

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO - UNINOVE

Programa de Pós Graduação Doutorado em Ciências da Reabilitação

Heliodora Leão Casalechi

**“Modulação de fatores anti-inflamatórios em modelo de lesão
traumática em tendão de Aquiles de rato”**

São Paulo, SP

2015

Heliodora Leão Casalechi

**“Modulação de fatores anti-inflamatórios em modelo de lesão
traumática em tendão de Aquiles de rato”**

Tese apresentada à Universidade Nove de
Julho, para obtenção do título de Doutora
em Ciências da Reabilitação.

Orientador: Prof. Dra. Regiane Albertini
de Carvalho

São Paulo, SP

2015

Casalechi Heliadora Leão.

“Modulação de fatores anti-inflamatórios em modelo de lesão traumática em tendão de Aquiles de rato”./ Heliadora Leão Casalechi. 2015.

75 f.

Tese (doutorado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2015.

Orientador (a): Profa. Dra. Regiane Albertini de Carvalho.

1. Propriedades mecânicas. 2. Mediadores inflamatórios. 3. Tendinite.
4. Laser de baixa intensidade (LBI). 5. LED (Light Emitting Diode).

I. Carvalho, Regiane Albertini de.

II. Título

CDU 615.831

São Paulo, 24 de junho de 2015.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno(a): HELIODORA LEÃO CASALECHI

Título da Tese: "Modulação de fatores anti inflamatórios em modelo de lesão traumática em tendão de Aquiles de rato".

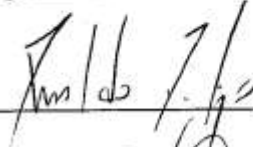
Presidente: PROFA. DRA. REGIANE ALBERTINI DE CARVALHO



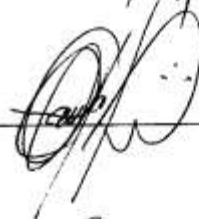
Membro: PROF. DR. LANDULFO SILVEIRA JUNIOR



Membro: PROF. DR. RINALDO ROBERTO. DE JESUS GUIRRO



Membro: PROF. DR. PAULO DE TARSO CAMILLO DE CARVALHO



Membro: PROF. DR. RODRIGO LABAT MARCOS



Dedico este trabalho:

A meus pais, Victor Hugo e Fiorita

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, por me guiar e dar forças em todos os momentos de minha vida.

Aos meus pais pelo investimento em meus estudos; e acima de tudo pelo amor, confiança, apoio e dedicação.

Ao meu marido Júlio que me apoiou e principalmente me incentivou desde o início do desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu irmão Vitor que além de ser meu grande amigo, sempre está ao meu lado, pronto para ajudar.

A família Fonseca Leão, pelo estímulo, ajuda e por estarem presentes em todos os momentos.

A Prof. Dra. Regiane Albertini de Carvalho pela oportunidade, confiança, paciência, pelos ensinamentos passados ao longo deste trabalho e principalmente por ter se tornado um exemplo a ser seguido.

Aos Professores Dr. Paulo de Tarso Camillo de Carvalho, Dr. Rodrigo Labat Marcos e Rodolfo de Paula Vieira pela orientação, colaboração e confiança.

As minhas alunas de iniciação científica, agora se tornando mestres Anna Cristina de Farias e Evela Silva, que muito me ajudaram desde o primeiro dia.

A minha amiga e companheira de jornada Carol Araruna, pelos préstimos e principalmente pela convivência.

A todos os membros do Laboratório, pela amizade e contribuição direta ou indiretamente neste trabalho.

Agradeço a direção, aos mestres e funcionários da Universidade Nove de Julho pela dedicação e amizade.

A FAPESP e a Capes/PDSE pelo apoio financeiro.

E a todos aqueles que de alguma forma colaboraram para a elaboração deste trabalho e não foram citados nominalmente.

RESUMO

A tendinite é uma desordem comum do sistema musculoesquelético. Embora os tendões tenham habilidade de reparação espontânea após ferimento, o tecido da cicatrização que é formado pode impedir o tendão de executar as funções normais. Estudos vêm sendo realizados utilizando a fototerapia em diferentes áreas da saúde, empregando tanto lasers quanto LEDs de baixa intensidade. Contudo, existe um número reduzido de estudos com a utilização da terapia com LEDs. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos anti-inflamatórios e as propriedades mecânicas do tecido após a ação da fototerapia utilizando LASER (830nm) e LEDs (945nm), na região do infravermelho, na tendinite induzida por trauma mecânico em tendão de Aquiles de ratos. Foram utilizados 112 ratos machos albinos da linhagem Wistar (240 ± 20 g), distribuídos em 14 grupos e dois períodos experimentais diferentes. Grupos CONT (grupo controle), os grupos TEND (grupos tendinite) nos períodos de 7 e 14 dias, o LEDT (grupos terapia LED), do 1º ao 7º dia e do 1º ao 14º dia) e o grupo LEDT delay (terapia LED do 7º ao 14º dia). A terapia teve início 12 horas após a indução da tendinite, utilizando uma dose de 6J no ponto de aplicação, com intervalos de 48 em 48 horas. A fototerapia foi aplicada transcutaneamente em um único ponto sobre a região lesionada. Os animais dos grupos controle foram submetidos à simulação da aplicação com o aparelho desligado, o mesmo desenho experimental foi utilizado feito para o tratamento Laser. As eutanásias ocorreram ao 7º e 14º dia do experimento. Foi realizada análise biomecânica, histopatológica para avaliação de neutrófilos e colágeno, também foram quantificados os mediadores inflamatórios por meio da RT-PCR e os níveis de IL-6 e TNF- α foram avaliados pelo teste imunoenzimático (ELISA). Por meio dos resultados encontrados, é possível inferir que os tratamentos com Laser de baixa intensidade, nos parâmetros utilizados e nos tempos estudados melhora a qualidade do reparo do tecido tendíneo, a biomecânica e reduz a migração de células inflamatórias, já o LED de baixa intensidade apesar de diminuir a inflamação não foi eficiente na manutenção da biomecânica do tendão.

Palavras-chave: Propriedades Mecânicas, Mediadores Inflamatórios, Tendinite, Laser de Baixa Intensidade (LBI), LED (*Light Emitting Diode*).

ABSTRACT

Tendinitis is a common disorder of the musculoskeletal system with multiple pathological manifestations. Although most tendons have the ability to spontaneously repair after injury, scar tissue is formed that can prevent the tendon to perform normal functions. Studies have been conducted using phototherapy in different health areas, using low-intensity lasers and LEDs. However, there are few studies with LEDs therapy. The aim of this study was to investigate the effect of phototherapy with Laser (830nm) and LED (945nm) in the repair process of the calcaneus tendonitis in rats. The inflammation was induced by controlled contusion in the medial region of the Achilles tendon of the animals. Was used 112 young male Wistar rats (240 ± 20 g), divided into 14 groups with two different experimental periods. Groups CONT (control group), TEND (tendinitis group) during periods 7 and 14 days, LEDT (LED therapy, from 1th to 7th day and from 1th to 14th day), and LEDT delay (LED therapy from 7th to 14th day). The therapy was initiated 12h after the tendinitis induction, with a 48h interval between irradiations (dose 6J/point). The control animals received simulation of treatment; the same experimental design was used for Laser treatment. All groups were euthanized on the 7th or 14th day after the induction. The tendons were dissected, extracted, and sent for analysis. Were performed biomechanical and histological analysis to evaluate neutrophils and collagen, were also quantitated the inflammatory mediators by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) and the IL-6 and TNF- α levels by ELISA. The results showed that treatments with low-intensity lasers in the parameters used and the times studied reduces migration of inflammatory cells and improves the quality of repair, but the LED even decreasing the inflammation was not effective of biomechanical properties of tendon tissue.

Key words: Mechanical Properties, Inflammatory Mediators, Tendinitis, Low Level Laser, LED (*Light Emitting Diode*).

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1. Utilização da fototerapia Laser/LED em diferentes estudos.....	10
Tabela 2. Parâmetros de irradiação do Laser.....	54
Tabela 3. Parâmetros de irradiação do LED.....	54
Tabela 4. Dados de expressão gênica para tempo de 7 dias.....	58
Tabela 5. Dados de expressão gênica para tempo de 14 dias.....	58

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática dos grupos experimentais utilizados.....52
- Figura 2.** Gráfico de comparação dos níveis de IL-6 no período de 7 dias entre os grupos controle e tratados.....59
- Figura 3.** Gráfico de comparação dos níveis de IL-6 no período de 14 dias entre os grupos controle, tratados e tratados delay.....59
- Figura 4.** Gráfico de comparação dos níveis de TNF- α no período de 7 dias entre os grupos controle e tratados.....60
- Figura 5.** Gráfico de comparação dos níveis de TNF- α no período de 14 dias entre os grupos controle, tratados e tratados delay.....60

SUMÁRIO

1. CONTEXTUALIZAÇÃO.....	02
1.1 Tendinite.....	02
1.2Reparação Tendínea.....	03
1.3 Mediadores Inflamatórios.....	04
1.4 Fototerapia.....	06
2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA.....	11
3. OBJETIVO.....	13
3.1 Objetivos Específicos.....	13
4. RESULTADOS.....	14
4.1 Artigo – 1.....	14
4.2 Artigo – 2.....	22
4.3 Dados não publicados.....	51
4.3.1 Método.....	51
4.3.2 Resultados.....	58
5. DISCUSSÃO.....	61
6. CONCLUSÃO.....	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

1.1 Tendinite

Tendinopatias são desordens do sistema músculo esquelético que alteram as características do tendão, apresentam várias manifestações patológicas de grande variedade etiológica, considerada um problema ocupacional e de saúde pública (EVANS, 2012; BARBE, 2003).

Com sua patogenia pouco compreendida, os esforços físicos excessivos e repetitivos podem causar micro-traumas nos tecidos levando assim a uma ruptura espontânea dos tendões, como ocorre na prática desportiva, estas lesões também são chamadas de lesões de sobrecarga, resultantes da incapacidade do tendão em suportar qualquer carga adicional de tensão (SALATE, 2002). A lesão pode ser causada por movimentos repetitivos até exceder a capacidade de reparação do tendão e este poderá se romper, ocasionando uma inflamação, a tendinite (ALMEKINDERS; TEMPLE, 1998).

As causas da tendinite envolvem uma variedade de fatores intrínsecos e extrínsecos, entre eles a vascularidade, disfunção dos músculos envolvidos, idade, peso e altura, hipóxia tecidual e mudanças no tendão induzida pelos radicais livres, devido a danos de isquemia e reperfusão (MAFFULLI; KADER, 2002; MAGRA; MAFFULLI, 2008; SCHEPSIS; JONES; HAAS, 2002).

Na ocorrência de uma lesão, a causa mais frequente é o estresse tendíneo, pois ocorre extensão exacerbada dos tendões acima da capacidade tecidual, com desorganização das fibras tendíneas, levando ao surgimento de um processo hemorrágico e inflamatório que possui efeitos deletérios para o tendão (MACHADO et al. 2000; STERGIOULAS et al. 2008).

Em quadros de tendinite, o principal procedimento é prevenir os danos ocasionados pela reação inflamatória, tentando reverter o processo de inflamação aguda ou subaguda, visando minimizar os efeitos no tendão lesado e iniciar um processo de reparação que permita um restabelecimento funcional dos tendões (MACHADO et al. 2000).

Existem diferentes tipos de tratamentos para tendinite, como medicamentos localmente aplicados ou ministrados por via oral, injeções de antiinflamatórios não esteroidais e esteroidais (ALFREDSON, 2005; MAGRA, MAFFULLI, 2006; HENNESSY et al. 2007; GLASER et al. 2008;), técnicas comuns de mobilização e exercícios terapêuticos (BROSSEAU, 2002; ANDRES, MURRELL, 2008; REES et al. 2008), recursos eletroterapêuticos como o ultra-som e o laser (KOEKE et al. 2005; BJORDAL; LOPES-MARTINS; IVERSEN, 2006; FARCIC et al. 2013).

1.2 Reparação Tendínea

A reparação do tendão pode promover a arquitetura de um tendão normal, porém, dificilmente irá reproduzir a formação prévia ou retornará às suas propriedades mecânicas originais de deslizamento sobre os tecidos vizinhos (MACHADO et al. 2000). Por haver baixa vascularização, oxigenação e nutrição, o tendão possui baixa capacidade de regeneração (ENWEMEKA, 1989). Apesar do intensivo remodelamento do tendão nos primeiros meses após a lesão, a remodelação completa nunca será alcançada, pois as fibras de colágeno que substituem a lesão apresentam diâmetro menor resultando numa redução da força biomecânica do tendão (MAFFULLI; MOLLER; EVANS, 2002). No entanto, sabe-se que quando o tendão lesado é estimulado por meios fisioterápicos apropriados este se regenera adequadamente.

O processo de reparo tendíneo acontece em três fases sobrepostas, inflamatória, proliferativa e de remodelamento (ENWEMEKA, 1989). Na fase inflamatória ocorre à forma de cicatrização extrínseca, que acontece do primeiro ao sétimo dia após a lesão, e libera no local os mediadores químicos da inflamação, onde as células inflamatórias fazem a migração para o local da lesão. Os fibroblastos migratórios e os macrófagos desempenham um papel fagocitário. Os macrófagos são responsáveis por fagocitar e digerir partículas estranhas, removendo restos celulares e componentes extracelulares alterados durante o processo de cicatrização (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004), havendo cobertura da lesão (POTENZA, 1962). A fase proliferativa inicia-se do quinto ao vigésimo primeiro dia após a lesão, com a chegada de fibroblastos e miofibroblastos (GOFFI, 1996). É quando ocorre a cicatrização de forma intrínseca com a síntese do fibroblasto no interior da lesão até o final do revestimento do tendão (MAFFULLI; MOLLER; EVANS, 2002), obtendo proliferação e síntese de colágeno tanto das camadas superficiais quanto das camadas profundas do tendão (MANSKLE; LESKER, 1984). A migração e proliferação dessas células são estimuladas por fatores de crescimento liberados por plaquetas e macrófagos teciduais presentes no local da lesão. Goffi (1996), também afirma que o remodelamento tem início por volta do décimo quarto dia após a lesão e se estende por um período de um ano ou mais, sendo necessário cerca de oito meses para uma reconstrução parcial.

As fases de proliferação e remodelamento são importantes para uma melhor reparação tecidual onde há intensa proliferação celular (fibroblastos), síntese de fibrilas de colágeno e o alinhamento das fibras no eixo longitudinal do tendão (ENWEMEKA, 1989). De acordo com Maffulli *et al.* (2002), a resposta extrínseca é a mais importante,

se comparada à intrínseca, porque promove um rápido preenchimento da lesão com tecido de granulação.

Existem três critérios fundamentais para a obtenção de um bom resultado funcional, primeiro a facilitação da movimentação precoce, segundo o restabelecimento do movimento de deslizamento do tecido e terceiro a retomada da função de suporte de força tensora (ELWKIL, 2006).

1.3 Mediadores Inflamatórios

Após a lesão do tendão ocorrem vários eventos para promover o processo de reparo tecidual, entre eles a grande migração leucocitária e formação de citocinas pró-inflamatórias, presentes na inflamação intensa (LIECHTY et al., 2000). Tais eventos podem causar alteração do tecido com a formação de cicatriz, impedindo o mecanismo de deslizamento do tendão (LIN et al. 2006; BEREDJIKLIAN et al. 2003). De acordo com Ricchetti et al. (2008), uma forma de minimizar essas alterações é controlar o processo de cicatrização por meio da modulação do processo inflamatório e dos níveis de citocinas anti e pró-inflamatórias envolvidas no reparo.

O Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) é uma citocina produzida por diversos tipos celulares e é considerado o principal mediador inflamatório, por ser a primeira citocina liberada pelas células do hospedeiro, após contato com a bactéria ou seus produtos. Além disso, conforme foi demonstrado em estudos com animais, a administração de TNF- α induz à síntese de outros mediadores, como a IL-1 e IL-6, cuja liberação é inibida pela neutralização da atividade do TNF- α (FONG & LOWRY, 1990). A presença dos mediadores IL-1 e IL-6 esta diretamente relacionada com a progressão da tendinite (HAYER et al. 2007).

Os efeitos biológicos observados após a estimulação *in vitro* ou *in vivo* com o TNF- α , são consequência de sua ligação a receptores específicos localizados na membrana celular (SBARSI et al., 2007). Devido a sua interação com o sistema imune, esta citocina é capaz de exacerbar os sinais e sintomas de doenças que são desencadeadas por alterações da resposta imunológica, como por exemplo, o lúpus eritematoso e a artrite reumatóide (LOPEZ-ARMADA et al., 2006).

A migração dessas células inflamatórias como neutrófilos e macrófagos para o tecido sinovial coincide com os sinais e sintomas da doença crônica. Laragione et al. (2007) demonstraram que alguns genes regulam a migração de neutrófilos, e além disso, o bloqueio desses genes reduz os níveis de TNF- α no líquido sinovial de ratos com artrite. Nesse mesmo sentido, autores observaram que o bloqueio de fatores de

transcrição como a enzima MAPkinase p38 reduz a expressão de genes para IL-1 β , IL-6, metaloproteinases e TNF- α em modelo experimental de artrite reumatóide em ratos (BOYLE et al., 2006).

Considerando os resultados que descrevem o envolvimento do TNF- α na resposta inflamatória crônica, é razoável admitir que esta citocina possa ser alvo de ação de terapias anti-inflamatórias.

Durante a inflamação articular, as células sinoviais produzem grande quantidade de citocinas, particularmente citocinas pró-inflamatórias como, por exemplo, a IL-1 β (BRADDOCK & QUINN, 2004). De fato, Aigner et al. (2006) demonstraram que citocinas como IL-1 β é capaz de comprometer a integridade da cartilagem de articulações em processos inflamatórios crônicos como a artrite reumatóide e a osteoartrite. Durante o processo inflamatório, o metabolismo das células que constituem o tecido lesado sofre importantes alterações, a expressão de enzimas e a síntese de mediadores pró-inflamatórios se apresentam exacerbadas (VERBRUGGEN et al., 2006).

Os efeitos da IL-1 β podem ser inibidos *in vitro* e *in vivo* através de inibidores naturais tais como, antagonistas do receptor de IL-1 β e receptores solúveis. Esse tipo de receptor pertence à família dos receptores de citocinas que não induzem resposta intracelular (JACQUES et al., 2006). Esses mesmos autores demonstraram que os inibidores de IL-1 β são eficazes no tratamento dos sintomas da inflamação crônica articular. Além disso, esses resultados corroboram com aqueles encontrados em pacientes acometidos por doença reumática.

A IL-6 induz não somente reações de fase aguda do processo inflamatório, mas também participa no desenvolvimento de respostas imunológicas humorais e celulares. Dentre os efeitos da IL-6 podemos destacar o estágio final de diferenciação de células B, a secreção de imunoglobulinas e a ativação de células T. A principal característica que difere a fase aguda da resposta inflamatória da inflamação crônica é recrutamento de células inflamatórias (monócitos) para o local da lesão. A IL-6 desempenha importante função no processo de transição da fase aguda para a fase crônica do processo inflamatório (KAPLANSKI et al., 2003).

Se a atividade de citocinas pró-inflamatórias persiste, essa resposta inflamatória passa a ser caracterizada com inflamação crônica, que inclui a resposta imunológica. Durante a inflamação crônica, a IL-6 favorece o acúmulo de células inflamatórias mononucleares no sítio da lesão. Isto se deve a secreção contínua de MCP-1, e aos efeitos angioproliferativos e anti-apoptóticos sobre as células T (ATREYA et al., 2000).

Este efeito pode aumentar os níveis séricos de IL-6 e estabelecer a base para a amplificação da proliferação celular crônica. Neste tipo de doença, a IL-6 não apenas mantém a inflamação, mas também modifica a resposta imunológica. Além disso, a concentração de IL-6 circulante está elevada em diversas doenças inflamatórias crônicas tais como, artrite reumatóide, artrite idiopática juvenil sistêmica, lúpus eritematoso, espondilite anquilosante, psoríase e doença de Crohn.

A IL-10 apresenta um importante papel no reparo tecidual, pois esta relacionada à modulação do processo inflamatório como citocina anti-inflamatória, parecendo acelerar a cicatrização por meio da redução da inflamação, e manutenção das propriedades mecânicas e histológicas do tecido (LIN et al. 2006; RICCHETTI et al. 2008). É conhecida por inibir a expressão de IL-6 e IL-8 e a migração de células inflamatórias no local da lesão, incluindo macrófagos e monócitos (ALAM et al. 1994; RICCHETTI et al. 2008).

Em eventos anti-inflamatórios os níveis de IL-10 e IL-13 podem estar aumentados (LEONARDI et al. 2003), neste caso pode haver efeito compensatório de IL-10, caso haja redução de IL-4, diminuindo a inflamação e conduzindo a formação de um colágeno mais organizado (LIN et al. 2006). Juntamente com as citocinas IL-4 e IL-13, a IL-10 realiza atividades funcionais como a supressão de eventos pró-inflamatórios, pela inibição de IL-6 e regulação dos níveis de IL-12 (LIN et al. 2005; RYAN et al. 2005).

A IL-10 possui importante função biológica na inibição da maturação e diferenciação de células dendríticas em monócitos, também inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias por estas células e pelos macrófagos. As principais citocinas pró-inflamatórias como, IL-1, IL-6 e ainda o TNF- α são drasticamente reprimidas após exposição a IL-10 que pode inibir a inflamação, aumentando os receptores antagonistas de IL-1 pelos macrófagos (MOSSER et al. 2008). Em estudo no qual os animais que sofreram lesões no tendão e foram tratados com IL-10, apresentaram suas propriedades mecânicas melhoradas, semelhantes ao grupo controle (RICCHETTI et al. 2008). De acordo com Choi et al. (2007), a IL-10 parece inibir de uma maneira continuada a produção das citocinas pró-inflamatórias por meio de feedback negativo.

