



**18º Congresso de Iniciação Científica**

**AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO VASCULAR DO TENDÃO CALCÂNEO NORMAL E  
SUBMETIDO Á LESÃO PARCIAL ANTES E APÓS A TERAPIA A LASER DE BAIXA  
INTENSIDADE EM RATOS**

**Autor(es)**

---

RAFAELA FERREIRA

**Orientador(es)**

---

ROSANA MACHER TEODORI, CARLOS EDUARDO PINFILDI

**Apoio Financeiro**

---

PIBIC/CNPQ

**1. Introdução**

---

O tendão calcâneo é o tendão mais volumoso e resistente do corpo humano (MAHAN; CARTER, 1992), sendo imprescindível para o funcionamento do mecanismo articular do tornozelo, tendo como principais funções a transmissão da força produzida pelo músculo para o osso e a resistência de cargas significantes de força tênsil (MAFFULLI et al., 2000; VIDAL et al., 1987; DEMIR et al., 2004; ELWAKIL, 2007).

A ruptura desse tendão, muito comum na clínica, geralmente ocorre entre 2 a 6 cm de sua inserção no osso calcâneo (MAHAN; CARTER, 1992) e é considerada grave, devido ao seu escasso suprimento sanguíneo, podendo levar semanas ou até meses para completar a cicatrização (BAXTER, 1994; AGAIBY et al., 2000). Nesse sentido, é fundamental desenvolver estudos que visem diminuir o tempo de recuperação, melhorando o reparo tendíneo, como é o caso de recursos que estimulam a angiogênese, pois quanto mais rápido for restabelecida a circulação sanguínea no tecido lesado, menor será a área afetada pela falta de oxigênio e nutrientes, permitindo uma recuperação mais rápida.

Nesse contexto, o desenvolvimento de modelos experimentais que se assemelhem aos problemas intrínsecos que ocorrem no ser humano é importante, uma vez que não há na literatura um bom suporte científico que aponte a composição e a dinâmica vascular de um tendão calcâneo animal. Tal modelo poderia contribuir para compreender se o tendão animal sofre os mesmos processos de vascularização em regiões diferentes, como ocorre no ser humano, cujo tendão do calcâneo tem a área medial hipovascularizada em relação as regiões proximal e distal, o que caracteriza um fator predisponente para ruptura (MAFFULLI et al., 2000).

O modelo também pode contribuir para o estudo do local mais adequado para aplicação da terapia a laser (light Amplification by Stimulated Emission Radiation) de baixa intensidade (LLLT), já que a maioria dos estudos irradia a região central (entre a junção musculotendínea e a inserção no osso calcâneo) referida como uma zona hipovascular em seres humanos (SALATE et al., 2005).

Atualmente, a LLLT, tem merecido destaque devido a efeitos bioquímicos e celulares importantes que contribuem para a resolução do processo cicatricial (PUGLIESE et al., 2003).

Estudos tem demonstrado efeitos importantes como o aumento na proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; HAWKINS; ABRAHAMSE, 2006), neovascularização, reparação transcutânea de tendões (BIHARI, MESTER, 1989; ENWEMEKA et al., 1990; PARIZOTTO; BARANAUSKAS, 1998; ALMEIDA-LOPES et al., 1999; PINFILDI et al., 2005; PRADO et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2009), efeitos anti-oxidantes e bactericidas (RIZZI et al., 2006; AVNI et al., 2005) e o aumento do metabolismo mitocondrial estimulando a síntese de DNA e proliferação celular (BASFOR, 1995;

PARIZOTTO; BARANAUSKAS, 1998).

Esses achados fazem do laser um agente físico importante que facilita e acelera o reparo tendíneo.

## 2. Objetivos

---

Avaliar a composição vascular do tendão calcâneo normal e submetido à lesão parcial antes e após a terapia a laser de baixa intensidade.

## 3. Desenvolvimento

---

Foram utilizados 28 ratos Wistar adultos pesando entre 280 e 320 g, oriundos do Biotério da FACIS-UNIMEP, os quais foram distribuídos aleatoriamente por sorteio computadorizado (BioStat 5.0) em 4 grupos de 7 animais: Grupo Controle (CON) - sem lesão ou tratamento e o tendão calcâneo foi retirado para as análises histológicas e morfométricas de vasos sanguíneos; Grupo Sham (Sham) - lesão parcial do tendão calcâneo e simulação da radiação laser; Grupo Laser Visível (LV - laser 830 nm) - lesão do tendão do calcâneo e irradiação laser (AsGaAl) 830nm com densidade de energia de 40 J/cm<sup>2</sup>; Grupo Laser Infravermelho (LIV - laser 660 nm) - lesão do tendão calcâneo e irradiação laser (AlGaInp) 660 nm com densidade de energia de 40 J/cm<sup>2</sup>.

