %), para se submeterem aos diferentes tipos de preparo: para microscopia eletrônica de varredura, para microscopia de força atômica ou para espectroscopia por infravermelho (FT-IR).

## PREPARO PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Para uma avaliação qualitativa do arranjo, orientação e continuidade das fibras de colágeno, os tendões dissecados e lavados foram submetidos a uma solução de glutaraldeído a 3% por 24 horas. O material foi submetido a criofratura após imersão em Nitrogênio líquido, respeitando

os planos paralelos e perpendiculares ao longo do eixo longitudinal dos tendões. O material fraturado foi a seguir, desidratado em uma série graduada de Etanol (50 a 100%) e secas até o ponto crítico de CO<sup>2</sup> (West Germany). O material seco foi montado em cilindros de Alumínio e foram metalizados por lançamento de partículas (conhecido do inglês "spoutering") de Ouro. A observação das superfícies expostas por fratura deu-se com o Microscópio Eletrônico de Varredura **Stereoscan DM-9** (Cambridge Instruments Ltd.), com uma tensão de 25 KV.

#### LEITURAS NO MICROSCOPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA

As amostras foram colocadas na câmara de leitura e foi feito vácuo para o início das leituras, tendo sido selecionado sempre as regiões de maior organização nas amostras, com aumentos de 2.200, 5.400 e 10.800 vezes, caminhando da menor resolução para as maiores.

#### PREPARO PARA MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

Os tendões retirados sob as mesmas condições de tratamentos, foram separados após a lavagem em solução fisiológica e foram preparados como lâminas para microscopia óptica. Foram desidratadas em soluções de concentrações crescentes de álcool etílico chegando até álcool absoluto (100%), e posteriormente as amostras foram diafanizadas em Xilol por cerca de 15 minutos, até que ficassem suficientemente transparentes. Após esta etapa, os tendões eram colocados em blocos de parafina para histologia, e deixado para solidificação por uma noite.

Os blocos foram devidamente identificados e a partir deles foram montados em micrótomo (**R. Jung-Heidelberg**) para sofrerem cortes de 7 micrômetros. Foram colados com albumina e ordenados nas lâminas histológicas de vidro. Em seguida foram desparafinizadas em xilol, reidratando as peças em seqüências decrescentes de álcool etílico, e lavando as lâminas em água corrente por 30 minutos. Nenhum tipo de corante foi introduzido nas lâminas, uma vez que sabe-se que podem modificar a estrutura das moléculas, especialmente do colágeno (**Vidal et al., 1975**).

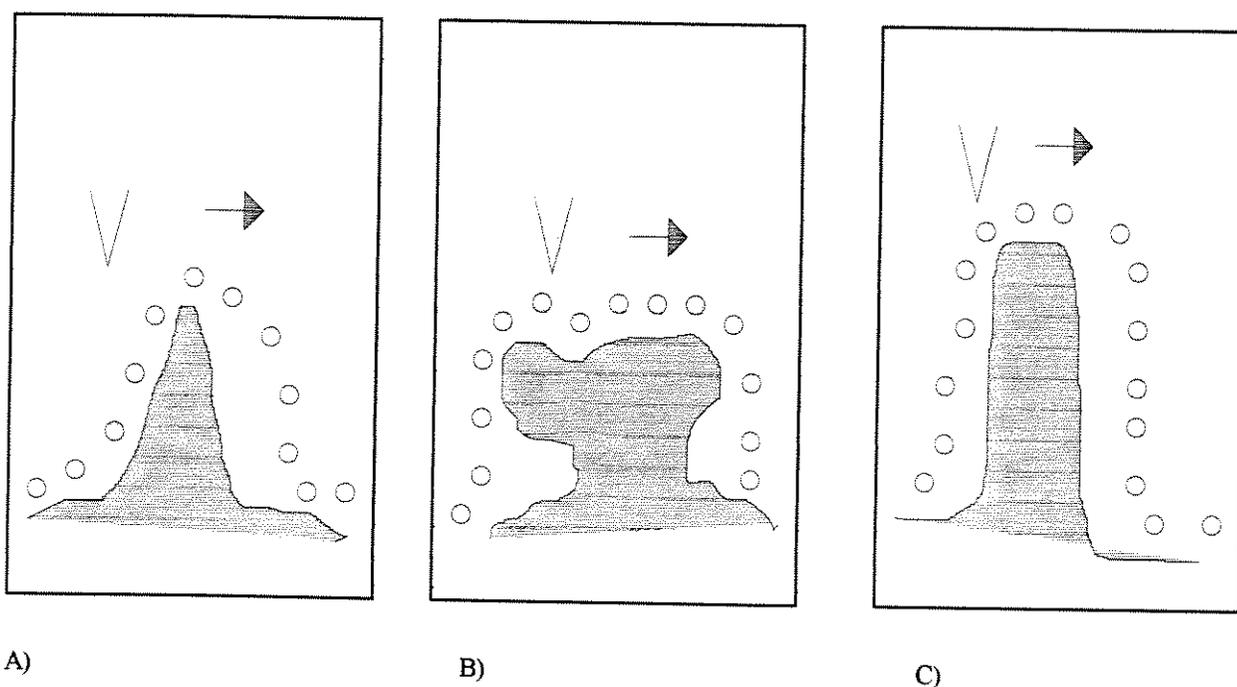
As lâminas histológicas não cabem na cabeça de leitura do microscópio de força atômica, e portanto foram cortadas com videa em tamanhos de 1 X 1 cm e coladas no porta-amostras metálico (disco).

Antes da análise de cada amostra, se reidratava o tendão para que ficasse o mais próximo possível da sua forma natural, por meio de uma gota de água destilada sobre o corte do filme do tendão. Após a retirada do excesso de água, os tendões ficavam amolecidos, com uma consistência semelhante àquela encontrada em condições biológicas. É importante fazer cortes no sentido longitudinal devido ao fato de facilitar as observações da organização das fibras, a relação entre elas e portanto a ordem molecular, dependendo da resolução. Fatiando as amostras com estes cortes, temos a possibilidade de observar, mesmo com um sistema de análise de superfície, estruturas nas regiões mais internas dos tendões e assim caracterizar as condições de organização interna das fibras, fibrilas, microfibrilas e moléculas do tropocolágeno.

## LEITURAS NO MICROSCÓPIO DE FORÇA ATÔMICA

Após a calibração do microscópio, escolhia-se cantilevers com as melhores pontas (mais pontiagudas) para ajustes do feixe de laser sobre o cantilever, selecionando os melhores valores de ganho. Em seguida, se fazia o ajuste da paridade do feixe nos fotodetectores, utilizando-se o valor de -2,0 V.

As leituras foram realizadas com freqüências de varredura entre 1 e 4 Hz e forças na faixa de 10-14 nN.



**Figura 22** - Erros de medida de MFA quando analisados materiais com diferentes características de superfície: (a) dificuldade com amostras pontiagudas; (b) dificuldades com amostras muito irregulares e rebordos superficiais maiores que o seu pedículo; (c) dificuldades de interpretação em materiais com arestas muito abruptas.

É muito importante tomar certos cuidados ao se realizar as medidas com MFA. Sabe-se que o potencial de análise deste recurso é

muito grande, proporcionando grandes resoluções nas imagens, mas é fundamental interpretar de forma consciente as análises realizadas. Na figura 22 são mostradas algumas medidas que necessitam de adequada interpretação para não haver erros, levando em conta as características da técnica e a adequação das medidas aos valores reais.

É altamente recomendável que o pesquisador que se enveredar para análise de imagens de MFA tenha em mente as limitações que a técnica impõe para observação dos diferentes materiais, fazendo os ajustes necessários para evitar tais artefatos da técnica e obter leituras mais confiáveis tecnicamente.

As leituras são possíveis quando as regiões a serem analisadas são acessíveis à geometria da ponta do cristal. As condições de calibração do equipamento são de extrema importância, já que depende disso para que haja uma boa performance. Além da calibração, as condições do cantilever como limpeza e qualidade da ponta, assim como a escolha adequada do tipo (constante de mola) de cantilever para cada análise a ser realizada pode ser fatores que tenham interferência direta na qualidade das imagens.

Outro fator que deve-se observar seria a condição de limpeza e características da amostra a ser analisada. Amostras com poeira ou contaminadas com algum detrito podem causar dificuldades na análise e interpretação dos dados.

Em altas resoluções, como nos níveis submoleculares e atômicos, a isolamento acústica contra os ruídos externos é procedimento primordial para que o sistema funcione em perfeitas condições e que as forças resultantes sejam aquelas reais e não haja destruição de ligações interatômicas da amostra.

## ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO (FT-IR)

Os mesmos cortes utilizados para as leituras de MFA também puderam ser aproveitados para a realização de FT-IR. Portanto, a espessura do filme utilizado para as análises foi de 7  $\mu\text{m}$ , de forma semelhante a **Wong, Wong e Fung (1993)**. Foram realizadas as leituras no espectrômetro FT-IR mod. 16 PC da PERKIN-ELMER, acoplado ao microscópio óptico Olympus S2-PT. Após escolha sempre das melhores regiões encontradas na lâmina, feita pelo microscópio óptico acoplado ao FT-IR, ajustou-se a abertura da câmara de leitura para 1mm X 1mm e escolheu-se a resolução de 8  $\text{cm}^{-1}$ . Foi realizada a leitura da lâmina de vidro coberta com albumina para determinar o espectro de fundo e subtraí-lo das leituras subsequentes. Foram realizados 160 varreduras por amostra para se obter a média dos espectros. Foram realizadas análises por transmitância e reflectância. Nas leituras por reflectância, utilizou-se um espelho sob a lâmina com objetivo de aumentar o grau de reflexão.

Os espectros sofreram um processo de deconvolução por um fator de 10 vezes e são apresentados entre os valores de 1800 e 1000  $\text{cm}^{-1}$ . Alguns tratamentos matemáticos entre os valores de pico observados foram realizados para obtenção de dados correlacionados dentro do próprio espectro.

## **RESULTADOS**

Serão apresentados a seguir os resultados relativos a microscopia eletrônica de varredura, microscopia de força atômica e espectroscopia por infravermelho (FT-IR), descritos separadamente em tópicos para melhor visualização e detalhamento.

### **MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.**

Foram realizadas fotomicrografias eletrônicas com aumentos padronizados de 2.200, 5.400 e 10.800 vezes nas quais foram analisadas as

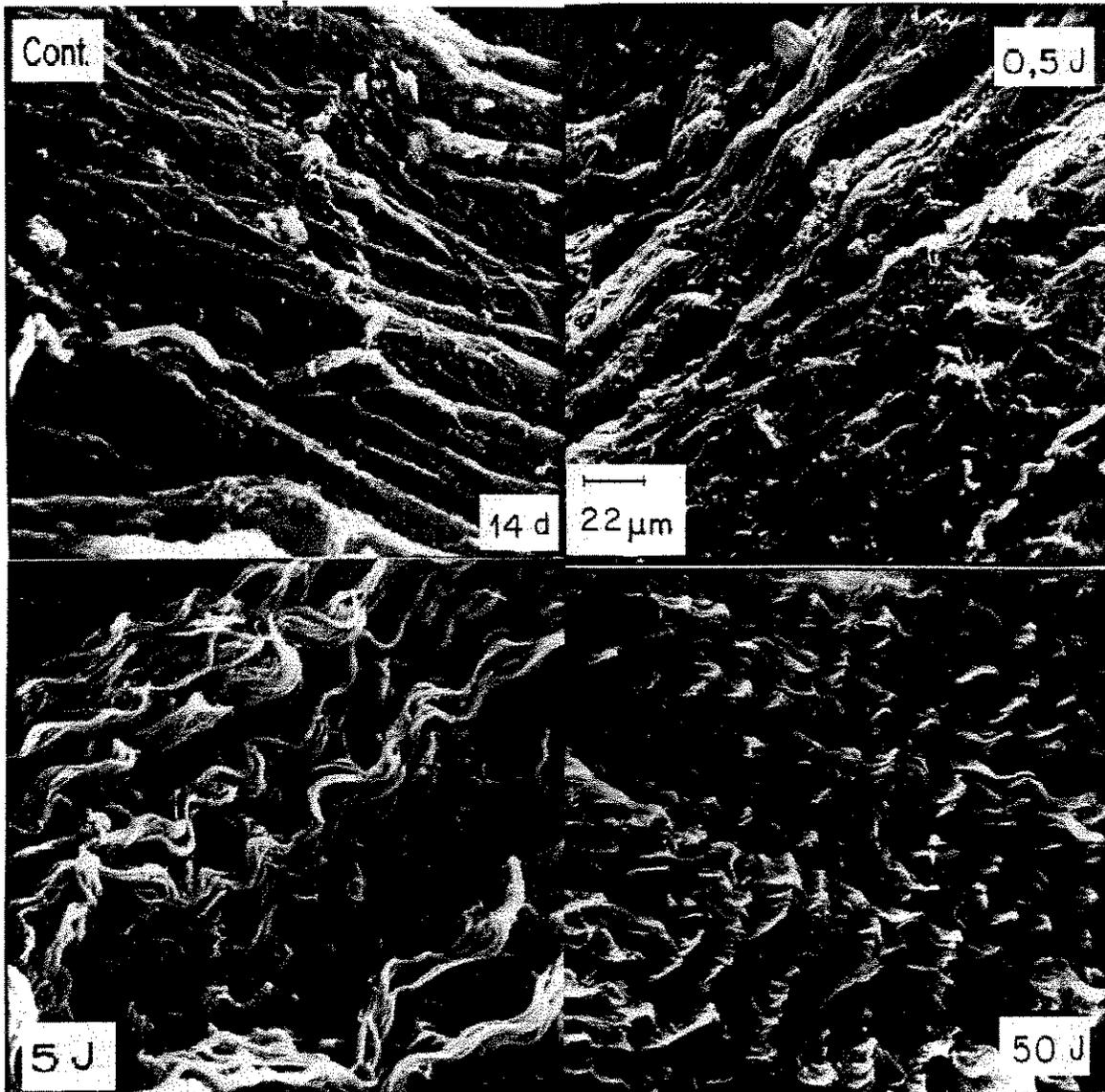
características de organização estrutural, dimensões das fibras de colágeno, morfologia de agregação das fibras em feixes e celularidade.

Na figura 23 podemos observar as fotomicrografias com ampliação de 2.200 vezes para o grupo de animais tratados com laser e sacrificado aos 14 dias. Podemos observar diferenças marcantes na organização direcional e alinhamento das fibras de colágeno ao longo do eixo longitudinal do tendão quando comparamos as diferentes doses de laser empregadas.

Ao se observar as imagens de colágeno com ampliações maiores (5.400 e 10.800 X, nas figuras 26 e 27), ainda no grupo sacrificado no 14º dia, podemos notar as frequências diferentes das ondulações no registro axial, apresentando menor quantidade de fibras transpassando, além de notar uma diferença importante nas dimensões das fibras e na formação dos feixes, cujos arranjos são notadamente com maior número de fibras por feixe na dose de 0,5 e 5 J/cm<sup>2</sup> em relação ao controle e ainda melhorando o agrupamento das fibras na dose de 5 J/cm<sup>2</sup>, mas com uma pequena redução neste parâmetro quando comparada à fotomicrografia dos animais com dose de 50 J/cm<sup>2</sup>, porém superior quando comparada à dose de 0,5 J/cm<sup>2</sup>. Houve a observação também de maior número de fibroblastos ao longo da matriz colagenosa. Exemplo disso está na fotomicrografia na figura 28.

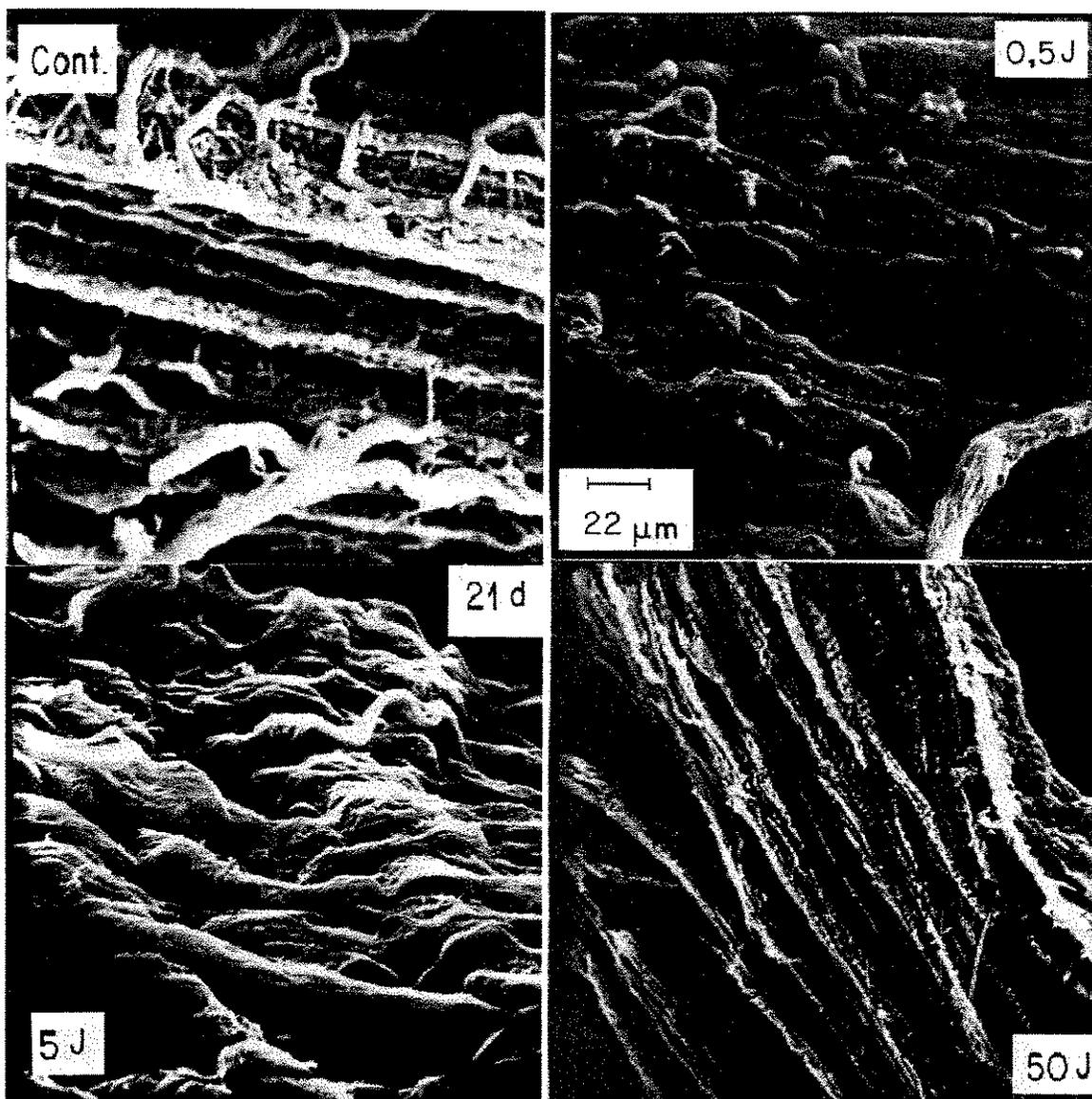
As dimensões das fibras que compõem os feixes de colágeno dos tendões foram maiores nos animais tratados com laser, especialmente naqueles com dose de 5 J/cm<sup>2</sup> de densidade de energia, aparecendo também feixes de dimensões maiores e mais ordenados, com poucas fibras fora do registro axial, além de um maior número de fibras por feixe. Um detalhe que pode ser observado no 14º dia com os maiores aumentos, ainda com a

microscopia eletrônica de varredura, está relacionado com o aparecimento de enrolamentos das fibrilas dentro do próprio feixe.