1.4 Fototerapia

Diversos estudos visam o desenvolvimento de técnicas a fim de otimizar o processo de reparação tendínea. A qualidade da recuperação tecidual está diretamente relacionada à efetiva reabilitação funcional do indivíduo. Assim, o desenvolvimento de

equipamentos e técnicas terapêuticas tem sido amplamente investigado na área da Saúde e Engenharia Biomédica. Encontram-se técnicas que utilizam eletroterapia, ultraterapêutico o laser de baixa intensidade (TLBI) e recentemente a terapia com LED de baixa intensidade.

A luz tem sido utilizada como agente terapêutico por séculos e LASER (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) foi idealizado por Albert Einstein em 1917, quando expôs os princípios físicos da emissão estimulada. Desde o final da década de 1960, houve um grande avanço nos equipamentos de laser e em suas aplicações na área médica (GENOVESE, 2000; MATERA; TATARUNAS; OLIVEIRA, 2003, BJORDAL; LOPES-MARTINS; IVERSEN, 2006; ALBERTINI et al., 2008).

A TLBI é uma modalidade de tratamento clínico que não produz efeito térmico sobre os tecidos, portanto, os efeitos biológicos não podem ser atribuídos ao aumento de calor. A intensidade dos efeitos depende do metabolismo celular ou da condição clínica tecidual antes da irradiação. A radiação emitida por um laser tem como características o paralelismo de suas ondas (coerência) e a distribuição espectral estreita com o mesmo comprimento de onda, a monocromaticidade (SANTOS et al. 2003).

A TLBI exhibe bons resultados, dentre eles a cicatrização de feridas, melhora na regeneração de nervos, melhora na regeneração neovascular, e na indução de formação óssea (NISSAN, 2006). Estudos demonstram resultados favoráveis também no processo de reparação tendínea, pela deposição de fibras de colágeno na fase inicial e tardia, assim como minimização da presença de células inflamatórias na zona da lesão (TAVARES; MAZZER; PASTORELLO, 2005).

Em estudo realizado, quarenta coelhos adultos sofreram tenotomia do tendão de Aquiles e foram divididos em dois grupos, o grupo tratado recebeu irradiação com laser HeNe (632,8 nm) durante o processo de cicatrização do tendão, concluiu-se que a estimulação com o laser diminuiu a resistência da cicatriz nos coelhos do grupo tratado quando comparados ao grupo controle (OLIVEIRA, 2002).

Um estudo comparativo entre TLBI, ultra-som terapêutico e eletroestimulação, indica que a TLBI causa intensa estimulação sobre atividade celular (número de fibroblastos e síntese de colágeno) no tecido lesado (ENWEMEKA; REDDY, 2000). Em outro estudo comparativo, que utilizou TLBI no processo de reparação de tendão de Aquiles, analisou-se a evolução bioquímica e biomecânica do tendão, sendo que no grupo tratado ocorreu aumento significativo da produção de hidroxiprolina (aminoácido

importante na síntese do colágeno) e melhora da biomecânica do membro lesado (DEMIR, et al. 2004).

Em um estudo onde coelhos tenotomizados receberam TLBI, observou-se aumento de 26% de fibras colágenas no grupo tratado em relação ao grupo que não recebeu a terapia (TAVARES; MAZZER; PASTORELLO, 2005). Em feridas cutâneas induzidas no dorso de ratos, o grupo tratado com TLBI, apresentou um aumento significativo de até 50% de colágeno em relação ao grupo controle, além de apresentar maior concentração de células reparadoras e contração das bordas das feridas (REDDY; STEHNO-BITTEL; ENWEMEKA, 1998). Em estudo semelhante, com feridas cutâneas, Pugliese et al. (2003) concluiu que a TLBI aumenta a concentração das fibras colágenas e elásticas reduzindo o edema e o processo inflamatório.

Considerando as vantagens atribuídas à TLBI sobre as terapias convencionais (ultra-som, crioterapia, eletroestimulação, entre outras) no que se refere à otimização do processo de reparação de lesões tendíneas, os estudos empregando novos equipamentos a base de luz têm sido encontrados. A investigação da similaridade dos efeitos de novas terapias com fontes de luz, quando comparadas aos efeitos atestados do laser, viabilização o desenvolvimento comercial de equipamentos economicamente mais acessíveis. Norteados por este objetivo, estudos empregando a terapia com LEDs em baixa intensidade têm sido desenvolvidos.

Segundo alguns autores, a terapia com LED em baixa potência pode gerar efeitos semelhantes aos obtidos com a TLBI. O aumento da atividade celular, tanto em divisão como em síntese, têm sido relacionados ao comprimento de onda e com a dose, e não especificamente à fonte de luz (KARU, 2003).

Os LEDs são diodos emissores de luz, que ao serem energizados emitem luz monocromática e não coerente. Permitem sua utilização sem a necessidade de filtros ópticos e, em virtude de serem dispositivos semicondutores, apresentam grande eficiência de conversão de energia elétrica em óptica, dissipando pouca potência. Tem como característica principal a condução da corrente elétrica em um único sentido, apresentando duas regiões distintas, sendo a primeira receptora de elétrons denominada por “p” e a segunda doadora de elétrons, denominada por “n” (MEDEIROS, 2001). Quando polarizados adequadamente estes dispositivos semicondutores emitem luz na faixa visível ou invisível, dependendo de seus componentes (ZANIN, et al. 2005).

O processo de absorção luminosa por um cromóforo tecidual está relacionado ao comprimento de onda do fóton. Este deve possuir um pacote energético específico para que promova reações moleculares. Quando ocorre a absorção de fótons por um

cromóforo, um estado molecular eletronicamente excitado se estabelece, resultando em aumento ou redução de atividade celular. A fotobiomodulação tem como característica a possibilidade de aplicação em vários métodos terapêuticos empregando diferentes fontes emissoras de luz (KARU, 2003).

Atualmente os LEDs estão sendo introduzidos comercialmente como uma alternativa para as terapias que utilizam laser de baixa potência. Em estudos recentes, alguns autores como Pöntinen (2000) e Whelan et al. (2000), concluem que a coerência da luz não é responsável pelos efeitos da TLBI, já que esta propriedade se perde nas primeiras camadas do tecido biológico. Discordando, o estudo de Boulton e Marshall (1986) atribui os efeitos acima mencionados à coerência do laser o que o diferencia do LED.

O baixo custo da irradiação com luz não coerente e sua eficácia similar a dos lasers foi demonstrada por Slear; Angell-Petersen e Warloe, (2000) e Clark; Bryden e Dawe, (2003) em estudos com lesões cutâneas. Resultados satisfatórios também foram obtidos por Vinck et al. (2003) com o LED em estudo com cultura de fibroblastos.

Trelles; Allones e Mayo, (2006), utilizaram a terapia com LED ($\lambda=633$ nm) para auxiliar a cicatrização de ferida cutânea a laser Er:YAG, e relatam que após a primeira sessão do tratamento os pacientes apresentaram pouca ou nenhuma dor, e no décimo quinto dia essas feridas já estavam completamente reparadas e com mínimo tecido cicatricial quando comparados ao controle. A utilização do LED representa uma recente, não invasiva intervenção terapêutica para o tratamento de feridas, infecções e isquemias (DESMET et al. 2006). As terapias que utilizaram o LED vermelho, emitindo no visível, obtiveram excelentes resultados, como cicatrização acelerada e sem dor de feridas cutâneas (TRELLES; ALLONES e MAYO, 2006).

Casalechi et al. (2008), demonstraram a efetividade do LED no processo de regeneração do tendão de Aquiles, com diminuição do número de fibroblastos e melhora na qualidade da remodelação. Bastos, Lizarelli e Parizzoto (2009) também encontraram efeitos semelhantes na cicatrização de tendão ao comparar o LED (630nm e 880m) com o laser (685nm e 830nm), sendo que os comprimentos de onda no infravermelho obtiveram melhores resultados foram mais eficientes.

Embora vários estudos atestem o efeito benéfico da terapia com LED, ainda se fazem necessários muitos estudos para determinar dosimetria e mecanismo de ação deste tipo de terapia. O desenvolvimento desta terapia poderia contribuir nos sistemas de atenção à saúde pública, reduzindo o processo de reabilitação de pacientes através de uma terapia de baixo custo.

O quadro abaixo (Tabela 1) demonstra a utilização da fototerapia com Laser e LED de baixa intensidade em estudos distintos, com diferentes parâmetros e seus respectivos resultados.

Quadro 1: Utilização da fototerapia Laser/LED em diferentes estudos.

Autor/Ano	Fonte/ λ	Dose (J)	Modelo	Resultado	Área tratada
Arruda et al, 2007	Laser 670 e 904 nm (associados)	1,8J e 2,7J	Rato	↑ organização das fibras colágenas	Tendão calcâneo
Albertini et al, 2008	Laser/660 e 684 nm	3J	Rato	↓ expressão de mediadores pró-inflamatórios	Tendão calcâneo
Casalechi et al, 2009	LED/640nm	12J	Rato	↓ inflamação ↑ qualidade do reparo	Tendão calcâneo
Xavier et al, 2010	LED/880nm	3,7J	Rato	↓ inflamação	Tendão calcâneo
Pires et al, 2011	Laser/780nm	1,6J	Rato	↓ expressão de mediadores pró-inflamatórios	Tendão calcâneo
Marcos et al, 2012	Laser/810nm	1 e 3J	Rato	↓ inflamação manutenção das propriedades biomecânicas	Tendão calcâneo
Casalechi et al, 2013	Laser/780	1,5J	Rato	↓ inflamação	Tendão calcâneo
Xavier et al, 2014	LED/880nm	3,7J	Rato	↑ expressão de IL-10 e colágeno tipos I e III	Tendão calcâneo
Torres-Silva et al, 2014	Laser/660nm	3J	Rato	↓ expressão de mediadores pró-inflamatórios	Tendão calcâneo

2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Com o crescente avanço dos estudos concernentes à base molecular das desordens musculoesqueléticas, novas terapias vêm sendo desenvolvidas, com especial ênfase àquelas que apresentam potencial terapêutico sobre o edema inflamatório e dor. Além disso, grande atenção tem sido dada aos efeitos adversos de terapias anti-inflamatórias. Com a inversão da pirâmide etária e o gradual envelhecimento da população brasileira, paralelamente devermos observar uma aumento da prevalência de doenças inflamatórias musculoesqueléticas e reumáticas. Sendo assim, cada indivíduo acima de 60 anos é um potencial candidato ao uso crônico de fármacos anti-inflamatórios e conseqüentemente, aos conhecidos efeitos adversos decorrentes deste uso.

Dentre os diversos tipos de drogas nesta classe, os inibidores específicos da enzima ciclooxygenase-2 (COX-2) tem apresentado efeito favorável no tratamento das desordens desse tipo. No entanto, o impacto econômico das terapias para desordens musculoesqueléticas a partir do uso de drogas anti-inflamatórias é consideravelmente alto, principalmente devido aos custos da medicação, hospitalização e toxicidade destes agentes, principalmente com relação a efeitos adversos gastrintestinais.

Os distúrbios musculoesqueléticos também representam gastos em relação à saúde ocupacional, considerados como um dos problemas mais graves no campo da saúde do trabalhador, são responsáveis pela maior parte dos afastamentos do trabalho e custos com pagamentos de indenizações no Brasil e em grande parcela dos países industrializados (BORGES, 2000; WALSHA et al. 2004). Nos Estados Unidos, por exemplo, as doenças musculoesqueléticas compõem 52,2% das que geraram benefícios do Seguro de Compensação dos Trabalhadores e na França, constituíram-se em 63% das enfermidades relacionadas ao trabalho que receberam este tipo de compensação (BUCKLE; DEVEREUX, 2002; LEIGH et al. 2004). No Brasil, em 2002, as doenças musculoesqueléticas foram responsáveis por 22,6% dos benefícios despachados e em 2006, 48,2% dos benefícios previdenciários por doença do trabalho, excluindo-se os acidentes, foram concedidos por doenças musculoesqueléticas (GADELHA, 2006; SOUZA; SANTANA, 2011). Além dos gastos gerados com afastamentos, são ocasionados gastos com indenizações e tratamento. Considerando a magnitude das doenças musculoesqueléticas no contexto dos beneficiários o desenvolvimento de terapias visando diminuir os custos no tratamento dessas doenças se torna de grande valor.

O uso de Fototerapia na prática clínica para o efeito anti-inflamatório em diferentes doenças baseia-se em um número crescente de publicações de caráter

científico. Recentemente, vimos acumulando experiência em trabalhos experimentais e clínicos com a aplicação do LED e do Laser da Baixa Potência em diferentes situações. Durante este tempo, fomos capazes de caracterizar o efeito da Terapia com Laser de Baixa Potência na reação inflamatória de edema de pata, pleurisia e dermatite, hiperreatividade de vias aéreas em ratos e camundongos, e tendinite de Tendão de Aquiles. No entanto, é muito importante ressaltar que pouco se conhece a respeito do mecanismo de ação dos LEDs. Neste sentido, os estudos experimentais com estes comprimentos de onda assumem grande relevância para o esclarecimento do mecanismo de ação da terapia LED.

Tendo em vista os dados apresentados anteriormente, a importância da utilização de terapias não medicamentosas representa um fator altamente relevante para o Sistema de Saúde, especialmente em países emergentes. No entanto, o estabelecimento de parâmetros clínicos para a utilização desta técnica se faz ainda extremamente necessário.

Outro importante ponto positivo da fototerapia a ser considerado é o custo do tratamento. Vale ressaltar que o custo no tratamento de complicações como artrite reumatóide, bursite, tendinite, lúpus eritematoso e outros tipos de limitação da musculatura esquelética é alto. Assim, uma terapia alternativa que além de ser eficaz e não apresentar efeitos colaterais, também seja de baixo custo, tem distinto valor no tratamento de doenças musculoesqueléticas. Economicamente, o uso da fototerapia é mais viável que a constante compra de medicamentos voltados ao tratamento específico da tendinite, sem contar os medicamentos para atenuar os efeitos colaterais.

3. OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo investigar os efeitos anti-inflamatórios e as propriedades mecânicas do tecido após a ação da fototerapia utilizando LASER e LEDs, na região do infravermelho, na tendinite induzida por trauma mecânico em tendão de Aquiles de ratos.

3.1 Objetivos Específicos

Artigo 1:

- Analise biomecânica do tendão após a ação da fototerapia com Laser (ensaio de resistência e tração).
- Analise do infiltrado de neutrófilos, por meio da histomorfometria após a ação da fototerapia com Laser.
- Analise da organização do colágeno e sua maturação após a ação da fototerapia com Laser.

Artigo 2:

- Analise biomecânica do tendão após a ação da fototerapia com LED (ensaio de resistência e tração).
- Analise do infiltrado de neutrófilos, por meio da histomorfometria após a ação da fototerapia com LED.
- Analise da organização do colágeno e sua maturação após a ação da fototerapia com LED.

Dados não publicados:

- Investigação do envolvimento de mediadores inflamatórios. Nível da interleucina 6 (IL-6) e da citocina fator de necrose tumoral (TNF- α), após a ação da fototerapia com Laser e LED.
- Investigação do envolvimento de mediadores inflamatórios. Expressão gênica da interleucina 6 (IL-6), da citocina fator de necrose tumoral (TNF- α) e COX-1 e COX-2, após a ação da fototerapia com Laser e LED.

4. RESULTADOS

4.1 Artigo – 1

Casalechi HL, de Farias Marques AC, da Silva EAP, Aimbire F, Marcos RL, Lopes-Martins RAB, de Carvalho PdTC, Albertini R. Analysis of the effect of phototherapy in model with traumatic Achilles tendon injury in rats. **Lasers Med Sci.** v.12, p.1075-81, 2014.

Os resultados descritos neste primeiro estudo são referentes às análises biomecânicas e histopatológicas dos grupos: controle, laser, tendinite e diclofenaco. Estes resultados demonstram que o tratamento com Laser de baixa intensidade, nos parâmetros utilizados e nos tempos estudados melhora a qualidade do reparo do tecido tendíneo, a biomecânica e reduz a migração de células inflamatórias.

Analysis of the effect of phototherapy in model with traumatic Achilles tendon injury in rats

Helindora Leão Casalechi · Anna Cristina de Farias Marques ·
Evela Aparecida Pereira da Silva · Flávio Aimbire ·
Rodrigo Labat Marcos · Rodrigo A. B. Lopes-Martins ·
Paulo de Tarso Camilo de Carvalho · Regiane Albertini

Received: 5 June 2013 / Accepted: 13 October 2013 / Published online: 2 November 2013
© Springer-Verlag London 2013

Abstract The aim of this study was to investigate the effect of low-intensity laser (LILT) infrared (830 nm) therapy in tendon inflammation, tendinitis induced by mechanical trauma in rat Achilles tendon. For this, we used 65 young male Wistar rats, weighing ± 300 g divided into different groups: C = control ($n=5$) and experimental ($n=10$ /group), with two different times of sacrifice such as treated with L = laser, D = treated with diclofenac, and T = untreated injured. The tendon inflammation was induced by controlled contusion in the medial region of the Achilles tendon of the animals. The treated groups received some kind of intervention every 24 h, all groups were sacrificed on the 7th or 14th day after the trauma. The tendons were dissected, extracted, and sent for analysis. Histological analysis of the L group showed a decrease in the number of inflammatory cells in relation to other groups in both periods studied. The comparative results between the number of inflammatory cells in the control and treated groups at 7 and 14 days showed statistically significant differences. Qualitative analysis findings obtained by the picrosirius red technique under polarized light showed that in 7 days, the T group presented collagen types I and III in the same proportion; group D presented a predominance of type III fibers, while in group L, type I collagen predominated. The

14-day group D showed collagen types I and III in the same proportion, while in group L, there was a predominance of type I fibers. Biomechanical analysis showed that 7-day groups L and C showed similar stiffness and increased breaking strength. The 14-day groups L and C showed greater rupturing strength as well as increased stiffness angle. Group D showed a decrease of maximum traction strength and degree of rigidity. It was concluded that treatment with LILT in the parameters used and the times studied reduces migration of inflammatory cells and improves the quality of repair while reducing the functional limitations.

Keywords LILT · Tendinitis · Inflammatory process

Introduction

Tendinopathies are clinical conditions mainly characterized by tendon pain and edema, affecting functionality and movements of the member. Despite of the controversy concerning on the use of the terms tendinitis/tendinosis, we believe that tendon lesions are able to express most of the inflammatory cardinal signs, i.e., pain, edema, vasodilation (redness), increased temperature, and loss of function. In this context, we decided to use the term tendinitis along the text. Tendinitis is a common disorder of the musculoskeletal system with multiple pathological manifestations. Due to etiologic variety, it is one of the disorders that mostly keeps workers away from work and is now treated as an occupational and public health problem [1].

Although the causes of tendonitis may include a variety of factors, including overweight, trauma, prolonged use of drugs such as antibiotics and corticosteroids, repetitive stress in work activities, and recreational sports activities; the incidence of tendon injuries seems to come increasing with the idea

H. L. Casalechi · A. C. de Farias Marques · E. A. P. da Silva ·
P. d. T. C. de Carvalho · R. Albertini (✉)
Post Graduate Program in Rehabilitation Sciences, Universidade
Nove de Julho (UNINOVE), Rua Vergueiro, 235, São Paulo,
SP 01504-001, Brazil
e-mail: regianealbertini@uninove.br

F. Aimbire
Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil

R. L. Marcos · R. A. B. Lopes-Martins
Post Graduate Program in Biophotonics Applied to Health Sciences,
Universidade Nove de Julho (UNINOVE), São Paulo, SP, Brazil

which increasing sports activities improves quality of life [2, 3]. With a poorly understood pathogenesis, excessive physical effort and exertion can cause repetitive micro-trauma in the tissue leading to spontaneous rupture of tendons [4]. The causes of tendinitis involve a variety of intrinsic and extrinsic factors, including the vascularity, dysfunction of the muscles involved; age, height, and weight; tissue hypoxia; and changes in tendons induced by free radicals, due to ischemia and reperfusion damage [5, 6].

In cases of tendinitis, the main procedure is to prevent the damage caused by inflammatory reaction, trying to reverse the acute or subacute inflammation. The aim is to minimize the effects on the injured tendon and initiate a recovery process that allows functional recovery of tendons [6].

After tendon injury, the process of healing or tissue repair starts. This process begins with a local inflammatory reaction characterized by edema, vasodilatation in the tissue, and tendon pain on movement and at rest. In addition, recruitment of inflammatory cells and production of humoral mediators such as cytokines and eicosanoids occurs locally [7, 8].

Considering the importance and high incidence of such condition, a variety of therapeutic modalities has been employed in order to alleviate pain and repair the tendon. However, the first step after diagnosis should be the identification of the cause of tendinitis and possible risk factors. There are different types of treatments for tendinitis, such as anti-inflammatory drugs (steroids and NSAIDs), mobilization techniques, eccentric exercises, as well as electrotherapeutic resources such as ultrasound and low-level laser [9]. The use of anti-inflammatory drugs to treat tendon disorders is still a controversy. Some authors reported positive findings using NSAIDs, confirming their clinical popularity [10, 11]. These authors suggest that NSAIDs would be able to increase tensile strength and accelerate collagen production. On the other hand, other authors demonstrated that the use of NSAIDs is highly contraindicated [8, 12], significantly decreasing tensile strength and altering biomechanical properties of the tendon, and most of the medication has detrimental effects on patients [8]. The Laser (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation) was devised by Albert Einstein in 1917. Since the late 1960s, there has been a major breakthrough in laser equipment and its applications in the medical field [13–15]. Therapy with low-intensity laser (LILT) shows good results, including wound healing, improvement in nerve regeneration and vascular regeneration, and induction of bone formation [16, 17]. Studies have shown favorable results also in tendon repair process by deposition of collagen fibers in the early and late stages as well as minimization of inflammatory cells in the lesion area [18].

