

INFLUÊNCIA DE DIFERENTES COMPRIMENTOS DE ONDA DA LASERTERAPIA DE BAIXA INTENSIDADE NA REGENERAÇÃO TENDÍNEA DO RATO APÓS TENOTOMIA

ARRUDA ERB¹, RODRIGUES NC², TACIRO C³ E PARIZOTTO NA⁴

¹ Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP - Brasil

² Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, SP - Brasil

³ Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, UFSCar

⁴ Departamento de Fisioterapia, UFSCar

Correspondência para: Nivaldo Antonio Parizotto, Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos, Rod. Washington Luiz, km 235, CEP 13565-905, São Carlos, SP - Brasil

Recebido: 17/08/2006 - Revisado: 24/04/2007 - Aceito: 28/06/2007

RESUMO

Objetivo: Comparar a influência da terapia laser baixa intensidade (TLBI) na organização das fibras de colágeno, na dose de 3J/cm² em dois comprimentos de onda (λ) (670nm e 904nm) e na associação de ambos, durante o reparo do tendão calcâneo de ratos. **Método:** Foram utilizadas 37 ratas da raça Wistar divididas em 5 grupos, submetidas a tenotomia total por meio de cisalhamento transversal do tendão na porção média entre a inserção calcânea e a junção miotendínea, com exceção do grupo GP (n= 6) que não houve lesão. O grupo GA (n= 8) foi submetido à irradiação laser $\lambda= 904\text{nm}$, diodo de GaAs, emissão pulsada, duração do pulso de 180ns, frequência de pulso de 2000Hz e potência de pico de 15W e dose de 3J/cm². O grupo GB (n= 8) foi submetido à irradiação laser $\lambda= 670\text{nm}$, diodo de AlGaInP, emissão contínua, potência 30mW e dose de 3J/cm². O grupo GAB (n= 8) recebeu irradiação de ambos os lasers 670nm e 904nm associados. O grupo GCL (n= 7) foi submetido a um tratamento placebo, assim como um grupo padrão. Após um total de 12 sessões de laserterapia, os animais foram submetidos à eutanásia no 14º dia pós-operatório. Após processamento histológico padrão, foi realizada a quantificação do retardo óptico pela birrefringência. **Resultados:** A análise estatística mostra que todos os grupos irradiados apresentaram valores de retardo óptico maiores quando comparados ao grupo placebo (p= 0,00001), o que indica que apresentaram melhor organização das fibras colágenas ao longo do eixo longitudinal do tendão, evidenciando melhor qualidade no reparo. O grupo GAB foi o que apresentou melhores resultados (p= 0,00001) quando comparado aos demais grupos, excetuando-se o GP, que é o referencial de retardo óptico para esta faixa etária.

Palavras-chave: laser terapia de baixa intensidade; tendão calcâneo; reparo tecidual; tenotomia total; birrefringência.

ABSTRACT

Influence of different low-intensity laser therapy wavelengths for rat tendon regeneration following tenotomy

Objective: The aim of this study was to compare the effect of the low level laser therapy in the organization of the collagen fibers with 3 J/cm² of dose in two wavelengths (670nm and 904nm) and in the combination of both on the tissue repair of the calcaneus tendon. **Methods:** We used 37 female Wistar rats divided in 5 groups which had been submitted to the total tenotomy. Group GA (n= 8) was submitted to the laser irradiation in $\lambda= 904\text{nm}$, GaAS diode, pulsated emission, peak power 15W and dose of 3J/cm², group GB (n= 8) was submitted to laser irradiation $\lambda= 670\text{nm}$ AlGaInP diode, continuous emission, power 30 mW and dose 3J/cm², group GAB (n= 8) was submitted to association of both of lasers and group GCL (n= 7) which the calcaneum tendon was submitted to placebo treatment. The group GP (n= 6) was a standard group without lesion and treatment. The animals received 12 sessions of lasertherapy and submitted to euthanasia on 14th day after surgery. The tendons were submitted to histological procedure and were analyzed to evaluate the optic retardation (in nm) for the birefringence measurement. **Results:** The statistic analysis showed that the irradiated groups have higher values of optic retardation statistically significant than placebo group (p= 0,00001). It indicates that all the treated groups show better organization of collagen fibers in the longitudinal axis of the tendon, evidencing better quality in the tissue repair. The group GAB was that shown best results (p= 0,00001) when compared to another groups.

