

**ANDRÉ LUIZ MAIA DO VALE**

**AVALIAÇÃO DO LASER DE ARSENIETO DE GÁLIO (AS-GA) NO PROCESSO DE  
REPARAÇÃO MUSCULAR DO RATO**

**BRASÍLIA**

**2008**

**ANDRÉ LUIZ MAIA DO VALE**

**O USO DO LASER DE ARSENIETO DE GÁLIO (AS-GA) NO PROCESSO DE  
REPARAÇÃO MUSCULAR DO RATO**

Dissertação apresentada, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília – UnB.

Orientador: Prof.Dr. Paulo Gonçalves de Oliveira.

**BRASÍLIA**

**2008**

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>II</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>IV</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>V</b>
<b>LISTA DE GRÁFICOS</b> .....	<b>VI</b>
<b>LISTA DE QUADROS</b> .....	<b>VII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>VIII</b>
<b>LISTA DE ANEXOS</b> .....	<b>IX</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>X</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>XII</b>
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>2</b>
<b>1. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>6</b>
1.1 LASER .....	6
1.1.1 LASER DE ARSENIETO DE GÁLIO .....	11
1.1.2 EFEITOS .....	12
1.1.3 DOSIMETRIA .....	13
1.2 MÚSCULO ESQUELÉTICO .....	14
1.2.1 LESÕES MUSCULARES .....	15
1.2.2 REPARAÇÃO DOS MÚSCULOS ESQUELÉTICOS .....	16
1.3 LASER NA REPARAÇÃO DO TECIDO MUSCULAR .....	17
<b>2. OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>19</b>
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	19
<b>3. MÉTODO</b> .....	<b>20</b>
3.1 FASE PRÉ-OPERATÓRIA .....	20
3.2 FASE OPERATÓRIA .....	24
3.3 FASE PÓS-OPERATÓRIA .....	25
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	29
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>30</b>
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>38</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>48</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>49</b>

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Gonçalves de Oliveira, pela confiança depositada desde o primeiro dia em que apresentei meu projeto.

Aos meus pais, Sandra Maria e Luiz Tarcisio, que mostram todos os dias o amor incondicional a mim e a minha irmã. Agradeço ao meu pai, pelo exemplo que é de caráter e a minha mãe pelo exemplo de coragem.

A minha querida irmã Michelle sempre carinhosa e dedicada. Mesmo sem conseguir demonstrar todos os dias eu a amo muito.

A minha namorada Mariah que sempre se mostrou companheira e paciente, mesmo nas horas em que não pude dar a atenção que desejava. Obrigado por me aproximar de Deus e me tornar uma pessoa cada dia melhor.

Aos meus avôs, professor Maia (*In Memoriam*) e Raimunda, sempre mostraram como seguir na vida com extrema sabedoria.

A minha madrinha, Miramar, que sempre me inspirou a trilhar os caminhos da docência e da pesquisa. É admirável como sempre se mostra interessada e disposta em ajudar, principalmente comigo.

Ao meu padrinho, Milton Alexandre, que possibilitou a realização dessa pesquisa, sempre se mostrando disponível.

A professora, Dra. Selma Aparecida Kückelhaus, que apareceu em um dos momentos que eu mais precisava de ajuda. Sempre levantando a minha auto-estima com seu bom-humor e me ensinando os melhores caminhos a seguir. Saiba que a considero uma grande amiga.

Aos meus grandes amigos Érico e Nilza que me mostraram que a idade não é nenhum empecilho quando se tem uma grande amizade. Obrigado por confiar no meu trabalho.

Aos meus adoráveis pacientes. Sei que se estou os atendendo, é porque talvez não estejam em seu perfeito estado físico. Mais agradeço a todos pelo carinho, pela confiança e principalmente, pelos ensinamentos de vida que recebo a cada atendimento. Por tudo isso, minha paixão pela profissão sempre se renova.

A todos os meus grandes amigos de infância. Mesmo seguindo trilhas diferentes, sempre estivemos juntos nos momentos tristes e felizes das nossas vidas.

A todos os técnicos da Bioagri Laboratórios em especial a técnica Lázara, pela atenção e disposição dadas.

Ao professor Dr. José Roberto, que me mostrou o significado da palavra ensinar.

Ao professor Dr. César Melo, que me despertou para iniciação científica.

**LISTA DE ABREVIATURAS**

As-Ga – Arsenieto de Gálio

ATP – Adenosina Tri-Fosfato

cm<sup>2</sup>- centímetros quadrados

cm - centímetros

He-Ne – Hélio-Neônio

IMMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

j - joules

Kg - kilogramas

LASER – Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation

mm – milímetros

mg - miligramas

ml – mililitros

nm – Nanômetro

w – Watts

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Esquema orientativo dose/efeito.....	pág 13
Tabela 2 – Esquema orientativo processo inflamatório/dose.....	pág 13
Tabela 3 - Quantidade de fibras musculares encontradas em cada grupo.....	pág 30
Tabela 4 - Número total de fibras reparadas no grupo “A”.....	pág 31
Tabela 5 - Percentual de fibras musculares reparadas no grupo “A”.....	pág 31
Tabela 6 - Número de fibras encontradas no grupo “B”(14 dias).....	pág 33
Tabela 7 - Número total de fibras reparadas no grupo “B”.....	pág 34
Tabela 8 - Percentual de fibras musculares reparadas no grupo “B”.....	pág 34

**LISTA DE GRÁFICOS**

Gráfico 1: Comparação entre o grupo controle (7 dias) e o grupo LASER (7 dias) com diferentes doses.  $p < 0,05$ .....pág 32

Gráfico 2: Comparação entre o grupo controle (14 dias) e o grupo LASER (14 dias) com diferentes doses.  $p > 0,05$ .....pág 35

Gráfico 3: percentual de fibras reparadas nos grupos "A" e "B" .....pág 36



**LISTA DE QUADROS**

Quadro 1: Condições ambientais do biotério de experimentação.....	pág 21
Quadro 2: Distribuição dos animais do grupo A.....	pág 22
Quadro 3: Distribuição dos animais do grupo B. ....	pág 22
Quadro 4: Doses e tempo de aplicação em cada grupo. ....	pág 27

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1: Diagrama do LASER.....	pág 07
Figura 2: Espectro de radiações eletromagnéticas. ....	pág 08
Figura 3: Luz incidente, refletida, absorvida e transmitida.....	pág 09
Figura 4: Característica de unidirecionalidade do LASER.....	pág 09
Figura 5: Comprimento de onda e poder de penetração do LASER nos tecidos.....	pág 11
Figura 6: Exemplo da ficha de identificação nas caixas dos animais.....	pág 23
Figura 7: Delimitação do local da ferida.....	pág 24
Figura 8: Punch para biópsia descartável com 3 mm de circunferência e 1 cm de profundidade.....	pág 25
Figura 9: Aparelho de LASER com a caneta com comprimento de onda de 904 nanômetros.....	pág 26
Figura 7: Tratamento com LASER As-Ga. Aplicação realizada em cinco pontos distintos.....	pág 28
Figura 8: Lâmina do grupo tratado com laser.....	pág 36
Figura 9: Lâmina no grupo controle.....	pág 37

**LISTA DE ANEXOS**

Anexo 1 – Parecer do Comitê Institucional de Ética.....pág 56

Anexo 2 – Procedimentos do Biotério III da Bioagri Laboratórios .....pág 57

## RESUMO

Na área da Fisioterapia, buscamos avaliar e reabilitar diversos tipos de afecções, dentre elas as lesões musculares que talvez sejam as mais estudadas. Os recursos utilizados para promover o processo de reparação dessas lesões são diversos, destacando-se a utilização do LASER de baixa potência. Seus efeitos reparativos já são reconhecidos em alguns tecidos, porém, no tecido muscular, ainda não são evidentes. O objetivo do presente estudo foi investigar o processo de reparação do tecido muscular em ratos utilizando 3 doses diferentes do laser de Arsenieto de Gálio (As-Ga) em dois períodos distintos (7 e 14 dias). Para isso, foram utilizados 64 ratos da raça *Wistar* com peso médio de 379,8 g (269,6g a 450,8g), distribuídos em dois grupos: grupo "A", tratamento/controle por sete dias, e grupo "B", tratamento/controle por 14 dias. Esses por sua vez foram subdivididos em grupos de tratamento com doses de 4, 8 e 20 joules/cm<sup>2</sup> e grupo controle. Para provocar a lesão muscular, foram realizadas incisões cirúrgicas no dorso de todos os animais retirando-se um fragmento de pele e músculo, com um *punch* de biópsia de 3 mm de circunferência. Vinte e quatro horas após a operação foi iniciado o tratamento dos animais. O grupo controle recebeu simulações do tratamento. O grupo "A" recebeu tratamento/simulação por sete dias consecutivos enquanto que os do grupo "B" por 14 dias consecutivos. Após esse período, os animais foram eutanasiados e o músculo foi removido para análise. A análise histopatológica foi realizada a contagem de fibras musculares reparadas. Os resultados apresentaram diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) no grupo "A" (7 dias), entre os animais que receberam o tratamento com

o laser, para os animais do grupo controle. Porém os animais do grupo “B” (14 dias), não foram observados diferenças significantes entre os grupos. Comparando as diferentes doses do laser, não foram observadas diferenças significantes em nenhum dos períodos avaliados. Esses resultados indicam que o tratamento do laser de As-Ga melhora a reparação do tecido muscular, especialmente na primeira semana após o trauma.

**Palavras-chave:** reparação muscular; Laser.

## ABSTRACT

In the area of the Physicaltherapy, we search to evaluate and to rehabilitate diverse types of affections, amongst them the muscular injuries that are perhaps studied. The used resources to promote the process of repairing of these injuries are diverse, being distinguished it use of the LASER of low power. Its reparations effect already are recognized in some tissues, however, in the tissue muscular, not yet they are clear. The objective of the present study was to investigate the process of repairing of the tissue muscular in rats being used 3 different doses of the Gallium Arsenide laser (As-Ga) in two distinct periods (7 and 14 days). For this, 64 rats of the Wistar race had been used with average weight of 379,8 g (269,6g a 450,8g), distributed in two groups: group "A", treatment/control per seven days, and group "B", treatment/control per 14 days. These in turn had been subdivided in groups of treatment with doses of 4, 8 and 20 joules/cm<sup>2</sup> and group have controlled. To provoke the muscular injury, the animals had been carried through surgical incisions in the back of all and left one break up of skin and muscle, with one punch of biopsy of 3 mm of circumference. Twenty and four hours after the operation was initiated the treatment of the animals. The group control received simulation from the treatment. The group "A" received treatment/simulation per seven days consecutive whereas from group "B" per 14 days consecutive. After this period, the animals had been died and the muscle was removed for analysis. The histopathological analysis was carried through the repaired muscular staple fibre counting. The results had presented statistical differences ( $p < 0,05$ ) in the group "A" (7 days), between the animals that had received the treatment with

the laser, for the animals of the group have controlled. However the animals of group "B" (14 days), had not been observed significant differences between the groups. Comparing the different doses of the laser, significant differences in none of the evaluated periods had not been observed. These results after indicate that the treatment of the laser of As-Ga improves the repairing of the tissue muscular, especially in the first week the trauma.

**Words-keys:** repairing muscle; Laser.

## INTRODUÇÃO

Qualquer individuo está sujeito a sofrer lesões como ao cair da escada, sofrer uma distensão muscular quando pratica algum esporte ou até mesmo sofrer uma queimadura. Dentre os diversos tipos de lesões, as mais importantes para a área da reabilitação são as lesões relacionadas ao aparelho locomotor. Serrão (2004) relata que as altas incidências de lesões musculares em atividades esportivas e atividades de trabalho, fazem com que diversos estudos tentem elucidar os aspectos envolvidos em tais lesões e ainda os processos que as reparam.

De modo geral, as lesões interferem na execução de atividades diárias fazendo com que o individuo passe por um período de recuperação. Quando as lesões ocorrem, o organismo reage, passando por uma seqüência de eventos que tentam limitar a lesão e ao mesmo tempo preparam as células que não foram danificadas para a replicação necessária à substituição daquelas que foram mortas (CONTRAN *et al.*, 2000). Essa capacidade que o organismo possui de se reparar após uma lesão é essencial para a sobrevivência (JÓZSA e KANNUS, 1997).

Brasileiro Filho (2000) explica que o reparo dos tecidos envolve processos distintos: a regeneração, onde o tecido é substituído por um de idêntica função, nesse caso as células replicam e muitas vezes não há vestígios residuais de uma lesão; O segundo processo envolve a substituição do tecido lesado por tecido conjuntivo, nesse caso ocorre fibrose ou cicatrização, as células não conseguem replicação suficiente para que o tecido lesado volte ao seu estado normal. Ambos os processos, regeneração e



cicatrização, atuam na reparação. Ainda segundo o autor, os mecanismos que determinam o reparo são semelhantes em ambos os casos. Envolvem migração, proliferação e diferenciação celular assim como a interação entre célula e a matriz extracelular.