As possibly responsible for the beneficial effects of low-level laser therapy (LLLT) in tendon injuries, we can list two important biological responses that have been reported in

clinical studies, according to Bjordal et al. 2006 [19]. The first point, recently confirmed by Marcos et al. 2012 [8], is the modulatory effect of fibroblast metabolism and collagen deposition by matrix metalloproteinases. The second point is the modulation or inhibition of inflammatory mediators by laser light [8, 19].

The advantage of LILT compared to conventional pharmacological therapy is the absence of unwanted side effects. However, it is important to note that little is known about the mechanism of action of infrared laser. So this study aims to investigate the hypothesis that laser phototherapy helps in the process of tendon repair. For this purpose, we use an infrared laser (830 nm) in an experimental model of tendon lesion induced by mechanical trauma in Achilles tendon of rats.

Material and methods

Animals

Sixty five albino, male, young adults Wistar rats; weighing ± 300 g were used. The animals were randomized and kept in standard cages in (five animals/cage). They were kept in a room with constant humidity and temperature (24 °C/60 %), light and dark cycles of 12/12 h, with water and food *ad libitum*.

All experiments were in accordance with the Ethics and Animal Research of the Universidade Nove de Julho guidelines, under approval of the protocol number An 0014/2011.

Induced tendinitis by mechanical trauma

After intraperitoneal anesthesia (ketamine hydrochloride 10 %, 10 ml (Syntec) using a dose of 0.1 ml per 100 g body weight and xylazine hydrochloride 2 %, 10 ml (Syntec)), the animals were placed in prone position in a non-cutting guillotine to induce tendon trauma of the medial calcaneal tendon of the left paw in all animals, with the exception of the control group. The equipment is able to produce standard and reproducible trauma lesions in rat Achilles tendons.

Experimental groups

The 65 animals were randomly divided into 10 groups: those who had not suffered mechanical trauma ($n=5$) and did not undergo any treatment were named Control (C) group. The groups of animals that underwent mechanical trauma ($n=10$ /group) were named according to the type of treatment and moment of sacrifice. Those treated with laser were named L7 and L14. Sodium diclofenac treatment, D7 and D14. The

animals which suffered tendon trauma and did not receive any treatment were T7 and T14.

Treatment with sodium diclofenac

A standard solution of sodium diclofenac (25 mg/mL, Voltaren®) was used. A volume of 0.8 ml obtained from the standard solution was intraperitoneally injected, starting 12 h after injury and continued every 24 h for 7 days.

Treatment with low level laser

A low level laser (Theralase, DMC®, 830 nm (± 10 nm) 50 mW; 0.028 cm² spot area) power was used.

The laser radiation was applied by contact technique at the injured Achilles tendon during 120 s, yielding a total energy dose of 6 J in a single point. At the moment of laser irradiation, the animals were manually restrained and the laser probe was positioned at an angle of 90° in relation to the tissue surface. Before the beginning of the experiments, the laser equipment was calibrated with a power meter (Model 13 PEM 001 / 1, MellersGriot, Netherlands).

The treatment started 12 h after the lesion and continued for every 24 h until sacrifice (7 and 14 days).

Euthanasia

Euthanasia of animals occurred in a CO₂ chamber, after 7 and 14 days after injury. The left tendons of all groups were dissected and extracted from the insertion to the calcaneal myotendinous junction. Half of them (five per group) were used for histological analysis and the other five tissues were submitted to biomechanical assays.

Analysis of inflammatory cells

Five randomly selected sections were stained with HE for each animal, corresponding to the median portion of the Achilles tendons. The results were obtained by counting the inflammatory cells present in five microscopic areas of tendon tissue.

Histomorphometric analysis was performed with an optical microscope. To obtain the total number of inflammatory cells in the observation fields, Image J software® in its function 'cell counter' was used.

Qualitative analysis of collagen types I and III

Five histological sections from each animal were stained with the Picrosirius Red dye. The material was examined under optical microscopy, with $\times 40$, using polarized light source. In this method, thicker fibers are shown stained in red orange, representing collagen type I.

While the thinner and more dispersed fibers were greenish representing the type III collagen [16].

Biomechanical analysis

Immediately after removal, tendon tissues were submitted to biomechanical assays. A universal assay machine (EMIC tensiometer, model DL 200 MF®) was used. In order to study the resistance to failure and elastic properties of the tissue, a special protocol was created, consisting of a sequence of loading and unloading forces applied to each tendon (strain = 1 % of its length) and this sequence was repeated until disruption [8]. Tendon length, width, and height were recorded before the mechanical test and these values were used to standardize results. The tendons were attached to the universal assay machine. The musculotendinous junction was fixed at the bottom and osteotendinous at the top of the tensiometer's handle. The maximum force was recorded at the time of rupture and compared among groups. The results were expressed by means of graphs as in Fig. 1, which shows the standard curve. The graphs represent the mechanical traction assay of the tendons of different groups until a breaking point.

Statistical analysis

Statistical analysis of treated and untreated groups was made. The analysis was conducted within and among groups, the values were tabulated and tested using ANOVA with the Tukey post-test for analysis of variance, and statistical significance level was 5 % ($p < 0.05$).

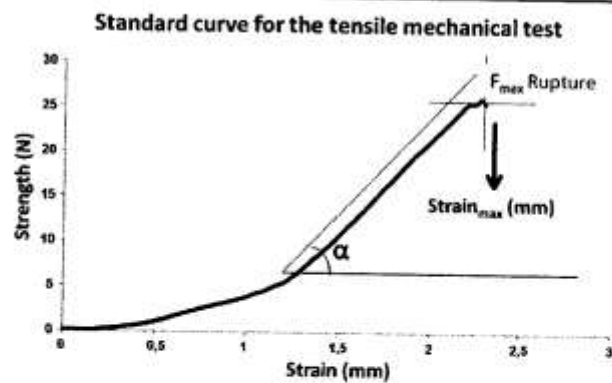
The program used to perform statistical tests was GraphPadInStat® version 3.0. For the graphs, the mean and standard deviation of the number of inflammatory cells were used through the GraphPadPrism® version 3.0 program.

Results

The comparison of results between the number of inflammatory cells in the control group and the treated groups at 7 and 14 days showed statistically significant differences. The counting results of inflammatory cells in the 7-day period were (mean and standard deviation) control group 2 ± 1 and tendinitis 105 ± 17 , diclofenac 53 ± 13 and laser 38 ± 8 . In the 14-day count, results were (mean and standard deviation) control group 2 ± 1 and tendinitis 105 ± 17 , diclofenac 54.66 ± 2.73 and laser 53.5 ± 14.37 .

Comparison of the amount of inflammatory cells among the groups are represented graphically in Fig. 2 and this shows that there is a statistically significant difference between the treated and control groups.

Fig. 1 Standard curve. The *Y* axis represents the force in Newton (N), evaluates the greatest force during stretching. The maximum force is presented by each tendon at the moment of rupture. The *X* axis represents the displacement of the material in millimeters (mm).



Qualitative analysis for observation of collagen fibers showed the presence of types I and III, as shown in Fig. 3.

In the control group, there was a predominance of red fibers, which represent collagen type I. At 7 days after injury, group T presented the same proportion of collagen types I and III and group D showed a predominance of green fibers, which represent the type III collagen. Meanwhile, group L had a predominance of red fibers, which represent the type I collagen.

At 14 days after injury, the presence of red fibers, type I was observed in the same proportion as green, type III in group D. Group L showed a predominance of red fibers, which represent collagen type I.

According to the traction test, it was observed that the 7-day group T showed changes in the angle that determines the stiffness of the material and maximal strength at early stages of rupture, these two rates were even lower in group D. On the other hand, group L showed stiffness similar to group C and increased rupture strength, as shown in Fig. 4a.

At 14 days after injury, group T continued to show a slight decrease of maximum force at the moment of rupture, but with an increase in angle in relation to axis *X*. Group D continued presenting a decrease of maximum traction strength and of stiffness determining angle. Groups L and C showed greater strength during the rupture; in group L, a slight increase of the rigidity angle was also observed, as shown in Fig. 4b.

Discussion

The results shown in this study confirm the hypothesis that phototherapy with low level laser assists in the process of tendon repair. These results corroborate previous studies that demonstrated that laser irradiation modulates various biological processes, such as decrease of inflammatory response, stimulation of neovascularization, wound healing acceleration, and skeletal muscle repair after injury besides inducing protein synthesis [7]. In previous studies, it was

Fig. 2 a Chart comparing the number of inflammatory cells on day 7 among the treated and control groups. ***Highly significant ($p < 0.001$), *Significant ($p < 0.05$). b Graph comparing the number of inflammatory cells at day 14 between the treated and control groups. ***Highly significant ($p < 0.001$)

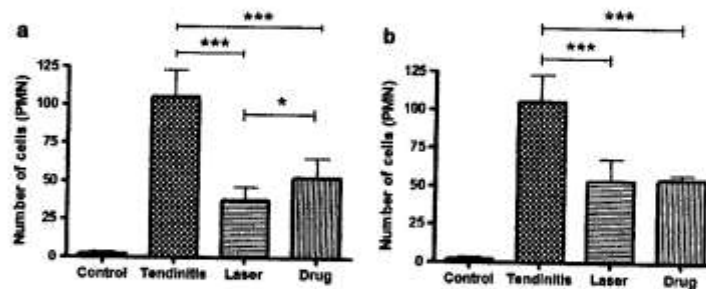
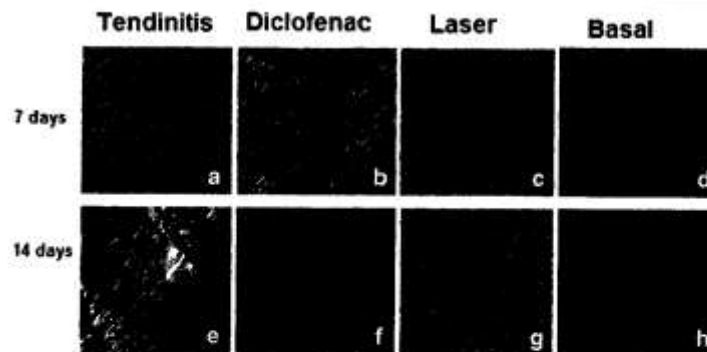


Fig. 3 Photomicrographs of histological tendons sections of treated and control animals at different times of euthanasia (Picrosirius Red, original magnification $\times 40$)



observed that the laser at a wavelength of 904 nm decreases inflammation and enhances collagen synthesis [20, 21]. Therefore, it was decided to investigate the effect of the laser wavelength of 830 nm which is near infrared. The energy density was 6 J for tendon repair process after trauma induction since there are few studies using these parameters.

This study had two treatment phases to investigate the action of the laser (830 nm) in the tendon repair process. The treatment of the acute stage in the repair process of the tendon was performed in 7-day groups considering the presence of inflammatory cells responsible for the healing process in the first days after injury [22]. Treatment for the chronic phase was carried out in the 14-day groups.

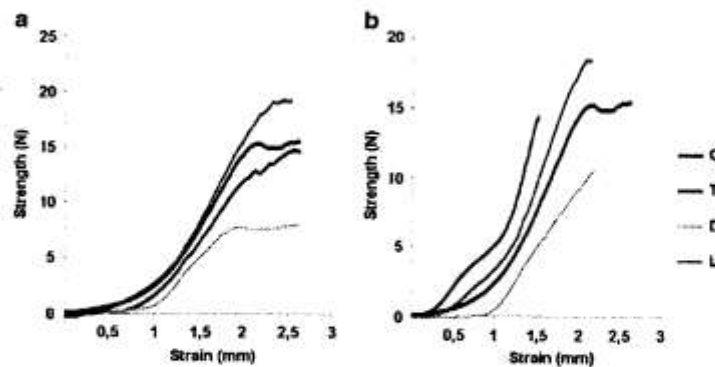
The average value of inflammatory cells in the animals of the group treated with laser in the 7-day period after injury (TA₇) was lower when compared with the average of the control group (NA) of the same period. This difference was statistically significant, demonstrating the effect of laser in the

decrease of inflammatory cells in the tendon repair process. These results are consistent with the results found by Enwemeka et al. and Carrinho et al. [23, 24].

The mean and standard deviation of the laser-treated group during the period of the 7th to 14th day after injury (TC₁₄), considered one of the treatment groups in the chronic phase, were the lowest values found in all groups of the experiment. Given this result, it can be stated that LILT presented its best results in this group because its effects through photobiomodulation provided greater decrease of inflammatory cells in this group.

Further, regarding the importance of reducing the migration of monocytes and neutrophils to the inflammation site is the fact that these cells, once attracted to the focus of inflammation, secrete TNF- α and other chemotactic factors, feeding back the inflammatory process [25]. Other authors stated in their studies that the anti-inflammatory effects of LILT are directly related to the decrease in plasma level of

Fig. 4 a Graphic resistance and elasticity at 7 days. b Graph resistance and elasticity at 14 days. Legend: C = control, L = laser, D = treated with diclofenac, and T = untreated injured



pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-6, and IL-2 [26–29]. The effects of LILT photobiomodulation are also associated with increased production of growth factors such as bFGF and IGF-1 [30]. Therefore, LILT would help break the positive feedback of inflammation and favor the repair process.

Since the main function of tendons is to transmit traction load, experimental studies of the biomechanical properties of these tissues are of great importance. They are usually carried out through traction tests in order to obtain force-deformation graphs, in which the mechanical properties are determined [31]. Regarding the repair process according to the traction test, it was possible to show that the laser treatment could change mechanical properties of the tendon, such as maximum force at the moment of tissue rupture and the greater angle formed in the linear region of each curve indicating the stiffness of the material. While in the first period (7 days), the injured group showed a slight decrease in stiffness, during the second period (14 days) the same group showed an increase in stiffness. This may be due to a process of fibrosis determined by the induction of inflammation. In this case, a more rigid tissue with a smaller force may have facilitated the rupture process. While the untreated group showed a slight decrease of rupture strength, the injured group treated with laser showed an increase of that strength. The injured group treated with diclofenac showed fewer results, indicating a worsening of these mechanical properties.

In this case, the use of this anti-inflammatory drug did not help in protecting tissue repair or conserving its mechanical properties. That may be related to structural changes in the tissue. Studies show that anti-inflammatory drugs in rat tendon injuries cause decreased edema and accumulation of inflammatory cells and changes in the expression, organization, and maturation of collagen, without showing effect upon compliance and traction strength of the tendon [32, 33].

The results of strength and elasticity corroborate the finding in relation to collagen type III, which in the 14-day laser group is proliferating. In normal tendons, which suffered no injury, type I collagen represents up to 90 % of its fibers [34]. Some authors noted that Achilles tendons ruptured spontaneously present high amounts of collagen type III [35, 36]. This agrees with the findings obtained by the picrosirius red technique, with visualization under polarized light observed in this study.

Therefore, it can be suggested that the 830-nm laser was effective in reducing functional limitations in models of traumatic tendinitis and that there is a correlation between the functional and cellular effects.

Conclusion

It was concluded that treatment with LILT within the parameters used and the time periods studied improve the

quality of tendon tissue repair and reduces migration of inflammatory cells and functional limitations.

References

- Alfredson H, Lorentzon R (2000) Chronic Achilles tendinosis: recommendations for treatment and prevention. *Sports Med* 29(2): 135–146
- van der Linden PD, Sturkenboom MC, Herings RM, Leufkens HM, Rowlands S, Stricker BH (2003) Increased risk of Achilles tendon rupture with quinolone antibiobacterial use, especially in elderly patients taking oral corticosteroids. *Arch Intern Med* 163(15):1801–1807
- McGarvey WC, Singh D, Trevino SG (1996) Partial Achilles tendon ruptures associated with fluoroquinolone antibiotics: a case report and literature review. *Foot Ankle Int* 17(8):496–498
- Salate ACB (2002) Síndromes por over-use em Tendão de Calcâneo. *Fisioter Bras* 3(6):351–355
- Maffulli N, Kader D (2002) Tendinopathy of tendoachillis. *J Bone Joint Surg* 84 B:1–8
- Magna M, Maffulli N (2008) Genetic aspects of tendinopathy. *J Sci Med Sport* 11:243–247
- Bjordal JM, Lopes-Martins RAB, Iversen VV (2006) A randomized, placebo controlled trial of low level laser therapy for activated Achilles tendinitis with microdialysis measurement of peritendinous prostaglandin E2 concentrations. *J Sports Med* 40:76–80
- Maroos RI, Leif-Junior EC, Arnold G, Magnenet V, Rahouadj R, Wang X, Demesrie F, Magdalous J, de Carvalho MH, Lopes-Martins RA (2012) Low-level laser therapy in collagenase-induced Achilles tendinitis in rats: analyses of biochemical and biomechanical aspects. *J Orthop Res* 30(12):1945–1951
- Schepis AA, Jones H, Haas AL (2002) Achilles tendon disorders in athletes. *J Sports Med* 30:287
- Forlund C, Bylander B, Aspenberg P (2003) Indomethacin and celecoxib improve tendon healing in rats. *Acta Orthop Scand* 74(4): 465–469
- Weiler J M (1992) Medical modifiers of sports injury. The use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in sports soft-tissue injury. *Clin Sports Med* v. 11, n. 3, p. 625–644
- Virchenko O, Skoglund B, Aspenberg P (2004) Parecoxib impairs early tendon repair but improves later remodeling. *Am J Sports Med* 32(7):1743–1747
- Matera JM, Taturanas AC, Oliveira SM (2003) O uso do laser vermelho de gás (904 nm) após excisão artroplástica da cabeça do fêmur em cães. *Acta Cir Bras* 18(2):102–106
- Albentins R, Villaverde AB, Aimbire F, Bjordal J, Brugnera A, Mittmann J, Silva JA, Costa M (2008) Cytokine mRNA expression is decreased in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation after low-level laser therapy. *Photomed Laser Surg* 26(1):19–24
- Nissan J, Assif D, Gross MD, Yaffe A, Indenman I (2006) Effect of low intensity laser irradiation on surgically created bony defects in rats. *J Oral Rehabil* 33(8):619–624
- Denadai AS, de Carvalho PT, dos Reis FA, Belchior AC, Pereira DM, Dourado DM, Silva IS, de Oliveira LV (2009) Morphometric and histological analysis of low-power laser influence on bone morphogenetic protein in bone defects repair. *Lasers Med Sci* 24(5):689–695
- dos Reis FA, Belchior AC, de Carvalho PT, da Silva BA, Pereira DM, Silva IS, Nicolau RA (2009) Effect of laser therapy (660 nm) on recovery of the sciatic nerve in rats after injury through neurectomy followed by epineural anastomosis. *Lasers Med Sci* 24(5):741–747

18. Pires D, Xavier M, Araújo T, Silva JA Jr, Aimbire F, Albertini R (2011) Low-level laser therapy (LLLT; 780 nm) acts differently on mRNA expression of anti- and pro-inflammatory mediators in an experimental model of collagenase-induced tendinitis in rat. *Lasers Med Sci* 26(1):85–94
19. Bjørndal JM, Lopes-Martins RA, Iversen VV (2006) A randomised, placebo controlled trial of low level laser therapy for activated Achilles tendinitis with microdialysis measurement of peritendinous prostaglandin E2 concentrations. *Br J Sports Med* 40(1):76–80
20. Filligon LI, Mauriz JL, Vedovelli K, Moreira AJ, Zettler CG, Lech O, Marmoi NP (2005) González-Gallego J. Low-level laser therapy (LLLT) prevents oxidative stress and reduces fibrosis in rat traumatized Achilles tendon. *Lasers Surg Med* 37(4):293–300
21. Demir H, Yara YS, Kinap M et al (2004) Comparison of the effects of laser and ultrasound treatments on experimental wound healing in rats. *J Rehabil Res Dev* 41(5):724–728
22. Enwemeka CS (1989) Inflammation cellularity and fibrolysis in regeneration tendon: Implications for tendon rehabilitation. *Phys Ther* 69(10):816–825
23. Enwemeka CS, Reddy GK (2000) The biological effects of laser therapy and other physical modalities on connective tissue repair processes. *Laser Ther* 12:22–30
24. Carrilho PM, Rezno ACM, Koeks P, Salate ACB, Parizotto NA, Vidal BC (2006) Comparative study using 685-nm and 830-nm lasers in the tissue repair of tendotomized tendons in mouse. *Photomed Laser Surg* 24(6):754–758
25. Voltarelli JC (1994) Febre e inflamação. *Medicina*, Ribeirão Preto 27: 7–48
26. Nomura K, Yamaguchi M, Abiko Y (2001) Inhibition of interleukin-1beta production and gene expression in human gingival fibroblasts by low-energy laser irradiation. *Lasers Med Sci* 16:218–223
27. Zhevago N, Samoilova K (2006) Pro-and Anti-inflammatory cytokine content in human peripheral blood after its transcutaneous (in vivo) and direct (in vitro) irradiation with polychromatic visible and infrared light. *Photomed Laser Surg* 24:129–139
28. Aimbire F, Albertini R, Pacheco MT, Castro-Faria-Neto HC, Loonardo PS, Iversen VV et al (2006) Low-Level Laser Therapy Induces Dose-Dependent Decrease of TNF- α Levels in Acute Inflammation. *Photomed Laser Surg* 24:33–37
29. Albertini R, Villaverde AB, Aimbire F, Bjørndal J, Brugneri A, Minnami J et al (2008) Cytokine mRNA expression is decreased in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation after low-level laser therapy. *Photomed Laser Surg* 26:19–24
30. Saygun I, Karacay S, Sendar M, Ural AU, Sencimen M, Kurtis B (2008) Effects of laser irradiation on the release of basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin like growth factor-1 (IGF-1), and receptor of IGF-1 (IGFBP3) from gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci* 23:211–215
31. Reisff RBM, Croci AT, Bolliger Neto R, Pereira CAM (2007) Comparative study on biomechanical properties of the central portion of frozen and fresh calcaneus tendon. *Acta Otop Bras* 15(1):6–8
32. Carlstedt CA, Madsen K, Wredmark T (1987) The influence of indomethacin on biomechanical and biochemical properties of the plantarislongus tendon in the rabbit. *Arch Orthop Trauma Surg* 106(3):157–160
33. Marmolis D (2003) Nonsteroidal anti-inflammatory drug reduces neutrophil and macrophage accumulation but does not improve tendon regeneration. *Lab Invest* 83:991–999
34. Tsai WC, Hsu CC, Chou CY, Chen J, Pang JH (2007) Effects of celecoxib on migration, proliferation and collagen expression of tendon cells. *Connect Tissue Res* 48(1):46–51
35. Coombs RRH, Klemman L, Narcisi P, Nichols A, Pope FM (1980) Collagen typing in Achilles tendon rupture. *J Bone Joint Surg Br* 62:258
36. Doral MN, Alam M, Bozkurt M, Turhan E, Atay OA, Donmez G et al (2010) Functional anatomy of the Achilles tendon. *Knee Surg Sport Traumatol/Arthrosc* 18(5):638–643

4.2 Artigo – 2

Casalechi HL, Aimbire F, Marcos RL, de Farias Marques AC, da Silva EAP, de Carvalho PdTC, Albertini R. Efeitos da Fototerapia com Light Emitting Diode em Modelo de Lesão Traumática em Tendão de Aquiles de Ratos. **Submetido a Lasers Med Sci.**

Os resultados descritos neste estudo são referentes às análises biomecânicas e histopatológicas dos grupos: controle, tendinite, diclofenaco, LED e LED delay. Estes resultados demonstram que o tratamento com LED de baixa intensidade, nos parâmetros utilizados e nos tempos estudados reduziu a migração de células inflamatórias e melhorou a qualidade do reparo tendíneo, mas não foi eficiente na manutenção da biomecânica do tendão.