Key words: low-intensity laser therapy; Achilles tendon; tissue repair; total tenotomy; birefringence.

INTRODUÇÃO

O tecido tendíneo é um tipo de tecido conjuntivo denso e tem como função transmitir a força produzida pelo músculo para o osso, tornando possível o movimento articular¹.

Enwemeka et al.² relatam que o tendão é constituído por fibroblastos e matriz extracelular, na qual estão imersas proteínas fibrosas de colágeno e elastina, proteoglicanas, glicoproteínas e mucopolissacarídeos. O colágeno é o maior componente da matriz extracelular, compreendendo cerca de 86% a 95% do peso úmido do tendão. As fibrilas de colágeno são longas e cristalinas. Em tendões, as fibrilas e fibras são altamente alinhadas, o que confere alta resistência mecânica para forças de tração. A análise de birrefringência quantifica esse alinhamento das fibras de colágeno devido às suas propriedades anisotrópicas, por meio da qual se mede o retardo óptico em nanômetro. Portanto, quanto maior é essa medida, maior o grau de organização e compactação das fibras¹.

O processo de cicatrização das lesões tendíneas pode levar semanas ou até meses para se completar. Durante esse período, geralmente o paciente é imobilizado para evitar rupturas, o que causa inúmeras complicações funcionais retardando o processo de reabilitação³. A fase inicial do processo de reparo leva de 7 a 10 dias para consolidação, porém a reabilitação completa pode exigir semanas ou meses⁴.

Devido a ocorrência dessas lesões ser tão comum, torna-se necessária a elaboração de estudos com o objetivo de melhorar o reparo tendíneo, reduzindo o tempo de recuperação e o retorno às atividades rotineiras. A importância desses estudos serem realizados em ratos deve-se à dificuldade de se promoverem alguns procedimentos invasivos em humanos.

Nas últimas décadas, observou-se um aumento no interesse clínico por evidências biológicas da otimização do processo de reparo tendíneo, o que tem influenciado estratégias adotadas no tratamento das lesões tendíneas⁵⁻¹¹. Dessa forma, diversos pesquisadores têm estudado várias modalidades terapêuticas com o objetivo de acelerar o processo regenerativo e assim demonstraram que a fotobiomodulação, através da radiação laser de baixa intensidade com os diferentes comprimentos de onda, interage de diferentes formas no reparo tendíneo^{3,7-11}.

Desde então, muitos estudos foram realizados com fotobiomodulação em tendões de ratos machos, em virtude do ciclo estral das fêmeas e suas possíveis implicações no reparo tecidual. Porém, a incidência deste tipo de lesão é crescente entre as mulheres. Isso pode estar relacionado com a busca por práticas desportivas que sobrecarregam o tendão dessas mulheres¹². Fatores estruturais e funcionais como fraqueza muscular, discrepância de membros, entre outros, influenciam no aumento da incidência dessas lesões no sexo feminino.

Apesar da possível interferência do ciclo menstrual no processo de reparo tendíneo, quando esse tipo de lesão ocorre, não escolhe em que fase do ciclo menstrual a paciente se encontra e, devido a esse fator, não foi predeterminada a fase estral das ratas para simular as diferentes condições prévias em pacientes.