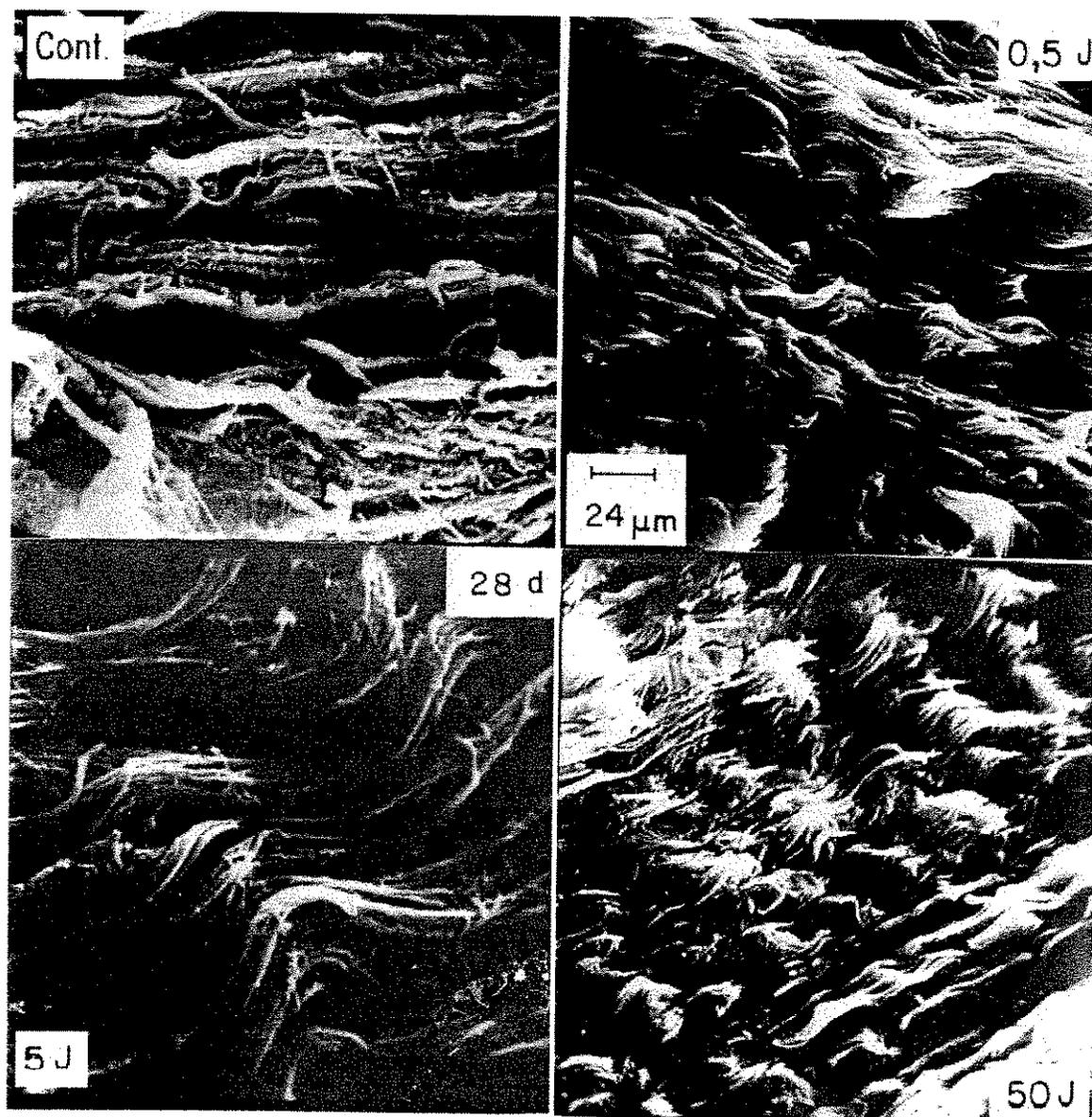


**Figura 23** - Fotomicrografias eletrônicas de varredura de tendões de rato após 14 dias de recuperação da tenectomia. A prancha mostra no canto superior esquerdo a fotomicrografia do representante do grupo controle, seguidos pelos representantes dos grupos fotoestimulado por laser de HeNe com doses de  $0,5 \text{ J/cm}^2$ ,  $5 \text{ J/cm}^2$  e  $50 \text{ J/cm}^2$ . Existe já evidências de evolução da morfologia de ondulações das fibrilas de colágeno com períodos diferentes relativo as diferentes doses de fotoestimulação e o controle que praticamente não apresenta esta tipologia aos 14 dias de reparação. (A barra mostra a ampliação da fotomicrografia)

Ao observarmos a figura 24, cujas fotomicrografias apresentam as imagens dos tendões dos animais sacrificados no 21º dia após a lesão, com aumentos de 2.200 X, podemos notar diferença importante entre os



**Figura 24** - Fotomicrografias eletrônicas de varredura de tendões de rato após 21 dias de recuperação da tenectomia. A prancha mostra no canto superior esquerdo a fotomicrografia do representante do grupo controle, seguidos pelos representantes dos grupos fotoestimulado por laser de HeNe com doses de  $0,5 \text{ J/cm}^2$ ,  $5 \text{ J/cm}^2$  e  $50 \text{ J/cm}^2$ . A ordenação dos feixes no sentido do longo eixo é a diferença mais marcante. (A barra mostra a ampliação da fotomicrografia)



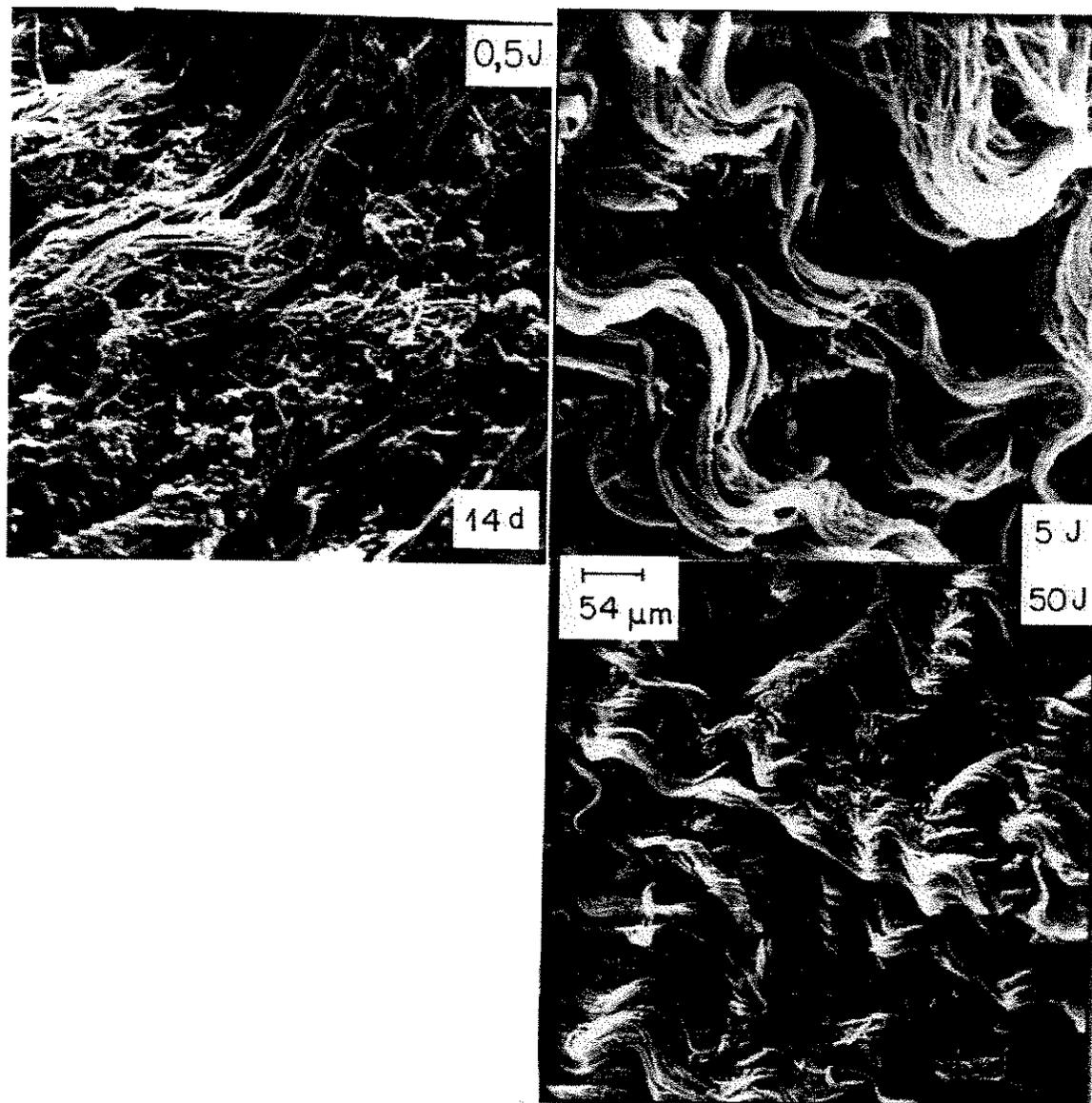
**Figura 25** - Fotomicrografias eletrônicas de varredura de tendões de rato após 28 dias de recuperação da tenectomia. A prancha mostra no canto superior esquerdo a fotomicrografia do representante do grupo controle, seguidos pelos representantes dos grupos fotoestimulado por laser de HeNe com doses de  $0,5 \text{ J/cm}^2$ ,  $5 \text{ J/cm}^2$  e  $50 \text{ J/cm}^2$ . Pode ser observada a diferença entre os diversos grupos relacionado com a dimensão dos feixes de colágeno e a morfologia de ondulações e frisados das fibrilas. (A barra mostra a ampliação da fotomicrografia)

tendões. No tendão do grupo controle pode ser visto grande quantidade de fibras fora do registro axial, transpassando para outros feixes, com direção diferente daquela esperada para este tipo de estrutura. Nas fotomicrografias dos grupos tratados com laser com as diferentes doses podemos observar a presença de poucas fibras fora do registro axial, os feixes mais agrupados e organizados, além do aparecimento das ondulações e enrugamentos, mas não tão frisados como nos animais sacrificados no 14º dia. No tendão controle não se observa ondulações na maioria das fibras enquanto que com 0,5 e 5 J/cm<sup>2</sup> os frisados aparecem, com frequência maior e mais evidentes no grupo tratado com 5 J/cm<sup>2</sup>. O grupo tratado com 50 J/cm<sup>2</sup> pode ser observado um frisado com frequência bastante alta, que pouco aparece neste aumento, mas pode ser visto nas fotomicrografias com maiores aumentos (figuras 26 e 27).

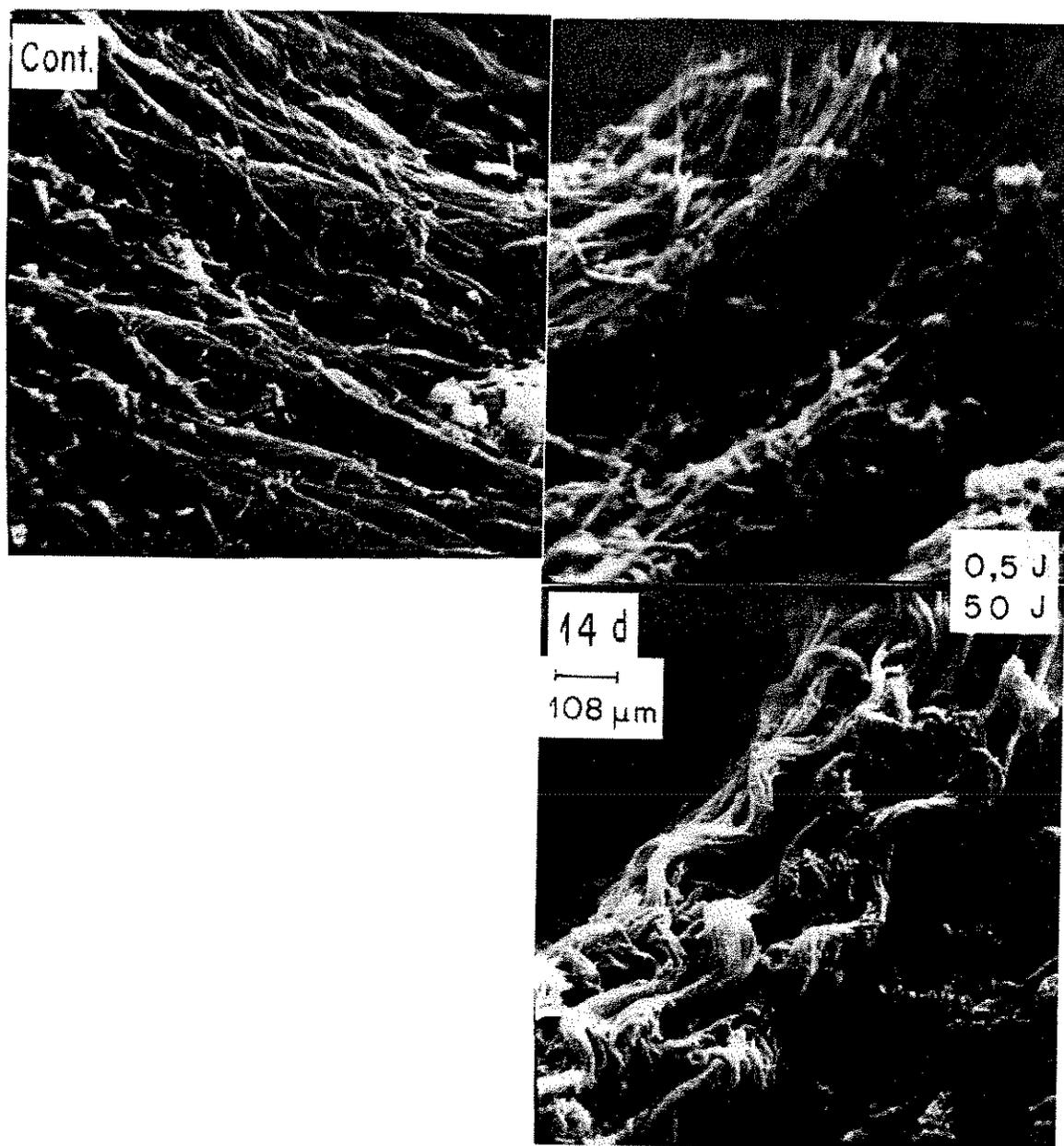
No 28º dia após o sacrifício dos animais, podemos observar pela microscopia eletrônica de varredura (figura 25) o início do aparecimento das ondulações e frisados no grupo de animais controle, mostrando que inicia-se o processo de maturação das fibras colágenas, para estes animais neste momento. Por outro lado, os grupos tratados com laser nas diferentes doses mostram os frisados em estágio bastante adiantados, aparentemente mais preparados para atividades funcionais.

Nas superfícies expostas pela criofatura dos tendões, apareceram frisados, ondulações ou enrugamentos (do inglês, "crimped morphology"), típicos de fibras maduras e sujeitas a tração mecânica. As frequências dos frisados foram se diferenciando no curso do processo de maturação das fibras, como se pode notar nas fotomicrografias nos diferentes tempos de evolução da reparação. Esta morfologia foi mais evidente com as doses de 5

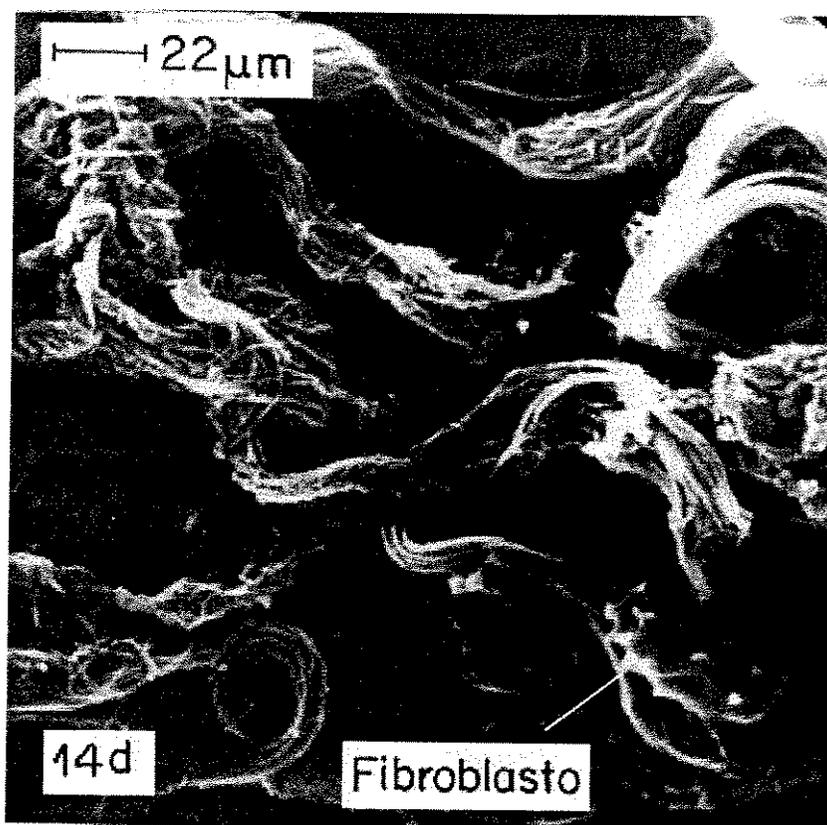
$J/cm^2$  de laser quando comparadas ao mesmo tempo de evolução da reparação tecidual.



**Figura 26** - Fotomicrografias eletrônicas de varredura de tendões de rato após 14 dias de recuperação da tenectomia. A prancha mostra a comparação do controle com as diferentes doses de fotoestimulação por laser de HeNe ( $0,5 J/cm^2$ ,  $5 J/cm^2$  e  $50 J/cm^2$ ) observada com aumento médio, demonstrando as diferenças entre as dimensões das fibrilas e dos feixes, assim como a aparência frisada (ondulações) do colágeno. (A barra mostra a ampliação da fotomicrografia)



**Figura 27** - Fotomicrografias eletrônicas de varredura de tendões de rato após 14 dias de recuperação da tenectomia. A prancha mostra a comparação do grupo controle com as diferentes doses de fotoestimulação por laser de HeNe ( $0,5 \text{ J/cm}^2$  e  $50 \text{ J/cm}^2$ ), observada com grande aumento, demonstrando as diferenças entre as dimensões das fibrilas e dos feixes de colágeno. (A barra mostra a ampliação da fotomicrografia)



**Figura 28** - Fotomicrografia eletrônica de varredura do tendão do rato após 14 dias de recuperação da tenectomia fotoestimulado por laser de HeNe com dose de  $50 \text{ J/cm}^2$ . Observa-se a presença de um fibroblasto bem evidente e com grande carga de material fibroso (espículas na membrana) realizando excitose dos monômeros de colágeno. (A barra mostra a ampliação da fotomicrografia)

A morfologia de ondulações não apareceu nos animais controle aos 14 e 21 dias, iniciando o seu aparecimento nos controles apenas em pequenas quantidades apenas aos 28 dias no curso da evolução temporal.

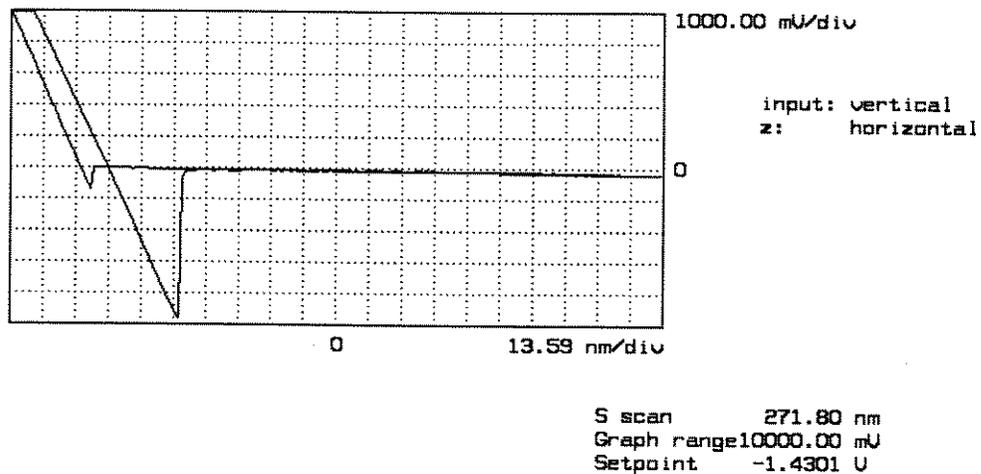
Cabe ressaltar dois aspectos nos resultados apresentados para microscopia eletrônica de varredura. Um se refere à análise das diferentes doses de tratamento pelo laser comparadas ao controle sem tratamento, e o outro decorrente do curso da evolução temporal do processo de reparo tecidual, onde se demonstrou a interferência no curso da reparação por parte do tratamento proposto.

A análise do conjunto de dados obtidos por diferentes técnicas de observação poderia proporcionar consistência e a reprodutibilidade ou corroboração das observações. Para isso se utilizou outras técnicas de análise do mesmo processo.

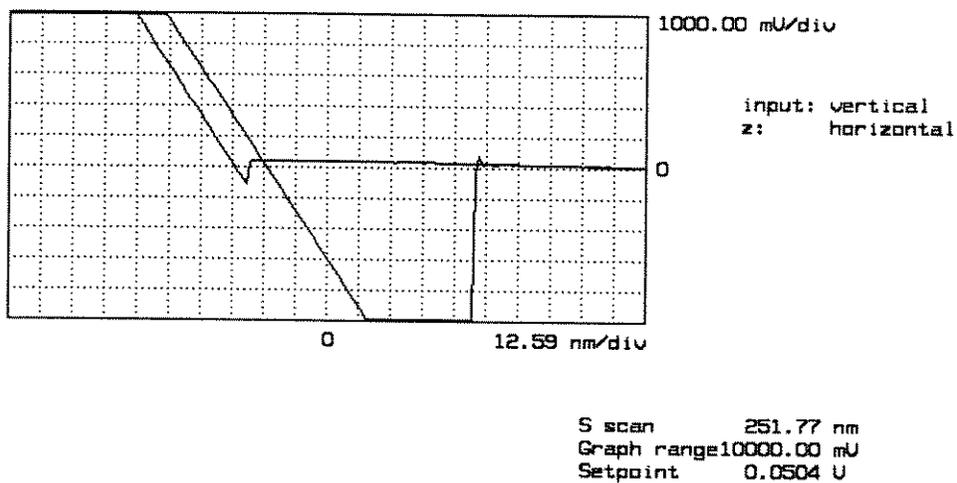
## **MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA**

As características das forças empregadas na varredura da ponta de prova sobre as superfícies são diferentes em função da resolução que se queira obter. A força utilizada nas imagens pela microscopia de força atômica utilizando cantilever com constante elástica de de 0,012 N/m em varredura de dimensões grandes (pouca resolução) está ilustrada na figura 29. Pode se observar o quadro que ao grau de inclinação da reta está na decorrência da sensibilidade de X e Y, onde X é dado em nanômetros e Y em Volts. Nota-se que na figura 30 as características das forças utilizadas nas imagens de grande resolução, utilizando cantilever com uma constante elástica bastante reduzida (0,006 N/m) numa varredura de dimensões reduzidas parecem bastante diferentes daquilo que se pode ver na figura 29.

Obtivemos imagens de dimensões padronizadas e eventualmente, em função da qualidade das imagens e das possibilidades de obtenção de informações adicionais e importantes, realizamos imagens com a característica de melhor qualidade e redução de ruídos. Para isso se utilizou as melhores frequências de varredura e as condições de ajuste do microscópio possíveis.



**Figura 29** - Gráfico de força obtido à partir de uma varredura de grande resolução no microscópio de força atômica, onde pode ser notado o valor de referência de -1,4301 V e a forma da curva de força da ponta (onde está a região pontiaguda) e a força de reação da amostra. As escalas estão descritas no gráfico.



