

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO – UNINOVE
Programa de Pós Graduação em Ciências da Reabilitação

ANNA CRISTINA DE FARIAS MARQUES

EFEITO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE NO COLÁGENO TIPO I E III E
NA METALOPROTEINASE DE MATRIZ EM MODELO EXPERIMENTAL DE
TENDINOPATIA INDUZIDA POR COLAGENASE EM TENDÃO CALCÂNEO
DE RATAS IDOSAS

São Paulo, SP
2015.

ANNA CRISTINA DE FARIAS MARQUES

EFEITO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE NO COLÁGENO TIPO I E III E
NA METALOPROTEINASE DE MATRIZ EM MODELO EXPERIMENTAL DE
TENDINOPATIA INDUZIDA POR COLAGENASE EM TENDÃO CALCÂNEO
DE RATAS IDOSAS

Trabalho apresentado à Universidade Nove
de Julho para a obtenção do título de Mestre
em Ciências da Reabilitação.

Orientador: Prof. Dr. Paulo de Tarso Camillo
de Carvalho

Co-orientadora: Profa. Dra. Regiane
Albertini de Carvalho

SÃO PAULO, SP

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Marques, Anna Cristina de Farias Marques.

Efeito do laser de baixa intensidade no colágeno tipo I e III na metaloproteinase de matriz em modelo experimental de tendinopatia induzida por colagenase em tendão calcâneo de ratas idosas. /Anna Cristina de Farias Marques.2015.

73 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2015.

Orientador (a): Prof. Dr. Paulo de Tarso Camillo de Carvalho.

*1. Tendão calcâneo. 2. Tendinopatia. 3. Colagenase. 4. Laser de baixa intensidade. 5. Envelhecimento. 6. Colágeno. 7. MMP. 8. VEGF.
I. Carvalho, Paulo de Tarso Camillo de. II. Título*

CDU 615.8

São Paulo, 18 de dezembro de 2015.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno(a): Anna Cristina de Farias Marques

Título da Dissertação: "Efeito do laser de baixa intensidade no colágeno tipo I e II na metaloproteinase de matriz em modelo experimental de tendinopatia induzida por colagenase em tendão calcâneo de ratas idosas".

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



Membro: PROF. DR. RODRIGO LABAT MARCOS



Membro: PROF. DR. LUCIO FRIGO



Dedicatória

Dedico o presente trabalho a Deus e a meus pais,
Dulcinéa e José Marques, por todo ensinamento!

“Eu, tendo nascido de bons pais, recebi,
portanto, alguma instrução em todo
o conhecimento de meus pais; e tendo
passado muitas aflições no decurso de
meus dias, fui, não obstante, altamente
favorecido pelo Senhor em todos os meus dias...”

(I Nefi 1:1)

Vento Oportuno

**“Para ir da oportunidade ao êxito é preciso enfrentar o medo de mudança,
romper com o mesmo e ter a capacidade de se antecipar.”**

(Mário Sérgio Cortella – Qual é a tua obra?)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar-me em todos os momentos.

À minha amada família Marques, em especial minha Mãe, Dulcinéa Marques, por acreditar em mim.

À minha querida família Nassim, em especial meus irmãos, Silvia e Jorge Nassim, pelo apoio.

À minha grande amiga Evela, pela sincera parceria de anos, em vários âmbitos da vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo de Tarso Camillo de Carvalho, por toda paciência e ensinamentos.

À minha Co-orientadora, Profa. Dra. Regiane Albertini de Carvalho pela oportunidade.

Aos Professores dos programas de Pós-graduação, em especial Profa. Dra. Daniela Teixeira e Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos, que de várias formas contribuíram para realização deste trabalho.

Aos técnicos do laboratório, em especial à Ângela, por toda disposição em ajudar!

A todos os colegas do laboratório, em especial à Luciana, Simone, Heliadora, Carolina Araruna e Vanessa, pela amizade e ajuda em todos os momentos desta longa jornada do Mestrado.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo auxílio financeiro.

E a todos que direta ou indiretamente me ajudaram a trilhar esse caminho, tornando o meu fardo muito mais leve. Em especial Marina Odília, Felipe Oliva Toledo, KaLee Mortensen e Guto Hazuki.

Meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

1 CONTEXTUALIZAÇÃO	14
1.1 ENVELHECIMENTO	14
1.2 TENDÃO.....	15
1.3 TENDINOPATIAS.....	16
1.4 COLÁGENO	17
1.5 METALOPROTEINASE DE MATRIZ (MMP)	19
1.6 VASCULAR ENDOTHELIALGROWTHFACTOR – FATOR DE CRESCIMENTO VASCULAR ENDOTELIAL (VEGF)	21
1.7 LASER DE BAIXA INTENSIDADE (LBI)	22
2 OBJETIVOS:.....	24
2.1 OBJETIVO GERAL:	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 ANIMAIS E ASPECTOS ÉTICOS.....	25
3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS	25
3.3 MODELO EXPERIMENTAL DE TENDINOPATIA INDUZIDA POR COLAGENASE	26
3.4 TERAPIA LASER DE BAIXA INTENSIDADE (TLBI).....	27
3.5 EUTANÁSIA	29
3.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA	29
3.7 COLÁGENO - TIPO DE ANÁLISES MORFOMÉTRICAS.....	30
3.8 IMUNOHISTOQUÍMICA.....	30
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
4 RESULTADOS.....	32
4.1 ARTIGO.....	32
5 DISCUSSÃO	55
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
8 ANEXO 1 – APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA	72
9 ANEXO 2- CERTIFICADO DE EDIÇÃO DO INGLÊS	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros do Laser.....	29
------------------------------------	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura interna do tendão	15
Figura 2: Estrutura interna do colágeno.....	17
Figura 3: Fluxograma dos grupos experimentais.....	26
Figura 4: Aplicação da Colagenase.....	27
Figura 5: Modelo de Laser utilizado.....	27
Figura 6: Posicionamento para irradiação com o Laser.....	28
Figure 1 (paper): Comparison of the results in 7, 14 and 21 days (Collagen I and III)	51
Figure 2 (paper): Comparison of the results in 7, 14 and 21 days (MMP 3)	52
Figure 3 (paper): Comparison of the results in 7, 14 and 21 days (MMP 9)	53
Figure 4 (paper): Comparison of the results in 7, 14 and 21 days (VEGF)	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IL	Interleucina
IL-1	Interleucina-1
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
J	Joule
LBI	Laserterapia de baixa intensidade
TLBI	Terapia Laser de Baixa Intensidade
W	Watts
mW	Milliwatts
nm	Nanometro
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TIMP	Inibidor de tecido das metaloproteinases
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinase
MMPs	Metaloproteinases

Resumo

O objetivo deste estudo foi investigar O Efeito da terapia Laser de baixa intensidade no Colágeno tipo I e III, Metaloproteinase e VEGF em Modelo Experimental de Tendinopatia, em ratas fêmeas idosas. A colagenase foi induzida na região peritendínea no tendão Calcâneo dos animais. Quarenta e duas ratas Wistar (*Norvegicus albinus*) foram utilizadas no estudo, com grupos consistindo de 36 animais idosos (18 meses de idade; com média da massa, 517.7 ± 27.54 g) e 6 animais adultos (12 semanas de idade; média da massa, $266, 19:30 0 \pm$ g). Os animais foram randomizados e divididos em três grupos, Controle, tendinopatia idoso e tendinopatia Laser idoso, e subdividido em três grupos experimentais, 7, 14 e 21 dias. O tratamento com Laser de baixa intensidade foi aplicado utilizando um Laser Arseneto de Galium e Alumínio (AsGaAl) (Theralaser, DMC®) operando no comprimento de onda de 830nm (± 10 nm), 50 mW de potência, saída do feixe de $0,028 \text{ cm}^2$, densidade de energia de 107 J/cm^2 , densidade de potência $1,7 \text{ w/cm}^2$ e energia de 3 J, com uma frequência de 3 vezes por semana, até a data da eutanásia (7, 14 e 21 dias). Foram analisados VEGF e MMP 3 e 9 por meio de Imunohistoquímica e Colágeno tipo I e III por Sirius red. Os resultados sugerem que a Terapia a Lesar de Baixa Intensidade foi capaz de aumentar os níveis de Colágeno tipo I e III de maneira gradual e com significativa diferença no grupo Tendinpatia Idoso ($p < 0,001$), isso pode ser observado em relação ao VEGF ($p < 0.001$), foi também observado diminuição da expressão de MMP 3 e MMP 9 em relação ao grupo tendinopatia Idoso, com diferença estatística ($p < 0,001$). Nós concluímos que a terapia Laser de Baixa Intensidade foi capaz de diminuir a produção de Colágeno tipo I e III, reduzir a expressão de MMP 3 e 9, e aumentar a expressão de VEGF, mesmo nas ratas fêmeas idosas com deficiência hormonal causada pela idade.

Palavras-chave: Tendão Calcâneo, Tendão de Aquiles, tendinopatia, colagenase, LASER de Baixa Intensidade, envelhecimento, Colágeno, MMP, VEGF.

Abstract

This study investigates the effect of low-level laser therapy (LLLT) on collagen type I and III, matrix metalloproteinase (MMP), and vascular endothelial growth factor (VEGF) in experimentally induced tendinopathy in female aged rats. Tendinopathy was induced by collagenase peritendinous of the Achilles tendon. Forty-two Wistar rats (*Norvegicus albinus*) were used; groups consisted of 36 aged animals (18 months old; mean body weight, 517.7 ± 27.54 g) and 6 adult animals (12 weeks old; mean body weight, 266 ± 19.30 g). The animals were randomly divided in three groups: control, aged tendinopathy, and aged tendinopathy LLLT; the aged groups were subdivided according to experimental periods: 7, 14, and 21 days. LLLT involved a gallium-arsenide-aluminum laser (Theralaser, DMC®) with active medium operating at wavelength 830 ± 10 nm, 50 mW power, 0.028 cm² laser beam, 107 J/cm² energy density, 1.7 W/cm² power density, and 6 J of energy, with a frequency of 3 times per week, until euthanasia. VEGF, MMP-3, and MMP-9 were analyzed by immunohistochemistry, and collagen type I and III by Sirius red. LLLT increased the deposition of collagen type I and III in a gradual manner, with significant differences relative to the group aged tendonitis ($p < 0.001$), and in relation to VEGF ($p < 0.001$); decreased expression of MMP-3 and 9 was observed in group aged tendinopathy ($p < 0.001$). LLLT, therefore, increased the production of collagen type I and III, downregulated the expression of MMP-3 and MMP-9, and upregulated that of VEGF, with age and age-induced hormonal deficiency.

Keywords: Calcaneal tendon, Achilles tendon, tendinopathy, collagenase, LLLT, aged, Collagen, MMP, VEGF.

1 Contextualização

1.1 Envelhecimento

O envelhecimento está relacionado ao declínio na homeostase e capacidade regenerativa de todos os tecidos e órgãos, podendo assim haver uma diminuição na funcionalidade. Essas alterações funcionais refletem os efeitos deletérios da idade (LIU, 2011).

Envelhecimento dos tendões ou ainda tendinopatia crônica são frequentemente responsáveis por deficiências na meia idade e em idosos. Com o envelhecimento, o tecido tendíneo sofre uma série de mudanças morfológicas e bioquímicas, as quais envolvem células e Matriz Extracelular (MEC). A MEC aumenta de volume, causando uma relativa diminuição do número de células no tecido. Durante o envelhecimento, mudanças paralelas, ocorrem nas fibras elásticas, as quais diminuem em número, havendo aparecimento de alterações estruturais (NOURISSAT, 2013; IPPOLITO, 1980).

O envelhecimento e a deficiência de estrógeno podem reduzir constituintes da MEC. Esta diminuição pode comprometer a constituição e função dos tendões, uma vez que eles são formados por estruturas de colágeno, especialmente tipo I e III (RUZZINI, 2014, SHARIR, 2011).

1.2 Tendão

Os tendões consistem numa matriz complexa de feixe de fibras paralelas de Colágeno, proteínas de adesão e proteoglicanos com fibroblastos alinhados com as fibras de Colágeno. Estas fibras de Colágeno são formadas por fibrilas contínuas de Colágeno, alinhadas com o eixo longitudinal do tecido, para proporcionar a resistência mecânica. (RUZZINI, 2014; SHARIR, 2011; CASALHECHI, 2014; YANG, 2004).

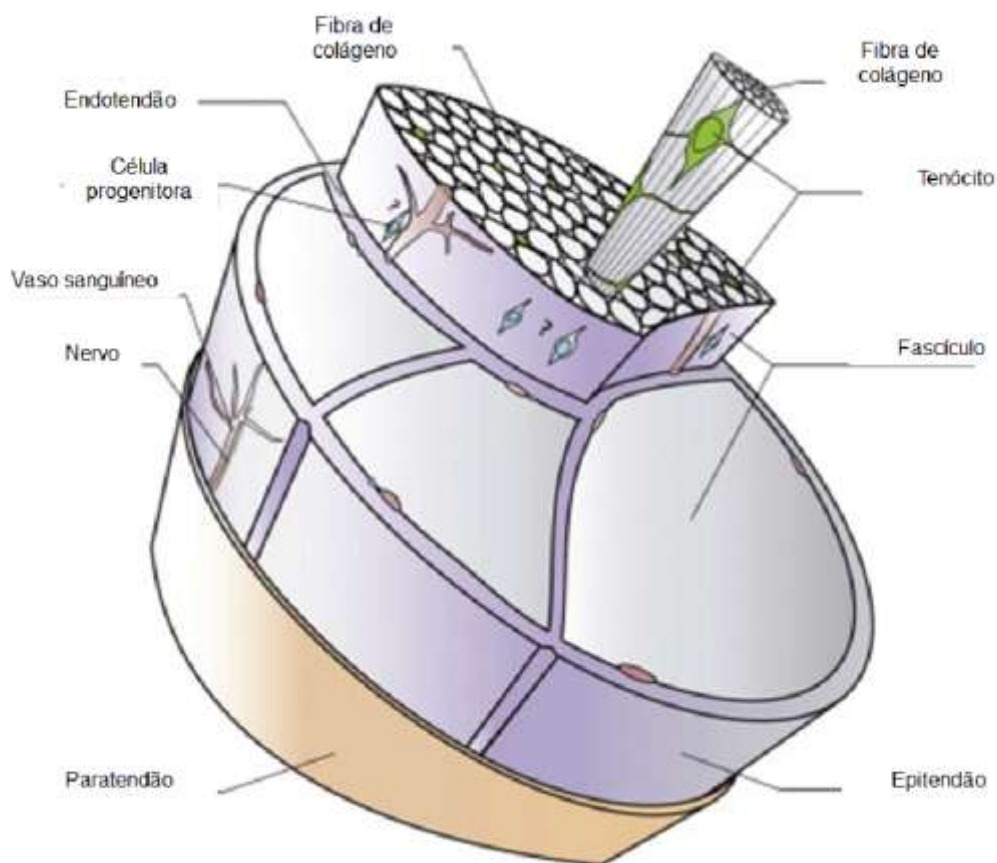


Figura 1. Estrutura interna do tendão. Fonte adaptada: Docheva et al, 2015.

O tendão é completamente coberto pelo epitendão, uma camada fina de tecido conjuntivo contendo suprimentos nervosos, vasculares e linfáticos. O endotendão se estende profundamente no tendão. Mais

superficialmente, o epitendão é envolvido pelo paratendão, um tecido conjuntivo areolar contendo basicamente fibrilas de colágeno (KVIST, 1985).

A função primária do tendão é transmitir as forças musculares para os ossos, promovendo movimento articular e a estrutura de Colágeno proporciona a resistência à tração necessária para executar essas funções. (RUZZINI, 2014; SHARIR, 2011; CASALHECHI, 2014; YANG, 2004).

1.3 Tendinopatia

Desordens tendíneas são frequentes e responsáveis por morbidades substanciais, tanto por esportes, quanto por outras atividades ocupacionais.

O excesso de atividades/sobrecarga nos tendões (overuse/overload). A sobrecarga pode levar o tendão a fadiga suas fibras como consequência pode acarretar micro traumas, rupturas parciais ou total do tendão (KHAN, 1999).

No processo inflamatório crônico, ocorre o remodelamento da bainha tendínea e do tecido sinovial, enchendo o espaço sinovial de células inflamatórias. Tais alterações no tecido tendíneo promove um distúrbio do tendão, podendo reduzir sua funcionalidade. Poderá também haver outra complicação, que consiste no fato que os tendões usam suas extremidades para se ligarem em outras estruturas como ossos e cartilagens e uma vez alterado, este processo inflamatório pode migrar para outros tecidos, iniciando um quadro pré-artrítico. Esta pode ser então a explicação sobre como os tendões são as estruturas mais afetadas pela inflamação crônica e como a tendinopatia pode influenciar no aparecimento e evolução de doenças inflamatórias nos ossos e cartilagens (HAYER, 2007).

As causas da tendinopatia envolvem uma variedade de fatores intrínsecos e extrínsecos, tais como pouco vascularizado, 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, 2002; MAGRA, 2008; SCHEPSIS, 2002).