Observou-se ainda que o comprimento de onda é a característica mais importante da radiação laser, pois determina quais biomoléculas vão interagir^{13,14}. A radiação visível tem uma via mitocondrial e a invisível (infravermelho) tem uma ação sobre cromóforos da membrana celular. Portanto, os efeitos terapêuticos são específicos, o que leva a crer que exista possibilidade de se utilizar ambas as vias de estimulação com objetivo de incrementar resultados. No entanto, por ser uma tecnologia relativamente nova, ainda se encontram em fase de determinação os seus reais efeitos, aplicações efetivas e limitações^{15,16}.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizadas 37 ratas da raça Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), com 5 semanas de idade e massa corporal de $181 \pm 12,3$ g provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), as quais permaneceram no biotério do Laboratório de Eletrotermofototerapia, em gaiolas de polipropileno padrão, agrupadas em número de 4, mantidas em ambiente controlado, com ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo água e ração balanceada *ad libitum*. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade de São Carlos – CCEA/UFSCar pelo parecer CEEA 009/2006. Durante o presente experimento não foi registrada nenhuma perda amostral.

Procedimento cirúrgico

O modelo utilizado neste estudo foi baseado no experimento de Enwemeka et al.³ Os animais foram inicialmente pesados e posteriormente anestesiados com Cloridrato de Ketamina a 10% (95mg/kg) e Cloridrato de Xilazina a 2% (12mg/kg) com aplicação intraperitoneal.

A pele sobre a região posterior da tíbia do membro posterior direito, no local correspondente ao tendão calcâneo, foi tricotomizada manualmente. Após assepsia local (com álcool iodado), foi realizada uma incisão longitudinal na pele sobre o local correspondente a tenotomia, no terço médio do tendão calcâneo, entre a inserção calcanear e a junção miotendínea, onde foi realizada a tenotomia total por cisalhamento transversal, utilizando lâmina de bisturi número 11 (Figura 1A).

A seguir, a pele foi suturada com fio 4.0 poliamida monofilamento não absorvível e submetida à limpeza local

(com álcool iodado), não havendo posteriormente nenhum tipo de imobilização do segmento (Figura 1B).

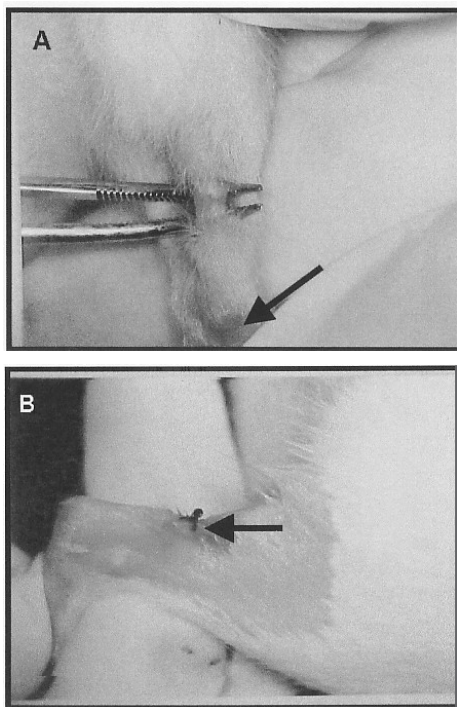


Figura 1. A. Tendão calcâneo exposto após incisão na pele, pronto para sofrer tenotomia por cisalhamento transversal, a seta evidencia o calcâneo. B. sutura realizada na pele (seta) após tenotomia total de tendão calcâneo e posterior limpeza com álcool iodado.

Grupos experimentais

Os animais foram divididos aleatoriamente em 5 grupos: grupo GA (n=8): o tendão calcâneo foi lesado e submetido à irradiação laser infravermelho com comprimento de onda 904 nm, pulsado, potência de pico de 15W e dose de 3J/cm² e tempo de aplicação de 9 segundos; grupo GB (n= 8): o tendão calcâneo foi lesado e submetido à irradiação laser vermelho com comprimento de onda 670nm, contínuo, potência 30mW e dose 3J/cm², e tempo de aplicação de 6 segundos; grupo GAB (n= 8): o tendão calcâneo foi lesado e submetido à irradiação com a associação dos dois tipos de laser nas mesmas condições descritas anteriormente, resultando em um tempo de aplicação total de 15 segundos; grupo GP (n= 7): não houve lesão, e os animais não foram submetidos a nenhum tipo de irradiação laser; grupo GCL (n= 6): o tendão calcâneo lesado cirurgicamente foi submetido a um tratamento placebo (emissor laser desligado, os animais foram submetidos ao mesmo estresse da simulação do tratamento).

