

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOFOTÔNICA APLICADA AS CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**EFEITOS DA TERAPIA LED DE BAIXA POTÊNCIA EM RATAS
OVARIECTOMIZADAS COM TRAUMA TENDÍNEO: ASPECTOS
INFLAMATÓRIOS**

São Paulo, SP

2013

CARLA HELRIGLE SILVA

**EFEITOS DA TERAPIA LED DE BAIXA POTÊNCIA EM RATAS
OVARIECTOMIZADAS COM TRAUMA TENDÍNEO: ASPECTOS
INFLAMATÓRIOS**

Dissertação apresentada à Universidade
Nove de Julho, para obtenção do Título
de Mestre em Biofotônica Aplicada às
Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dra. Regiane
Albertini de Carvalho

Silva, Carla Helrigle.

Efeitos da terapia led de baixa potência em ratas ovariectomizadas com trauma tendíneo: aspectos inflamatórios. / Carla Helrigle Silva. 2013.

54f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2013.

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

São Paulo, 09 de outubro de 2013.

TERMO DE APROVAÇÃO

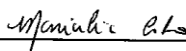
Aluno(a): CARLA HELRIGLE SILVA

Título da Dissertação: "Efeitos da terapia LED de baixa potência em ratas ovariectomizadas com trauma tendíneo: aspectos inflamatórios"

Presidente: PROFA. DRA. REGIANE ALBERTINI DE CARVALHO



Membro: PROFA. DRA. MARICILIA SILVA COSTA



Membro: PROF. DR. ERNESTO CESAR PINTO LEAL JUNIOR



DEDICATÓRIA

“Há um único recanto do universo que podemos ter certeza de melhorar: o nosso próprio eu” (Aldous Huxley).

Dedico esta obra ao meu marido Gabriel, companheiro, amoroso, que me ensinou a amar e me proporcionou minha maior felicidade, nossa filha Valentina.

Aos meus pais Carlos e Geni exemplos de luta e companheirismo.

A minhas irmãs Tatiana e Cândida, meus sobrinhos Talita, Murilo e Lanna, meu compadre Lúcio Cláudio e minha cunhada Carolina Nasser por todo carinho e atenção.

Aos meus amigos e colegas de trabalho em especial minha grande amiga Giorgia Lay Ang.

A todos vocês dedico esta dissertação!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre ao meu lado me iluminando e protegendo a mim e minha filha, ainda em minha barriga, nas inúmeras viagens para realização desta conquista.

Meu marido **Gabriel de Carvalho F. Nasser** pela paciência, apoio e compreensão.

A minha Orientadora Professora Doutora **Regiane Albertini de Carvalho**, pelo respeito, ensino, paciência e confiança.

Aos Professores do programa de mestrado em Biofotônica.

A aluna de Doutorado Heliodora Casalechi por toda ajuda.

Aos meus colaboradores Prof. Rogério Rabelo e a acadêmica de Veterinária Panmera Helrigel.

Aos meus colegas de trabalho, UFG, em especial Prof. Cássio Fontana, Prof.^a Vera Fontana.

A todos os alunos da primeira turma de Biofotônica (mestrado) em especial a acadêmica Gianna Mões.

Obrigada!

RESUMO

Este estudo experimental tem objetivo de analisar os efeitos da fototerapia LED, no processo inflamatório em tendão de Aquiles de ratas ovariectomizadas (OVX), pelo envolvimento dos mediadores inflamatórios IL-6, IL-10 e TNF- α . Foram utilizados 35 ratas *Wistar* fêmeas, divididas em 4 grupos: sendo 3 grupos ovariectomizados, não tratados (NTTA); tratados (TTA) e controle subdivididos nos períodos experimentais de 3, 7 e 14 dias, totalizando 30 ratos; e um grupo (n=5) não ovariectomizados (Não OVX). A tendinite foi induzida por trauma, utilizando uma massa de 208g posicionada a 20 cm do tendão direito de cada animal, com energia de 0,70J. Os animais foram tratados 12h após a tendinite, com terapia LED (945nm, potência de 32mW, energia de 3,84J, densidade de potência 0,06W/cm², densidade de energia 7,68J/cm², área de saída do feixe 0,5 cm² e tempo de 120s) e a cada 48h nos períodos de 3, 7 e 14 dias. Em seguida, a eutanásia decorreu em câmara de CO₂, 24h ao último tratamento. Os tendões foram dissecados e acondicionados em nitrogênio líquido a 196°C negativos, descongelados apenas no momento da realização do teste imunoenzimático (ELISA). Após a análise dos resultados os grupos tratados com LED apresentaram diminuição no número de células pró-inflamatórias, IL-6 e TNF- α (p<0,05), e aumento no número da IL-10 (p<0,05) anti-inflamatória mesmo quando comparado como grupo não OVX (p<0,05). Assim conclui-se que a LED de baixa intensidade, nos parâmetros estudados tem efeito reparador em processo de tendinopatia (tendinite) traumática em ratas (OVX).

Palavras-chave: Inflamação, Ovariectomia, Tendinite, Citocinas, LED.

ABSTRACT

The aim of this experimental study was to investigate the effects of LED phototherapy on the inflammation process in the calcaneal tendon of ovariectomized rats (OVX) through the involvement of inflammatory mediators IL-6, IL-10 and TNF- α . Thirty-five female Wistar rats were divided into 4 groups: 3 ovariectomized groups, untreated (NTTA); treated (TTA) and control subdivided into experimental periods of 3, 7 and 14 days, totaling 30 rats and one group (n = 5) not ovariectomized (not OVX). Tendinitis was induced by trauma using a 208g mass placed at 20 cm from the right tendon of each animal with energy of 0.70 J. The animals were treated 12 hours after tendonitis with LED therapy (945nm, power 32mW, energy of 3.84 J, power density of 0.06 W / cm², energy density of 7.68 J / cm², beam output area of 0.5 cm² and time of 120 s) and every 48 hours at 3, 7 and 14 days. Then, euthanasia was performed in a CO₂ chamber 24h after the last treatment. The tendons were dissected and stored in liquid nitrogen at -196°C, thawed only at the time of immunoenzymatic test (ELISA). After analysis of results, groups treated with LED showed decrease in the number of pro-inflammatory cells, IL-6 and TNF- α (p < 0.05) and increased number of anti-inflammatory IL-10 (p < 0.05) even when compared to the not OVX group (p < 0.05). It was concluded that low-intensity LED in the studied parameters has repairing effect on the tendinopathy process (tendonitis) caused by trauma in female rats (OVX).

Keywords: Inflammation, Ovariectomy, Tendonitis, Cytokines, LED.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	3
AGRADECIMENTOS	4
RESUMO	5
ABSTRACT	6
SUMÁRIO	7
LISTA DE QUADROS E TABELAS	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE ABREVIATURAS	10
1. CONTEXTUALIZAÇÃO	11
1.1 Ovariectomia	11
1.2 Tendinite	13
1.3 Terapia LED	16
1.4 Justificativa	18
2. OBJETIVO GERAL	20
2.1 Objetivos específicos	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Aspectos Éticos	21
3.2 Animais	21
3.3 Modelo Experimental de Ovariectomia	21
3.4 Grupos Experimentais	22
3.5 Modelo Experimental de Tendinite	24
3.6 Terapia LED	24
3.7 Modelo de eutanásia	27
3.8 Determinação de Eicosanóides, TNF- α , IL-6 e IL-10	27
3.9 Análise Estatística	28
4. RESULTADOS (ARTIGO)	29
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
6. REFERÊNCIAS	43

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1:Parâmetros de irradiação do LED (Light Emitting Diode)_____Pag.25

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fluxograma dos tempos e grupos _____ Pag.23

Figura 2: Prensa Lesinadora da Marca CIPEDA® _____ Pag.24

Figura 3: Organograma de atividade e tempo _____ Pag.26

LISTA DE ABREVIATURAS

%: Porcentagem

°C: Celsius

cm²: Centímetro quadrado

COX: ciclooxigenase

D E: densidade de Energia

Fig: figura

g: grama

h: horas

H₂O: água

IL: Interleucina

IL1-β: Interleucina1-Beta

IP: Intraperitoneal

J: Joule

Kg: quilograma

LASER: Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation

LED: Light Emitting Diode

mg: miligrama

mW: miliwatt

n: número

nm: nanômetro

NTTA: grupo não tratado

OVX: Ovariectomia

pg: picograma

pH: peróxido de hidrogênio

RNA_m: ácido ribonucléico mensageiro

s: segundos

SC: Subcutâneo

TGF-β: Fator de transformação de crescimento Beta

TMB: tetrametilbenzidina

TNF: Fator de Necrose Tumoral

TNF-α: Fator de Necrose Tumoral alpha

TRH: Terapia de Reposição Hormonal

TTA: grupo tratado com LED

μl: microlitro

1 CONTEXTUALIZAÇÃO

1.1 Ovariectomia

É bem conhecido que as mulheres são mais propensas a lesões músculoesqueléticas. Muitos estudos revelam que os índices de acidentes por lesão ligamentar estão relacionados com a diferença sexual, sendo a adaptação da tração mecânica sobre o tendão diferenciada entre homens e mulheres (LIU et al., 1997; YU et al., 2001; MAGNUSSON et al., 2007; MOUNTCASTLE et al., 2007). A estrutura e composição de alguns tecidos é influenciada por hormônios sexuais femininos (WOJTYS et al., 1998, SHULTZ et al., 2004).

Há vários fatores que podem afetar a cicatrização do tendão (SHARMA; MAFFULLI, 2005). O estrógeno é um hormônio que produz numerosas ações fisiológicas, incluindo efeitos no desenvolvimento celular. Além de ações neuroendócrinas envolvidas no controle da ovulação, preparo cíclico do trato reprodutor para fertilização e implantação do óvulo, ações no metabolismo de minerais, carboidratos, proteínas e lipídeos (WILLIAMS; STANGEL, 1996).

Os ovários são a principal fonte de estrógeno circulante. O principal produto secretor é o estradiol, sintetizado pelas células granulosas a partir de precursores androgênicos (androstenediona ou testosterona), proporcionados pelas células da teca (WILLIAMS; STANGEL, 1996). Os mecanismos pelos quais esse hormônio age não estão completamente claros, mas sabe-se que seu mecanismo de ação envolve interação entre uma molécula ligante e um receptor (COMPSTON, 2001).

O tecido músculoesquelético e os tendões são conhecidos por possuir receptores de hormônios sexuais, incluindo progesterona e estrógeno (WIJK et al., 2008). O receptor de estrógeno encontra-se em tecidos do trato reprodutivo em concentrações variáveis. A especificidade do hormônio é determinada pelo domínio de ligação do estrógeno na região do receptor, e a resposta do tecido depende do número de receptores (TURNER et al., 1994). O receptor se liga de maneira reversível ao estrógeno com alta afinidade e especificidade. A ativação do receptor parece envolver uma mudança conformacional capaz de ligá-lo ao receptor nuclear (RORIES; SPELSBERG, 1989). A resposta biológica à ação do estrógeno é um fenômeno saturável. O número de receptores por massa de tecido é limitado (GRAY, 1989).

A identificação de receptores de estrógeno e progesterona nos fibroblastos referi uma relação dos hormônios femininos sobre a estrutura do tecido (LIU et al., 1997). A presença de frouxidão ligamentar é apontada quando comparado os níveis basais de estrógeno e progesterona à fase de pico (HEITZ et al., 1999).

O estrógeno modula algumas citocinas, destacando-se a interleucina IL-1, a qual induz a síntese e a liberação de outros mediadores, como a IL-6 (VANDEUREN et al., 1992). Os quais estimulam os fibroblastos a se proliferarem e a produzirem colágeno controlando o crescimento das células endoteliais (TROWBRIDGE; EMLING, 1996). Tendo efeitos mensuráveis sobre o tecido colagenoso (SLAUTERBECK et al., 1999). Os mecanismos subjacentes a presença de estrógeno também causam alterações na produção e liberação de colágeno, com a síntese de colágeno diminuída a um aumento da degradação do tendão (FISCHER, 1973; LIU et al., 1997; NEUGARTEN et al., 2000; YU et al., 2001).

Sabe-se dos efeitos do estrógeno na síntese de colágeno sobre a exposição de diferentes níveis deste hormônio (MILLER et al., 2006; BRYANT et al., 2008). Há evidências de que o tendão é particularmente sensível a altos níveis de estrógeno, dada a presença de receptores específicos (MILLER et al., 2006). Assim, embora o exato mecanismo é desconhecido, acredita-se que a diminuição da estirpe do tendão nos usuários de contraceptivos é um sinal dos efeitos do estrógeno sobre a síntese de colágeno (BRYANT et al., 2008).