Devido à pouca vascularização, o tecido tendíneo possui uma baixa capacidade de reparação. Porém quando o tecido é submetido a tratamento adequado pode levar a uma cicatrização ideal (KHAN, 1999).

Tendinopatias, ao contrário da tendinite, é o melhor termo descritivo genérico para as condições clínicas em relação aos tendões que sofrem uso excessivo (over use).

Tendinopatia é um problema difícil que requer longos cuidados. Alguns tratamentos têm sido desenvolvidos para tratar a tendinopatia, no entanto, em muitas situações, esses tratamentos não conseguem controlar o processo inflamatório e dor. Nos últimos anos, a fototerapia tem demonstrado eficácia entre modalidades terapêuticas para o tratamento de tendinopatia, principalmente no controle da dor (MARCOS , 2014; HASLERUD, 2015) e processo inflamatório (LOPES-MARTINS, 2014; DOYLE, 2015; GAO, 2014), onde podemos observar que especialmente o uso da terapia Laser de baixa intensidade na fase inicial do processo inflamatório, agindo na modulação de citocinas pró e antiinflamatórias (HUUSKO, 2014; LOPA, 2015; LIN, 2006; RICCHETTI, 2008), melhoria na produção e diferenciação de Colágeno (WANJARE, 2015; YANG, 2004; TAN, 2015) e resultados clínicos que leva-nos a evidências científicas (TUMILTY, 2012; ESLAMIAN, 2012; STERGILOULAS, 2008).

1.4 Colágeno

O colágeno é uma proteína de grande importância na constituição da Matriz Extracelular do tecido conjuntivo, constituindo de 25% a 30% do total de proteínas do corpo humano, e de fundamental importância na arquitetura tecidual. Está organizado em fibras insolúveis de grande força tênsil o que lhe confere a função de principal componente tensor dos tecidos conjuntivos como osso, dentes, cartilagens, tendões e as matrizes fibrosas da pele e vasos sanguíneos. As fibras colágenas começam a se desenvolver durante o período embrionário no processo inicial de diferenciação dos tecidos e posteriormente são responsáveis pela integridade dos mesmos (VELASCO, 2004).

Uma das principais funções do colágeno é a de manter a estrutura física de uma espécie, pois sua estrutura macromolecular lhe confere grande resistência mecânica, resultando na formação de fibras.

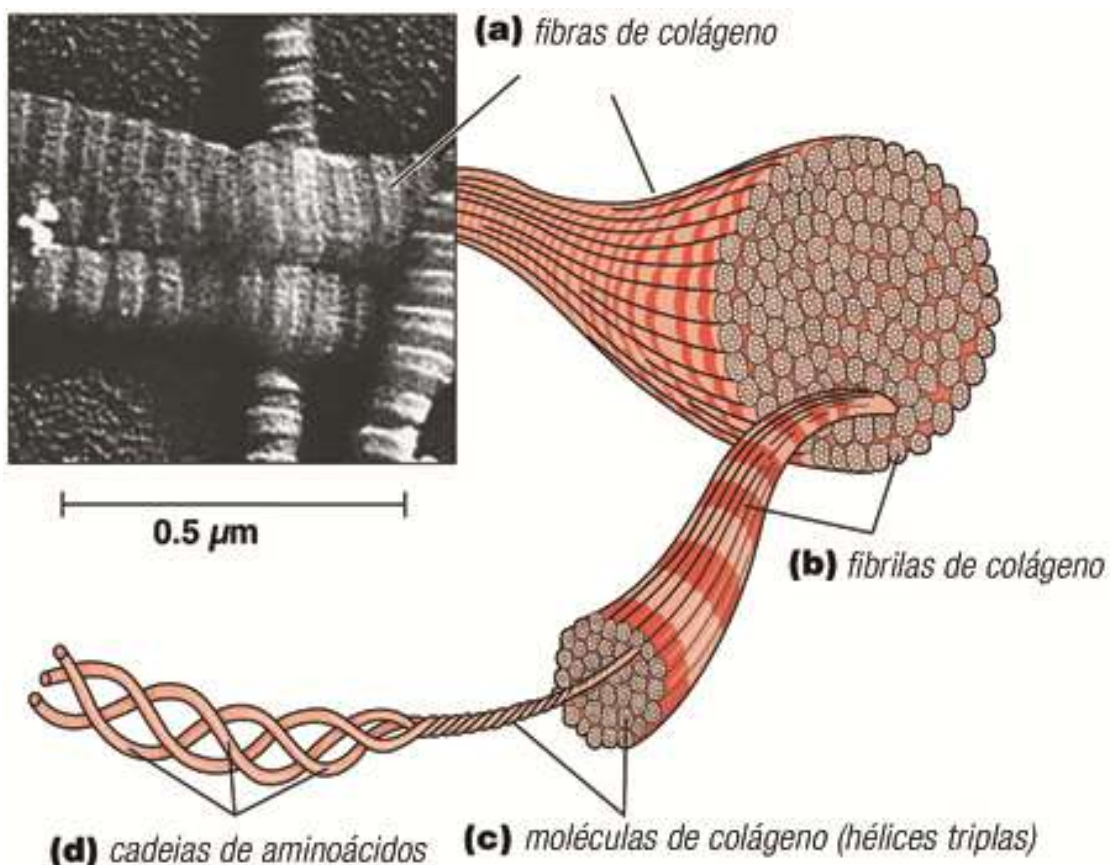


Figura 2: Estrutura interna do colágeno. (www.scitecnutrition.com).

Os fibroblastos, que são as células mais numerosas no tecido conjuntivo frouxo, têm como uma das funções, sintetizar o colágeno. A obtenção de colágeno pelos fibroblastos consiste na síntese de cadeias polipeptídicas individuais de colágeno tipo I e III conhecidas como moléculas precursoras chamadas pro colágeno. Após a secreção dessas moléculas precursoras para o meio extracelular, seus fragmentos terminais são clivados por meio de enzimas extracelulares, as colagenases, e com a clivagem, são formadas as moléculas de colágeno que se polimerizam para formar fibrilas, que, por sua vez, se agregam para constituir as fibras colágenas (ROBINS; KUMAR; COTRAN, 2010).

A proporção do tipo de colágeno existente em um tecido depende da especificidade deste e o tamanho das fibrilas de colágeno é um fator importante para determinar a natureza física do tecido (HARRIS, 2005). As

fibras de Colágeno são compostas principalmente por tipo I e III e são os principais componentes estruturais dos tendões.

A degradação do colágeno se inicia precocemente, sendo muito ativa durante o processo inflamatório. Esse processo de degradação é mediado por collagenases específicas, incluindo as collagenases séricas (elastase, catepsina C e proteinase neutra) e as metaloproteinases, e a atividade das collagenases é controlada por citocinas liberadas principalmente por células inflamatórias, endoteliais e fibroblastos.

O tendão após a lesão poderá apresentar alterações das propriedades mecânicas em comparação ao tecido saudável. Após o processo de cura, a restauração da força mecânica é o principal objetivo dessa cura tendínea. O remodelamento da matriz do tendão também pode ser um fator importante para restaurar sua característica tênsil (HOU, 2009).

Dentre várias constituintes da Matriz Extracelular dos tendões, as fibras de colágeno são as principais responsáveis pela força. Os Colágenos I e III são sintetizados para promover este reparo. As fibras de Colágeno III são mais finas e extensíveis e possuem habilidade de dar forma rápida as ligações transversais das fibras de colágeno e durante o processo de cicatrização do tendão, aparecem de forma transitória, promovendo a estabilização do local da reparação. Entretanto, o aumento Colágeno III pode causar redução da resistência a tração do tendão (HOU, 2009).

Numa segunda fase do reparo, parte do Colágeno tipo III é substituído pelo Colágeno I, que aumentará as características tênsis do tendão. Contudo, a regulação entre o Colágeno III para o Colágeno I influenciaria na regulação das forças mecânicas do tendão (HOU, 2009).

1.5 Metaloproteinase de Matriz (MMP)

As MMPs são enzimas de ação proteolítica e possuem um importante papel na modulação da matriz extracelular do tendão, entretanto o mecanismo desta modulação ainda permanece obscuro (UEDA, 2008). O grau de decomposição de MEC é controlado pela liberação de metaloproteinases de matriz (MMPs) e pela diminuição de inibidores de tecidos das

metaloproteinases (TIMPs) (LOPES-MARTINS, 2014). Várias MMPs têm sido investigadas em Tendinopatias crônicas, com aumento dos níveis de expressão de MMP-1, MMP-2, MMP-9, MMP-19, MMP-23 e MMP-25, e diminuição dos níveis de expressão de MMP-3, MMP-10, MMP-12, MMP-27 e TIMP-2 em tendões lesionados (SHARIR, 2011; HASLERUD, 2015; DOYLE, 2015). Contudo, não há atualmente nenhuma evidência direta de uma associação entre a idade e as atividades das MMPs.

São várias as MMPs, entretanto neste estudo, observamos a MMP-3 e a MMP-9. A MMP-9 é uma metaloproteinase, secretada predominantemente por leucócitos, sendo um elemento essencial na inflamação e reparação de tecidos. É expressa principalmente na fase inflamatória, mas pode persistir em fases avançadas. (SALO, 1994; ARUMUGAM, 1999). A redução na atividade da MMP-9 pode contribuir para o acúmulo excessivo de constituintes da matriz extracelular, contribuindo para o desenvolvimento de fibrose (BELLAYR, 2009).

A MMP-3 é produzida na parede do vaso por fibroblastos, células musculares lisas e macrófagos. Tem a função de degradar uma ampla gama de proteínas de matriz extracelular e ativar outras MMPs, o que a faz ter um papel chave na degradação da Matriz Extracelular e remodelação (NAGASSE; WOESSNER, 1999). Entretanto, quando hiper expressada, pode alterar a estrutura da parede do vaso por meio da degradação de proteínas da matriz extracelular (BORGHAEI; SULLIVAN; MOCHAN, 1999).

A degradação da Matriz Extracelular também pode alterar o diâmetro das fibras, conduzindo ao enfraquecimento das fibras de colágeno e aumentando as chances de ruptura do tendão. Desta forma, a supressão de algumas MMPs poderia auxiliar no reparo do tendão (UEDA, 2008).

O envelhecimento pode modificar a atividade de MMP induzida mecanicamente (LOPA, 2015). Portanto, é crucial investigar se o envelhecimento afeta as atividades enzimáticas de MMP e seus inibidores fisiológicos, as TIMPs diretamente, com isto, poderia finalmente melhorar a compreensão do mecanismo que explica o aumento da incidência de tendinopatia no envelhecimento da população (YU, 2013).

1.6 Vascular Endothelial Growth Factor – Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF)

Estudos recentes revelam um papel importante do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) na angiogênese induzida por doença degenerativa no tendão. O VEGF atinge seu pico após 2 a 3 dias, mantendo máxima expressão entre 3 e 7 dias após a lesão, período em que a diferenciação e o crescimento capilar estão no máximo. Essa expressão positiva promove as fases iniciais da angionênese, incluindo a dilatação vascular, a permeabilidade, a migração e a proliferação. No entanto, a baixa expressão dos níveis de VEGF acarreta em vascularização insuficiente que provavelmente contribui para atrasos no processo de reparação tecidual (JOHNSON; WILGUS, 2014).

O VEGF aumenta consideravelmente, após a exposição ao conjunto de fatores de crescimento liberados. O que sugere que aceleram a proliferação das células do tendão e estimulam a síntese de colágeno tipo I (ANITUA, 2005).

A capacidade de reparo após micro trauma é fortemente comprometida nos tendões, por ser um tecido pouco vascularizado. Essa vascularização reduzida não é uma característica específica dos tendões, e vários estudos mostraram que o número e tamanho dos vasos sanguíneos são consideravelmente menores nos tendões.

A angiogênese é mediada por fatores angiogênicos, e estudos recentes têm mostrado que o Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF) é altamente expresso em tendões lesionados, enquanto a expressão de VEGF é quase completamente regulada negativamente em tendões saudáveis. Vários fatores são capazes de regular positivamente a expressão de VEGF em tenócitos, incluindo hipóxia, citocinas inflamatórias e carga mecânica.

O VEGF tem o potencial de estimular a expressão das Metaloproteinases de Matriz (MMPs) e diminuir a expressão de inibidores de MMPs em vários tipos de células, isto é, células endoteliais, fibroblastos, condrócitos, podendo ter um papel significativo no processo patológico da lesão degenerativa do tendão. Esta constatação sugere que a angiogênese

também desempenha um papel importante na dor associada com a lesão degenerativa do tendão (SAVITISKAYA, 2014).

1.7 Laser de Baixa Intensidade (LBI)

O Laser (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation) foi idealizado por Albert Einstein em 1917 e desde o final da década de 60 houve um grande avanço nos equipamentos de laser e em suas aplicações na área médica (BJORDAL, 2006; GENOVESE, 2000; MATERA, 2003; ALBERTINI, 2008). A luz laser tem como características principais a monocromaticidade (luz laser composta de fótons, todos da mesma cor e com o mesmo comprimento de onda) e coerência espacial e temporal (ondas sucessivas da radiação em mesma fase e tempo da onda com mesma direção) (ALBERGEL, 1984).

Existem diferentes tipos de tratamentos para tendinopatia, técnicas mobilização, exercícios terapêuticos e recursos eletroterapêuticos como o ultrassom e o laser (BJORDAL, 2006). Os antiinflamatórios não esteroidais (AINES) são os mais utilizados, mesmo que já tenha sido mostrado em estudos que inflamação e tendinopatias nem sempre andam juntas. Em estudo feito por (CASALECHI, 2014) demonstrou que o uso de AINES em um protocolo de tendinopatia crônica levou a diminuição da resistência a tensão do tendão, observando possível modificação da característica original do tecido tendíneo, podendo comprometer sua função.

Duas respostas biológicas vem sendo marcadas como possível mecanismo de ação da luz laser: A resposta biológica pode ter um possível efeito modulador, dose dependente sobre o metabolismo dos fibroblastos e deposição de colágeno. Esta resposta tem sido observada em uma ampla gama de estudos controlados sobre culturas de células e experimentação animal. Como também o efeito anti-inflamatório e analgésico, é a possível semelhança com os AINES e esteróides. (BJORDAL et al, 2006).

Estudos demonstram resultados favoráveis no processo de reparação tendíneo, pela deposição de fibras de colágeno na fase inicial e tardia, assim como minimização da presença de células inflamatórias na zona da lesão (TAVARES, 2005). Portanto, tornam-se essenciais mais estudos sobre a

Terapia LASER de Baixa Intensidade, onde a teoria mais aceita é a que por meio de absorção de fótons por cromóforos mitocondriais, nomeadamente Citocromo C Oxidase (CCO), leva ao aumento de trifosfato de adenosina (ATP), redução de estresse oxidativo, iniciando uma cascata de efeitos de reparação tecidual e reduzindo a inflamação, tornando-se objetivos de vários estudos em saúde pública (FERRARESI, 2015; FARIVAR, 2014; SPITLER, 2015; ALBUQUERQUE-PONTES, 2015).

A perspectiva de vida aumentou e mulheres têm vivido anos produtivos em um período pós-menopausa, mas com algumas limitações fisiológicas comuns da idade. Com isso, em muitos estudos foram testados a eficiência da terapia Laser de Baixa Intensidade em tendinopatia, porém pouco se sabe da TLBI em idosos em condições associadas com mudanças hormonais relacionadas à produção de estrógeno, dado a evidência que na estrutura celular, morfologia do tendão e as alterações hormonais associadas com o envelhecimento, complicam a resolução ou tratamento da tendinopatia. Portanto, o objetivo deste estudo foi verificar a possibilidade da TLBI modular o processo inflamatório na tendinopatia induzida por colagenase em ratas fêmeas idosas, por meio da análise de Colágeno tipo I e III (presentes na constituição do tendão), das MMPs 3 e 9 (importantes para um equilíbrio no tecido tendíneo) e o VEGF (responsável pela angiogênese, consequentemente um bom reparo do tecido em suas afecções). Tornando-se, contudo, este estudo de essencial importância ao tratamento com a TLBI nas tendinopatias.

2 Objetivos:

2.1 Objetivo Geral:

O objetivo deste estudo foi verificar a possibilidade da TLBI, na região do infravermelho, modular o processo inflamatório na tendinopatia induzida por colagenase em ratas fêmeas idosas.

2.2 Objetivos Específicos:

Avaliar os efeitos da TLBI sobre:

- Colágeno tipo I e III.
- MMP 3 e 9.
- VEGF.

3 Material e métodos

3.1 Animais e aspectos éticos

Quarenta e duas ratas Wistar fêmeas (norvegicus albinos) foram utilizadas neste estudo, com grupos consistindo de 36 animais idosos (18 meses de idade; peso corporal médio, 500g) e 6 animais adultos (12 semanas de idade; peso corporal médio, 300g). Os animais são provenientes do biotério da Universidade Nove de Julho (UNINOVE), onde foram alojados e mantidos sob luz (ciclo claro e escuro de 12 horas) e temperatura controlada, e com água e comida "ad libitum". Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os padrões estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Os animais foram tratados de acordo com as diretrizes nacionais para o tratamento humanitário dos animais de laboratório, e todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNINOVE - AN00302014.