Equipamento utilizado

O equipamento utilizado foi aferido no Grupo de Óptica da Universidade de São Paulo - USP, Campus de São Carlos, para se obter alta confiabilidade na intensidade efetiva da

emissão laser. É um laser classe 3B da IBRAMED, tendo sido escolhida a dose de 3J/cm² nos comprimentos de onda de 904nm e 670nm.

O equipamento possui um diodo GaAs que trabalha somente em regime pulsado com comprimento de onda 904nm e potência de pico de 15W (a potência do diodo é fixa), pulsado na frequência de 2000Hz, dose de 3J/cm², diâmetro do feixe 0,07cm², duração de pulso de 180ns, resultando em um tempo de aplicação de 9 segundos. Também possui um diodo de AlGaInP com comprimento de onda 670nm e potência de 30mW (a potência do diodo é fixa), contínuo, dose de 3J/cm², área do feixe 0,02cm² resultando em um tempo de aplicação de 6 segundos. A combinação dos dois comprimentos de onda aplicados um seguido do outro resultou na somatória dos tempos, ou seja, 15 segundos. O modo de emissão diferenciado entre os dois comprimentos de onda se deve ao fato de o diodo de GaAs somente emitir radiação pulsada, e, pelo fato de a potência dos diodos deste equipamento ser fixa, não houve padronização da mesma para reproduzir com maior eficiência o seu uso na prática clínica.

A terapia laser teve início 24 horas após a tenotomia. O tratamento constou de 12 sessões consecutivas e ininterruptas. Todo o procedimento experimental foi realizado num mesmo período circadiano.

Para a realização das aplicações laser, os animais foram imobilizados por meio de apreensão manual e foram irradiados por fotoestimulação transcutânea na região da lesão com a técnica de contato, num ângulo de 90° em relação à superfície da área lesada.

No 14º dia após a tenotomia (24 horas após a última sessão), os animais sofreram eutanásia e seus tendões foram retirados cirurgicamente por dissecação desde a inserção calcanear até a junção miotendínea. Imediatamente os tendões foram lavados em solução salina a 0,9% para preparação das lâminas para análise da birrefringência.

Preparação das lâminas

Para uma avaliação qualitativa e quantitativa da concentração, estado de agregação e orientação das fibras de colágeno, os tendões foram dissecados, lavados e submetidos à confecção das lâminas.

Cada lâmina foi montada com uma série de 3 cortes consecutivos de cada tendão e cada grupo de animais, sendo representado por 111 lâminas montadas com os tendões de cada um dos grupos experimentais.

Estas lâminas não receberam nenhum tipo de coloração e ficaram descobertas para sofrerem uma reidratação no momento da análise.

Medidas de birrefringência

A análise das fibras de colágeno foi realizada utilizando, para isso, uma de suas propriedades anisotrópicas ópticas: a birrefringência total, medida por meio da microscopia de polarização.

As lâminas de cada grupo foram imersas em água destilada cujo índice de refração é de ($n= 1,333$) por cerca de 30 minutos, para análise através da birrefringência, conforme os estudos de Vidal¹.

Após o período de imersão, as lâminas foram cobertas por lamínulas contendo água destilada nas interfaces. Para a realização da análise, foi utilizado um microscópio de luz polarizada da marca LEICA com uma objetiva pol.10X/0,22, condensador 0.9, compensador de Sénarmont $\lambda/4$, luz monocromática $\lambda= 546\text{nm}$, obtida por meio de um filtro de interferência LEICA, do LAMAV (Departamento de Engenharia de Materiais da UFSCar). Esse tipo de análise tem sido utilizado para mensurar o grau de organização das fibras colágenas de forma quantitativa em diversos estudos^{1,17,18}.