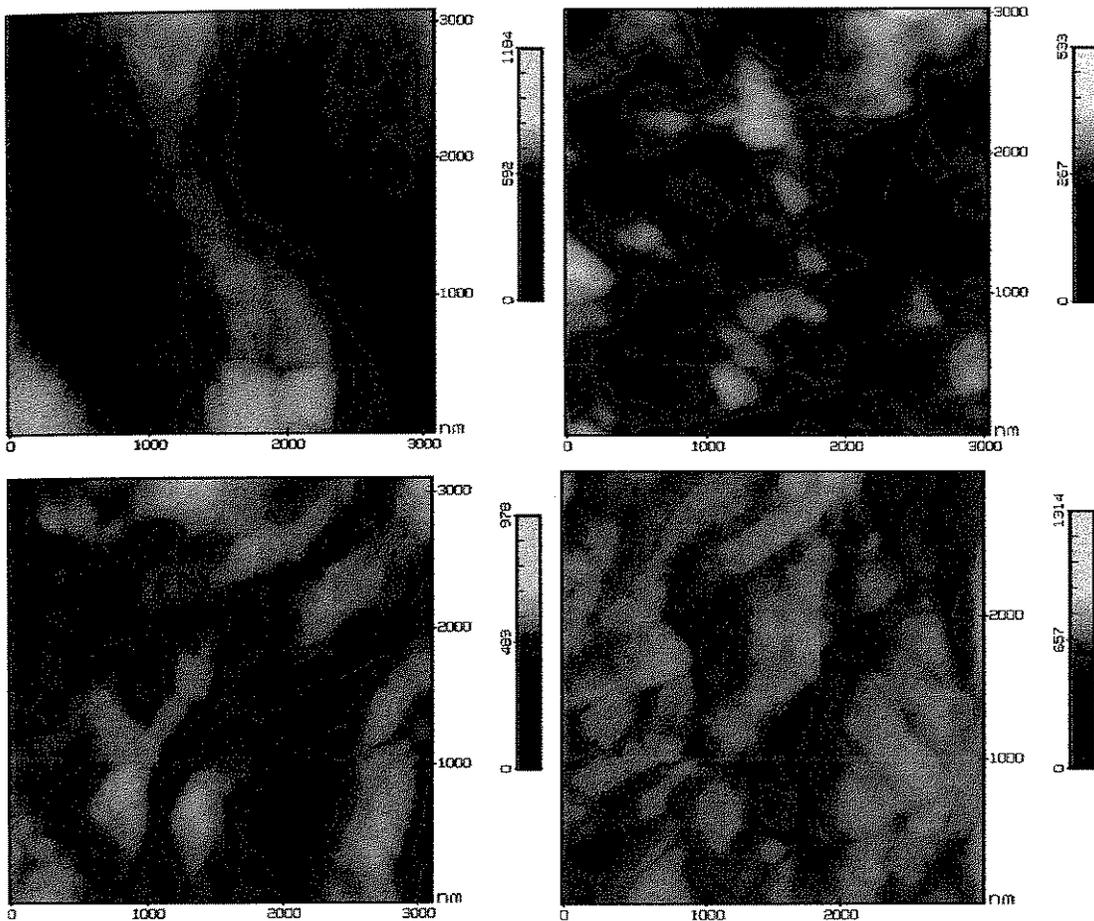
**Figura 30** - Gráfico de força registrado em varreduras de grandes dimensões (pouca resolução), onde podemos observar o valor de referência de 0,0504 V e escalas contidas no próprio gráfico, para pontas cujas constantes de mola eram de 0,012 N/m.

As imagens serão apresentadas de modo padronizado em grupos de 4, sendo a superior esquerda relativa ao grupo controle, a superior direita do grupo tratado com laser a  $0,5 \text{ J/cm}^2$ , a inferior esquerda do grupo de  $5 \text{ J/cm}^2$  e inferior direita do grupo de  $50 \text{ J/cm}^2$ .

Na figura 31 podemos observar a organização das fibrilas de colágeno nos tendões analisados pela microscopia de força atômica, nos animais sacrificados no 7º dia após a tenectomia e em processo de reparação. Já nesta etapa do processo, se pode notar diferenças na velocidade do curso da reparação entre o grupo controle e aqueles tratados pelo laser em diferentes doses. Nesta mesma figura, com quadro de  $3.000 \times 3.000 \text{ nm}$ , portanto com uma boa resolução, já se pode caracterizar a indução pelo laser de alterações na ordem molecular e o início do aparecimento da morfologia de ondulações.

Na figura 32, este quadro fica mais caracterizado no 14º dia, nas mesmas dimensões da figura anterior. Sinais de autoenrolamento das fibrilas de colágeno tornam-se visíveis e se define bem os arranjos que se formam, a junção das fibras em feixes compactos de microfibrilas, mas ainda com aparecimento de fibras transpassadas, fugindo da organização no sentido azimutal do tendão.

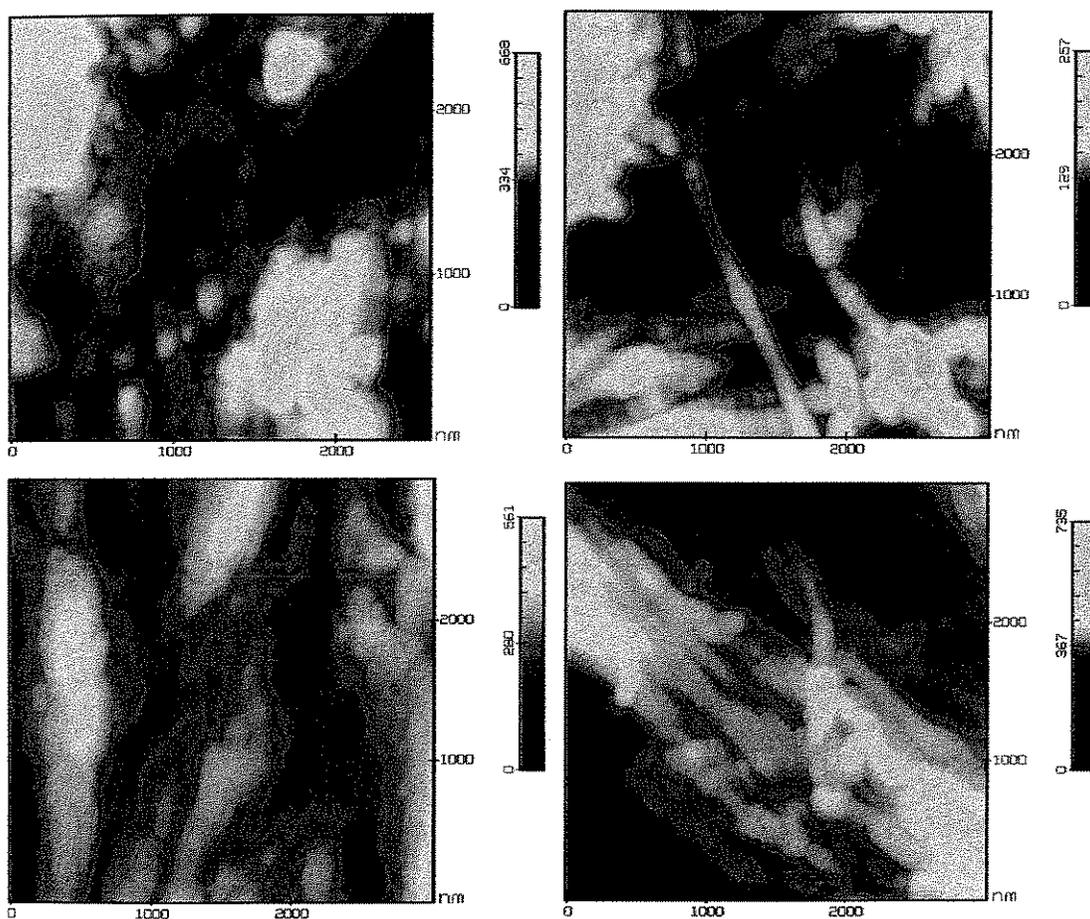
As imagens de MFA são a corroboração dos dados encontrados para microscopia eletrônica de varredura. Neste mesmo tempo de reparação, na MEV já se observava os sinais de organização e arranjo, assim como a morfologia de ondulações. A resolução com a qual podemos observar a evolução do processo é bastante superior e conseguimos detalhes nanoestruturais, com boa profundidade de foco, que na MEV não seria possível.



**Figura 31** - *Imagens obtidas por microscopia de força atômica de microfibrilas de colágeno do tendão de ratos em processo de reparação após 7 dias da tenectomia. Acima e à esquerda está a imagem do representante do grupo controle, não irradiado e à direita representante do grupo irradiado com laser de HeNe com dose de 0,5 J/cm<sup>2</sup>. Abaixo se encontram à esquerda representante do grupo irradiado com dose de 5 J/cm<sup>2</sup> e à direita 50 J/cm<sup>2</sup>. (Ampliação do quadro = 3.000 X 3.000 nm)*

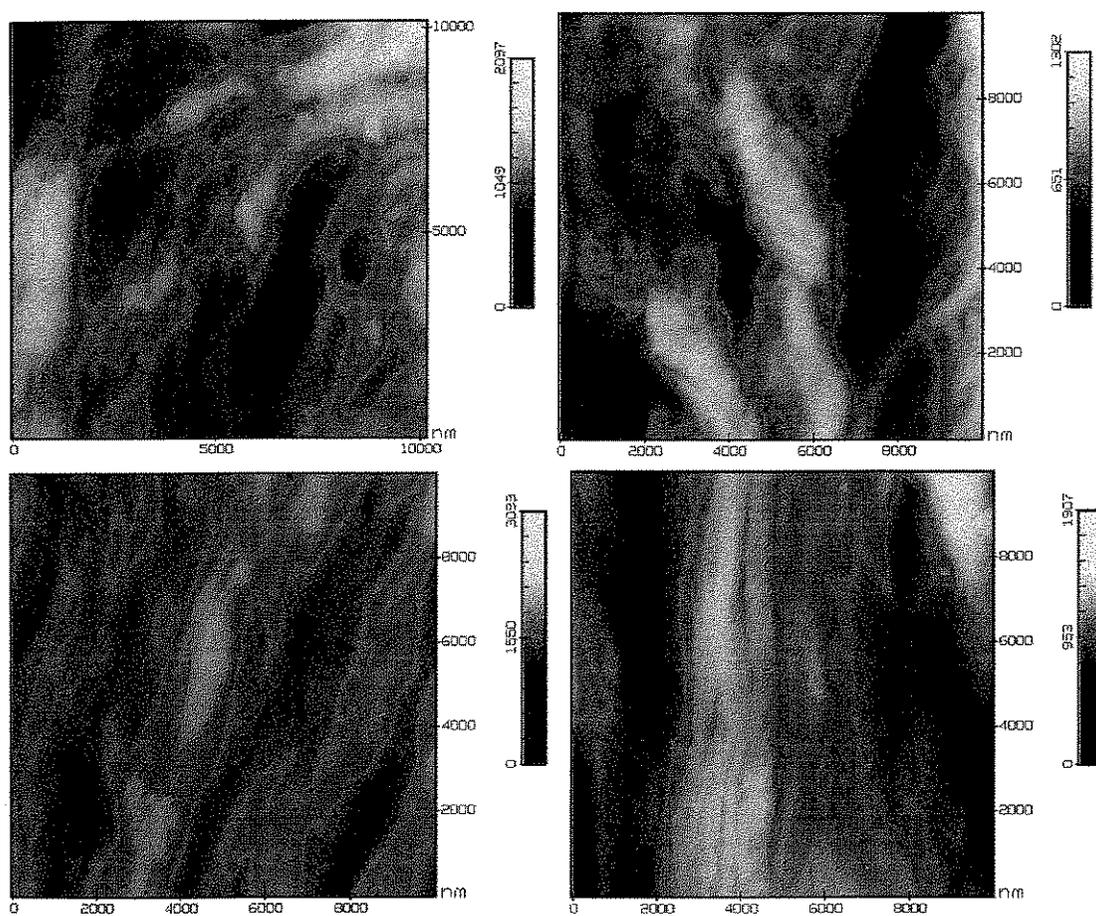
Na figura 33 temos as imagens tomadas no 21<sup>o</sup> dia pós tenectomia. São ilustrativas da evolução do processo de reparo e aceleração da formação de fibrilas mais espessas e com maior teor de autoenolamentos, assim como a morfologia de enrugamento sinal de maturação das fibrilas, que nesta etapa já se encontram mais maturadas. A apresentação das fibrilas mais organizadas

ainda no longo eixo do tendão nos dá fortes indícios que provavelmente esteja havendo utilização mais intensa deste tendão durante atividades funcionais dos animais. Este indício se justifica em função de que aumenta a atividade piezoelétrica do colágeno, o que conduz a uma melhora consequente da performance mecânica desta estrutura.

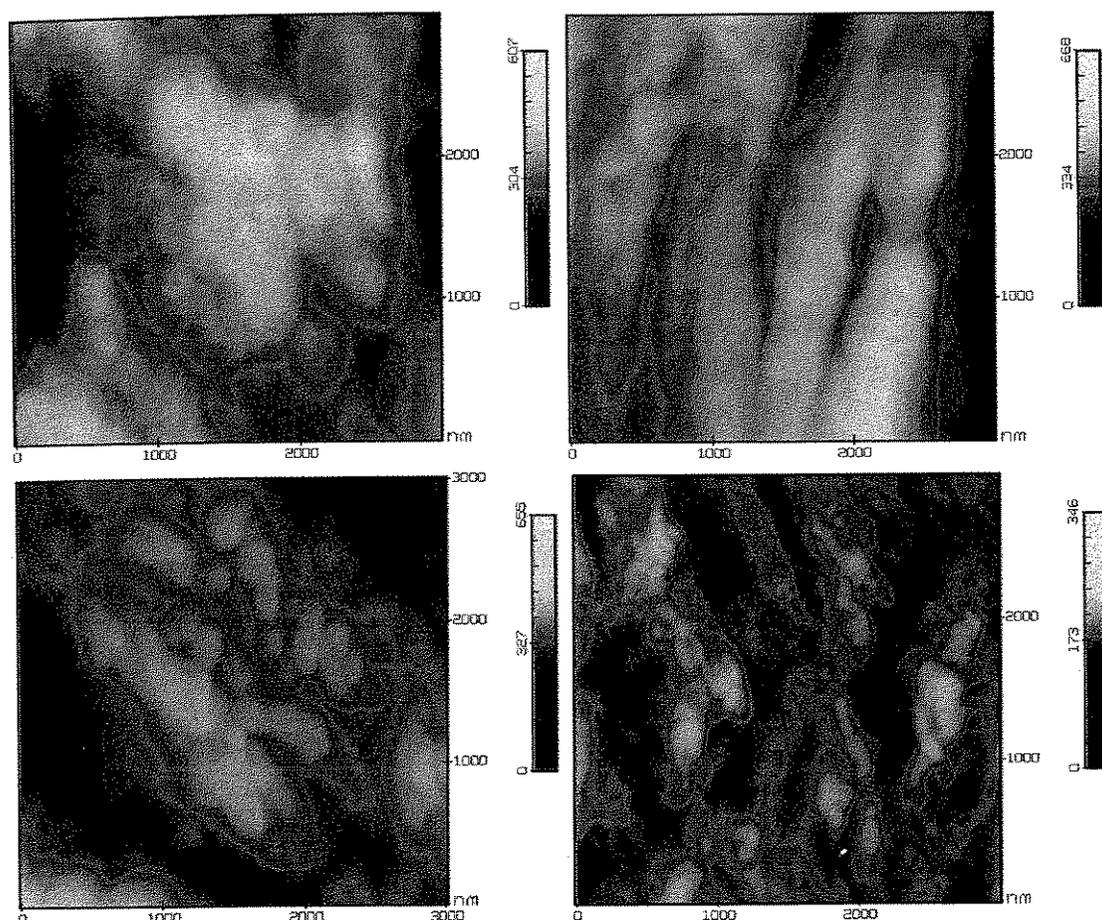


**Figura 32** - *Imagens obtidas por microscopia de força atômica de microfibrilas de colágeno do tendão de ratos em processo de reparação após 14 dias da tenectomia. Acima e à esquerda está a imagem do representante do grupo controle, não irradiado e à direita representante do grupo irradiado com laser de HeNe com dose de  $0,5 \text{ J/cm}^2$ . Abaixo se encontram à esquerda representante do grupo irradiado com dose de  $5 \text{ J/cm}^2$  e à direita  $50 \text{ J/cm}^2$ . (Ampliação do quadro =  $3.000 \times 3.000 \text{ nm}$ )*

Aos 28 dias de reparação, os tendões melhoram muito suas características morfológicas, mesmo o animal controle já dá sinais de aparecimento de ondulações ou rugosidades nos tendões, sinal claro que se isso apareceu precocemente nas imagens dos períodos anteriores, houve uma evidente aceleração deste processo biológico. Pode ser bem caracterizado nas imagens com resoluções menores (10.000 X 10.000) como as vistas na figura 35.



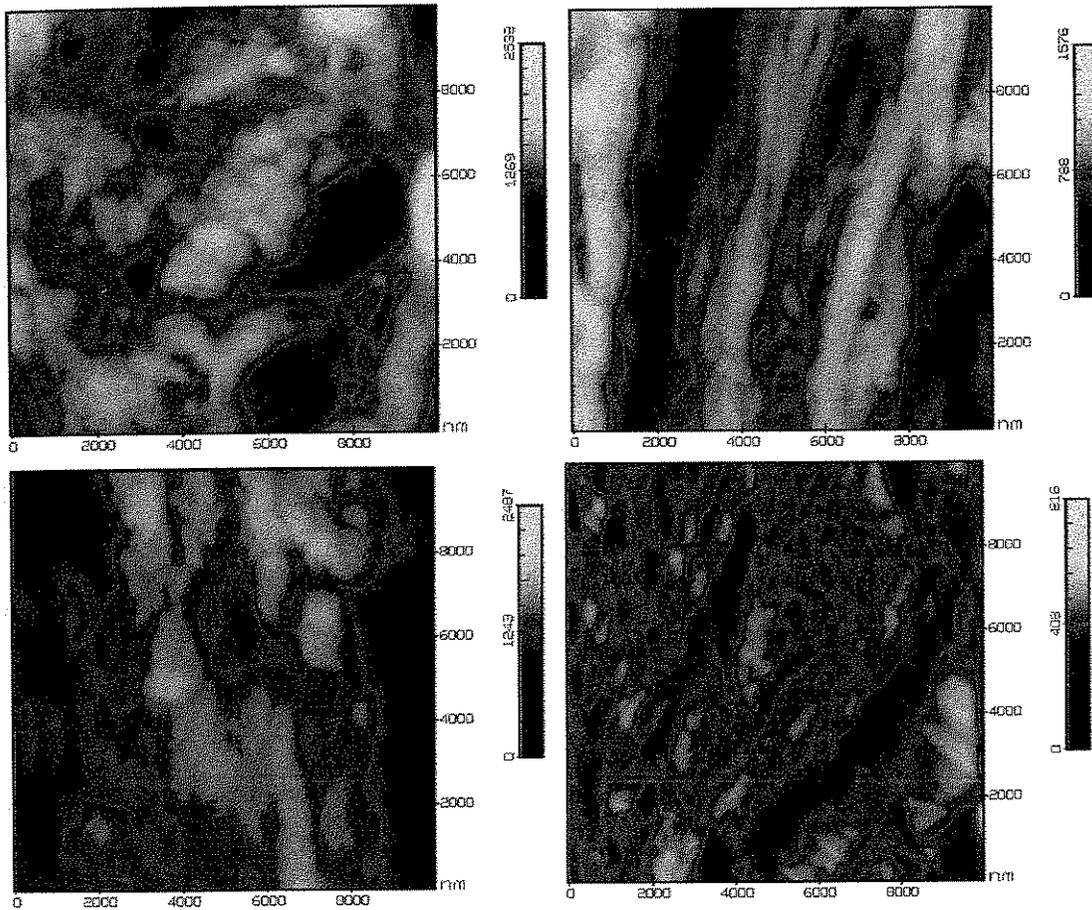
**Figura 33** - *Imagens obtidas por microscopia de força atômica de microfibrilas de colágeno do tendão de ratos em processo de reparação após 21 dias da tenectomia. Acima e à esquerda está a imagem do representante do grupo controle, não irradiado e à direita representante do grupo irradiado com laser de HeNe com dose de  $0,5 \text{ J/cm}^2$ . Abaixo se encontram à esquerda representante do grupo irradiado com dose de  $5 \text{ J/cm}^2$  e à direita  $50 \text{ J/cm}^2$ . (Ampliação do quadro =  $10.000 \times 10.000 \text{ nm}$ )*



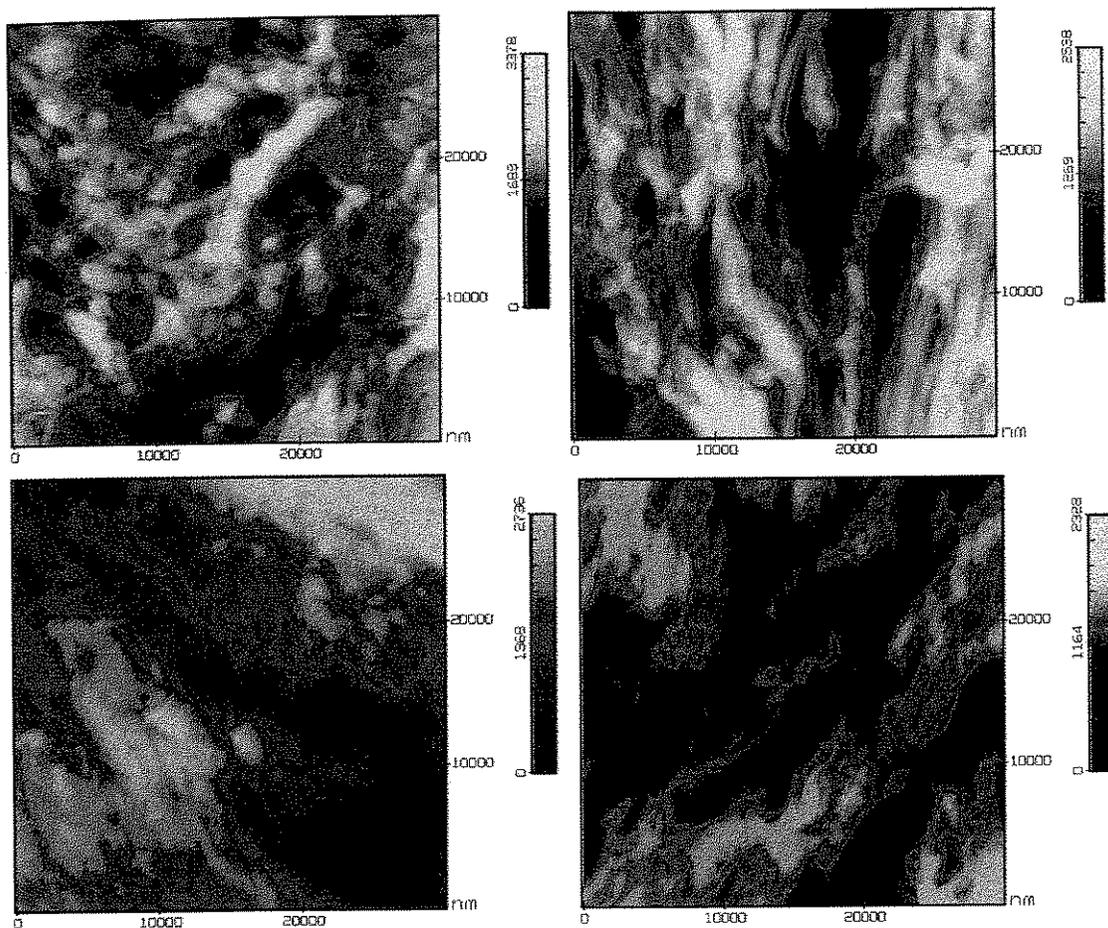
**Figura 34** - *Imagens obtidas por microscopia de força atômica de microfibrilas de colágeno do tendão de ratos em processo de reparação após 28 dias da tenectomia. Acima e à esquerda está a imagem do representante do grupo controle, não irradiado e à direita representante do grupo irradiado com laser de HeNe com dose de 0,5 J/cm<sup>2</sup>. Abaixo se encontram à esquerda representante do grupo irradiado com dose de 5 J/cm<sup>2</sup> e à direita 50 J/cm<sup>2</sup>. (Ampliação do quadro = 3.000 X 3.000 nm)*

No período final (relativo a este estudo) da reparação do tendão, apresentamos imagens de diversas resoluções, variando de 3.000 X 3.000 nm até 30.000 X 30.000 nm, com o objetivo de proporcionar uma caracterização mais ampla do processo e conseguir detalhes não observados anteriormente. As figuras 34, 35 e 36 se referem a esta visualização prgressiva no sentido

das dimensões dos quadros observados e portanto redução na resolução das imagens.