Desta forma, concentrações variadas deste hormônio estão associadas com a diminuição da resistência e tração, além de provocar redução no conteúdo total de colágeno, diâmetro e densidade da fibra de colágeno (HAMA et al., 1976; ABUBAKER et al., 1996; SLAUTERBECK et al., 1999). Com importante ação na homeostasia dos tecidos músculoesqueléticos, porém com uma incompleta compreensão sobre a síntese de colágeno, já que o conteúdo de colágeno é conhecido por afetar as propriedades mecânicas do tecido conjuntivo (MAGNUSSON et al., 2007, CIRCI et al., 2009). Assim, é plausível esperar que estes fatores possam causar variabilidade nas propriedades dos tendões (CIRCI et al., 2009).

1.2 Tendinite

A tendinite, lesão de esforço, é uma desordem comum do sistema músculoesquelético com várias manifestações patológicas, sendo este o termo usado para descrever dor crônica no tendão que na maioria das vezes é causada pela realização do mesmo movimento repetidamente (MAFFULLI, KADER, 2002; CHIODO, WILSON, 2006). Devido à variedade etiológica é uma das desordens que mais afastam trabalhadores de suas funções, sendo tratada como um problema ocupacional e representando mais de 30% das ocorrências esportivas (SANDMEIER, RENSTRÖM, 1997; COVIZI et al., 2001; MAFFULLI et al., 2000; MAFFULLI, KADER, 2002; PAAVOLA, et al., 2002; BARBE, 2003).

O tendão do calcâneo é um dos tendões mais lesionados, causando incapacidade, devido à dor e o inchaço. Um dos distúrbios mais comuns da sociedade moderna. (FELSON et al., 2000; CHERRY, MEYER, 2001; LONGO et al., 2009). Sabe-se em sua patogenia que os esforços físicos excessivos e repetitivos podem causar microtraumas nos tecidos levando assim a uma ruptura espontânea dos tendões, ocasionando uma inflamação (tendinite) como ocorre na prática desportiva, estas lesões também são chamadas de lesões de sobrecarga, resultantes na inabilidade do tendão em suportar qualquer carga adicional de tensão (SALATE, 2002).

Quando acontece 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). Não havendo prevenção destes danos, surge o processo inflamatório crônico, onde ocorre o remodelamento da bainha tendínea e do tecido sinovial, enchendo o espaço sinovial de células inflamatórias. Estas alterações no tecido tendíneo conduzem a um distúrbio maciço do tendão, reduzindo sua funcionalidade. Outra complicação está no fato que os tendões usam suas extremidades para se ligarem em outras estruturas como ossos e cartilagens; este processo inflamatório pode migrar para esses tecidos. Esta pode ser a explicação sobre como os tendões são as estruturas mais afetadas pela inflamação crônica e como a tendinite influencia na manifestação de doenças inflamatórias nos ossos e cartilagens (HAYER et al., 2007).

No processo inflamatório a compleição de mediadores químicos faz com que a inflamação mantenha características uniformes mesmo sendo produzida por irritantes díspares. As citocinas são produzidas por células do sistema imune com a propriedade de atuar sobre outras células do organismo, pertencentes ou não ao sistema imunológico (MONTES et al., 2000).

A regulação do processo inflamatório envolve um equilíbrio entre as citocinas pró e anti-inflamatórias. Estas últimas têm o papel de inibir as primeiras. A mais bem pesquisada e notória dentre as anti-inflamatórias é a IL-10, que em linfócitos infiltra nas zonas isquêmicas e infartadas. Em monócitos e macrófagos ela inibe a síntese do TNF, IL-6 e outras, além de suprimir as metaloproteínas e estimular inibidores da metaloproteinase preservando a matriz celular. (FRANGOIANNIS et al., 1998; HILL et al., 1998; MOURA et al., 2001; ESPER, MONROY, 2001).

A IL-10 é uma citocina pleiotrópica produzida pelas células T helpers, linfócitos T, linfócitos B, monócitos e macrófagos. Possui propriedades anti-inflamatórias, cuja principal função é a regulação do sistema imune, pois inibe de maneira potente a expressão e/ou a produção de citocinas pró-inflamatórias. Exerce seu efeito anti-inflamatório no sistema vascular pela inibição das interações celulares endoteliais e leucocitárias, e da produção de chemocinas por macrófagos ou linfócitos. Por meio de um *feedback* negativo parece bloquear de modo persistente a produção das citocinas pró-inflamatórias (CHOI et al., 2007).

Após contato com um agente agressor a primeira citocina pronunciada pelas células do hospedeiro é o de Fator de Necrose Tumoral (TNF), considerado o principal mediador inflamatório, produzido por diversos tipos celulares. A ministração de TNF induz a síntese de outros mediadores, como a IL-6, cuja liberação é inibida pela neutralização da atividade do TNF (FONG, LOWRY, 1990). O TNF desempenha papel-chave no disparo e na regulação da resposta inflamatória e imunológica, além de atuar como mediador de algumas respostas metabólicas e cardiovasculares que ocorrem durante a infecção (GRUNFELD, PALLADINO, 1990).

Sua ligação a receptores específicos localizados na membrana celular, o TNF- α , intera com o sistema imune, sendo capaz de exacerbar os sinais e sintomas de doenças que são desencadeadas por alterações da resposta imunológica (LOPEZ-ARMADA et al., 2006; SBARSI et al., 2007). Sendo uma citocina pró-inflamatória esta participa na

degeneração do osso e da cartilagem, ocupando a primeira posição nas citocinas da cascata inflamatória, regulando a produção de mediadores dentre eles as interleucinas IL-6 e IL-10 (BRENNAN et al., 1998).

A IL-6 está fortemente relacionada à produção e liberação das proteínas da fase aguda e pode induzir febre e causar a liberação do hormônio adrenocorticotrófico. A concentração de IL-6 no soro eleva-se dentro de 2 a 4 horas após um corte ou trauma e a intensidade da resposta correlaciona-se com a duração. A IL-6 é um bom marcador de dano tissular e seus níveis podem ser um prognóstico de choque séptico. Este padrão de resposta é consistente com o papel de um mediador, considerado um indicador bastante preciso na evolução da lesão (HAUSER et al., 1998, CASEY, 1993; MOURA et al., 2001; ESPER, MONROY, 2001).

Assim como a IL-6, o TNF- α é um mediador central da resposta de fase aguda, pois também determina a produção e elevação das concentrações plasmáticas (YUDKIN et al., 1999; WILLERSON, RIDKER, 2004; FRANCISCO et al., 2006). Por causa de sua atividade biológica pleiotrópica, esta citocina está envolvida no processo de inflamação, pois desempenha um papel principal na cascata das citocinas e estimula a síntese de outras citocinas (FRANCISCO et al., 2006).

A migração e proliferação dos fibroblastos são desencadeadas por fatores de crescimento e citocinas fibrogênicas dentre estes o TNF e a IL-6 e 10, parcialmente derivadas dos macrófagos inflamatórios. Durante a formação do tecido de granulação, os fibroblastos adquirem características estruturais, funcionais, imunológicas e químicas diferentes dos tecidos fibroblásticos normais (CONTRAN et al., 2000).

No entanto, a renovação do colágeno é, em geral, muito lenta, e em muitos órgãos, como tendões e ligamentos, ela é praticamente estável (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Muitas vezes a reparação pode prover uma 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). Com isso, a possibilidade de ocorrer alguma falha durante o processo de reparo poderá levar a uma desarmonia nos tendões (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A cicatrização do tendão apresenta melhores resultados na presença do estrogênio, tendo a proliferação celular e a resposta inflamatória superior. Porém o conhecimento sobre as propriedades do tendão relacionados a deficiente de estrogênio são escassos e incoerentes (CIRCI et al., 2009).

Com uma predominância e cronicidade elevada esta tendinopatia é um grande problema sócio econômico onde a busca de intervenções, tratamentos médicos e novas terapias são de suma importância (LANGBERG; KONGS-GAARD, 2008). Há diversas técnicas de tratamentos sendo inseridas para atenuar e sanar as tendinopatias, com um aumento exacerbado de estudos referente à utilização de luz como terapia (CARVALHO et al. 2006, ALBERTINI et al., 2007; XAVIER et al., 2010). Porém, há bem menos pesquisas referentes à fototerapia de baixa potência LED, que vem evidenciando resultados positivos no processo inflamatório tão quanto comparados aos estudos com fototerapia utilizando o LASER do qual se difere na presença de coerência (DALLAGNOL et al., 2009).

1.3 Terapia LED

O LED suscita emissão de luz monocromática, não coerente, o que difere da luz LASER (ANDRADE et al., 2001; CORAZZA, 2005; PACHECO, 2007). Por ser semicondutor, tendo como atributo conduzir a corrente elétrica em um único sentido, oferece grande eficiência na conversão de energia elétrica em óptica, dissipando pouca potência (MEDEIROS, 2001), emitindo apenas uma pequena banda espectral (STAHL, 2000; KURACHI et al., 2001; CORAZZA, 2005; PACHECO, 2007). Diversos autores relatam que terapias que utilizam LED em baixa intensidade promovem os mesmos efeitos que LASER de baixa intensidade (ANDRADE et al., 2001; BICUDO, 2004; MAVROPOULOS et al., 2005; FARIA, 2006; MACHADO et al., 2008; DALLAGNOL et al., 2009).

A coerência é uma propriedade da luz LASER, porém ao penetrar no tecido ela se perde nos primeiros extratos da pele (PONTINEM, 2000; DALLAGNOL et al., 2009). Isto ocorre devido a grande variedade de estruturas celulares que compõe a pele (MICKILEY et al., 1988; HACZEKI et al., 1989). A perda de coerência, não existente no LED, não altera a irradiação absorvida pelas células (SMITH, 2005). Desta forma os fótons vão se distribuir de acordo com a absorção de cada estrutura. O cromóforo é responsável pela absorção luminosa, quando ocorre a absorção de fótons por um

cromóforo um estado molecular eletronicamente excitado se estabelece, resultando na atividade celular (KARU, KOLYAKOV, 2005). A ampliação desta atividade, tanto em divisão como em síntese, têm sido relacionados ao comprimento de onda do fóton e com a dose, e não especificamente à fonte de luz (KARU, 2000).

O desenvolvimento da terapia LED vem contribuir nos sistemas de atenção a saúde pública, sendo mais um componente para a reabilitação de pacientes por meio de uma terapia de baixo custo. Possuem evidências científicas que a fototerapia de baixa intensidade é uma estratégia terapêutica para regeneração e fortalecimento nos tendões calcâneos de ratos após lesão induzida. Dessa forma, observa-se que o LED pode vir a ser um substituto para algumas terapias de baixa intensidade. Entretanto, para tal se faz necessário mais estudos para determinar dosimetria, efeito e mecanismo de ação da terapia com LED (SACONA et al., 2008; CASALECHI, 2009).

As pesquisas com a utilização do LED estão em crescimento, há diversos benefícios encontrados como a regeneração do tecido tendinoso e organização das fibras colágenas sendo tão eficaz quanto outras terapias (FARIA, 2006), na prevenção de cáries, efeito bactericida e alívio da dor na cicatrização (BEVILACQUA et al., 2007; TORTAMANO et al., 2009), regeneração do tendão de Aquiles, com diminuição do número de fibroblastos e melhora na qualidade da remodelação (CASALECHI et al., 2009), resultados semelhantes na cicatrização do tendão ao comparar o LED com o LASER (BASTOS et al., 2009), regeneração positiva em inflamação óssea (ARAÚJO, 2009), ação anti-inflamatória com aumento qualitativo e quantitativo dos fibroblastos e fibras colágenas (SILVA et al., 2011) acólito na cicatrização de ferida cutânea, com melhora da dor após a primeira sessão e reparo completo no décimo quinto dia (TRELLES et al., 2006).

Nas investigações referentes aos efeitos positivos da terapia LED baixa intensidade sobre o tendão do calcâneo, em ratos, encontra-se uma variada densidade de energia como no estudo de Parente (2012), utilizando uma densidade de energia (DE) de 2,04 J/cm² obteve resultados satisfatórios na recuperação da tendinite com ações positivas sobre maturação das fibras colágenas e no processo inflamatório com diminuição na expressão de IL1- β e aumento na expressão TGF- β em animais nutridos e desnutridos. Neste mesmo estudo as análises histopatológicas, apontam uma redução no número de células inflamatórias, reparação tecidual e melhora no alinhamento das fibras

colágenas. Faria (2006) verificou regeneração e organização nas fibras colágenas usando uma DE de 4J/cm², também com esta mesma DE Silva et al. (2010) alcançaram melhora na ação anti-inflamatória acelerando a reparação tecidual, Casalechi et al. (2009) com 20J/cm² obtiveram redução do número de Fibroblastos e aumento na remodelação das fibras de colágenas, Xavier et al. (2010) utilizando 7,5 J/cm², demonstraram redução na expressão do RNAm em COX, TNF, IL4 e aumento IL10, outros estudos também mostram resultados satisfatórios na busca dos níveis de mediadores pró e anti-inflamatórios (PIRES et al., 2011, LARAIA et al., 2012, CASALECHI et al., 2013, XAVIER et al., 2013).