Lasers in Medical Science

Effects of phototherapy with Light Emitting Diode in Traumatic Achilles Tendon Injury in Rats

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Effects of phototherapy with Light Emitting Diode in Traumatic Achilles Tendon Injury in Rats
Article Type:	Original Article
Keywords:	Light Emitting Diode (LED), Tendon Injury, Inflammatory Process.
Corresponding Author:	Regiane Albertini, PhD. São José dos Campos, BRAZIL.
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Heliodora Leão Casalechi
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Heliodora Leão Casalechi Flavio Aimbire, PhD. Rodrigo Labat Marcos, PhD. Evela Aparecida Pereira da Silva Anna Crislina de Farias Marques Paulo de Tarso Camillo de Carvalho, PhD. Regiane Albertini, PhD.
Order of Authors Secondary Information:	
Funding Information:	
Abstract:	The aim of this study was to investigate the effect of low-intensity light emitting diode (LED) infrared (845nm ±20nm) therapy in tendon inflammation; injury was induced by mechanical trauma in rat Achilles tendon. For this we used 75 young male Wistar rats, weighing ± 300 g divided into different groups; C = control (n = 5) and experimental (n = 10/group) with two different times of sacrifice; D = treated with diclofenac and T = untreated injured, treated with LED and group LED delay. The tendon inflammation was induced by controlled contusion in the medial region of the Achilles tendon of the animals. The treated groups received some kind of intervention every 48 hours, all groups were sacrificed on the 7th or 14th day after the trauma. The tendons were dissected, extracted and sent for analysis. Histological analysis of the LED groups showed a decrease in the number of inflammatory cells in relation to T groups in both periods studied. The comparative results between the number of inflammatory cells in the control and treated groups at 7 and 14 days showed statistically significant differences. Qualitative analysis findings obtained by picrosirius red technique under polarized light showed that in 7 days the T group presented collagen types I and III in the same proportion; group D presented a predominance of type III fibers, while in group LED type I collagen predominated. The 14-day group D showed collagen type I and III in the same proportion, while in groups LED and LED delay there was a predominance of type I fibers. Biomechanical analysis showed that 7- day groups LED and D showed lower rates of breaking strength. The 14-day group D showed a decrease of maximum traction strength and degree of rigidity, groups LED and LED delay showed lower strength during the rupture. It was concluded that treatment with

LED in the parameters used and the times studied reduces migration of inflammatory cells and improves the quality of repair, but is not effective in maintaining the biomechanics of tendon.

**Effects of phototherapy with Light Emitting Diode in Traumatic
Achilles Tendon Injury in Rats**

Heliadora Leão Casalechi¹, Flavio Aimbire², Rodrigo Labat Marcos¹, Evela Aparecida
Pereira da Silva¹, Anna Cristina de Farias Marques¹, Paulo de Tarso Camillo de
Carvalho¹, Regiane Albertini²

1 – Post Graduate Program in Rehabilitation Sciences, Nove de Julho University
(Uninove), São Paulo - SP, Brazil.

2 – Institute of Science and Technology - ICT, Federal University of São Paulo
(Unifesp), São José dos Campos - SP, Brazil.

Author for correspondence:

Regiane Albertini, Prof. Ph.D.

Universidade Federal de São Paulo - Unifesp

Rua Talim, 330, Postal Code: 12231-280

São José dos Campos – SP, Brazil

Fone: +55 12 3309-9500

E-mail: regiane.albertini@unifesp.br

Abstract

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

The aim of this study was to investigate the effect of low-intensity light emitting diode (LED) infrared (945nm \pm 20nm) therapy in tendon inflammation; injury was induced by mechanical trauma in rat Achilles tendon. For this we used 75 young male Wistar rats, weighing \pm 300 g divided into different groups; C = control (n = 5) and experimental (n = 10/group) with two different times of sacrifice; D = treated with diclofenac and T = untreated injured, treated with LED and group LED delay. The tendon inflammation was induced by controlled contusion in the medial region of the Achilles tendon of the animals. The treated groups received some kind of intervention every 48 hours, all groups were sacrificed on the 7th or 14th day after the trauma. The tendons were dissected, extracted and sent for analysis. Histological analysis of the LED groups showed a decrease in the number of inflammatory cells in relation to T groups in both periods studied. The comparative results between the number of inflammatory cells in the control and treated groups at 7 and 14 days showed statistically significant differences. Qualitative analysis findings obtained by picrosirius red technique under polarized light showed that in 7 days the T group presented collagen types I and III in the same proportion; group D presented a predominance of type III fibers, while in group LED type I collagen predominated. The 14-day group D showed collagen type I and III in the same proportion, while in groups LED and LED delay there was a predominance of type I fibers. Biomechanical analysis showed that 7- day groups LED and D showed lower rates of breaking strength. The 14-day group D showed a decrease of maximum traction strength and degree of rigidity, groups LED and LED delay showed lower strength during the rupture. It was concluded that treatment with LED in the parameters used and the times studied reduces migration of inflammatory cells and improves the quality of repair, but is not effective in maintaining the biomechanics of tendon.

Keywords: Light Emitting Diode (LED), Tendon Injury, Inflammatory Process.

INTRODUCTION

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Primary tendon injuries are common disorders of the musculoskeletal system, with different pathological manifestations and represent a great part of orthopedic surgery and rheumatologic recommendation [1,2]. The term tendinitis has been used to describe chronic tendon pain, and covers inflammation and central pathological process [3]. Due to its etiology it is one of the many disorders that keep workers away from their duties. It is now treated as an occupational and public health problem, yet its pathogenesis remains poorly understood [2,4].

Micro-traumas caused by excessive and repetitive physical exertion can lead to spontaneous tendon rupture. The most common cause for this type of injury is tendon stress, aggravated by stretching the tissue beyond its capacity, breaking its fibers, causing a hemorrhagic inflammatory process [5,6]. The complete healing process of the tendon injury can take up to months. The initial repair phase takes around 7 to 10 days to consolidate, but the complete rehabilitation requires weeks or months [7,8].

In cases of tendon injury it is important to prevent the damage caused by the inflammatory response. This minimizes the effects on the injured tendon and starts the healing process which enables the functional recovery of the tendons [9]. Due to the high frequency of this type of injury, studies are needed in order to improve tendon repair and reduce recovery time and return to daily activities [10].

Among the different types of processing to optimize the tendon repair process are medication, mobilization techniques, therapeutic exercise and electrotherapeutic resources such as ultrasound and phototherapy [11]. Although anti-inflammatory drugs are commonly used in the treatment of tendinopathy, their long-term effects do not seem to be completely satisfactory when compared to the amount of harm to the patients [12, 13]. Low intensity Light Emitting Diode (LED) phototherapy is a low cost

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

alternative to the use of laser since studies employing LED therapy suggest that both sources have similar effects [14,15]. In relation to the tendon repair process, the effectiveness of LED therapy was evidenced by studies demonstrating improved quality of remodeling and decreased inflammation [16,17,18,19].

The advantage of the low-intensity LED compared to conventional drug therapy is that it has no unwanted side effects, however, it is important to point out that little is known about the LEDs mechanism. This study tests the hypothesis that phototherapy with infrared LED assists in the tendon repair process. Therefore, the aim of the study was to investigate the effect of phototherapy with infrared (945 nm) LED on tendon inflammation induced by mechanical trauma in Achilles rat tendon.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Seventy five albino, male, young, Wistar rats; \pm weighing 300g were used. The animals were kept in standard cages in random groups of five. They were kept in a room with constant humidity and temperature (24°C/60%), light and dark cycles of 12 per 12 hours, with water and food *ad libitum*.

All experiments were in accordance with the Ethics and Animal Research of the University Nine July guidelines, under approval of the protocol number An 0032/2012.

Induced Tendinites by mechanical trauma

All animals were subjected to anesthesia, the drug was administered intraperitoneally in the combination: ketamine (hydrochloride) 10%-10ml (Syntec) using a dose of 0.1 ml per 100g body weight and xylazine (hydrochloride) 2%-10ml (Syntec), a dose of 0.1 ml per 100g for each animal. Then we performed the trauma, in

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

which the animals, except for group C were placed prone in equipment for controlled induction of trauma (guillotine) of the medial calcaneal tendon of the left paw in all animals.

Experimental groups

The animals were randomly divided into 8 groups: those who had not suffered mechanical trauma (n=5) and did not undergo any treatment were named Control (C). The groups of animals that underwent mechanical trauma (n=10/group) were named according to the type of treatment and time of sacrifice. Those treated with LED were named LED7, LED14 and LED delay. Diclofenac Sodium treatment, D7 and D14. The ones that had induced tendinitis and did not undergo any treatment were T7 and T14.

Treatment with Diclofenac sodium

Doses of 0.8 ml of the dilution 3ml Diclofenac Sodium 75mg to 297ml of distilled water were applied intraperitoneally.

Treatment was initiated 12 hours after injury and continued every 24 hours for seven days.

Treatment with Low Intensity Light Emitting Diode (LED)

A LED device (prototype) of low intensity, operating at a wavelength of 945nm (± 20 nm) 50mW power was used.

The LED was applied by contact with the left Achilles tendon during 120 seconds, yielding a final 6J by punctual application. For the LED application the animals were manually restrained and were irradiated at a 90° angle in relation to the

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

tissue surface. Before the beginning of the experiments, the LED equipment was calibrated with a power meter (Model 13 PEM 001/J, MellersGriot, Netherlands).

The treatment started 12 hours after the lesion and continued for every 48 hours until sacrifice (7 and 14 days). In group LED delay the treatment started from 7th day until the 14th after the lesion and continued for every 48 hours.

Euthanasia

Euthanasia of animals occurred in a CO₂ chamber, following the times of 7 and 14 days after injury. The left tendons of all groups were dissected and extracted from the insertion to the calcaneal myotendinous junction. Half of them (5/group) were used in histology and the rest in mechanical traction assay.

Analysis of Inflammatory Cells

Five randomly selected sections were stained with HE for each animal, corresponding to the median of the Achilles tendons. The results were obtained by counting the inflammatory cells present in five microscopic areas of tendon repair. These analysis criteria were used for all groups.

Histomorphometric analysis was performed with an optical microscope. To get the total number of inflammatory cells in the observation fields, program ImageJ[®] in its function "cell counter" was used.

Qualitative Analysis of collagen types I and III

Five histological sections from each animal were stained with Picrosirius Red. The material was examined under optical microscopy, with 40x, using polarized light source. In this method thicker fibers are shown stained in red orange, representing

collagen type I. While the thinner and more dispersed fibers were greenish representing the type III collagen [20].

Biomechanical Analysis

The tendon was used immediately after removal. For the test a sequence of loading and unloading forces was applied to each tendon (strain = 1% of its length) and this sequence was repeated until disruption [21]. Tendon length, width and height were recorded before the mechanical test and these values were used to standardize results. The tendons were attached to the universal assay machine (EMIC tensiometer, model DL 200 MF). The musculotendinous junction was fixed at the bottom and osteotendinous at the top of the tensiometer's handle. The maximum force was recorded at the time of rupture and compared among groups [22]. The results were expressed by means of graphs represent the mechanical traction assay of the tendons of different groups until breaking point.

Statistical Analysis

Statistical analysis of treated and untreated groups was made. The analysis was conducted within and among groups, the values were tabulated and tested using ANOVA with Tukey post-test for analysis of variance, and statistical significance level of 5% ($p < 0.05$).

The program used to perform statistical tests was GraphPadInStat ® version 3.0. For the graphs, the mean and standard deviation of the number of inflammatory cells was used through the GraphPadPrism® version 3.0 program.

RESULTS

Effect of mechanical trauma, diclofenac sodium and LED on the amount of inflammatory cells in tendon tissue.

Our results demonstrate a significant increase in the number of inflammatory cells in tendon tissue 7 and 14 days after inducing the injury, when compared to the group of animals not subjected to the tendon trauma (control group). The count of inflammatory cells in the group submitted to tendon lesion was 105.16 ± 17.70 inflammatory cells on the 7th day after induction of the tendon lesions when compared with control cell infiltrate group was 2.33 ± 1.21 ($p < 0.05$) inflammatory cells in the same period. This was also observed 14 days after inducing injury. Inflammatory infiltrate of the tendon of animals not treated with LED or diclofenac sodium showed a significant increase of 105.16 ± 17.80 cells when compared to the group that was not submitted to mechanical tendon injury (control group) which was 2.33 ± 1.21 ($p < 0.05$), inflammatory cells.

Since the last century, several authors have shown in clinical practice that the classical pharmacological treatment for the symptoms of acute or chronic inflammation is effective in reducing pain and edema [23]. Our results support these findings, as the animals treated with diclofenac sodium for 7 days after the induced mechanical trauma presented a marked reduction in the number of inflammatory cells in tendon tissue to 52.5 ± 13.0 ($p < 0.05$) inflammatory cells when compared with the group of lesioned animals not treated with diclofenac, which showed a value of 105.16 ± 17.70 inflammatory cells. When lesioned animals were treated with diclofenac sodium for 14 days after induction of injury, the tendon inflammatory infiltrate was significantly reduced to 54.66 ± 2.73 ($p < 0.05$) inflammatory cells when compared to the untreated group subjected only to mechanical trauma which presented 105.16 ± 17.80

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

inflammatory cells. Although less significant than the diclofenac, the non invasive and beneficial treatment with LED for relief of acute and chronic inflammation symptoms is also well described by many authors [16,17,18]. Our results show the beneficial effects of LED on a tendon injury induced by mechanical trauma model. In fact, animals treated for 7 days with LED (LED7) after induced lesion showed a significant reduction of the tendon inflammatory infiltrate with a value of 54.2 ± 8.9 ($p < 0.05$) when compared to inflammatory cells of untreated injured animals (group T7) that showed 105.16 ± 17.70 inflammatory cells in the tendon tissue. The same effect induced by the LED, of reducing the number of inflammatory cells in tendon tissue 7 days after injury induction, was also observed when the animals were treated with LED for 14 days after injury induction. Under these conditions, the LED brought the cellular infiltrate number to the value of 73.0 ± 10.2 inflammatory cells in the injured tendon animals compared with the value of 105.16 ± 17.80 inflammatory cells in injured animals not treated with the LED. Among the phases of inflammation, the late phase is important because it is responsible for the activation of the cellular machinery of tissue repair. Accordingly, our results show that even later, between 7 and 14 days after induction of injury, the treatment with LED (LEDD) was effective in reducing the number of inflammatory cells in tendon tissue to the value of 72.0 ± 19.30 inflammatory cells after mechanical trauma when compared with untreated lesioned animals, presenting an inflammatory infiltrate with the value of 105.16 ± 17.80 cells. A comparison of the number of inflammatory cells between the groups is represented graphically in Figure 1 showing a statistically significant difference between the treated and control groups.

[FIGURE 1]

Effect of mechanical trauma, diclofenac sodium and LED on the types of collagen fibers the tendon tissue.

The results presented in Figure 2 show that the control group of animals has a predominance of red fibers, which are considered type I collagen fibers, with higher rigidity. This corresponds to the state of not injured tendon since the type I collagen is the most abundant in bones and tendons. In addition, within 7 days after tendon injury, we demonstrated the presence of collagen fibers types I and III (green fiber) in the same proportion. Similarly, animals treated with diclofenac sodium for 7 days after the induced tendon injury showed predominance of green fibers, which represent the type III collagen. In contrast, animals treated with LED 7 days after injury induction generated a predominance of red fibers, or collagen type I. Fourteen days after injury induction it was possible to observe the presence of red fibers, type I, and green fibers, type III, in the same proportion. The group of animals that underwent tendon injury and was treated with diclofenac sodium also showed the same ratio of collagen I and III. However, when animals with tendon injury were treated with LED 14 days after induction of the injury an intense presence of type I collagen fibers, and low proportion of type III collagen fibers was observed. Likewise, the injured animals treated with LEDD, between 7 and 14 days after the induction of tendon trauma, also showed a predominance of red fibers which represent collagen type I.

[FIGURE 2]

Effect of mechanical trauma, diclofenac sodium and LED on the stiffness and maximum breaking strength of the collagen fibers of the tissue.

Figure 3 illustrates that in accordance with the tensile test performed 7 days after the induction of tendon injury changes in the angle and tensile strength of the

1 tendon tissue can be observed. Indeed, our results show that seven days after the tendon
2 trauma, the animals presented changes both in the angle that determines the rigidity of
3 the material and at full strength in the early stages of the break. Interestingly, these two
4 numbers were lower in groups of animals treated with diclofenac or LED.
5
6
7
8

9 [FIGURE 3]
10

11 After 14 days of tendon damage, the untreated group showed a slight reduction
12 of the maximum force at the time of rupture, but an increased angle to the axis of
13 abscissa when compared with the control group. The animals treated with diclofenac
14 sodium for 14 days after reduction of tendon trauma maintained the maximum breaking
15 force and angle determined rigidity. The lesioned groups treated with LED or LEDD
16 also showed a lower strength at rupture, represented graphically in Figure 4.
17
18
19
20
21
22
23
24
25

26 [FIGURE 4]
27

28 DISCUSSION

29 Several authors have shown that the application of phototherapy with the use of
30 light sources, coherent or not, is able to induce beneficial anti-inflammatory effects such
31 as reducing edema and pain and chronic inflammatory processes involving the skeletal
32 musculature and tendons [24-28].
33
34
35
36
37
38
39
40

41 In this study, we demonstrated that phototherapy with low intensity LED assists
42 in tendon repair process reducing classic signs of inflammation. Cell migration to the
43 tendon as well as the structural changes in the type of collagen induced by tendon injury
44 suffered interference of phototherapy with LED 945 nm and fluency 6J. These results
45 corroborate previous studies that demonstrated that the LED irradiation contributes to
46 the improvement of repair process of the tissue tendon [15-19]. Another point worth
47 mentioning is the change of the mechanical forces involved in the ability of the tendons
48 to transmit tensile load. Our results show that the induced tendinitis reduced breaking
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 strength and the rigidity of the tendon tissue. Studies by Casalechi and collaborators
2 (2014) showed that low power laser was able to restore rigidity and tensile strength of
3 the tendons of animals undergoing tendon inflammation. However, our findings indicate
4 that treatment with LED showed no beneficial effects on tensile loading of the tendon
5 after the injury induction. This does not mean that the LED is not able to modulate
6 tendon traction response. Probably the dosimetry chosen for the control of inflammation
7 is not adequate to mitigate the changes in the tensile capacity of the tissue. Light
8 dosimetry when the therapy is noninvasive often lacks standardization of doses that are
9 really effective and can be reproduced. In fact, while the light undergoes all the effects
10 of interaction in the tissue to be absorbed, there is a technical difficulty in measuring
11 exactly how much light actually interacts with proteins and signaling molecules of the
12 beneficial effect of phototherapy. Although our results are unprecedented as to the
13 effect of LED on biomechanical parameters, the lack of knowledge about cell signaling
14 responsible for the effect of phototherapy on the tensile capacity of the tendon still does
15 not allow us to explain some peculiarities of phototherapy treatment. The rationale for
16 selecting the wavelength used in this study was based on studies by some authors who
17 have shown that the LED, with wavelengths in the red and infrared enable decreased
18 inflammation and increased proliferation of fibroblasts; in addition collagen synthesis in
19 fibroblast culture and animal models with tendinitis induction by collagenase or tendon
20 rupture [17,24,25]. The development of these changes in the course of the inflammatory
21 process is of fundamental importance to the beginning of the tissue repair process.
22 Despite the LED anti-inflammatory effects in the inflammatory response of skeletal
23 muscle, there are few studies that focus on the beneficial effects of phototherapy
24 parameters chosen in this study. Thus, experimental studies aimed at understanding the
25 effect of LED (945 nm and 6 J) on the mechanism of inflammation and the development
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

of tissue repair are deemed important. Therefore we decided to investigate the effect of the LED at a wavelength of 945 nm and fluency J. 6

In this paper we investigate the LED action in two different periods after tendinous injury. Thus, we evaluated the anti-inflammatory effect of the LED in the acute phase and in the chronic phase (tissue repair) of induced tendinitis. Taking into account the presence of inflammatory cells in the first days after injury induction, [29], phototherapy in acute tendon injury procedure was performed for 7 days. The treatment in the chronic phase was carried out in the group in which the tendon injury was assessed 14 days after induction. This study also included a "delay" group in which the initiation of treatment occurred 7 days after induction of injury, extending to 14 days.