3.2 Grupos experimentais

36 animais idosos foram divididos aleatoriamente em 2 grupos (com 18 animais por grupo), subdivididos em três períodos experimentais, 7, 14 e 21 dias. Além disso, um grupo controle adulto sem irradiação LBI e nenhuma lesão (grupo adicional experimental incluiu 6 animais).

- Grupo controle (n=6) – grupo não recebeu lesão ou tratamento.
- Grupo tendinopatia idoso (n=18) – foi induzida lesão por Colagenase na região peritendínea do tendão calcâneo dos animais que não receberam tratamento. Subdivididos em três períodos experimentais, 7, 14 e 21 dias, de acordo com o período de eutanásia.
- Grupo Tendinopatia Idoso LBI (n=18) – foi induzida lesão por Colagenase na região peritendínea no tendão calcâneo dos animais que receberam tratamento com LASER de Baixa Intensidade (LBI). Subdivididos em três períodos experimentais, 7,14 e 21dias, de acordo com o período de eutanásia.

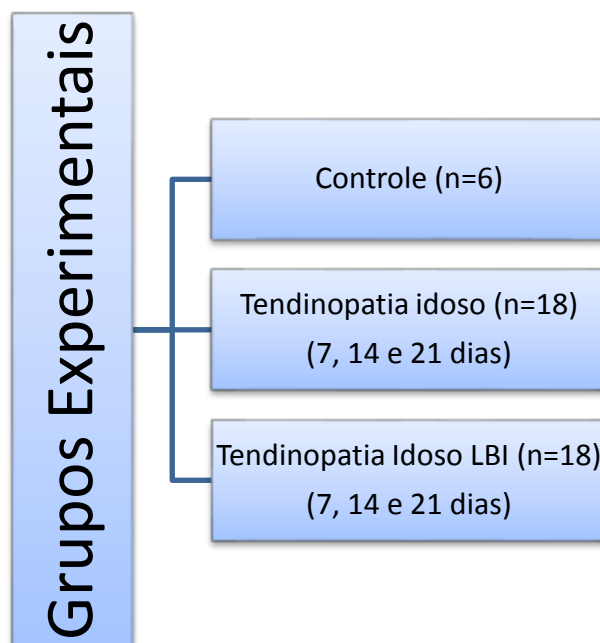


Figura 3: Fluxograma dos grupos experimentais.

3.3 Modelo experimental de tendinopatia induzida por Colagenase

Tendinopatia foi induzida utilizando colagenase, uma enzima que degrada o colágeno e induz a um processo inflamatório agudo por colagenase ((1 mg / ml; Sigma Chemical Co, gato C- 6885)) foi dissolvido em 100 mg / ml em solução salina tamponada com fosfato estéril (PBS) contendo 50 mM de NaH₂P₀₄ e NaCl 10 mM (pH 7,1). A pele foi preparada cirurgicamente e colagenase foi injectado nas duas patas (100 ug / tendão) por via percutânea na região peritendínea do tendão de Aquiles, cerca de 2 mm proximal à junção osteotendinosos sob anestesia. O mesmo volume de PBS sem colagenase foi injectada, utilizando o mesmo procedimento em um grupo controle. (MARCOS, 2012).



Figura 4: representa a aplicação da Colagenase.

3.4 Terapia Laser de Baixa Intensidade (TLBI)

Foi utilizado um laser de baixa intensidade, modelo TheraLase da marca DMC, operando no comprimento de onda de 830nm (± 10 nm).



Figura 5: modelo de Laser utilizado.

Um tratamento a Laser de Baixa Intensidade foi aplicado utilizando um Laser Arseneto de Gálio alumínio (AsGaAl) (Theralaser, DMC®) com meio ativo operacional no comprimento de onda de 830nm (\pm 10nm), 50 mW de potência, feixe 0,028cm² laser, densidade de energia de 107.0J / cm², densidade de potência de 1,7 W / cm² e energia 3 J. O laser foi aplicado pelo contato direto com o tendão de Aquiles durante 60 segundos por ponto, em três pontos (miotendíneo, região medial do tendão e ósteotendíneo), Os animais foram contidos manualmente para o procedimento e irradiado a um ângulo de 90 ° em relação à superfície do tecido. Antes do início das experiências, o equipamento de laser foi calibrado com um medidor de potência (Modelo 13PEM001 / J, Mellers Griot, Países Baixos).

O tratamento foi iniciado 12 horas após a lesão, três vezes por semana até o momento da eutanásia (7, 14 e 21 dias).



Figura 6: posicionamento para irradiação com o Laser.

Parâmetros de irradiação	Laser
Comprimento de onda	830nm
Potência	50mW
Densidade de energia	107J/cm ²
Área de saída do feixe	0,028cm ²
Tempo	60s

Tabela1: Parâmetros de irradiação do Laser

3.5 Eutanásia

Os animais foram identificados, pesados e sacrificados via intraperitoneal administração tiopental (THIOPENTAX - Cristália 100 mg / kg) (DL) com lidocaína 10 mg / ml (Xylestesin - Cristália). As amostras foram então recolhidas e enviadas para análise histológica, por meio dos procedimentos de imunohistoquímica e análise morfométrica do colágeno (CONCEA, 2013).

3.6 Análise histológica

Os tecidos do tendão foram fixados com formalina a 10%, embebidos em parafina, seccionados e secções de 5 mm de espessura foram corados com Hematoxilina - Eosina e Picrosirius Red.

Nesta base, o presente estudo teve como objetivo analisar a ação do LBI em modelo experimental de tendinopatia induzida por collagenase em ratas idosas, por meio da expressão de MMP 3, MMP 9 e VEGF (imunohistoquímica), e do Colágeno tipo I e III (Picrosirius Red, sob luz polarizada), durante a inflamação crônica nos tempos de 7, 14 e 21 dias.

3.7 Colágeno - tipo de análises morfométricas

A análise morfométrica foi realizada sobre as lâminas, por meio de digitalização e análise de imagem utilizando um programa computacional de processamento e análise de imagem específica (Imagem Pro Plus 4.5). Para quantificar as áreas representativas de colágeno, cinco campos observados utilizando um microscópio de transmissão óptica e de luz polarizada (Carl Zeiss, Pol-Interferential fotomicroscópio, Alemanha) acoplado a uma câmera CMOS de cor com 1280 x 1024 pixels de resolução (Thorlabs GmbH, Alemanha), com aumento de 120x. e este foi ligado a um microcomputador equipado com uma placa de vídeo. Todas as imagens foram digitalizadas antes do processo de quantificação, uniformizando deste modo a intensidade da luz do microscópio e condensador de altura. As áreas de colágeno foram separadas na imagem, utilizando a distribuição de cor como o parâmetro de discriminação.

Picrosirius red, um composto aniônico, que distingue a espessura e a densidade das fibras de colágeno, através de coloração emitida sob luz polarizada, foi utilizado para estimar a porcentagem de fibras de colágeno. Enquanto as fibras finas dissociadas típicas de colágeno tipo III são esverdeadas, as mais grossas e fortes fibras associadas de colágeno tipo I emitem cores com comprimento de onda maior como vermelho e amarelo (ALVES, 2014).

3.8 Imunohistoquímica

A parafina foi completamente removida, através de uma série de lavagens sequenciais xileno / etanol / água para remover a cera e o tecido re-hidratar. As secções foram lavadas em PBS (6 x 5 min lavagens). Posteriormente, as lâminas foram incubadas na presença do anticorpo primário aplicado durante a noite a 4 ° C. Os anticorpos primários utilizados foram: VEGF: anti-rato de VEGF (VG-1; Abcam, Tóquio, Japão, a MMP-3: de coelho

anti-MMP-3 anticorpo (ab-53015, Abcam, Tóquio, Japão), MMP-9 :. de cabra anti-MMP-9 anticorpo (sc-6840, Santa Cruz Biotechnology Após lavagem em PBS (6 vezes, 5 minutos), foram incubados com o anticorpo secundário, de acordo com anticorpo primário utilizado, durante 30 min Após lavagem em PBS. (6 × 5 mínimo de lavagens), uma reação de coloração foi realizada com diaminobenzidina (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japão) e os núcleos foram contrastados com hematoxilina. Áreas de coloração positiva para cada uma das etiquetas e observados sob um microscópio de luz (E200 , Nikon, Japão), e as imagens foram capturadas por um microcomputador equipado com IC Capturar 2,2 software (A Fonte Imaging, Alemanha). De cada amostra, 4 imagens foram gravadas de diferentes campos de visão, incluindo cada parte do manchado, usando um 40 × objectivo, de modo que o comprimento foi capturado. Uma vez capturada, as imagens foram analisadas utilizando um sistema de análise de imagem baseada em software (Image-Pro Plus 4.5, Media Cybernetics, MD, EUA). (PARK, 2015).

3.9 Análise estatística

Para o tipo de colágeno e análise imuno-histoquímica, os dados foram tabulados utilizando software Microsoft Excel 2007 e inicialmente avaliados para normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Observou-se uma distribuição normal, Two-way ANOVA com teste de Bonferroni post hoc foi utilizado para comparações entre os grupos experimentais. Todos os dados foram expressos em valores de desvio padrão e média. GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Foi utilizado programa de software. Diferenças significativas a partir da hipótese de nulidade foram consideradas quando ($p < 0,05$).

4 Resultados

4.1 Artigo

Submetido a Revista Lasers in Medical Science.

The Low-level laser therapy effect on collagen type I and III, VEGF and metalloproteinase in experimental induced tendinopathy in rats aged

Anna Cristina de Farias Marques¹; Regiane Albertini¹; Andrey Jorge Serra²; Evela Aparecida Pereira da Silva²; Vanessa Lima Cavalcante de Oliveira¹; Luciana Miato Silva ³, Ernesto C. Leal Junior^{1, 2}; Paulo de Tarso Camillo de Carvalho ^{1,2}

1 Postgraduate Program in Rehabilitation Sciences, Universidade Nove de Julho (UNINOVE), São Paulo, SP, Brazil.

2 Postgraduate Program in Biophotonics, Universidade Nove de Julho (UNINOVE), São Paulo, SP, Brazil.

3 Postgraduate Program in Medicine Universidade Nove de Julho (UNINOVE), São Paulo, SP, Brazil.

Please address reprint requests and all correspondence to:

Paulo de Tarso Camillo de Carvalho, Postgraduate Program in Rehabilitation Sciences, Universidade Nove de Julho (UNINOVE), Rua Vergueiro 235, São Paulo, SP, Brazil

Phone number: +55 19 99290262

Fax number: +55 11 33859000

E-mail: paulo.tarso@uninove.br

Lasers in Medical Science

Low-level laser therapy on collagen type I and III, vascular endothelial growth factor, and metalloproteinase in experimentally induced tendinopathy in aged rats

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Low-level laser therapy on collagen type I and III, vascular endothelial growth factor, and metalloproteinase in experimentally induced tendinopathy in aged rats
Article Type:	Original Article
Keywords:	Tendinitis; Collagenase; Low-level laser therapy; Aged; Tendon.
Corresponding Author:	Paulo de Tarso Camillo Carvalho, PhD University Nove de Julho-UNINOVE Campinas, São Paulo BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	University Nove de Julho-UNINOVE
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Anna Farias Marques, MsC
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Anna Farias Marques, MsC Regiane Albertini, PhD Evela A da Silva, MsC Andrey Jorge Serra, PhD Vanessa Lima Cavalcante de Oliveira, MsC Luciana Miato Silva Ernesto C Leal-Junior, PhD Paulo de Tarso Camillo Carvalho, PhD
Order of Authors Secondary Information:	
Funding Information:	Brazilian Research Council-CNPq for the Research Productivity Scholarship (307665/2012-7) Mr. Paulo de Tarso Camillo Carvalho
Abstract:	The objective of this study is to investigate the Low-level laser therapy effect on collagen type I and III, metalloproteinase and VEGF in experimental induced tendinopathie in female rats aged. Tendinitis was induced by collagenase region - peritendinous the Achilles tendon of the animals. Forty-two Wistar rats (Norvegicus albinus) were used in this study, with groups consisting of 36 aged animals (18 months old; mean body weight, 517.7 ± 27.54 g) and 6 adults animals (12 weeks old; mean body weight, 266, 19:30 0 ± g). The animals were randomly divided in three groups, control, Aged tendinitis and tendinitis LLLT aged, and subdivided into three periods Experimental, 7, 14 and 21 days. low-level laser treatment was applied using a Gallium Arsenide and Aluminium (AsGaAl) laser (Theralaser, DMC®) with active medium operating at wave length of 830nm (±10nm), 50 mW power, laser beam 0,028cm ² , energy density of 107J /cm ² , power density 1,7 w/cm ² and energy 6 J. with a frequency of 3 times per week, until the date of euthanasia (7, 14 and 21 days). Analyzed VEGF and MMP 3 and 9 by Immunohistochemistry and collagen type I, III, by Sirius red. The results indicate that LLLT was able to increase the deposition of collagen types I and III in a gradual manner and with significant difference to the group tendonitis elderly (p <0.001), it can be observed in relation to VEGF (p <0.001) was also observed decreased expression of MMPs 3 and 9 in relation to the group

	tendinitis elderly, with statistical difference ($p < 0.001$). We conclude that LLLT was able to increase the production of collagen type I and III reduce the expression of MMPs 3 and 9, and to increase VEGF expression, even in females aged rats and hormonal deficiency caused by age
--	---

Low-level laser therapy on collagen type I and III, vascular endothelial growth factor, and metalloproteinase in experimentally induced tendinopathy in aged rats

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

Abstract

This study investigates the effect of low-level laser therapy (LLLT) on collagen type I and III, matrix metalloproteinase (MMP), and vascular endothelial growth factor (VEGF) in experimentally induced tendinopathy in female aged rats. Tendinopathy was induced by collagenase peritendinous of the Achilles tendon. Forty-two Wistar rats (*Norvegicus albinus*) were used; groups consisted of 36 aged animals (18 months old; mean body weight, 517.7 ± 27.54 g) and 6 adult animals (12 weeks old; mean body weight, 266 ± 19.30 g). The animals were randomly divided in three groups: control, aged tendinopathy, and aged tendinopathy LLLT; the aged groups were subdivided according to experimental periods: 7, 14, and 21 days. LLLT involved a gallium-arsenide-aluminum laser (Theralaser, DMC®) with active medium operating at wavelength 830 ± 10 nm, 50 mW power, 0.028 cm² laser beam, 107 J/cm² energy density, 1.7 w/cm² power density, and 6 J of energy, with a frequency of 3 times per week, until euthanasia. VEGF, MMP-3, and MMP-9 were analyzed by immunohistochemistry, and collagen type I and III by Sirius red. LLLT increased the deposition of collagen type I and III in a gradual manner, with significant differences relative to the group aged tendonitis ($p < 0.001$), and in relation to VEGF ($p < 0.001$); decreased expression of MMP-3 and 9 was observed in group aged tendinopathy ($p < 0.001$). LLLT, therefore, increased the production of collagen type I and III, downregulated the expression of MMP-3 and MMP-9, and upregulated that of VEGF, with age and age-induced hormonal deficiency.

Keywords: calcaneal tendon, tendinopathy, collagenase, LLLT, aged.

Introduction

Aging is accompanied by a decline in the homeostatic and regenerative capacity of all tissues and organs [1]. Tendon aging or chronic tendinopathy are often responsible for handicapping middle-aged and aging populations [2]. With aging, tendon tissue undergoes morphological and biochemical changes, involving both the cells and the extracellular matrix (ECM); the ECM increases in volume, causing a relative decrease of the number of cells per unit of tissue surface. During aging, parallel changes occur in the elastic fibers, which decrease in number and show structural alterations [3]. Aging and estrogen deficiency can reduce the constituents of the ECM. This decrease may compromise the constitution and function of tendons, since they are formed of collagen structures, especially type I and III; the tendon is composed of fascicles, formed from collagen fibers. These collagen fibers are formed from continuous collagen fibrils, aligned to the tissue long-axis for mechanical strength and can therefore develop tendinopathy [4,5].

Tendon disorders are frequent and are responsible for substantial morbidity both in sports and in the workplace. Tendinopathy, as opposed to tendinitis or tendinosis, is the best generic descriptive term for the clinical conditions in and around tendons arising from overuse. Tendinopathy is a serious issue requiring lengthy management, and patients often respond poorly to treatment [6].

Several physical modalities have been developed to treat tendinopathy; however, they often fail to control the inflammatory process and pain. In recent years, phototherapy is the leading treatment for tendinopathy, mainly demonstrating efficacy in management of pain [7,8] and inflammation [9,10,11]. In particular, low-level laser therapy (LLLT) in early stages of the inflammatory process modulates the expression of pro- and anti-inflammatory cytokines [12,13,14,15], improves the production and differentiation of collagen [16,17,18], and shows positive clinical results [19,20,21]. Although some studies have evaluated the efficiency of LLLT in tendinopathy, aging conditions are associated with hormonal changes related to the production of estrogen. Given the evidence that aging causes changes in cell structure and morphology of the tendon, hormonal changes associated with aging complicates the resolution of tendinopathy. The purpose of this study was to verify the viability of LLLT, and normalize the tendinopathy process induced by collagenase in female aged rats.