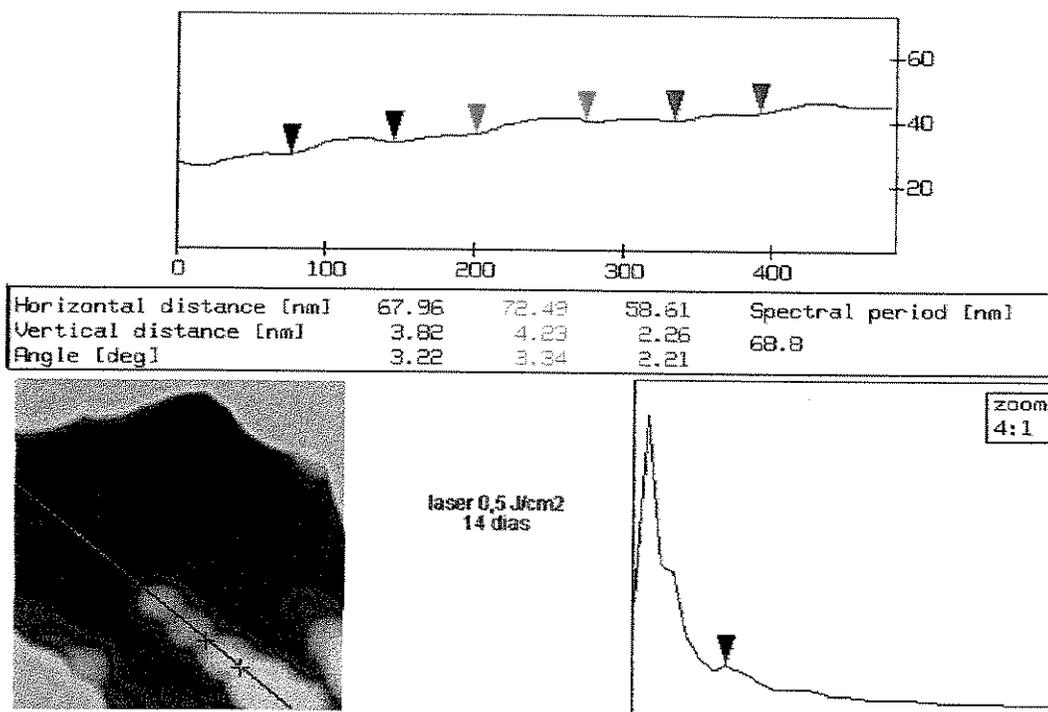
**Figura 35** - *Imagens obtidas por microscopia de força atômica de microfibrilas de colágeno do tendão de ratos em processo de reparação após 28 dias da tenectomia. Acima e à esquerda está a imagem do representante do grupo controle, não irradiado e à direita representante do grupo irradiado com laser de HeNe com dose de  $0,5 \text{ J/cm}^2$ . Abaixo se encontram à esquerda representante do grupo irradiado com dose de  $5 \text{ J/cm}^2$  e à direita  $50 \text{ J/cm}^2$ . (Ampliação do quadro =  $10.000 \times 10.000 \text{ nm}$ )*



**Figura 36** - *Imagens obtidas por microscopia de força atômica de microfibrilas de colágeno do tendão de ratos em processo de reparação após 28 dias da tenectomia. Acima e à esquerda está a imagem do representante do grupo controle, não irradiado e à direita representante do grupo irradiado com laser de HeNe com dose de  $0,5 \text{ J/cm}^2$ . Abaixo se encontram à esquerda representante do grupo irradiado com dose de  $5 \text{ J/cm}^2$  e à direita  $50 \text{ J/cm}^2$ . (Ampliação do quadro =  $30.000 \times 30.000 \text{ nm}$ )*

Na figura 37, apresenta-se uma secção no sentido longitudinal da fibrila de colágeno (inferior esquerdo) e no quadro superior aparece o perfil da fibrila com a característica banda D. O valor médio para o período espectral foi de  $68,8 \text{ nm}$  no  $14^{\circ}$  dia para a amostra de tendão tratado com laser na dose de  $0,5 \text{ J/cm}^2$ . Apesar de não estarem presentes as ilustrações, foram medidos os períodos espectrais das amostras relativas a dose de  $5$  e  $50 \text{ J/cm}^2$ , sendo respectivamente  $74,6 \text{ nm}$  e  $124 \text{ nm}$ . Quanto menor o valor deste

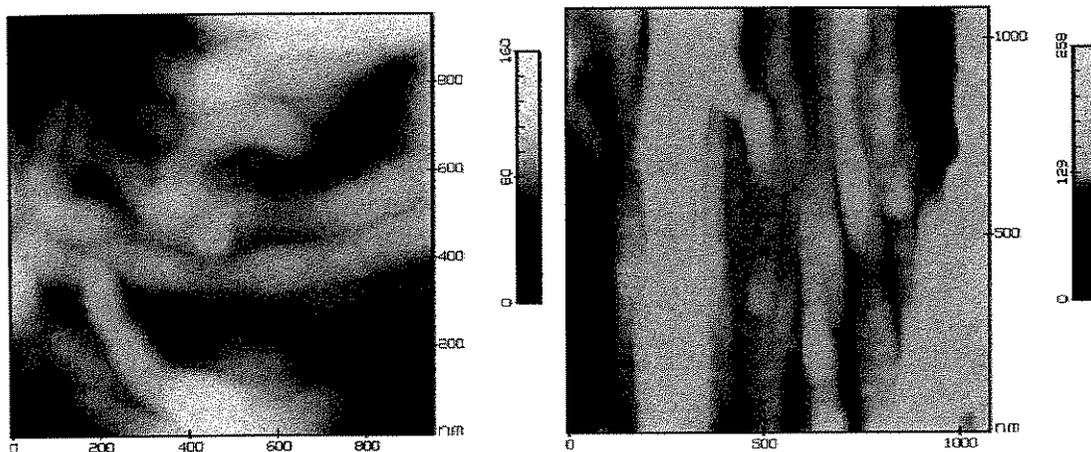
período espectral, mais ajustadas as moléculas e maior a interação intramolecular. Certamente isto está relacionado com os dados obtidos por Baranauskas et al. (1998)<sup>1</sup> onde o período espectral está em cerca de 60,3 nm para o tendão normal, sem ter sofrido qualquer tipo de intervenção, num provável estado de equilíbrio entre síntese e degradação das proteínas, em estado fisiológico natural.



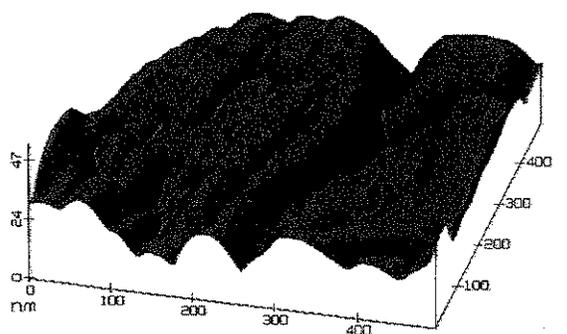
**Figura 37** - Visualização da secção longitudinal de uma fibrila de colágeno do tendão do rato submetido a tenectomia e tratado com laser com dose de  $0,5 \text{ J/cm}^2$  para estimular o processo de reparo tecidual. Note-se o período espectral de  $68,8 \text{ nm}$ , valor relativo a fibrila de colágeno já madura. A amostra foi retirada de animal sacrificado após 14 dias de evolução da reparação.

<sup>1</sup> Vide capítulo 3, página 66.

O arranjo das fibrilas deve ser denso e organizado, sem desvios da trajetória correta, que é o eixo azimuthal do tendão, para que as fibrilas possam participar do suporte de carga, função característica desta estrutura



**Figura 38** - *Imagens obtidas por microscopia de força atômica de microfibrilas de colágeno do tendão de ratos em processo de reparação após 14 dias da tenectomia. A imagem da esquerda representa o processo de autoenrolamento das microfibrilas de maneira desordenada nesta etapa, relativa ao grupo controle não irradiado e à direita representa o autoenrolamento com feixes bem organizados e ordenados de microfibrilas de colágeno relativa ao grupo irradiado com laser de HeNe com dose de  $5 \text{ J/cm}^2$ . (Ampliação do quadro =  $1.000 \times 1.000 \text{ nm}$ )*



**Figura 39** - *Imagem (ao lado) no formato topografia das fibrilas de colágeno aos 14 dias após a tenectomia, relativo ao grupo tratado com laser HeNe com dose de  $5 \text{ J/cm}^2$ , onde se observa a organização das fibrilas em relação ao eixo azimuthal.*

corporal, além de trações provenientes da ação muscular correspondente. Isto ocorreu nas doses menores de laser ( $0,5$  e  $5 \text{ J/cm}^2$ ) e pode ser observado na figura 38, onde há evidências de que o grupo tratado foi melhor qualificado, ao se observar as dimensões do feixe e o formato do autoenrolamento das microfibrilas em torno de si mesmas, característica esta promissora de melhor desempenho funcional.

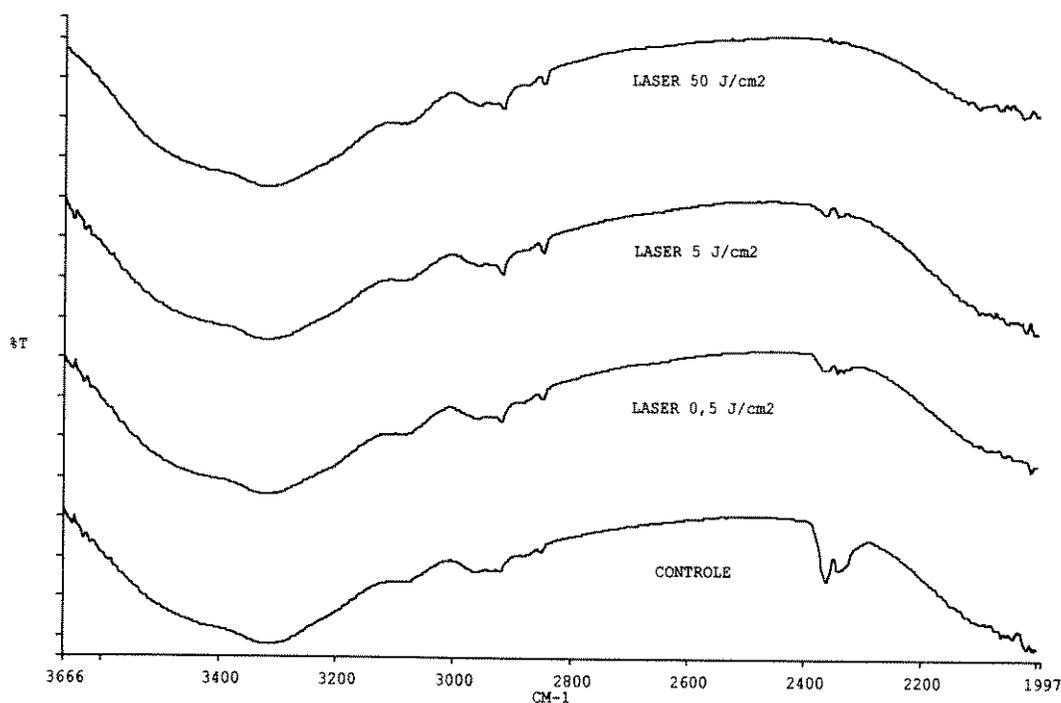
Na figura 39, pode ser observada a mesma organização descrita anteriormente no representante do grupo de animais tratados com laser na dose de  $5 \text{ J/cm}^2$ , apresentado na forma de topografia, mostrando bom arranjo no sentido do eixo azimutal, mesmo com grande ampliação da imagem.

O que se pode verificar no conjunto das imagens de microscopia de força atômica apresentadas, é uma clara superioridade na qualidade da reparação dos tendões submetidos a irradiação com laser de baixa intensidade, especialmente com as doses de  $0,5$  e  $5 \text{ J/cm}^2$ , quando comparadas com o grupo irradiado com dose de  $50 \text{ J/cm}^2$  ou com o controle não irradiado.

## **ESPECTROSCOPIA POR INFRAVERMELHO (FT-IR)**

Os espectros de transmitância de FT-IR representativos para os animais sacrificados no 14º dia podem ser vistos na figura 40. Nesta faixa espectral está a banda de vibração da água, o que frequentemente dificulta a avaliação de possíveis modificações. Vale ressaltar que as amostras

analisadas foram desidratadas em solução alcoólica, apesar da presença de moléculas de água fixadas na estrutura do colágeno. A banda com grande absorbância entre 3.300 e 3.400  $\text{cm}^{-1}$  demonstra isso com clareza quando tomado o espectro total entre 2.000 e 5.000  $\text{cm}^{-1}$  de número de onda.



**Figura 40** - *Espectro de transmitância por FT-IR de cortes de colágeno do tendão do rato. Não há diferenças dignas de nota, mas pode-se observar a banda de vibração da água. As amostras de tendões foram retirados no 28º dia após a tenectomia.*

Porém a faixa escolhida para estudo situa-se nas bandas ente 2.000 e 3.700  $\text{cm}^{-1}$ . Alguns ruídos importantes foram observados em função do fato de estarmos utilizando vidro como substrato para o filme de colágeno estudado. Isto fez com que modificássemos o método, para obtenção de melhor qualidade nas análises. Para isto, utilizamos espectros de reflectância nas análises seguintes.

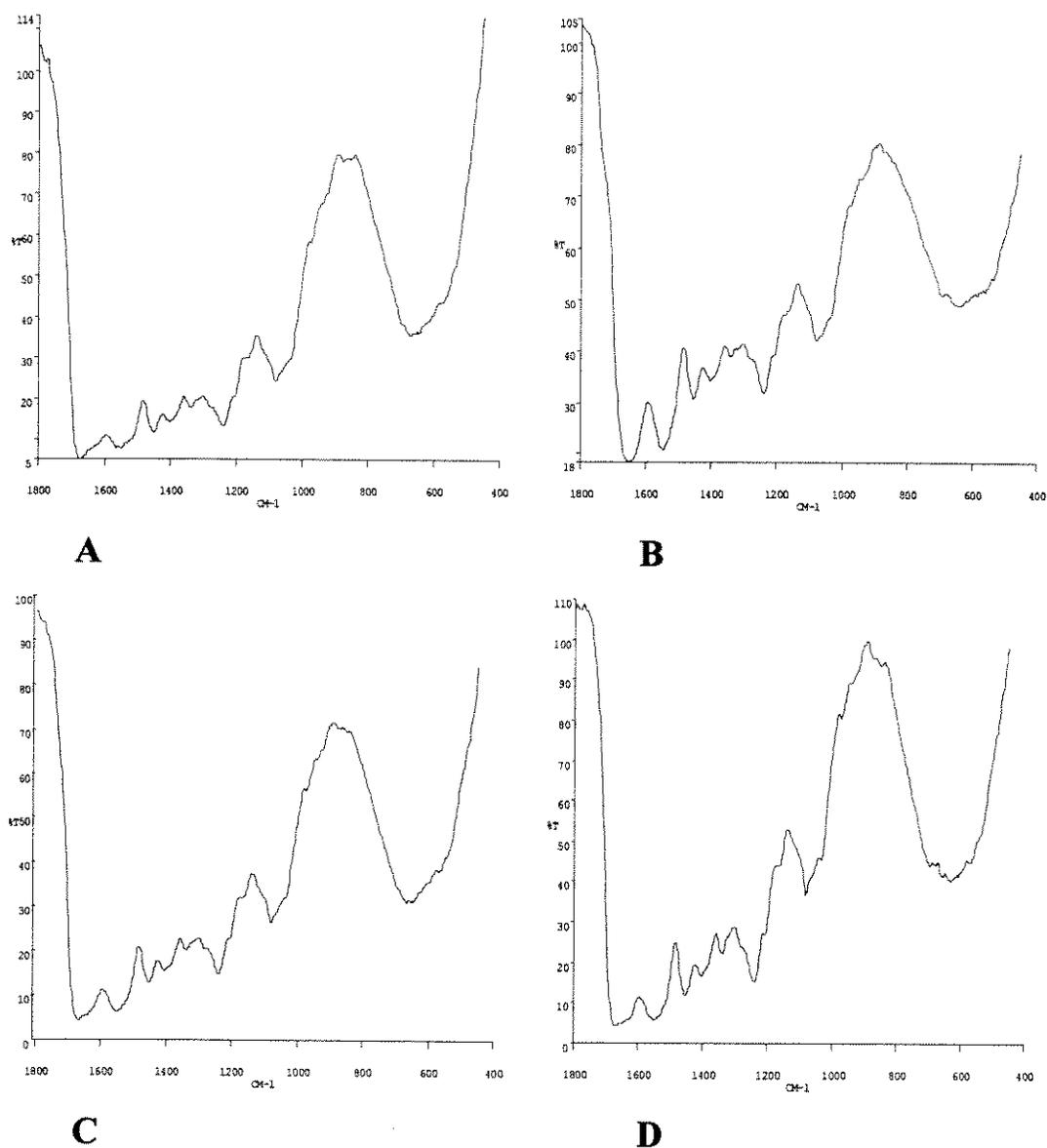
Justamente na faixa que se situa a banda da vibração da hidroxila (OH), que frequentemente forma pontes de hidrogênio, por compartilhar

dos mesmos elétrons, há a vibração atribuída à água, cuja faixa de absorvância máxima se situa em torno de 3.300 e 3.400  $\text{cm}^{-1}$ , o que atrapalha a interpretação de qualquer resultado obtido. Na molécula de colágeno, há ocorrência freqüente da formação de pontes de hidrogênio, aumentando em número de ocorrências à medida que exista maior coesão das fibras e ordenação das moléculas em relação a um eixo preferencial.

Nos espectros por transmitância na faixa de 2.000 a 3.700  $\text{cm}^{-1}$  analisados na figura 40 observa-se não haver diferenças dignas de nota entre os espectros. As semelhanças dos espectros dos tendões dos animais controle em relação àqueles tratados com diferentes doses de laser podem ser observados, relacionados ao 28º dia após a tenectomia. Portanto, na faixa entre 2.000 e 3.700  $\text{cm}^{-1}$ , as possibilidades de observação de diferenças foram frustradas. Porém, a observação dos espectros de reflectância utilizados para eliminar a interferência provocada pelo vidro onde estavam adsorvidas as amostras, podemos observar pequenas mas significativas diferenças entre os dados retirados dos espectros obtidos.