Diversos fatores influenciam no processo do reparo, dentre eles a extensão, a localização e o tipo de lesão. Além desses, é fundamental a capacidade de replicação celular dos tecidos lesados. Esses fatores podem prever se o reparo se dará na forma de cicatrização ou na forma de regeneração. Caso o tecido não possua capacidade de replicação o processo de reparo será na forma de cicatrização. (CONTRAN *et al.*, 2000). Alguns tecidos como o epitelial, possuem grande capacidade de replicação, já os neurônios do sistema nervoso central não possuem essa capacidade (BRASILEIRO FILHO, 2000). Portanto, quanto mais a célula for capaz de replicar, maior a chance de aquele tecido lesado voltar ao seu estado normal.

Outro fator importante para a reparação, a relação da matriz extracelular com o tecido lesado. Shu (2000) refere que as células crescem, deslocam-se e diferenciam-se em íntimo contato com a matriz celular. Ela organiza-se em rede nos espaços que circundam as células. Consiste de várias macromoléculas e desempenham diversas funções como oferecer água para proporcionar turgor aos tecidos. Dentre as principais macromoléculas que formam a matriz estão as proteínas estruturais como o colágeno e a elastina, glicoproteínas adesivas e proteoglicanos (TILLMAN e CUMMINGS, 1992).

Quando se trata de feridas abertas, pode-se referir também que o processo de reparo pode acontecer em primeira intenção, onde as bordas das

feridas estão próximas umas das outras e, portanto, o processo de reparo é mais fácil, e o reparo em segunda intenção, onde as bordas das feridas estão mais afastadas provocando a lentidão do processo. (BRASILEIRO FILHO, 2000).

Na prática fisioterapêutica, são encontrados diversos tipos de lesões e procura-se reabilitar os pacientes fazendo com que eles retornem o mais rápido possível para suas atividades habituais. Quando se depara com lesões que ainda não repararam completamente, utiliza-se de vários recursos para acelerar esse processo. Dentre eles, o laser tem sido utilizado na área.

Postulado em 1917 por Albert Einstein, o laser passou por diversas modificações fazendo com que ele tivesse várias aplicações. O primeiro laser foi construído somente em 1960 por Theodore Maiman, nos Estados Unidos da América. Em 1964 Basov e Prokhorov ganharam o prêmio Nobel devido aos grandes progressos na área. Já os lasers de baixa potência surgiram somente no início da década de 80 com Mester. (CARRINHOS, 2004; ALMEIDA-LOPES, 2003).

O que se espera com a terapia com laser é potencializar o processo de reparação dos tecidos lesados na tentativa de restabelecer mais rapidamente sua função original. Alguns estudos comprovam o poder de reparação cutânea da radiação do laser como o de Tatarunas *et al.* (1998) onde o laser de baixa potência contribui para a cicatrização de forma mais rápida do epitélio de gatos domésticos. No entanto, outros estudos, como o de Oliveira *et al.* (1999), não foram observadas respostas favoráveis para a reparação de músculos esqueléticos de ratos utilizando o mesmo recurso.

Na prática, além de favorecer o processo de reparação, o laser também tem sido usado para a redução de dor e inflamação (BASFORD, 1995). Em função do conjunto de efeitos, o restabelecimento funcional tornar-se-ia mais rápido e a reparação melhoraria nos aspectos qualitativos e de tempo (VEÇOSO, 1993).

As pesquisas desenvolvidas sobre reparação muscular estudam a dinâmica do músculo após a lesão. Entre os diversos modelos de tratamento está o laser, que embora muito utilizado na prática terapêutica, ainda carece de mais substratos científicos que possam corroborar seus efeitos na reparação muscular (BASSOLI, 2001).

## 1. REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.1 LASER

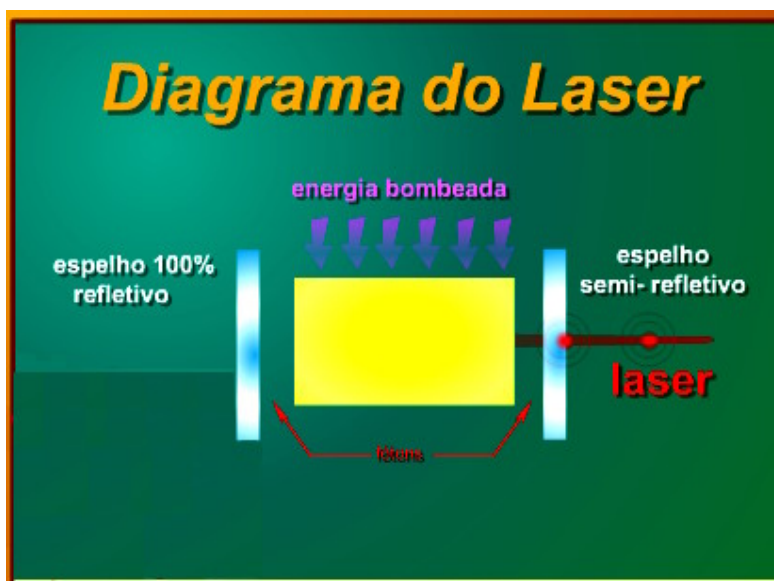
A sigla LASER significa *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, que traduzindo significa amplificação de luz por emissão estimulada da radiação. Tal radiação é do tipo eletromagnético não ionizante sendo uma fonte luminosa com características específicas (VEÇOSO, 1993). Alguns princípios físicos precisam ser lembrados para o entendimento, mesmo que simplificado do laser.

O átomo é constituído por um núcleo contendo prótons e nêutrons e por elétrons, que giram em torno do núcleo ocupando órbitas. Átomos podem ser excitados por fontes externas de energia como o calor e a energia elétrica. Quando um átomo é excitado, alguns elétrons passam para órbitas mais afastadas do núcleo, com níveis de energia superiores, entrando em um estado chamado metaestável. Quando o elétron retorna ao nível anterior da órbita, há emissão de um fóton de luz. No caso do laser, esse fóton acaba desencadeando a queda dos demais átomos, gerando um processo em cascata e com crescimento em progressão geométrica. O resultado é uma emissão estimulada da radiação. O laser é, portanto, um tipo de luz cujos fótons são idênticos e se propagam em trajetórias paralelas. (BAXTER, 1997; KITCHEN e BAZIN, 1996).

Para a produção de um laser, são necessárias algumas condições específicas para que essa reação em cadeia ocorra. Primeiro é necessário um meio ativo que gere luz quando excitadas por uma fonte externa. Esse processo gera um fator de bombeamento, cuja função é transformar o meio

ativo em um meio amplificador de radiação. E por último, o meio ativo deve estar contido em um reservatório denominado cavidade ressonante, onde em uma extremidade há um espelho 100% refletor e na outra, um parcialmente refletor. A reflexão mútua provoca o alinhamento dos fótons na direção longitudinal e, através do refletor parcial, é emitido um feixe de luz altamente concentrado e monocromático. Com todas essas estruturas, garante-se que essa radiação seja amplificada. (ALMEIDA-LOPES, 2003).

Figura 1: Diagrama do LASER.

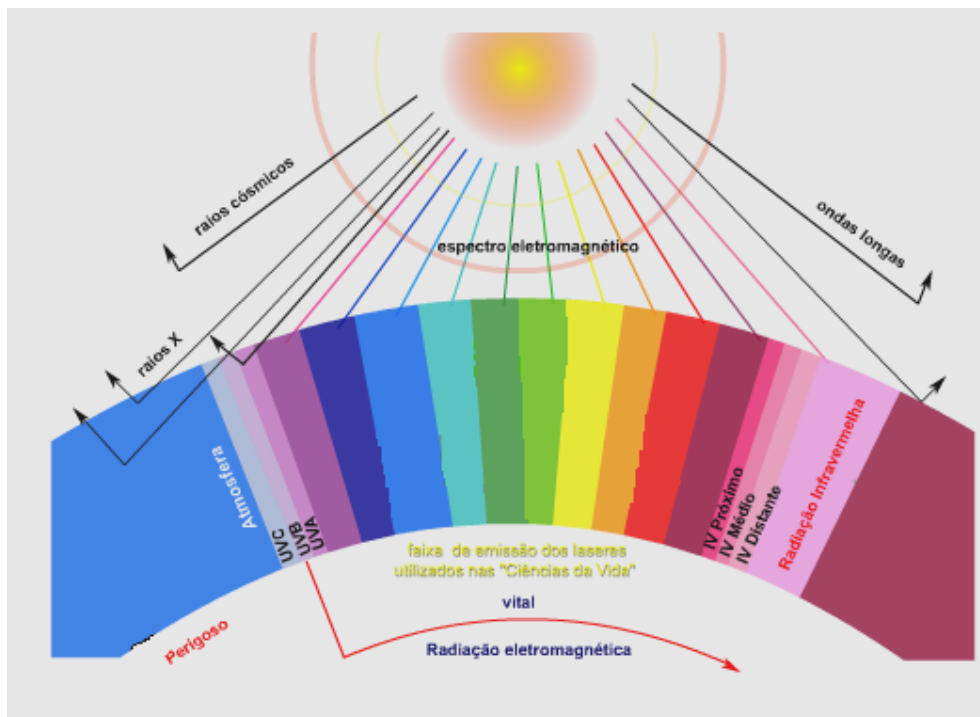


Fonte: ALMEIDA-LOPES, 2003.

Para a identificação do laser, precisamos conhecer sua fonte geradora (meio ativo que gera luz) e sua intensidade (caracterizada pela densidade de potência óptica produzida ou energia do laser) que é expressa em Watts (w) (BAXTER, 1997; ALMEIDA-LOPES, 2003). Os diferentes aparelhos de laser são determinados principalmente pelo comprimento de onda utilizada, que representa a distância que separa duas cristas ou dois valores consecutivos de ondas. A unidade para esse parâmetro é o nanômetro (nm) (MAILLET, 1987;

CARRINHOS, 2004). Por ser uma radiação óptica, ela faz parte do espectro de luz eletromagnético (FIGURA 2). Os lasers de baixa potência enquadram-se entre os comprimentos de onda de 630 nm a 1300 nm. Isso significa que dentro do espectro está entre a luz visível e a parte mais próxima do infravermelho. (BAXTER, 1997; KITCHEN e PARTRIDGE, 1991).

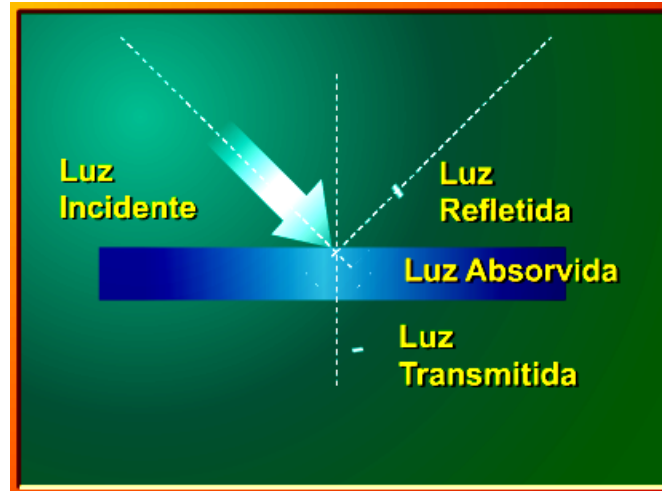
Figura 2: Espectro de radiações eletromagnéticas.



Fonte: [www.nupen.com.br](http://www.nupen.com.br).

Almeida-Lopes (2003) explica que assim como toda a luz, o laser pode ser refletido, absorvido ou transmitido, sofrendo ou não espalhamento no processo como mostrado na figura 3.

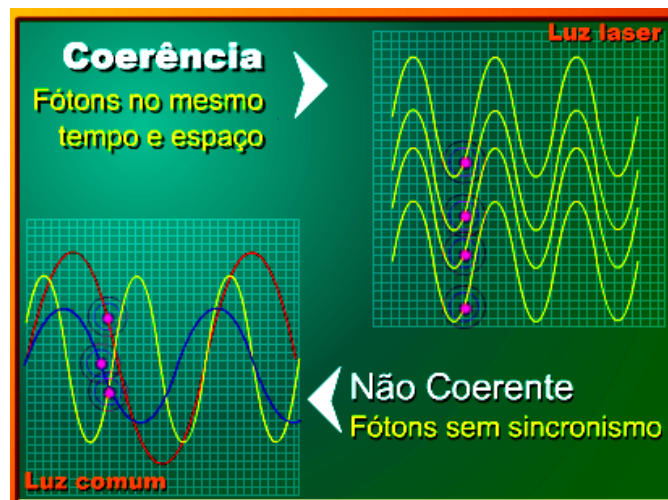
Figura 3: Luz incidente, refletida, absorvida e transmitida



Fonte: ALMEIDA-LOPES, 2003.

No entanto, o laser, tem características como unidirecionalidade, coerência e monocromaticidade. Portanto, são dispositivos capazes de emitir luz com comprimento de onda único e definido. (Figura 4). (LOW e REED, 2001; BAXTER, 1997; BAGNATO, 2001).