Os mecanismos da terapia LED podem ser considerados bem compreendidos, no entanto a dose adequada para uma eficiente resposta e conseqüentemente uma cicatrização perfeita sem implicações ainda é tácita. Diante da redução do estrógeno causada pela ovariectomia e suas conseqüências na regeneração tecidual, maturação de tecidos e dos estudos sobre a fototerapia de baixa potência no processo inflamatório, o presente trabalho teve o desígnio investigar os efeitos da terapia LED verificando os níveis das citocinas IL-6, IL-10 e TNF- α em ratas ovariectomizadas com trauma tendíneo.

1.4 Justificativa

O envelhecimento está associado a várias modificações no organismo, dentre as mudanças fisiológicas desta faixa etária está à redução hormonal, paralelamente a um aumento da prevalência de doenças inflamatórias musculoesqueléticas, sendo estas variações hormonais um coadjuvante no processo de adensamento destas patologias. Com o avanço dos estudos referentes a estas desordens, novas terapias vêm sendo desenvolvidas, com especial ênfase àquelas que apresentam potencial terapêutico sobre a inflamação e dor. Além disso, grande atenção tem sido dada aos efeitos adversos de terapias anti-inflamatórias. 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.

A razão do aumento de pesquisas buscando comparar os efeitos da fototerapia com o uso do LED em substituição ao LASER é que, diferente do comprimento de onda, a sua coerência não é um fator importante para o efeito biomodulador (SMITH, 2005). Além disso, os aparelhos que emitem radiação laser têm alto custo, fazendo-se

necessária a busca por fontes luminosas alternativas. Nesse contexto, os LED's surgem como uma excelente opção em virtude do seu potencial de ação e de seu valor mais barato. Porém, existem discordâncias de pesquisadores quanto à eficiência dessa terapia na biomodulação tecidual. Com isso, torna-se necessário o conhecimento sobre a dose e os mecanismos que influenciam na recuperação dos tendões, com deficiência de estrógeno, reparados com LED, pois o estabelecimento de protocolos adequados poderá auxiliar mais rapidamente na incorporação desse tipo de fototerapia e como o tendão sob níveis insuficientes de estrógeno se manifesta perante a esta terapia.

2 OBJETIVOS

2.2 Objetivos Gerais

Investigar os efeitos da fototerapia LED, na região do infravermelho, no processo inflamatório tendíneo induzido por trauma mecânico no tendão calcâneo em ratas ovariectomizadas.

2.3 Objetivos específicos:

- Analisar o envolvimento dos mediadores inflamatórios IL-6, IL-10 e TNF- α .

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 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: An0022/2012.

3.2 Animais

Foram utilizadas 35 ratas, fêmeas, jovens, linhagem *Wistar* (200 ± 20 g), que passaram por um período de ambientação e adaptação de uma semana no biotério, antes do início dos experimentos. Os animais foram mantidos em gaiolas padrão, em grupos aleatórios de cinco animais, mantidos em sala com temperatura e umidade constante (24°C e 60%), iluminação com ciclo de claro e escuro 12 por 12 horas, com água e ração a vontade.

3.3 Modelo Experimental de Ovariectomia

Os animais submetidos à ovariectomia primeiro foram anestesiados com a combinação de ketamina (40-100 mg/kg, IP) e xilazina (1-5mg/kg, IP) (VIANA, 2003) assim submetidos a tricotomia. A incisão foi feita um dedo a frente da crista ilíaca, parte tricotomizada, em condições assépticas preparadas para a ovariectomia (OVX). Bilateralmente os ovários foram identificados, mantidos firmemente, e com fio de Nylon amarrados ao redor do oviduto, incluindo os vasos sanguíneos ovarianos e então removidos. A incisão, pele e parede muscular, foram suturadas (HERNANDEZ, 2000; IRIGOYEN, 2005; FLUES et al., 2010). Os animais receberam depois da cirurgia uma injeção de antibiótico Enrofloxacina (5-10 mg/kg, SC) a cada 12h (VIANA, 2003).

Após quatorze dias de pós-operatório foi verificada a efetividade do procedimento através do teste de esfregaço (MARCONDES et al., 2001), onde todos os animais se encontravam com o ciclo estral em diestro. Sendo aguardados 90 dias para o início do experimento (LATOURET et al., 2001; SHINODA et al., 2002; FLUES et al., 2010).

3.4 Grupos Experimentais

Noventa dias após a ovariectomia, os animais pesando (240 ± 20 g), foram aleatoriamente distribuídos em três grupos experimentais com períodos de 3 dias, 7 dias e 14 dias sendo subdivididos em tratados e não tratados. Todo material para o grupo controle, ratas ovariectomizadas, foi retirado do tendão contralateral (tendão esquerdo) dos animais nos respectivos períodos, demonstrados abaixo:

Tempo experimental de 3 dias (animais eutanasiados no 4º dia experimental):

- Grupo NTTA3(n=5): controle-tendinite, na fase inicial a tendinite foi induzida por meio de trauma conforme descrição, porém não receberam tratamento, sendo simuladas as mesmas técnicas de aplicação da irradiação com o equipamento desligado.
- Grupo TTA3(n=5): tendinite induzida, os animais foram tratados com LED ($7,6\text{J}/\text{cm}^2$), no infravermelho (945nm) com dose total de $15,2\text{J}/\text{cm}^2$, a partir de 12 horas após a indução da tendinite até o 3º dia, em dias alternados.
- Grupo Controle 3: foi constituído por 4 tendões retirados das patas contralaterais (esquerda) dos animais acima.

Tempo experimental de 7 dias (animais eutanasiados no 8º dia experimental):

- Grupo NTTA7 (n=5): controle-tendinite, na fase inicial a tendinite foi induzida por meio de trauma conforme descrição, porém não receberam tratamento, sendo simuladas as mesmas técnicas de aplicação da irradiação com o equipamento desligado.
- Grupo TTA7 (n=5): tendinite induzida, os animais foram tratados com LED ($7,6\text{J}/\text{cm}^2$), no infravermelho (945nm) com dose total de $30,4\text{J}/\text{cm}^2$, a partir de 12 horas após a indução da tendinite até o 7º dia, em dias alternados.
- Grupo Controle 7: foi constituído por 4 tendões retirados das patas contralaterais (esquerda) dos animais acima.

Tempo experimental de 14 dias (animais eutanasiados 14º dia experimental):

- Grupo NTTA 14 (n=5): controle-tendinite, na fase inicial a tendinite foi induzida por meio de trauma conforme descrição, porém não receberam tratamento, sendo simuladas as mesmas técnicas de aplicação da irradiação com o equipamento desligado.
- Grupo TTA 14 (n=5): tendinite induzida, os animais foram tratados com LED ($7,6\text{J}/\text{cm}^2$), no infravermelho (945nm) com dose total de $53,2\text{J}/\text{cm}^2$, a partir de 12 horas após a indução da tendinite até o 14º dia, em dias alternados.
- Grupo Controle 14: foi constituído por 4 tendões retirados das patas contralaterais (esquerda) dos animais acima.

O grupo não OVX foi composto por ratas, fêmeas *Wistar* (n=5), não ovariectomizadas com o mesmo peso ($240\pm 20\text{g}$) e idade das ratas ovariectomizadas após 90 dias.

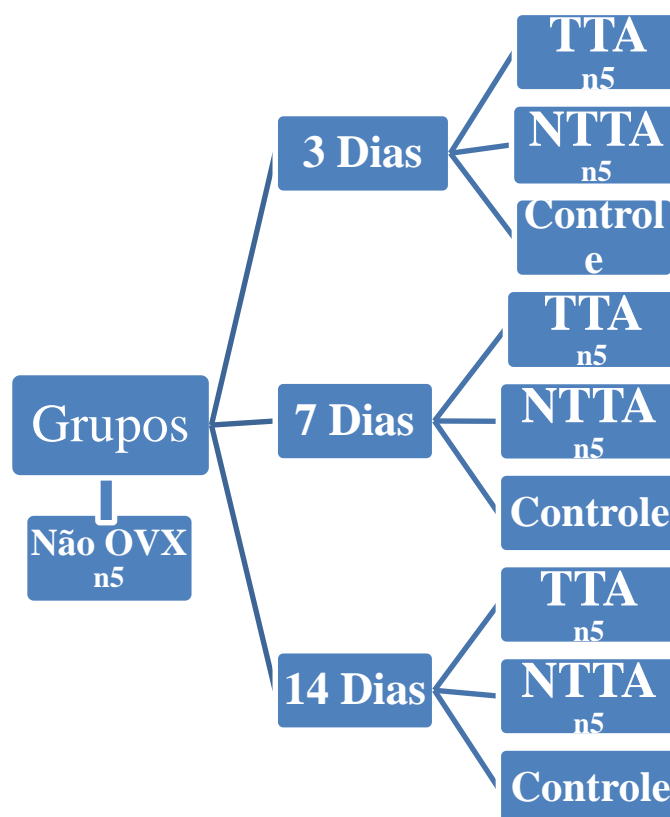


Figura 1: Fluxograma dos tempos e grupos, cada grupo com dois subgrupos e mais o grupo controle formado por ratas não ovariectomizadas, totalizando 35 animais.

3.5 Modelo Experimental de Tendinite

As ratas foram anestesiadas via intraperitoneal com uma combinação de ketamina (40-100 mg/ kg, IP) e xilazina (1-5 mg/ kg, IP) (VIANA, 2003, DAMY et al., 2010). Todos os cuidados prévios foram tomados para evitar qualquer desconforto para os animais. Os animais posicionados em decúbito ventral no aparelho para indução controlada de trauma prensa lesionadora CIPEDA® (Fig. 2), para a produção de uma contusão na região medial do tendão calcâneo. Utilizou-se massa de 208g posicionada a 20 cm do tendão do animal, o impacto da mesma possibilitou uma energia aplicada no tendão de 0,70J.



Figura 2. Prensa Lesionadora da marca CIPEDA®.

Fonte: www.cidepe.com.br/pt/produtos/fisiologia/prensa-lesionadora

Após os procedimentos descritos acima, os animais foram mantidos aquecidos até a finalização do efeito anestésico, com o objetivo de se evitar a morte acidental por hipotermia. Também receberam analgésico Flunixinina Meglumina (2,5 mg/kg SC) (VIANA, 2003) para a prevenção de qualquer desconforto possível.

3.6 Terapia LED

O equipamento LED (Light Emitting Diode) utilizado no estudo foi um protótipo desenvolvido para esta pesquisa, com potência previamente aferida por meio de um medidor de potência (Model 13 PEM 001/J, Melles Griot, Netherlands). Os parâmetros estão detalhados na tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros de irradiação do LED

Parâmetros de irradiação	LED
Comprimento de onda	945nm (± 10 nm)
Potência	32mW
Energia	3,84J
Densidade de Potência	0,06W/cm ²
Densidade de energia	7,68J/cm ²
Área de saída do feixe	0,5cm ²
Tempo	120s

Os animais foram posicionados em decúbito ventral e contidos manualmente. As patas traseiras foram imobilizadas seguindo-se a aplicação do LED por 120 segundos. A aplicação foi pontual em contato direto com o tendão calcâneo direito, (MOURA JÚNIOR, 2010; SILVA et al., 2011) formando um ângulo de 90° em relação ao tendão.

Para efeito do tratamento os animais foram expostos à radiação LED em dias alternados, ou seja, com um intervalo de 48 horas entre as aplicações, sendo iniciado 12 horas após a indução da tendinite no grupo tratado (TTA), tendo-se o cuidado para que todos tivessem a mesma manipulação diária em mesmo horário (CASALECHI et al.,

2009; XAVIER et al., 2010).