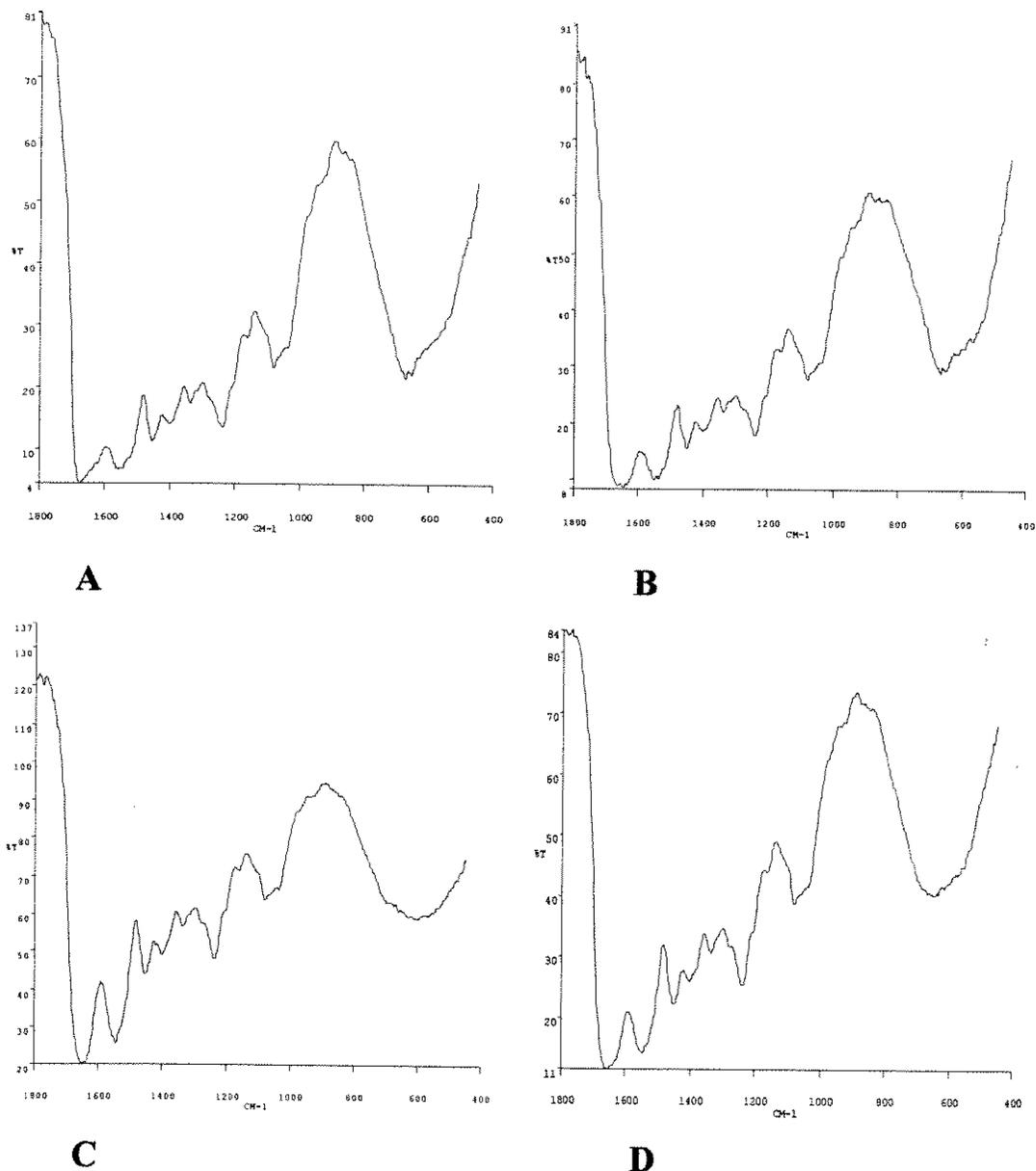
Na figura 41 podemos observar uma série de espectros relativos a tendões representativos dos grupos estudados e coletados no 14º dia após a lesão tendinosa, mostrando características bastante semelhantes aparentemente, mas diferentes numa análise mais detalhada (vide tabela 2).

Uma série de análises qualitativas e quantitativas foram realizadas nos espectros obtidos, inclusive testes estatísticos para alturas relativas em diferentes bandas de absorção, deconvoluções e segundas derivadas, na tentativa de observar alterações na quantidade de pontes de hidrogênio e de dissulfeto, sabidamente importantes na estrutura da molécula de colágeno.



**Figura 41** - Espectros de FT-IR por reflectância de filmes de colágeno obtidos após 14 dias de cicatrização. Os espectros A, B e C foram tendões fotoestimulados com laser de HeNe respectivamente com doses de 50, 5 e 0.5 J/cm<sup>2</sup> e o espectro D é representativo de animal controle com tratamento simulado.

A seguir, poderemos observar os espectros realizados nas mesmas condições dos anteriores, mas dos tendões retirados dos animais sacrificados no 28<sup>o</sup> dia após a lesão. Os espectros são também representativos dos diversos grupos estudados, inclusive o grupo controle.



**Figura 42** - Espectros de FT-IR por reflectância de filmes de colágeno obtidos após 28 dias de cicatrização. Os espectros A, B e C foram tendões fotoestimulados com laser de HeNe respectivamente com doses de 50, 5 e 0.5 J/cm<sup>2</sup> e o espectro D é representativo de animal controle com tratamento simulado.

A partir de um estudo mais detalhado destes espectros, podemos observar diferenças importantes (vide tabela II e III) como a banda de vibração do grupamento químico amida I no grupo controle que foi em média 1.658,8 cm<sup>-1</sup>, deslocada para 1.676,7 cm<sup>-1</sup> em média, para os animais analisados no 14º dia e tratados com laser na dose de 0.5 J/cm<sup>2</sup>,

fato este que representa um aumento da coesão inter e intra-molecular na estrutura do colágeno. Provavelmente isso ocorra devido a formação de pontes de hidrogênio e de dissulfeto, características do colágeno durante o desenvolvimento da fibrilogênese no processo de reparo tecidual.

**Tabela II** - Valores dos número de ondas ( $\text{cm}^{-1}$ ) obtidos pela análise por Espectroscopia Infravermelha por Transformada de Fourier (FT-IR) de amostras de colágeno do tendão do rato. Os valores são dados em média e desvio padrão ( $n=4$ ) para os grupos controle e tratados com laser de HeNe nas diferentes doses, para os tendões retirados de animais sacrificados 14 dias após a lesão.

TRAT. \ BANDA	Amida I	Amida II	Amida III
<b>Controle</b>	1668,8 $\pm 3,01$	1551,2 $\pm 1,78$	1238,8 $\pm 0,37$
<b>Laser 0,5 J/cm<sup>2</sup></b>	1672,2 $\pm 5,81$	1552,3 $\pm 2,61$	1239,4 $\pm 0,60$
<b>Laser 5 J/cm<sup>2</sup></b>	1662,9 $\pm 12,57$	1549,4 $\pm 5,97$	1238,0 $\pm 2,07$
<b>Laser 50 J/cm<sup>2</sup></b>	1666,2 $\pm 1,83$	1552,9 $\pm 1,64$	1238,4 $\pm 0,37$

Não houveram diferenças estatísticas entre as amostras analisadas quando aplicado teste "t" de Student para amostras pareadas.

Na tabela II são mostrados os dados obtidos por meio de recursos computacionais onde podemos achar os picos de vibração de cada espectro e fizemos uma análise estatística simples, com cálculo das médias e respectivos desvios padrões para o número de espectros (4) realizados para cada grupo. Os resultados demonstram que não houve diferença importante entre as médias dos diferentes grupos estudados, tanto para a

banda atribuída à amida I, constituinte principal dos aminoácidos, como para as formas secundária e terciária deste grupamento químico.

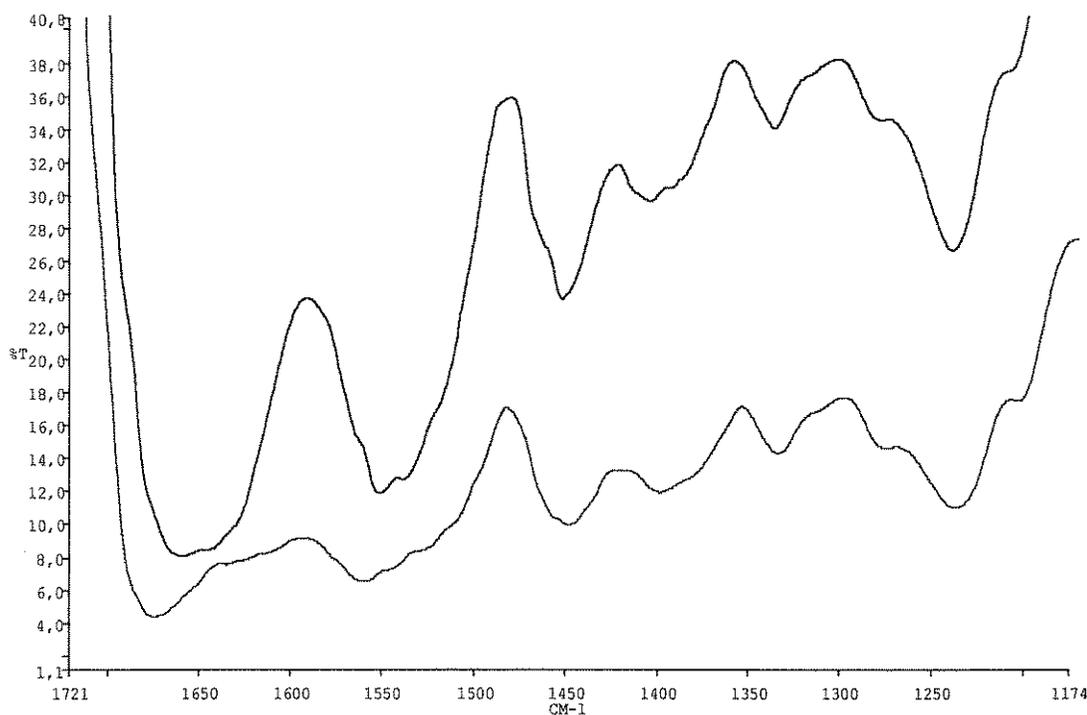
**Tabela III** - Valores dos número de ondas ( $\text{cm}^{-1}$ ) obtidos pela análise por Espectroscopia Infravermelha por Transformada de Fourier (FT-IR) de amostras de colágeno do tendão do rato. Os valores são dados em média e desvio padrão ( $n=4$ ) para os grupos controle e tratados com laser de HeNe nas diferentes doses, para os tendões retirados de animais sacrificados 28 dias após a lesão.

TRAT. \ BANDA	Amida I	Amida II	Amida III
<b>Controle</b>	1658,8 ±8,43	1552,5 ±2,56	1238,8 ±0,59
<b>Laser 0,5 J/cm<sup>2</sup></b>	1676,7* ±2,81	1558,6 ±8,72	1240,8*** ±1,21
<b>Laser 5 J/cm<sup>2</sup></b>	1662,2** ±4,06	1550,3 ±2,54	1238,7 ±0,28
<b>Laser 50 J/cm<sup>2</sup></b>	1663,1 ±2,83	1550,3 ±4,21	1239,2 ±0,49

\* Diferença estatisticamente significativa quando comparada o grupo tratado com laser 0,5 J/cm<sup>2</sup> com o valor médio do grupo controle. \*\* Diferença estatística quando comparado doses de laser de 0,5 e 5 J/cm<sup>2</sup>. \*\*\* Diferença estatística quando comparado a dose de 0,5 J/cm<sup>2</sup> com o grupo controle. Os outros valores não foram estatisticamente diferentes entre si quando aplicado o teste "t" de Student para amostras pareadas para  $p \leq 0,05$ .

Houve uma dispersão bastante grande em alguns dos dados mas também uma boa distribuição dos valores amostrais quando se observam os valores dos dados nas tabelas II e III. Foi aplicado o teste "t" de Student para amostras pareadas e comparado cada grupo de picos nos espectros atribuídos para amida I, II e III com o grupo controle. Apenas houve diferença estatisticamente significativa para a amida I dos grupos controle quando comparada com o grupo tratado com laser a 0,5 J/cm<sup>2</sup> de dose. Na

média, houve um deslocamento do pico da amida primária de  $1.658,8 \text{ cm}^{-1}$  para  $1.676,7 \text{ cm}^{-1}$ , o que dá uma diferença de  $17,9 \text{ cm}^{-1}$ , valor bastante significativo do ponto de vista das correlações de forças moleculares.



**Figura 43** - Gráfico dos espectros dos grupos controle (vermelho) e tratado com laser com dose de  $0,5 \text{ J/cm}^2$  (azul) aos 28 dias após a tenectomia. Notar a diferença contrastante (na média, estatisticamente significantes) dos picos (primeiros à esquerda) atribuídos para amida I, onde para o controle o pico foi de  $1.659 \text{ cm}^{-1}$  e para o tratado foi de  $1.677,4 \text{ cm}^{-1}$ . O deslocamento para esquerda do pico do grupo tratado provavelmente apareceu devido a um aumento de ocorrência de pontes de hidrogênio intra e intermolecular nas moléculas de colágeno do tendão do rato.

Na figura 43 conseguimos distinguir com maior precisão as bandas de vibração atribuídas as amidas I, II e III, onde se verifica um deslocamento importante na banda da amida I. Este deslocamento pode ser atribuído ao aumento da interação da carbonila com grupamentos hidroxila provindos da água, aumentando a agregação das moléculas no enrolamento

da tríplice hélice, assim como aumenta a disponibilidade de radicais hidroxila para realização de ligações covalentes, chamadas de pontes de hidrogênio, onde os elétrons deste átomo são partilhados pela carbonila e hidroxila simultaneamente.

### **Observações Finais**

O conjunto de resultados apresentados demonstram uma clara atuação do laser de HeNe sobre o processo de reparação do tendão por meio de modificações na velocidade de organização das fibrilas, no sentido da agregação molecular do colágeno. Feixes de dimensões maiores e espessura das fibrilas de características mais maduras relativamente ao tempo de síntese e um arranjo intra e intermolecular mais ajustado e com ligações cruzadas realizadas por aumento de pontes de hidrogênio foram resultados observados nas análises realizadas, que justificam haver mecanismos que interferem no processo biológico de reparação tecidual do tendão em níveis moleculares.

## DISCUSSÃO

O tendão em processo de reparo aparentemente tem um comportamento semelhante ao tendão em desenvolvimento a partir da sua constituição inicial antes do nascimento, ou seja, na embriogênese. A formação das fibrilas de colágeno na região da reparação tecidual acontece de forma hierárquica, onde parte do processo se dá dentro dos fibroblastos e outra parte fora deles. Maior celularidade nos momentos iniciais da reparação é esperado e uma lenta inversão do volume de células para dar espaço a um volume maior de fibras colágenas, com diâmetros diferenciados ao longo do curso do processo. Um fino controle do processo é exercido pelos fibroblastos na maioria dos passos, desde a estequiometria dos diferentes produtos da matriz genética durante a síntese e subsequente empacotamento para a secreção, até a extrusão das macromoléculas e a formação dos feixes na região extracelular. A

manutenção das condições estruturais e metabólicas do tendão no animal adulto, quando já existe uma grande proporção de fibras em relação à celularidade (fibroblastos ou “tenoblastos” quando no tendão ou peritendão), requer menor atividade de síntese por meio do retículo endoplasmático rugoso destas células, uma vez que já há um certo equilíbrio entre a degradação e síntese destes polipeptídeos.

No entanto, quando há uma lesão do tecido tendinoso e portanto aparece a necessidade de reparo, há informação genética para procedimentos do organismo nesta direção (Miller, 1976). Há um período de maior celularidade, no qual há um volume maior de fibroblastos em relação ao de fibras, que para o rato vai até cerca de 5 dias e posteriormente ocorre uma inversão, proporcionada por uma atividade sintética elevada por parte dos fibroblastos, que passam a tomar o espaço antes ocupado pelas células.

O modelo de cicatrização do tendão após tenectomia é bastante discutido por Enwemeka (1991) como adequado para estudos de métodos físicos sobre a estrutura do colágeno, que pode ser avaliado quanto a intensidade de síntese e orientação ou organização das fibras.

Os nossos resultados mostram que houve uma ocupação importante de fibras no espaço cicatricial, onde o processo de reparo ocorreu. O período inicial de reparação não foi objeto desta investigação, uma vez que iniciamos as observações já no sétimo dia após a lesão, quando esperava-se um número maior de fibras em relação ao de células. As observações se pautaram pela análise do registro axial das fibras e fibrilas em diferentes etapas do processo de reparação. Há uma evidente orientação dos feixes macromoleculares de colágeno no sentido do longo eixo do tendão.

**Birk et al. (1989)** afirmam que as fibrilas se organizam em macroagregados e no tendão tem um arranjo próximo de um arranjo uniaxial. Os fatores que levam a limitação do comprimento e diâmetro dos segmentos das fibrilas não são conhecidos. É aceito que o processo de organização nos canais da matriz extracelular é simplesmente limitado pela quantidade de procolágeno no espaço. Outros mecanismos de limitação da polimerização que interagem com o segmento em crescimento podem ocorrer. Pode ser visto que a tensão exercida pelas células sobre a matriz em desenvolvimento pode mais facilmente rearranjar segmentos curtos ao invés dos longos. Além disso, o processo descontínuo da formação de fibrila segue um arranjo angular para o crescimento e o reparo.

**Mello et al. (1975)** demonstraram evidências de modificações na orientação macromolecular das fibras de colágeno durante o processo de reparação em tendões de rato. Quando observamos as imagens de microscopia eletrônica de varredura e microscopia de força atômica obtidas neste trabalho, há evidências de modificações estruturais promovidas pela fotoestimulação com o laser de HeNe, nas diferentes doses estudadas. Além da fotoestimulação com laser na faixa de luz visível (HeNe), os trabalhos de **Longo et al. (1987)** mostra que na faixa do infravermelho é possível obter aceleração da cicatrização. **Tsuchida et al. (1991)** conseguiu cicatrização acelerada com laser inclusive em feridas em animais diabéticos, o que mostra um potencial terapêutico a ser analisado no futuro.

A orientação das fibras e dos feixes de colágeno são indícios de modificações funcionais da estrutura do tendão. O tendão é uma estrutura preparada para o desenvolvimento de trações em direção ao seu maior eixo. **Hunter e Finlay (1973)** mostram que há formação de ondas e enrugamentos ao longo deste eixo que se destinam a recepção de trações

mecânicas, propriedade natural dos tendões. Não está claro ainda se estas ondas são uma propriedade intrínseca das fibrilas constituintes, determinada pela seqüência de aminoácidos das moléculas de tropocolágeno, ou é o resultado da interação das fibrilas de colágeno com os componentes não colagênicos do tecido. Entretanto a base bioquímica para a função biológica destas ondas e enrugamentos parece ser a rápida entrada de água nas moléculas quando aparece uma contração muscular. Quando inicia-se uma contração há um aplanamento das ondas e o músculo inicia sua ação de tração mecânica e posteriormente há uma limitação à distensão devido ao deslizamento de uma fibrila sobre as outras (Hunter e Finlay, 1973). O modo de preparação das nossas amostras foi único, sem submissão prévia dos tendões à tração. Os enrugamentos e ondas que apareceram são integrantes naturais destas amostras, que caso houvesse interferência por parte dos métodos de preparação, ela se repetiria em todas amostras de forma semelhante. Portanto não se pode atribuir a observação desta morfologia característica a um artefato de preparo.

É interessante notar que as imagens são bastante ilustrativas sobre o aparecimento das ondas ou da morfologia de enrugamento das fibras, que são demonstradas tanto com a microscopia eletrônica de varredura, nos diferentes aumentos, como também em resolução bastante superior, como no caso das imagens de microscopia de força atômica, onde as imagens parecem se repetir, apesar das diferenças de resolução. A impressão que se tem é de que não há diferenças de resoluções nas imagens apresentadas. O fato é que a característica de autoenrolamento da molécula de colágeno aparece em ambas as situações, tanto com maiores como menores graus de resolução das imagens.

As moléculas de água proporcionam uma maior probabilidade de realizações de pontes de hidrogênio na molécula de colágeno além de proporcionar maior densidade de pontes intermoleculares covalentes (Davidson, 1989). As ligações cruzadas parecem estar intimamente ligadas a uma melhoria na resistência e firmeza do tecido cicatricial (Frank et al., 1995). Neste sentido, há fortes evidências de que houve um aumento de ligações cruzadas nas moléculas de colágeno quando submetidas a irradiação com laser de HeNe. Os arranjos dos feixes, a orientação das fibras e a organização das fibrilas podem ser observadas em maior proporção nas imagens tomadas dos animais submetidos ao laser. Murray (1989) já havia mostrado que a interação do laser (argônio) na pele e no vaso sanguíneo induz a formação de ligações cruzadas no colágeno tipo I e tipo VI, proporcionando uma fusão dos tecidos com melhor qualidade, reduzindo a intensidade do processo inflamatório decorrente da intervenção experimental. Apesar do objetivo destes autores ser diferente daquele que temos com este trabalho, além do comprimento de onda, da potência e dose de laser empregados, as condições de interação da luz com os tecidos permite-nos fazer associações com os resultados obtidos neste trabalho. Enwemeka et al. (1990) realizou trabalho com o mesmo tipo de laser que utilizamos neste trabalho e obteve uma cicatrização de melhor qualidade, além de observar um aumento na síntese de colágeno pela fotoestimulação. A associação dos resultados dos trabalhos de ambos os investigadores nos permitiram propor métodos diferenciados de análise para obter dados que comprovassem a eficácia do laser de HeNe no processo de reparo do tendão por fotoestimulação.

Aparentemente o efeito visto no tecido sob observação não é o único que aparece. Efeitos sistêmicos sobre o sistema nervoso central e

periférico foram observados por **Rochkind et al. (1989)** quando analisavam o efeito do laser sobre queimaduras e feridas de pele.

### **Microscopia Eletrônica de Varredura.**

O Laser de HeNe parece agir no processo de orientação das fibras de colágeno provavelmente por ação nos fibroblastos, que se depositam ao longo da região em processo de reparo (**Manske e Lesker, 1984**). Acredita-se que na regeneração de tecidos tendinosos, as populações de fibras e fibrilas tem organização e diâmetros diferenciados em função dos estímulos mecânicos (**Matthew e Moore, 1991; Raspanti, Ottani e Ruggeri, 1990; Elliott, 1965**). Por outro lado, **Enwemeka (1990)** demonstra em seu trabalho um aumento nas dimensões das fibras de colágeno avaliados morfometricamente em microscopia eletrônica de transmissão em animais tratados com laser de HeNe.

A redução do tempo de maturação das fibras proporciona atividade mecânica precoce, o que aumenta a estimulação mecânica nos tendões. Macroscopicamente, os tendões tratados com laser de HeNe se apresentaram com secção transversa maior e fascículos bastante unidos entre si, enquanto que nos animais controle os fascículos estavam bastante separados.

**Romanos, Pelekanos e Strub (1995)** demonstram que a alta energia do laser Nd:YAG causa uma lentidão na cicatrização mas quando se fez com baixa energia, houve uma cicatrização mais rápida e sem formação de cicatriz hipertrófica. O colágeno tipo I é responsável pela estabilidade de uma rede estrutural onde os filamentos curtos entrarão nos mecanismos de reparação e regeneração. Evidências de que o colágeno tipo I pode ser

estimulado pela radiação coerente do laser de HeNe foram obtido por **Saperia et al. (1986)** avaliando os níveis de RNAm de procolágeno tipo I e III. Neste trabalho, até 28 dias após a fotoestimulação, os investigadores detectaram elevações nas concentrações de RNAm para ambos os tipos de precursores do colágeno.