Figura 4: Característica de unidirecionalidade do LASER.



Fonte: ALMEIDA-LOPES, 2003.

Para se entender como o laser funciona em tecidos biológicos, também é necessário saber que as radiações ao chocarem com a matéria viva liberam energia, produzindo diferentes efeitos. Veçoso (1993) explica que o laser transporta energia que aplicada em um determinado tecido irá realizar um trabalho. Para sabermos quanta energia esta sendo depositada no tecido, temos que verificar a potência do aparelho em watts, dividir pela área total a ser irradiada em centímetros quadrados ( $\text{cm}^2$ ) e multiplicamos pelo tempo de exposição. Teremos então a dosagem de energia expressa em joules/ $\text{cm}^2$ , ou seja, a dose de energia que será depositada em uma determinada área do tecido. (BAXTER, 1997; TÚNER e HODE, 1999).

Na prática, são utilizados os aparelhos sem potencial destrutivo com potência inferior a 1watt (w), considerado o limite de potência para a ocorrência de potencial destrutivo. Assim, a baixa potência dos lasers terapêuticos permite que não sejam destruídos os tecidos, pelo contrário, estes lasers teriam um acentuado efeito bioquímico e bioenergético, além de efeitos anti-álgico e antiinflamatório e também estimulante do metabolismo celular (VEÇOSO, 1993; BAXTER, 1997).

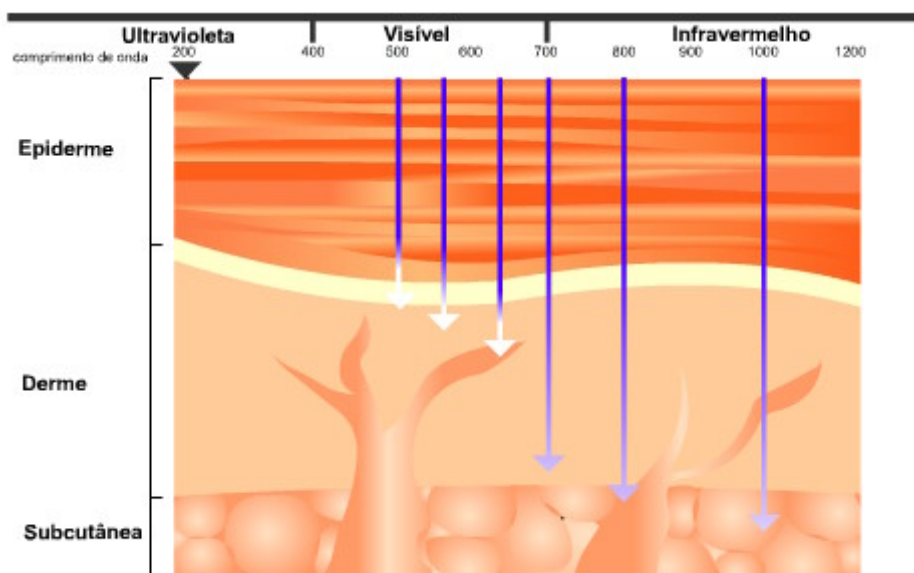
Dentre os diversos aparelhos, o mais utilizado é o de fonte de Hélio-Neônio (He-Ne) e o de fonte de Arsenieto de Gálio (As-Ga). Ambos servem para auxiliar no processo de reparo dos tecidos. (VEÇOSO, 1993; BAXTER, 1997). No presente estudo, será avaliado o laser de As-Ga.



### 1.1.1 LASER DE ARSENIETO DE GÁLIO

O aparelho de laser de Arsenieto de Gálio tem comprimento de onda de 904 nm e encontra-se no espectro de emissão infravermelho (KLOTH, 1997; COLLS, 1984). Esse tipo de laser opera no regime pulsado e atinge a profundidade entre 30 mm e 50 mm dependendo do tecido (LOW e REED, 2001). Na Figura 5 é exemplificado o poder de profundidade do laser.

Figura 5: Comprimento de onda e poder de penetração do LASER nos tecidos.



*Fonte: Almeida Lopes, 2003.*

O aparelho de laser As-Ga emite radiação obtida a partir da estimulação de um diodo semiconductor, formado por cristais de Arsenieto de Gálio que, com a combinação de uma corrente elétrica aplicada, formam uma quantidade de energia que é amplificada, dando origem à radiação. Por isso pode ser chamado também de laser diódico (VEÇOSO, 1993).

Para Kolari (1985), o laser As-Ga além de possuir maior poder de penetração, também possui outras vantagens em relação ao laser de Hélio-

Neônio como: tamanho reduzido, menor custo, ser mais seguro e de simples aplicação.

LAAKSO *et al.* (1993) referem que os comprimentos de onda mais longos, na faixa do infravermelho, são mais eficazes para o tratamento de lesões mais profundas.

### 1.1.2 EFEITOS

Os principais efeitos do laser, conforme relatados por Karu (1998) são os efeitos: antiinflamatório; analgésico e reparativo. Veçoso (1993) e Baxter (1997) referem que a radiação a laser possui vários efeitos terapêuticos proporcionados pela liberação da energia no tecido, sendo os principais deles: liberação de substâncias como a bradicinina, serotonina e histamina; estimulação da produção de Adenosina Tri-Fosfato (ATP); síntese de prostaglandinas e estimulação à microcirculação. Mester *et al.* (1991), revelaram que a absorção dos fótons de luz causam dois diferentes efeitos nos tecidos biológicos: os efeitos térmicos, causados pela excitação cinética e os efeitos bioquímicos causados pela excitação eletrônica das moléculas.

Kitchen e Partridge (1991) admitiram também que o laser promove o reparo tecidual por intermédio do aumento dos macrófagos, pela angiogênese e pelo aumento da atividade fagocitária.

Mester *et al.* (1985) sugeriram que o laser potencializa o processo de reparação, pois favorece a liberação de fatores de crescimento, aumenta a síntese de ATP assim como a produção de ácidos nucléicos e a divisão celular.

Anders *et al.* (1993) relatam o efeito bioestimulante do tecido muscular, através da liberação de substâncias pré-formadoras, como a bradicinina,

histamina e serotonina, além de promover a estimulação de reações enzimáticas.

### 1.1.3 DOSIMETRIA

Na laserterapia, a unidade posológica é a densidade energética, ou seja, a quantidade de energia por área. Na Tabela 1, é apresentado um esquema orientativo descrito por Colls (1984) para critérios de dose em relação ao efeito desejado.

Tabela 1 – Esquema orientativo dose/efeito

<b>Efeito</b>	<b>Dose</b>
<b>Analgésico</b>	2 a 4 J/cm <sup>2</sup>
<b>Antiinflamatório</b>	1 a 3 J/cm <sup>2</sup>
<b>Cicatrizante</b>	3 a 6 J/cm <sup>2</sup>
<b>Circulatório</b>	1 a 3 j/cm <sup>2</sup>

Fonte: Veçoso, 1993.

Na Tabela 2, é apresentado o esquema orientativo de Colls (1984) para critérios de dose com base no processo inflamatório:

Tabela 2 – Esquema orientativo processo inflamatório/dose

<b>Processo Inflamatório</b>	<b>Dose</b>
<b>Agudo</b>	1 a 3 J/cm <sup>2</sup>
<b>Subagudo</b>	3 a 4 J/cm <sup>2</sup>
<b>Crônico</b>	5 a 7 J/cm <sup>2</sup>

Fonte: Veçoso, 1993.

Túner e Hode (1999) relataram que a melhor dose para o processo de reparo é de 4 joules /cm<sup>2</sup> e desde então, vários pesquisadores tem utilizado essa dose para o reparo como Parizoto e Baranauskas (1998).

As doses mais efetivas, porém, dependem de uma série de fatores como o aparelho emissor, a distância do aparelho para a área a ser irradiada, o tamanho da área, o tipo de fonte utilizada, o tempo de exposição da radiação, além de levar em consideração fatores como reflexão, transmissão, dispersão, absorção e profundidade do tecido. (BAXTER, 1997).

## **1.2 MÚSCULO ESQUELÉTICO**

Os músculos esqueléticos são os órgãos efetores do movimento, sendo sua propriedade mais importante a contratilidade, definida como “a capacidade de gerar uma força de tração e, se necessário, uma mudança no comprimento enquanto a tração é mantida” (WATKINS, 2001).

Segundo Junqueira e Carneiro (1990), o tecido muscular é responsável pelos movimentos corporais. É constituído por células alongadas e que contém grande quantidade de filamentos responsáveis pela contração.

Esses músculos representam 40% a 50% do peso corporal e possuem, segundo Powers e Howley (2000), três funções: produzir força para a locomoção e respiração, força para a sustentação da postura e calor durante a exposição ao frio. Foss e Keteunian (2000) afirmam que a principal função do músculo esquelético é a contração, que resulta em movimentos. É pela capacidade de contraírem seus músculos, gerando movimento acompanhado de força em maior ou menor grau, que o homem pode realizar suas atividades cotidianas.

As principais estruturas que formam o músculo esquelético são: o sarcolema (membrana celular), citoplasma (sarcoplasma), retículo sarcoplasmático e as sarcossomas (mitocôndrias) (GARTENER e HIATT,

1997). Powers e Howley (2000) afirmaram ainda que os músculos esqueléticos são constituídos por células (fibras musculares), tecidos nervosos, sangue e tecido conjuntivo, separados entre si e mantidos no lugar por fâscias. Cada fibra muscular é individual e possui o comprimento do músculo, tendo a forma de um cilindro fino e alongado e agrupando-se em feixes denominados fascículos. Ross e Rowrell (1993) afirmaram que as fibras musculares estão dispostas paralelamente em relação às vizinhas, possuem vários núcleos em sua periferia, além de serem altamente vascularizados. Seus tamanhos podem chegar a 30 centímetros e seu diâmetro pode variar de 10mm a 100mm. (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999).

Foss e Keteunian (2000) referem que o homem possui dois tipos de fibras musculares: as do tipo I ou de contração lenta; e as do tipo II ou de contração rápida, sendo que essas últimas são sub-classificadas como do tipo IIa, IIb e IIc. As fibras do tipo II produzem 10% a 20% a mais de força que as do tipo I, porém é mais susceptível a fadiga.

A distribuição das fibras musculares esqueléticas é influenciada pela idade, sexo, determinação genética, treinamento e de acordo com a função que cada músculo deve desempenhar (WATKINS, 2000).

### **1.2.1 LESÕES MUSCULARES**

As lesões musculares podem ser entendidas como quaisquer alterações que promovam o mau funcionamento do músculo, sejam elas morfológicas ou histoquímicas (CARLSON e FAULKER, 1983). Existem diferentes tipos de lesões musculares, dentre elas as rupturas, que de acordo com Veçoso (1993),

podem ocorrer como ruptura total de fibras, ruptura parcial e sem ruptura das fibras musculares.

A competição esportiva e o culto ao corpo levam ao grande aparecimento de lesões musculares, mais ou menos graves, que certamente conduzem a uma perda de atividades. (BASSOLI, 2001).

### **1.2.2 REPARAÇÃO DOS MÚSCULOS ESQUELÉTICOS**

A reparação dos tecidos pode ocorrer por meio de dois processos - a cicatrização e a regeneração. Os dois processos atuam simultaneamente, porém em proporções inversas. Quando ocorre a regeneração, a cicatrização diminui e vice-versa (CONTRAN *et al.*, 2000).

A capacidade de regeneração está limitada somente a determinados tecidos. Bonide-Fowler (1994), admitiu que os músculos esqueléticos têm grande capacidade de regeneração após uma lesão, seja parcial ou completa de suas fibras. Os fatores que limitariam essa capacidade seriam as populações de células satélites viáveis. Champion (1984) referiu que essas células funcionam como pró-genitoras de núcleos de miofibras. As células satélites são ativadas em até vinte e quatro horas após a lesão do músculo, o início da fase regenerativa é marcado pela proliferação mioblástica. (PRISK e HUARD, 2003).

Nikolaiu *et al.* (1987) conseguiram demonstrar que após uma lesão controlada, provocada por esforço, os músculos tiveram uma recuperação funcional após 48 horas.

Bondesen *et al.* (2004) referem que os eventos celulares durante a regeneração muscular ocorrem do forma harmoniosa.

Junqueira e Carneiro (1999) afirmaram que as células satélites são fusiformes, estão dispostas paralelamente às fibras musculares, dentro da lâmina basal, e só podem ser identificadas por microscopia eletrônica.

Segundo Hurme e Kalimo (1992), para que ocorra o processo de regeneração de uma lesão muscular deve haver antes, o mais cedo possível, a remoção de material necrosado por macrófagos. Esse seria um pré-requisito para a proliferação de células satélites, que deveria acontecer antes que o tecido cicatricial proliferasse excessivamente e obstruísse a regeneração.

### **1.3 LASER NA REPARAÇÃO DO TECIDO MUSCULAR**

Estudos anteriores demonstraram que a radiação de laser de baixa potência com fonte de He-Ne promove a regeneração do músculo esquelético em mamíferos e em anfíbios (WEISS e ORON, 1993; AMARAL *et al.*, 2001).