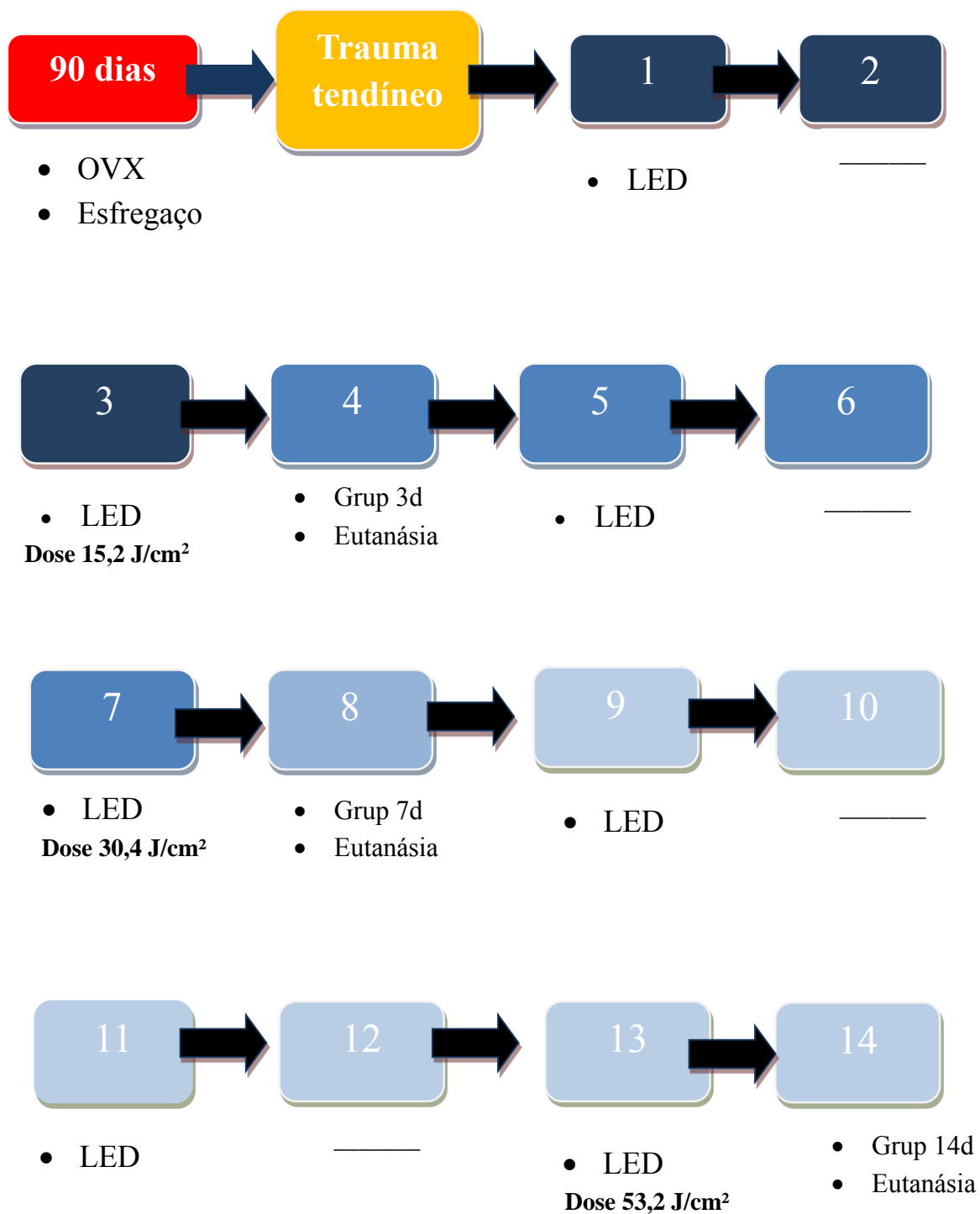


Figura 3: Organograma de atividade e tempo.

3.7 Modelos de eutanásia

Ao termino de cada grupo experimental (3, 7 e 14 dias), os animais foram eutanasiados 24hs após a última sessão de terapia. Para padronização, conforme protocolo experimental, a eutanásia ocorreu com a utilização da câmara de CO₂, calibrada para o nível entre 70 a 80% de ocupação da câmara (disponível no biotério da UNINOVE). Os animais foram conduzidos 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, a partir de uma primeira incisão na junção miotendínea seguida por uma incisão na junção osteotendínea, na inserção calcâneo. Assim, foram devidamente identificados e armazenados em tubos para criogenia Nalgene® e acondicionados em nitrogênio líquido a 196°C negativos, descongelados apenas no momento da realização do teste imunoenzimático (ELISA). Foram retirados os tendões direitos de todos os animais e quatro tendões esquerdos dos animais ovariectomizados, compondo o material para o controle.

3.8 Determinação de Eicosanóides, TNF- α , IL-6 e IL-10

A dosagem das citocinas TNF- α , IL-6 e IL-10 das amostras de tendão calcâneo foram realizadas pelo teste imunoenzimático (ELISA), seguindo instruções do kit comercial (B&D System, EUA). Para tanto, placas de 96 poços foram sensibilizadas com 100 μ l de anticorpo monoclonal para cada citocina: IL-6 diluído em tampão carbonato de sódio (0,1M, pH 9,6), enquanto anti IL-10 e TNF- α diluídos em tampão fosfato de sódio (0,2M, pH 6,5). As placas foram incubadas (4°C) por 18h. Para o bloqueio, após 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. Em seguida, 100 μ l das amostras devidamente diluídas, os padrões das citocinas recombinantes foram adicionados à placa e deixadas por 18h 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 1h em temperatura ambiente. Após lavagem das placas, o volume de 100 μ l de estreptavidina – peroxidase foi adicionado e deixado por 1h 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 µl/poço de ácido sulfúrico (2 N). A leitura foi realizada em espectrofotômetro Espectra Max plus 384 (Sunnyvale, CA, EUA) em comprimento de onda de 450nm com correção a 570nm. As concentrações das amostras foram calculadas a partir das curvas-padrão obtidas com as citocinas recombinantes. O limite de detecção para IL-10 e TNF- α é de 1,95 pg/ml, enquanto para IL-6 é de 15,6 pg/ml.

3.9 Análise estatística

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.

4.0 RESULTADO

Artigo

HELIGLE C, CARVALHO PTC, CASALECHI HL, HELRIGEL, PA, RABELO RL, AIMBIRE F, ALBERTINI R. Efeitos da terapia LED de baixa potência nos biomarcadores inflamatórios em ratas ovariectomizadas com trauma tendíneo. **Artigo Submetido à revista Laser Medical Science.**

EFFECTS OF LOW-INTENSITY LED THERAPY ON INFLAMMATORY BIOMARKERS OF OVARIECTOMIZED RATS WITH TENDON TRAUMA

Carla Helrigle¹, Paulo de Tarso Camilo de Carvalho¹, Heliadora Leão Casalechi¹, Panmera Almeida Helrigel², Rogério Leão Rabelo², Flavio Aimbire¹, Regiane Albertini^{1*}

1 - Programa de Pós Graduação em Biofotônica aplicada às ciências da saúde, Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, SP, Brasil.

2 - Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Goiás - UFG, Jataí, GO, Brasil.

*Prof. Dra. Regiane Albertini de Carvalho
e-mail: regianealbertini@uninove.br

Abstract: The aim of this experimental study was to investigate the effects of LED phototherapy on the inflammation process in the calcaneal tendon of ovariectomized rats (OVX) through the involvement of inflammatory mediators IL-6, IL-10 and TNF- α . Thirty-five female Wistar rats were divided into 4 groups: 3 ovariectomized groups, untreated (NTTA); treated (TTA) and control subdivided into experimental periods of 3, 7 and 14 days, totaling 30 rats and one group (n = 5) not ovariectomized (not OVX). Tendinitis was induced by trauma using a 208g mass placed at 20 cm from the right tendon of each animal with energy of 0.70 J. The animals were treated 12 hours after tendonitis with LED therapy (945nm, power 32mW, energy of 3.84 J, power density of 0.06 W / cm², energy density of 7.68 J / cm², beam output area of 0.5 cm² and time of 120 s) and every 48 hours at 3, 7 and 14 days. Then, euthanasia was performed in a CO₂ chamber 24h after the last treatment. The tendons were dissected and stored in liquid nitrogen at -196°C, thawed only at the time of immunoenzymatic test (ELISA). After analysis of results, groups treated with LED showed decrease in the number of pro-inflammatory cells, IL-6 and TNF- α (p < 0.05) and increased number of anti-inflammatory IL-10 (p < 0.05) even when compared to the not OVX group (p < 0.05). It was concluded that low-intensity LED in the studied parameters has repairing effect on the tendinopathy process (tendonitis) caused by trauma in female rats (OVX).

Keywords: Inflammation, Ovariectomy, Tendonitis, Cytokines, LED.

INTRODUÇÃO

É bem conhecido que as mulheres são mais propensas a lesões musculoesqueléticas, estudos revelam que os índices de acidentes por lesão estão relacionados com a diferença sexual, sendo a adaptação da tração mecânica sobre o tendão diferenciada entre homens e mulheres [1-3]. A estrutura e composição de alguns tecidos podem ser influenciadas por hormônios sexuais femininos, o estrógeno causa alterações na produção e liberação de colágeno [4]. A diminuição da síntese de colágeno leva a um aumento da degradação do tendão [1,2].

A tendinite é um dos distúrbios mais comuns na sociedade moderna, causando incapacidade devido à dor e inchaço [5]. Em sua patogenia sabe-se que esforços físicos excessivos e repetitivos podem causar micro-traumas nos tecidos, levando a ruptura espontânea dos tendões. A causa mais frequente de uma lesão é o estresse tendíneo, ocorre extensão exacerbada dos tendões acima da capacidade tecidual, com desorganização das fibras tendíneas, levando ao surgimento de um processo hemorrágico e inflamatório [6,7].

A compleição de mediadores químicos faz com que a inflamação mantenha características uniformes mesmo sendo produzida por irritantes díspares. A regulação do processo inflamatório envolve um equilíbrio entre as citocinas pró e anti-inflamatórias. A IL-10, mais notória entre as citocinas anti-inflamatórias, atua em linfócitos infiltrando nas zonas isquêmicas e infartadas e em monócitos e macrófagos inibindo a síntese do TNF-alpha, IL-6 e outras [8-10].

A prevalência de doenças inflamatórias musculoesqueléticas aumenta com o envelhecimento, dentre as mudanças fisiológicas desta faixa etária está à redução hormonal [11,12]. Sendo assim, cada indivíduo acima de 60 anos é um potencial candidato ao uso crônico de fármacos anti-inflamatórios e aos conhecidos efeitos adversos decorrentes deste uso [13]. Com o avanço dos estudos referentes a estas desordens, terapias vêm sendo desenvolvidas com a utilização de recursos eletroterapêuticos como ultra som, o laser e o LED [14].

O uso de terapias com LED emitindo em baixa intensidade surge como alternativa a utilização do laser, uma vez que este apresenta resultados similares e baixo custo [15-17]. No entanto é importante ressaltar que pouco se conhece sobre as consequências da deficiência de estrógeno no tendão e os mecanismos de ação do LED na tendinite. Assim este estudo testa a hipótese que a fototerapia com LED auxilia no processo de reparação tendínea diante da redução do estrógeno. Neste sentido o objetivo foi analisar o efeito da fototerapia com LED (945nm) no processo inflamatório tendíneo induzido por trauma mecânico em tendão de Aquiles de ratas ovariectomizadas.

MÉTODOLOGIA

Aspectos Éticos

Para a realização deste estudo foram seguidas as premissas da COBEA e CRMV (Conselho Regional de Medicina Veterinária) e Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Nove de Julho (UNINOVE). 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: An0022/2012.

Animais

Foram utilizadas 35 ratas, fêmeas, jovens, linhagem *Wistar* (200 ± 20 g), que passaram por um período de ambientação e adaptação de uma semana no biotério, antes do início dos experimentos. Os animais foram mantidos em gaiolas padrão, em grupos aleatórios de cinco animais, mantidos em sala com temperatura e umidade constante (24°C e 60%), iluminação com ciclo de claro e escuro 12 por 12 horas, com água e ração a vontade.

Protocolo de tratamento e grupos experimentais

Noventa dias após a ovariectomia, os animais pesando (240 ± 20 g), foram aleatoriamente distribuídos em três grupos experimentais com períodos de 3 dias, 7 dias e 14 dias sendo subdivididos em tratados e não tratados. Todo material para o grupo controle, ratas ovariectomizadas, foi retirado do tendão contralateral (tendão esquerdo) dos animais nos respectivos períodos. Demonstrados figura 1.

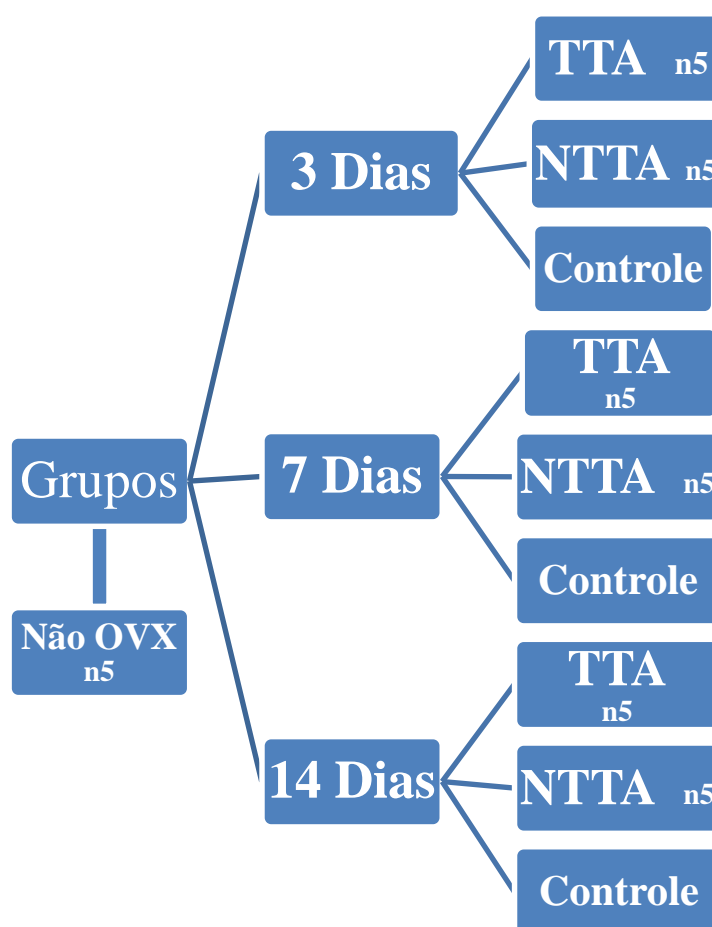


Fig 1 Flowchart of times and groups, each group with two subgroups plus control group of non-ovariectomized rats, totaling 35 animals

Ovariectomia

Os animais submetidos à ovariectomia, foram anestesiados com a combinação de ketamina (40-100 mg/kg, IP) e xilazina (1-5 mg/kg, IP) [18]. A incisão foi feita um dedo a frente da crista ilíaca na parte submetida a tricotomia, em condições assépticas preparadas para a ovariectomia (OVX), bilateralmente os ovários foram identificados, mantido firmemente, e com fio de Nylon amarrados ao redor do oviduto, incluindo os

vasos sanguíneos ovarianos e então removidos. A incisão, pele e parede muscular, foram suturadas [19]. Os animais receberam depois da cirurgia uma injeção de antibiótico Enrofloxacina (5-10 mg/kg, SC) a cada 12h [18].