Foram obtidas medidas com o eixo do tendão a 45° de inclinação em relação ao polarizador e o analisador, permitindo o maior brilho de birrefringência e, portanto, uma análise de alinhamento das fibras colágenas ao longo do eixo do tendão.

RESULTADOS

Na figura 2 pode-se verificar uma representação das imagens observadas normalmente à microscopia de polarização. Pode-se notar que há evidências qualitativas na aparência da organização das fibras de colágeno no tendão, demonstrando que os grupos tratados com laser estão em melhores condições de organização estrutural. A junção dos dois tipos de laser no mesmo tendão mostrou ser mais efetiva na organização das fibras colágenas.

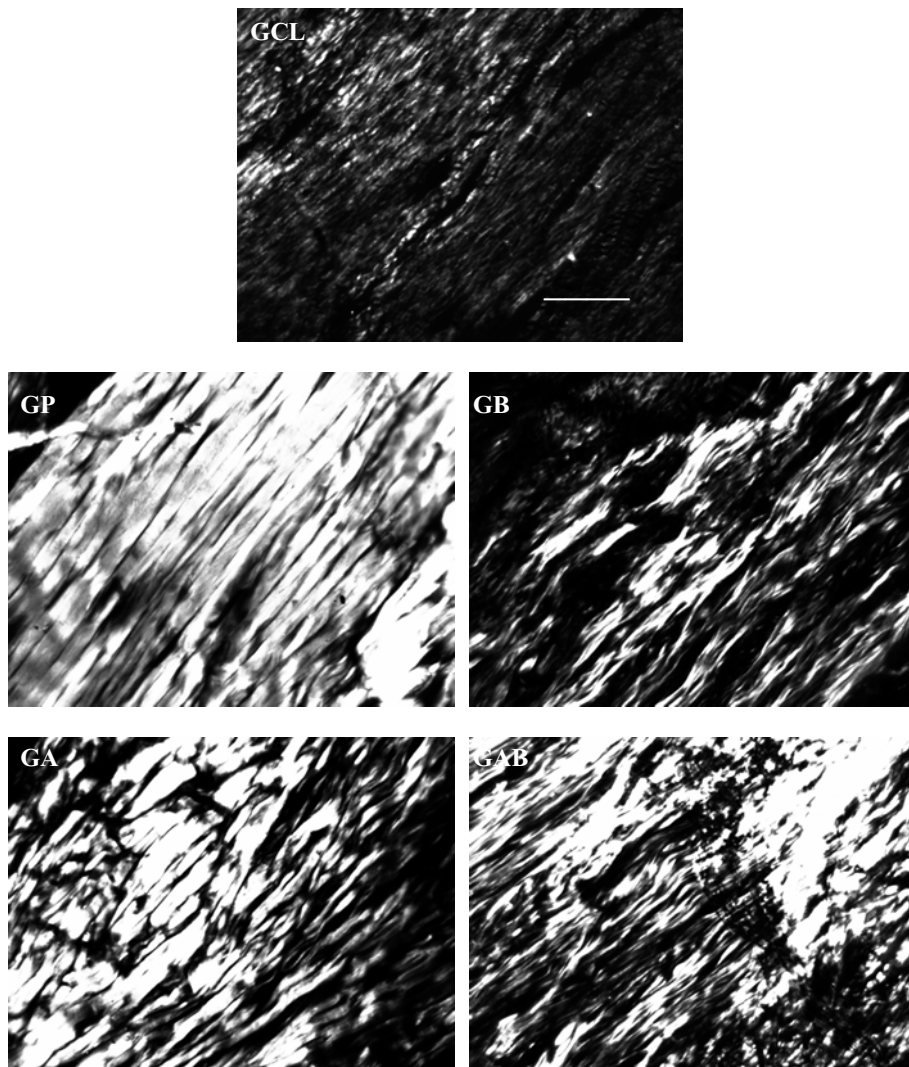


Figura 2. A imagem mostra o brilho de birrefringência das fibras colágenas dos grupos de ratos analisados em microscopia de polarização. O grupo GCL apresenta uma disposição das fibras colágenas pouco alinhadas com o eixo longitudinal do tendão (45°). O grupo GP apresenta alto grau de alinhamento das fibras e ordenamento azimutal enquanto que o grupo GB mostra algumas fibras ao longo do eixo longitudinal, sendo mais organizado que o GCL. O grupo GA apresenta uma melhor qualidade de alinhamento quando comparado com GCL e GB. E finalmente o grupo GAB mostrou a melhor organização das fibras em comparação com os demais grupos lesados, exceto pelo GP, que não sofreu lesão. O aumento para estas fotomicrografias foi de 20Xpol. A barra corresponde a $200\mu\text{m}$.

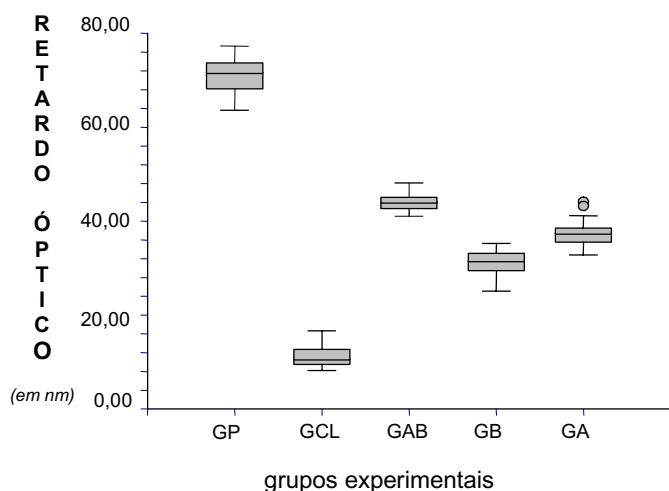


Figura 3. Valores médios de retardo óptico (RO em nanômetros) com os respectivos desvios-padrões referentes ao grupo GP, GCL, GAB, GB e GA. O retardo óptico está fortemente ligado ao estado de agregação das moléculas de colágeno no tendão do rato.