Porém, alguns estudos como o de Oliveira *et al* (1999), não mostraram diferenças na regeneração do músculo tibial anterior de ratos entre os grupos controle e tratado com laser de As-Ga.

A eficácia do uso da radiação a laser em tratamentos fisioterapêuticos ainda tem sido amplamente discutida na literatura da área. Diversos estudos publicados trazem resultados contraditórios. (LAAKSO *et al.*, 1993). Segundo Matera (2003), a literatura é confusa quanto aos tipos de lâseres e doses mais efetivas para as várias espécies animais e diferentes afecções.

A interação do uso da radiação a LASER com os sistemas biológicos é mais bem estabelecida no nível celular, mas a utilização do laser como agente

fisioterapêutico ainda permanece polêmico. A literatura é escassa, principalmente no que diz respeito ao processo de reparação muscular.

Embora o processo de regeneração muscular esteja sendo bastante estudado, existem algumas questões que permanecem sem resposta, especialmente aquelas que se referem ao efeito dos diferentes agentes físicos usados para promover esse processo (OLIVEIRA *et al.*, 1999).

Essa lacuna apontada pela literatura da área justifica e concede relevância ao problema de pesquisa proposto no presente estudo. A partir daí estabelecemos os objetivos



## **2. OBJETIVO GERAL**

Avaliar os efeitos da utilização da terapia a laser de Arsenieto de Gálio (As-Ga) no processo de reparação muscular de ratos.

### **2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a)** Avaliar o processo de reparação do músculo utilizando 3 diferentes doses de laser As-Ga: 4 joules/cm<sup>2</sup>, 8 joules/cm<sup>2</sup> e 20 joules/cm<sup>2</sup>, observando-se os animais por períodos de tratamento distintos: sete e quatorze dias consecutivos.
- b)** Comparar as diferentes doses utilizadas, com os animais do grupo controle (sem radiação do laser) por períodos distintos: sete e quatorze dias.

### **3. MÉTODO**

O estudo realizado foi experimental, controlado, randomizado e cego. Todo o procedimento experimental foi conduzido nos Laboratórios da Bioagri Ltda, localizada em Planaltina – Distrito Federal - Fazenda Lagoa Bonita, Chácara 13. Todos os procedimentos foram realizados pelo mesmo pesquisador com a ajuda de um técnico de laboratório.

No presente estudo foram avaliados os efeitos do laser de As-Ga utilizando três diferentes doses no processo de reparação do tecido muscular em ratos pelo período experimental de 7 e 14 dias.

Os procedimentos experimentais foram divididos em três fases: a fase pré-operatória, fase operatória e fase pós-operatória. Todos os procedimentos foram rigorosamente cumpridos conforme a exigência do Comitê Institucional de Ética da Bioagri Laboratórios que foi aprovado no dia 11 de agosto de 2006. O parecer do Comitê encontra-se no ANEXO 1.

#### **3.1 FASE PRÉ-OPERATÓRIA**

##### **a) Animais**

Foram utilizados 64 ratos da raça *Wistar Hannover*, machos adultos com peso médio de 379,8g (269,6g a 450,8g), provenientes do biotério de criação da Bioagri Laboratórios. Os animais foram conduzidos até o biotério de experimento onde permaneceram até a eutanásia. Antes do início do experimento, os animais foram aclimatados por um período de cinco dias. Todos os animais que não tinham essas características ou que durante o experimento apresentassem algum problema como sinais de dor ou sofrimento,

ou não adequação com o tratamento, seriam automaticamente excluídos da pesquisa.

Todas as condições de temperatura, umidade, ventilação e iluminação foram controladas (Quadro 1), assim como as condições de esterilização do ambiente, materiais e pessoas dentro do biotério. Os animais foram colocados em caixas individuais de polipropileno (30 x 18 x 13 cm) cobertas por uma grade metálica e forradas com cama de maravalha. Os animais tiveram livre acesso à água e a ração *ad libitum*. A troca da maravalha e água foram realizadas a cada quatro dias.

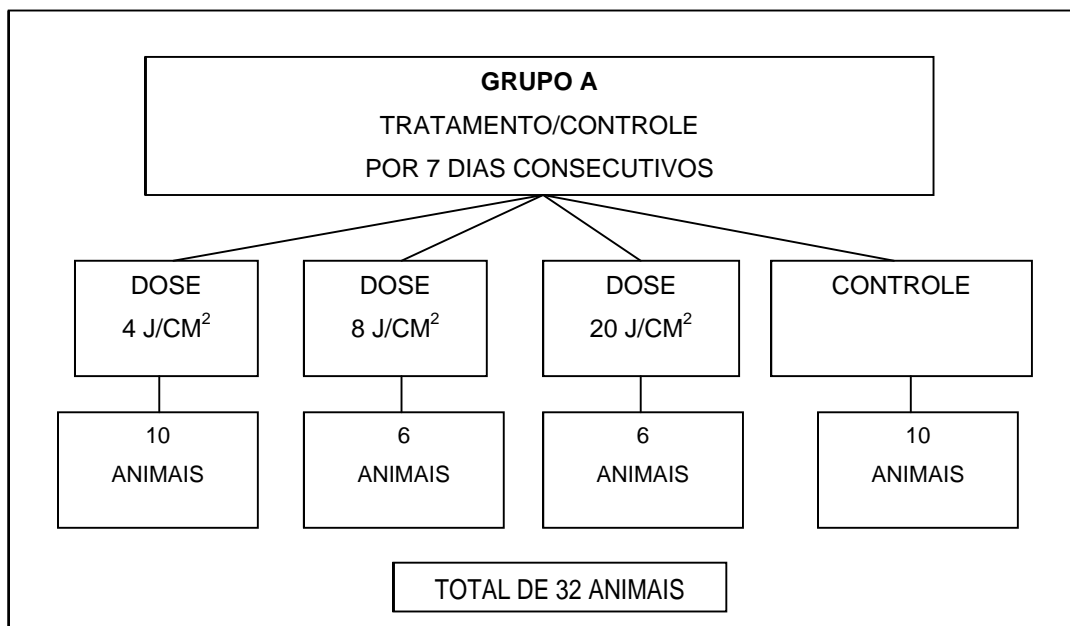
Condições Ambientais	
Temperatura	19° ± 6°C
Umidade Relativa	30 a 70%
Iluminação	12 horas claro e 12 horas escuro
Trocas de ar	10 a 15 trocas de ar por hora

Quadro 1: Condições ambientais do biotério de experimentação.

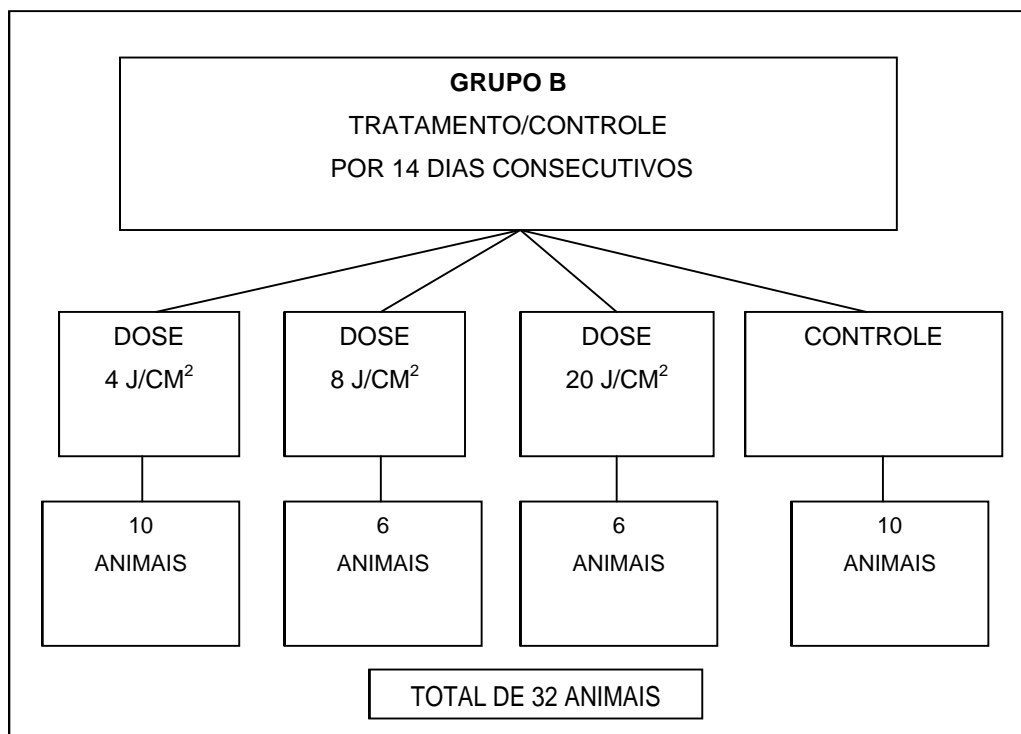
#### b) Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: Grupo “A” (32 animais) controle/tratamento por 7 dias consecutivos e Grupo “B” (32 animais) controle/tratamento por 14 dias consecutivos. Após a lesão muscular os animais dos grupos de tratamento foram subdivididos para receber três diferentes doses de tratamento: doses de 4 joules/cm<sup>2</sup>, 8 joules/cm<sup>2</sup> ou 20 joules/cm<sup>2</sup>.

A distribuição dos animais esta descrita nos quadros 2 e 3.



Quadro 2: Distribuição dos animais do grupo A.



Quadro 3: Distribuição dos animais do grupo B.

### c) Identificação dos animais

Todas as caixas foram identificadas e continham informações como o peso, o grupo experimental, a data da operação, a data da eutanásia, horário da operação e o controle diário de tratamento/controle. (figura 6).

Os animais ainda receberam identificações específicas para análise histológica, já que a histologista fez suas análises à cega para que as análises não fossem influenciadas.

Figura 6: Exemplo da ficha de identificação nas caixas dos animais.

<b><u>Identificação do animal:</u></b>						
Data da operação:			Hora:			
Data da eutanásia:			Hora:			
Grupo experimental:						
Dose de tratamento:						
Número do animal:						
Visto de tratamento						
Data/hora 1º dia	Data/hora 2º dia	Data/hora 3º dia	Data/hora 4º dia	Data/hora 5º dia	Data/hora 6º dia	Data/hora 7º dia

### d) Pesagem dos animais

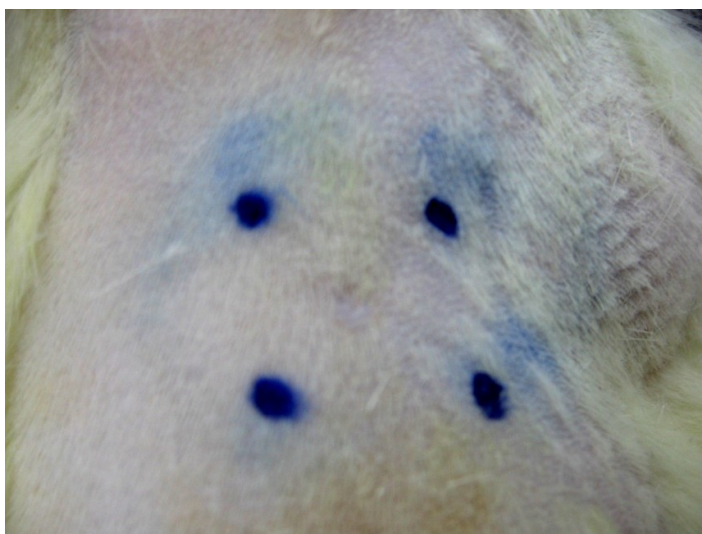
Os animais foram pesados em uma balança analítica dentro do biotério que foi aferida e é inspecionada pelo INMETRO. Em seguida, os animais foram submetidos à anestesia injetando-se por via intramuscular, na região da coxa direita de cada animal, uma solução de quetamina e xilasina (60mg/kg + 10mg/kg) na dose de 0,2ml da solução para cada 100 gramas de peso do animal.

Os procedimentos subseqüentes foram realizados somente após o reflexo de retirada da pata, após estímulo doloroso, estar completamente abolido.