Utilizou-se um aparelho de laser LLLT de diodo infravermelho e visível, com comprimento de onda de 830 nm (AsGaAl) e 660 nm (AlGaInp), com potência de 60 mW, densidade de energia de 40 J/cm<sup>2</sup>, área de seção transversal do feixe de 0,028 cm<sup>2</sup> com feixe contínuo.

Para lesão parcial do tendão utilizou-se um lesionador contendo uma barra horizontal que foi liberada sobre o tendão do calcâneo da pata direita dos animais.

Os animais foram pesados e anestesiados proporcionalmente à massa corporal, com uma injeção intramuscular de Ketamina 100 mL/Kg e Cloridrato de Xilazina 50 mL/Kg. A pata direita do animal foi posicionada no lesionador, tracionada na região do calcâneo mantendo-se o tornozelo em dorsiflexão e um peso de 200 g foi liberado perpendicularmente sobre o tendão, a partir de uma altura de 20 cm, com energia potencial de queda de 364,9 mJ.

As aplicações de laser foram realizadas durante quatro dias, tendo início após 1 minuto da lesão, com a técnica pontual com contato, sendo a potência de saída de 60 mW para ambos os lasers. A energia total foi de 1.1 J e densidade de potência de 2,14 mW/cm<sup>2</sup>.

Os animais foram eutanaziados no quinto dia após o trauma por meio de hiperdosagem anestésica e seus tendões foram retirados por dissecação desde a inserção do calcâneo até a junção musculotendínea. No grupo controle, o tendão foi obtido no mesmo período de tempo, sendo todos submetidos à análise morfométrica e histológica.

Para isso os tendões foram lavados em solução salina a 0,9%, sendo preparados para os demais procedimentos histológicos. Após passar por todos os banhos nas substâncias necessárias, os tendões foram divididos em três partes iguais (proximal, central e distal) e incluídos em parafina. De cada região do tendão foram obtidos cortes transversais semi-seriados por um micrótomo rotativo. Os cortes foram montados em lâminas histológicas, desparafinizados e novamente hidratados para coloração com hematoxilina e eosina para análise dos vasos sanguíneos.

Para análise morfométrica utilizou-se uma ocular reticulada (Carl Zeiss KF 10x/8), com objetiva de 40 vezes, sendo que cada quadrado do retículo media 25µm, portanto para cada animal contou-se uma área de 37500 µm<sup>2</sup> (foram contadas três áreas do retículo, medindo 2500 µm<sup>2</sup> em cada corte e para cada animal contou-se um total de 5 cortes). A calibração da ocular se fez por uma régua milimetrada (OBJ. MIKROM 5/17).

Verificou-se a distribuição dos dados por meio do teste de normalidade de Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias com uso do teste de Levene e realizou-se análise intra e entre grupos, seguida do teste de Tukey. As análises foram processadas com uso do SPSS 13.0 e em todos os testes o nível de significância adotado foi de 5%.

## 4. Resultado e Discussão

---

Na figura 1 observa-se a distribuição dos vasos sanguíneos nas diferentes porções do tendão calcâneo (proximal, medial e distal), além de fibrócitos e fibras colágenas.

Os resultados da análise morfométrica nos diferentes grupos experimentais estão apresentados na tabela 1.

Um dos componentes estudados e relatados na literatura é o suporte vascular do tendão do calcâneo, bem descrito em seres humanos por Zantop et al. (2003), que estudaram a composição vascular em cadáveres e mostraram que a hipovascularização da região central do tendão pode ser um fator de predisposição para lesões espontâneas ou degenerativas. Porém, não há suporte científico na literatura pesquisada que aponte a composição vascular de um tendão calcâneo animal, fato importante para o desenvolvimento de terapias que favoreçam o aumento do suprimento sanguíneo.