With respect to cell migration induced by triggered tendinitis, our results show that the chosen experimental model in this study is consistent with the view that mimics the characteristic signs of tendon inflammation in adults. Indeed our results show a significant increase in the number of inflammatory cells in tendon tissue of animals that underwent the lesion procedure. Experimental studies of diseases that affect the skeletal muscular system and tendons have observed a larger population of neutrophils when compared to other cell populations also involved in the tendon inflammatory response [30]. For this reason, the tendon injury has been characterized as a neutrophilic inflammation. Once they reach the site of inflammation, these neutrophils activated by chemotactic proteins produced at the tendon damage site, are able to secrete large amounts of metalloproteinases that affect directly the proteins that make up the structure of tendons [31]. Furthermore, neutrophils secrete chemokines which attract more neutrophils significantly increasing the neutrophil inflammatory infiltrate and, consequently, the severity of the lesion [32].

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

With respect to cell migration triggered by induced tendinitis, our results show that the chosen experimental model in this study is consistent with the view that mimics the characteristic signs of tendon inflammation in adults. Indeed our results show a significant increase in the number of inflammatory cells in tendon tissue of animals underwent lesion. Experimental studies of diseases that affect the skeletal muscular system and tendons have observed a larger population of neutrophils when compared to other cell populations also involved in the inflammatory response tendon [30]. Once they reach the site of inflammation, these neutrophils activated by chemotactic proteins produced at the site of tendon damage, are able to secrete large amounts of metalloproteinases that act and affect directly the proteins that make up the structure of tendons [31]. Furthermore, neutrophils secrete chemokines which attract more neutrophils, significantly increasing the neutrophil inflammatory infiltrate, and consequently, the severity of the lesion [32].

It is noteworthy that the population variance of inflammatory cells that migrate into the injured tendon is time sensitive. Accordingly, our results show that despite the presence of neutrophils in both periods (chronic and acute) after induction of tendinitis, some authors have demonstrated that the number of macrophages increased significantly when compared to the acute phase of the tendon inflammatory response [22]. The effect of metalloproteinases secreted by neutrophils associated with the participation of macrophages in the late phase of the inflammatory response puts these cell populations in close connection with the tissue repair process, mainly due to the fact that from the phagocytic activity of macrophages starts activation and transformation of fibroblasts in the lesion site for tissue repair.

The severity of the injury directly influences tissue repair as a more extensive injury will require increased availability of fibroblasts. These activated fibroblasts,

1 primarily by growth and differentiation factors, give rise to a large amount of collagen
2 fibers of different types and functions [33]. In many cases an extensive fibrosis area
3 may develop in the tendon tissue impairing joint mobility.
4
5

6
7 Thus, studies investigating the anti-inflammatory effect of therapies that are both
8 non-invasive therapies and have no side effects are of paramount importance for
9 treatment of chronic diseases that most often follow the patient throughout life. The
10 LED is promising and meets these prerequisites. Phototherapy with polarized light
11 created from the LED has been quite effective in treating musculoskeletal disorders, in
12 experimental models and in clinical medicine. Accordingly, studies trying to
13 characterize a particular LED dose capable of controlling the exacerbation of the
14 inflammatory response and reduce the tendon pull capacity are considered important.
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

26 Tissue repair is an important part of the outcome of the inflammatory process for
27 the healing of the injured tissue [22]. The degree of mobility impairment of an injured
28 organ is determined by several factors, from the activation of fibroblasts and
29 chondrocytes to the deposition and alignment of collagen fibers that replace the
30 damaged tissue. Whereas the mechanical trauma affects the organ's mobility, tissue
31 repair is one of the most important factors in the joints and tendons inserted in skeletal
32 muscle. Our results show that the LED has an anti-inflammatory effect on cell
33 migration to the site of tendon injury. This demonstrates the effect of LED in reducing
34 inflammatory cells at the beginning of tendon repair process. These results are
35 consistent with the results found by Casalechi et al., 2009 and Xavier et al., 2010
36 [17,18]. In the chronic phase, the period from the 7th to the 14th day after the injury, the
37 treatment with LED was also able to reduce the number of inflammatory cells in tendon
38 tissue. Thus, low intensity LED therapy presented better photobiomodulators effects at
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

the initial stage, but included a reduction in the number of inflammatory cells in both periods.

Since the primary function of tendons is to transmit tensile loading, experimental studies of the biomechanical properties of these tissues are important. They are usually performed by tensile tests, which aim produce force versus deflection graphs, in which mechanical properties are determined [34]. As for the tissue repair process, according to the tensile test it has become clear that in a first moment, 7 days, the tendonitis group showed a slight decrease in stiffness and in the second moment, 14 days, the same group showed an increase in rigidity which can be related to a particular process of fibrosis due to the inducing of inflammation. In this case, a more rigid tissue with a lower strength can present an easier rupture process.

The groups treated with LED presented a reduction of the maximum breaking strength, indicating little efficiency of this light source in the maintenance of the mechanical properties of the tendon. Unlike the low-intensity laser therapy. A similar study the laser-treated groups showed an increase of this same strength in the tendon rupture [22]. This leads us to assume that the LED is interfering at some point in the maturation of collagen or even increasing its degradation by enzymes stimulus such as MMPs. This fact could be related to the wavelength used in this study (945), since previous studies have found that LED therapy emitting in the red region has an inhibitory effect over MMP-1 and MMP-2, besides enhancing the collagen synthesis [35,36].

Worsening of these mechanical properties shows that LED therapy did not help in their protection and maintenance, the same is true for the group treated with anti-inflammatory, which also had lower results. This may be related to structural changes in the tissue, since studies have shown that anti-inflammatory drugs in rat tendon injury

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

reduce edema and inflammatory cell accumulation, modification in the expression, maturation and organization of collagen, without showing effect on the compliance and tensile strength of the tendon [37,38].

The strength and elasticity results corroborate the findings obtained by Picrosiriusred technique with viewing under polarized light, relative to the type of collagen. The groups treated with LED in both experimental periods (7 or 14 days after inducing the tendon injury) showed a predominance of red fibers, representing collagen type I, which is characterized by greater rigidity. Some authors found increased type I collagen gene expression after LED use [39]. In normal tendons, which did not suffer injury, type I collagen is up to 90% of its fibers [40]. Other studies also show the LED effects in the increase of both collagen type I and type III production [19,24]. Authors point out that Achilles tendons that have suffered spontaneous rupture have high amounts of type III collagen in the remodeling phase [41,42], diverging from the findings observed in the group of this study.

Studies show positive effects in relation to quality of tissue repair during the tendon healing process with improved organization and alignment of collagen fibers [16,17]. Corroborating the findings in this study, it is possible to observe the adequacy of alignment of the fiber alignment.

Thus, we suggest that the LED 945nm was effective in reducing the number of inflammatory cells, but did not prevent functional limitations in the models of traumatic injury

CONCLUSION

We concluded that treatment with low intensity LED in the studied parameters and times reduces migration of inflammatory cells. It also improves the quality of the tendon tissue repair, but is not effective in maintaining the biomechanics of tendon.

REFERENCES

1. Rees JD, Wilson AM, Wolman RL. Current concepts in the management of tendon disorders. *Rheumatology (Oxford)*. 2006; 45:508–521.
2. Alfredson H, Lorentzon R. Chronic Achilles tendinosis. Recommendations for treatment and prevention. *Sports Med.*, 2000; 29(2): 135-146.
3. Chiodo CP, Wilson MG. Current concepts review: acute ruptures of the Achilles tendon. *Foot Ankle Int.* 2006; 27:305–313
4. Scott A, Cook JL, Hart DA, Walker DC, Duronio V, Khan KM. Tenocyte responses to mechanical loading in vivo: a role for local insulin-like growth factor 1 signaling in early tendinosis in rats. *Arthritis Rheum.* 2007; 56:871–881.
5. Salate ACB. Síndromes por *overuse* em Tendão de Calcâneo. *Fisioter. Bras.*, 2002; 3(6): 351-355.
6. Stergioulas A, Stergioula M, Aarskog R., Lopes-Martins RAB, Bjordal JM. Effects of low-level laser therapy and eccentric exercises in the treatment of recreational athletes with chronic Achilles tendinopathy. *J Sports Med.* 2008; 36:881.
7. Enwemeka CS, Reddy K. The biological effects of laser therapy and other modalities on connective tissue repair process. *Laser Therapy.* 2000; 12:22-30.
8. Soma CA, Mandelbaum BR. Repair of acute Achilles tendon ruptures. *Orthop Clin North Am.* 1995; 26:239-47.
9. Machado MVM, Vulcano LC, Hussni CA, Alves LG. Efeito da laserterapia em tendinite experimental no tendão flexor digital superficial em eqüinos: Estudo histológico e ultrasonográfico. *Arch. Vet. Sci.*, 2000; 5: 111-115.
10. Arruda ERB, Rodrigues NC, Taciro C, Parizotto N. Influência de diferentes comprimentos de onda da laserterapia de baixa intensidade na regeneração tendínea do rato após tenotomia. *Rev. Bras. Fisioter.*, 2007; 11(4):283-288.
11. Bjordal JM, Lopes-Martins RAB, Iversen VV. A randomised, placebo controlled trial of low level laser therapy for activated Achilles tendinitis with microdialysis measurement of peritendinous prostaglandin E2 concentrations. *J. Sports Med.*, 2006; 40: 76-80.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
12. Buchbinder RS, Green S, Youd JM. Corticosteroid injections for shoulder pain (Cochrane Review). *Cochrane Database Syst Rev.* 2003; (1):CD004016.
13. Bjordal JM, Ljunggren AE, Klovning A, Slordal L. Non-steroidal anti-inflammatory drugs, including coxibs, in osteoarthritic knee pain. A meta-analysis of randomised placebo-controlled trials. *Br Med J.*, 2004; 329:13-17.
14. Lim W, Lee S, Kim I, Chung M, Kim M, Lim H, et al. The anti-inflammatory mechanism of 635 nm Light – Emitting – Diode irradiation compared with existing COX inhibitors. *Lasers surg Med.* 2007; 39:614-621.
15. Dall Agnol MA, Nicolau RA, Lima CJ, Munin E. Comparative analysis of coherent light action (laser) versus non-coherent light (light-emitting diode) for tissue repair in diabetic rats. *Lasers Med Sci.* 2009; 24:909-916.
16. Bastos JLN, Lizarelli RFZ, Parizotto NA. Comparative study of laser and LED Systems of Low Intensity Applied to Tendon Healing. *Laser Phys.* 2009; 19(9): 1925-931.
17. Casalechi HL, Nicolau RA, Casalechi VL, Silveira L Jr., Paula AMB, Pacheco MTT. The effects of low level light emitting diode on the repair process of Achilles tendon therapy in rats. *Lasers Med. Sci.* 2009; 24:659-665.
18. Xavier M, David DR, de Souza RA, Arrieiro AN, Miranda H, Santana ET, Silva JA Jr., Salgado MA, Aimbire F, Albertini R. Anti-inflammatory effects of low-level light emitting diode therapy on Achilles tendinitis in rats. *Lasers Surg Med.* 2010; 42(6): 553-8.
19. Xavier M, de Souza RA, Pires VA, Santos AP, Aimbire F, Silva JA Jr., Albertini R, Villaverde AB. Low-level light-emitting diode therapy increases mRNA expressions of IL-10 and type I and III collagens on Achilles tendinitis in rats. *Lasers Med Sci.* 2014; 29:85-90.
20. Denadai AS, de Carvalho PT, dos Reis FA, Belchior AC, Pereira DM, Dourado DM, Silva IS, de Oliveira LV. Morphometric and histological analysis of low-power laser influence on bone morphogenetic protein in bone defects repair. *Lasers Med Sci.* 2009; 24(5): 689-695.
21. Marcos RL, Leal-Junior EC, Arnold G, Magnenet V, Rahouadj R, Wang X, Demeurie F, Magdalou J, de Carvalho MH, Lopes-Martins RA (2012) Low-level laser therapy in collagenase-induced Achilles tendinitis in rats: analyses of biochemical and biomechanical aspects. *J Orthop Res* 30(12):1945–1951.
22. Casalechi HL, de Farias Marques AC, da Silva EA, Aimbire F, Marcos RL, Lopes-Martins RA, de Carvalho Pde T, Albertini R. Analysis of the effect of phototherapy in model with traumatic Achilles tendon injury in rats. *Lasers Med Sci.* 2014; 29(3):1075-81.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
23. Andres BM, Murrell GA. Treatment of tendinopathy: what works, what does not, and what is on the horizon. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2008; 466(7): 1539-1554.
24. Moura Júnior, Mde; Arisawa, EA; Martin, AA; de Carvalho, JP; da Silva JM; Silva, JF; Silveira L Jr. Effects of low-power LED and therapeutic ultrasound in the tissue healing and inflammation in a tendinitis experimental model in rats. *Lasers Med Sci.* 2014; 29(1):301-11.
25. Vinck EM, Cagnie BJ, 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):95-99.
26. Albertini R, Villaverde AB, Aimbire F, Salgado MAC, Bjordal JM, Alves LP, Munin E, Costa MS. Anti-inflammatory effects of low-level laser therapy (LLLT) with two different red wavelengths (660nm and 684 nm). *J Photochem Photobiol B* 2007; 89:50-55.
27. Nissan J, Assif D, Gross MD, Yaffe A, Inderman I. Effect of low intensity laser irradiation on surgically created bony defects in rats. *Journal of Oral Rehabilitation*, 2006; 33(8): 619-924.
28. Albertini R, Aimbire F, Villaverde AB, Silva JRJA, Costa MS. COX-2 mRNA expression decreases in the subplantar muscle of paw subjected to carrageenan-induced inflammation after low level laser therapy. *Inflamm Res* 2007; 56:1-2.
29. Enwemeka, CS. Inflammation cellularity and fibrillogenesis in regeneration tendon: Implications for tendon rehabilitation. *Physical therapy.* 1989; 69(10): 816-25.
30. Marsolais D, Côté CH, Frenette J. Neutrophils and macrophages accumulate sequentially following Achilles tendon injury. *J Orthop Res.* 2001; 19(6): 1203-9.
31. Faith M, Sukumaran A, Pulimood B, Jacob M. How reliable an indicator of inflammation is myeloperoxidase activity? *Clin. Chim. Acta.* 2008; 396(1-2): 23-25, 2008.
32. Queiroz-Junior CM, Pacheco CMF, Maltos KLM, Caliari MV, Duarte IDG, Francischi JN. Role of systemic and local administration of selective inhibitors of cyclooxygenase 1 and 2 in an experimental model of periodontal disease in rats. *J. Periodontal Res.* 2009; 44(2): 153-160.
33. Wong JKF, Metcalfe AD, Wong R, Bush J, Platt C, Garcon A, Goldspink N, McGrouther DA, Ferguson MWJ. Reduction of Tendon Adhesions following Administration of Adaprev, a Hypertonic Solution of Mannose-6-Phosphate: Mechanism of Action Studies. *PLoS One.* 2014; 9(11): e112672.
34. Reiff RBM, Croci AT, Bolliger Neto R, Pereira CAM. Comparative study on biomechanical properties of the central portion of frozen and fresh calcaneus tendon. *Acta Ortop Bras.* 2007; 15(1):6-8.

- 1 35. Weiss RA, Mcdaniel DH, Geronemus RG, Weiss MA, Beasley KL, Munavalli GM,
2 Bellew SG. Clinical Experience with Light-Emitting Diode (LED) Photomodulation.
3 *Dermatol Surg.* 2005; 31(9):1-7.
4
- 5 36. Kim HS, Park WS, Baek JI, Lee BS, Yoo DS, Park SJ. Continuous irradiation with
6 a 633-nm light-emitting diode exerts an anti-aging effect on human skin cells. *Int J Mol*
7 *Med.* 2015; 35(2):383-90.
8
- 9 37. Carlstedt CA, Madsen K, Wredmark T. The influence of indomethacin on
10 biomechanical and biochemical properties of the plantaris longus tendon in the rabbit.
11 *Arch Orthop Trauma Surg.* 1987; 106(3):157-60.
12
- 13 38. Marsolais D. Nonsteroidal anti-inflammatory drug reduces neutrophil and macrophage
14 accumulation but does not improve tendon regeneration. *Lab Invest.* 2003; 83:991-9.
15
- 16 39. Tian YS, Kim NH, Lee AY. Antiphotaging effects of light-
17 emitting diode irradiation on narrow-band ultraviolet B-exposed cultured human skin
18 cells. *Dermatol Surg.* 2012; 38(10):1695-703.
19
- 20 40. Tsai WC, Hsu CC, Chou CY, Chen J, Pang JH. Effects of celecoxib on migration,
21 proliferation and collagen expression of tendon cells. *Connect Tissue Res.* 2007;
22 48(1):46-51.
23
- 24 41. Coombs RRH, Klenerman L, Narcisi P, Nichols A, Pope FM. Collagen typing in
25 Achilles tendon rupture. *J. Bone Joint Surg Br.* 1980; 62:258.
26
- 27 42. Doral MN, Alam M, Bozkurt M, Turhan E, Atay OA, Donmez G, et al. Functional
28 anatomy of the Achilles tendon. *Knee Surg Sport Traumatol Arthrosc.* 2010;
29 18(5):638-43.
30
- 31
- 32
- 33
- 34
- 35
- 36
- 37
- 38
- 39
- 40
- 41
- 42
- 43
- 44
- 45
- 46
- 47
- 48
- 49
- 50
- 51
- 52
- 53
- 54
- 55
- 56
- 57
- 58
- 59
- 60
- 61
- 62
- 63
- 64
- 65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

LEGENDS

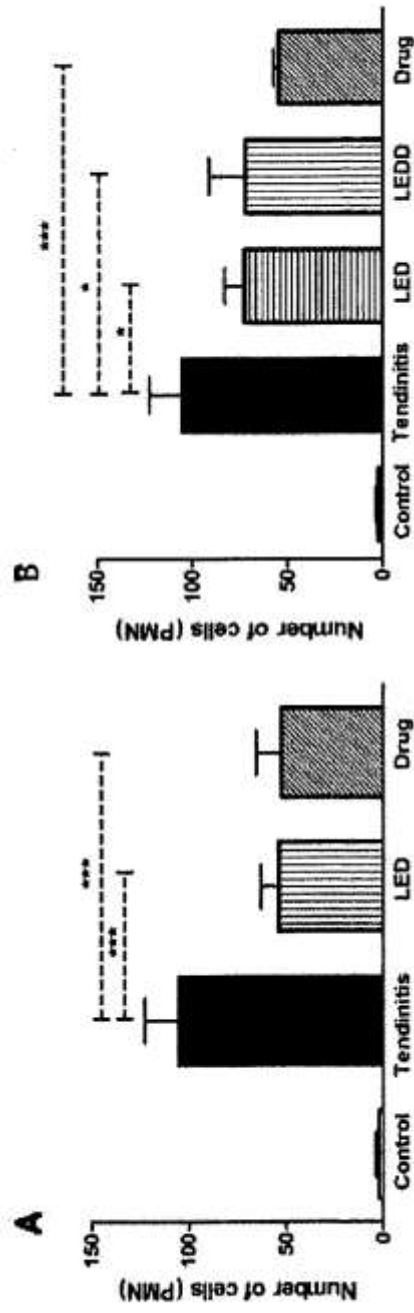
Figure 1. (A) Chart comparing the number of inflammatory cells on day 7 among the treated and control groups. *** Highly significant ($p < 0.001$). (B) Graph comparing the number of inflammatory cells at day 14 between the treated and control groups. *** Highly significant ($p < 0.001$), * significant ($p < 0.05$).

Figure 2. Photomicrographs of histological tendons sections of treated and control animals at different times of euthanasia. (Picosirius Red, original magnification x 40).

Figure 3. Graphic resistance and elasticity at 7 days. *** Highly significant ($p < 0.001$).

Figure 4. Graph resistance and elasticity at 14 days. *** Highly significant ($p < 0.001$), ** significant ($p < 0.01$).