Materials and Methods

Animals and ethics

Forty-two female Wistar rats (*Norvegicus albinus*) were used, with groups of 36 aged animals (18 months old; mean body weight, 517.7 ± 27.54 g) and 6 adult animals (12 weeks old; mean body weight, 266 ± 19.30 g). Animals were acquired from the animal facility of the Universidade Nove de Julho (UNINOVE), where they were housed and kept under controlled light and temperature, with water and food given *ad libitum*. All experimental procedures were carried out in accordance with standards established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). Animals were handled in compliance with national guidelines for the humane treatment of laboratory animals, and all experimental procedures were approved by the Research Ethics Committee of the UNINOVE - AN00302014.

Experimental groups

The 36 aged animals were randomly divided into 2 groups (18 animals per group). An additional adult control group with no LLLT irradiation and no injury included 6 animals.

- 1- Control group (adult) – no LLLT irradiation and no injury;
- 2- Tendinopathy aged group – no LLLT irradiation;
- 3- Tendinopathy LLLT aged group – LLLT irradiation and injury.

The aged groups were further divided into 3 subgroups according to experimental time of euthanasia (7, 14, and 21 days).

Experimental model of collagenase-induced tendinopathy

Tendinopathy was induced using collagenase, an enzyme that degrades collagen and induces an acute inflammatory process. Collagenase (1 mg/ml; Sigma Chemical Co, Cat. C-6885) was dissolved at 100 mg/ml in sterile phosphate buffered saline (PBS) containing 50 mM NaH_2PO_4 and 10 mM NaCl (pH 7.1). Skin was surgically prepared and collagenase was injected in the two legs (100 $\mu\text{g}/\text{tendon}$) percutaneously into the Achilles tendon, approximately 2 mm proximal to the osteotendinous junction under anesthesia. The same volume of PBS without collagenase was injected using the same procedure in a control group [22].

Low-level laser therapy

LLLT was applied using a gallium-arsenide-aluminum (AsGaAl) laser (Theralaser, DMC[®]) with active medium operating at wavelength 830 ± 10 nm, 50 mW power, 0.028 cm^2 laser beam, 107 J/cm^2 energy density, 1.7 w/cm^2 power density and 3 J energy. The laser was applied by direct contact with the left Achilles tendon for 60 seconds per point, at three points (muscle-tendon, tendon and bone-tendon). Animals were manually restrained for the procedure and irradiated at a 90° angle in relation to the tissue surface. Before beginning the experiments, laser equipment was calibrated with a power meter (Model 13PEM001/J, Mellers Griot, The Netherlands). Treatment was initiated 12 hours after injury, three times a week until euthanasia (7, 14, and 21 days).

Euthanasia

The animals were identified, weighed, and euthanized via intraperitoneal thiopental administration (THIOPENTAX - Cristália 100 mg/kg; DL) with lidocaine 10 mg/ml (Xylestesin - Cristália). Samples were then taken and sent for immunohistochemistry and morphometric collagen analysis. The tendon tissues were histologically analyzed by fixing with 10% formalin, embedded in paraffin, and sectioned. Sections (5- μm thick) were stained with hematoxylin - eosin and Picrosirius red.

Morphometric analysis of collagen types

Morphometric analysis was performed using image digitization and computational analysis with a specific image processing and analysis program (Image Pro plus 4.5). To quantify the areas representing collagen, five fields observed using a microscope that optically transmitted and polarized light (Carl Zeiss, Pol-

1 Interferential Photomicroscope, Germany) were coupled to a color CMOS camera with 1280 x 1024 pixel
2 resolution at 400× magnification (Thorlabs GmbH, Germany), which was connected to a microcomputer
3 equipped with a video board. All images were digitized before the quantification process, thereby
4 standardizing the microscope light intensity and condenser height. Collagen areas were separated in the
5 image, using color distribution as the discriminating parameter.
6

7 Picrosirius red, an anionic composite that distinguishes the thickness and density of collagen fibers through
8 coloration emitted under polarized light, was used to estimate the percentage of collagen fibers. While thin
9 dissociated fibers typical of type III collagen are greenish, the thickest strong associated fibers of type I
10 collagen emit colors with longer wavelengths, such as red and yellow [23].
11
12

13 **Immunohistochemistry**

14 Paraffin was completely removed through a series of sequential xylene/ethanol/water washes to remove the
15 wax and rehydrate the tissue. Sections were washed in PBS (6 × 5 min washes) and mounted with 1%
16 normal goat serum in PBS for 30 min. Subsequently, slides were incubated in the presence of primary
17 antibody applied overnight at 4°C. Primary antibodies used were mouse anti-rat VEGF antibody (VG-1;
18 Abcam, Tokyo, Japan); rabbit anti-MMP-3 antibody (ab-53015, Abcam, Tokyo, Japan); and goat anti-
19 MMP-9 antibody (sc-6840, Santa Cruz Biotechnology). After washing in PBS (6 times, 5 min), sections
20 were incubated with secondary antibody for 30 min. After washing in PBS (6 × 5 min washes), a coloring
21 reaction was carried out with diaminobenzidine (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) and nuclei
22 were counterstained with hematoxylin. Areas of positive staining for each of the tags were observed under
23 a light microscope (E200, Nikon, Japan), and images were captured by a microcomputer equipped with IC
24 Capture 2.2 software (The Imaging Source, Germany). From each sample, 4 images were recorded of
25 different fields of view, including each stained area, using a 10× objective lens to capture the length. Once
26 captured, the images were analyzed using a software-based image analysis system (Image-Pro Plus® 4.5,
27 Media Cybernetics, MD, USA) [24].
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40

41 **Statistical Analysis**

42 For collagen type and immunohistochemistry analyses, data were tabulated using Microsoft Excel 2007
43 software and initially assessed for normality using the Shapiro-Wilk test. Since a normal distribution was
44 observed, two-way ANOVA with Bonferroni post hoc test was used for comparisons between experimental
45 groups. All of the data are expressed as mean ± standard deviation. GraphPad Prism 5 software program
46 was used (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) and significant differences were considered when
47 $p < 0.05$.
48
49
50
51
52
53
54
55

56 **Results**

57 **Collagen type I**

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

Collagen type I was identified by light polarization and quantified as percentage per analyzed area. Seven days after induction by collagenase, the control group was significantly greater than the aged tendinopathy group (32.80 ± 2.14 vs. 22.87 ± 1.62 ; $p < 0.001$). The aged tendinopathy LLLT group (32.59 ± 1.04) was not statistically significant from the control group. However, when comparing the aged tendinopathy with aged tendinopathy LLLT, a statistical difference ($p < 0.001$) was reported. Fourteen days after induction, the aged tendinopathy group (20.15 ± 0.40) was significantly different from the control group ($p < 0.001$). The aged tendinopathy LLLT group (32.99 ± 1.76) was not statistically different to the control group. However, the aged tendinopathy group was significantly different from the aged tendinopathy LLLT group ($p < 0.001$). Twenty-one days after induction, there was a statistical difference across all groups (aged tendinopathy: 22.26 ± 1.22 ; aged tendinopathy LLLT: 38.65 ± 0.52 ; $p < 0.001$). In summary, the control group showed no statistical difference with the aged tendinopathy LLLT group at 7 and 14 days (Fig. 1a and b).

Collagen type III

Collagen type III was identified and quantified similar to type I (percentage per analyzed area). Seven days after induction, the aged tendinopathy group was significantly greater than the control group (45.19 ± 1.37 vs. 28.23 ± 2.40 ; $p < 0.001$). The aged tendinopathy LLLT group (30.13 ± 0.73) was not statistically different from the control group. However, aged tendinopathy and aged tendinopathy LLLT groups were statistically different ($p < 0.001$). Fourteen days after induction, the aged tendinopathy group (37.80 ± 2.44) was statistically different from the control group ($p < 0.001$). The aged tendinopathy LLLT group (24.02 ± 2.75) was also statistically different from the control group ($p < 0.01$). Furthermore, a statistical difference of $p < 0.001$ was observed between aged tendinopathy and aged tendinopathy LLLT groups. Twenty-one days after induction, statistical difference was observed across all groups (aged tendinopathy: 35.16 ± 0.80 ; aged tendinopathy LLLT group: 20.84 ± 2.42 ; $p < 0.001$). In summary, the control group showed no statistical difference with the aged tendinopathy LLLT group at 7 days (Fig. 1c).

Matrix metalloproteinase 3

MMP-3 was analyzed by immunohistochemistry. Seven days after induction, the control group showed 49.89 ± 3.31 , the aged tendinopathy group showed 190.31 ± 5.35 , and the aged tendinopathy LLLT group showed 88.75 ± 3.23 ; there was statistical difference across all groups ($p < 0.001$). Fourteen days after induction, the aged tendinopathy group was significantly greater than the control group (194.72 ± 8.59 vs. 49.89 ± 3.31 ; $p < 0.001$). A statistical difference of $p < 0.05$ was reported between the control group and the aged tendinopathy LLLT group (61.04 ± 7.41). There was also a statistical difference of $p < 0.001$ when comparing the aged tendinopathy group and the aged tendinopathy LLLT group. Twenty-one days after induction, there was a statistical difference of $p < 0.001$ between the control group and aged tendinopathy group (150.29 ± 5.23). However, there was no statistical difference when comparing the control group and the aged tendinopathy LLLT group (44.12 ± 13.62). The aged tendinopathy and the aged tendinopathy LLLT groups were significantly different ($p < 0.001$). Overall, there was no statistical difference between the control group and the aged tendinopathy LLLT group at 21 days (Fig. 2a and b).

Matrix metalloproteinase 9

MMP-9 was analyzed by immunohistochemistry. Seven days after induction, the aged tendinopathy group was significantly greater than the control group (167.02 ± 9.80 vs 41.39 ± 4.00 ; $p < 0.001$). Comparing the control group and the aged tendinopathy LLLT group (47.53 ± 8.20), there was no statistical difference. However, there was a statistical difference between the aged tendinopathy group and the aged tendinopathy LLLT group ($p < 0.001$). Fourteen days after induction, the aged tendinopathy group was significantly greater than the control group (104.90 ± 3.10 vs 41.39 ± 4.00 ; $p < 0.001$). There was also statistical difference ($p < 0.001$) when comparing the control group with aged tendinopathy LLLT (30.40 ± 5.00). Furthermore, there was statistical difference when comparing the aged tendinopathy group with aged tendinopathy LLLT ($p < 0.001$). Twenty-one days after induction, there was statistical difference across all groups (control group: 41.39 ± 4.00 ; aged tendinopathy: 96.23 ± 2.93 ; aged tendinopathy LLLT: 24.94 ± 4.55 ; $p < 0.001$). Overall, the control group showed no statistical difference with the aged tendinopathy LLLT group at 7 days (Fig. 3a and b).

Vascular endothelial growth factor

VEGF was analyzed by immunohistochemistry. Seven days after induction, the aged tendinopathy group was significantly less than the control group (56.28 ± 5.50 vs 96.07 ± 17.62 ; $p < 0.001$). The aged tendinopathy LLLT group (131.00 ± 14.00) was statistically different to the control group ($p < 0.001$). Fourteen days after induction, the aged tendinopathy group (56.61 ± 4.90) was statistically different to the control group ($p < 0.001$). The aged tendinopathy LLLT group (116.00 ± 6.00) was not statistically different from the control group. However, comparing the aged tendinopathy and aged tendinopathy LLLT, there was a statistical difference 21 days after induction ($p < 0.001$), and there was a statistical difference of $p < 0.001$ between the control group and aged tendinopathy group (54.30 ± 3.15). However, there was no statistical difference when comparing the control group and the aged tendinopathy LLLT group (85.60 ± 15.00). A statistical difference was observed between the aged tendinopathy and the aged tendinopathy LLLT group ($p < 0.001$). Overall, the control group showed no statistical difference to the aged tendinopathy LLLT group at 14 and 21 days (Fig. 4a and b).

Discussion

The etiology of tendinopathy remains unclear and many causes have been theorized, such as hypoxia, ischemic damage, oxidative stress, hyperthermia, impaired apoptosis, and inflammation. In tendon injury and healing, inflammatory mediators, fluoroquinolones, and MMP imbalances have been implicated as mechanisms of tendon degeneration. Histologically, tendinopathy is characterized by disordered and haphazard healing with absence of inflammatory cells, poor healing responses, non-inflammatory intratendinous collagen degeneration, fiber disorientation and thinning, hypercellularity, scattered vascular ingrowth, and increased interfibrillar glycosaminoglycans [25].

1 The sex difference in immune responses after injury is mediated in part by alterations in the circulating
2 levels of gonadal steroid hormones through modulation of the production of inflammatory cytokines and
3 immune regulation. For example, aberrant production of IL-6 is an important mediator of immunity after
4 injury, and estradiol is a critical regulator of IL-6 production and overall immune function [26]. Therefore,
5 the present study was designed with the purpose of investigating the chronic inflammatory process of
6 tendonitis in older female animals when subjected to LLLT. Several studies have shown that LLLT may be
7 a powerful therapeutic tool, throughout inflammatory processes of both tendinopathies [27,28,22] and in
8 the repair of tendon damage [29]. However, hormonal changes that occur during aging, mainly related to
9 estrogen, may be capable of interfering with any inflammatory process [30,31,32], often hampered by
10 collagen deposition, angiogenesis, and imbalances in MMP action [33,34,35]. On this basis, the present
11 study aimed to analyze the action of LLLT in experimentally induced tendinitis by collagenase in older rats
12 by immunohistochemical analysis of VEGF, MMP-3, MMP-9, and collagen type III, and to verify the total
13 collagen and collagen type I and III during chronic inflammation, using histological staining technique for
14 Picrosirius red under polarized light in the timeline (7, 14 and 21 days).

15 In this study, we observed that LLLT at a 3 joules dosage increased collagen deposition when compared
16 with the group of older rats with tendonitis, and we demonstrate that collagen approached the values of our
17 control group consisting of female adult rats. In addition to total collagen, we also assessed the percentage
18 of collagen marked by Picrosirius Red polarized light.

19 Few studies have focused on the effect of aging on tendon, and most investigated the mechanical features
20 of tendons. Although studies show that dimensions or mechanical properties of tendons do not differ
21 between young and old men, the collagen content is lower in older individuals, and the advanced glycation
22 end marker accumulates markedly in the tendons of older subjects.

23 Type I and III collagen are the main components of ECM in tendons, corresponding to 65-95% and 10%
24 of the composition, respectively. The synthesis of type III collagen increases during early stages of repair,
25 and it is thought that when it decreases, type I collagen is synthesized and organized [36]. The analysis of
26 tendinitis LLLT aged group at 7, 14, and 21 days showed a significant difference in the tendinitis aged
27 group between type I and III collagen areas, similar to typical tendon healing. The same occurred with type
28 I collagen in the control group. On the contrary, type I and III collagen in the areas tendinitis LLLT group
29 at 14 and 28 days did not differ significantly, explaining the delayed healing. Our findings indicate that
30 LLLT may lead to the improvement and acceleration of inflammation when compared to LLLT in an aged
31 animal model of tendinitis.

32 In addition to aging, estrogen levels might also play a key role; women show a lower risk of tendinopathies
33 during pre-menopausal years, whereas after menopause, this risk increases. Estrogen levels may influence
34 tendon metabolism and, in addition to several growth factors, are important for the behavior of
35 musculoskeletal tissues and may affect tendon properties; postmenopausal estrogen deficiency seems to
36 downregulate collagen turnover and decrease tendon elasticity [37]. Our results with respect to collagen are
37 similar to findings by Guerra et al. [38], who used normal adult rats, carried out a partial tenotomy, and
38 treated them with a GaAlAs laser with an 830-nm pulse with 4 J/cm², with the same dose at days 8 and 15
39 days after injury, and investigated collagen and MMP activity and collagen synthesis. The researchers
40 concluded that pulsed LLLT improved remodeling of the ECM during the healing process in tendons

1 through activation of MMP-2 and stimulation of collagen synthesis. Collagen increment obtained by LLLT
2 in [38] and in our study is in line with results from other researchers; despite not using models with aged
3 animals and different tissue types, LLLT results are satisfactory in increasing collagen [39].

4 Collagen I is the most extensively examined in aged humans and the consensus is that aging confers a
5 progressive decrease in collagen I synthesis, concurrent with an increase in collagen I degradation [40].
6 Production and reorientation of collagen are essential to restore the strength of the tendons and there are
7 reports that effects of laser photostimulation on tendon healing may involve the promotion of ECM
8 production and degradation [41]. Alves et al. [23] reported that the degradation of ECM components, such
9 as collagen fibers, occurs as a result of MMP activity.