O presente estudo mostrou que o tendão calcâneo de ratos apresenta uma composição vascular diferente nos segmentos proximal,

medial e distal, tendo maior número de vasos na região proximal e distal e menor na região medial. Esses resultados corroboram aqueles de Chen et al. (2009), que observaram uma região de hipovascularização na região medial comparada às regiões proximal e distal em seres humanos e, que essa região medial é irrigada principalmente pela artéria fibular e as regiões proximal e distal pela artéria tibial posterior.

Esse fato é relevante, já que a literatura sobre LLLT em reparo tendíneo aponta que a aplicação da terapia é realizada na região medial do tendão, considerada uma área de hipovascularização. No estudo de Oliveira et al. (2009) a terapia a laser 830 nm (AsGaAl) foi aplicada na região medial do tendão do calcâneo após lesão parcial com apenas um ponto de tratamento, promovendo realinhamento das fibras. Arruda et al (2007) também utilizaram laser infravermelho e visível (670 e 904 nm, respectivamente) na região medial do tendão do calcâneo após tenotomia, porém, nenhum desses estudos abordou ou avaliou a vascularização como um importante fator no reparo tecidual.

No presente estudo observou-se que o valor da densidade de área dos vasos sanguíneos acompanhou também o valor do número de vasos, ou seja, nas áreas proximal e distal a densidade de área de vasos sanguíneos foi maior do que na região medial, que é exatamente a região hipovascular do tendão do calcâneo humano e, segundo Knobloch (2006), é a área em que ocorre a maior parte das tendinopatias. Esse fato não está exclusiva e comprovadamente relacionado à vascularização, mas é uma das hipóteses com forte relação, pois uma região com menor aporte sanguíneo estaria mais suscetível a lesões do que outras regiões do tendão que são mais vascularizadas e, por isso, recebem nutrição adequada para manter o tecido saudável.

As aplicações de Laser foram realizadas na porção medial com objetivo de melhorar a circulação sanguínea, ou seja, na tentativa de promover angiogênese, porém o estudo mostrou que mesmo irradiando laser nessa região, não foi possível promover aumento no número de vasos na região medial em nenhum dos grupos quando comparado com o grupo controle, sendo que também não houve diferença significativa entre os grupos LV, LIV e Sham.

A ausência de alteração do número e densidade de área de vasos sanguíneos após lesão e/ou irradiação a laser pode ser devida à intensidade do impacto causado ao tendão durante a lesão. Os resultados sugerem que a carga aplicada ao tendão pode não ter sido suficiente para gerar uma inflamação, o que explicaria a ausência de angiogênese no modelo utilizado e os valores de número e densidade de área de vasos sanguíneos semelhantes entre os grupos experimentais e o controle.

Apesar disso, o modelo é interessante porque simula as lesões tendíneas comuns em humanos, havendo necessidade pesquisas que possam determinar a carga ideal para causar lesão, bem como investigar a influência da terapia a laser de baixa intensidade.

## 5. Considerações Finais

---

Conclui-se que: a vascularização do tendão do rato é similar à do tendão humano, o que favorece a realização de estudos que possam servir de subsídio para intervenção em humanos; a inflamação após a lesão não foi evidente a ponto de modificar o número e densidade de área de vasos sanguíneos no tecido estudado; o efeito da irradiação a laser aplicada neste estudo não pôde ser observado em consequência da resposta dos animais à lesão.

## Referências Bibliográficas

---

- AGAIBY AD, et al. Laser Modulation of Angiogenic Factor Production by T-Lymphocytes. *Lasers Surg Med.* 2000; 26:357-63.
- ALMEIDA-LOPES L, et al. Comparasion of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblats proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers Surg Med.* 2001; 29:179-84.
- ARRUDA ERB., et al. Influences of different low level laser therapy wavelengths in rat tendon regeneration after tenotomy. *Rev Bras Fisioter.* 2007;11(4):247-52.
- AVNI D., et al. Protection of skeletal muscles from ischemic injury: low-level laser therapy increases antioxidant activity. 2005; *Photomed Laser Surg*:23(3):273-7.
- BASFORD JR. Low intensity laser therapy: still not an established clinical tool. *Lasers Surg Med.* 1995; 16:331-42.
- BAXTER GD. Bionergetics and tissue optics. In: *Therapeutic Lasers: theory and practice.* Edinburg: Churchill Livingstone. 1994.
- BIHARI J, MESTER AR. The biostimulative effect of low level laser therapy on longstanding crural ulcers using helium-neon laser, helium-neon laser plus infrared lasers, and noncoherent light: preliminary report of a randomized double blind comparative study. *Laser Ther.* 1989; 1:97.
- CHEN TM., et al. The Arterial Anatomy of the Achilles Tendon: Anatomical Study and Clinical Implications. *Clinical Anatomy,*

2009; 22:377-85.