#### e) Tricotomia

Após os animais estarem completamente anestesiados e sedados, foi realizada a tricotomia no dorso do animal com máquina de tosa *Oster*. Após a retirada dos pêlos, o local da incisão foi marcado com uma caneta de tinta permanente de cor azul em quatro pontos eqüidistantes do local central da ferida conforme mostrado na Figura 7:

Figura 7: Delimitação do local da ferida



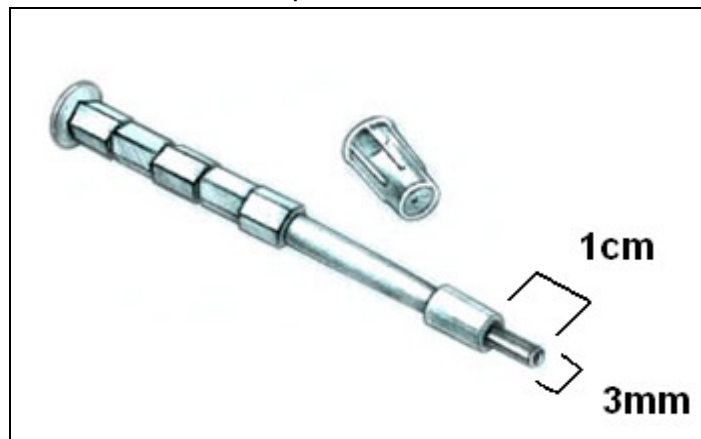
### 3.2 FASE OPERATÓRIA

#### a) Procedimento cirúrgico

O procedimento cirúrgico iniciou com anti-sepsia do local com álcool iodado 0,1% e logo em seguida foi realizada a retirada da pele do animal com *punch* de biópsia descartável de 3 mm de circunferência (Figura 8). Com o mesmo *punch* realizou-se a retirada de um fragmento do músculo subcutâneo e do músculo grande dorsal do animal, tendo como limite de profundidade o comprimento total da área da lâmina do *punch* (1 cm de comprimento). Para a

retirada da parte muscular, o *punch* foi colocado uma única vez e foram realizados movimentos circulares no local até que ele atingisse seu comprimento total.

Figura 8: Punch para biópsia descartável com 3 mm de circunferência e 1 cm de profundidade.



Fonte: [http://www.rimed.com.br/img\\_produto\\_mini/14211.jpg](http://www.rimed.com.br/img_produto_mini/14211.jpg).

A ferida gerada permaneceu aberta para que a reparação ocorresse por segunda intenção.

### 3.3 FASE PÓS-OPERATÓRIA

#### a) Avaliação dos animais

Os animais foram avaliados clinicamente uma vez nos primeiros 30 minutos e depois mais duas vezes nas primeiras quatro horas após o procedimento. Após o primeiro dia, os animais passaram a ser observados duas vezes ao dia.

Os animais não apresentaram nenhuma alteração comportamental e/ou clínica durante todo o período de experimento. Os critérios para avaliação de dor, sofrimento e estresse animal seguiram a referência do *Guide for Care and User of Laboratory Animals*.

Para o controle da dor, foi administrado dipirona sódica em gotas no bebedouro (30 gotas/100 ml) por um período de 3 dias. Após esse período foi suspensa a oferta de analgésicos. No estudo piloto, observou-se que após esse período, os animais não bebiam mais água com tanta frequência, provavelmente por causa do gosto da água diluída com a dipirona.

#### b) Tratamento com LASER

O aparelho de laser utilizado na pesquisa possui as seguintes características: modelo clínico portátil, LASERPULSE<sup>®</sup>, produzido pela Ibramed Ltda, acompanhado de caneta de As-Ga com comprimento de onda de 904 nm, potência média de 3 a 7 miliwatts, duração de pulso de 180 nano-segundos e frequência de 2000 Hertz (figura 9). O aparelho permaneceu durante o experimento dentro do biotério e foi calibrado antes do início da pesquisa.

Figura 9: Aparelho de LASER com a caneta com comprimento de onda de 904 nanômetros.



O laser foi aplicado pontualmente nos animais do grupo “tratamento” iniciando-se 24 horas após a realização da operação. Nos animais do grupo controle foi realizada simulação de tratamento, onde a caneta foi posicionada da mesma maneira que o grupo tratado, porém o aparelho permaneceu desligado durante o processo. Os pontos de aplicação seguiram as marcações



realizadas no período pré-operatório (quatro pontos mais o ponto central da lesão). Durante a aplicação do tratamento, os animais foram imobilizados por um técnico e logo em seguida foi realizada a aplicação da radiação, onde a caneta do aparelho foi posicionada a um ângulo de 90° em relação ao animal. As doses utilizadas estão ilustradas no quadro 4.

Grupo A (7dias) e B (14 dias) com tratamento de LASER As-Ga	Tempo de aplicação em segundos (cada aplicação)
Dose de 4 Joules/cm <sup>2</sup>	12 segundos
Dose de 8 Joules/cm <sup>2</sup>	48 segundos
Dose de 20 Joules/cm <sup>2</sup>	1minuto

Quadro 4: doses e tempo de aplicação em cada grupo.

O tempo de aplicação foi dado pelo próprio aparelho. Cada dose era aplicada uma vez ao dia em cada um dos pontos em seqüência. Os animais receberam doses/simulação por período de 7 e 14 dias consecutivos. O ponto de saída da radiação pela caneta do aparelho mede aproximadamente 3mm de circunferência, assim como a área da lesão gerada. A Figura 7 mostra como foi realizado o tratamento.

Figura 7: Tratamento com LASER As-Ga. Aplicação realizada em cinco pontos distintos.



*Fonte: pesquisa do autor.*

c) Eutanásia

Cada animal foi removido do biotério 24 horas após o seu último tratamento/simulação e foi eutanasiado em câmara inalatória de gás carbônico. Esse método de eutanásia está de acordo com a resolução nº 714 de junho de 2002 do Conselho Federal de Medicina Veterinária. Em seguida o animal foi posicionado em uma bancada para a remoção e fixação do tecido em paraformaldeído a 10%. Os frascos contendo os tecidos foram identificados com um código apenas de reconhecimento do pesquisador responsável. As lâminas foram confeccionadas por uma técnica de laboratório da Bioagri e coradas com Hematoxilina e Eosina.

d) Análise histológica

As análises foram realizadas por uma mesma patologista de forma cega.

Para a análise de reparação do músculo subcutâneo do animal, a histologista estabeleceu o critério de contagem de fibras musculares encontradas e fibras musculares reparadas.

### **3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Para a análise estatística, foram usados os programas Prism<sup>®</sup> Software Package (GraphPad, USA, 1997) e o Microsoft<sup>®</sup> Office Excel versão 2007. Os testes estatísticos empregados entre os grupos laser As-Ga e controle para o parâmetro de reparação do músculo subcutâneo, foi o ANOVA seguido pelo Student-Newman-Keuls para a comparação entre os grupos, considerando significantes um  $p < 0,05$ .

#### 4. RESULTADOS

Os resultados do estudo serão apresentados em duas etapas: análise do grupo “A” (7 dias de tratamento/simulação) e análise do grupo “B” (14 dias de tratamento/simulação).

##### a) Grupo LASER As-Ga e grupo controle (7dias)

Na Tabela 3 está demonstrada a quantidade de fibras musculares encontradas nas lâminas analisadas e as médias de cada um dos grupos de tratamento/controle. Nessa tabela, pode ser observada a falta de um animal do grupo controle, 2 animais do grupo tratado com laser na dose de 4 joules/cm<sup>2</sup> e 1 animal do grupo tratado com laser na dose de 20 joules/cm<sup>2</sup>. Isso ocorreu devido a problemas durante a preparação das lâminas, não permitindo que as mesmas pudessem ser avaliadas.

Tabela 3 : Quantidade de fibras musculares encontradas no grupo “A” (7 dias)

Animal	Total de fibras Controle	Total de fibras 4 joules/cm <sup>2</sup>	Total de fibras 8 joules/cm <sup>2</sup>	Total de fibras 20 joules/cm <sup>2</sup>
1	18	17	20	22
2	19	17	20	17
3	17	21	15	23
4	14	24	15	17
5	16	20	37	x
6	14	23	31	18
7	16	15	x	x
8	17	17	x	x
9	18	x	x	x
10	x	x	x	x
Média	17	19	23	19

Na Tabela 4 é mostrado o número dos animais, a quantidade de fibras reparadas, os grupos de tratamento/controle e as médias.

Tabela 4: Número total de fibras reparadas no grupo "A"

Animal	Fibras reparadas Controle	Fibras reparadas 4 joules/cm <sup>2</sup>	Fibras reparadas 8 joules/cm <sup>2</sup>	Fibras reparadas 20 joules/cm <sup>2</sup>
1	6	12	13	14
2	7	13	10	9
3	10	12	7	12
4	5	21	11	12
5	5	15	23	8
6	3	21	21	8
7	4	9	x	x
8	9	3	x	x
9	7	6	x	x
10	x	14	x	x
Média	6	13	14	11

A Tabela 5 mostra os percentuais das fibras reparadas e as médias de um dos grupos.

Tabela 5: Percentual de fibras musculares reparadas no grupo "A"

Animal	Fibras reparadas Controle	Fibras reparadas 4 joules/cm <sup>2</sup>	Fibras reparadas 8 joules/cm <sup>2</sup>	Fibras reparadas 20 joules/cm <sup>2</sup>
1	33,3	70,6	65,0	63,6
2	36,8	76,5	50,0	52,9
3	58,8	57,1	46,7	52,2
4	35,7	87,5	73,3	70,6
5	31,3	75,0	62,2	x
6	21,4	91,3	67,7	44,4
7	25,0	60,0	x	x
8	52,9	17,6	x	x
9	38,9	x	x	x
10	x	x	x	x
Média	37	67	61	57

Para a análise de reparação tecidual, foi quantificado o número de fibras musculares reparadas. No Gráfico 1 são demonstrados os percentuais de fibras musculares do músculo subcutâneo reparados após sete dias de tratamento com diferentes potências de laser As-Ga. Os resultados foram analisados pelo teste ANOVA ( $p=0,0042$ ) seguido pelo Student-Newman-Keuls para a comparação entre os grupos.

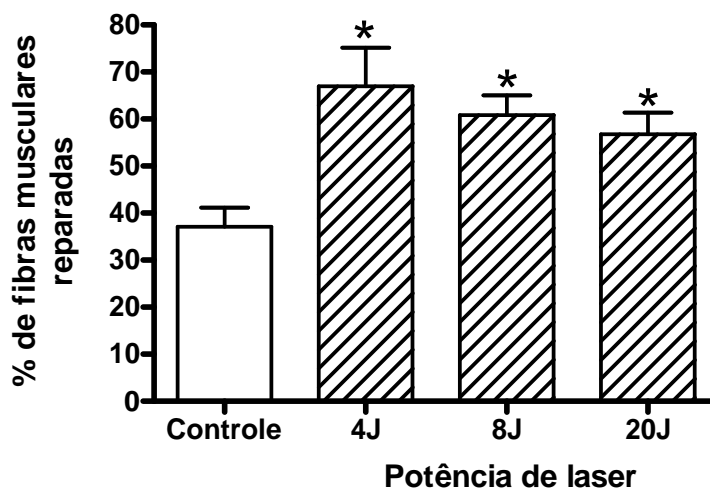


Gráfico 1: Comparação entre o grupo controle (7 dias) e o grupo LASER (7 dias) com diferentes doses.  $p < 0,05$

Todos os grupos tiveram diferenças estatísticas significantes em relação ao grupo controle, mostrando que os grupos tratados com o laser As-Ga obtiveram maior índice de fibras reparadas em relação ao grupo que não sofreu a radiação. As diferenças foram exatamente de:

- Controle x 4joules/cm<sup>2</sup> = Student-Newman-Keuls;  $p=0,0041$
- Controle x 8 joules/cm<sup>2</sup> = Student-Newman-Keuls;  $p=0,0017$
- Controle x 20 joules/cm<sup>2</sup> = Student-Newman-Keuls;  $p=0,008$

Foi observado também, que não houve diferenças significantes entre os grupos de tratamento, apenas um leve aumento no percentual de fibras reparadas no grupo tratado com o laser As-Ga com uma dose de 4 joules/cm<sup>2</sup>

b) Grupo LASER As-Ga e controle, tratados por 14 dias

Na Tabela 6 é mostrada a quantidade de fibras musculares encontradas nas lâminas analisadas e as médias de cada um dos grupos de tratamento/controle. Nessa tabela observa-se também a falta de alguns animais pelos mesmos motivos citados anteriormente.

Tabela 6: Número de fibras encontradas no grupo “B”(14 dias)

Animal	Total de fibras Controle	Total de fibras 4J	Total de fibras 8J	Total de fibras 20J
1	33	20	17	18
2	18	23	28	22
3	19	26	18	17
4	19	20	16	22
5	31	24	x	27
6	30	21	x	x
7	18	17	x	x
8	21	23	x	x
9	21	25	x	x
10	x	22	x	x
Média	23	22	21	21

Na Tabela 7 é demonstrado o número dos animais, a quantidade de fibras reparadas, os grupos de tratamento/controle e as médias.

Tabela 7: número total de fibras reparadas no grupo “B”

Animal	Fibras reparadas Controle	Fibras reparadas 4J	Fibras reparadas 8J	Fibras reparadas 20J
1	22	19	12	9
2	5	17	21	13
3	11	12	12	16
4	12	14	8	7
5	20	12	x	20
6	13	15	x	x
7	7	8	x	x
8	10	14	x	x
9	10	12	x	x
10	x	14	x	x
Média	12	12	13	13

Na Tabela 8 são demonstrados os percentuais das fibras reparadas e as médias de um dos grupos.