As alterações estruturais da matriz extracelular que está cercada de células e elementos vasculares, estabelece uma rede ativa de sinalização entre as células e a própria matriz (**Vidal, 1989**).

**Yu et al. (1996)** comentam que o laser de HeNe tem um efeito sistêmico em adição aos efeitos locais sobre a cicatrização. A produção de fatores de crescimento ou a estimulação da capacidade fagocítica dos leucócitos após irradiação pode estar envolvendo o efeito sistêmico. Porém a estimulação da liberação de fatores de crescimento parece estar envolvida tanto em situações *in vivo* como *in vitro*.

O laser de HeNe estimulou a liberação de interleucina 1- $\alpha$  e IL-8 (**Armendariz-Borunda, Katayama e Seyer, 1992**). Ambas as citocinas estimulam a proliferação celular de queratinócitos. Provavelmente isto acontece por estimulação da respiração celular por oxidação dos fotoceptores (moléculas fotoativas), levando a um gradiente de prótons na membrana mitocondrial que estimula a produção de ATP (**Passarella et al., 1984**). Estes achados são evidências de aumento da cicatrização pelos mecanismos celulares e moleculares pelo laser de HeNe. Os resultados da microscopia eletrônica de varredura dos tendões de animais fotoestimulados com laser de HeNe são bastante ilustrativos da melhoria da qualidade do reparo a que estes tendões foram submetidos e da aceleração na velocidade deste processo.

Na observação das fotomicrografias eletrônicas de varredura, a aparência é muito semelhante aquilo que se observa em cortes de tendão

na microscopia de luz. A apresentação de feixes mais espessos, com número maior de fibras e o aparecimento de ondulações ou enrugamentos ("crimped morphology") em maior quantidade e mais precocemente nos animais tratados com laser pode ser observado quando comparados com o grupo controle. Isto é uma evidência de aceleração na formação e maturação das fibrilas submetidas ao laser.

Além da idade cronológica das fibras e a influência deste fator no desenvolvimento de funções de tração, o aspecto ondulado se modifica com o grau de maturação das fibras colágenas proporcionando um aumento na capacidade de suporte às trações mecânicas (**Shah, Palacios e Palacios, 1982 e Moore e Beaux, 1987**). Aparentemente outras estruturas e moléculas não colagênicas estão envolvidas no desempenho mecânico dos tendões ou mesmo de outros tecidos que estão constantemente sujeitos a trações mecânicas (**Danielsen, Yahia et al., 1990**), especialmente as fibras elásticas. Portanto, o laser proporciona um provável aumento na capacidade de suporte às trações mecânicas destes tendões *in vivo*.

### **Microscopia de Força Atômica.**

As dificuldades para realização de imagens de MFA com materiais biológicos já é conhecida (**Morris, 1994**). Há a possibilidade de interpretação dos achados de forma incorreta, o que leva a um cuidado maior para inferir sobre os resultados com esta técnica de análise.

A observação atenta durante a varredura e a comparação com as diferentes ampliações da imagem parecem ser de grande importância no processo de tomada de imagens para materiais biológicos. Há grande

possibilidade de penetração da ponta sobre a amostra, especialmente quando se umidifica a amostra para conseguir uma maior aproximação com as condições naturais das moléculas de colágeno, como foi realizado neste trabalho.

Quando associamos as imagens de MFA com MEV, podemos perceber uma grande repetibilidade das condições estudadas. Há uma corroboração dos resultados observados nas menores resoluções (relacionadas as imagens de MEV) quando se compara com as imagens com resoluções maiores. É o que ocorre nas observações das imagens obtidas por MFA.

A morfologia de ondulações na superfície analisada é evidente. Apresenta-se imagens que demonstram o aparecimento das ondulações tanto naquelas imagens com grande resolução apresentadas no capítulo 5 (comprovação), realizadas em condições especiais (período noturno) para evitar ruídos ambientais, como durante a tomada das imagens de menor ampliação.

Vários autores estudaram o colágeno como amostra para MFA (**Guckenberger et al., 1988; Voelker et al., 1988; Snellman et al., 1990; Zhu et al., 1991; Chernoff e Chernoff, 1992 e Hillebrand et al., 1992**). Se conseguiu demonstrar a estrutura alongada e fibrosa em tamanho adequado e com o aparecimento da periodicidade próxima daquela que se conhece por outros métodos. **Chernoff e Chernoff (1992)**, nos estudos com MFA de preparações de colágeno sobre mica e analisadas no ar ambiente, mostraram imagens das fibrilas, dos monômeros e da banda D característica das fibrilas de colágeno. A banda D foi detectada também por **Gathercole et al. (1993)** cuja observação parece muito pertinente: a variação de contraste observada na microscopia eletrônica de transmissão para a banda D corresponde a um padrão de deposição maior de corante,

sabidamente associado ao grau de hidrofiliidade (cargas) dos grupos aminoácidos ao longo das microfibrilas. Nossos resultados demonstram haver a periodicidade, mas não podemos atribuir precisamente à banda D. Além da periodicidade nas imagens de grande resolução, há o aparecimento de um período que aparentemente se refere a morfologia de ondulações e enrugamentos, observável tanto ao MFA (em altas resoluções) como com outra técnica e em menor resolução, a MEV. Parece haver ondas dentro de outra onda, ou seja, parece haver um envelope. **Diamant et al. (1972)** comenta em seu estudo que há a necessidade de observação em duas ordens de magnitude para analisar as estriações das microfibrilas no sentido do comprimento de sua função natural no organismo. As fibrilas se enrolam em tríplice hélice, que por sua vez produz outro enrolamento secundário e que pode se enrolar outras vezes mais, proporcionando uma provável melhoria de performance nas características de tração mecânica do tendão, especialmente quando isto acontece na direção das forças atuantes. Este mecanismo seria comparado a uma mola, que se alongaria sob tração e teria um valor máximo de resistência à tração. Após atingir tal valor, haveria fadiga do material e portanto a sua ruptura. **Diamant et al. (1972)** foi o primeiro a descrever a morfologia de ondulações e correlacionou-as com o aspecto de tração mecânica. Outros autores também associaram a tração exercida com o desempenho funcional em situações *in vivo* (**Yahia, Drouin e Newman, 1990; Yahia et al., 1990; Hunter e Finlay, 1973**).

No nosso modelo de reparo, estimulado com laser de HeNe em diversas doses, podemos observar a formação das ondulações na dependência da dose utilizada e também relacionada com o tempo de evolução da reparação. O aspecto periódico das ondulações está estreitamente relacionado com a idade das fibrilas. **Diamant et al. (1972)**

observam no seu trabalho que a idade dos animais interfere no período e também no comprimento das fibrilas, mas ressalta uma exceção: as fibras novas decorrentes do processo de reparo. Neste caso o importante não é a idade do animal, mas a idade física das novas fibrilas que seriam formadas no processo de reparo, levando portanto a um menor comprimento de fibras e portanto períodos de menor valor.

Nas imagens de MEV e MFA podemos notar esse fato. Nas imagens das etapas iniciais de reparação (14 dias), os períodos se apresentam menores e à medida que tomamos as imagens das etapas subsequentes, há o aparecimento de frequências de maior valor, com fibras aparentemente mais longas. Os diâmetros parecem também aumentar com o curso temporal da reparação tecidual do tendão.

A correlação entre estimulação mecânica e aumento da espessura das fibrilas de colágeno e seu estado de agregação já é conhecida (**Diamant et al., 1972**). Por outro lado, acredita-se que o tendão desempenhe funções de transdutor, contando com propriedades piezoelétricas e piroelétricas (**Fukada, 1974; Liboff e Furst, 1974; Vidal, 1989**). Esta conversão da deformação mecânica em carga na estrutura da molécula nos sugere uma possibilidade de interação da energia eletromagnética com a estrutura molecular do colágeno.

**Charman (1990)** propõe como forma de interação da energia eletromagnética, a possibilidade de formação de dipolos (magnéticos e/ou elétricos) dentro da estrutura molecular, que por estarem separados por uma curta distância entre eles, proporcionaria um *momento* de força (produto da carga pela distância), que oscilaria de acordo com uma frequência de ressonância própria. Estas frequências estariam vinculadas às dimensões e propriedades estruturais dos tecidos e células. Na mesma proposta, **Charman (1990)** comenta sobre a interferência destes campos

eletromagnéticos com a atividade enzimática dos tecidos e nas moléculas, dando evidências que as cargas nas membranas e nas biomoléculas modificam a eficiência de interação, promovendo diferenças nos produtos finais de reação (**Hasted, 1988**).

**Parrish (1985)** discute os eventos fotofísicos que podem ser considerados como consequência da interação da energia com a matéria. A energia eletromagnética atravessa os tecidos enquanto vai interagindo com as biomoléculas. No processo de “dissipação” dessa energia, as moléculas podem ser alteradas reversível ou irreversivelmente, podendo causar modificações mensuráveis (configuração estrutural) nas propriedades teciduais.

A radiação eletromagnética caminha pelos tecidos com a velocidade da luz decrescida por um fator relacionado com o índice de refração do material tecidual. A transferência da radiação para os tecidos é complexa. Depende das propriedades ópticas dos tecidos que de certa forma acaba determinando a dose de radiação recebida pelas diferentes camadas teciduais. Neste sentido as propriedades de absorção e o espalhamento das ondas podem modificar fortemente a resposta a uma dada exposição.

Os fótons, após investirem contra as biomoléculas, são absorvidos e deixam de existir (**Parrish, 1985**). Sua energia é transferida para os cromóforos ou moléculas que o absorveram. As moléculas excitadas eletronicamente podem ter energia suficiente para causar alterações fotoquímicas nas ligações. Modificações nas configurações primárias, secundárias, terciárias e quaternárias das macromoléculas podem ocorrer nos tecidos.

Estes eventos fotofísicos podem levar a ativação ou inativação de enzimas ou podem alterar as propriedades físicas e químicas das macromoléculas mais importantes. Isto pode ativar uma cascata de reações

químicas que modifica as respostas de fluxo sanguíneo e permeabilidade vascular em função das modificações no potencial de membrana.

O laser, como campo eletromagnético, tem uma particularidade que o coloca em vantagem com relação as demais formas de energia eletromagnética. **Frohlich (1988)** define a coerência no tempo e espaço como uma grande vantagem para melhorar a sintonia entre o “emissor” de um sinal e o “receptor” deste sinal, reduzindo os ruídos de interferência e funcionando como uma espécie de “filtro”. Por outro lado, **Smith (1988)** relaciona o sistema enzimático com um “amplificador” de sinais, onde o sinal de entrada está relacionado a “quantidade de enzima no local” e o sinal de saída está relacionado com a “quantidade de produto da reação formado por minuto”. Uma confirmação desta hipótese foi feita por **Paschoal (1991)**, quando utilizou luz coerente e obteve resultados satisfatórios na cicatrização de pele e no mesmo trabalho, ao utilizar a luz incoerente nas mesmas doses, os resultados foram insatisfatórios.

Ao que se apresenta como resultado, há uma interação importante entre a luz coerente do laser de HeNe e as moléculas de colágeno, provavelmente envolvendo os fibroblastos. Os feixes de colágeno se comportam de forma diferenciada em relação às distintas dosimetrias utilizadas, demonstrando uma espécie de transdução da energia eletromagnética coerente, modificando sua estrutura intrínseca por deslocamentos inter e intramoleculares, provocando liberação dos grupos polares nas superfícies das fibras, que interagem com os componentes da membrana celular dos fibroblastos. **Vidal (1989)** propôs uma teoria que poderia explicar estas formas de modulação dos sinais e o seu reconhecimento pelos componentes extracelulares. Os fenômenos de adesão e reconhecimento dos diferentes estados funcionais dos biopolímeros parecem ser o caminho da interação entre as fontes externas

de energia e a detecção das necessidades de ajustes funcionais, tanto em situações fisiológicas como nos estados fisiopatológicos, como é o caso do processo de reparação.

Para as diversas doses de laser utilizadas houveram diferentes respostas do organismo, levando a crer que a interação parece vinculada a energia absorvida. A relação da dose de fotoestimulação com laser e os resultados em relação às dimensões da secção transversa e do diâmetro das fibrilas de colágeno já foi demonstrada por **Enwemeka et al. (1990)**, corroborando a idéia que as respostas são dependentes da dose. No entanto, quando utilizamos doses bastante elevadas, quando comparadas com aquelas recomendadas para utilização clínica, no caso deste trabalho este valor foi fixado em  $50 \text{ J/cm}^2$ , aparentemente houve uma estimulação menor que a dose de  $5 \text{ J/cm}^2$ , considerada dentro de um valor médio. Este bloqueio da resposta se deve provavelmente à formação de radicais livres, que são estimulados pelo laser, e dependendo de sua concentração no tecido, pode chegar a uma saturação dos mecanismos de síntese de proteínas, levando até a sua redução (**Lubart et al, 1992**).

A penetração nos tecidos pelo laser e sua possibilidade de ação tem sido colocado em dúvida. Um estudo comparativo entre os lasers de HeNe (632,8 nm) e HeCd (442nm) na cicatrização em ratos foi realizado por **Zhang e Al-Watban (1994)**. Ambos os lasers produziram aceleração da cicatrização na pele de ratos, porém houve um destaque para os efeitos do HeNe. A velocidade de cicatrização foi dependente das doses utilizadas (1, 4, 7 e  $11 \text{ J/cm}^2$ ). Os diferentes efeitos sobre a velocidade de cicatrização pode ser atribuído às diferentes penetrações e transmissões dos comprimentos de onda, o que leva a absorção diferenciada pela derme e epiderme.

**Yamamoto et al. (1996)** demonstraram um aumento na produção de procolágeno  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  em meio pobre de nutrientes mas não em soro fetal bovino. Isto mostra que algum fator do soro fetal bovino interfere na síntese de procolágeno. Talvez isto explique porque o laser tenha grande eficiência em úlceras tórpidas.

Irradiando fibroblastos com duas doses, a menor dose (3 min) mostrou ser mais efetiva. Foi utilizado dexametasona para analisar o mecanismo de estimulação do laser na produção de procolágeno pelos fibroblastos. Se demonstrou uma inibição ao nível pré-translacional da síntese de RNAm (**Raghow, Gossage e Kang, 1986**). Como houve o retorno aos níveis de controle após algum tempo, os autores sugerem haver um efeito no momento da translação da síntese do RNAm.

Acredita-se que o GMPc no fibroblasto pode estar envolvido no processo de síntese de procolágeno. Foi utilizado um bloqueador da guanilato ciclase, o azul de metileno, que conseguiu reduzir a síntese de procolágeno em 60% em relação ao controle, que não aumentou sob a ação do laser de baixa intensidade como era esperado.

**Poppas et al. (1996)** num modelo experimental de incisão de pele, utilizaram laser para facilitar a soldagem pela albumina, associado ao fator de crescimento transformador  $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ), um estimulador da cicatrização. A alegação dos autores para explicar os seus resultados é que usando a albumina, que é desnaturada pelo laser (calor), pode haver a liberação de substâncias bioativas. Essas substâncias assim como os fatores de crescimento, podem auxiliar no processo de cicatrização.

**Muraka et al. (1997)** mostraram que o TGF- $\beta_3$  estimula a síntese de colágeno através de uma conexão com TGF- $\beta_1$  e por um mecanismo independente que é capaz de controlar e bloquear o efeito estimulatório do TGF- $\beta_1$ . Já é conhecido a regulação das diferentes isoformas de TGF- $\beta_1$ ,

$\beta_2$  e  $\beta_3$  em vários tecidos durante a embriogênese, a fibrose e a cicatrização.

O TGF- $\beta_1$  funciona como uma sintonia fina na síntese de matriz extracelular dentro do amplo contexto de estimulação desta família de peptídeos. Uma via importante de regulação dos TGF- $\beta$  se dá por meio das citocinas e outros fatores de crescimento.

O TGF- $\beta_1$  é abundante nas lesões teciduais. O ambiente proteolítico característico das lesões pode servir para ativar o peptídeo ou liberar dos seus estoques na matriz extracelular ou do coágulo formado rapidamente após a lesão.

Os resultados de **Schindl et al. (1994)** mostram que o laser de baixa intensidade estimula a angiogênese positivamente de forma precoce com doses como 1,2 J/cm<sup>2</sup>. Não só a velocidade de formação dos vasos é acelerada mas o diâmetro dos novos vasos e sua persistência foram observadas nas condições experimentais induzida pelo fenômeno de Arthus na córnea de coelho. Essa possibilidade de atuação do laser pode significar um potente aliado no processo de reparo tecidual, aumentando a disponibilidade de nutrientes, o que poderia facilitar a síntese protéica pelas células imersas na matriz extracelular, que por sua vez, depositaria este material sintetizado no meio extracelular.

A partir desta etapa, os fenômenos de organização e ordenamento da matriz extracelular agiriam. A estruturação da matriz depende da adesividade dos componentes celulares entre si e com a própria matriz extracelular. **Karu et al. (1996)** demonstram que as interações da superfície celular com outras células e com a matriz extracelular estão envolvidas na regulação de processos como embriogênese, crescimento celular e diferenciação, morfogênese e a formação de metástase.

Algumas moléculas relacionadas ao mecanismo de adesão entre células e entre célula-matriz extracelular já foram caracterizadas como as glicoproteínas, as proteoglicanas e os glicolipídeos. Essas moléculas não absorvem radiação na faixa da luz visível ou infravermelho próximo (**Quarto, Martino e Michelini, 1988**). Isto significa que as alterações de adesividade foram devido modificações na membrana das células e não por excitação direta destas moléculas. A adesão celular em fibroblastos estimulada pelo laser de HeNe é um fenômeno conhecido para situações *in Vitro* (**Boulton e Marshall, 1986**) e corrobora a hipótese aqui discutida e comprovada sobre a matriz extracelular *in Vivo* pelos resultados apresentados. **Karu et al. (1996)** também sustenta a hipótese de que o laser de baixa intensidade aumenta fortemente a adesão celular, inclusive em processos de cicatrização.

Esta resposta biológica está relacionada à cascata de reações bioquímicas no citoplasma e na membrana celular a partir de fotoceptores nas mitocôndrias. Estes fotoceptores são principalmente o citocromo C e superóxido dismutase presentes nas mitocôndrias (**Quarto, Martino e Michelini, 1988**).

O gradiente iônico na membrana está estritamente relacionado com as fases iniciais da adesão celular, especialmente nos fibroblastos (**Zedelft, 1980**). Sabe-se que o laser modifica o gradiente iônico (**Passarella et al., 1984**). Os resultados apresentados dão suporte a idéia de que métodos que alteram o transporte iônico através da membrana celular poderiam modular ou influir na adesão e portanto na sedimentação celular, claramente observados nas imagens mostradas neste trabalho, tanto na MEV como na MFA. Tal fato parece estar na dependência da dose e portanto da interação do campo eletromagnético coerente com o tecido tendinoso.

**Garden et al. (1986)** demonstra que além da cicatrização acelerada pelo laser em diversos tipos de tecidos, na pele especificamente ele aumentou a força de fixação da cicatriz medida como tensão de ruptura. **Juri e Palma (1987)** demonstram isso na pele com úlcera de decúbito. Tal fato nos leva a crer que além dos aspectos morfológicos apresentados, provavelmente possa haver reflexos destas modificações no desempenho funcional dos tecidos sob ação do laser.

Neste sentido, **Mathew e Moore (1991)**; **Raspanti, Ottani e Ruggeri (1990)** e **Elliott (1965)** demonstram que no processo de regeneração do tendão, as populações de fibras e fibrilas tem organização e diâmetros em função dos estímulos mecânicos recebidos. Como observamos diâmetros de fibras de maior espessura e uma organização de melhor qualidade nos tendões tratados com laser em doses intermediárias dentre aquelas usadas neste trabalho, e entendendo que **Diamant et al. (1972)** mostrou que o desempenho mecânico dos tendões com estrutura do colágeno na forma de ondulações é de melhor qualidade, ou seja, suportam maiores cargas sob estresse, podemos inferir que provavelmente os tendões mostrados nas figuras 22-26 e 31-35 são ilustrativos da melhora no desempenho funcional. **Yahia, Drouin e Newman (1990)**; **Yahia et al. (1990)** e **Hunter e Finlay (1973)** também correlacionam a morfologia de ondulações nas diversas escalas de observação com desempenho funcional do tecido onde o colágeno se insere e funciona como a matriz de organização tecidual.

A idade cronológica das fibras parece ser outro fator no processo de reparação do tendão. As ondulações que aparecem precocemente nos animais tratados com laser demonstram um grau de maturação maior nas fibras colágenas e aumenta a capacidade de trações mecânicas (**Shah, 1982**; **Moore e Beaux, 1987**). Além do colágeno, é provável que outras

moléculas não colagênicas estejam envolvidas no desempenho mecânico dos tendões ou outros tecidos sujeitos a trações de maneira constante (Danielsen, 1981 e Yahia et al., 1990), especialmente as fibras elásticas e as proteoglicanas.

## ESPECTROSCOPIA POR INFRAVERMELHO (FT-IR)

Os espectros de colágeno do tendão mostrados nos resultados nos fornecem informações valiosas para o entendimento daquilo que provavelmente esteja acontecendo quando observamos morfologia com aumento do grau de enrolamento das fibrilas. Deslocamento da banda de absorção da amida I como observado na tabela 2 é demonstração clara do aumento das pontes de hidrogênio ligadas às hidroxilas, que podem ser tanto intramolecular como intermolecular.

A simetria da banda de absorção, sem aparecimento de ombros na faixa de 1658 a 1676  $\text{cm}^{-1}$ , é sinal de que há uma presença importante de estruturas  $\alpha$ -hélice e enrolamentos aleatórios (autoenrolamento) como estruturas secundárias deste polipeptídeo. A atribuição na faixa de 1.000-1.100  $\text{cm}^{-1}$  para as proteoglicanas é fato conhecido (Ozaki, Mizuno e Kaneuchi, 1992). Observamos nos espectros do tendão que esta absorção ocorreu com pico em cerca de 1.080  $\text{cm}^{-1}$ . Sabe-se que há uma grande concentração de proteoglicanas ácidas e sulfatadas, o que pode inclusive assinar com uma banda de absorção para o S próximo de 1.240  $\text{cm}^{-1}$ . Nossos dados mostram 1238  $\text{cm}^{-1}$  como assinatura atribuída ao grupo sulfato. Além das proteoglicanas, a banda próxima de 1.080  $\text{cm}^{-1}$  contém

vibrações de intensidade média para ácido hialurônico, que mostra uma banda adicional em  $1.238\text{ cm}^{-1}$ , juntamente com a amida III.