Após quatorze dias de pós-operatório foi verificado a efetividade do procedimento através do teste de esfregaço [20], onde todos os animais se encontraram com o ciclo estral em diestro. Para início do experimento aguardamos noventa (90) dias [19,21].

Indução da tendinite

As ratas foram anestesiadas com uma combinação de ketamina (40-100 mg/ kg, IP) e xilazina (1-5 mg/ kg, IP) [18] e, posteriormente, submetidos à indução da tendinite. Para o procedimento os animais foram posicionados em decúbito ventral no aparelho, prensa lesionadora CIPEDE®, para a produção da contusão controlada na região medial do tendão do calcâneo direito. Utilizando massa de 208g posicionada a 20 cm do tendão do animal, o impacto da mesma possibilitou uma energia aplicada no tendão de 0,70J.

Terapia LED

Os parâmetros estão detalhados na tabela 1. Antes do início dos experimentos, o equipamento de LED foi aferido com um medidor de potência (Model 13 PEM 001/J, MellersGriot, Netherlands

Tabela 1 Parâmetros de irradiação do LED

Table 1 LED irradiation parameters

Parâmetros de irradiação	LED
Comprimento de onda	945nm (\pm 10nm)
Potência	32mW
Energia	3,84J
Densidade de Potência	0,06W/cm ²
Densidade de energia	7,68J/cm ²
Área de saída do feixe	0,5cm ²
Tempo	120s

Os animais foram posicionados em decúbito ventral e imobilizados manualmente. As patas traseiras foram imobilizadas seguindo-se da aplicação do LED. Para efeito do tratamento os animais foram expostos a radiação LED em dias alternados, ou seja, com um intervalo de 48 horas entre as aplicações, iniciado 12 horas após a indução da

tendinite conforme representado na figura 2, tendo-se o cuidado para que todos tivessem a mesma manipulação diária em mesmo horário.

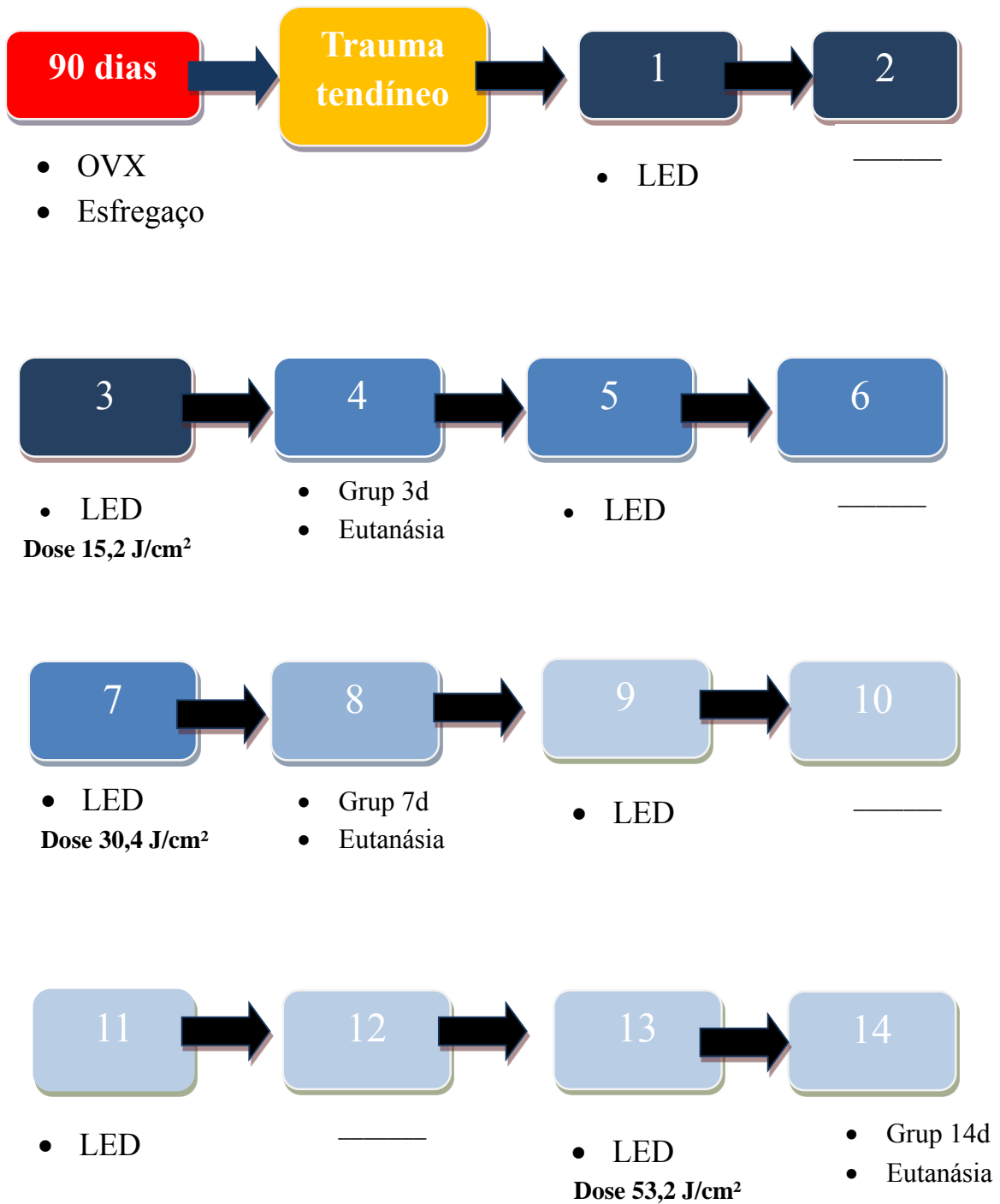


Fig 2 Organization chart of activity and time

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 calcâneo. Em seguida, foram devidamente identificados e armazenados em tubos para criogenia Nalgene®, seguidamente acondicionados em nitrogênio líquido a 196°C negativos, descongelados apenas no momento da realização do teste imunoenzimático (ELISA). Foram retirados os tendões direitos de todos os animais e quatro tendões esquerdos dos animais ovariectomizados compondo o material para o controle.

Determinação de Eicosanóides, TNF- α , IL-6 e IL-10

A dosagem das citocinas TNF- α , IL-6 e IL-10 das amostras de Tendão do calcâneo 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: IL-6 diluído em tampão carbonato de sódio (0,1M, pH 9,6), enquanto anti IL-10 e TNF- α diluídos em tampão fosfato de sódio (0,2M, pH 6,5). As placas foram incubadas (4°C) por 18h. Para o bloqueio, após 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. Em seguida, 100 μ l das amostras devidamente diluídas ou dos padrões das citocinas recombinantes foram adicionados à placa e deixadas por 18h em temperatura de 4°C. Acrescentamos, após lavagem, 100 μ l dos respectivos anticorpos biotinizados específicos de detecção para cada citocina e deixamos por 1h em temperatura ambiente. Após lavagem das placas, o volume de 100 μ l de estreptavidina – peroxidase foi adicionado e deixado por 1h 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 Espectra Max plus 384 (Sunnyvale, CA, EUA) em comprimento de onda de 450nm com correção a 570nm. As concentrações das amostras foram calculadas a partir das curvas-padrão obtidas com as citocinas recombinantes. O limite de detecção para IL-10 e TNF- α é de 1,95 pg/ml, enquanto para IL-6 é de 15,6 pg/ml.

Análise Estatística

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.

RESULTADOS

Os níveis de IL-6 estão menores nos grupos tratados LED quando comparados aos não tratados, com diferença extremamente significativa em todos os períodos (3, 7 e 14 dias) conforme demonstrado na figura 3.

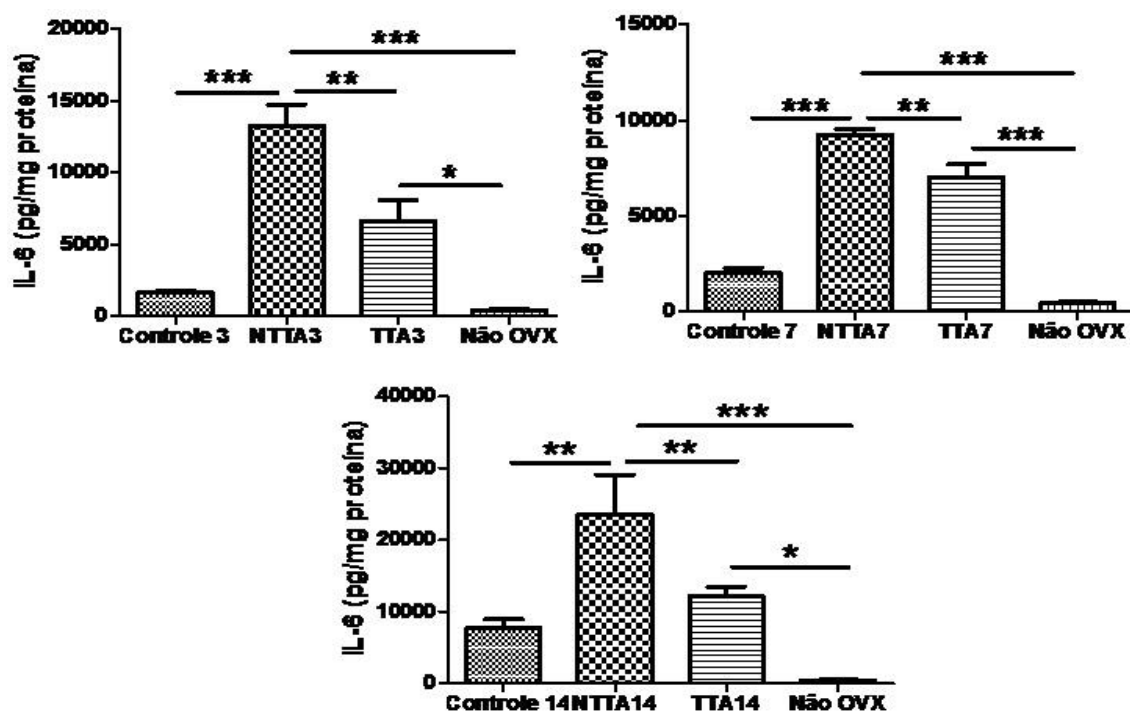


Fig 3 Comparison of IL - 6 levels in the period of 3, 7 and 14 days between control, untreated, treated and not OVX groups. # Indicates significant difference for the other groups *** extremely significant - P values < 0.001. ** P < 0.01 and * significant P < 0.05

Também foi encontrado uma redução estatisticamente significativa na produção do TNF- α no grupo tratado de 3 dias comparado ao não tratado, figura 4 que também demonstra os resultados dos demais períodos experimentais.