Tabela 8: percentual de fibras musculares reparadas no grupo “B”

Animal	Fibras reparadas Controle	Fibras reparadas 4J	Fibras reparadas 8J	Fibras reparadas 20J
1	66,7	95,0	70,6	50,0
2	27,8	73,9	75,0	59,1
3	57,9	46,2	66,7	94,1
4	63,2	70,0	50,0	31,8
5	64,5	50,0	x	74,1
6	43,3	71,4	x	x
7	38,9	47,1	x	x
8	47,6	60,9	x	x
9	47,6	48,0	x	x
10	x	63,6	x	x
Média	51	63	66	62



Para os animais que foram avaliados por 14 dias, não foram observadas diferenças estatísticas entre nenhum dos grupos. No gráfico 2, são demonstrados os percentuais.

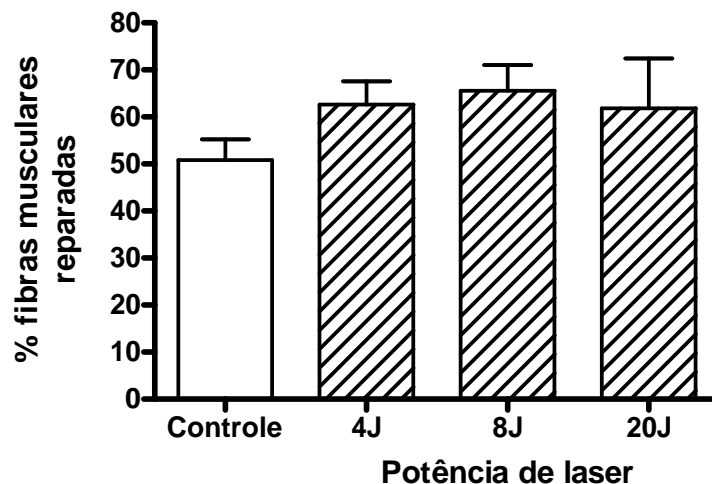


Gráfico 2: Comparação entre o grupo controle (14 dias) e o grupo LASER (14 dias) com diferentes doses.  $p > 0,05$

Comparando o grupo “A” (7 dias) e “B” (14 dias), observamos os índices percentuais de fibras reparadas. Não foram observadas diferenças significantes entre os grupos “A” e “B”. No gráfico 3 é mostrado os dois grupos. As colunas que não tem sombreamento representam o grupo “A” e as colunas sombreadas com listas diagonais representam o grupo “B”.

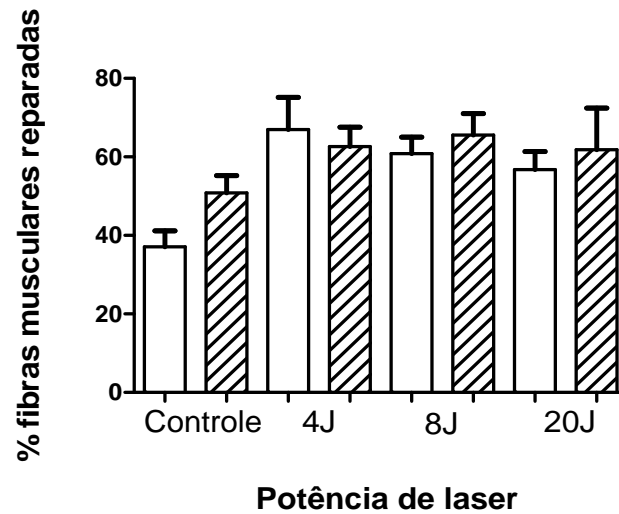


Gráfico 3: percentual de fibras reparadas nos grupos "A" e "B"

Na figura 8 é mostrada uma lâmina do grupo tratado com o laser com uma dose de 4 joules/cm<sup>2</sup> por 7 dias consecutivos. Já na figura 9 é mostrada uma lâmina do grupo controle pelo mesmo período. Observa-se a diferença entre as fibras musculares no grupo tratado em relação ao grupo controle.

Figura 8: Lâmina do grupo tratado com laser.

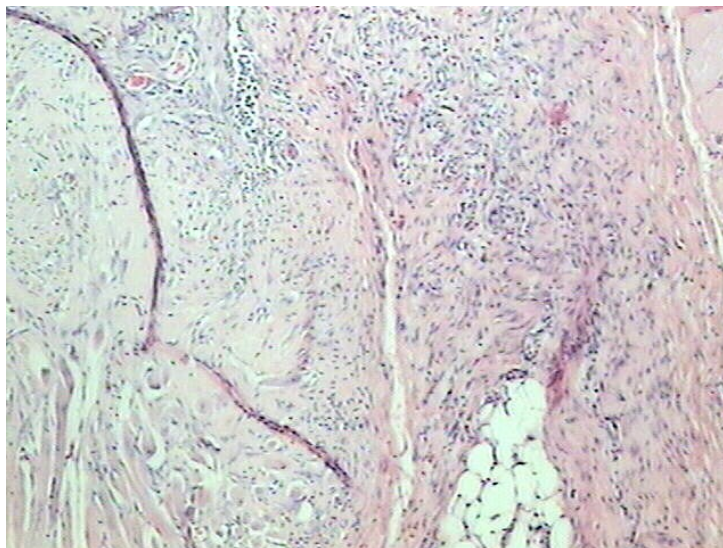
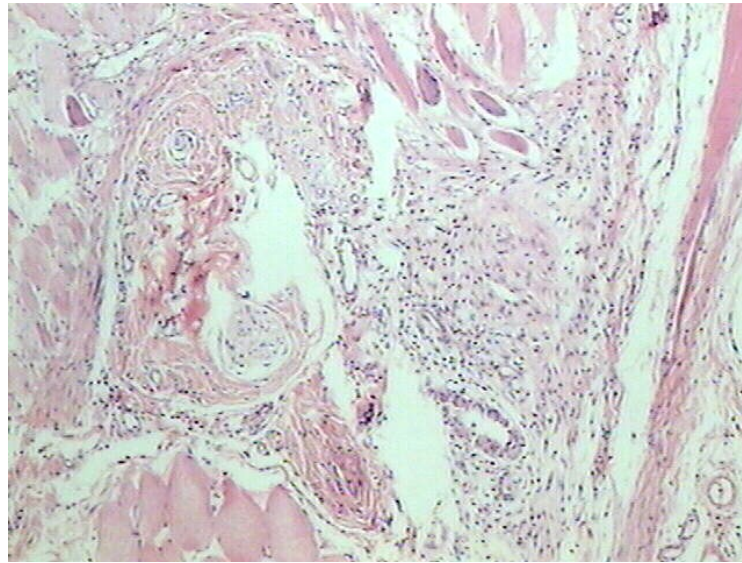


Figura 9: Lâmina no grupo controle.



## 5. DISCUSSÃO

Estudos preliminares comprovaram a eficácia da utilização do laser de As-Ga no processo de reparação de alguns tecidos como, por exemplo, no estudo de Tatarunas *et al.* (1998) onde o laser ajudou a reparar o tecido epitelial de ratos. Já outros como o de Lucas *et al.* (2000) e Mendes (2000) referiram que a terapia com o LASER de As-Ga não tem efeitos benéficos no tratamento de úlceras de decúbito em humanos.

No processo de reparação muscular, os resultados são contraditórios como os resultados obtidos por Amaral *et al.* (2001) que observaram resultados positivos no processo de reparação muscular em camundongos utilizando o laser He-Ne. Já Oliveira *et al.* (1999) não mostraram diferenças importantes no processo de reparo muscular utilizando o laser As-Ga.

Tantos resultados diferentes na literatura estimularam a realização deste estudo. Por isso, o objetivo do presente estudo foi analisar o processo de reparação do tecido muscular utilizando três diferentes doses do laser de As-Ga por um período de 7 e 14 dias consecutivos.

A pesquisa foi conduzida na Bioagri Laboratórios que é reconhecida por assegurar normas de qualidade rígidas e é certificada por diversos órgãos oficiais como o IMMETRO. As normas de seguranças assim como os procedimentos que asseguram as boas práticas laboratoriais encontram-se em ANEXO 2.

Os métodos adotados por vários pesquisadores para gerar as lesões musculares têm sido a utilização de miotoxinas ou operações (MINAMOTO, 1999; NICOLAU, 2001; ABOU HALA, 2003). Outros autores como Filho-Freitas

*et al.* (2006) e Luz *et al.* (2007), optaram por produzir lesões musculares por impacto mecânico. No presente experimento, preferiu-se a indução cirúrgica pela melhor precisão do método.

A lesão no dorso do animal foi preferida a uma lesão na pata, como realizada em um teste piloto, pois os animais acabavam por mexer em suas feridas, o que provocava aumento considerável da área da lesão. Esse foi o motivo também para mantê-los em caixas individuais. Além de facilitar a identificação, evitamos que os animais ferissem uns aos outros.

Optou-se por realizar a incisão com o *punch* de biópsia para se padronizar a lesão e facilitar a análise do processo de reparação do músculo do animal, além de favorecer o processo de reparo por segunda intenção. O *punch* utilizado mede 3 mm de circunferência, que tem a medida aproximada da ponta da caneta do laser, de onde sai a radiação. A profundidade da lesão foi de 1 cm, uma profundidade superior a capacidade de penetração do laser de As-Ga como mostrado no estudo de Low e Reed (2001), onde relataram que esse tipo de laser opera em profundidade de 30 mm a 50 mm. Longo *et al.* (1987), demonstraram que o laser consegue obter aceleração da reparação nas faixas de comprimento de onda infravermelha. Outros autores também relataram que os lasers são eficazes dependendo do comprimento de onda do aparelho. (PARIZOTTO e BARANAUSKAS (1998); REDDY *et al.*, 1998). Labbe *et al.* (1990) referiram que as melhores faixas de onda estão entre 633 nm a 1060 nm. LAASKO *et al.* (1993) explicaram que isso acontece porque os comprimentos de onda mais curtos dispersam mais, penetrando menos do que os comprimentos longos e, portanto, os comprimentos mais longos são mais adequados para os tecidos profundos como o muscular.

Rochkind *et al.* (1989) conduziram vários experimentos sobre os efeitos do laser em feridas cutâneas, queimaduras e lesões nervosas. As doses utilizadas variaram entre 7 e 10 joules/cm<sup>2</sup>. Concluíram que a quantidade de radiação que alcançava o nervo ciático era pequena em relação aquela que atingia a pele dos animais. Isso nos mostra que as doses não influenciam no alcance da profundidade do laser.

No presente estudo, as doses foram escolhidas usando critérios individuais. A primeira dose de 4 joules/cm<sup>2</sup> foi escolhida pelos modelos de Colls (1984) e Túner e Hode (1999), que mostraram que essa seria a dose mais utilizada nesse tipo de lesão. Filho-Freitas *et al.* (2006) também mostraram efeitos estimulatórios com radiação de 4 joules/cm<sup>2</sup> em lesões traumáticas sobre o tecido muscular de ratos.

As doses mais altas foram escolhidas para testar os resultados apresentados em alguns estudos, que trazem a utilização desse tipo de laser com doses mais altas observando efeitos negativos. Por exemplo, no estudo de Vicenzo *et al.* (2002) os efeitos estimulatórios do laser se dão melhor com doses abaixo de 8 joules/cm sendo inibitórios com doses acima desse valores. Luz *et al.* (2007), mostraram em seu experimento que a dose de 10 joules/cm<sup>2</sup> induziu aumento da síntese de colágeno em animais tratados por 8 dias e diminuiu nos animais tratados por 15 dias. No estudo de Schaffer *et al.* (1997), os autores demonstraram que a proliferação de células normais foi observada após radiação com laser de 805 nm na dose de 4 joules/cm<sup>2</sup>, já na dose de 20 joules/cm<sup>2</sup> esse efeito foi suprimido. Parizoto e Baranauskas (1998) evidenciaram que o laser de He-Ne intensificou melhor o reparo do tendão de ratos com uma dose de 5 joules/cm<sup>2</sup> do que com uma dose de 50 joules/cm<sup>2</sup>.

No presente estudo optou-se por tratamento com a dose mais alta do aparelho (20 joules/cm<sup>2</sup>) e uma dose intermediária de 8 joules/cm<sup>2</sup>.

Os efeitos do laser de baixa potência no processo de reparo estão intimamente relacionados com as doses enérgicas adequadas, assim como a aplicação correta e o uso regular. Doses baixas ou altas podem produzir efeitos inversos aos efeitos desejáveis. (KARU, 1989). Longo e Mester (1998) também afirmaram que o laser pode estimular ou inibir o processo de reparo dependendo do tipo de aparelho. Outro exemplo é o estudo de Young *et al.* (1989), que mostraram que a radiação com o laser teve efeito inibitório sobre a proliferação de fibroblastos

Os diversos efeitos da radiação do laser são descritos por diversos autores. A ação analgésica se dá principalmente pela redução da inflamação através da reabsorção de exsudatos, além da estimulação da microcirculação e alteração no metabolismo de serotoninas. O efeito antiinflamatório é devido à interferência na síntese de prostaglandinas e a ação microcirculatória (FREITAS e BARANAUSKAS, 2000). Já seus efeitos reparativos levam ao rearranjo estrutural do citoesqueleto e a modulação celular (MEDRADO, *et al.*, 2003).