10 Modulators of healing MMPs are important regulators of ECM remodeling, and their levels are altered
11 during tendon healing. In the rat flexor tendon laceration model, the expression of MMP-9 and MMP-13
12 (Collagenase-3) peaked between days 7 and 14. Levels of MMP-2, MMP-3, and MMP-14 (MT1-MMP)
13 increased after surgery, and remained high until day 28. These findings suggest that MMP-9 and MMP-13
14 participate only in collagen degradation, whereas MMP-2, MMP-3 and MMP-14 participate in both
15 collagen degradation and collagen remodeling [25]. In the present study, we conducted a study of MMP-3
16 and MMP-9 over the same experimental periods; we used immunohistochemistry and showed high activity
17 of these MMPs in the tendinitis aged group, suggesting that they had a key role in the collagen analysis
18 presented above.

19 Aging might exert a negative effect on tendon structure or its healing process by a mechanism that involves
20 increased MMP-2 and MMP-9 activities, and decreased proliferation of tenocytes [42]. Aro et al. [43]
21 observed the presence of latent and active isoforms of MMP-9 during the first 7 days after tendon injury.
22 This period is characterized by inflammation and MMP-9 is predominantly synthesized by inflammatory
23 cells; it has an important role in the degradation of denatured collagen and other matrix components.

24 Our group treated with LLLT showed little markup for both MPPs, similar to the results obtained in the
25 control group consisting of animals without changes due to age. Our results can also be endorsed by findings
26 of Casalechi et al. [44] that used the same model to study the effect of LLLT, operating at 780 nm, 22 mW
27 potency, and 1.54 J energy, investigating acute and chronic pathology, and determining the gene expression
28 of MMPs and the reduction of MMP-1 mRNA expression in groups that had received LLLT in the initial
29 phase of treatment. Silva et al. [45] conducted a study investigating the action of LLLT repair of skin
30 wounds in diabetic rats; the authors correlate the increase of collagen type I and III with reducing MMP-2
31 and MMP-9 and regarding the authors description of MMP-9 gene expression, and a marked decrease was
32 found in the diabetic group submitted to LLLT.

33 Tendinopathy or tendonitis is characterized histopathologically in the chronic stage by the disruption of
34 fibroblast proliferation and apoptosis with arrays, and the proliferation of vessels and nerves containing
35 sensory, nociceptive, and autonomic elements. This histopathology has been characterized as a "failed
36 healing response" and has also been termed "angiofibroblastic tendinosis" to refer to the major finding of
37 increased vascular fibroblastic and cellularity [46].

38 Regarding angiogenesis, VEGF plays a role in the formation and growth of new blood vessels, playing a
39 substantial role in chronic inflammation and wound healing. VEGF is also known to increase vascular
40 permeability, which can enhance clinical signs of overuse. The VEGF, von Willebrand factor, plays an

1 important role in tendon hemostasis. VEGF is not highly expressed in adult tendon, but its expression is
2 increased in several animals models of acute injury or mechanical loading [47]. Mechanical overload,
3 inflammation and injury, hypoxic conditions, or a combination of the above could lead to increased
4 expression of VEGF in tendon [46].

5
6 However, there is strong evidence that VEGF-induced angiogenesis might influence the course of
7 degenerative tendon disease in another way. It is well known that degradation of ECM is also required for
8 the sprouting and invasion of new blood vessels. Vascular endothelial or smooth muscle cells are known to
9 produce MMPs in response to VEGF stimulation [47].

10
11 Considering the evidence of the major role of VEGF in the tendinopathy healing process, LLLT action was
12 also an important marker. We observed that in the older tendinitis group, expression by
13 immunohistochemical labeling of VEGF had decreased compared the other groups throughout the
14 experimental periods; intra-group marking of VEGF gradually rose over 7, 14 and 21 days but without
15 approaching the normal control or tendinitis LLLT aged groups.

16
17 LLLT modulation of VEGF gene and protein expression is common in the literature, and some groups have
18 investigated the increase of VEGF expression under adverse conditions. De Oliveira et al. (2015) conducted
19 a study using two types of mesenchymal stem cells from human and rat adipose tissues on nutritional
20 deficiencies submitted to LLLT. VEGF and VEGFR2 were increased with LLLT action in both cell types;
21 however, human cells at nutritional deprivation showed higher expression of VEGF and its receptor after
22 irradiation with other laser doses. Casalecchi et al. [46] investigated the effect of LLLT in an identical
23 model to that used in this study and confirmed the early induction of VEGF mRNA expression in the LLLT
24 groups. Savitskaya et al. [47] reported that chronic tendon loading causes mechanical trauma, with multiple
25 microruptures of the microvasculature tendon. These microruptures initiate a cascade of VEGF-mediated
26 vascular remodeling that may be chronically pathological, and chronic tendon pathology appears to be a
27 highly active ongoing process of neovascularization. VEGF expression and neovascularization could be
28 used in the clinical setting to monitor tendon degeneration.

29
30 In summary, our findings demonstrate that aging and hormonal factors related to gender affect the
31 evolutionary-process-of-tendinopathy, inferring in chronic inflammation phase and complicating its
32 resolution. On the other hand, it also observed that LLLT was effective in tendon treatment even in adverse
33 conditions such as aging and hormonal changes caused by estrogen. This study suggests that LLLT obtained
34 satisfactory results, where the collagen type III tendinitis LLLT elderly group resembled the control group
35 at days 7 and 14 days, as well as collagen III at day 7. MMP-3 showed the best results in 21 days. MMP-9
36 showed the best results at 7 days. VEGF produced satisfactory results in 14 to 21 days.

37
38 Limitations to our study were the lack of measurement of estrogen and the inability to investigate type I
39 collagen by immunohistochemistry or another form of protein expression verification. Following on from
40 our analysis of MMPs, we could expand this study to using markers TIMP II and I.

41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 **Author Disclosure Statement** 58 59 60 61 62 63 64 65

1 Professor Ernesto Cesar Pinto Leal-Junior received research support from Multi Radiance Medical (Solon,
2 OH - USA), a laser device manufacturer. Multi Radiance Medical had no role in the planning of this study,
3 and the laser device used was not theirs. They had no influence on study design, data collection and analysis,
4 decision to publish, or preparation of the manuscript. The remaining authors declare that they have no
5 conflict of interests.
6
7
8
9

10 11 12 **Acknowledgements**

13 Professor Paulo de Tarso Camillo de Carvalho thanks the Brazilian Research Council-CNPq for the
14 Research Productivity Scholarship (Process nº 307665/2012-7).
15
16
17
18
19

20 21 **References**

- 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. Liu L, Rando TA (2011) Manifestations and mechanisms of stem cell aging. *J Cell Biol* 193:257-266. doi: 10.1083/jcb.201010131
 2. Ippolito E, Natali PG, Postacchini F, Accinni L, De Martino C (1980) Morphological, immunochemical, and biochemical study of rabbit achilles tendon at various ages. *J Bone Joint Surg (Am)* 62:583-598
 3. Nourissat G, Houard X, Sellam J, Duprez D, Berenbaum F (2013) Use of autologous growth factors in aging tendon and chronic tendinopathy. *Front Biosci (Elite Ed)* 5:911-921
 4. Ruzzini L, Abbruzzese F, Rainer A, Longo UG, Trombetta M, Maffulli N, Denaro V (2014) Characterization of age- related changes of tendon stem cells from adult human tendons. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 22:2856-2866. doi: 10.1007/s00167-013-2457-4
 5. Sharir A, Zelzer E (2011) Tendon homeostasis: the right pull. *Curr Biol* 21:R472-474. doi: 10.1016/j.cub.2011.05.025
 6. Sharma P, Maffulli N (2005) [Tendon injury and tendinopathy: healing and repair](#). *J Bone Joint Surg Am* 87:187-202.
 7. Marcos RL, Arnold G, Magnenet V, Rahouadj R, Magdalou J, Lopes-Martins RA (2014) [Biomechanical and biochemical protective effect of low-level laser therapy for Achilles tendinitis](#). *J Mech Behav Biomed Mater* 29:272-285.
 8. Haslerud S, Magnussen LH, Joensen J, Lopes-Martins RA, Bjordal JM (2015) [The efficacy of low-level laser therapy for shoulder tendinopathy: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials](#). *Physiother Res Int* 20:108-125.
 9. Lopes-Martins RA. (2014) [Tendinitis, an open avenue for low-level laser therapy](#). *Photomed Laser Surg*. 32:369-370.
 10. Doyle AT, Lauber C, Sabine K (2015) [The effects of LLLT on pain associated with tendinopathy: A critically appraised topic](#). *J Sport Rehabil*

11. Gao S, Shu S, Wang L, Zhou J, Yuan Z (2014) [Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine responses of peripheral blood mononuclear cells in apparently healthy subjects](#). *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 34:1589-1593.
12. Huusko JM, Karjalainen MK, Mahlman M, Haataja R, Kari MA, Andersson S, Toldi G, Tammela O, Rämetsä M, Lavoie PM, Hallman M (2014) Gen-BPD Study Group. [A study of genes encoding cytokines \(IL6, IL10, TNF\), cytokine receptors \(IL6R, IL6ST\), and glucocorticoid receptor \(NR3C1\) and susceptibility to bronchopulmonary dysplasia](#). *BMC Med Genet* 15:120.
13. Lopa S, Leijts MJ, Moretti M, Lubberts E, van Osch GJ, Bastiaansen-Jenniskens YM (2015) [Arthritic and non-arthritic synovial fluids modulate IL10 and IL1RA gene expression in differentially activated primary human monocytes](#). *Osteoarthritis Cartilage*. 23:1853-1857.
14. Lin TW, Cardenas L, Glaser DL, Soslowky LJ (2006) [Tendon healing in interleukin-4 and interleukin-6 knockout mice](#). *J Biomech* 39:61-69.
15. Ricchetti ET, Reddy SC, Ansoorge HL, Zgonis MH, Van Kleunen JP, Liechty KW, Soslowky LJ, Beredjiklian PK (2008) [Effect of interleukin-10 overexpression on the properties of healing tendon in a murine patellar tendon model](#). *J Hand Surg Am* 33:1843-1852.
16. Wanjare M, Agarwal N, Gerecht S (2015) [Biomechanical strain induces elastin and collagen production in human pluripotent stem cell-derived vascular smooth muscle cells](#). *Am J Physiol Cell Physiol* 309:C271-281.
17. Yang G, Crawford RC, Wang JH (2004) [Proliferation and collagen production of human patellar tendon fibroblasts in response to cyclic uniaxial stretching in serum-free conditions](#). *J Biomech* 37:1543-1550.
18. Tan LG, Xiao JH, Yu DL, Zhang L, Zheng F, Guo LY, Yang JY, Tang JM, Chen SY, Wang JN (2015) [PEP-1-SOD1 fusion proteins block cardiac myofibroblast activation and angiotensin II-induced collagen production](#). *BMC Cardiovasc Disord* 15:116.
19. Tumilty S, McDonough S, Hurley DA, Baxter GD (2012) [Clinical effectiveness of low-level laser therapy as an adjunct to eccentric exercise for the treatment of Achilles' tendinopathy: a randomized controlled trial](#). *Arch Phys Med Rehabil* 93:733-739.
20. Eslamian F, Shakouri SK, Ghojzadeh M, Nobari OE, Eftekharsadat B (2012) [Effects of low-level laser therapy in combination with physiotherapy in the management of rotator cuff tendinitis](#). *Lasers Med Sci* 27:951-958.
21. Stergioulas A, Stergioula M, Aarskog R, Lopes-Martins RA, Bjordal JM (2008) [Effects of low-level laser therapy and eccentric exercises in the treatment of recreational athletes with chronic achilles tendinopathy](#). *Am J Sports Med* 36:881-887.
22. 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* 30:1945-1951. doi: 10.1002/jor.22156
23. Alves AC, Albertini R, dos Santos SA, Leal-Junior EC, Santana E, Serra AJ, Silva JA Jr, de Carvalho Pde T (2014) [Effect of low-level laser therapy on metalloproteinase MMP-2 and MMP-](#)

- [9 production and percentage of collagen types I and III in a papain cartilage injury model](#). *Lasers Med Sci* 29:911-919.
24. Park DY, Min BH, Choi BH, Kim YJ, Kim M, Suh-Kim H, Kim JH (2015) The degeneration of meniscus roots is accompanied by fibrocartilage formation, which may precede meniscus root tears in osteoarthritic knees. *Am J Sports Med*.
25. Sharma P, Maffulli N (2006) Biology of tendon injury: healing, modeling and remodeling. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 6:181-190.
26. Helrigle C, de Carvalho PD, Casalechi HL, Leal-Junior EC, Fernandes GH, Helrigel PA, Rabelo RL, de Oliveira Aleixo-Junior I, Aimbire F, Albertini R (2015) Effects of low-intensity non-coherent light therapy on the inflammatory process in the calcaneal tendon of ovariectomized rats. *Lasers Med Sci*. doi: 10.1007/s10103-015-1821-7.
27. Tumilty S, Munn J, McDonough S, Hurley DA, Basford JR, Baxter GD (2010) [Low level laser treatment of tendinopathy: a systematic review with meta-analysis](#). *Photomed Laser Surg* 28:3-16.
28. Torres-Silva R, Lopes-Martins RA, Bjordal JM, Frigo L, Rahouadj R, Arnold G, Leal-Junior EC, Magdalou J, Pallotta R, Marcos RL (2015). [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* 30:1985-1990.
29. [Laraja 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* 88:1546-1550.
30. Frizziero A, Vittadini F, Gasparre G, Masiero S (2014) [Impact of oestrogen deficiency and aging on tendon: concise review](#). *Muscles Ligaments Tendons J* 4:324-328.
31. Dehghan F, Muniandy S, Yusof A, Salleh N (2014) Sex-steroid regulation of relaxin receptor isoforms (RXFP1 & RXFP2) expression in the patellar tendon and lateral collateral ligament of female WKY rats. *Int J Med Sci* 11:180-191.
32. Aydin A, Kenar H, Atmaca H, Alici T, Gacar G, Mtezzinoğlu ÜS, Karaöz E (2013) [The short- and long- term effects of estrogen deficiency on apoptosis in musculoskeletal tissues: an experimental animal model study](#). *Arch Iran Med* 16:271-276.
33. Taylor SH, Yeung CY, Kalson NS, Lu Y, Zigrino P, Starborg T, Warwood S, Holmes DF, Canty-Laird EG, Mauch C, Kadler KE (2015) [Matrix metalloproteinase 14 is required for fibrous tissue expansion](#). *Elife* 4:e09345. doi: 10.7554/eLife.09345
34. [Muto T1, Kokubu T, Mifune Y, Imui A, Harada Y, Yoshifumi, Takase F, Kuroda R, Kurosaka M](#) (2014) Temporary inductions of matrix metalloprotease-3 (MMP-3) expression and cell apoptosis are associated with tendon degeneration or rupture after corticosteroid injection. *J Orthop Res* 32:1297-1304. doi: 10.1002/jor.22681
35. Spiesz EM, Thorpe CT, Chaudhry S, Riley GP, Birch HL, Clegg PD, Screen HR (2015) [Tendon extracellular matrix damage, degradation and inflammation in response to in vitro overload exercise](#). *J Orthop Res* 33:889-897.