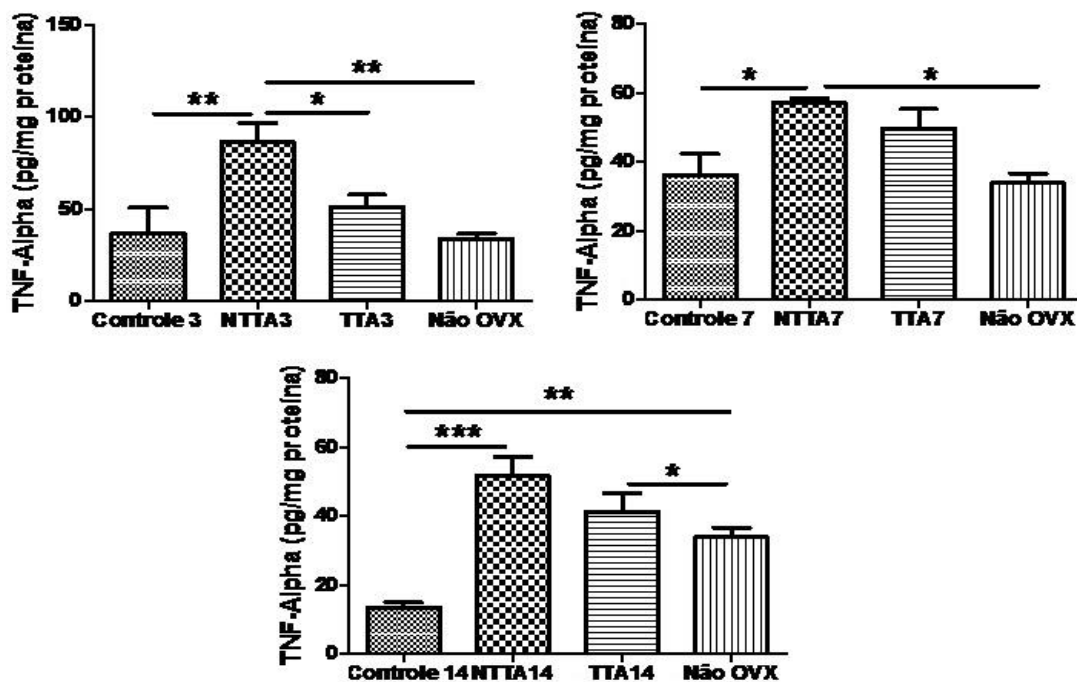


Fig 4 Comparison of TNF- α levels in the period of 3, 7, 14 days between control, untreated, treated and not OVX groups. # Indicates significant difference for the other groups *significant $P < 0.05$ and *** extremely significant - P values < 0.001

Nos níveis da interleucina dez (IL-10) foi observado aumento significativo ao comparar o grupo tratado com o não tratado, no período experimental de 14 dias, também foram observados valores maiores desta citocina, quando comparado o grupo tratado com o grupo não OVX, figura 5 na qual também pode se verificar os outros períodos experimentais.

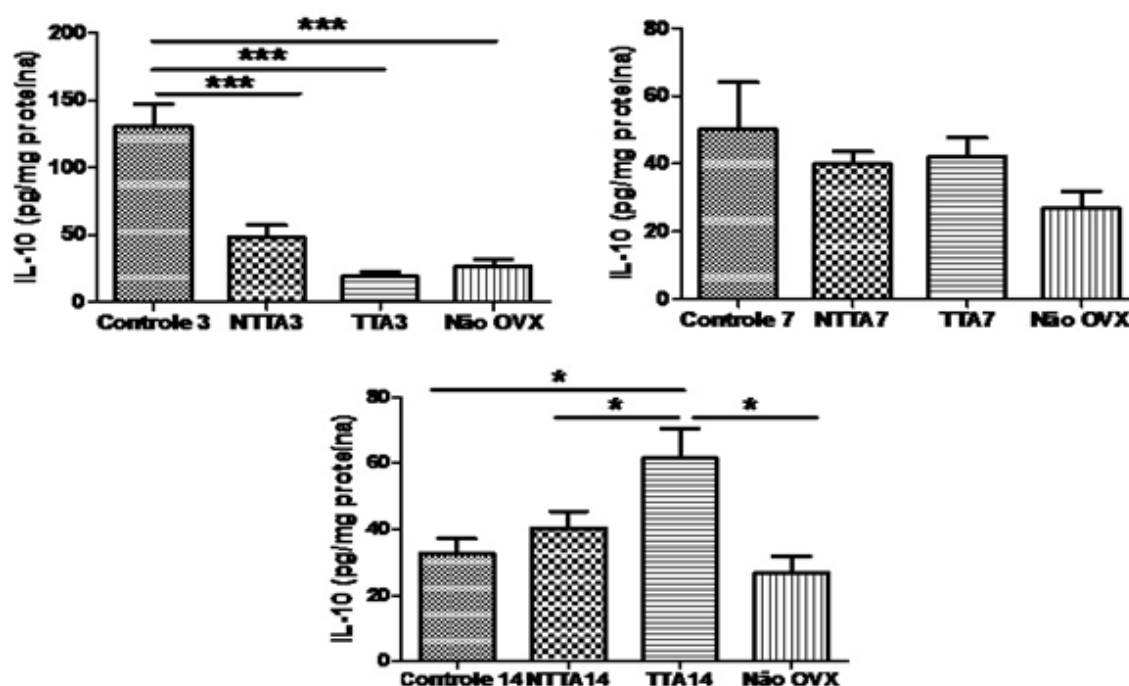


Fig 5 Figure 5 : Graph comparing the IL - 10 levels between control, untreated, treated and not OVX groups, # indicates significant difference for the other groups ***

extremely significant - P values < 0.001 within 3 days; for the period of 7 days, there was no statistically significant difference compared to the IL - 10 levels in 14 days * indicates significant difference P < 0.05

DISCUSSÃO

Os mediadores químicos fazem com que a inflamação mantenha características uniformes, para a regulação do processo inflamatório envolvendo um equilíbrio entre as citocinas pró e anti-inflamatórias. O aumento da IL-10 e a redução da IL-6 e TNF- α é fundamental para este equilíbrio [8-10]. A absorção dos fótons, coerentes ou não, pelos cromóforos através da utilização de fototerapia de baixa intensidade potencializa esta estabilização, minimizando os efeitos da inflamação.

A modulação do processo inflamatório no tendão é indicada pelo aumento dos níveis de mediadores como o TNF- α e as interleucinas os quais estão relacionados à progressão da tendinite [22]. No entanto a IL-10 é uma citocina que impede a inflamação pela inibição de citocinas inflamatórias como IL-6 e o TNF- α [23].

Verificando os níveis das citocinas pró e anti-inflamatorias, através de determinação dos eicosanóides, sobre a ação da terapia LED no processo inflamatório tendíneo, nos grupos tratados quando comparados aos não tratados tanto na fase aguda como crônica, sendo corroborados com achados apresentados por Xavier et al [24], Pires et al [24], Casalechi et al [26] e Xavier et al [27] os quais utilizaram um protocolo igual ao deste estudo, com densidade de energia variando de 7,7 a 7,5J/cm² aplicada a cada 48h.

Os resultados do presente estudo mostraram uma redução nos níveis da IL-6 ao uso do LED como nas pesquisas Laraia et al. [28] utilizando laser, nos estudos de Xavier et al [24] e Pires et al [25] verificando a expressão da IL-6 com a utilização do LED.

Os estudos de Pires et al [25] apresentaram redução na expressão do TNF- α apenas na fase crônica, verificada nos períodos 7 e 14 dias como nos achados de Xavier et al. [24]. Porém o presente estudo verificou redução somente no terceiro dia com a utilização do LED.

Há um aumento significativo na produção IL-10 no período de 14 dias, o que não foi encontrado nos períodos de 3 e 7 dias. Porém nos estudos de Laraia et al [28], em períodos menores verificou-se aumento na produção desta citocina, com a utilização do Laser. Entretanto nos estudos de Xavier et al [27] e Casalechi et al [26] a terapia LED melhorou a expressão RNAm IL-10, na fase inicial de cicatrização do tendão.

Na comparação do grupo Não OVX com o grupo TTA, os níveis de IL-10 foram superiores no grupo tratado com LED (TTA) no período de 14 dias. Esses resultados confirmam que o uso do LED na tendinite em ratas com baixos níveis de estrógeno apresenta respostas positivas na produção de citocinas anti-inflamatórias.

A deficiência de estrógeno reprime o desenvolvimento celular e a resposta inflamatória do tendão Circi et al [29] porém com os nossos achados podemos sugerir que o uso do LED de baixa potência estimula esta resposta inflamatória, aumentando os níveis da citocina anti-inflamatórias (IL-10), logo podendo auxiliar na melhora da cicatrização do tendão.

Entretanto estudos sobre as propriedades do tendão relacionados à deficiência de estrógeno são escassos e incoerentes, Circi et al [29], afirmam que não existe um efeito

direto da deficiência de estrógeno endógeno nas propriedades do tendão de Aquiles em modelos de rato.

Afirma-se que a prevalência de lesões do tecido conjuntivo é maior em mulheres quando comparadas aos homens, devido a diferença hormonal [1]. No entanto Vosseller et al [30], relatam a identificação dos pacientes sem revisão dos prontuários, o que pode ter superestimado o número de mulheres com ruptura do tendão de Aquiles.

Porém Cook et al [31] concluíram que o uso de terapia de reposição hormonal (TRH) pode melhorar a saúde do tendão em mulheres na pós-menopausa, pois em seu estudo as mulheres que não faziam reposição tiveram maior frequência de distúrbios no tendão. Finni et al [32] verificaram o efeito da TRH nas características do tendão, em gêmeas monozigóticas, observando níveis mais elevados de estrogênio o que pode estar associado com o menor tamanho do tendão.

O uso da terapia LED como tratamento para tendinite em baixos níveis de estrógeno apresenta efeitos satisfatórios sobre a inflamação estimulando a liberação de mediadores anti-inflamatórios e consequentemente reprimindo os pró-inflamatórios.

CONCLUSÃO

Foi possível concluir que o tratamento com LED nos parâmetros utilizados e nos tempos estudados reduz a liberação de IL-6 e TNF- α e aumenta a liberação de IL-10, melhorando a reparação do tecido tendíneo em ratas ovariectomizadas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

São necessários mais estudos para levantar o quanto a deficiência de estrógeno agride o tendão e os benefícios da utilização da terapia LED neste tecido sob estas condições.

REFERÊNCIAS

1. LIU SH, AL-SHAIKH RA, PANOSSIAN V, FINERMAN GA, LANE JM (1997) Estrogen affects the cellular metabolism of the anterior cruciate ligament. A potential explanation for female athletic injury. *Am J Sports Med* 25(5):704-9
2. YU WD, PANOSSIAN V, HATCH JD, LIU SH, FINERMAN GA (2001) Combined effects of estrogen and progesterone on the anterior cruciate ligament. *Clin Orthop Relat Res* 383:268-281
3. MAGNUSSON SP, HANSEN M, LANGBERG H, MILLER B, HARALDSSON B, WESTH EK, et al (2007) The adaptability of tendon to loading differs in men and women. *Int J Exp Pathol* 88(4):237-240
4. SHULTZ SJ, KIRK SE, JOHNSON ML, SANDER TC, PERRIN DH (2004) Relationship between sex hormones and anterior knee laxity across the menstrual cycle. *Med Sci Sports Exerc* 36:1165-1174
5. LONGO UG, RONGA M, MAFFULLI N (2009) Achilles tendinopathy. *Sports Med Arthrosc* 17:112-126
6. SALATE ACB (2002) Síndromes por overuseem Tendão de Calcâneo. *Fisioter Bras* 3(6):351-355

7. STERGIOULAS A, STERGIOULA M, AARSKOG R., LOPES-MARTINS RAB, BJORDAL JM (2008) Effects of low-level laser therapy and eccentric exercises in the treatment of recreational athletes with chronic Achilles tendinopathy. *J Sports Med* 36:881
8. MONTES R, RODRIGUEZ W, HURTADO V, PÉREZ A, ROCHA E (2000) Importância de las citocinas y del sistema fibrinolítico en la fisiopatología de la CID y sucontrol. *Rev Iberoamer Tromb Hemostasia* 13:99-115
09. MOURA HV, POMERANTZEFF PMA, GOMES WJ (2001) Síndrome da resposta inflamatória sistêmica na circulação extracorpórea: papel das interleucinas. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 16(4):376-87
10. ESPER RC, MONROY FNN (2001) Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica: nuevos conceptos. *Gac Méd Méx* 137(2):127-34
11. NESTORSON J, MOVIN T, MULLER M, KARLSSON J (2000) Function after Achilles tendon rupture in day elderly. *Acta Orthop Scand* 71(1):64-68
12. COMPSTON JE (2001) Sex steroids and bone. *Physiol Rev* 81(1):419-47
13. BJORDAL JM, LJUNGGREN AE, KLOVNING A, SLORDAL L (2004) Non-steroidal anti-inflammatory drugs, including coxibs, in osteoarthritic knee pain: a meta-analysis of randomised placebo-controlled trials. *Br Med J* 329:1317-20
14. BJORDAL JM, LOPES-MARTINS RAB, 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. *J Sports Med* 40:76-80
15. LIM W, LEE S, KIM I, CHUNG M, KIM M, LIM H, et al (2007) The anti-inflammatory mechanism of 635 nm Light – Emitting – Diode irradiation compared with existing COX inhibitors. *Lasers surg Med* 39:614-621
16. DALL AGNOL MA, NICOLAU RA, LIMA CJ, MUNIN E (2009) Comparative analysis of coherent light action (laser) versus non-coherent light (light-emitting diode) for tissue repair in diabetic rats. *Lasers Med Sci* 24:909-916
17. CASALECHI HL, NICOLAU RA, CASLECHIV L, SILVEIRA JRL, PAULA AMB, PACHECO MTT (2009) The effects of low level light emitting diode on the repair process of Achilles tendon therapy in rats. *Lasers Med Sci* 24:659-665
18. DAMY SB, CAMARGO RS, CHAMMAS R, FIGUEIREDO LFP (2010) Aspectos fundamentais da experimentação animal - aplicações em cirurgia experimental. *Rev Assoc Med Bras* 56(1):103-11
19. FLUES K, PAULINI J, BRITO S, SANCHES IC, CONSOLIM-COLOMBO F, IRIGOYEN MC (2010) Exercise training associated with estrogen therapy induced cardiovascular benefits after ovarian hormones deprivation. *Maturitas* 65:267- 271
20. MARCONDES FK, BIANCHI FJ, TANNO AP (2002) Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol* 62(4A):609-614