Stainki *et al.* (1998) relatam que além desses efeitos, o laser de baixa potência modula o tecido conjuntivo na regeneração ou cicatrização dos tecidos musculares.

Estudos realizados anteriormente sugeriam que a radiação aumentaria a síntese de ATP pela aceleração na transferência de elétrons na cadeia mitocondrial, estimulando o reparo tecidual. (YAAKOBI *et al.*, 1996; ENWEMEKA, 1998).

Mester *et al.* (1985) referiram que o laser de baixa potência aumenta a proliferação celular e acelera a formação do tecido de granulação. Lopes-Almeida *et al.* (2001) relataram que o laser aumenta o metabolismo celular e o potencial regenerativo dos tecidos biológicos.

Enwemeka *et al.* (1994) relataram que houve aumento de 40% da capacidade biomecânica de tendões lesados utilizando o laser de As-Ga com doses de 0,5 joules/cm<sup>2</sup>, 1 joule/cm<sup>2</sup> e 1,5 joules/cm<sup>2</sup>.

Outro aspecto importante é a frequência ideal para o tratamento. Karu (1989) considera que o melhor é realizar o tratamento a cada dois dias. Outros autores como Hallman *et al.*, apud LAASKO *et al.* (1993), priorizam frequências diárias de tratamento. No presente estudo, foi realizada frequência diária de tratamento por ser tratar de um período curto que foi de 7 e 14 dias.

No presente estudo, foi observado que os animais do grupo "A" (7 dias) tiveram um índice de fibras reparadas melhor do que os animais que não receberam tratamento, independente da dose.

Resultados semelhantes são encontrados no estudo de Assia *et al.* (1989) que mostram que os efeitos do laser são transitórios, permanecendo por até três semanas, sendo mais efetivos na primeira semana. Isso poderia explicar as alterações encontradas quando comparados os grupos nos primeiros 7 dias em relação ao grupo tratado por 14 dias.

Segundo autores como Ben-Dov, *et al.* (1999), Amaral *et al.* (2001) e Shefer *et al.* (2002) e (2003), o laser aplicado nas primeiras horas após a lesão otimiza o processo reparativo do tecido muscular pelo aumento da mobilidade



mioblástica e de miofibrilas jovens com proliferação de células satélites e neofomação de vasos sanguíneos na área que sofreu a radiação.

Corroborando com a idéia de que o laser é benéfico na reparação do tecido muscular, o estudo de Luz *et al.* (2007) concluem que o laser de As-Ga-Al resultou em uma melhor distribuição do colágeno entre as fibras musculares, contribuindo para prevenir quadros de retrações musculares, portanto, contribuindo para a recuperação da função muscular. Assim como esse estudo, Cressoni *et al.* (2008), demonstram o poder de reparação do laser, usando-o para acelerar a regeneração do músculo tibial anterior de ratos. Concluíram que o laser de Al-Ga-InP teve efeitos antiinflamatórios, reduzindo o número de leucócitos na área da lesão, acelerando a regeneração do tecido durante uma fase aguda.

O estudo de Amaral *et al.* (2001) demonstrou que o LASER de He-Ne aumenta a área total de fibras musculares em relação ao grupo controle. Eles sugerem que radiação provocaria um aumento da taxa de síntese de proteínas, além de estimular as células satélites durante o processo.

Quando comparados os grupos que receberam doses diferentes de radiação, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos, mostrando que ambas as doses utilizadas, 4 joules/cm<sup>2</sup>; 8 joules/cm<sup>2</sup> e 20 joules/cm<sup>2</sup>, foram eficientes no processo de reparo do músculo, porém não podemos dizer qual seria a melhor dose para esse tipo de lesão. No estudo de Amaral *et al.* (2001), foram utilizadas doses de 2,6; 8,4 e 25 joules, e observou-se que apenas a dose de 2,6 joules promoveu mudanças significativas no tecido muscular de ratos utilizando o laser de He-Ne.

Em resumo, os resultados deste trabalho demonstraram que as fibras musculares que constituem os músculos esqueléticos, durante o período de 7 dias de tratamento com o laser de As-Ga, em diferentes doses, tiveram índice de reparação acelerado em relação aos animais que não fizeram o tratamento.

Já no grupo "B" (14 dias), não foram observadas diferenças entre os animais do grupo controle e o grupo de tratamento com o laser As-Ga. Isso indica que o tratamento com o laser é mais efetivo na primeira semana. Após esse período a radiação do laser não gera mais mudanças que poderiam provocar aceleração do reparo dos tecidos. Os índices de reparação das fibras ficam semelhantes nos grupos tratados.

Como inferência a efetividade do tratamento com o laser As-Ga no processo de reparo muscular dos ratos observa-se que esse processo depende do período de tempo do tratamento e não da dose utilizada.

Ao exame histopatológico foi analisada a quantidade de fibras musculares reparadas, ou seja, a capacidade de regeneração desse tecido.

Bassoli (2001) afirmou que o evento que talvez seja decisivo na regeneração muscular, seja a proliferação de células miogênicas, que se transformarão futuramente em mioblastos. Esse autor afirmou também que os mecanismos que fazem com que essas células sejam ativadas ainda não são totalmente conhecidos.

Corroborando a idéia de que o parâmetro de regeneração apresenta maior vantagem em relação ao parâmetro de cicatrização, Carlson e Faulkner (1983) lembram que a regeneração resulta em maior ou menor restauração da

estrutura original e função do músculo, ao contrário da cicatrização que não devolve a função original do tecido muscular.

Fischer *et al.* (1990) consideraram que no período entre 24 e 48 horas há aumento do número de núcleos sarcolemais, semelhantes às células satélites. Após esse período, células regeneradoras desenvolvem núcleos centrais e organizam os sarcômeros.

Os mecanismos de reparo da fibra muscular são de importantes para compreender o processo de restauração após uma lesão no músculo. O processo de cicatrização compete diretamente com a regeneração das fibras. (SHEFER *et al.*, 2002).

Shefer *et al.* (2002) mostraram que após uma lesão grave, a regeneração do músculo esquelético passa por um processo lento, o qual o tecido cicatricial compete com a regeneração das fibras musculares no local da lesão.

No músculo esquelético de ratos e sapos, a radiação com laser de He-Ne no local de um ferimento, promoveu regeneração duas a oito vezes maiores respectivamente, em relação ao grupo controle. (WEISS e ORON, 1992); (BIBIKOVA e ORON, 1993).

Estudos realizados em cultura de células satélites indicaram que a radiação a laser aumentou a proliferação dessas células, inibindo sua diferenciação celular. (BEN-DOVE *et al.*, 1999).

O aumento de células satélites na regeneração muscular foi evidenciado no estudo de Rantanen *et al.* (1999) utilizando ultra-som com frequência de 3 MHz, em que foi observado aumento de 96% nas células satélites. As células

satélites, contudo, somente aparecem após os restos dos tecidos necrosados terem sido fagocitadas. Danilov *et al.* (1996) relataram que a fase de proliferação é iniciada 36 horas após a lesão e inclui a ativação de células satélites, proliferação e aparecimento de mioblastos.

Bassoli (2001) afirmou que, mesmo após dez dias de tratamento com ultra-som, ainda havia a presença de numerosas células satélites bloqueadas em metáfise, mostrando que realmente a regeneração dos tecidos depende do tamanho da lesão.

No presente estudo, não foram analisadas as células satélites, o que poderia ser feito por microscopia eletrônica. Porém, é possível inferir que as células satélites atuaram no reparo do tecido, considerando-se a reparação observada das fibras musculares.

A aplicação do laser pode induzir tanto a estimulação quanto a inibição da formação de fibras musculares ou colágenas. Isso depende do tipo de laser, comprimento de onda, número de aplicações, distância da caneta em relação ao tecido e da densidade de da radiação utilizada. (KARU *et al.*, 1995; FISCHER *et al.*, 2000; PEREIRA *et al.*, 2002).

Para favorecer o aspecto regenerativo do tecido, o laser deveria diminuir a síntese de colágeno. Fischer *et al.* (2000) explicaram que o retardo da síntese de colágeno na fase mais tardia, ameniza as retrações musculares, favorecendo os fatores de regeneração ao invés de cicatrização (fibrose). Eles explicam ainda que a organização do colágeno é fundamental para que o tecido muscular consiga reparar, principalmente porque a desorganização assim como seu excesso, inibem a regeneração , e favorecem a cicatrização.

Estudos *in vitro* ou *in vivo*, mostram o poder de reparação dos lasers de baixa potência em diferentes tecidos biológicos. (AMARAL *et al.*, 1999).

Os resultados obtidos no presente estudo evidenciam que a terapia com o laser de As-Ga auxiliou na reparação do tecido muscular em ratos, principalmente na primeira semana.

## **6. CONCLUSÕES**

Nas condições que foi realizado o presente estudo, a aplicação do laser As-Ga contribui para a aceleração do processo regenerativo do músculo na primeira semana após a lesão.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU-HALA, A.Z. *Efeitos da irradiação laser e da irradiação infravermelha em músculo tibial anterior de rato submetido ao processo de fadiga muscular*. Dissertação de Mestrado. UNIVAP – Universidade do Vale Paraiba. São José dos Campos, 2003.

ALMEIDA-LOPES, L.; RIGAU, J.; ZÂNGARO, R.A.; GUIDUGLI-NETO, J.; JAEGER, M.M.M. *Compararison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence*. *Lasers in Surgery and Medicine*, v.29, p.179-184, 2001.

ALMEIDA-LOPES, L. *Análise in vitro da proliferação celular de fibroblastos de gengiva humana tratados com laser de baixa intensidade utilizando diferentes parâmetros de irradiação*. Tese (Doutorado em Engenharia de Materiais), inter-unidades: IFSC/IQSC/EESC da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.

ALMEIDA-LOPES, L. *Laserterapia: conceitos e aplicações*. Disponível em: [http://www.nupen.com.br/Revista\\_port/fund\\_fisicos1.php](http://www.nupen.com.br/Revista_port/fund_fisicos1.php): 25 jun, 2008.

AMARAL, A.C.; PARIZOTTO, N.A.; SALVINI, T.F. *He-Ne laser action in the regeneration of tibialis anterior muscle of mice*. *Lasers in Medical Science*, v.16, p.44-52, 2001.

ANDERS, J.J.; BORKE, R.C.; WOORLERY, S.K.; VAN DE MERWE, W.P. *Low power laser irradiation alters the rate of regeneration of the rat facial nerve*. *Lasers in Surgery and Medicine*, v.13, p.72-75, 1993.

ASSIA, E.; ROSNER, M.; BELKIN, M.; SOLOMON, A.; SCHWATZ, M. *Temporal parameters of low energy laser irradiation for optimal delay of post-traumatic degeneration of rat optic nerve*. *Brain Research*, v. 476, p.205-212, 1989.

BEN-DOV.; SHEFER, G.; IRINITCHEV, A.; WERING, A.; ORON, U.; HALEVY, O. *Low-laser irradiation affects satellite cell proliferation and differentiation in vitro*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1448, p.372-380, 1999.

BASFORD, J.R. *Low-intensity laser therapy: still not an established clinical tool*. *Lasers in Surgery and Medicine*. v. 16, p.331-342, 1995.

BASSOLI, D. A. *Avaliação dos efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade na regeneração de músculos esqueléticos com vistas a aplicabilidade em clínica fisioterapêutica*. Dissertação de Mestrado em Bioengenharia Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos, 2001.

BAXTER, D. *Therapeutic Lasers: Theory and Practice*. New York: Churchill Livingstone, 1997.

BAGNATO, V.S. *Os fundamentos da luz laser*. Física na escola, São Carlos, v.2, n.2, p.4-9, 2001.