A absorção intensa nas bandas de amida I e amida II respectivamente em  $1.668$  e  $1.551\text{ cm}^{-1}$  mostram uma vibração característica atribuída por **Ozaki, Mizuno e Kaneuchi (1992)** a poliglicina, uma vez que o colágeno tem em um terço de sua molécula o aminoácido glicina.

**Sowa (1995)** atribui ao deslocamento vibracional em proteínas para valores superiores a estruturas com maior quantidade de  $\alpha$ -hélices, enquanto os deslocamentos inferiores, os agrupamentos são mais desordenados, chamados também de estruturas  $\beta$ . O fato de conseguirmos observar a vibração de amida I em valores em torno de  $1.668\text{ cm}^{-1}$ , cujas variações para números de onda superiores ou inferiores pode significar aumento ou diminuição da quantidade de ligações entre as moléculas de colágeno, especialmente as do tipo aquosas, onde a hidroxila forma pontes de H (**Wong, Wong e Fung, 1993**).

Internamente na molécula de colágeno, as pontes podem se formar relacionadas freqüentemente ao grupo carbonila, onde os resíduos ácidos cedem elétrons e se ligam mais fortemente, em pontes de H, o que está imbricado na formação da  $\alpha$ -hélice. O pico entre  $1.658$ - $1.672\text{ cm}^{-1}$  que aparece bem acentuado nos espectros obtidos neste trabalho, refere-se ao aumento de ligações das carbonilas com água, produzindo grande aproximação dos monômeros do colágeno, o que resulta em empacotamento molecular mais denso. (**George e Veis, 1991**).

Sob o ponto de vista da espectroscopia, ao observarmos as diferenças estatísticas relativas a variação dos picos referentes a amida I, onde o controle está em  $1.658,8\text{ cm}^{-1}$  e conta com uma grande variância e o os espectros obtidos do grupo tratado com laser com  $0,5\text{ J/cm}^2$ , cujo

valor médio está em  $1.676,7 \text{ cm}^{-1}$ , demonstra a coerência dos achados da análise morfológica, tanto com microscopia eletrônica de varredura como microscopia de força atômica. Associando os resultados anteriores com a diferença encontrada entre os grupos tratados com as doses de 0,5 e 5  $\text{J/cm}^2$ , e levando-se em consideração que os valores do grupo tratado com laser a 0,5  $\text{J/cm}^2$  são semelhantes quando comparados com o controle, podemos concluir que as doses efetivas foram 0,5 e 5  $\text{J/cm}^2$  no sentido de aumento na formação das pontes de hidrogênio e portanto melhor arranjo e empacotamento molecular, produzindo como consequência um aumento da junção das fibrilas de colágeno.

No que concerne ao papel da amida III, diferenças foram observadas em relação ao grupo controle, o que mostra que inclusive a presença de estiramento de C-N alifático intenso na estrutura da molécula do colágeno, provavelmente com a formação das pontes de dissulfeto, uma vez que o aumento do número de onda mostra elevação da vibração relacionada provavelmente com a banda do enxofre (S). Outra possível contribuição para esta banda é a quantidade de fosfodiéster (Sowa, 1995), cuja estrutura possibilita a formação também de pontes de hidrogênio entre as amidas III (Ozaki, 1989). A grande presença de metileno pode ser uma contribuição que não pode ser descartada nesta banda de vibração.

É interessante notar que a banda da amida III é bastante destacada por Jacobsen e Wasacz (1990), sendo fortemente influenciada por fatores como pH do meio, temperatura ou mesmo relacionados a preparação do material, podendo provocar deslocamentos nas bandas estudadas.

Além das diferenças estatísticas encontradas relativas ao deslocamento dos picos de vibração da amida I e amida III, ambas nos grupos sacrificados no 28º dia após a tenectomia, podemos notar que apesar de estatisticamente não serem diferentes os picos no 14º dia,

apontam uma tendência que se confirma no 28º dia. É o caso da amida I do controle versus  $50 \text{ J/cm}^2$  e amida III do grupo de  $0,5 \text{ J/cm}^2$  versus  $50 \text{ J/cm}^2$ .

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ainda é precoce fazer afirmações sobre as implicações destes resultados na utilização clínica do laser de baixa intensidade, apesar de haver uma carência muito grande de fundamentação nesta área do conhecimento. O que se pode depreender dos dados apresentados neste trabalho é que há possibilidades de aceleração do processo de reparação do tendão fotoestimulados pelo laser de baixa intensidade, dependente da dose, onde parece haver doses que atuam de maneira diferenciadas. Numa delas se conseguiu resposta menos intensa ( $0,5 \text{ J/cm}^2$ ), com outra, resposta mais intensa ( $5 \text{ J/cm}^2$ ), e outra dose ( $50 \text{ J/cm}^2$ ) que parece ser muito elevada, pois mostrou haver uma saturação do sistema envolvido no processo de reparo do tendão.

Não podemos afirmar que  $5 \text{ J/cm}^2$  é a dose melhor para atuação na reparação do tendão porque fizemos uma curva de doses com apenas três pontos, seguindo uma escala logarítmica, e portanto ficaria comprometida uma afirmação desta natureza. É necessário ter mais pontos da curva para se fazer tal afirmação, ajustando as intensidades de resposta até que se obtenha o máximo valor, que acredito, possa ser aplicado uma curva de distribuição de Gauss. Estas curvas seriam convenientes serem construídas para cada tipo de fenômeno a ser estudado sob fotoestimulação pelo laser de baixa intensidade.

O presente trabalho abre uma perspectiva de continuidade de toda uma linha de investigação sobre os fenômenos de interação do campo eletromagnético coerente e não coerente com o colágeno, analisado sob o ponto de vista da ordem na estrutura molecular, assim como a interação com outros modelos biológicos.

Questões como doses mais adequadas de laser para produzir melhores efeitos, saturação dos sistemas enzimáticos, adequação dos comprimentos de onda para as melhores absorções pelos diferentes tecidos são possibilidades de estudos futuros. Investigações são importantes para se elucidar mecanismos de interação dos campos eletromagnéticos coerentes e sua comparação com os campos não coerentes. Os fenômenos de fotobiomodulação (ativação ou inibição) nos diferentes tecidos e células, assim como na matriz extracelular de distintos órgãos são diretrizes para encaminhamento de algumas das questões levantadas no decorrer deste trabalho, que entendo, pode ser a solução viável para o tratamento de vários problemas de saúde.

## **CONCLUSÕES e CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Este trabalho mostra evidências que o laser de baixa energia tem efeitos significativos sobre o processo de reparação tecidual no tendão, especialmente relacionado com a matriz extracelular.

Diferentes doses do laser de HeNe produziram efeitos diferenciados quando analisados sob microscopia eletrônica de varredura, microscopia de força atômica e espectroscopia por infravermelho, métodos estes usados neste estudo cujos resultados foram complementares e se corroboraram.

Observações da estrutura fibrilar pela microscopia eletrônica de varredura evidenciou melhoria da organização tecidual e o depósito de

maior número de células para a síntese de material da matriz extracelular produzido pela fotoestimulação com laser de HeNe.

As análises realizadas pela microscopia de força atômica corroborou os dados da microscopia eletrônica de varredura, porém com amplificação das estruturas, permitindo observações em nível macromolecular, mostrando que o laser de HeNe estimulou a formação de colágeno precocemente, com melhor empacotamento e organização ao longo do eixo maior do tendão. Estes resultados demonstram também que a intensidade da fotoestimulação depende da dose do laser que foi empregada e não ocorre de maneira diretamente proporcional.

A espectroscopia por infravermelho pela transformada de Fourier pode fazer a complementação das informações ultra e nanoestruturais (morfológicas) com a análise daquilo que acontece intrinsecamente na molécula, mostrando que as hipóteses sobre as quais se analisava qualitativamente, se conseguiu um tratamento quantitativo e se mostrou muito útil para afirmar que o laser tem uma ação sobre a formação de pontes de hidrogênio na molécula do colágeno, durante o desenvolvimento do processo de reparação do tendão.

As doses de laser por ordem decrescente que foram superiores na fotoestimulação da molécula de colágeno com laser de 6 mW e comprimento de onda de 632,8 nm foram as seguintes: 5 J/cm<sup>2</sup>, 0,5 J/cm<sup>2</sup> e 50 J/cm<sup>2</sup>.

Estes resultados confirmam alguns dados da literatura aplicados sobre outros processos e abre uma perspectiva de novos estudos para elaborar curvas de dose-resposta e observações de diferentes comprimentos de onda, coerentes ou não, aplicados sobre os tecidos biológicos sob diferentes modelos experimentais.

Podemos concluir que o laser de HeNe:

- 1- Teve efeito na reparação tecidual.
- 2- As melhores doses de laser de baixa intensidade entre aquelas empregadas neste trabalho foram 0,5 e 5 J/cm<sup>2</sup>.
- 3- Houve uma aceleração na velocidade de reparo do tendão observável no 14º dia e bastante evidente no 28º dia após a lesão total do tendão (tenectomia).
- 4- Pode-se afirmar que houve um aumento na quantidade de pontes de hidrogênio formadas na molécula de colágeno pela fotoativação pelo laser de HeNe detectada pela espectroscopia por infravermelho.
- 5- Houve uma melhor organização da estrutura fibrilar e molecular do colágeno, com melhor orientação azimutal e empacotamento dos feixes de fibras e das moléculas, com destaque para a espessura dos feixes formados.
- 6- Os métodos utilizados para análise foram complementares e eficientes quanto ao objetivo de análise estrutural e bioquímica da matriz extracelular no tendão do rato.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, T.P.; WU, Y.V. e KEIMAN, R. - Evidence of  $A$  and  $E_1$  normal mode absorbances in the infrared spectrum of hemoglobin. **Applied Spectrosc.** **44(5)**: 899- 900, 1990.
- ABERGEL, R.P.; MEEKER, C.; LAM, T.; DWYER, R.M.; LYONS, R.F. e CASTEL, J.C. - Control of connective tissue metabolism by laser. Recent developments and future prospects. **Dermat. Surg.** **11**: 1142- 1150, 1984.
- ABERGEL, R.P.; LYONS, R.F. e CASTEL, J.C. - Biostimulation of wound healing by lasers: experimental approaches in animal models and fibroblast cultures. **J. Dermat. Surg. Oncol.** **13**: 127- 133, 1987.
- ASPDEN, R.M. e HUKINS, W.L. - Stress in collagen fibrils of articular cartilage calculated from their measured orientations. **Matrix** **9**: 486- 488, 1989.
- ATHENSTAEDT, H.- Pyroelectric and piezoelectric properties of vertebrates. **Ann. N.Y Acad. Sci.** **238**: 68-93, 1974.
- BALBONI, G.G.; ZONEFRATTI, R. e BRANDI, M.L. - Effects of HeNe/IR laser irradiation on two lines of normal human fibroblasts *in vitro*. **Arch. Ital. Anat. Embriol.** **91(3)**: 179- 188, 1986.
- BARANAUSKAS, V.; VIDAL, B.C. e PARIZOTTO, N.A. - Observation of geometric structure of collagen molecules by atomic force microscopy. **Applied Biochem. Biotechnol.** **69**: 91- 97, 1998.



- BUCK, R.A. - Reorientation response of cells to repeated stretch and recoil of substratum. **Exp. Cell Res.** 127: 470-474, 1980.
- BUTT, H.J.; WOLFF, E.K.; GOULD, S.A.C.; NORTHERN, B.D.; PETERSON, C.M. e HANSMA, P.K. - Imaging Cells with the Atomic Force Microscope. **J. Struct. Biol.** 105: 54-61, 1990.
- CARBONARE, M.D. e PATHAK, M.A. - Skin photosensitizing agents and the role of reactive oxygen species in photoaging. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.** 14: 105- 124, 1992.
- CASTRO, D.J.; ABERGEL, P. MEEKER, C.; DWYER, R. e JOHNSTON, K. - Effects of Nd-YAG laser on DNA synthesis and collagen production in human skin fibroblast cultures. **Annals Plast. Surg.** 11(3): 214- 222, 1983.
- CHARMAN, R.A. - Cellular reception and emission of electromagnetic signals. **Physiotherapy** 76(9): 509- 516, 1990.
- CHEONG, W.F.; PRAHL, S.A. e WELCH, A.J. - A review of the optical properties of biological tissues. **IEEE J. Quantum Electron.** 26(12): 2166- 2185, 1990.
- CHVAPIL, M. - Reconstituted collagen. IN: **Biology of Collagen.** VIIDIK, A. e VUUST, J. (Ed.), Academic Press, London, Cap. 22, p. 214, 1980.
- CLARK, R.A.F. - Cutaneous tissue repair: basic biologic considerations. **J. Amer. Acad. Dermatol.** 13: 701- 725, 1985.
- COLVER, G.B. e PRIESTLY, C.G. - Failure of He-Ne to affect components of wound healing *in vitro*. **British J. Dermatol.** 121: 179- 186, 1989.

- COTTA, M.A. - Estudo de efeitos não térmicos da radiação laser em tecidos vivos. **Dissertação de Mestrado**, Instituto de Física "Gleb Wataghin", UNICAMP, 1987.
- DANIELSEN, C.C. - Mechanical properties of reconstituted collagen fibrils. **Connect. Tissue Research** 9: 51- 57, 1981.
- DEVOR, M. - What's in a beam for pain therapy? **Pain** 43: 139, 1990.
- DEWITT, M.T.; HANDLEY, C.J.; OAKES, B.W. e LOUTHER, D.A. - In vitro response of chondrocytes to mechanical loading. The effect of short term mechanical tension. **Connective Tissue Res.** 12: 97-109, 1983.
- DIAMANT, J.; KELLER, A.; BAER, E.; LITT, M. E ARRIDGE, R.G.C. - Collagen; ultrastructure and its relation to mechanical properties as a function of ageing. **Proc. R. Soc. Lond. B.** 180: 293-315, 1972.
- DYSON, M. e YOUNG, S. - The effect of laser therapy on wound contraction and cellularity in mice. **Lasers Med. Sci.** 1: 125- 130, 1986.
- EGGER, M.; OHNESORGE, F.; WEISENHORN, A.L.; HEYN, S.P.; DRAKE, B.; PRATER, C.B.; GOULD, S.A.C.; HANSMA, P.K. e GAUB, H.E. - Wet Lipid-Protein Membranes Imaged at Submolecular Resolution by Atomic Force Microscopy. **J. Struct. Biol.** 103: 89-94, 1990.
- ELLIOTT, D.H. - The growth of tendon after denervation or excision of its muscle. **Proc. R. Soc. Lond. B.** 162: 203-209, 1965.
- ENWEMEKA, C.S.; RODRIGUEZ, O.O.; GALL, N.G. e WALSH, N.E. - Morphometrics of collagen fibrill populations in HeNe laser photobiostimulated tendons. **J. Clin. Laser Med. Surg.** 6: 47- 52, 1990.

- ENWEMEKA, C.S. - Connective tissue plasticity: ultrastructural, biomechanical, and morphometric effects of physical factors on intact and regenerating tendons. **J. Orth. Sports Phys. Ther.** **14(5)**: 198-212, 1991.
- EYRE, D.K. - Collagen: Molecular Diversity in the Body's Protein Scaffold. **Science** **207(3)**: 1315-22, 1980.
- FLOCK, S.T.; PATTERSON, M.S.; WILSON, B.C. e WYMAN, D.R. - Monte Carlo modeling of light propagation in highly scattering tissues - I: Model predictions and comparison with diffusion theory. **IEEE Trans. Biom. Eng.** **36(12)**: 1162- 1167, 1989a.
- FLOCK, S.T.; WILSON, B.C. e PATTERSON, M.S. - Monte Carlo modeling of light propagation in highly scattering tissues - II: Comparison with measurements in phantoms. **IEEE Trans. Biom. Eng.** **36(12)**: 1169- 1173, 1989b.
- FRANCO, W.; SILVEIRA, J.E.N. e PARIZOTTO, N.A. - Effect of Low Intensity Infrared Laser Radiation of on Hydrosmotic Action of Vasopressin (AVP) in the Isolated Toad Bladder. **Laser Therapy** No Prelo, 1997.
- FRASER, R.D.B.; MacRAE, T.P.; MILLER, A. e SUZUKI, E. - Molecular conformation and packing in collagen fibrils. **J. Mol. Biol.** **167**: 497- 521, 1983.
- FRASER, R.D.B.; MacRAE, T.P. e MILLER, A. - Molecular Packing in Type I Collagen Fibrils. **J. Mol. Biol.** **193**: 115-25, 1987.
- FROLICH, H. - Coherent electrical vibrations in biological systems and the cancer problem. **Trans. Microwave: Theory and Techniques IEEE** **26**: 613 -617, 1978.

- FROLICH, H. - Theoretical physics and biology. IN: FROLICH, H. (Ed.) **Biological Coherence and Response to External Stimuli**. Springer-Verlag, Heidelberg, 1988.
- FUKADA, E. Piezoelectric properties of organic polymers. **Ann. N.Y Acad. Sci. 238**: 7- 25, 1974.
- Gamaleya, N.F. - Laser biomedical research in the URSS. In: Wolbarsht, M.L. (ed.) **Laser Application in Medicine and Biology**, New York, Plenum Press, Vol. I, 1-177, 1977.
- GAM, A.N.; THORSEN, H. e LONNBERG, F. - The effect of low-level laser therapy on musculoskeletal pain: a meta-analysis. **Pain 52**: 63-66, 1993.
- Garden, J.M.; Robinson, J.R.; Taute, P.M.; Lautenschlager, E.P.; Leibovich, S.J. e Hartz, R.S. - The low-output Carbon Dioxide Laser for cutaneous wound closure of scalpel incisions: Comparative tensile strength studies of the Laser to suture and staple for wound closure. **Lasers Surg. Med. 6**: 67-71, 1986.
- GEORGE, A. e VEIS, A. - FTIRS in H<sub>2</sub>O demonstrates that collagen monomers undergo a conformational transition prior to thermal self-assembly in vitro. **Biochemistry 30**: 2372- 2377, 1991.
- GLASSBERG, E.; LASK, G.P.; TAM, E.M.L. e UITTO, J. - Cellular effects of the pulsed tunable dye laser at 577 nanometres on human endothelial cells, fibroblasts and erythrocytes. **Lasers Surg. Med. 8**: 567- 572, 1988.
- GLIMCHER, 1960 *APUD* In: **Treatise on Collagen**. RAMACHANDRAN, G.N. (Ed.), vol. 2, Academic Press, New York, 1968.

- GROSWEINER, L.I.; KARAGIANNES, J.L.; JOHNSON, P.W. e ZHANG, Z. - Gaussian beam spread in biological tissues. **Applied Optics** **29**(3): 379- 383, 1990.
- GORDON, J.P.; ZEIGER, H.J. e TOWNES, C.H. - The maser. New type of amplifier, frequency standard and spectrometer. **Phys. Rev.** **99**: 1264- 1274, 1955.
- HALLMAN, H.O., BASFORD, J.R.; O'BRIEN, J.F. E CUMMINS, L.A. - Does low energy He-Ne laser irradiation alter *in vitro* replication of human fibroblasts? **Lasers Surg. Med.** **8**: 125- 129, 1988.
- HANSMA, P.K.; ELINGS, V.B.; MARTI, O. e BRACKER, C.E. - Scanning tunneling microscopy and atomic force microscopy: application to biology and technology. **Science** **242**: 209- 228, 1988.
- HARDY, L.B.; HARDY, F.S.; FINE, S.; XXXX - Effect of ruby laser radiation on mouse fibroblast culture. **Fed. Proc.** **26**: 668- 673, 1967.
- HAUGSTAD, G. e GLADFELTER, W.L. - Probing biopolymers with scanning force methods: adsorption, structure, properties, and transformation of gelatin on mica. **Langmuir** **10**: 4295- 4306, 1994.
- HOU, J.S.; MOW, V.C.; LAI, W.M. e HOLMES, M.H. - An analysis of the squeeze-film lubrication mechanism for articular cartilage. **J. Biomechanics** **25**(3): 247-259, 1992.
- HUNTER, J.; LEONARD, L.; WILSON, R.; SNIDER, G. e DIXON, I. - Effects of low energy laser on wound healing in a porcine model. **Lasers Surg. Med.** **3**: 285- 290, 1984.
- HUNTER, J.A.A. e FINLAY, B. - Scanning electron microscopy of connective tissues in health and disease. **Intern. Rev. Connect. Tis. Res.** **6**: 218-256, 1973.

- INOUE, K.; NISHIOKA, J. e HUKUDA, S. - Altered lymphocyte proliferation by low dose laser irradiation. **Clin. Exp. Rheumat.** 7: 521- 523, 1989.
- JAKOBSEN, R.J. e WASACZ, F.M. - Infrared spectra-structure correlations and adsorption behavior for helix proteins. **Applied Spectrosc.** 44(9): 1478- 1490, 1990.
- JASCHKE, M.; BUTT, H.J. e WOLFF, E.K. - Imaging flagella of *Halobacteria* by atomic force microscopy. **Analyst** 119(9): 1943- 1946, 1994.
- JONES, E.Y. e MILLER, A. - Analysis of structural design features in collagen. **J. Mol. Biol.** 218: 209- 219, 1991.
- JURI, H. e PALMA, J.A. - CO<sub>2</sub> Laser in decubitus ulcers: A comparative study. **Lasers Surg. Med.** 7: 296-299, 1987.
- KARU, T.I. - Photobiological fundamentals of low power laser therapy. **IEEE J. Quantum Electron.** 23(10): 1703- 1717, 1987.
- KARU, T.I. - Molecular mechanism of the therapeutic effect of low intensity laser irradiation. **Lasers Life Sci.** 2: 53- 74, 1988.
- KARU, T.I. - Photobiology of Low-Power Laser Therapy. In: **Laser Science and Technology**. LETOKHOV, SHANK, SHEN e WALTHER (Eds.) Vol. 8, 1989.
- KARU, T.I.; PYATIBRAT, L.V.; KALENDO, G.S. e ESENALIEV, R.O. - Effects of monochromatic low-intensity light and laser irradiation on adhesion of HeLa cells *in Vitro*. **Laser Surg. Med.** 18: 171- 177, 1996.