21. SHINODA M, LATOUR MG, LAVOIE JM (2002) Effects of physical training on body composition and organ weights in ovariectomized and hyperestrogenic rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26(3):335-43
22. HAYER S, REDLICE K, KORB A, HERMANN S, SMOLEN J, SCHETT G (2007) Tenosynovitis and osteoclast formation as the initial preclinical changes in a murine model of inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum*. 56(1):79-88
23. LIN MT, STORER B, MARTIN PJ, TSENG LH, GOOLEY T, CHEN PJ, HANSEN JA (2003) Relation of an interleukin-10 promoter polymorphism to graft-versus-host disease and survival after hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med* 349:2201-2210
24. XAVIER M, DAVID DR, DE SOUZA RA, ARRIEIRO AN, MIRANDA H, SANTANA ET, et al (2010) Anti-inflammatory effects of low-level light emitting diode therapy on Achilles tendinitis in rats. *Lasers Surg Med* 42:553-558
25. 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* 26:85-94
26. CASALECHI HL, LEAL-JUNIOR EC, XAVIER M, SILVA JA JR, DE CARVALHO PD, AIMBIRE F, et al (2013) Low-level laser therapy in experimental model of collagenase-induced tendinitis in rats: effects in acute and chronic inflammatory phases. *Lasers Med Sci* 28:989-995
27. XAVIER M, SOUZA RA, PIRES VA, SANTOS AP, AIMBIRE F, SILVA JA, et al (2013) Low-level light-emitting diode therapy increases mRNA expressions of IL-10 and type I and III collagens on Achilles tendinitis in rats. *Las Med Sci*. doi: 10.1007/s10103-013-1280-y
28. LARAIA EM, SILVA IS, PEREIRA DM, DOS REIS FA, ALBERTINI R, DE ALMEIDA P, et al (2012) Effect of low-level laser therapy (660 nm) on acute inflammation induced by tenotomy of Achilles tendon in rats. *Photochem Photobiol* 88:1546-1550
29. CIRCI E, AKPINAR S, BALCIK C, BACANLI D, GUVEN G, RAHMI CA, et al (2009) Biomechanical and histological comparison of the influence of oestrogen deficient state on tendon healing potential in rats *International Orthopaedics (SICOT)* 33(5):1461-1466
30. VOSELLER JT, ELLIS SJ, LEVINE DS, KENNEDY JG, ELLIOT AJ, DELAND JT, et al (2013) Achilles Tendon Rupture in Women. *Foot Ankle Int* 34(1):49-53
31. COOK JL, BASS SL, BLACK JE (2007) Hormone therapy is associated with smaller Achilles tendon diameter in active post-menopausal women. *Scand J Med Sci Sports* 17:128-132
32. FINNI T, KOVANEN V, RONKAINEN PHA, PÖLLÄNEN E, BASHFORD GR, KAPRIO J, et al (2009) Combination of hormone replacement therapy and high physical activity is associated with differences in Achilles tendon size in monozygotic female twin pairs. *J Appl Physiol* 106:1332-1337

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando os resultados obtidos por meio deste estudo, novas investigações tornam-se necessárias, visando estudo de novas doses de irradiação, diferentes comprimentos de onda utilizando terapias com LED nas propriedades do tecido tendíneo sobre a deficiência do estrógeno.

REFERÊNCIAS

ABUBAKER, A. O.; HEBDA, P. C.; GUNSOLLEY, J. N.; Effects of sex hormones on protein and collagen content of the temporomandibular joint disc of the rat. **J Oral Maxillofac Surg.**, v.54, p.721–727, 1996.

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, 2007.

ANDRADE, M. F.; RASTELLI, A. S.; SAAD, R. S.; SAAD, J. R. C.; Avaliação de capacidade de polimerização de um novo dispositivo a base de LED á bateria. **J. Am. Dent. Assoc.**,v.4, p.372-376, 2001.

ARAÚJO, K. S.; Efeito da Terapia com LED operando em baixa potência sobre a reparação óssea de ratos – análise por espectroscopia Raman. 2009. **Dissertação (Mestrado em Bioengenharia)**. São José dos Campos: Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, São Paulo. 2009.

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.**, n.21, p.167-176, 2003.

BASTOS, J. L. N.; LIZARRELLI, R. F. Z.; PARIZZOTTO, N. A.; Comparative study of laser and LED Systems of Low Intensity Applied to Tendon Healing. **Laser Phys.**, v.19, n.9, p.1925-1931, 2009.

BEVILACQUA, I. M.; NICOLAU, R. A.; KHOURI, S.; BRUGNERA, A. J. R.; TEODORO, G. R.; ZÂNGARO, R. A.; The impact of photodynamic therapy on the viability of *Streptococcus mutans* in a planktonic culture. **Photomed Laser Surg.** v. 25, n.6, p.513-8, 2007.

BICUDO, L. L.; Utilização de LEDs na mucosite oral em pacientes com linfoma de Hodgkin clássico – estudo de caso. 2004. 58f. **Dissertação (Mestrado em**

Odontologia) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. São Paulo. Universidade de São Paulo, 2002.

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.** v. 329, p. 1317-20, 2004.

BRENNAN, F. M.; MAINI, R. N.; FELDMANN, M.; Role of pro-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. **Immunopathol.**, v. 20, p. 133-147, 1998.

BRYANT, A. L.; CLARK, R. A.; BARTOLD, S.; MURPHY, A.; BENNELL, K. L.; HOHMANN, E. et al. Effects of estrogen on the mechanical behavior of the human Achilles tendon in vivo. **J Appl Physiol.** v. 105, p. 1035-1043, 2008.

BUCHBINDER RS, GREENS, YOUNG JM. Corticosteroid injections for shoulder pain (Cochrane Review). *Cochrane Database Syst Rev.* 2003;1:CD004016.

CARVALHO, P.T.C.; SILVA, I. S.; REIS, F.A.; Histological study of tendon healing in malnourished Wistar rats treated with ultrasound therapy. **Acta Cirúrgica Brasileira.** v. 21, n. 13, (Suplemento 4), 2006.

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.

CASALECHI, H. L.; NICOLAU, R. A.; CASALECHI, V. L.; SILVEIRA, J. R. 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.

CASEY, L. C. Role of the cytokines in the pathogenesis of cardiopulmonary-induced multisystem organ failure. **Ann Thorac Surg.**, v. 56, s. 5, p. S92-6, 1993.

CHERRY, N. M.; MEYER, J. D. Thereposted incidence of work-related demusculoskeletal disease in the UK. **Occup. med.**, v. 51, n.7, p.450-455, 2001.

CHIODO, C. P.; WILSON, M. G. Current concepts review: acute ruptures of the Achilles tendon. **Foot Ankle Int.**, v. 27, p. 305–313, 2006.

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

CIRCI, E.; AKPINAR, S.; BALCIK, C.; BACANLI, D.; GUVEN, G.; RAHMI, C. A.; ISMAIL, C. T. Biomechanical and histological comparison of the influence of oestrogen deficient state on tendon healing potential in rats International. **Orthopaedics (SICOT)**., v. 33, n. 5, p. 1461-1466, 2009.

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

COMPSTON, J. E. Sex steroids and bone. **Physiological Reviews.**, v.81, n.1, p. 419-47, 2001.

CONTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia Estrutural e Funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 1485 p.

CORAZZA, A. V. **Fotobiomodulação comparativa entre o Laser e LED de baixa intensidade na angiogênese de feridas cutâneas de ratos**. 2005. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Escola de Engenharia de São Carlos; Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2005.

COVIZI, D. Z.; FELISBINO, S. L.; GOMES, L.; PIMENTEL, E. R.; CARVALHO, H. F. Regional adaptations in threerattendons. **Tissue Cell**. v. 33, n. 5, p. 483-90, 2001.

DALL AGNOL, M. A.; NICOLAU, R. A.; LIMA, C. J.; 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.**, v. 24, p. 909-916, 2009.

DAMY, S. B.; CAMARGO, R. S.; CHAMMAS, R.; FIGUEIREDO, L. F. P. Aspectos fundamentais da experimentação animal - aplicações em cirurgia experimental. **Ver Assoc Med Bras.**, v. 56, n. 1, p. 103-11, 2010.

ESPER, R. C.; MONROY, F. N. N. Síndrome de respuestainflamatoria sistémica: nuevos conceptos. **Gac Méd Méx.**, v. 137, n. 2, p. 127-34, 2001.

FARIA, E. T. B.; **Estudo dos efeitos da terapia com luz coerente e não coerente sobre a reparação tendínea através da espectroscopia Raman e análise histopatológica.** 2006. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) 2006. São José dos Campos: Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, São Paulo.

FELSON, D. T.; LOWRENCE, R. C.; DIEPPE, P. A.; HIRSCH, R.; HELMICK, C. G.; JORDAN, J. M.; KINGTON, R. S.; LANE, N. E.; NEVITT, M. C.; ZNAG, Y.; SOWERS, M.; MCALIDON, T.; SPECTON, T. D.; POOLE, A. R.; YANOVSKI, S. Z.; ATESHIAN, G.; SHARMA, L.; BUCKWALTER, J. A.; BRANT, K. D.; FRIES, J. F. osteoarthritis: new insights. Part 1: The factors disease and its risk factors. **Ann Intern Med.**, v. 133, n. 8, p. 633-646, 2000.

FISCHER, G. M. Comparison of collagen dynamics in different tissues under the influence of estradiol. **Endocrinology.**, v. 93, p. 1216–1218, 1973.

FLUES, K.; PAULINI, J.; BRITO, S.; SANCHES, I. C.; CONSOLIM-COLOMBO, F.; IRIGOYEN, M. C. Exercise training associated with estrogen therapy induced cardiovascular benefits after ovarian hormones deprivation. **Maturitas.**, v. 65, p. 267-271, 2010.

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

FRANCISCO, G.; HERNÁNDEZ, C.; SIMÓ, R. Serum markers of vascular inflammation in dyslipidemia. **Clin Chim Acta.**, v. 369, p. 1-16, 2006.

FRANGOIANNIS, N. G.; YOUKER, K. A.; ROSSEN, R. D.; GWENCHENBERG M., LINDEY M. H.; MENDOZA, L. H.; MICHAEL, L. H.; BALLANTYNE, C. M.; SMITH, C. W.; ENTMAN, M. L. Cytokines and the microcirculation in ischemia and reperfusion. **J Mol Cell Cardiol.**, v. 30, p. 2567-76, 1998.

GRAY, T. K. Estrogens and skeleton: cellular and molecular mechanisms. **J Steroid Biochem.**, v. 34, n. 1-6, p. 285-7, 1989.

GRUNFELD, C.; PALLADINO, M. A. Tumor necrosis factor: immunologic, antitumor, metabolic, and cardiovascular activities. **Adv Intern Med.**, v. 35, p. 45-72, 1990.

HAMA, H.; YAMAMURO, T.; TAKEDA, T. Experimental studies on connective tissue of capsular ligament – influences of aging and sex-hormones. **Acta Orthopaedica Scandinavica.**, v. 47, p. 473–479, 1976.

HAUSER, G. J.; BEM-ARI, J.; COLVIN, M. P. et al. Interleukin-6 levels in serum and lung lavage fluid of children undergoing open heart surgery correlate with postoperative morbidity. **Intensive Care Med.**, v. 24, p. 481-6, 1998.

HAYER, S.; REDLICE, 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.

HEITZ, NED A., EISENMAN, PATRICIA A.; BECK, CHARLES L.; WALKER, J. A. Hormonal Changes Throughout the Menstrual Cycle and Increased Anterior Cruciate Ligament Laxity in Females **Journal of Athletic Training.**, v. 34, n. 2, p. 144-149, 1999.

HERNANDEZ, I.; DELGADO, J. L.; DIAZ, J.; QUESADA, T.; TERUEL, M. J.; LLANOS, M. C., et al. 17Beta-estradiol prevents oxidative stress and decreases blood pressure in ovariectomized rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, v. 279, p. R1599- R1605, 2000.