- BIBIKOVA, A.; ORON, U. *Promotion of muscle regeneration in the toad (bufo viridis) gastrocnemius by low-energy laser irradiation*. Anal. Rec., v. 235, p.374-380, 1993.
- BONDESEN, B.A.; MILLS, S.T.; KRISTY, M.K.; GRACE.K.P. *The COX-2 pathway is essential during early stages of skeletal muscle regeneration*. Journal Physiology Cell, v.287, 475-483, 2004.
- BONIDE-FOWLER, S. *Skeletal muscle regeneration after injury – An Overview*. Journal of Voice, v.8, n.1, p.53-62, 1994.
- BRASILEIRO FILHO, G. B. *Bogliolo Patologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- CAMPION, D. R. *The muscle satellite cell: A review*. International Review of Cytology. 1984. v.87, p.225 - 51.
- CARLSON, B.M; FALKNER, J.A. *The regeneration of skeletal muscle fibers following injury: a review*. Medicine and Science in Sports and Exercises. 1983. v.15, n.3, p.187 – 198
- CARRINHO, P.M. *Estudo comparativo utilizando LASERS de 685 nm e 830 nm no processo de reparo tecidual em tendões tenotomizados de ratos*. Dissertação de Mestrado em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2004.
- COLLS, J. *La LASER Terapia Hoy*. Centro de Documentacion LASER de Meditec. Barcelona, 1984.
- COTRAN, R.S; KUMAR, V; COLLINS, S.L. *Robbins: Patologia Estrutural e Funcional*. Reparo dos Tecidos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- CRESSONI, M.D.C.; GIUSTI, H.H.K.D.; CASAROTTO, R.A.; ANARUMA, C.A. *The effects of a 785nm AlGaInP laser on the regeneration of rat anterior tibialis muscle after surgically induced injury*. Photomedicine and Laser Surgery, v.26, p.461-466, 2008.
- DANILOV, R.K; ODINTSOVA, I.A; NAIDENOVA, I.U.G. *The regeneration of skeletal muscle tissue after a gunshot injury*. Morfologia. 1996. v.110, n.5, p.86-90.
- ENWEMWKA, C.S.; COHEN-KORNBERG, E.; DUSWALT, E.P.; WEBWE, D.M.; RODRIGUEZ, I.M. *Biomechanical effects of three different periods of GaAs laser photostimulation on tenotomized tendons*. Laser therapy, v. 6, p.181-188, 1994.
- FILHO-FREITAS, G.A.; SILVA,M.F.R.; BELLETI,M.E.; MACHADO,E.R.; SILVA,N.S. *Efeito da irradiação de baixa potência Arsenieto de Gálio Alumínio (As-Ga-Al) de 785 nm sobre a cicatrização de lesão muscular: estudo experimental*. Revista UniVap, v. 13, p.53-60, 2006.



- FICSHER, B.D ET AL. *Ultrastutural events following acute muscle trauma*. Medicine and Science in Sports and Exercise. 1990. v.22, n.2, p. 185- 193.
- FOSS, Merle L.; KETEUIAN, S.J. *Bases fisiológicas do exercício e do esporte*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000
- FREITAS, I.G.F; BARANAUSKAS, V.M.A. *Laser effects on osteogenesis*. Applied Surface Science, v.154, p.548-554, 2000.
- GARTNER, P.L.; HIATT,J.L. *Histologia*. Rio de Janeiro: Ed. Guanabaro Koogan, 1999.
- HURME, T; KALIMO, H. *Activation of myogenic precursor cells after muscle injury*. Medicine and Sciences in Sports and Exercise. 1992. v.24, n.2, p.197-205.
- JÓSZA, L.; KANNUS,P. *Human Tendons: anatomy, physiology and pathology*. Human Kinetcs, USA, 1997.
- JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J.S.F. *Histologia Básica*. 7 ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1990.
- KARU, T. *The science of low-power Laser therapy*. Australia: Gordon and Breach Science Publishers, 1998.
- KARU, T. *Mechanisms of interation of monochromatic visible light with cells*. Proceedeings of Effects os Low Power Light on Biological Systems, v. 2630, p.2-9, 1995.
- KARU, T. *Photobiology of low-power laser therapy*, v.8. London: Harwood Academic Publishers, 1989.
- KITCHEN, S.S.; BAZIN, S. *Eletroterapia de Clayton*. São Paulo: Ed. Manole Ltda, p. 191-210, 1996.
- KITCHEN, S.S.; PARTRIDGE, C.J. *A review of level laser therapy. Part 1: background, physiological effects and hazards*. Phsiotherapy ,v. 77, n.3, p.161-170, 1991.
- KLOTH, L. *Wound Healing: alternatives in management*. USA: Churchill Livingstone. P. 327-364, 1997.
- KAARIANEN, M.; KAARIANEN, J.; JARVINEN , T.L.N.; SIEVANEN, H.; KALIMO, H.; JARVINEN, M. *Correlation between biochemical and structural changes during the regeneration of skeletal muscle after laceration injury*. Journal of Ortopedic Research, v.16, p. 197- 296, 1998.
- KOLARI, P.J. *Penetration of unfocused LASER light into the skin*. Arch.Dematol. 1985. v.277, p. 342- 344.
- LAAKSO, L.; RICHARDSON, C.; CRAMOND, T. *Factors affecting low level laser therapy*. Australian Journal Phisioterapy, v. 39, n.2, p.95-99, 1993.

LABBE, R.F.; SKOGERBOE, K.J.; DAVIS, H.A.; RETTMER, R.L. *Laser photobioactivation mechanisms: in vitro studies using ascorbic acid uptake and hydroxyoroline formation as biochemical markers of irradiation response*. Lasers in Surgery and Medicine, v.10, p.201-207, 1990.

LONGO, L.; EVANGELISTA, S.; TINACCI, G.; SESTI, A.G. *Effects of diode laser silver Arsenide-Aluminium (Ga-Al-As) 904 nm on healing of experimental wounds*. Lasers in Surgery and Medicine, v. 7, p.444-447, 1987.

LONGO, L. MESTER, A. *Present and future of laser cicatrization*. In: Proceeding 2<sup>nd</sup> Congress World Association for Laser Therapy. Kansas City, Missouri, USA, September 2-5, p.10-11, 1998.

LOW, L.; REED, A. *Eletroterapia Explicada: Princípios e Prática*. 3<sup>a</sup> Ed., São Paulo: Ed. Manole, 2001.

LUCAS, C.; STANBOROUGH, C.L.; FREEMAN, R.J.; DE HAAN, R.J. *Efficacy of low-level laser therapy on wound healing in human subjects: a systematic review*. Lasers Medicine Science, v.15, p.84-93, 2000.

LUZ, M.M.M.; LUZ, F.G.R.; SILVA, M.F.R.; OLIVEIRA, C.S.; MATA, F.R.; MATA, J.R. *Efeito do Laser As-Ga-Al de baixa potência sobre o músculo gastrocnêmio de rato submetido à lesão mecânica*. Revista Eletrônica de Farmácia, v.4, p.159-168, 2007.

MAILLET, H. *O laser- Princípios e técnicas de aplicação*. São Paulo: Ed. Manole, 1987.

MATERA, J.M; TATARUNAS, A.C; OLIVEIRA, S.M. *Comparação de três vias de acesso a articulação coxofemoral para excisão da cabeça e colo do fêmur de cães*. Vet. Notícias. 1998. v.4, p.43-47.

MEDRADO, A.P.; PUGLIESE, L.S.; REIS, S.R.A.; ANDRADE, Z.A. *Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts*. Lasers and Surgery and Medicine, v.32, p.239-244, 2003.

MENDES, A.F.O. *Avaliação do laser, com comprimento de onda 670nm, no processo de cicatrização de úlceras de pressão no paciente lesado medular*. Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, 2000.

MESTER, E.; MESTER, A.F.; MESTER, A. *The biomedical effects of laser application*. Lasers in Surgery and Medicine, v. 5, p.31-39, 1985.

MESTER, A.; SNOW, J.B.; SHAMAN, P. *Photochemical effects of laser irradiation on neuritic outgrowth of olfactory neuroepithelial explants*. Reprinted from Otolaryngology: Head and Neck Surgery, v. 105, n.3, p.449-456, 1991.

MINAMOTO, V.B.; GRAZZIANO, C.R.; SALVINI, T.F. *Effects of single and periodic trauma contusion on the rat soleus muscle at different stages of regeneration*. The Anatomical Record, v. 254, p. 281-287, 1999.

NICOLAU, R.A. *Efeito fo Laser de baixa potência (As-Ga-Al) em tecido ósseo de rato submetido à lesão, analisando por histomorfometria óssea*. Dissertação de Mestrado, Universidade do Vale Paraiba. São José dos Campos, 2001.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Fourth Printing. Washington, 2000. 125 p. ISBN 0-309-05377-3.

NIKOLAOU, P.K.; MACDONALD, B.L.; GLISSON, R.R.; SEABER, A.V.; GARRET JR, W.E. *Biomechanical and histological evaluation of muscle after controlled strain injury*. The American Journal of Sports Medicine, v.15, n.1, p.9-14, 1987.

OLIVEIRA, N.M.L.; PARIZOTTO, N.A.; SALVINI, T.F. *Ga-As (904 nm) laser radiation does not affect muscle regeneration in mouse skeletal muscle*. Lasers in Surgery and Medicine, v.25, p. 13-21, 1999.

PARIZOTTO, N.A.; BARANAUSKAS, V. *Hidrigen bonding of collagen molecule stimulated by He-Ne laser in regenerating of tendón*. In: Proceeding 2<sup>nd</sup> World Association of Laser Therapy. Kansas city, Missouri, USA, September 2-5, p. 64-65, 1998.

PEREIRA, A.N.; EDUARDO, C.P.;MSTSON,E.; MARQUES, N.M. *Effect os low-power laser irradiation on cell growth and procollagen syntheses of cultured fibroblasts*. Lasers in Surgery and Medicine, v.31, p.263,267, 2002.

POWERS, S.K.; HOWLEY, E.T. *Fisiologia do exercício: teoria e aplicação ao condicionamento e ao desempenho*. São Paulo: Manole, 2000.

PRISK, V.; HUARD, J. *Muscle injuries and repair: The role of prostaglandins and inflammation*. Histology and Histopathology, v.18, p.1243-1256, 2003.

RANTANEN, J.; THORSSON,O.; WOLLMER,P.; HURME, T.; KALIMO,H. *Effects of therapeutic ultrasound on the regeneration of skeletal myofibers after experimental muscle injury*. The American Journal of Sports Medicine. 1999. v.27, n.1, p.54-59.

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

ROCKIND, S.; NISSAN.M; LUBART, R.; AVRAM.J.; BARTAL, A. *The vivo nerve response to direct low-energy laser irradiation*. Acta Neurochir, v.94, p.74-77, 1988.

ROSS, M.H.; ROMRELL, L.J. *Histologia: texto e atlas*. 2 ed. São Paulo: Ed Panamericana, 1993.

SERRÃO, F.V. *Alterações morfo-funcionais do músculo quadriceps femoral de humanos lesado pelo exercício excêntrico*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos, 2004.

SCHAFFER, M.; SROKA, R.; SCHARADES-REICHARDT, U. SCHAFFER, P.M. *Biomodulative effects induced by 805 nm laser light irradiation of normal and tumor cells*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, v.40, p.253-357, 1997.

SHEFER, G.; BARASH, I.; ORON, U.; HALEVY, O. *Low-energy laser irradiation enhances de new protein syntheses its effects on translation-regulatory proteins in skeletal muscle myoblasts*. Biochimica et Biophysica Acta, v.1593, p.131-139, 2003-

SHEFER, G.; PARTRIDGE, T.A.; HESLOP, L.; GROSS, J.G.; ORON, U.; HALEVY, O. *Low-energy Laser irradiation promotes the survival and cel cycle entry of skeletal muscle satellite cells*. Journal of Cell Sceince, v. 115, p.1461-1469, 2002.

STAINKI, D.R.; RAISER, A.G.; GRAÇA, D.L.; BECKER, C.; FERNADEZ, G.M.S. *The gallium arsenide (GaAs) laser radiation in the radial nerve regeneration submitted to secondary surgical repair*. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v.35, p.37-40, 1998.

SUH, H. *Tissue restoration, tissue engineering and regenerative medicine*. Yonsei Medical Journal, v.41, n6, p.681-684, 2000.

TATARUNAS, A.C.; MATERA, J.M.; DAGLI. M.L.Z. *Estudo clinico e anatomopatológico da cicatrização cutânea no gato domestic. Utilização do laser de baixa potência Ga-As (904 nm)*. Acta Cirúrgica Brasileira., v.13, n2, 1998.

TILLMAN, L.J.; CUMMINGS, G.S. *Biologic mechanisms of connective tissue mutability*. In: CURRIER, D:P; NELSON; R:M. Dynamics of Human Biologic Tissue, Philadelphia: F:A Davis Company, cap. 1, p.1-41, 1992.

TUNER, J.; HODE, L. *Its all in the parameters: a critical analysis of some ell-known negative studies on low level laser therapy*. Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery, v. 16, n.5, p.245-248, 1998.

VEÇOSO, M.C. *LASER em Fisioterapia*. São Paulo, Lovise, 1993.

VICENZO, G. *Influência do Laser de baixa energia no processo de consolidação de fraturas de tibia: estudo experimental em ratos*. Revista Brasileira de Ortopedia, v. 36, p.174-178, 2001.

WATKINS, J. *Estrutura e função do sistema musculoesquelético*. Porto Alegre: Artmed, 2001.

WEISS, N.; ORON, U. *Enhancement of muscle regeneration in the rat gastrocnemius muscle by low energy laser irradiation*. Anat. Embryol., v. 186, p.497-503, 1992.

YAAKOBI, T.; MALTZ, L.; ORON, U. *Promotion of repair in the bone of tibia in rats by low energy laser (He-Ne) irradiation*. *Calcified Tissue International*, v. 59, p.297-300, 1996.

YOUNG, S.; BOLTON, P.; DYSON.M.; HARVEY,W.; DIAMANTOPOULOS,C. *Macrophage responsiveness to light therapy*. *Lasers in Surgery and Medicine*, v. 9, p.497-505, 1989.

**ANEXO 1**

**ANEXO 2**

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.  
This page will not be added after purchasing Win2PDF.