Figure 1
Click here to download Figure: Fig. 1.tif



[Click here to download Figure: Fig. 2.tif](#)

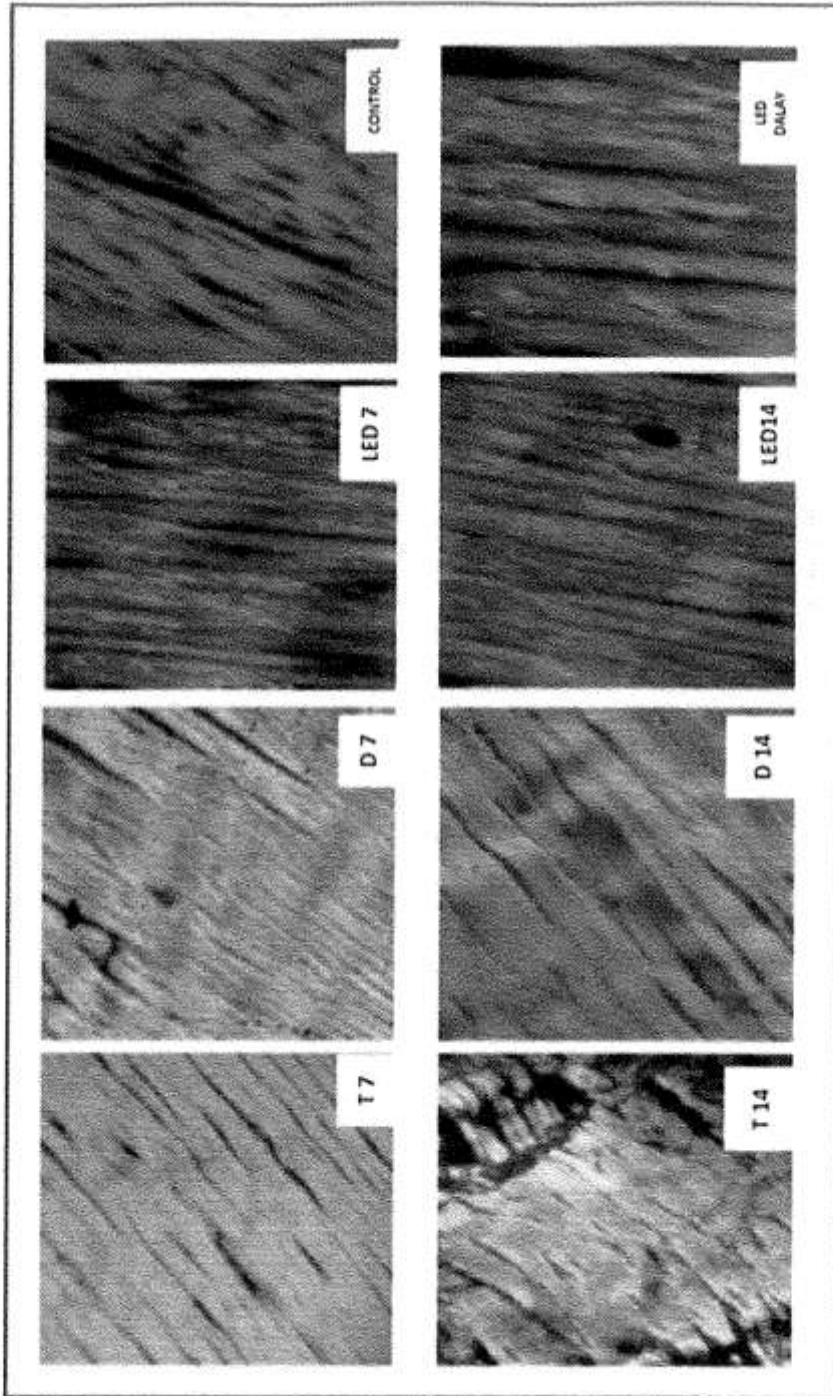


Figure 3
Click here to download Figure: Fig. 3.tif

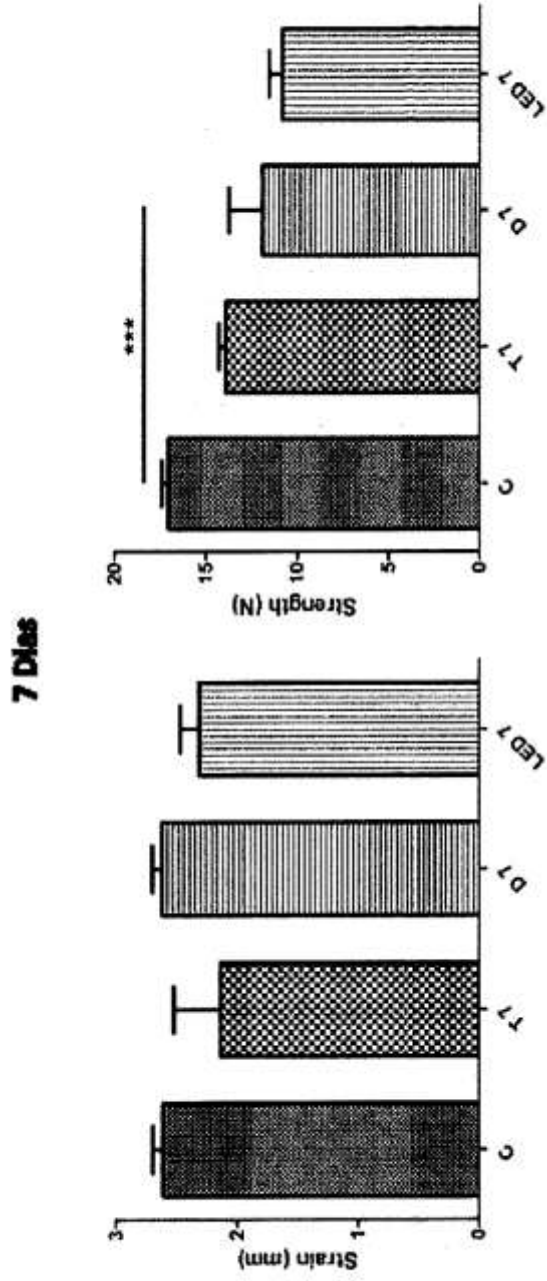
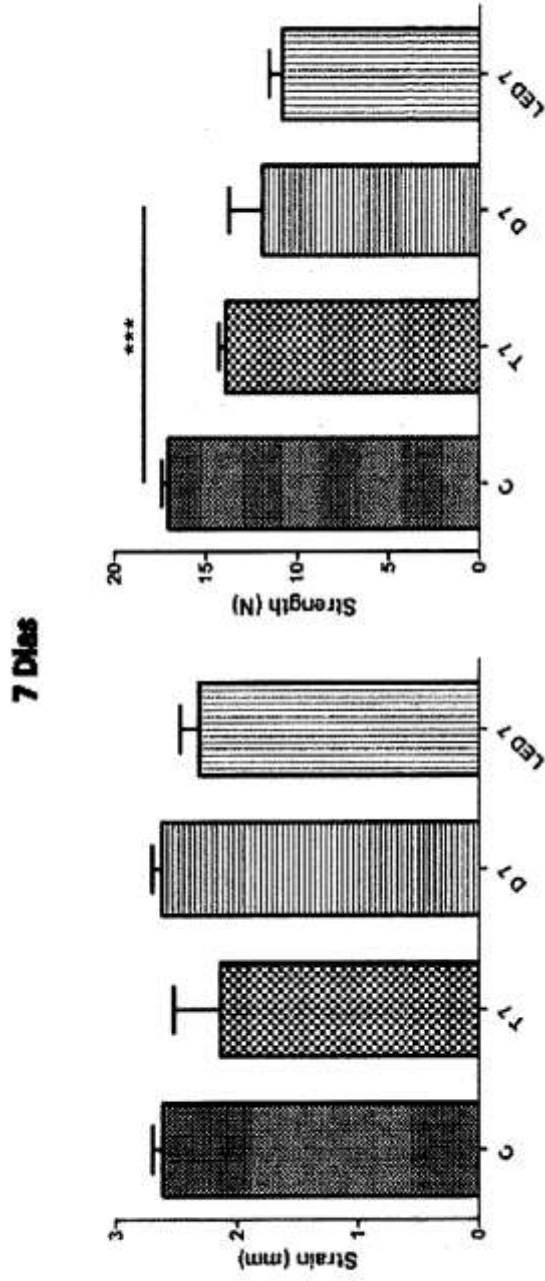


Figure 3
Click here to download Figure: Fig. 3.tif



4.3 Dados não publicados

4.3.1 MÉTODO

A metodologia a ser apresentada é referente aos resultados adicionais, que ainda não foram publicados e não serão apresentados no formato de artigo.

- **Aspectos Éticos**

Os aspectos éticos deste estudo seguiram as premissas da Sociedade Brasileira de Experimentação Animal (COBEA) sendo realizado de acordo com as orientações para o cuidado animal. Os procedimentos experimentais foram avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa na Utilização de Animais – CEUA da Universidade Nove de Julho (UNINOVE), sob registro: 0032/2012.

- **Animais**

Foram utilizados ratos, machos, jovens, linhagem *Wistar* (240 ± 20 g), Os animais passam por um período de ambientação e adaptação de uma semana, no Biotério de passagem da Uninove antes de se iniciarem os experimentos, em um ciclo de claro e escuro de 12 horas e com alimentação e água à vontade.

- **Indução da tendinite**

Os animais foram pesados e posteriormente anestesiados com cloridrato de Ketamina a 10% e cloridrato de Xilazina a 2% (87 e 13 mg/kg respectivamente) com aplicação intraperitoneal. Todos os cuidados prévios foram tomados para evitar qualquer desconforto para os animais. Os animais foram posicionados em aparelho para a produção de uma contusão controlada na região medial do tendão de Aquiles.

Após os procedimentos descritos acima, os animais ficaram mantidos aquecidos até a finalização do efeito anestésico, com o objetivo de se evitar a morte acidental por hipotermia decorrente da anestesia. Os animais receberam analgésico dipirona por via oral, nos dois primeiros dias após a indução da contusão, para a prevenção de qualquer desconforto possível.

- **Grupos Experimentais**

Os animais foram aleatoriamente distribuídos em 9 grupos, subdivididos em dois períodos experimentais, quatro grupos no período de 7 dias, e cinco grupos no período de 14 dias, conforme a figura 1:

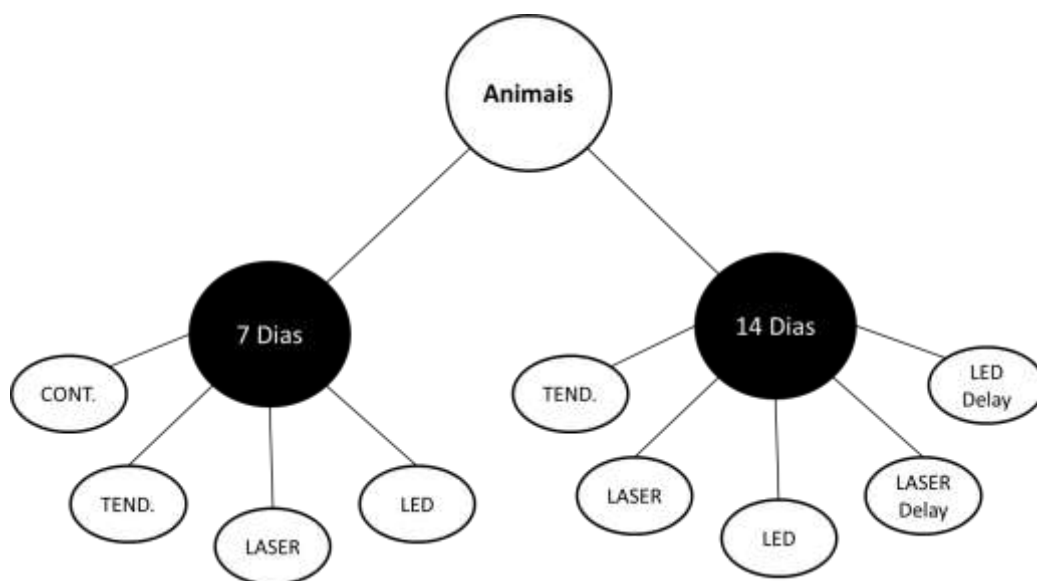


Figura 1: Representação esquemática dos grupos experimentais utilizados.

Grupo CONT: grupo controle, não houve indução da tendinite e os animais não receberam nenhum tipo de tratamento.

Grupo TEND: controle-tendinite, a tendinite foi induzida por meio de trauma, conforme descrição, porém não houve tratamento, foram simuladas as mesmas técnicas de aplicação da irradiação com o equipamento desligado.

Grupo LASER: a tendinite foi induzida e os animais foram tratados com laser (6J), no infravermelho (830nm), a partir de doze horas após a indução da tendinite, em dias alternados, até o 7º ou 14º dia de acordo com o período experimental.

Grupo LED: a tendinite foi induzida e os animais foram tratados com LED (6J), no infravermelho (945nm), a partir de doze horas após a indução da tendinite, em dias alternados, até o 7º ou 14º dia de acordo com o período experimental.

Grupo LASER Delay: a tendinite foi induzida e os animais foram tratados com laser (6J), no infravermelho (880nm), a partir do 7º ao 14º dia após a indução da tendinite, em dias alternados.

Grupo LED Delay: a tendinite foi induzida e os animais foram tratados com LED (6J), no infravermelho (945nm), a partir do 7º ao 14º dia após a indução da tendinite, em dias alternados.

- **Terapia Laser:**

Os parâmetros estão detalhados na tabela 2. Antes do início dos experimentos, o equipamento de laser foi aferido com um medidor potência (Model 13 PEM 001/J, Mellers Griot, Netherlands).

Tabela 2: Parâmetros de irradiação do Laser

Parâmetros de irradiação	Laser
Comprimento de onda	830nm
Potência	50mW
Dose	6J
Densidade de potência	3.57W/cm ²
Densidade de energia	107J/cm ²
Área de saída do feixe	0.028 cm ²
Tempo	120s

- **Terapia LED:**

Os parâmetros estão detalhados na tabela 3. Antes do início dos experimentos, o equipamento de laser foi aferido com um medidor potência (Model 13 PEM 001/J, Mellers Griot, Netherlands).

Tabela 3: Parâmetros de irradiação do LED

Parâmetros de irradiação	LED
Comprimento de onda	945 nm (± 10 nm)
Potência	50 mW
Dose	6J
Densidade de potência	0,06W/cm ²
Densidade de energia	7,68J/cm ²
Área de saída do feixe	0,5cm ²
Tempo	120s

Para aplicação das terapias tanto Laser quanto LED os animais foram posicionados em decúbito ventral e imobilizados manualmente. As patas traseiras foram imobilizadas seguindo-se da aplicação transcutânea do laser/LED. Para efeito do tratamento os animais foram expostos à radiação laser/LED em dias alternados, ou seja, com um intervalo de 48 horas entre as aplicações. A terapia teve início 12 horas após a indução da tendinite nos grupos Laser e LED, e no sétimo dia nos grupos Laser e LEDT

Delay, tendo-se o cuidado para que todos tivessem a mesma manipulação diária em mesmo horário.

- **Estimativa de penetração da terapia**

A estimativa da quantidade de energia que penetra no tecido foi realizada por meio de cálculos com base nos coeficientes de absorção e dispersão do tendão (CHEONG et al. 1990; WILSON et al. 2014).

De acordo com os cálculos a terapia com Laser (830nm) penetrou 5,0 mm no tendão, já com LED (945nm) penetrou 3,7 mm no tendão.

- **Modelo de eutanásia**

Os animais foram eutanasiados conforme protocolo experimental, com a utilização da câmara de CO₂, calibrada para o nível entre 70 a 80% de ocupação da câmara (disponível no biotério de passagem da UNINOVE). Os animais foram conduzidos individualmente até a câmara e colocados imediatamente em contato com o gás para perda rápida de consciência e hipóxia, atribuída à depressão dos centros vitais.

A remoção dos tendões foi feita por dissecação, sendo realizada uma primeira incisão na junção miotendínea seguido por uma incisão na junção osteotendínea, na inserção calcanear. Em seguida, os tendões foram devidamente identificados e armazenados em tubos para criogenia Nalgene®, acondicionados em nitrogênio líquido a 196°C negativos, descongelados apenas no momento da utilização para as análises. Foram retirados os tendões direitos de todos os animais e quatro tendões esquerdos de cada grupo.

- **Reação de Polimerização em Cadeia em Tempo Real (Real-Time PCR)**

Os procedimentos para utilização desta técnica foram realizados no Departamento de Ciências da Reabilitação da Universidade Nove de Julho (UNINOVE), onde foram analisadas a expressão gênica das seguintes citocinas: IL-6 e TNF- α , e das enzimas COX-1 e COX-2. O tendão, após removido foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e mantido a -80°C até o processamento. O RNA total foi extraído usando o reagent 26 Trizol (Gibco BRL, EUA) de acordo com instruções do fabricante. Após tratamento com DNase, a síntese dos cDNAs foram processadas pelo método da transcriptase reversa empregando a enzima SuperScript (Invitrogen) a partir de 2 μ g de RNA total e na presença de mistura de primers randômicos e oligo dT. Os experimentos de Real-Time PCR foram programados da seguinte maneira: 1 ciclo de

desnaturação inicial de 10 min a 95°C, e 40 ciclos de amplificação (30 seg de desnaturação a 95°C e 1 min de anelamento e extensão a 60°C); as sequências dos primers que foram utilizados constam no trabalho de Wang et al. (2004). Os resultados foram interpretados usando a fórmula 2-Ct (Ct: número de ciclos necessários para atingir o limiar de fluorescência acima do valor de fundo - background) que relaciona a expressão do gene de interesse comparado aquela do gene controle β -actina.

- **Determinação de Eicosanóides TNF- α e IL-6**

A dosagem das citocinas TNF- α e IL-6 das amostras de Tendão de Aquiles foram realizadas pelo teste imunoenzimático (ELISA), seguindo instruções do kit comercial (R&D System, EUA). Para tanto, placas de 96 poços foram sensibilizadas com 100 μ l de anticorpo monoclonal para cada citocina: anti-IL-6 diluído em tampão carbonato de sódio (0,1M, pH 9,6), enquanto anti TNF- α foi diluído em tampão fosfato de sódio (0,2M, pH 6,5). As placas foram incubadas (4°C) por 18 h. Para o bloqueio, as placas foram lavadas com PBST (solução PBS contendo 0,05% de Tween 20) por 4 vezes e depois preenchidas com 300 μ l/poço de solução de bloqueio (3% gelatina em PBST, Sigma) à 37°C por 3 horas e submetidas a novo ciclo de lavagens. A seguir, 100 μ l das amostras devidamente diluídas ou dos padrões das citocinas recombinantes foram adicionados à placa e deixadas por 18 h em temperatura de 4°C. Após lavagem, 100 μ l dos respectivos anticorpos biotinilados específicos de detecção para cada citocina foram acrescentados e deixados por 1 h em temperatura ambiente. Após lavagem das placas, o volume de 100 μ l de estreptavidina – peroxidase foi adicionado e deixado por 1 h em temperatura ambiente (22°C) seguida de novas lavagens. A reação foi revelada pela adição de 100 μ l/poço da solução de 3.3'5.5' tetrametilbenzidina (TMB) e interrompida pela adição de 50 μ l/poço de ácido sulfúrico (2 N). A leitura foi realizada em espectrofotômetro Spectra Max plus 384 (Sunnyvale, CA, EUA) em comprimento de onda de 450nm com correção a 570 nm. As concentrações das amostras foram calculadas a partir das curvas-padrão obtidas com as citocinas recombinantes. O limite de detecção para TNF- α é de 1,95 pg/mL, enquanto para IL-6 é de 15,6 pg/mL.

- **Análise Estatística**

- PCR-RT:

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pelo teste Kolmogorov-Smirnov quanto à distribuição. Para os dados com distribuição paramétrica foi realizado o teste ANOVA uma via complementado pelo teste de Student-Newman-Keuls. Os

dados não paramétricos foram analisados com o teste de Kruskal-Wallis complementado pelo teste de Dunns.

Teste Imunoenzimático (ELISA):

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pelo teste de análise de variância com 5% de probabilidade (ANOVA) e, quando necessário outro teste para determinação da diferença encontrada foi utilizado o teste de Tukey, também com 5% de probabilidade.

4.3.2 RESULTADOS

- **Análise da expressão gênica**

As análises da expressão gênica das citocinas: IL-6, TNF- α , e das enzimas COX-1 e COX-2, mostraram redução na expressão para TNF- α e COX2 para o tratamento com laser e com LED, no período de 7 dias, conforme mostram os dados na tabela 4.

Tabela 4: Dados de expressão gênica para tempo de 7 dias

	Controle	Tendinite	Laser	LED
IL-6	0,10 \pm 0,17	0,71 \pm 0,37	0,43 \pm 0,27	0,41 \pm 0,41
TNF- α	0,14 \pm 0,25	1,41 \pm 0,18	0,85 \pm 0,3 [#]	0,96 \pm 0,25 [#]
COX-1	0,9 \pm 0,22	0,59 \pm 0,24	0,42 \pm 0,23	0,57 \pm 0,22
COX-2	1,10 \pm 0,6	2,57 \pm 0,27	1,84 \pm 0,4 [#]	1,76 \pm 0,29 [#]

[#]p<0,01 vs. Tendinite

As análises da expressão gênica das citocinas: IL-6, TNF- α , e das enzimas COX-1 e COX-2 no período de 14 dias não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, conforme mostram os dados na tabela 5.

Tabela 5: Dados de expressão gênica para tempo de 14 dias

	Controle	Tendinite	Laser	LED	Laser D	LED D
IL-6	0,10 \pm 0,17	0,45 \pm 0,12	0,51 \pm 0,4	0,36 \pm 0,12	0,76 \pm 0,33	0,59 \pm 0,33
TNF- α	0,14 \pm 0,25	1,34 \pm 0,35	0,82 \pm 0,26	1,18 \pm 0,24	0,90 \pm 0,43	0,65 \pm 0,28
COX-1	0,9 \pm 0,22	0,42 \pm 0,23	0,41 \pm 0,28	0,63 \pm 0,23	0,36 \pm 0,35	0,48 \pm 0,28
COX-2	1,10 \pm 0,6	1,73 \pm 0,66	1,76 \pm 0,55	1,63 \pm 0,38	1,92 \pm 0,49	1,65 \pm 0,47

Não houve diferenças significantes entre os grupos para qualquer comparação.

- **Avaliação dos Níveis de IL-6 e TNF- α**

Observa-se que em 7 dias houve um aumento do nível de IL-6 nos grupos tratados em relação ao basal e tendinite, representado graficamente na figura 2. Já em 14 dias pode-se observar um menor nível de IL-6 no grupo laser em relação aos demais grupos que receberam indução da tendinite, representado graficamente na figura 3.