- KASUYA, T. e TSUKAKOSHI, M. - Laser microirradiation of cells. In: **Laser Science and Technology**. LETOKHOV, SHANK, SHEN e WALTHER (Eds.) Vol. 1, 1988.
- KIRSCH, J.L. e KOENIG, J.L. - The variable-temperature FT-IR study of the secondary structure of  $\gamma$ -globulin, chymotrypsin, serum albumin, and  $\beta$ -lactoglobulin in aqueous solution. **Applied Spectrosc.** 43(3): 445- 451, 1989.
- KONDYURIN, A.V.; KOZULIN, A.T. e MIKOV, S.N. - Fragment method for the study of hydrogen bonding in polymers. **Vibrat. Spectrosc.** 2: 183- 186, 1991.
- KROETINGER, M. - On the use of laser in acupuncture. **Int. J. Acup. Electrot. Res.** 5: 279- 311, 1980.
- LACAPERE, J.J.; STOKES, D.L. e CHATENAY, D. - Atomic Force Microscopy of Three-dimensional Membrane Protein Crystals: Ca-ATPase of Sarcoplasmic Reticulum. **Biophys. J.** 63(8): 303-8, 1992.
- LAIHO, R.; LEVOLA, T. e SNELLMAN, H. - A Scanning Tunneling Microscope Constructed in a Rigid Square Frame. **Surface Sci.** 181: 370-5, 1987.
- LAM, T.; ABERGEL, P.; MEEKER, C.; DWYER, RM.; e CASTEL, J.C. - Low-energy lasers selectively enhance collagen synthesis. **Lasers Surg. Med.** 3: 328- 335, 1984.
- LIBOFF, A.R. e FURST, M. - Pyroelectric effect in collagenous structure. **Ann. N.Y Acad. Sci.** 238: 26- 35, 1974.
- LICHT, S. - History of ultra-violet therapy. In: LICHT, S. (ed.) **Therapeutic electricity and ultra-violet radiation**. 2nd edition, Williams & Wilkins, Baltimore, 1967.

- LIEVENS, P. - The influence of laser irradiation on the motricity of lymphatical system and on the wound healing process. **Proceedings International Congress Laser Medicine Surgery**, p. 171-174, 1985
- LIPSHITZ, H.; ETHEREDGE, I.I.I.R. e GLIMCHER, M.J. - Changes in the hexosamine content and swelling ratio of articular cartilage as function of depth from the surface. **J. Bone Joint Surg.** **58A**: 1149-1153, 1976.
- LIU, Z.Q.; RANGAYYAN, R.M. E FRANK, C.B. - Statistical analysis of collagen alignment in ligaments by scale-space analysis. **IEEE Transactions on Biomed. Eng.** **38**(6): 580- 587, 1991.
- LYONS, R.F.; ABERGEL, R.P.; WHITE, R.A.; DWYER, R.; CASTEL, J.C. e UITTO, J. - Biostimulation of wound healing *in vivo* by helium neon laser. **Annals Plast. Surg.** **18**: 47- 52, 1987.
- LONGMORE, R.B. e GARDNER, D.L. - Development with age of human articular cartilage surface structure. **Annals Rheum. Dis.** **34**: 26-37, 1975.
- LONGO, L.; EVANGELISTA, S.; TINACCI, G. e SESTI, A.G. - Effects of diode Laser Silver Arsenide-Aluminium (Ga-Al-As) 904 nm on healing of experimental wounds. **Lasers Surg. Med.** **7**: 444-447, 1987.
- MAIMANN, T.H. - Stimulated optical radiation in ruby. **Nature** **187**: 493, 1960.
- MANSKE, P.R. E LESKER, B.S. - Histologic evidence of intrinsic flexor tendon repair in various experimental animals: An *In Vitro* study. **Clin. Orthop. Rel. Res.** **182**: 297- 304, 1984.
- MARCHESINI, R.; BERTONI, A.; ANDREOLA, S.; MELONI, E. e SICHIROLLO, A.E. - Extinction and absorption coefficients and

- scattering phase functions of human tissues *in vitro*. **Applied Optics** **28**(12): 2318- 2324, 1989.
- MARCUS, S.L. e DUGAN, M.H. - Global status of clinical photodynamic therapy: The registration process for a new therapy. **Lasers Surg. Med.** **12**: 318- 324, 1992.
- MAROUDAS, A. e BULLOUGH, P. - Permeability of articular cartilage. **Nature** **219**: 1260-1261,1968.
- MAROUDAS, A.; MISRAHI, J.; KATZ, E.P.; WACHTEL, E.J. e SOUDRY, M. - IN: KUETTNER, K et al. (Ed.) **Articular Cartilage Biochemistry**. Raven Press, New York, 311-329, 1986.
- MATTHEW, C.A. E MOORE, M.J. - Regeneration of rat extensor digitorum longus tendon: The effect of a sequential partial tenotomy on collagen fibril formation. **Matrix** **11**: 259- 268, 1991.
- MELLO, M.L.S. e VIDAL, B.C. - Anisotropic properties of toluidine blue-stained collagen. **Annls Histochem.** **18**: 103- 122, 1973.
- MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C.; CARVALHO, A.C. e CASEIRO-FILHO, A.C. - Change with age of anisotropic properties of collagen. **Gerontology** **25**: 2-8, 1979.
- MESTER, E. e JASZSAGI-NAGY, E. - The effect of laser radiation on wound healing and collagen synthesis. **Studia Biophysica** **35**: 227- 230, 1973.
- MESTER, E.; MESTER, A.F. e MESTER, A. - Les effets bio-stimulants du laser. **Lyon Chirurgical** **80**(6): 457- 459, 1984.
- MESTER, E.; MESTER, A.F. e MESTER, A. - The biomedical effects of laser application. **Lasers Surg. Med.** **5**: 31- 39, 1985.

- MESTER, E.; MESTER, A. e TÖTH, J. - Effetto biostimolante del raggi laser. **Min. Riflessoter. Laserter.** 1: 29- 34, 1984.
- MESTER, E.; NAGYLUCSKAY, S.; TISZA, S.; SPIRY, T. e KORENYI-BOTH, A. - Stimulation of wound healing by means of laser rays. **Acta Chir. Acad. Sci. Hung.** 19: 163- 170, 1978.
- MILLER, E.J. - Biochemical characteristics and biological significance of the genetically-distinct collagens. **Mol. Cell. Biochem.** 13: 165-192, 1976.
- MOES, C.J.M.; VAN GEMERT, M.J.C.; STAR, W.M.; MARIJNISSEN, J.P.A. e PRAHL, S.A. - Measurements and calculations of the nergy fluence rate in a scattering and absorbing phantom at 633 nm. **Applied Optics** 28(12): 2292- 2303, 1989.
- MOORE, M.J. e BEAUX, A. - A quantitative ultrastructural study of rat tendon from birth to maturity. **J. Anat.** 153: 163-169, 1987.
- NEAGU, C.; van der WERF, K.O.; PUTMAN, C.A.J.; KRAAN, Y.M.; de GROOTH, B.G.; van HULST, N.F. e GREVE, J. - Analysis of Immunolabeled Cells by Atomic Force Microscopy, Optical Microscopy and Flow Cytometry. **J. Struct. Biol.** 112: 32-40, 1994.
- NEMETSCHKEK, TH.; JELINEK, K.; KNÖRZER, E.; MOSLER, E.; NEMETSCHKEK-GANSLER,H.; RIEDL,H. E SCHILLING, V. - Transformation of the structure of collagen: A time resolved analysis of mechanochemical processes using synchrton radiation. **J. Molec. Biol.** 167: 461- 479, 1983.
- OHSHIRO, T. - **Low Reactive-Level Laser Therapy: Practical Application.** John Wiley & Sons, Chichester, 242 p., 1991.

- OHTA, A.; ABERGEL, R.P.; UITTO, J.; DWYER, R. e JOHNSTON, K. - Laser modulation of human immune system: Inhibition of lymphocyte proliferation by Gallium-Arsenide laser at low energy. **Lasers Surg. Med.** 7: 199- 201, 1987.
- OKADA, K.; OZAKI, Y.; KAWAUCHI, K. e MURAIISHI, S. - The usefulness of infrared microspectroscopy for IR spectroscopic measurements of solid proteins. **Applied Spectrosc.** 44(8): 1412-1414, 1990.
- OZAKI, Y.; KANEUCHI, F.; IWAMOTO, T.; YOSHIURA, M. e IRIYAMA, K. - Nondestructive analysis of biological materials by FT-IR-ATR. Method I: Direct evidence for the existence of collagen helix structure in lens capsule. **Applied Spectrosc.** 43(1): 138- 141, 1989.
- OZAKI, Y. e KANEUCHI, F. - Nondestructive analysis of biological materials by ATR/FT-IR spectroscopy. Part II: Potencial of the ATR method in clinical studies of internal organs. **Applied Spectrosc.** 43(4): 723- 725, 1989.
- OSAKI, Y.; ARITARE, M. e KANEUCHI, F. - Structural differences between type I and type IV collagen in biological tissues studied *in Vivo* by attenuated total reflexion/Fourier transform infrared spectroscopy. **Applied Spectrosc.** 46(4): 626- 630, 1992.
- PAGAN, C.J.B.; BASTOS, L.L.; DOI; LOBOSCHI, E.M.; SANTOS, P.S. e PARIZOTTO, N.A. - Estudo de potenciais evocados somatosensoriais causados por estimulação laser. **Anais do VI Simpósio Estadual de Lasers e Aplicações**, p.43, São Carlos (SP), 17-19 de outubro, 1994.
- PARIZOTTO, N.A. - **Estudo da influência da estimulação elétrica, do carbacol e da ligadura do nervo ciático do rato sobre a recuperação funcional após axotomia.** Dissertação de Mestrado,

Faculdade de Medicina de Riberão Preto, Universidade de São Paulo, 1977.

PARIZOTTO, N.A.; BARANAUSKAS, V. e VILARTA, R. - Morfologia sub-micrométrica de superfícies de cartilagens: variação de profundidades em articulações sujeitas a diferentes tensões de compressão. **Reunião Anual da FESBE - Caxambú (MG)**, 1993.

PASCHOAL, J. R. - **Efeito do grau de coerência da luz laser na cicatrização de lesão cutânea experimental**. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP Campinas, 1991.

PASSARELLA, S.; CASAMASSIMA, E.; MOLINARI, S.; CARETTO, G. e JIRILLO, E. - Increase of proton electrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated *in vitro* by helium-neon laser. **FEBS Lett.** **175**: 95- 99, 1984.

PEREIRA, R.S.; PARIZOTTO, N.A. e BARANAUSKAS, V. - Observation of Baker's yeast strains used in biotransformation by atomic force microscopy. **Appl. Biochem. Biotechnol.** **59(2)**: 135-143, 1996.

PERKINS, W.D. - Fourier transform-infrared spectroscopy. Part I. Instrumentation. **J. Chem. Educ.** **63(1)**: A5- A10, 1986.

PERKINS, W.D. - Fourier transform-infrared spectroscopy. Part II. Advantages of FT-IR. **J. Chem. Educ.** **64(11)**: A269- A271, 1987.

POURREAU-SCHNEIDER, N.; AHMED, A. e SOUDRY, M. - He-Ne laser treatment transform fibroblasts into myofibroblasts. **Am. J. Pathol.** **137**: 171- 178, 1990.

- QUARTO, E.; MARTINO, G. e MICHELINI, G. - Succinic oxidase activity in He-Ne laser irradiated mitochondria. **Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim.** **129**: 133- 137, 1988.
- QUATE, C.F. - Vacuum Tunneling: A new Technique for Microscopy. **Phys. Today** **8**: 26-33, 1986.
- QUICKENDEN, T.I. e TILBURY, R.N. - A critical examination of the bioplasma hypothesis. **Physiol. Chem. Phys. Med. NMR** **18**: 89- 101, 1986.
- RADMACHER, M.; FRITZ, M.; CLEVELAND, J.P.; WALTERS, D.A. e HANSMA, P.K. - Imaging adhesion forces and elasticity of lysozime adsorbed on mica with the atomic force microscope. **Langmuir** **10**: 3809- 3814, 1994.
- RAMACHANDRAN, G.N.; BANSAL, M. e BHATNAGAR, R.S. - A hypothesis on the role of hydroxyproline in stabilizing collagen structure. **Biochim. Biophys. Acta** **322**: 166- 171, 1973.
- RASPANTI, M.; OTTANI, V. e RUGGERI, A. - Subfibrillar architecture and functional properties of collagen: a comparative study in rat tendons. **J. Anat.** **172**: 157- 164, 1990.
- RICEVIUTI, G.; MAZZONE, A. e MONAIA, C. - *In vivo* and *in vitro* He-Ne laser effects on phagocyte function. **Inflammation** **1395**: 507- 527, 1989.
- RIUL, Jr., A.; MATTOSO, L.H.C.; TELLES, G.D.; HERRMANN, P.S.P.; COLNAGO, L.A.; PARIZOTTO, N.A.; BARANAUSKAS, V.; FARIA, R.M. e OLIVEIRA, Jr., O.N. - Characterization of Langmuir-Blodgett films of parent polyaniline. **Thin Solid Films** **284-285**: 177- 180, 1996.

- ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S. e KUMAR, V. L. Inflamação aguda e crônica. In: **Patologia básica**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. p. 21-39.
- ROCHKIND, S.; ROUSSO, M.; NISSAN, M.; VILLAREAL, M.; BARR-NEA, L. e REES, D.G. - Systemic effects of low-power Laser irradiation on the peripheral and central nervous system, cutaneous wounds, and burns. **Lasers Surg. Med.** 9: 174-182, 1989.
- ROITT, I.; BROSTOFF, J. e MALE, D. - **Imunology**. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1985.
- SAPERIA, D.; GASSBERG, E.; LYONS, R.F.; ABERGEL, R.P.; BANEUX, P.; CASTEL, J.C.; DWYER, R. E UITTO, J. - Demonstration of elevated type I and type III procollagen mRNA levels in cutaneous wounds treated with Helium-Neon laser. **Biochem. Biophys. Res. Com.** 138(3): 1123-1128, 1986.
- SCHMITT, J.M.; ZHOU, G.X.; WALKER, E.C. e WALL, R.T. - Multilayer model of photon diffusion in skin. **J. Opt. Soc. Am. A** 7(11): 2141- 2153, 1990.
- SCOTT, J.E. - Oxygen and the connective tissues. **Trends In Biological Sciences.** 17: 340- 343, 1992.
- SHAH, J.S.; PALACIOS, E. e PALACIOS, L. - Development of crimp morphology and cellular changes in chick tendons. **Develop. Biol.** 94: 499-504, 1982.
- SHAKESHEFF, K.M.; DAVIES, M.C.; ROBERTS, C.J.; TENDLER, S.J.B.; SHARD, A.G. e DOMB, A. - *In situ* atomic force microscopy imaging of polymer degradation in an aqueous environment. **Langmuir** 10: 4417- 4419, 1994.
- SILVEIRA, J.E.N.; CARVALHO, V.; PIRES, M.S.S.; PEREZ, S.E.A. E PARIZOTTO, N.A. - Efeito da radiação laser de baixa potência sobre

- o transporte de água em bexiga de sapo. **Anais da IV Reunião Anual da FESBE**, pag. 359, Caxambú (MG), 1989.
- SIPERKO, L.M. e LANDIS, W.J. - Atomic force microscopic determination of substrate effects on the structure of deposited biomineral phosphates. **Analyst** 119(9): 1935- 1938, 1994.
- SMITH, C.W. - Electromagnetic effects in humans. IN: FROLICH, H. (Ed.) **Biological Coherence and Response to External Stimuli**. Springer-Verlag, Heidelberg, 1988.
- SOWA, M.G.; WANG, J.; SCHULTZ, C.P.; KHALIQUE, A. e MANTSCH, H.H. - Infrared spectroscopic investigation of *in vivo* and *ex vivo* human nails. **Vibrat. Spectrosc.** 10: 49- 56, 1995.
- STERN, S.J.; CRAIG, J.; FLOCK, S.; MONTAGUE, D.; WANER, M. e JACQUES, S. - Tumor specific response to photodynamic therapy. **Lasers Surg. Med.** 13: 434- 439, 1993.
- TOCCO, G.; LE BORGNE DE KAOUEL, C. e AUBERT, C. - He-Ne and IR mid-laser influences in skin cells *in vitro*-preliminary results. **Proceedings Intern. Congress Lasers Surgery Medicine** p. 175-182, 1985.
- TOMBERG, V.T. - Non-thermal biological effects of laser beams. **Nature** 204: 868- 870, 1964.
- TRELLES, M.A. e MAYAYO, E. - Bone fracture consolidates faster with low-power laser. **Lasers Surg. Med.** 7: 36- 45, 1987.
- TSUCHIDA, T.; AIZAWA, K.; BABA, J.; FURUKAWA, K.; YAMAMOTO, H.; KAWATE, N.; KONAKA, C.; KATO, H.; HAYATA, Y. e ISHITSUKI, M. - Wound healing in mice using He-Ne scanning laser. **J. Clin. Laser Med. Surg.** 7(8): 256-266, 1991.

- VAN GEMERT, M.J.C.; JACQUES, S.L.; STERENBORG, H.J.C.M. e STAR, W.M. - Skin optics. **IEEE Trans. Biom. Eng.** **36**(12): 1146-1154, 1989.
- VIDAL, B.C. - The part played by mucopolysaccharides in form birrefringence of the collagen. **Protoplasma** **59**: 472-479, 1964.
- VIDAL, B.C. - Collagen bundle regulation and control (biocybernetics). **Revta. Bras. Pesq. Med. Biol.** **2**: 356- 359, 1969.
- VIDAL, B.C. - Dichroism in collagen bundles stained with Xilidine-Ponceau 2R. **Ann. Histochem.** **15**: 289-296, 1970.
- VIDAL, B.C.; MELLO, M.L.S.; GODO, C.; CASEIRO-FILHO, A.C. e ABUJADI, J.M. - Anisotropic properties of silver plus gold-impregnated collagen bundles: ADB and form birrefringence curves. **Ann. Histochem.** **20**: 15-26, 1975.
- VIDAL, B.C. - Matriz Extracelular. In: VIDAL, B.C. e MELLO, M.L.S. - **BIOLOGIA CELULAR**. Cap. 19 Livraria Atheneu, Rio de Janeiro, 1977a, pag. 273.
- VIDAL, B.C. - Acid glycosaminoglicans and endochondral ossification. Microspectrophotometry and macromolecular orientation. **Cell Mol. Biol.** **22**: 45-64, 1977b.
- VIDAL, B.C. - The part played by proteoglycans and structural glycoproteins in the macromolecular orientation of collagen bundles. **Cell. Mol. Biol.** **26**: 415-421, 1980.
- VIDAL, B.C. e MELLO, M.L.S. - Proteoglycan arrangement in tendon collagen bundles. **Cell. Mol. Biol.** **30**: 195- 204, 1984.

- VIDAL, B.C. - Interações células-matriz extracelular: uma unidade estrutural e sistemática. **Rev. Fac. Cien. Med. Unicamp** 4: 33 - 40, 1989.
- VIDAL, B.C. e CARVALHO, H.F. - Aggregational state and molecular order of tendons as a function of age. **Matrix** 10: 48-57, 1990.
- VIDAL, B.C.; BARANAUSKAS, V. e PARIZOTTO, N.A.- Atomic force microscope analysis on tendon collagen tipe I: molecular structure and molecular order. **5Th International Congress on Cell Biology**, p. 64: 6.1 - Madrid (Spain), 1992.
- VOLPI, M. e KATZ, E.P. - On the adaptative structures of the collagen fibrils of bone and cartilage. **J. Biomechanics** 24(Suppl 1): 67- 77, 1991.
- WALKER, P.S.; DOWSON, D.; LONGFIELD, M.D. e WRIGHT, V. - 'Boosted lubrication' in synovial joints by fluid entrapment and enrichment. **Annals Rheum. Dis.** 27: 512- 520, 1968.
- WHITE, A.; HANDLER, P. e SMITH, E.L. - Connective Tissue. IN: **Principles of Biochemistry**. Mac Graw- Hill Books Co., New York, Fifth edition, Cap. 38, pg. 978-994, 1973.
- WILSON, B.C. e JACQUES, S.L. - Optical reflectance and transmittance of tissues: principles and applications. **IEEE J. Quantum Electron.** 26(12): 2186- 2199, 1990.
- WONG, P.T.T. e RIGAS, B. - Infrared spectra of microtome sections of human colon tissues. **Applied Spectrosc.** 44(10): 1715- 1718, 1990.
- WONG, P.T.T.; WONG, R.K. e FUNG, M.F.K. - Pressure-tuning FT-IR study of human cervical tissues. **Applied Spectrosc.** 47(7): 1058-1063, 1993.

- YAHIA, H.; DROUIN, G. e NEWMAN, N. - Structure-function relationship of human spinal ligaments. **Z. Mikrosk. Anat. Forsch. Leipzig** **104**(1): 33-45, 1990.
- YAHIA, H.; BRUNET, J.; LABELLE, S. e RIVARD, C.H. - A scanning electron microscopic study of rabbit ligaments under strain. **Matrix** **10**: 58-64, 1990.
- YOON, G.; PRAHL, S.A. e WELCH, A.J. - Accuracies of the diffusion approximation its similarity relations for laser irradiated biological media. **Applied Optics** **28**(12): 2250- 2255, 1989.
- YOUNG, S.; BOLTON, P. e DYSON, M. - Macrophage responsiveness to light therapy. **Lasers Surg. Med.** **9**: 497- 505, 1989.
- ZEDELFT, B. - Factors influencing wound healing. IN: **Biology of Collagen**. VIIDIK, A. e VUUST, J. (Ed.) Academic Press, London, cap. 25, p. xx, 1980.
- ZON, J.R. - The living cell as a plasma physical system. **Physiol. Chem. Phys.** **12**: 357- 364, 1980.