Para a análise quantitativa do retardo óptico, os resultados foram analisados utilizando ANOVA unicaudal com *post hoc* de Dunnett. O grupo GAB demonstrou melhor organização das fibras de colágeno quando comparado com os outros grupos, exceto o GP. O grupo GB obteve maior índice de significância em comparação com GA e GCL e finalmente o GA obteve o melhor resultado se comparado com o GCL (Figura 3). A diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,01$) na comparação entre todos os grupos.

DISCUSSÃO

O benefício da TLBI sobre a organização das fibras colágenas ocorre com certos comprimentos de onda durante o processo de reparo segundo vários experimentos realizados^{9,10,11}.

Essas propriedades parecem provir do fato de que a TLBI causa um sinal na matriz extracelular, promovendo mudanças nas estruturas fibrilares. Isso ocorre após a energia eletromagnética interagir com as moléculas de colágeno. A organização azimutal do colágeno no eixo longitudinal do tendão apresenta uma boa evidência das mudanças estruturais que ocorrem com as fibras após serem irradiadas com laser^{10,19,20}.

Os resultados deste trabalho sugerem uma influência benéfica da TLBI na organização das fibras de colágeno quando se observam as imagens dos tendões e os dados encontrados nas medidas de birrefringência após tratamento de tenotomia calcâneo total^{1,16,17}. Tais dados corroboram os resultados de outros autores que utilizaram TLBI durante 12 dias do processo de reparo tecidual e verificaram resposta das células fibroblásticas e das moléculas de colágeno ao tratamento^{7,8,19-28}.