HILL, G. E.; POHORECKI, R.; WHITTEN, C. W. Plasma lipid concentrations correlate inversely with CPB-induced interleukin-6 release. **Can J Anaesth.**, v. 45, p. 509-14, 1998.

IRIGOYEN, M. C.; PAULINI, J.; FLORES, L. J.; FLUES, K.; BERTAGNOLLI, M.; MOREIRA, E. D., et al. Exercise training improves baroreflex sensitivity associated with oxidative stress reduction in ovariectomized rats. **Hypertension.** v. 46, p. 998-1003, 2005.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histología básica.** 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 92-124.

KARU, T. I. Cellular mechanism of low power laser therapy. In: SIMUNOVIC, Z. (org.). Karu Tiina. Lasers in medicine and dentistry: basic science and up-to-date clinical application of Low Energy-Level Laser Therapy - LLLT. **Croatia: Vitagraf.**, 2000; p.79-100.

KARU, T. I.; KOLYAKOV, S. F. Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. **Photomed Laser Surg.**, v. 23, n. 4, p. 355-61, 2005.

KURACHI, C.; TUBOY, A. M.; MAGALHÃES, D. V.; BAGNATO, V. S. Hardness evaluation of a dental composite polymerized with experimental led-based devices. **Dental Materials.**, v.17, p. 309-315, 2001.

LANGBERG, H.; KONGSGAARD, M. Eccentric training in tendinopathy-more questions than answers. **Scand J Med Sci Sports.**, v. 18, n. 5, p. 541-42, 2008.

LARAIA EM, SILVA IS, PEREIRA DM, DOS REIS FA, ALBERTINI R, DE ALMEIDA P, LEAL JUNIOR EC, DE TARSO CAMILLO DE CARVALHO P (2012) Effect of low-level laser therapy (660 nm) on acute inflammation induced by tenotomy of Achilles tendon in rats. **Photochem Photobiol.**, 21. doi:10.1111/j.1751-1097.2012.01179.x

LATOURET, M. G. M.; SHINODA, J. M.; LAVOIE, J. M. Metabolic effects of physical training in ovariectomized and hyperestrogenic rats. **J Appl Physiol.**, v. 90, n. 1, p. 235-41, 2001.

LIU, S. H.; AL-SHAIKH, R. A.; PANOSSIAN, V.; FINERMAN, G. A.; LANE, J. M. Estrogen affects the cellular metabolism of the anterior cruciate ligament. A potential explanation for female athletic injury. **Am J Sports Med.**, v. 25, n. 5, p. 704–9, 1997.

LONGO, U. G.; RONGA, M.; MAFFULLI, N. Achilles tendinopathy. **Sports Med Arthrosc.**, v. 17, p. 112–126, 2009.

LOPEZ-ARMADA, M. J.; CARAMES, B.; LIRES-DEAN, M.; CILLERO-PASTOR, B.; RUIZ-ROMERO, C.; GALDO, F.; BLANCO, F. J. 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, A. H. A; RODRIGUES, K. C.; MORAIS, K. C. M. Terapia fotodinâmica com LED e diferentes fotossensibilizantes. In: CBEB- Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, 21., 2008, Salvador. **Anais...** Salvador: GT5 Brasil, 2008. p. 1158-60.

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.; EWEN, S. W.; WATERSTON, S. W.; REAPER, J.; BARRASS, V. Tenocytes from ruptured and tendinopathic achilles tendons produce greater quantities of type III collagen than tenocytes from normal achilles tendons. An in vitro model of human tendon healing. **Am J Sports Med.**, v. 28, n. 4, p. 499-505, 2000.

MAFFULLI, N.; KADER, D. Tendinopathy of tendoachillis. **J Bone Joint Surg Br.**, v. 84, n. 1, p. 1-8, 2002.

MAGNUSSON, S. P.; HANSEN, M.; LANGBERG, H.; MILLER, B.; HARALDSSON, B.; WESTH, E. K.; KOSKINEN, S.; AAGAARD, P.; KJAER, M. The adaptability of tendon to loading differs in men and women. **Int J ExpPathol.**, v. 88, n. 4, p. 237-240, 2007.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Braz J Biol.**, v. 62, n. 4A, p. 609-614, 2002.

MAVROPOULOS, A.; STAUDT, C. B.; KILIARIDIS, S.; KREJCI, I. Light curing time reduction: in vitro evaluation of new intensive light-emitting diode curing units. **Eur J Orthod.**, v. 27, n. 4, p. 408-12, 2005.

MEDEIROS, I. S. **Dispositivos LED para polimerização de resinas compostas dentais: comparação com outra fonte de luz.** 2001, (Dissertação). Universidade de São Paulo. 2001.

MILLER, B. F.; HANSEN, M.; OLESEN, J. L.; FLYVBJERG, A.; SCHWARZ, P.; BABRAJ, J. A.; et al. No effect of menstrual cycle on myofibrillar and connective tissue protein synthesis in contracting skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v. 290, p. E163-E168, 2006.

MONTES, R.; RODRIGUEZ, W.; HURTADO, V.; PÉREZ, A.; ROCHA, E. Importância de las citocinas y del sistema fibrinolítico en la fisiopatología de la CID y su control. **Rev Iberoamer Tromb Hemostasia.**, v. 13.p. 99-115, 2000.

MOUNTCASTLE, S. B.; POSNER, M.; KRAGH, J.F.; TAYLOR, D. C. Gender differences in anterior cruciate ligament injury vary with activity: epidemiology of anterior cruciate ligament injuries in a young, athletic population. **Am J Sports Med.**, v. 35, n. 10, p. 1635–1642, 2007.

MOURA JÚNIOR, M. J. **Estudo por FT-Raman do LED de baixa potência e do ultrassom terapêutico em modelo experimental de tendinite em ratos**. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica). São José dos Campos: Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, São Paulo; 2010.

MOURA, H. V.; POMERANTZEFF, P. M. A.; GOMES, W. J. Síndrome da resposta inflamatóriasistêmica na circulação extracorpórea: papel das interleucinas. **Rev Bras Cir Cardiovasc.**; v. 16, n. 4, p. 376-87; 2001.

NEUGARTEN, A. A.; JUN L.; SHARON, S. Selective estrogen receptor modulators suppress mesangial cell collagen synthesis. **Am J Physiol Renal Physiol.** v. 279, p. F309-F318, 2000.

PAAVOLA, M.; KANNUS, P.; JÄRVINEN, T. A.; KHAN, K.; JÓZSA, L.; JÄRVINEN M. Achilles tendinopathy. **J Bone Joint Surg Am.**, v. 84-A, n. 11, p. 2062-76, 2002.

PACHECO, M. T. T. **Laseres Noções Básicas**. São José dos Campos: UNIVAP - Universidade do Vale do Paraíba; 2007.

PARENTE, M. **Análise do efeito do LED (Light EmittingDiode) de 640 nm no modelo experimental de tendinopatia traumática em ratos desnutridos**. 2012. 100 f. Dissertação (Mestrando em Ciências da Reabilitação) São Paulo: Programa de Pós Graduação em Ciências da Reabilitação, Universidade Nove de Julho – UNINOVE, São Paulo, Brasil, 2012.

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, p. 85–94, 2011. doi:10.1007/s10103-010-0811-z

- RORIES, C.; SPELSBERG, T. C. Ovarian steroid action on gene expression: mechanisms and models. **Annu Rev Physiol.**, v. 51, p. 653-81, 1989.
- SALATE, A. C. B. Síndromes por *overuse* em Tendão de Calcâneo. **Fisioter Bras.**, v. 3, n. 6, p. 351-355, 2002.
- SANDMEIER, R.; RENSTRÖM, P. A. Diagnosis and treatment of chronic tendon disorders in sports. **Scand J Med Sci Sports.**, v. 7, p. 96–106, 1997.
- 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.
- SHARMA, P.; MAFFULLI, N. Tendon injury and tendinopathy: healing and repair. **J Bone Jt Surg Am.**, v. 87, n. 1, p. 187–202, 2005.
- SHINODA, M.; LATOUR, M. G.; LAVOIE, J. M. Effects of physical training on body composition and organ weights in ovariectomized and hyperestrogenic rats. **Int J Obes Relat Metab Disord.**, v. 26, n. 3, p. 335-43, 2002.
- SHULTZ, S. J., KIRK, S. E., JOHNSON, M. L., SANDER, T. C., PERRIN, D. H. Relationship between sex hormones and anterior knee laxity across the menstrual cycle. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 36, p. 1165–1174, 2004.
- SILVA, J. M. N.; CARVALHO J P, JÚNIOR M J. Morphometric study of low power LED therapy tendonitis in rats. **Fisiot Pesq.**, São Paulo, v.18, n.4, p. 365-70, 2011.
- SILVA, J. M. N.; CARVALHO, J. P.; MOURA JÚNIOR, M. J.; ARISAWA, E. A. L. S.; MARTIN, A. A.; SÁ, H. P., et al. Estudo da ação do ultrassom terapêutico em modelo experimental de tendinite em ratos Wistar. **Consciência e Saúde**, v. 9, n. 4, p. 625-32, 2010.
- SLAUTERBECK, J.; CLEVINGER, C.; LUNDBERG, W.; BURCHFIELD, D. M. Estrogen level alters the failure load of the rabbit anterior cruciate ligament. **Journal of Orthopaedic Research.**, v. 17, p. 405–408, 1999.
- SMITH, K. C. Laser (and LED) therapy is phototherapy. **Photomed Lases Surg.** v. 23, p. 78-80, 2005.

STAHL, L.; ASHWORTH, S. H.; JANDT, K. D.; MILLS, R. W. Light-emitting diode (led) polymerization of dental composites: flexural properties and polymerization potential. **Biomaterials**, v. 21, p. 1379-1389, 2000.

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 achillestendinopathy. **J Sports Med.**, v. 36, p. 881, 2008.

TORTAMANO, A., LENZI, D. C., HADDAD, A. C., BOTTINO, M. C., DOMINGUEZ, G. C., VIGORITO, J. W. Low-level Laser for pain caused by placement of the first orthodontic archwire: a randomized clinical trial. *am. J orthod dento facial*; v. 136, n. 5, p. 662-7, 2009.

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.

TROWBRIDGE, H. O.; EMLING, R. C. **Regeneração e cicatrização**. In:_____ *Inflamação: uma revisão do processo*. 4 ed. São Paulo: Quintessence, cap. 7. p. 146-7. 1996.

TURNER, R. T.; RIGGS, B. L.; SPELSBERG, T. C. Skeletal effects of estrogen. **Endocrine Rev**, v. 15, n. 3, p. 275-300, 1994.

VAN DEUREN, M.; DOFFERHOFF, A. S. M.; VAN DER MEER, J. W. Cytokines and the response to infection. **J Pathol.**, v.168, p. 349-356, 1992.

VIANA, F. A. B. **Guia Terapêutico Veterinário**. Belo Horizonte: CEM, 2003. p. 75,91, 165, 198.

WIIK, A.; ELKMAN, M.; JOHANSSON, O.; JANSSON, E.; ESBJOMSSON, M.; Expression of both oestrogen receptor alpha and beta in human skeletal muscle tissue. **Histochemistry and Cell Biology**. v. 131, p. 181-9, 2009.

WILLERSON, J. T.; RIDKER, P. M. Inflammation as a cardiovascular risk factor. **Circulation.**, v. 109, p. 2-10, 2004.

WILLIAMS, C. L.; STANGEL, G. M. **Estrógenos e progestogênios**. In: GOODMAN, GILMAN. As bases farmacológicas da terapêutica. 9. ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, 1996. cap. 57, p. 1045-67.

WOJTYS, E. M.; HUSTON, U.; LINDENFELD, T.N.; HEWETT, T. E.; GREENFIELD, M. L. Association between the menstrual cycle and ACL injuries in female athletes. **Am J Sports Med.**, v. 26, p. 614-619, 1998.

XAVIER, M.; SOUZA, R. A.; PIRES, V. A.; SANTOS, A. P.; AIMBIRE, F.; SILVA, J. A.; 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 in Medical Science**. 2013. DOI 10.1007/s10103-013-1280-y

XAVIER, M.; DAVID, D. R.; DE SOUZA, R. A.; ARRIEIRO, A. N.; MIRANDA, H.; SANTANA, E. T.; SILVA, J. A. JR.; SALGADO, M. A. C.; AIMBIRE, F.; ALBERTINI, R. Anti-inflammatory effects of low-level light emitting diode therapy on Achilles tendinitis in rats. **Lasers Surg Med.**, v. 42, p. 553–558, 2010.

YU, W. D.; PANOSSIAN, V.; HATCH, J. D.; LIU, S. H.; FINERMAN, G. A. Combined effects of estrogen and progesterone on the anterior cruciate ligament. **Clin Orthop Relat Res.**, v. 383, p. 268-281, 2001.

YUDKIN, J. S.; STEHOUWER, C. D. A.; EMEIS, J. J.; COPPACK, S.W. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potencial role for cytokines originating from adipose tissue? **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 19, p. 972-8. 1999.