- 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
36. Dietrich F, L Duré G, P Klein C, F Bampi V, V Padoin A, D Silva V, Braga-Silva J (2015) Platelet-rich fibrin promotes an accelerated healing of Achilles tendon when compared to platelet-rich plasma in rat. *World J Plast Surg* 4:101-109.
 37. Torricelli P, Veronesi F, Pagani S, Maffulli N, Masiero S, Frizziero A, Fini M (2013) In vitro tenocyte metabolism in aging and oestrogen deficiency. *Age (Dordr)* 35(6):2125-36. doi: 10.1007/s11357-012-9500-0
 38. Guerra Fda R, Vieira CP, Almeida MS, Oliveira LP, de Aro AA, Pimentel ER (2013) LLLT improves tendon healing through increase of MMP activity and collagen synthesis. *Lasers Med Sci* 28:1281-1288. doi: 10.1007/s10103-012-1236-7
 39. Sprenger CC, Plymate SR, Reed MJ (2010) Aging-related alterations in the extracellular matrix modulate the microenvironment and influence tumor progression. *Int J Cancer* 127:2739-2748. doi: 10.1002/ijc.25615.
 40. Fillipin LI, Mauriz JL, Vedovelli K, Moreira AJ, Zettler CG, Lech O, Marroni NP, González-Gallego J (2005) Low level laser therapy (LLLTT) prevents oxidative stress and reduces fibrosis in rat traumatized Achilles tendon. *Lasers Surg Med* 37:293-300.
 41. Yu TY, Pang JH, Wu KP, Chen MJ, Chen CH, Tsai WC (2013) Aging is associated with increased activities of matrix metalloproteinase-2 and -9 in tenocytes. *BMC Musculoskelet Disord* 14:2. doi: 10.1186/1471-2474-14-2
 42. Aro AA, Simões GF, Esquisatto MA, Foglio MA, Carvalho JE, Oliveira AL, Gomes L, Pimentel ER (2013) *Arrabidaea chica* extract improves gait recovery and changes collagen content during healing of the Achilles tendon. *Injury* 44:884-892. doi: 10.1016/j.injury.2012.08.055
 43. Casalechi HL, Leal-Junior EC, Xavier M, Silva JA Jr, de Carvalho Pde T, Aimbire F, Albertini R (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. doi: 10.1007/s10103-012-1189-x
 44. Aparecida Da Silva A, Leal-Junior EC, Alves AC, Rambo CS, Dos Santos SA, Vieira RP, De Carvalho Pde T (2013) Wound-healing effects of low-level laser therapy in diabetic rats involve the modulation of MMP-2 and MMP-9 and the redistribution of collagen types I and III. *J Cosmet Laser Ther.* 15:210-216. doi: 10.3109/14764172.2012.761345
 45. Kaux JF, Janssen L, Drion P, Nussgens B, Libertiaux V, Pascon F, Heyeres A, Hoffmann A, Lambert C, Le Goff C, Denoël V, Defraigne JO, Rickert M, Crielaard JM, Colige A (2014) Vascular endothelial growth factor-111 (VEGF-111) and tendon healing: preliminary results in a rat model of tendon injury. *Muscles Ligaments Tendons J* 4:24-28.
 46. Pufe T, Petersen WJ, Mentlein R, Tillmann BN (2005) The role of vasculature and angiogenesis for the pathogenesis of degenerative tendons disease. *Scand J Med Sci Sports* 15:211-222.
 47. Savitskaya YA, Izaguirre A, Sierra L, Perez F, Cruz F, Villalobos E, Almazan A, Ibarra C (2011) Effect of angiogenesis-related cytokines on rotator cuff disease: the search for sensitive biomarkers of early tendon degeneration. *Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord* 4:43-53. doi: 10.4137/CMAMD.S7071

Legends

Fig. 1 Morphometric analysis of the percentage of collagen type I and III obtained from tendon and histological sections stained with Picrosirius red and observed under polarized light. (A) Panels representatively stained with Picrosirius Red show the presence of the two types of collagen fibers as well as their interlacing at 7, 14, and 21 days after experimentally induced tendinopathy in rats in groups: control, aged tendinopathy and aged tendinopathy LLLT. Magnification $\times 40$; *scale bar* = 20 μm . (B) Panels represent percentage of collagen type I at 7, 14, and 21 days after experimental induction. Data are presented as mean \pm SD. (C) Panels represent percentage of collagen type III at 7, 14, and 21 days after injury. * Denotes $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** denotes $p < 0.001$ using Bonferroni test with comparisons against the control group. # denotes $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, and ### $p < 0.001$ using Bonferroni test with comparisons against the aged tendinopathy. Data are presented as mean \pm SD.

Fig. 2 Comparison of the mean and standard deviation of immunolabeled areas in mm^2 for technical MMP-3 by immunohistochemistry. (A) Panel representatively stained and immunolabeled for MMP-3 at 7, 14, and 21 days after experimentally induced tendinopathy in rats in groups: control, tendinopathy aged, and tendinopathy LLLT aged. Magnification $\times 20$; *scale bar* = 20 μm . (B) Panel represents areas immunolabeled for MMP-3 at 7, 14, and 21 days after experimentally induced tendinopathy in rats in groups: control, tendinopathy aged, and tendinopathy LLLT aged. * Denotes $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ using Bonferroni test with comparisons against the control group; # denotes $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, and ### $p < 0.001$ using Bonferroni test with comparisons against the aged tendinopathy group. Data are presented as mean \pm SD.

Fig. 3 Comparison of the mean and standard deviation of immunolabeled areas in mm^2 for technical MMP-9 by immunohistochemistry. (A) Panel representatively stained with immunolabeled MMP-9 at 7, 14, and 21 days after experimentally induced tendinopathy in rats in groups: control, tendinopathy aged, and tendinopathy LLLT aged. Magnification $\times 20$; *scale bar* = 20 μm . (B) Panel represents areas immunolabeled for MMP-9 at 7, 14, and 21 days after experimentally induced tendinopathy in rats in groups: control, tendinopathy aged, and tendinopathy LLLT aged. * Denotes $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ using Bonferroni test with comparisons against the control group; # Denotes $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, and ### $p < 0.001$ using Bonferroni test with comparisons against the aged tendinopathy group. Data are presented as mean \pm SD.

Fig. 4 Comparison of the mean and standard deviation of immunolabeled areas in mm^2 for technical VEGF by immunohistochemistry. (A) Panel representatively stained and immunolabeled for VEGF at 7, 14, and 21 days after experimentally induced tendinopathy in rats in groups: control, tendinopathy aged, and tendinopathy LLLT aged. Magnification $\times 20$; *scale bar* = 20 μm . (B) Panel represents areas immunolabeled for VEGF at 7, 14, and 21 days after experimentally induced tendinopathy in rats in groups: control, tendinopathy aged, and tendinopathy LLLT aged. * Denotes $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ using Bonferroni test with comparisons against the control group; # denotes $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, and ### $p < 0.001$ using Bonferroni test with comparisons against the aged tendinopathy group. Data are presented as mean \pm SD.

Low-level laser therapy on collagen type I and III, vascular endothelial growth factor, and metalloproteinase in experimentally induced tendinopathy in aged rats

Anna Cristina de Farias Marques¹; Regiane Albertini¹; Andrey Jorge Serra²; Evela Aparecida Pereira da Silva²; Vanessa Lima Cavalcante de Oliveira¹; Luciana Miatto Silva¹, Ernesto C. Leal -Junior^{1,2}; Paulo de Tarso Camillo de Carvalho ^{1,2}

¹ Postgraduate Program in Rehabilitation Sciences, Universidade Nove de Julho (UNINOVE), São Paulo, SP, Brazil.

² Postgraduate Program in Biophotonics, Universidade Nove de Julho (UNINOVE), São Paulo, SP, Brazil. ³ Postgraduate Program in Medicine Universidade Nove de Julho (UNINOVE)

Please address reprint requests and all correspondence to:

Paulo de Tarso Camillo de Carvalho, Postgraduate Program in Rehabilitation Sciences, Universidade Nove de Julho (UNINOVE), Rua Vergueiro 235, São Paulo, SP, Brazil

Phone number: +55 19 99290262

Fax number: +55 11 33859000

E-mail: paulo.tarso@uninove.br

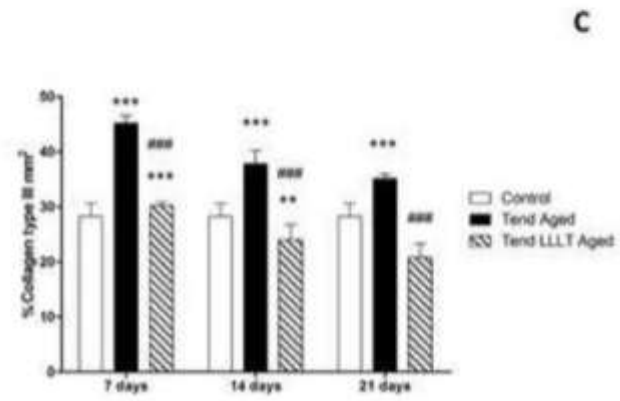
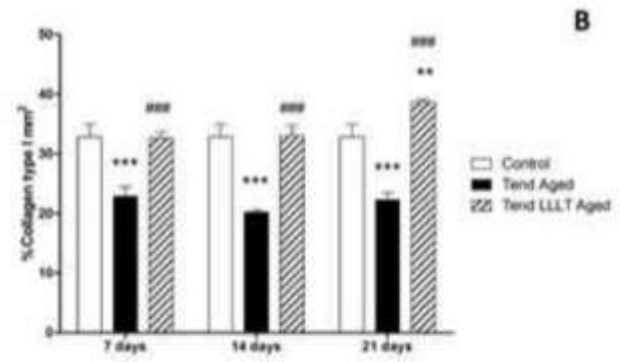
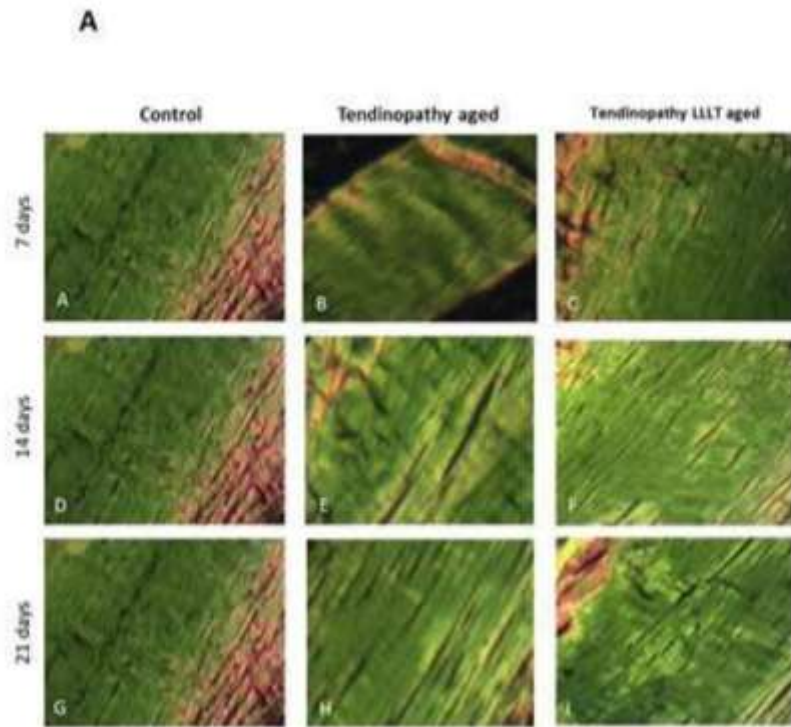