As vias de ativação propostas para o laser levam em conta a sua ação sobre os cromóforos situados nas mitocôndrias e a membrana celular. Gigo-Benato et al.²⁹ descreveram um efeito possivelmente sinérgico ao utilizarem dois comprimentos de onda distintos em uma lesão nervosa periférica, o que evidencia que essa sinergia possa ocorrer da mesma forma com o tecido tendíneo. Os cromóforos parecem ser diferentes para os distintos comprimentos de onda.

Lievens²⁹ verificou um aumento na proliferação fibroblástica em ferida utilizando a combinação de laser He-Ne (632,8nm) e As-Ga (904nm), 68,8mW, sugerindo que a combinação de lasers em diferentes λ pode trazer melhores resultados no reparo do tecido conjuntivo.

Os resultados aqui apresentados dão indícios de uma sinergia de ação dos lasers vermelho e infra-vermelho próximos no reparo do tecido conjuntivo no tendão de ratos. Devido às divergências encontradas na literatura e escassez de pesquisa, ainda há necessidade de estudos mais detalhados para elucidar os mecanismos de ação da TLBI e da combinação de diferentes λ para proporcionar a padronização de parâmetros para o seu uso em prática clínica.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos nas medidas de birrefringência deste experimento, é possível concluir que a TLBI foi eficiente em promover melhor grau de organização das fibras colágenas ao longo do eixo longitudinal, sugerindo assim melhor reparo tendíneo, após tenotomia total de tendão calcâneo, na dose de 3J/cm², nos λ 904nm, 670nm e com a associação de ambos. Os melhores resultados foram obtidos com a associação dos comprimentos de onda 670nm e 904nm.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Vidal BC. Image analysis of tendon helical superstructure using interference and polarized light microscopy. *Micron*. 2003; 34:423-32.
- Enwemeka CS. Inflammation, cellularity, and fibrillogenesis in regenerating tendon: implications for tendon rehabilitation. *Phys Ther*. 1989;69(10):816-26.
- Enwemeka CS, Reddy K. The biological effects of laser therapy and other modalities on connective tissue repair process. *Laser Therapy*. 2000;12:22-30.
- Soma CA, Mandelbaum BR. Repair of acute Achilles tendon ruptures. *Orthop Clin North Am*. 1995;26:239-47.
- Palms D, Spiegel HU, Schneider TO, Langer M, Stratmann U, Budny T, et al. Achilles tendon healing: long-term biomechanical effects postoperative immobilization and mobilization in a new mouse model. *J Orthop Res*. 2002;20(5):939-46.
- Koeke PU, Salate ACB, Parizotto NA, Barbosa G, Gaspar P, Benze BG, 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.