CUNHA A, PARIZOTTO NA, VIDAL BC. The effect of therapeutic ultrasound on repair of the Achilles tendon (tendon calcaneus) of the rat. *Ultrasound Med Biol.* 2001; 27:1691-6.

DEMIR H., et al. Comparison of the effects of laser, ultrasound and combined laser + ultrasound treatments in experimental tendon healing. *Laser Surg Med.* 2004; 35:84-9.

ELWAKIL TF. An in-vivo experimental evaluation of He-Ne laser photostimulation in healing Achilles tendons. *Lasers Med Sci.* 2007; 22:53-9

ENWEMEKA CS., et al. Morphometrics of collagen fibril populations in He-Ne laser photostimulated tendons. *J Clin Laser Med Surg.* 1990; 47-52.

HAWKINS D, ABRAHAMSE H. Effect of multiple exposures of low-level laser therapy on the cellular responses of wounded human skin fibroblasts. *Photomed Laser Surg.* 2006; 24(6):705-14.

KNOBLOCH K. Eccentric training in Achilles tendinopathy: is it harmful to tendon microcirculation? 2006; 41(6):e2.

MAHAN KT, CARTER SR. Multiple ruptures of the tendon Achillis. *J Foot Surg.* 1992; 31:548-559.

MAFFULLI N., et al. Tenocytes from Rupture and Tendinopathic Achilles tendons produce greater quantities of type III collagen than tenocytes from normal Achilles tendons: An in vitro model of human tendon healing. 2000; 28; 499.

OLIVEIRA FS., et al. Effect of low level laser therapy (830 nm) with different therapy regimes on the process of tissue repair in partial lesion calcaneous tendon. *Lasers Surg Med.* 2009; 41:271-76.

PARIZOTTO NA, BARANAUSKAS V. Hydrogen bonding of collagen molecule stimulated by He-Ne laser in the regenerating of tendon. In: *Proceeding 2nd World Association of Laser Therapy.* Kansas City, Missouri, USA, September 2-5, p. 64-5, 1998.

PINFILDI CE., et al. Helium-neon Laser in viability of random skin flap in rats. *Lasers Surg Med.* 2005; 37:74-77.

PRADO RP., et al. Experimental model for low level laser therapy on ischemic random skin flap in rats. *Acta Cir.* 2006; 21(4):258-62.

PUGLIESE LS., et al. The influence of low-level therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. *Pesqui Ondontol Bras.* 2003; 17(4):307-13.

RIZZI CF., et al. Effects of low-level laser therapy (LLLT) on the nuclear factor (NF)κB signaling Pathway in traumatized muscle. *Lasers Surg Med.* 2006; 38:704-13.

SALATE ACB., et al. Effect of In-Ga-Al-P diode laser irradiation on angiogenesis in partial ruptures of Achilles tendon in rats. *Photomed Laser Surg.* 2005; 23(5):470-5.

VIDAL BC. Métodos de biologia celular. In: Vidal BC, Mello MLS. *Biologia Celular*, Rio de Janeiro e São Paulo: Atheneu; 1987. P 5-40.

ZANTOP T, TILLMANN B, PETERSE W. Quantitative assessment of blood vessels of the human Achilles tendon: an immunohistochemical cadaver study. *Arch Orthop Trauma Surg* 2003; 123:501-04