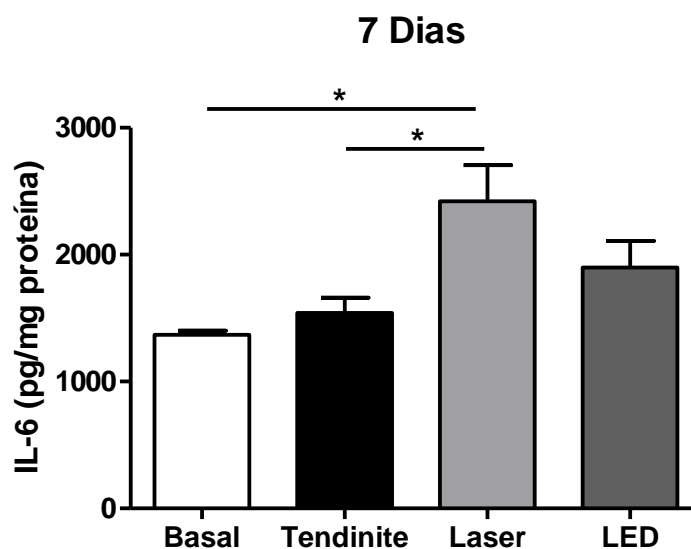


Figura 2: Gráfico de comparação dos níveis de IL-6 no período de 7 dias entre os grupos controle e tratados. *indica diferença significativa para os grupos $p < 0,05$

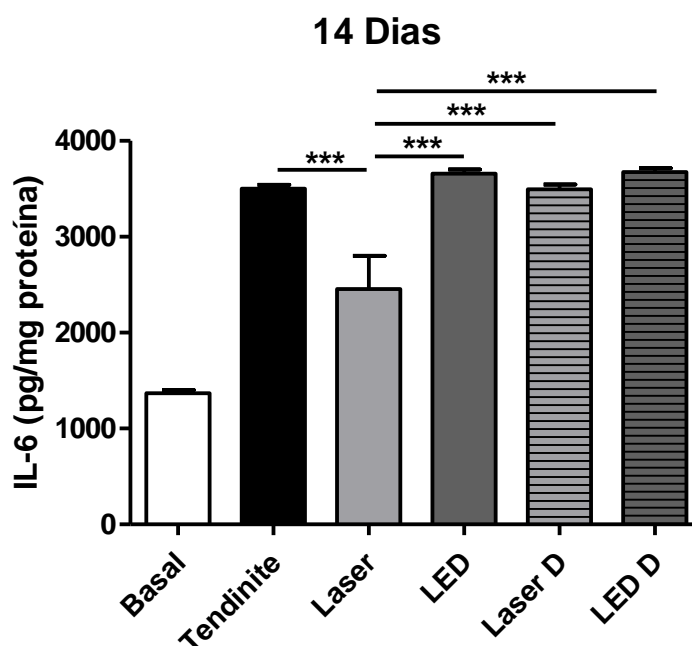


Figura 3: Gráfico de comparação dos níveis de IL-6 no período de 14 dias entre os grupos controle, tratados e tratados delay.*** indica diferença significativa para os grupos $p < 0,001$.

Os resultados de comparação dos níveis de TNF- α entre os grupos controle e tratados no período de 7 dias apresentaram diferenças estatisticamente significativas, pode ser observada a diminuição dos níveis dessa interleucina nos grupos tratados em relação aos grupos basal e tendinite, representado graficamente na figura 4. Em 14 dias não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas, pode ser observado

maior nível de TNF- α no grupo LED D em relação aos demais grupos que receberam indução da tendinite, representado graficamente na figura 5.

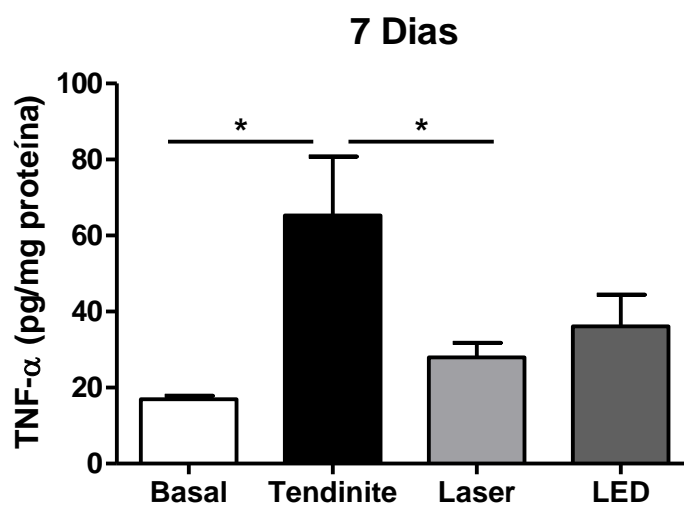


Figura 4: Gráfico de comparação dos níveis de TNF- α no período de 7 dias entre os grupos controle e tratados. *indica diferença significativa para os grupos $p < 0,05$

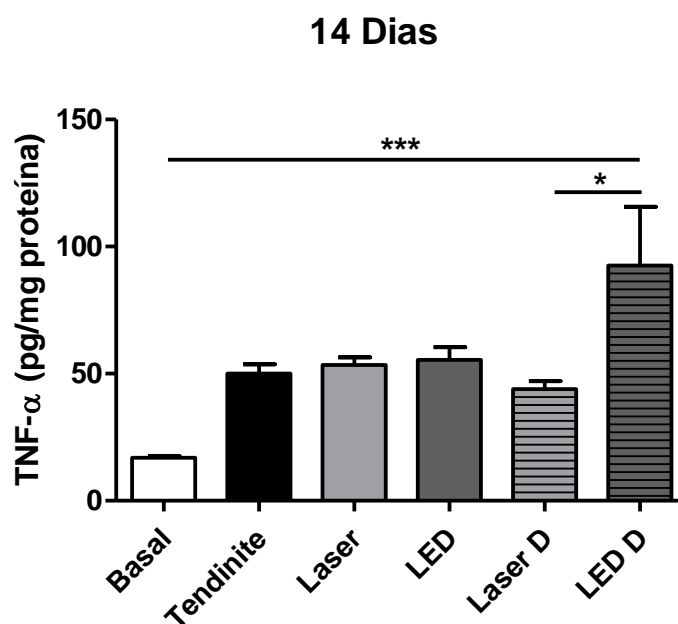


Figura 5: Gráfico de comparação dos níveis de TNF- α no período de 14 dias entre os grupos controle, tratados e tratados delay. *indica diferença significativa para os grupos $p < 0,05$ ***indica diferença significativa para os grupos $p < 0,001$.

5. DISCUSSÃO

A irradiação laser modula diversos processos biológicos, como: aumento da respiração mitocondrial e síntese de ATP; acelera a cicatrização de feridas; promove regeneração do músculo esquelético após lesão; diminui a resposta inflamatória e estimula a neovascularização. Também induz a síntese de proteínas (BJORDAL et al., 2006).

Os resultados demonstrados no presente estudo confirmam a hipótese de que a fototerapia auxilia no processo de reparação tendínea, pois, promove a modulação da resposta inflamatória, conforme os dados apresentados. Esses resultados corroboram com estudos anteriores que demonstraram que a irradiação laser modula vários processos biológicos (BJORDAL et al., 2006).

Em estudos anteriores, alguns autores observaram que o laser no comprimento de onda 904nm proporciona diminuição da inflamação e aumento da síntese de colágeno (DEMIR et al., 2004; FILLIPIN et al., 2005). Neste sentido, optou-se investigar o efeito da fototerapia na região do infravermelho próximo, a dose escolhida foi de 6J para o processo de reparação tendínea, por estar dentro da faixa de doses estudadas pelo nosso grupo de estudo.

O presente trabalho utilizou animais machos, por apresentarem menor incidência de alterações hormonais, reduzindo possíveis implicações no processo de reparação tendínea (ARRUDA et al., 2007). O tendão selecionado para este estudo foi o tendão calcâneo ou tendão de Aquiles, devido à facilidade do acesso, pois é superficial à pele, apresenta forma anatômica ampla e permite facilidade na execução da técnica experimental (CUNHA et al., 2001).

O perfil temporal do processo inflamatório de estruturas que compõem o sistema musculoesquelético revela diferenças importantes no desenvolvimento da inflamação e no reparo tecidual. Com esse tipo de análise temporal, é possível correlacionar o grau de lesão com as alterações celulares e teciduais que implicam na migração de células inflamatórias e perda da função mecânica, respectivamente. Além disso, a análise temporal permite avaliar a eficácia e os possíveis efeitos deletérios de terapias empregadas no tratamento dessas afecções. Assim, o presente estudo teve duas fases de tratamento para investigar a ação da fototerapia no processo de reparação tendínea. O tratamento na fase aguda do processo de reparação do tendão foi realizado no período de 7 dias, considerando a presença de células inflamatórias responsáveis pelo processo de cicatrização já nos primeiros dias após a lesão (ENWEMEKA, 1989). E o tratamento

na fase crônica foi realizado nos grupos 14 dias, visto que decorrido este período é possível avaliar o processo de reparação do tecido e alterações de sua funcionalidade. Além disso, a avaliação temporal da tendinite já vem sendo estudada por nosso grupo de pesquisa (XAVIER et al., 2010; PIRES et al., 2011; CASALECHI et al., 2013; XAVIER et al., 2014).

O valor da média de células inflamatórias dos animais do grupo tratado com laser no período de 7 dias após a lesão foi menor, comparado a média dos animais do grupo controle do mesmo período. Esta diferença foi estatisticamente significativa, demonstrando o efeito do laser na diminuição de células inflamatórias no processo de reparação do tendão. Estes resultados estão compatíveis com os resultados encontrados por Enwemwka et al., 2000 and Carrinho et al., 2006.

Os valores de média e desvio padrão do grupo tratado com laser no período do 1º ao 14º dia após a lesão, considerado um dos grupos do tratamento na fase crônica, foram os menores valores encontrados em todos os grupos do experimento. Diante desse resultado, pode-se afirmar que a TLBI apresentou seus melhores resultados neste grupo, pois através de seus efeitos fotobiomoduladores, proporcionou maior diminuição de células inflamatórias neste grupo. O tratamento com LED também obteve o mesmo padrão de redução no número de células inflamatórias.

Ainda em relação à importância da redução da migração de monócitos e neutrófilos para o sítio da inflamação está o fato de que estas células, depois de atraídas para o foco da inflamação, secretam diversos mediadores inflamatórios que são capazes de perpetuar a inflamação visto que são responsáveis por atrair mais células pró-inflamatórias para o sítio da lesão. Dentre os mediadores pró-inflamatórios envolvidos na resposta aguda e crônica da inflamação, podemos citar o TNF- α e a interleucina (IL-) 6. A resposta inflamatória também conta com a influência da citocina anti-inflamatória IL-10. Essa citocina participa da resposta imunológica e inflamatória, e tem a função de modular a secreção de mediadores pró-inflamatórios, seja reduzindo a expressão gênica, ou até mesmo, atenuando os efeitos deletérios da inflamação (VOLTARELLI, 1994). Vale ressaltar, que o balanço entre a secreção e os efeitos de mediadores pró e anti-inflamatórios garantem a integridade tecidual e com isso a funcionalidade do tecido estudado. Em contrapartida, a inflamação gera um desequilíbrio entre as respostas pró e anti-inflamatórias para que o tecido lesado seja reparado. Apesar disso, algumas respostas inflamatórias são bastante exacerbadas e isso desloca o eixo de equilíbrio da resposta inflamatória resultando em uma resposta que não é mais capaz de se autorregular. A partir desse contexto, se faz necessário o uso de terapias capazes de

atenuar o efeito pró-inflamatório, ao mesmo tempo, que garantam a função de citocinas que tem habilidade de reduzir a exacerbação da inflamação. Os resultados do presente estudo mostram que a Fototerapia se enquadra nesse requisito, os achados encontrados por meio do teste imunoenzimático ELISA indicam a diminuição do nível de TNF- α secretado nos grupos tratados com Laser e LED no período de 7 dias, resultado da modulação do processo inflamatório na fase aguda. Outros autores afirmaram em seus estudos que os efeitos antiinflamatórios da TLBI estão diretamente relacionados à diminuição do teor plasmático de citocinas pró-inflamatórias como a TNF- α , IL-6 e IL-2 (NOMURA et al., 2001; ZHEVAGO et al., 2006; AIMBIRE et al., 2006; ALBERTINI et al., 2008). Os efeitos fotobiomoduladores da TLBI, também são associados ao aumento da produção de fatores de crescimento, como bFGF e IGF-1 (SAYGUN et al., 2008). Assim, a TLBI estaria colaborando para a quebra do feed-back positivo da inflamação e favorecendo o processo de reparo.

De acordo com nossos resultados, em relação à expressão gênica das citocinas: IL-6 e TNF- α , e das enzimas COX-1 e COX-2, foi demonstrada redução na expressão de IL-1, IL-6 e COX nos grupos tratados com laser e com LED, no período de 7 dias. Logo, os resultados do presente estudo indicam que a Fototerapia está modulando a resposta inflamatória da fase aguda da tendinite contribuindo para a redução da retroalimentação positiva do processo inflamatório, onde células inflamatórias produzem mediadores inflamatórios que por sua vez atraem mais células para o sítio da lesão, em um ciclo que exacerba e perpetua a resposta inflamatória. Assim, podemos esperar uma melhor qualidade na reparação tecidual, dados estes que são confirmados pelo ensaio de resistência à tração no grupo laser, o grupo mais resistente à ruptura e com menor rigidez de tecido até mesmo que o grupo LED.

Em relação ao período experimental de 14 dias após a indução da tendinite, o que diz respeito à expressão gênica dos mediadores, os resultados aqui demonstrados apontam que tanto o laser como o LED não foram capazes de reduzir nenhum dos mediadores inflamatórios estudados. Da mesma forma, a Fototerapia também não foi eficaz em reduzir a concentração proteica do mediador TNF- α nesse período, mas reduziu a concentração proteica de IL-6 quando os animais foram tratados apenas com laser de baixa intensidade. Se analisarmos em conjunto os resultados obtidos no presente estudo, pode ser evidenciado que a fototerapia foi eficaz em reduzir o número de células inflamatórias no período de 14 dias após a indução da tendinite. Entretanto, é importante considerar que a fototerapia também tem limitações de eficácia. Assim, embora a dosimetria escolhida seja recomendada para o tratamento de processos

inflamatórios, o momento da irradiação pode não ser o ideal para a redução de todos os mediadores inflamatórios envolvidos na tendinite.

Os estudos experimentais das propriedades biomecânicas são fundamentais visto que a principal função dos tendões é transmitir carga tênsil, estes estudos, são realizados por meio de ensaios de tração, com o objetivo de adquirir gráficos de força-deformação, nos quais as propriedades mecânicas são determinadas (REIFF et al., 2007). Em relação ao processo de reparo de acordo com o teste de tração foi possível evidenciar que o tratamento utilizando o laser conseguiu alterar algumas propriedades mecânicas do tendão, tais como a força máxima no instante da ruptura do tecido e o maior ângulo que se forma na região linear de cada curva indicando a rigidez do material. Enquanto no primeiro momento (7 dias) o grupo lesionado e não tratado apresentou discreta diminuição da rigidez, no segundo momento (14 dias) o mesmo grupo apresentou um aumento da rigidez que pode estar relacionado a um processo de fibrose determinado a partir da indução da inflamação. Neste caso, um tecido mais rígido e com uma força menor pode apresentar um processo de ruptura facilitado. Enquanto o grupo lesionado não tratado apresentou discreta redução da força de ruptura, o grupo lesionado e tratado com laser apresentou um aumento desta mesma força, bastante superior até mesmo ao grupo tratado com LED. O grupo lesionado e tratado com diclofenaco foi o grupo que apresentou resultados menores, indicando uma piora destas propriedades mecânicas.

Neste caso, a utilização deste antiinflamatório não ajudou na proteção, no reparo do tecido e na conservação de suas propriedades mecânicas. O que pode estar relacionado com a alteração estrutural do tecido, pois estudos mostram que o uso de antiinflamatórios em lesão tendínea de rato causa redução do edema e do acúmulo de células inflamatórias, modificações na expressão, organização e maturação do colágeno, sem demonstrar o efeito sobre a complacência e resistência à tração do tendão (CARLSTEDT et al., 1987; MARSOLAIS et al., 2003).

Os resultados de resistência e elasticidade corroboram o achado em relação ao colágeno do tipo III, que no grupo laser em 14 dias apresenta-se em proliferação. Nos tendões normais, que não sofreram lesão, o colágeno tipo I representa até 90% de suas fibras (TSAI et al., 2007). Alguns autores observaram que em tendões calcâneos que sofreram ruptura espontânea apresentam quantidade elevada de colágeno tipo III (COOMBS et al., 1980; DORAL et al., 2010). Acordando com os achados obtidos pela técnica de Picrosirius red, com visualização sob luz polarizada, observados no presente estudo.

Desta forma, podemos sugerir que o laser em 830nm se mostrou efetivo na redução das limitações funcionais nos modelos de tendinite traumática, existindo uma correlação entre os efeitos celulares e funcionais. No entanto, o LED em 945nm se mostrou efetivo na redução do número de células inflamatórias, porém não evitou limitações funcionais nos modelos de lesão traumática.

6. CONCLUSÃO

Este trabalho nos permite inferir que:

- Laser
 - Reduziu o infiltrado inflamatório.
 - Melhorou a organização das fibras colágenas e a qualidade do reparo tecidual.
 - Foi eficiente na manutenção das propriedades mecânicas do tendão.
 - Reduziu a expressão gênica e a secreção de mediadores inflamatórios.

- LED
 - Reduziu o infiltrado inflamatório.
 - Melhorou a organização das fibras colágenas e a qualidade do reparo tecidual.
 - Reduziu a expressão gênica e a secreção de mediadores inflamatórios.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIGNER, T.; SOEDER, S.; HAAG, J. IL-1beta and BMPs- interactive players of cartilage matrix degradation and regeneration. **Eur Cell Mater.** v.26, n.12, p.49-56, 2006.

AIMBIRE, F.; ALBERTINI, R.; PACHECO, M.T.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C.; LEONARDO, P.S.; IVERSEN, V.V. et al. Low-Level Laser Therapy Induces Dose-Dependent Reduction of TNF- α Levels in Acute Inflammation. **Photomed Laser Surg.** v.24, p.33-37, 2006.

ALAM, R.; KUMAR, D.; ANDERSON-WALTERS, D.; FORSYTHE, P.A. Macrophage inflammatory protein-1 alpha and monocyte chemoattractant peptide-1 elicit immediate and late cutaneous reactions and activate murine mast cells in vivo. **J. Immunol.** v.2, p.1298-1303, 1994.

ALBERTINI, R.; VILLAVERDE, A. B.; AIMBIRE, F.; BJORDAL, J.; BRUGNERA, A.; MITTMANN, J.; SILVA, J. A.; COSTA, M. Cytokine mRNA expression is decreased in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation after low-level laser therapy. **Photomed. Laser Surg.** v.26, n.1, p.19-24, 2008.

ALFREDSON, H. Conservative management of Achilles tendinopathy: new ideas. **Foot and ankle clinics.** v.10, p. 321-329, 2005.

ALMEKINDERS, L. C.; TEMPLE, J. D. Etiology, diagnosis, and treatment of tendonitis: an analysis of the literature. **Med. Sci. Sports Exerc.** v.30, n.8, p.1183-1190, 1998.

ANDRES, B.M.; MURRELL, G.A. Treatment of tendinopathy: what works, what does not, and what is on the horizon. **Clinical Orthop. and Related Research.** v.466, p.1539-54, 2008.

ARRUDA, E.R.B; RODRIGUES, N.C; TACIRO, C; et al. Influência de diferentes comprimentos de onda da laserterapia de baixa intensidade na regeneração tendínea do rato após tenotomia. **Rev. Bras. Fisio.** São Carlos. v.11, n.4, p.283-8, 2007.

ATREYA, R.; MUDTER, J.; FINOTTO, S.; MULLBERG, J.; JOSTOCK, T.; WIRTZ, S.; SCHUTZ, M.; BARTSCH, B.; HOLTMANN, M.; BECKER, C.; GALLE, P. R.; ROSE-JOHN, S.; NEURATH, M. F. Blockade of IL-6 transsignaling abrogates established experimental colitis in mice by suppression of the antiapoptotic resistance of lamina propria T cells. **Nat. Med.** v.6, p.583-588, 2000.

BARBE, M. F.; BARR, A. E.; GORZELANY, I.; GAUGHAN, J.; SAFADI, F. F. Chronic repetitive reaching and grasping results in decreased motor performance and widespread tissue responses in a rat model of MSD. **J. Orthop. Res.** n.21, p.167-176, 2003.

BASTOS, J. L. N.; LIZARELLI, R. F. Z.; PARIZOTTO, N. A. Comparative study of laser and LED Systems of Low Intensity Applied to Tendon Healing. **Laser Phys.** v.19, n.9, p.1925-931, 2009.

BEREDJIKLIAN, P.K.; FAVATA, M.; CARTMELL, J.S.; FLANAGAN, C.L.; CROMBLEHOLME, T.M.; SOSLOWSKY, L.J. Regenerative versus reparative healing in tendon: a study of biomechanical and histological properties in fetal sheep. **Ann. Biomed. Eng.,** v.31, p.1143-1152, 2003.

BHANDARI, V.; ELIAS, J.A. Cytokines in tolerance to hyperoxia-induced injury in the developing and adult lung. **Free Radical Biology & Medicine.** v.41, p.4-18, 2006.

BJORDAL, J. M.; LOPES-MARTINS, R. A. B.; IVERSEN, V. V. A randomised, placebo controlled trial of low level laser therapy for activated Achilles tendinitis with microdialysis measurement of peritendinous prostaglandin E2 concentrations. **J. Sports Med.** v.40, p.76-80, 2006.