Figure 1

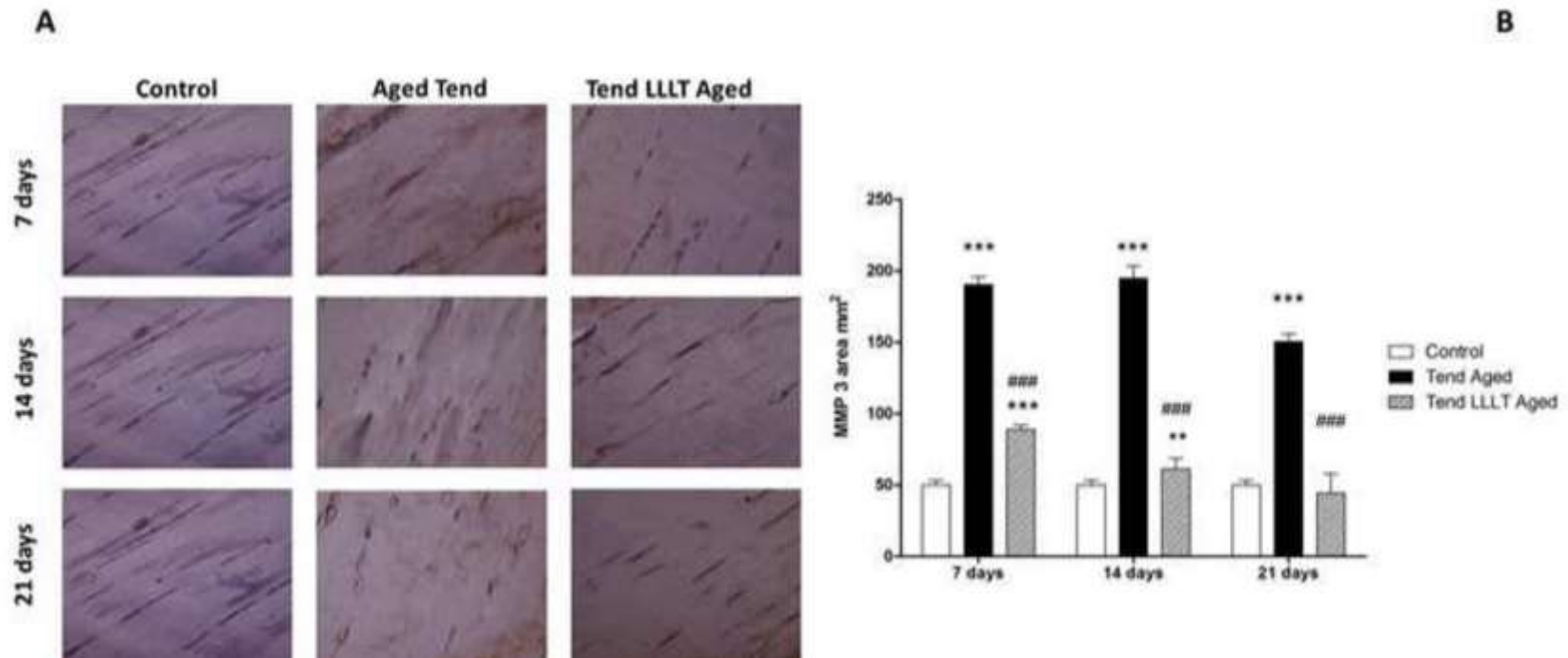


Figure 2

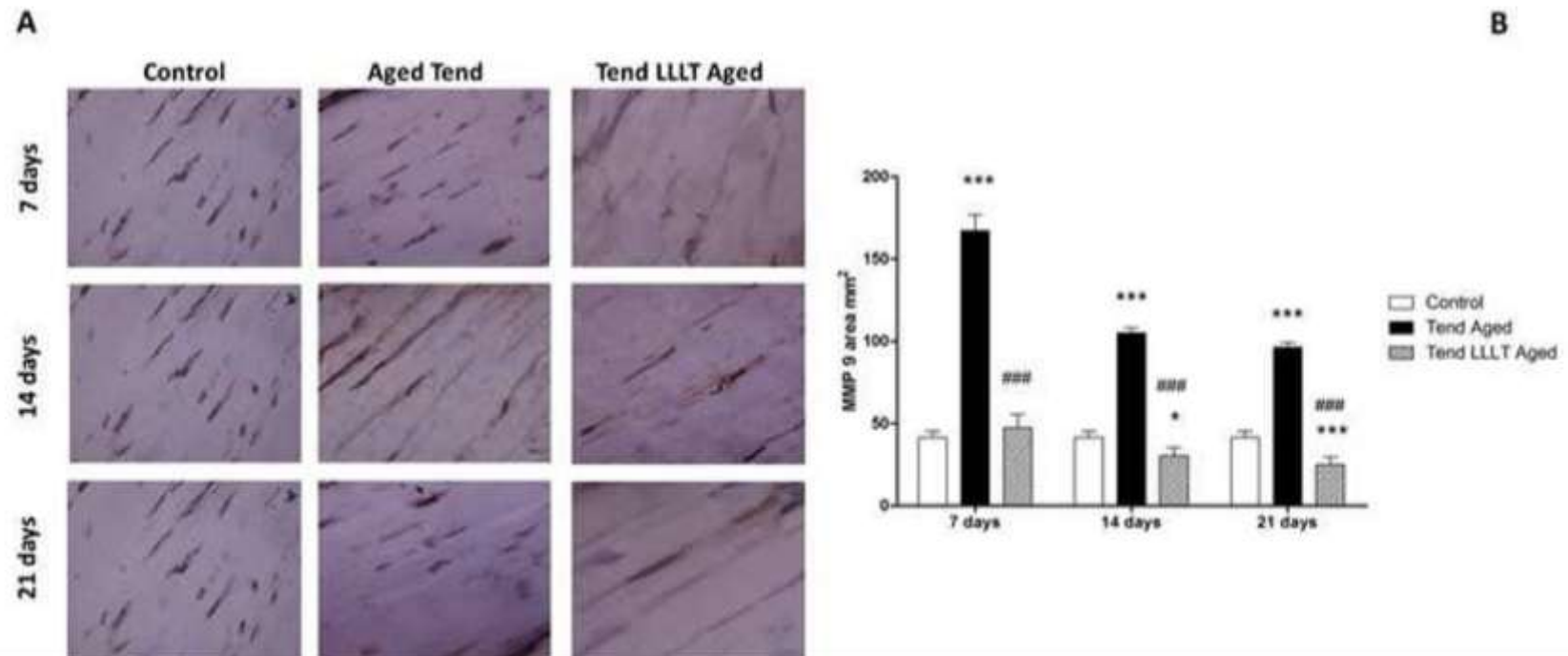


Figure 3

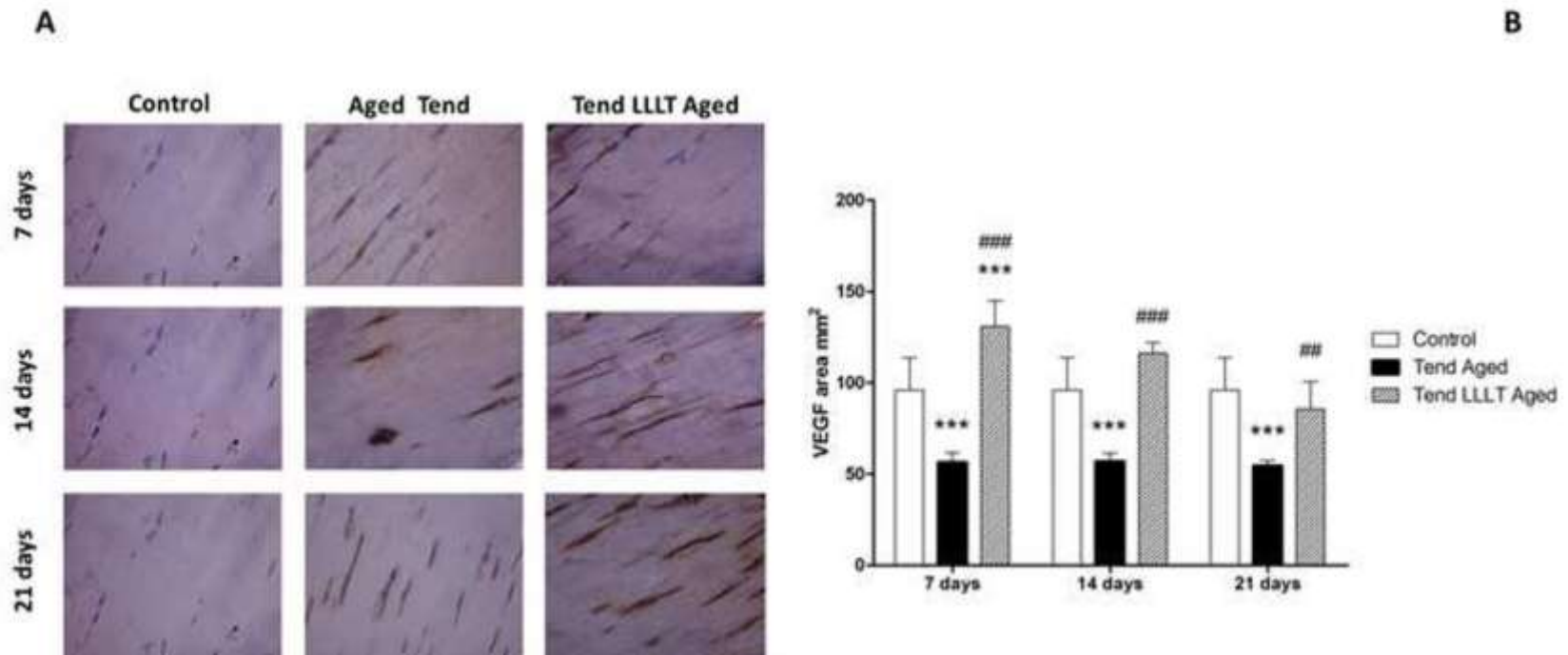


Figure 4

5 Discussão

A etiologia da tendinopatia ainda não está clara e muitas causas têm sido teorizadas, hipóxia, dano isquêmico, estresse oxidativo, hiperemia, apoptose prejudicada, inflamação, lesão no tendão, mediadores inflamatórios e desequilíbrio de metaloproteinase de matriz têm sido implicados aos mecanismos de degeneração do tendão. Histologicamente, tendinopatia mostra uma foto de cura casual desordenada, com ausência de células inflamatórias, má resposta de reparo, degeneração do colágeno intratendíneo, desorientação da fibra, hiper celularidade, e aumento glicosaminoglicanos interfibrilares (Sharma et al., 2006).

A diferença entre os sexos nas respostas imunes após a lesão é mediada em parte por alterações nos níveis de circulação de hormônios esteróides das gônadas através da modulação da produção de citocinas inflamatórias e imuno reguladoras, incluindo IL-6. Produção anormal de IL-6 é conhecida por ser um mediador importante de imunidade após a lesão, e estradiol é um regulador da produção de IL-6 e, por conseguinte, a função imunológica geral (HELRIGLE et al., 2015)

O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de investigar o comportamento do processo inflamatório crônico de tendinopatia em ratas fêmeas idosas quando submetidos à ação de Laser de Baixa Intensidade, onde vários estudos, incluindo estudos em nosso grupo, têm mostrado que a laserterapia pode ser uma poderosa ferramenta terapêutica, ao longo do processo inflamatório das tendinopatias (TUMILTY et al., 2010; TORRES-SILVA et al., 2015; MARCOS et al., 2012) e na reparação de danos no tendão (LARAIA et al., 2012). No entanto, a literatura afirma que as mudanças hormonais que ocorrem durante o envelhecimento, principalmente relacionadas ao estrógeno, são capazes de interferir com qualquer processo inflamatório (FRIZZIERO et al., 2014; DEGHAN et al., 2014; AYDIN et al., 2013), deposição de colágeno muitas vezes dificultada e estabelecendo um desequilíbrio na ação de metaloproteinases de matriz (MMPs) (TAYLOR et al., 2015; MUTO et al., 2014; SPIESZ et al., 2015). Nesta base, o presente estudo

teve como objetivo analisar a ação do LBI em modelo experimental de tendinopatia induzida por collagenase em ratas idosas, através da expressão imunohistoquímica de VEGF, MMP-3, MMP-9 e verificar o colágeno tipo I e III, durante a inflamação crônica, utilizando a técnica de coloração histológica para Picrosirius Red sob luz polarizada, nos tempos experimentais de 7, 14 e 21 dias.

Neste estudo, observou-se que a LBI, a uma dose de 3 joules, foi capaz de aumentar a deposição de colágeno quando comparado o grupo de ratas idosas com tendinopatia e demonstramos que o colágeno se aproximou dos valores do grupo controle, que consistia de ratas adultas. Além do colágeno total também avaliado e a porcentagem de colágeno marcado pela técnica de Picrosirius red, luz polarizada.

Poucos estudos têm se centrado sobre o efeito do envelhecimento sobre tendão, e a maioria deles tem investigado as características mecânicas dos tendões. Embora estudos mostrem que não têm diferenças nas dimensões ou propriedades mecânicas dos tendões entre jovens e idosos, o conteúdo de colágeno é menor em indivíduos mais velhos.

Colágenos do tipo I e III são os principais componentes da matriz extracelular em tendões, correspondendo a 65-95% e 10% da composição, respectivamente. A síntese de colágeno do tipo III aumenta durante as fases iniciais do reparo, e acredita-se que, quando se diminui, colágeno do tipo I é sintetizado e organizado. (DIETRICH et al., 2015). Analisando o grupo tendinopatia idoso LBI, aos 7, 14 e 21 dias, mostrou uma diferença estatística com o grupo tendinopatia idoso, áreas de colágeno tipo I e III, semelhante à cicatrização do tendão típico. O mesmo ocorreu com o colágeno tipo I no grupo controle. Pelo contrário, o colágeno tipo I e III, no grupo tendinopatia idoso LBI aos 14 e 21 dias não houve diferença estatística, explicando o reparo tardio. Nossos resultados nos permitem concluir que LBI sugere uma melhora e modulação da inflamação num modelo experimental, quando comparado o grupo tendinopatia idoso LBI com o grupo tendinopatia idoso.

Além do envelhecimento, os níveis de estrógeno também podem desempenhar um papel fundamental, o observado em mulheres que

apresentam um menor risco de tendinopatias durante os anos pré-menopausa, enquanto que, após a menopausa, esse risco aumenta. Os níveis de estrógeno podem influenciar o metabolismo do tendão, e, em adição a vários fatores de crescimento (isto em fator de crescimento derivados de plaquetas, fator de crescimento transformante- β , fator-1, fator de crescimento endotelial vascular, proteínas morfogenéticas ósseas, fatores de diferenciação de crescimento tipo insulina), o estrógeno, são importantes para o comportamento de tecidos musculoesqueléticos e pode afetar as propriedades do tendão; deficiência de estrógeno na pós-menopausa parece regular para baixo turnover de colágeno e à diminuição da elasticidade do tendão. (TORRICELLI et al., 2013) Os nossos resultados com relação ao colágeno são semelhantes aos achados de GUERRA et al., (2013), foi estudado utilizando ratas adultas saudáveis, realizada uma Tenotomia parcial e tratado com Laser GaAIAs com um comprimento de onda de 830 nm, pulsado com 4 J, ainda com a mesma dose nos dias 8 e 15 dias após a lesão e investigou o colágeno e a atividade das MMPs e a síntese de colágeno. Os pesquisadores concluíram que a LBI pulsado, melhorou a remodelação da MEC durante o processo de reparo nos tendões através da ativação de MMP-2 e estimulação da síntese de colágeno. Incremento colágeno obtido por LBI, em nosso estudo está de acordo com os resultados de outros pesquisadores que, apesar de não usar o modelo com animais idosos e diferentes tipos de tecidos na investigação dos resultados de LBI, são satisfatórios no aumento de colágeno (SPRENGER et al., 2010).

Colágeno I tem sido o mais extensivamente examinado em seres humanos idosos e o consenso é que o envelhecimento confere uma diminuição progressiva de síntese de colágeno do tipo I, concomitante com um aumento de degradação de colágeno I (FILLIPIN et al., 2005).

A produção e a reorientação do colágeno são essenciais para reparar a força dos tendões e há relatos que efeitos da foto estimulação do laser na cicatrização do tendão podem envolver a promoção da produção de matriz extracelular e degradação (YU et al., 2013).

Segundo, ALVES et al. (2014), a degradação dos componentes da matriz extracelular, tais como fibras de colágeno, ocorre como resultado da atividade de Metaloproteinase de Matriz.

Moduladores de MMPs no reparo são importantes reguladores da remodelação da MEC, e seus níveis são alterados durante a cicatrização do tendão. No modelo de laceração do tendão flexor de rato, a expressão de MMP-9 e MMP-13 (colagenase-3) atingiu um pico entre os dias 7 e 14. MMP-2, MMP-3 e MMP-14, níveis aumentados depois cirurgia, e manteve-se elevada até o dia 21. Estes resultados sugerem que MMP-9 e MMP-13, participam apenas na degradação do colágeno, considerando que o MMP-2, MMP-3 e MMP-14 participam tanto na degradação, como na remodelação do colágeno (SHARMA et al., 2006).

No presente estudo também foi realizado uma análise de MMP 3 e 9 sobre os mesmos períodos experimentais, portanto, usamos a técnica de imunohistoquímica e podemos ver que no grupo de tendinopatia idoso a atividade dessas MMPs foi intensa, que nos leva a crer que eles tinham um papel-chave nos resultados apresentados da análise do colágeno.

O envelhecimento pode exercer um efeito negativo sobre a estrutura do tendão ou no seu processo de cicatrização. O mecanismo implica uma multiplicação na atividade de MMP-2 e MMP-9, e diminuição na proliferação de tenócitos. ARO et al. (2013) observaram a presença de isoformas ativas e latentes da MMP-9, durante os primeiros 7 dias após a lesão do tendão. Este período é caracterizado por uma fase inflamatória e a MMP-9 é predominantemente sintetizada pelas células inflamatórias, o que tem um papel importante na degradação de colágeno desnaturado e de outros componentes da matriz.

No grupo tendinopatia idoso tratado com LBI mostrou pouca marcação para ambas as metaloproteinases, semelhantes aos resultados obtidos no grupo controle, composto por animais sem lesão e sem alterações devido à idade. Nossos resultados também confirmam os achados de CASALECHI et al. (2013) que é utilizado o mesmo modelo experimental e estudaram o efeito da LBI operando a 780 nm, potência de 22 mW e energia 1,54 J, onde foi

investigado a patologia aguda e crônica, utilizando os valores de expressão gênica de MMP. Foi observado a redução da expressão de MMP-1 mRNA, em que grupos receberam LBI na fase inicial do tratamento. SILVA et al. (2013) realizaram um estudo investigando a ação da LBI na reparação de feridas cutâneas em ratos diabéticos, os autores relacionam o aumento de colágeno tipo I e III, reduzindo metaloproteinases 2 e 9, como também descrevem que na expressão gênica MMP9, foi encontrada uma diminuição acentuada no grupo dos diabéticos submetidos a LBI.

A tendinopatia é caracterizada histopatologicamente na fase crônica pela interrupção da proliferação de fibroblastos e apoptose nas matrizes, ea proliferação de vasos e nervos contendo sensorial, nocicepção, e elementos autonômicos. A imagem histopatológica tem sido caracterizada como uma "resposta de reparo falha" e também tem sido chamado de "tendinose angiofibroblástica" para referir-se a principal conclusão de fibroblastos vasculares e aumento da celularidade (PUFE et al., 2005).

No que diz respeito à angiogênese, o VEGF desempenha um papel na formação e crescimento de novos vasos sanguíneos. O papel angiogênico que desempenha na inflamação crônica e cicatrização de feridas é substancial. VEGF também é conhecido por aumentar a permeabilidade vascular, que pode aumentar a sinais clínicos excessivos. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), desempenha um papel importante na homeostase do tendão. VEGF não é altamente expresso no tendão saudável de adulto, mas sua expressão é aumentada em vários modelos animais de lesão aguda ou carga mecânica (SAVITSKAYA et al., 2011). A sobrecarga mecânica, inflamação e lesão, condições de hipóxia, ou alguma combinação dos anteriores pode levar ao aumento expressão de VEGF no tendão (PUFE et al., 2005).

No entanto, existe uma forte evidência de que o VEGF induz a angiogênese, podendo influenciar o curso da doença degenerativa do tendão de outra maneira. A degradação é bem conhecida da matriz extracelular e é necessário também para o surgimento e invasão de novos vasos sanguíneos. Endotélio vascular ou células do músculo liso são conhecidos por produzirem as metaloproteinases de matriz (MMPs) em resposta à estimulação de VEGF

(SAVITSKAYA et al., 2011). Diante da evidência do papel importante do VEGF no processo de reparo na tendinopatia, também realizamos neste estudo, uma investigação da ação LBI, neste importante marcador, e foi observado que na expressão do grupo tendinopatia idoso por marcação imunohistoquímica de VEGF, tinha diminuído em comparação a outros grupos em todos os períodos experimentais e intra-grupo que marcam o VEGF, sofrendo aumento gradual ao longo de 7, 14 e 21 dias, mas sem se aproximar do grupo controle e do grupo tendinopatia idoso LBI.

Os resultados de estudos com LBI em que a modulação na expressão gênica e proteica de VEGF, são comuns na literatura, e alguns deles têm investigado o aumento da expressão de VEGF sob condições adversas tal como o estudo de OLIVEIRA et al., (2015) realizaram um estudo utilizando dois tipos de células-tronco mesenquimais (MSCs) de humanos e ratos, com tecidos adiposos em deficiências nutricionais, submetidos a LBI. Concluiu-se que o VEGF e VEGFR2 foram aumentados com a ação LBI em ambos os tipos de células, no entanto, as células humanas na privação nutricional apresentaram maior expressão do VEGF e seu receptor após a irradiação com outras doses laser.

CASALECHI et al., (2013) investigaram a ação do LBI em modelo idêntico a usada por nós neste estudo e concluiu que o nível de expressão de RNAm para VEGF aumentou nos grupos que a LBI iniciou cedo.

Segundo, SAVITSKAYA et al., (2011), a lesão crônica do tendão, provocada por trauma mecânico, com múltiplas micro rupturas, estas iniciam uma cascata vascular mediada por VEGF, onde pode ser notada cronicamente numa fase patológica. A tendinopatia crônica no tendão parece ser um processo altamente ativo no curso de neovascularização. A expressão de VEGF e neovascularização pode ser utilizada na prática clínica para monitorar a degeneração do tendão.

Em resumo, os nossos resultados demonstram que o envelhecimento e fatores hormonais relacionados ao gênero, afetam o processo evolutivo da tendinopatia, inferindo na fase de inflamação crônica e complicando sua resolução. Por outro lado, também foi observado que a LBI pode ser um aliado

eficaz no tratamento dos tendões, mesmo em condições adversas, tais como no envelhecimento e nas alterações hormonais causadas pela deficiência de estrógeno. No entanto, nosso estudo tem limitações, como a falta de medição do estrógeno e a falta de investigar também o colágeno tipo I por imunohistoquímica ou outra forma de verificação da expressão proteica. Devemos também ressaltar que a extensão deste estudo utilizando marcadores TIMP II e I, é importante, uma vez conduzido o estudo de MMP 3 e 9.

6 Considerações finais

Conclui-se que este estudo sugere que a LBI obteve resultados satisfatórios, onde o grupo tendinopatia idoso LBI, ocolágeno tipo I se assemelha ao grupo controle nos dias 7 e 14 dias. Bem como o colágeno III em 7 dias. A MMP3 obteve os melhores resultados em 21 dias. Como a MMP9 em 7 dias. No caso do VEGF, o resultado positivo foi alcançado em 14 a 21 dias.

7 Referências Bibliográficas

ALBERTINI, R.;VILLAVARDE, AB.;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.**, 2008; 26(1): 19-24.

ALBUQUERQUE-PONTES, G.M.;VIEIRA, R.de P.;TOMAZINI, S.S.;CAIRES, C.O.; NEMETH, V.; VANIN, A.A.;SANTOS, L.A.;PINTO, H.D.;MARCOS, R.L.;BJORDAL, J.M.; de CARVALHO, P. de T.; LEAL-JUNIOR, E.C.Effect of pre-irradiation with different doses, wavelengths, and application intervals of low-level laser therapy on cytochrome c oxidase activity in intact skeletal muscle of rats. **Lasers Med Sci.** 2015 Jan;30(1):59-66.