7. Vinck EM, Cagnie B, Cornelissen MJ, Declercq HA, Cambier DC. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. *Lasers Med Sci.* 2003;18(2):95-9.
8. Azevedo LH, Eduardo FP, Moreira MS, Eduardo CP, Marques MM. Influence of different power densities of LILT on cultured human fibroblast growth: A pilot study. *Lasers Med Sci.* 2006;21(2):86-9.
9. Reddy GK, Stehno-Bittel L, Enwemeka CS. Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit Achilles tendons. *Lasers Surg Med.* 1998;22:281-7.
10. Enwemeka CS, Cohen-Korneberg GE, Duswalt EP, Weber DM, Rodriguez IM. Biomechanical effects of three different periods of GaAs laser photostimulation on tenotomized tendons. *Laser Therapy.* 1994;6:181-8.
11. Enwemeka CS, Rodrigues OO, Gall NG, Walsh NE. Morphometrics of collagen fibril populations in He-Ne laser photostimulated tendons. *J Clin Laser Med Surg.* 1990;8:47-62.
12. Kannus P, Niitymaki S, Jarvinen M. Recent trends in women's sports injuries. A three-year prospective, controlled study. *Journal Sports Trauma.* 1990;12:161-7.
13. Vladimirov YA, Osipov AN, Klebanov GI. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. *Biochemistry.* 2004;69(1):81-90.
14. Amat A, Rigau J, Waynant RW, Ilev IK, Anders JJ. The electric field induced by light can explain cellular responses to electromagnetic energy: A hypothesis of mechanism. *J Photochem Photobiol B.* 2006;82:152-60.
15. Ortiz MCS, Carrinho PM, Santos AAS, Gonçalves RC, Parizotto NA. Laser de baixa intensidade: princípios e generalidades – parte 1. *Fisioter Bras.* 2001;2(4):221-40.
16. Carrinho PM, Koeke PU, Rennó AC, Vidal BC, Parizotto NA. Comparative study using 685 nm and 830 nm lasers in the tissue repair of tenotomized tendons in mice. *Photomed Laser Surg.* 2006;24(6):754-8.
17. Koeke PU, Parizotto NA, Carrinho PM, Salate AC. Comparative study of the efficacy of the topical application of hydrocortisone, therapeutic ultrasound and phonophoresis on the tissue repair process in rat tendons. *Ultrasound Med Biol.* 2005;31(3):345-50.
18. Parizotto NA, Baranauskas V. Hydrogen bonding of collagen molecule stimulated by He-Ne laser in regenerating of tendon. Proceeding 2° Congress World Association for Laser Therapy; 1998 Sept 2-5; Kansas City; 1998. p. 64-5.
19. Parizotto NA, Baranauskas V. Structural analysis of collagen fibrils after He-Ne laser photostimulated regenerating rat tendon. Proceeding 2° Congress World Association for Laser Therapy; 1998 Sept 2-5; Kansas City; 1998. p. 66-7.
20. Tavares MR, Mazer N, Pastorello M. Efeito do laser terapêutico na cicatrização tendinosa: estudo experimental em ratos. *Fisioter Bras.* 2005;6(2):96-100.
21. Salate AC, Barbosa G, Gaspar P, Koeke PU, Parizotto NA, Benze BG, 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.
22. Mester E, Mester AF, Mester A. The biomedical effects of laser application. *Lasers Surg Med.* 1985;5:31-9.
23. Simunovic Z, Ivankovich AD, Depolo A. Wound healing of animal and human body sport and traffic accident injuries using low-level laser therapy treatment: a randomized clinical study of seventy-four patients with control group. *J Clin Laser Med Surg.* 2000;18(2):67-73.
24. Enwemeka CS. Membrane bound intracellular collagen fibrils in fibroblasts and miofibroblasts of regenerating rabbit calcaneus tendons. *Tissue Cell.* 1991;23(2):173-90.
25. Gum SL, Reddy GK, Stehno-Bittel L, Enwemeka CS. Combined ultrasound, electrical stimulation, and laser promote collagen synthesis with moderate changes in tendon biomechanics. *Am J Phys Med Rehabil.* 1997;76(4):288-96.
26. Ortiz MCS, Carrinho PM, Santos AAS, Gonçalves RC, Parizotto NA. Laser de baixa intensidade: efeitos sobre os tecidos biológicos – parte 2. *Fisioter Bras.* 2001;2(6):337-52.
27. Longo L, Evangelista S, Tinacci, Sesti AG. Effects of diode laser silver arsenide-aluminium (Ga-Al-As) 904nm on healing of experimental wounds. *Lasers Surg Med.* 1987;7:444-7.
28. Gigo-Benato, Geuna S, de Castro Rodrigues A, Tos P, Fornaro M, Boux E, et al. Low power laser biostimulation enhances nerve repairs after end-to-side neurorrhaphy: a double-blind randomized study in the rat median nerve model. *Lasers Med Sci.* 2004;19(1):57-65.
29. Lievens P. Wound healing process: Influence of LLLT on the proliferation of fibroblasts and on the lymphatic regeneration. The 7th International Congress of European Medical Laser Association; 2000 Oct 18-22; Italy. Dubrovnik; 2000.