BOYLE, D.L., JONES, T.L., HAMMAKER, D., SVENSSON, C.I., ROSENGREN, S., ALBANI, S., SORKIN, L., FIRESTEIN, G.S. Regulation of peripheral inflammation by spinal p38 MAP kinase in rats. **PLoS Med.** v.3, n.9, p.338, 2006.

[BRADDOCK, M.](#) & [QUINN, A.](#) Target IL-1 in inflammatory disease: new opportunities for therapeutic intervention. **Nat Rev Drug Discov.** v.3, n.4, p.330-339, 2004.

BROSSEAU, L.; CASIMIRO, L.; MILNE, S.; ROBINSON, V.; SHEA, B.; TUGWELL, P.; WELLS, G. Deep transverse friction massage for treating tendinitis. Cochrane Database of Systematic Review. 2002.

BORGES, L.H. As Lesões por Esforços Repetitivos (LER) como índice do mal-estar no mundo do trabalho. **Rev CIPA.** v.252, p.50-61, 2000.

BOULTON, M.; MARSHALL, J.; He-Ne laser stimulation of human fibroblast proliferation and attachment in vitro. **Lasers in the Life Sciences.** v.1, p.125-134, 1986.

BUCKLE, P.W.; DEVEREUX, J.J.; The nature of work-related neck and upper limb musculoskeletal disorders. **Appl Ergon.** v.33, p.207-17, 2002.

CARLSTEDT, C.A.; MADSEN, K.; WREDMARK, T. The influence of indomethacin on biomechanical and biochemical properties of the plantaris longus tendon in the rabbit. **Arch Orthop Trauma Surg.** v.106, n.3, p.157-60, 1987.

CARRINHO, P.M.; RENNO, A.C.M.; KOEKE, P.; SALATE, A.C.B.; PARIZOTTO, N.A.; VIDAL, B.C. Comparative study using 685-nm and 830-nm Lasers in the tissue repair of tenotomized tendons in mouse. **Photomed. Laser Surg.** v.24, n.6, p.754-758, 2006.

CASALECHI, H. L.; NICOLAU, R. A.; CASALECHI, V. L.; SILVEIRA-JÚNIOR, L.; PAULA, A. M. B.; PACHECO, M. T. T. The effects of low level light emitting diode on the repair process of Achilles tendon therapy in rats. **Lasers Med. Sci.** v.24, p.659-665, 2009.

CASALECHI, H.L.; LEAL-JUNIOR, E.C.; XAVIER, M.; SILVA, J.A. JR.; DE CARVALHO, P.D.; AIMBIRE, F.; ALBERTINI, R. [Low-level laser therapy in experimental model of collagenase-induced tendinitis in rats: effects in acute and chronic inflammatory phases.](#) **Lasers Med Sci.** v.28, p.989-995, 2013.

CHEONG, W.F.; PRAHL, S.A.; WELCH, A.J. A review of the optical proprieties of biological tissues. **IEEE J. of Quantum Electronics.** v.26, n.12, p.2166-85, 1990.

CHOI, K.M.; RYU, O.H.; LEE, K.W.; KIM, H.Y.; SEO, J.A.; KIM, S.G.; et al. Serum adiponectin, interleukin-10 levels and inflammatory markers in the metabolic syndrome. **Diabetes Res Clin Pract.** v.75, p.235-40, 2007.

CLARK, C.; BRYDEN, A.; DAWE, R.; Topical 5-aminolaevolinic acid photodynamic therapy for cutaneous lesions: outcome and comparasion of light sources. **Photodermatol Photoimmunol Photomed.** v.19, p.134-141, 2003.

COOMBS, R.R.H.; KLENERMAN, L.; NARCISI, P.; NICHOLS, A.; POPE, F.M. Collagen typing in Achilles tendon rupture. **J. Bone Joint Surg Br.** v.62, p.258, 1980.

CUNHA, A.; PARIZOTTO, N.A.; VIDAL, B.C. The effect of therapeutic ultrasound on repair of the achiles tendon (tendo calcaneus) of the rat. **Ultrasound in Medicine and Biology**. v.27, n.12, p.1691-1696, 2001.

DEMIR, H.; MENKU, P.; KIRNAP, M.; CALIS, M.; IKIZCELI, I. Comparison of the effects of laser, ultrasound, and combined laser + ultrasound treatments in experimental tendon healing. **Lasers Surg. Med.** v.35, p.84-89, 2004.

DENADAI, A.S; DE CARVALHO, P.T; DOS REIS, F.A; BELCHIOR, A.C; PEREIRA, D.M; DOURADO, D.M; SILVA, I.S; DE OLIVEIRA, L.V. Morphometric and histological analysis of low-power laser influence on boné morphogenetic protein in bone defects repair. **Lasers Med Sci**. v.24, n.5, p.689-695, 2009.

DESMET, K.D.; PAZ, D.A.; CORRYJ. J.; ELLS T. J.; RILEY, M.T.; HENRY, M.M.; BUCHMANN, E.V.; Clinical and experimental applications of NIR-LED photobiomodulation. **Photomed. Laser Surg.** v.24, n.2, p.121-128, 2006.

DORAL, M.N.; ALAM, M.; BOZKURT, M.; TURHAN, E.; ATAY, O.A.; DONMEZ, G. et al. Functional anatomy of the Achilles tendon. **Knee Surg Sport Traumatol Arthrosc.** v.18, n.5, p.638-43, 2010.

ELWKIL, T.F.; An in-vivo experimental evaluation of He-Ne laser photostimulation in healing Achilles tendons. **Lasers Med. Sci.** v.22, p.53-59, 2006.

ENWEMEKA, C. S. Inflammation, cellularity and fibrillogenesis in regeneration tendon: Implications for tendon rehabilitation. **Phys. Ther.** v.69, n.10, p.816-825, 1989.

ENWEMEKA, C. S.; REDDY, G. K. The biological effects of laser therapy and other physical modalities on connective tissue repair processes. **Laser Ther.** v.12, p.22-30, 2000.

EVANS, R.B. Managing of injured tendon: Current concepts. **J. Hand. Ther.** v.25, p.173-189, 2012.

FILLIPIN, L.I; MAURIZ, J.L; VEDOVELLI, K; MOREIRA, A.J; ZETTLER, C. G; LECH, O; MARRONI, N. P; GONZÁLEZ-GALLEGO, J. Low-level laser therapy (LLLT) prevents oxidative stress and reduces fibrosis in rat traumatized Achilles tendon. **Lasers Surg. Med.** v.37, n.4, p.293-300, 2005.

FONG, Y.; LOWRY, S. Tumor necrosis factor in the pathophysiology of infection and sepsis. **Clin. Immunol. Immunopathol.** v.55, p.157-170, 1990.

GADELHA, A.P.G. Impacto previdenciário e ocupacional da incapacidade para o trabalho por doenças osteomusculares em sete ramos de atividade, Brasil, em 2002. Dissertação (mestrado) - Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde, 2006.

GENOVESE, J.W. **Laser de baixa intensidade**. 8. ed. São Paulo: Lovise, p. 78-86, 2000.

GLASER, T.; PODDAR, S.; TWEED, B.; WEBB, C.W. Clinical inquiries. What's the best way to treat Achilles tendonopathy? **J. Family Practice**. v.57, p.261-263, 2008.

GOFFI, F.S. **Técnica cirúrgica-Bases anatômicas, fisiopatologias e técnicas da cirurgia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, p.126-252, 1996.

HAYER, S.; REDLICH, K.; KORB, A.; HERMANN, S.; SMOLEN, J.; SCHETT, G. Tenosynovitis and osteoclast formation as the initial preclinical changes in a murine model of inflammatory arthritis. **Arthritis Rheum.** v.56, n.1, p.79-88, 2007.

- HENNESSY, M.S.; MOLLOY, A.P.; STURDEE, S.W. Noninsertional Achilles tendinopathy. **Foot and Ankle Clinics**. v.12, p.617-641, 2007.
- JACQUES, C., GOSSET, M., BERENBAUM, F., GABAY, C. The role of IL-1 and IL-1Ra in joint inflammation and cartilage degradation. **Vitam Horm**. v.74, p.371-403, 2006.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 92-124, 2004.
- KAPLANSKI, G., MARIN, V., MONTERO-JULIAN, F., MANTOVANI, A., FARNARIER, C. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. **Trends Immunol**. v.24, p.25-29, 2003.
- KARU, T.I.; **Cellular mechanism of low power laser therapy**. Simunovic, 2 ed. Lasers in Medicine and Dentistry. Vitagraf Rieka, p.79-100, 2003.
- LARAGIONE, T., YARLETT, N.C., BRENNER, M., MELLO, A., SHERRY, B., MILLER, E.J., METZ, C.N., GULKO, PS. The arthritis severity quantitative trait loci Cia4 and Cia6 regulate neutrophil migration into inflammatory sites and levels of TNF-alpha and nitric oxide. **J Immunol**. v. 178, n.4, p.2344-2351, 2007.
- LEIGH, J.P., ROBBINS, J.A. Occupational disease and worker's compensation: coverage, costs, and consequences. **Milbank Q**. v.82, p.689-721, 2004.
- LEONARDI, A.; CORTIVO, R.; FREGONA, I.; PLEBANI, M.; SECCHI, A.G.; ABATANGELO, G. Effects of Th2 cytokines on expression of collagen, MMP-1, and TIMP-1 in conjunctival fibroblasts. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v.44, p.183-189, 2003.
- LIECHTY, K.W.; ADZICK, N.S.; CROMBLEHOLME, T.M.; Diminished interleukin 6 (IL-6) production during the scarless human fetal wound repair. **Cytokine**. v.12, p.671-676, 2000.
- LIN, T.W.; CARDENAS, L.; GLASER, D.L.; SOSLOWSKY, L.J. Tendon healing in interleukin-4 and interleukin-6 knockout mice. **J. Biomech**. v.39, p.61-69, 2006.
- LIN, T.W.; CARDENAS, L.; SOSLOWSKY, L.J. Tendon properties in interleukin-4 and interleukin-6 knockout mice. **J. Biomech**. v.38, p.99-105, 2005.
- LOPEZ-ARMADA, M.J, CARAMES, B., LIRES-DEAN, M., CILLERO-PASTOR, B., RUIZ-ROMERO, C., GALDO, F., BLANCO, FJ. Cytokines, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta, differentially regulate apoptosis in osteoarthritis cultured human chondrocytes. **Osteoarthritis Cartilage**. V.14, n.7, p.660-669, 2006.
- MACHADO, M. V. M.; VULCANO, L. C.; HUSSNI, C. A.; ALVES, L. G. Efeito da laserterapia em tendinite experimental no tendão flexor digital superficial em equinos: Estudo histológico e ultrasonográfico, **Arch. Vet. Sci**. v.5, p.111-115, 2000.
- MAFFULLI, N.; KADER, D. Tendinopathy of tendo achillis. **J. Bone Joint Surg**. p.84-B:1-8, 2002.
- MAFFULLI, N.; MOLLER, H.D.; EVANS C.H.; Tendon healing: Can it be optimised? **Br J Sports Med**. v.36, p.315-316, 2002.
- MAGRA, M.; MAFFULLI, N. Nonsteroidal antiinflammatory drugs in tendinopathy: friend or foe. **Clinical J. of Sport Med**. v.16, p. ,2006.
- MAGRA, M.; MAFFULLI, N. Genetic aspects of tendinopathy. **J. Sci. Med. Sport**. v.11, p.243-247, 2008.

MANSKLE, B.R.; LESKER, B.S.; Histologic evidence of intrinsic flexor tendon repair in various experimental animals: in vitro study. **Clinical Orthopaedics and Related Research**. n.182, p.297-304, 1984.

MARSOLAIS, D. Nonsteroidal anti-inflammatory drug reduces neutrophil and macrophage accumulation but does not improve tendon regeneration. **Lab Invest**. v.83, p.991-9, 2003.

MATERA, J. M.; TATARUNAS A. C.; OLIVEIRA S. M. O uso do laser arseneto de gálio (904nm) após excisão artroplástica da cabeça do fêmur em cães. **Acta Cir. Bras**. v.18, n.2, p.102-106, 2003.

MEDEIROS, I. S. Dispositivos LED para polimerização de resinas compostas dentais: comparação com outra fonte de luz. 2001. Dissertação (Mestrado em Ciências e Engenharia de Materiais) – Interunidades em Ciências e Engenharia de Materiais, Universidade de São Paulo, 2001.

MOSSER, D.M.; ZHANG, X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. **Immunol. Ver**. v.226, p.205-218, 2008.

NISSAN, J.; ASSIF, D.; GROSS M.D.; YAFFE, A., INDERMAN, I.; Effect of low intensity laser irradiation on surgically created bony defects in rats. **Journal of Oral Rehabilitation**. v.33, n.8, p.619–924, 2006.

NOMURA, K.; YAMAGUCHI, M.; ABIKO, Y. Inhibition of interleukin-1beta production and gene expression in human gingival fibroblasts by low-energy laser irradiation. **Lasers Med Sci**. v.16, p.218-23, 2001.

OLIVEIRA, P.V.; Estudo mecânico do efeito do laser HeNe em cicatrização de tendão de Aquiles de coelho. 2002. 96f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) - Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão.2002.

PIRES, D; XAVIER, M; ARAÚJO, T; SILVA, J.A. JR; AIMBIRE, F; ALBERTINI, R. [Low-level laser therapy \(LLLT; 780 nm\) acts differently on mRNA expression of anti- and pro-inflammatory mediators in an experimental model of collagenase-induced tendinitis in rat.](#) **Lasers Med Sci**. v.26, n.1, p.85-94, 2011.

PONTINEN, P.; Laseracupuncture. In: Simunovic Z (ed.) **Lasers in Medicine and Dentistry**. Part One: Basic Science, and Up-to-date Clinical Application of Low Energy-Laser Laser Therapy LLLT. 1ed. Rijeka: Vitgraf, p.455-475, 2000.

POTENZA, A.D.; Tendon healing within the flexor digital sheath in the dog. **Journal Bone Joint Surgery**. v.44-A, n.1, p.49-64, 1962.

PUGLIESE, L.S.; MEDRADO, A.P.; REIS, S.R.A.; ANDRADE, Z.A.; The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. **Pesq. Odontol. Bras**. v.17, n.4, p.307-313, 2003.

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

REES, J.D.; WOLMAN, R.L.; WILSON, A. Eccentric exercises; why do they work, what are the problems and how can we improve them? **British J. of Sports Med**. v.43, p.242- 246, 2008.

REIFF, R.B.M.; CROCI, A.T.; BOLLIGER NETO, R.; PEREIRA, C.A.M. Comparative study on biomechanical properties of the central portion of frozen and fresh calcaneus tendon. **Acta Ortop Bras.** v.15, n.1, p.6-8, 2007.

RICCHETTI, E.T.; REDDY, S.C.; ANSORGE, H.L.; ZGONIS, M.H.; VAN KLEUNEN, J.P.; LIECHTY, K.W.; SOSLOWSKY, L.J.; BEREDJIKLIAN, P.K. Effect of interleukin-10 overexpression on the properties of healing tendon in a murine patellar tendon model. **J. Hand Surg. Eur.** v.33A, p.1843-1852, 2008.

RYAN, J.M.; BARRY, F.P.; MURPHY, J.M.; MAHON, B.P. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. **J. Inflamm.** v.26, p.2-8, 2005.

SALATE, A. C. B. Síndromes por *overuse* em Tendão de Calcâneo. **Fisioter. Bras.** v.3, n.6, p.351-355, 2002.

SAYGUN, I.; KARACAY, S.; SERDAR, M.; URAL, A.U.; SENCIMEN, M.; KURTIS, B. Effects of laser irradiation on the release of basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin like growth factor-1 (IGF-1), and receptor of IGF-1 (IGFBP3) from gingival fibroblasts. **Lasers Med Sci.** v.23, p.211-215, 2008.

SBARSI, I.; FALCONE, C.; BOIOCCHI, C.; CAMPO, I.; ZORZETTO, M.; DE SILVESTRI, A.; CUCCIA, M.; Inflammation and atherosclerosis: the role of TNF and TNF receptors polymorphisms in coronary artery disease. **Int J Immunopathol Pharmacol.** v.20, n.1, p.145-154, 2007.

SCHEPSIS, A.A.; JONES, H.; HAAS, A.L.; Achilles Tendon Disorders in Athletes. **J. Sports Med.** v.30, p.287, 2002.

SOLEAR, A.M.; ANGELL-PETERSEN, E.; WARLOE, T.; Photodynamic therapy of superficial basal cell carcinoma with 5-aminolevulinic acid with dimethylsulfoxide and ethylenediaminetetraacetic acid: a comparison of two light sources. **Photochem Photobiol.** v.71, p.724-729, 2000.

SOUZA, N.S.S.; SANTANA, V.S.; Incidência cumulativa anual de doenças musculoesqueléticas incapacitantes relacionadas ao trabalho em uma área urbana do Brasil. **Cad. Saúde Pública.** v.27, n.11, p.2124-2134, 2011.

STERGIOULAS, A.; STERGIOULA, M.; AARSKOG, R.; LOPES-MARTINS, R. A. B.; BJORDAL, J. M. Effects of low-level laser therapy and eccentric exercises in the treatment of recreational athletes with chronic achilles tendinopathy. **J. Sports Med.** v.36, p.881, 2008.

TAVARES, M.R.; MAZZER, N.; PASTORELLO, M.; Efeitos do laser terapêutico na cicatrização tendinosa: estudo experimental em ratos. **Fisioterapia Barsil.** v.6, n.2, p.96-100, 2005.

[TORRES-SILVA, R.](#); [LOPES-MARTINS, R.A.](#); [BJORDAL, J.M.](#); [FRIGO, L.](#); [RAHOUADI, R.](#); [ARNOLD, G.](#); [LEAL-JUNIOR, E.C.](#); [MAGDALOU, J.](#); [PALLOTTA, R.](#); [MARCOS, R.L.](#) The low level laser therapy (LLLT) operating in 660 nm reduce gene expression of inflammatory mediators in the experimental model of collagenase-induced rat tendinitis. **Lasers Med Sci.** Epub ahead of print, 2014.

TRELLES, M.; ALLONES, I.; MAYO, E. Er:YAG Laser Ablation of Plantar Verrucae with Red LED Therapy-Assisted Healing. **Photomed. Laser Surg.** v.24, n.4, p.494-498, 2006.

TSAI, W.C.; HSU, C.C.; CHOU, C.Y.; CHEN, J.; PANG, J.H. Effects of celecoxib on migration, proliferation and collagen expression of tendon cells. **Connect Tissue Res.** v.48, n.1, p.46-51, 2007.

VERBRUGGEN, L.A., REBMANN, V., DEMANET, C., DE COCK, S., GROSSE-WILDE, H. Soluble HLA-G in rheumatoid arthritis. **Hum Immunol.** v.67, n.8, p.561-567, 2006.

VINCK, E. M.; CAGNIE, B. J.; CORNELISSEN, M. J.; DECLERCQ, H. A.; CAMBIER, D. C.; Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. **Laser in Medical Science.** v.18, n.2, p.95-99, 2003.

VOLTARELLI, J.C. **Febre e inflamação.** Medicina, Ribeirão Preto, v.27, p.7-48, 1994.

WALSHA, I.A.P.; CORRALB, S.; FRANCOB, R.N.; CANETTIB, E.E.F.; ALEMA, M.E.R.; COURYA, H.J.C.G.; **Rev. Saúde Pública.** v.38, n.2, p.149-56, 2004.

WHELAN, H. T.; HOULE, J. M.; WHELEAN, N. T.; DONOHOE, D. L.; CWIKLINSKI, J.; SHMITD, M. H.; GOULD, L.; LARSON, D.L.; MEYER, G. A.; CEVERINI, V.; STINSON, H. The NASA Light-Emitting Diode medical program – Progress in space flight terrestrial applications. **Space Tech. App. Int. Forum.** v.504, p.37-43, 2000.

WILSON, R.H.; NADEAU, K.P.; JAWORSKI, F.B.; ROWLAND, R.; NGUYEN, J.Q.; CROUZET, C.; SAAGER, R.B.; CHOI, B.; TROMBERG, B.J.; DURKIN, A.J. Quantitative short-wave infrared multispectral imaging of in vivo tissue optical properties. **J. of Biomedical Optics.** v.19, n.8, 086011-4, 2014.

XAVIER, M.; DAVID, D. R; DE SOUZA, R. A; ARRIEIRO, A. N; MIRANDA, H.; SANTANA, E. T; SILVA, J. A. JR.; SALGADO, M. A; AIMBIRE, F; ALBERTINI, R. Anti-inflammatory effects of low-level light emitting diode therapy on Achilles tendinitis in rats. **Lasers Surg Med.** v.42, n.6, p.553-8, 2010.

XAVIER, M.; [DE SOUZA, R.A.](#); [PIRES, V.A.](#); [SANTOS, A.P.](#); [AIMBIRE, F.](#); [SILVA, J.A. JR.](#); [ALBERTINI, R.](#); [VILLAVERDE, A.B.](#) Low-level light-emitting diode therapy increases mRNA expressions of IL-10 and type I and III collagens on Achilles tendinitis in rats. **Lasers Med Sci.** v.29, p.85-90, 2014.

ZANIN, I.C.J.; GONÇALVES, R.B.; BRUGNERA, A.JR.; HOPE, C.K.; PRATTEN, J.; Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: in vitro study. **J Antimicrob Chemother.** v.56, n.2, p.324-330, 2005.

ZHEVAGO, N.; SAMOILOVA, K. Pro-and Anti-inflammatory Cytokine Content in Human Peripheral Blood after Its Transcutaneous (in Vivo) and Direct (in Vitro) Irradiation with Polychromatic Visible and Infrared Light. **Photomed. Laser Surg.** v.24, p.129-39, 2006.