ALVES, A.C.;ALBERTINI, R.; dos SANTOS, S.A.; LEAL-JUNIOR, E.C.; SANTANA, E.; SERRA, A.J.; SILVA, J. A. Jr.; de CARVALHO, P. de T. Effect of low-level laser therapy on metalloproteinase MMP-2 and MMP-9 production and percentage of collagen types I and III in a papain cartilage injury model. **Lasers Med Sci.** 2014 May;29(3):911-9.

APARECIDA, Da S. A.; LEAL-JUNIOR E.C.; ALVES A.C.; RAMBO, C.S.; Dos SANTOS S.A.; VIEIRA, R.P.; De CARVALHO, P. de T. Wound-healing effects of low-level laser therapy in diabetic rats involve the modulation of MMP-2 and MMP-9 and the redistribution of collagen types I and III. **J Cosmet Laser Ther.** 2013 Aug;15(4):210-6.

ARO, A.A.; SIMÕES, G.F.; ESQUISATTO, M.A.; FOGLIO, M.A.; CARVALHO, J.E.; OLIVEIRA, A.L.; GOMES, L.; PIMENTEL, E.R. Arrabidaea chica extract improves gait recovery and

changes_collagen_content during healing of the Achilles_tendon. **Injury**. 2013 Jul;44(7):884-92.

AYDIN, A.; KENAR, H.; ATMACA, H.; ALICI, T.; GACAR, G.; MÜEZZIONOĞLU, Ü.S.; KARAÖZ, E. The short- and long- term effects of estrogen deficiency on apoptosis in musculoskeletal tissues: an experimental animal model study. **Arch Iran Med**. 2013 May;16(5):271-6.

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.**, 2006; 40: 76-80.

CASALECHI, H.L.; LEAL-JUNIOR, E.C.; XAVIER, M.; SILVA, J.A. Jr.; de CARVALHO, P. de T.; AIMBIRE, F.; ALBERTINI, R. Low-level laser therapy_in_experimentalmodel_of_collagenaseInduced_tendinitis_in_rats:effects_in_acute_and_chronic_inflammatory_phases. **Lasers Med Sci**. 2013 May;28(3):989-95.

CASALECHI, H.L.; de FARIAS MARQUES, A.C.; da SILVA, E.A.; AIMBIRE, F.; MARCOS, R.L.; LOPES-MARTINS, R.A.; de CARVALHO, P. de T.; ALBERTINI, R. Analysis of the effect of phototherapy in model with traumatic Achilles tendon injury in rats. **Lasers Med Sci**. 2014 May;29(3):1075-81.

DEHGHAN, F.; MUNIANDY, S.; YUSOF, A.; SALLEH, N. Sex-steroid regulation of relaxin receptor isoforms (RXFP1 & RXFP2) expression in the patellar tendon and lateral collateral ligament of female WKY rats. **Int J Med Sci**. 2014 Jan 9;11(2):180-91.

DIETRICH, F.; L. DURÉ G.; P. KLEIN, C.; F. BAMPI, V.; V. PADOIN, A.; D. SILVA, V.; BRAGA-SILVA, J. Platelet-Rich Fibrin Promotes an Accelerated Healing of Achilles_Tendon_When Compared to Platelet-Rich Plasma in Rat. **World J Plast Surg**. 2015 Jul;4(2):101-9

DOYLE, A.T.; LAUBER C.; SABINE, K. The Effects of LLLT on Pain Associated With Tendinopathy: A Critically Appraised Topic. *J Sport Rehabil.* 2015 Jan 5.

Eslamian F, Shakouri SK, Ghojzadeh M, Nobari OE, Eftekharsadat B. Effects of low-level laser therapy in combination with physiotherapy in the management of rotator cuff tendinitis. *Lasers Med Sci.* 2012 Sep;27(5):951-8.

FARIVAR, S.; MALEKSHAHABI, T.; SHIARI, R. Biologicaleffectsof lowlevel laser therapy. *J Lasers MedSci.* 2014 Spring;5(2):58-62.

FERRARESI, C.; MARCELO, V. P. DE S.; YING-YING, H.; BAGNATO, V. S.; ARIZOTTO, N. A.; HAMBLIN, M. R. Time response of increases in ATP and muscle resistance to fatigue after low-level laser (light) therapy (LLLT) in mice. *Lasers Med Sci* (2015) 30:1259–1267.

FERRARESI, C.; PARIZOTTO, N.A.; PIRES, DE S.M.V.; KAIPPERT, B.; HUANG, Y.Y.; KOISO, T.; BAGNATO, V.S.; HAMBLIN, M.R. Light-emitting diode therapy in exercise-trained mice increases muscle performance, cytochrome c oxidase activity, ATP and cell proliferation. *J Biophotonics.* 2015 Sep;8(9):740-54.

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.* 2005 Oct;37(4):293-300.

FRIZZIERO, A.; VITTADINI, F.; GASPARRE, G.; MASIERO, S. Impact of oestrogen deficiency and aging on tendon: concise review. *Muscles Ligaments Tendons J.* 2014 Nov 17;4(3):324-8.

GAO, S.; SHU, S.; WANG, L.; ZHOU, J.; YUAN, Z. Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine responses of peripheral blood mononuclear cells

in apparently healthy subjects]. **Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao**. 2014 Nov;34(11):1589-93. Chinese.

GENOVESE, J.W. (8. Eds.) Laser de baixa intensidade. São Paulo: Lovise, 2000.

GUERRA, F.D.A. R.; VIEIRA, C.P.; ALMEIDA, M.S.; OLIVEIRA, L.P.; DE ARO, A.A.; PIMENTEL, E.R. LLLT improves tendon healing through increase of MMP activity and collagen synthesis. **Lasers Med Sci**. 2013 Sep;28(5):1281-8.

HASLERUD, S.; MAGNUSSEN, L.H.; JOENSEN, J.; LOPES-MARTINS, R.A.; BJORDAL, J.M. The efficacy of low-level laser therapy for shoulder tendinopathy: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Physiother Res Int**. 2015 Jun;20(2):108-25.

HAYER, S.; REDLICH, K.; KORB, A.; HERMANN, S.; SMOLEN, J.; SCHETT, G. Tnosynovitis 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.

HELRIGLE, C.; DE CARVALHO, P.D.; CASALECHI, H.L.; LEAL-JUNIOR, E.C.; FERNANDES, G.H.; HELRIGEL, P.A.; RABELO, R.L.; DE OLIVEIRA ALEIXO-JUNIOR, I.; AIMBIRE, F.; ALBERTINI, R. Effects of low-intensity non-coherent light therapy on the inflammatory process in the calcaneal tendon of ovariectomized rats. **Lasers Med Sci**. 2015 Oct 27.

HUUSKO, J.M.; KARJALAINEN, M.K.; MAHLMAN, M.; HAATAJA, R.; KARI, M.A.; ANDERSSON, S.; TOLDI, G.; TAMMELA, O.; RÄMET, M.; LAVOIE, P.M.; HALLMAN, M.; GEN-BPD STUDY GROUP. A study of genes encoding cytokines (IL6, IL10, TNF), cytokine receptors (IL6R, IL6ST), and glucocorticoid receptor (NR3C1) and susceptibility to bronchopulmonary dysplasia. **BMC Med Genet**. 2014 Nov 1;15:120.

IPPOLITO, E.; NATALI, P.G.; POSTACCHINI, F.; ACCINNI, L.; DE MARTINO, C. (1980) Morphological, immunochemical, and biochemical study of rabbit achilles tendon at various ages. **J Bone Joint Surg (Am)** 62:583–598.

KHAN KM.; COOK JL.; BONAR F.; HARCOURT PAM. Histopathology of common tendinopathies. Update and implications for clinical management. *Sports Med* 1999; 27: 393–408.

KAUX, J.F.; JANSSEN, L.; DRION, P.; NUSGENS, B.; LIBERTIAUX, V.; PASCON, F.; HEYERES, A.; HOFFMANN, A.; LAMBERT, C.; LE GOFF, C.; DENOËL, V.; DEFRAIGNE, J.O.; RICKERT, M.; CRIELAARD, J.M.; COLIGE, A. Vascular Endothelial Growth Factor-111 (VEGF-111) and tendon healing: preliminary results in a rat model of tendon injury. **Muscles Ligaments Tendons J.** 2014 May 8;4(1):24-8.

KVIST, M.; JOZSA, L.; JARVINEN, M. Fine structural alterations in chronic Achilles paratenonitis in athletes. **Path. Res. Pract.**, v. 180, p. 416-423, 1985.

LARAIA, E.M.; SILVA, I.S.; PEREIRA, D.M.; DOS REIS, F.A.; ALBERTINI, R.; DE ALMEIDA, P.; LEAL JUNIOR, E.C.; DE T. C. DE CARVALHO, P. DE T. C. Effect of low-level laser therapy (660 nm) on acute inflammation induced by tenotomy of Achilles tendon in rats. **Photochem Photobiol.** 2012 Nov-Dec;88(6):1546-50.

LIN, T.W.; CARDENAS, L.; GLASER, D.L.; SOSLOWSKY, L.J. Tendon healing in interleukin-4 and interleukin-6 knockout mice. **J Biomech.** 2006;39(1):61-9.

LIU, L.; RANDO, T.A. Manifestations and mechanisms of stem cell aging. **J Cell Biol.** 2011 Apr 18;193(2):257-66.

LOPA, S.; LEIJS, M.J.; MORETTI, M.; LUBBERTS, E.; VAN OSCH, G.J.; BASTIAANSEN-JENNISKENS, Y.M. Arthritic and non-arthritic synovial fluids modulate IL10 and IL1RA gene expression in differentially activated primary human monocytes. **Osteoarthritis Cartilage**. 2015 Nov;23(11):1853-7.

LOPES-MARTINS, R.A. Tendinitis, an open avenue for low-level laser therapy. **Photomed Laser Surg**. 2014 Jul;32(7):369-70.

MARCOS.R.L.; LEAL-JUNIOR, E.C.; ARNOLD, G.; MAGNET, V.; RAHOUADJ, R.; WANG, X.; DEMEURIE, F.; MAGDALOU, J.; DE CARVALHO, M.H.; LOPES-MARTINS, R.Á. Low-level laser therapy in collagenase-induced Achilles tendinitis in rats: analyses of biochemical and biomechanical aspects. **J Orthop Res**. 2012 Dec;30(12):1945-51.

MARCOS, R.L.; ARNOLD, G.; MAGNET, V.; RAHOUADJ, R.; MAGDALOU, J.; LOPES-MARTINS, R.Á. Biomechanical and biochemical protective effect of low-level laser therapy for Achilles tendinitis. **J Mech Behav Biomed Mater**. 2014 Jan;29:272-85.

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.**, 2003; 18(2): 102-106.

MUTO, T.; KOKUBU, T.; MIFUNE, Y.; INUI, A.; HARADA, Y.; YOSHIFUMI; TAKASE, F.; KURODA, R.; KUROSAKA, M. Temporary inductions of matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) expression and cell apoptosis are associated with tendon degeneration or rupture after corticosteroid injection. **J Orthop Res**. 2014 Oct;32(10):1297-304. doi: 10.1002/jor.22681. Epub 2014 Jul 2.

NOURISSAT, G.; HOUARD, X.; SELLAM, J.; DUPREZ, D.; BERENBAUM, F.; Use of autologous growth factors in aging tendon and chronic tendinopathy. **Front Biosci (Elite Ed)**. 2013 Jun 1; 5:911-21.

PARK, D.Y.; MIN, B.H.; CHOI, B.H.; KIM, Y.J.; KIM, M.; SUH-KIM, H.; KIM, J.H. The Degeneration of Meniscus Roots Is Accompanied by Fibrocartilage Formation, Which May Precede Meniscus Root Tears in Osteoarthritic Knees. **AmJ Sports Med.** 2015 Oct 1.

PUFE, T.; PETERSEN, W.J.; MENTLEIN, R.; TILLMANN, B.N. The role of vasculature and angiogenesis for the pathogenesis of degenerative tendons disease. **Scand J Med Sci Sports.** 2005 Aug;15(4):211-22.

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 Am.** 2008 Dec;33(10):1843-52.

RUZZINI, L.; ABBRUZZESE, F.; RAINER, A.; LONGO, U.G.; TROMBETTA, M.; MAFFULLI, N.; DENARO, V. Characterization of age related changes of tendon stem cells from adult human tendons. **Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.** 2014 Nov;22(11):2856-66.

SAVITSKAYA, Y.A.; IZAGUIRRE, A.; SIERRA, L.; PEREZ, F.; CRUZ, F.; VILLA LOBOS, E.; ALMAZAN, A.; IBARRA, C. Effect of angiogenesis-related cytokines on rotator cuff disease: the search for sensitive biomarkers of early tendon degeneration. **Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord.** 2011;4:43-53.

SHARMA, P.; MAFFULLI, N. Tendon injury and tendinopathy: healing and repair. **J Bone Joint Surg Am.** 2005 Jan;87(1):187-202.

SHARMA, P.; MAFFULLI, N. Biology of tendon injury: healing, modeling and remodeling. **J Musculoskelet Neuronal Interact.** 2006 Apr-Jun;6(2):181-90.

SHARIR, A.; ZELZER, E. Tendon homeostasis: the right pull. **Curr Biol.** 2011 Jun 21;21(12):R472-4.

SPIESZ, E.M.; THORPE, C.T.; CHAUDHRY, S.; RILEY, G.P.; BIRCH, H.L.; CLEGG, P.D.; SCREEN, H.R. Tendon extracellular matrix damage, degradation and inflammation in response to in vitro overload exercise. **J Orthop Res.** 2015 Jun;33(6):889-97.

SPITLER, R.; HO, H.; NORPETLIAN, F.; KONG, X.; JIANG, J.; YOKOMORI, K.; ANDERSEN, B.; BOSS, G.R.; BERNS, M.W. Combination of low level light therapy and nitrosyl-cobinamide accelerates wound healing. **J Biomed Opt.** 2015 May;20(5):051022.

SPRENGER, C.C.; PLYMATE, S.R.; REED, M.J. Aging-related alterations in the extracellular matrix modulate the microenvironment and influence tumor progression. **Int J Cancer.** 2010 Dec 15;127(12):2739-48.

STERGIOULAS, A.; STERGIOULA, M.; AARSKOG, R.; LOPES-MARTINS, R.A.; BJORDAL, J.M. Effects of low-level laser therapy and eccentric exercises in the treatment of recreational athletes with chronic achilles tendinopathy. **Am J Sports Med.** 2008 May;36(5):881-7.

TAN, L.G.; XIAO, J.H.; YU, D.L.; ZHANG, L.; ZHENG, F.; GUO, L.Y.; YANG, J.Y.; TANG, J.M.; CHEN, S.Y.; WANG, J.N. PEP-1-SOD1 fusion proteins block cardiac myofibroblast activation and angiotensin II-induced collagen production. **BMC Cardiovasc Disord.** 2015 Oct 7;15(1):116.

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

TAYLOR, S.H.; YEUNG, C.Y.; KALSON, N.S.; LU, Y.; ZIGRINO, P.; STARBORG, T.; WARWOOD, S.; HOLMES, D.F.; CANTY-LAIRD, E.G.; MAUCH, C.; KADLER, K.E. Matrix metalloproteinase 14 is required for fibrous tissue expansion. **Elife**. 2015 Sep 21;4.

TORRES-SILVA, R.; LOPES-MARTINS, R.A.; BJORDAL, J.M.; FRIGO, L.; RAHOUADJ, 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**. 2015 Sep;30(7):1985-90.

TUMILTY, S.; MUNN, J.; MCDONOUGH, S.; HURLEY, D.A.; BASFORD, J.R.; BAXTER, G.D. Low level laser treatment of tendinopathy: a systematic review with meta-analysis. **Photomed Laser Surg**. 2010 Feb;28(1):3-16.

TUMILTY, S.; MCDONOUGH, S.; HURLEY, D.A.; BAXTER, G.D. Clinical effectiveness of low-level laser therapy as an adjunct to eccentric exercise for the treatment of Achilles' tendinopathy: a randomized controlled trial. **Arch Phys Med Rehabil**. 2012 May;93(5):733-9.

WANJARE, M.; AGARWAL, N.; GERECHT, S. Biomechanical strain induces elastin and collagen production in human pluripotent stem cell-derived vascular smooth muscle cells. **Am J Physiol Cell Physiol**. 2015 Aug 15;309(4):C271-81.

YANG, G.; CRAWFORD, R.C.; WANG, J.H. Proliferation and collagen production of human patellar tendon fibroblasts in response to cyclic uniaxial stretching in serum-free conditions. **J Biomech**. 2004 Oct;37(10):1543-50.

YU, T.Y.; PANG, J.H.; WU, K.P.; CHEN, M.J.; CHEN, C.H.; TSAI, W.C. Aging is associated with increased activities of matrix metalloproteinase-2 and -9 in tenocytes. **BMC Musculoskelet Disord**. 2013 Jan 2;14:2.