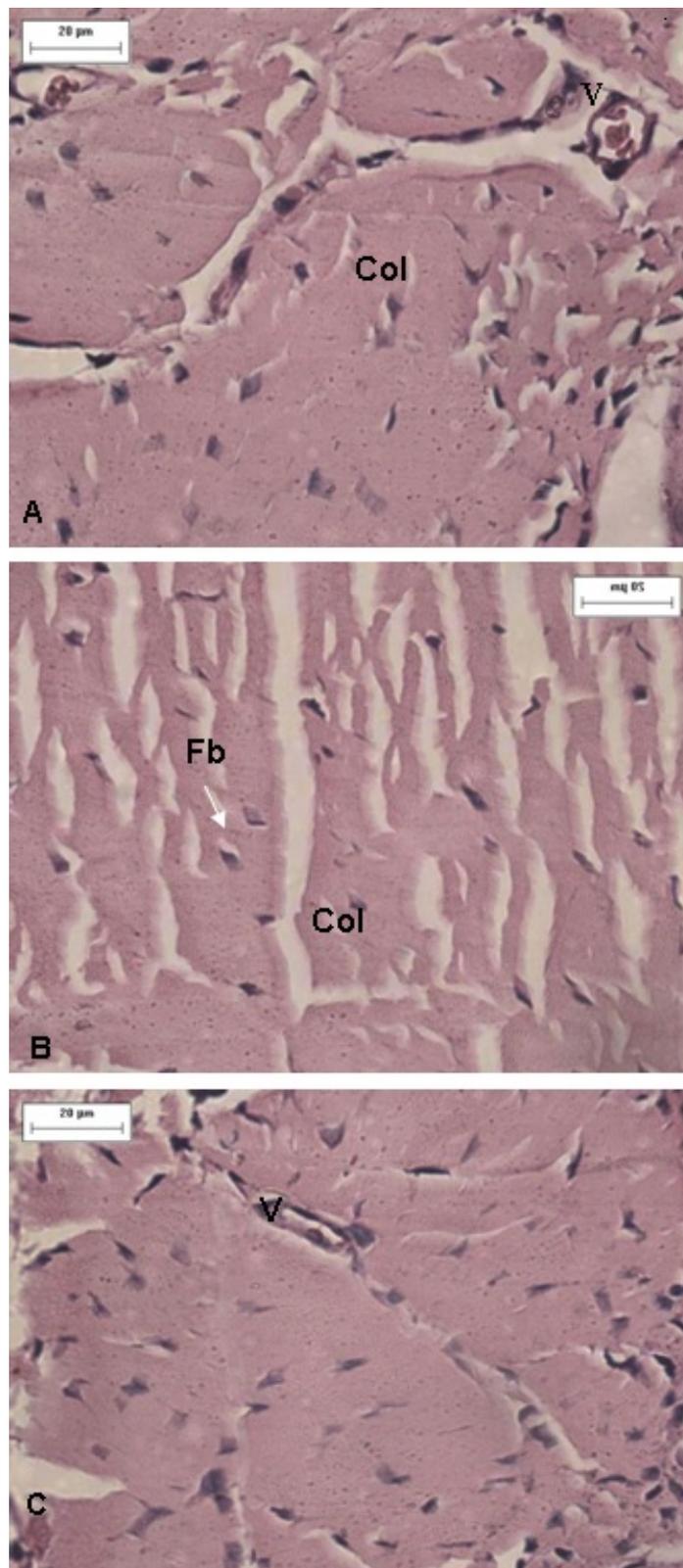
**Anexos**

---

**Tabela 1:** Valores de média e desvio padrão do número e densidade de área de vasos sanguíneos nas porções proximal, medial e distal do tendão do calcâneo de ratos nos grupos: CON (Controle); SHAM (Sham); LV (Laser Visível) e LIV (Laser Infravermelho).

	Proximal		Medial		Distal	
	<i>Nº Vasos</i>	<i>DA Vasos</i>	<i>Nº Vasos</i>	<i>DA Vasos</i>	<i>Nº Vasos</i>	<i>DA Vasos</i>
<b>CON</b>	20,00 ±4,94	27,50 ±2,71	14,00 ±7,53	20,17 ±6,81	23,17 ±8,42#	30,83 ±5,10#
<b>SHAM</b>	12,33 ±4,63*	14,67 ±2,60*	10,83 ±4,53	11,83 ±1,85	13,17 ±3,12*	14,33 ±1,28#*
<b>LV</b>	10,67 ±4,08*	11,50 ±2,14*	13,00 ±6,69	16,83 ±4,11	13,83 ±3,71*	16,33 ±1,94#*
<b>LIV</b>	10,00 ±3,74*	10,83 ±1,85*	13,17 ±3,54	16,00 ±2,29	10,67 ±2,42*	13,00 ±2,20#*

(\*) Difere do CON; (#) Difere do respectivo medial.



**Figura 1:** Fotomicrografias do tendão nas porções proximal (P), medial (M) e distal (D) em animal do grupo Controle. Fibrócito (Fb), colágeno (Col). Observar presença de vasos sanguíneos (V) nas porções P e D. Coloração: H.E. Bar = 20 µm.