

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

**ESTUDO EXPERIMENTAL DA FOTOBIMODULAÇÃO EM MODELO DE  
COABITAÇÃO ENTRE CAMUNDONGOS COM TENDINITE E  
CAMUNDONGOS COM TUMOR DE BEXIGA INDUZIDO**

**Marcia Aparecida Makabe**

**São Paulo  
2018**

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO**

**MARCIA APARECIDA MAKABE**

**ESTUDO EXPERIMENTAL DA FOTOBIMODULAÇÃO EM MODELO DE  
COABITAÇÃO ENTRE CAMUNDONGOS COM TENDINITE E  
CAMUNDONGOS COM TUMOR DE BEXIGA INDUZIDO**

**Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Biofotônica Aplicada às Ciências  
da Saúde da Universidade Nove de  
Julho, para obtenção do Título de  
Mestre.**

**Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos**

**São Paulo**

**2018**

***Makabe, Marcia Aparecida.***

***Estudo experimental da fotobiomodulação em modelo de coabitação entre camundongos com tendinite e camundongos com tumor de bexiga induzido. / Marcia Aparecida Makabe, 2019.***

***47 f.***

***Dissertação (Mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2019.***

***Orientador (a): Prof. Dr. Rodrigo Labat.***

***1. Coabitação. 2. Tendinite. 3. Fotobiomodulação. 4. Laser de baixa intensidade. 5. Mediadores inflamatórios***

***I. Labat, Rodrigo. II. Título***

***CDU 615.831***

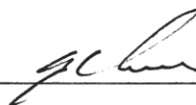
São Paulo, 06 de fevereiro de 2016

**TERMO DE APROVAÇÃO**

Aluno (a): Mamia Aparecida Makabe

Titulo da Dissertação: "Estudo experimental da fotobiomodulação em modelo de coabitação entre camundongos com tendinite e camundongos com tumor de bexiga induzido"

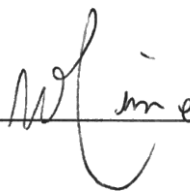
Presidente: PROF. DR. RODRIGO LABAT MARCOS



Membro: PROF. DR. ADRIANA LINO SANTOS FRANCO



Membro: PROF. DR. MARIO DE OLIVEIRA LIMA



*Dedico este trabalho ao amor da vida,  
minha filha Giovana, que me deu sentido  
a minha existência e que me proporciona  
todos os dias momentos de alegria*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Ser Supremo, pela vida e por colocar em minha vida pessoas amigas e preciosas.

Ao meu querido orientador Professor Doutor Rodrigo Marcos Labat, meu eterno agradecimento por todos os momentos de paciência, motivação, compreensão e competência. Pela honra e oportunidade de ser sua estudante/orientanda. Saiba que sempre será lembrado.

Aos membros da banca examinadora, pelo interesse e disponibilidade.

Aos participantes desse estudo pela disposição em ajudar no que deles dependesse para a conclusão da pesquisa.

Aos amigos de Mestrado que compartilharam comigo esses momentos de aprendizado, especialmente ao Marcelo, Thalita, Andréia, Cristina, Ellen, Felipe, Marlon, Rodrigo, Veridiana, Marília, Lidiane e Elza.

As minhas amigas de trabalho pela parceria e incentivo. Em especial Sarah Izbicki.

A minha filha Giovana, pelo amor condicional que me faz cada dia mais feliz.

Aos meus pais Yoshimasa, “in memoriam” e Thereza, por sempre acreditar em mim.

Aos meus irmãos que de alguma forma, se mantiveram incansáveis em suas manifestações de apoio e carinho.

Ao Programa de Mestrado e Doutorado em Biofotônica aplicada às Ciências da Saúde da Universidade Nove de Julho, representado pela Professora Doutora Kristiane Porta Santos Fernandes, e a todos os professores que fizeram parte desse caminhar.

“Existem momentos na vida da gente, em que as palavras perdem o sentido ou parecem inúteis e, por mais que a gente pense numa forma de empregá-las, elas parecem não servir. Então a gente não diz, apenas sente.”

**SIGMUND FREUD**

## LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

AI – Irradiação na glândula Adrenal

ANOVA - análise de variância

AsGaAl - Arseneto de Gálio e Alumínio

CI – Irradiação na região craniana

cm<sup>2</sup> - Centímetro quadrado

COAB - Coabitação

DE - Densidade de energia

D<sub>max</sub> - Descolamento máximo no momento da ruptura

DP - Densidade de potência

F<sub>max</sub> - Força de ruptura máxima

G- gramas

I.M. – intramuscular

IL10- Interleucina-10

IL1-β- Interleucina-1 beta

IL6 – Interleucina -6

J – Joule

J/cm<sup>2</sup> - Joules por centímetro quadrado

Kg – Kilograma

LASER – Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation

LED – Diodo Emissor de Luz

LBI– Laser de Baixa intensidade

Mm – Milímetros

MMP – Metaloproteinase da Matriz

mW – MiliWatt



nm– Nanômetro

NT –sem tratamento

NK1 – Receptor de Neuricinina

°C – graus célsius

TNF- $\alpha$  – Fator de Necrose Tumoral

$\alpha$ -Ângulo de relação entre Fmax e Deslocamento (Rigidez secante)

$\lambda$  - Comprimento de onda

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Tendinite em Tendão calcâneo (Aquiles) de humano (vista lateral)..	15
<b>Figura 2:</b> Grupos experimentais. ....	23
<b>Figura 3:</b> Protocolo Experimental. ....	24
<b>Figura 4:</b> Gráfico da expressão gênica de COX-2 em animais com tendinite coabitados com animais saudáveis ou com animais com tumor induzido.....	28
<b>Figura 5:</b> Gráfico da expressão gênica de IL-1 $\beta$ em animais com tendinite coabitados com animais saudáveis ou com animais com tumor induzido.....	29
<b>Figura 6:</b> Gráfico da expressão gênica de IL-6 em animais com tendinite coabitados com animais saudáveis ou com animais com tumor induzido.....	30
<b>Figura 7:</b> Gráfico da expressão gênica de IL-10 em animais com tendinite coabitados com animais saudáveis ou com animais com tumor induzido.....	31
<b>Figura 8:</b> Gráfico da expressão gênica de NK-1 em animais com tendinite coabitados com animais saudáveis ou com animais com tumor induzido.....	32
<b>Figura 9:</b> Fotomicroscopia do tendão calcâneo de camundongos com tendinite e sem tratamento que foram coabitados com animais saudáveis (NT COAB+saudável). Corte longitudinal com aumento de 20X (9A) e 40X (9B)	33
<b>Figura 10:</b> Fotomicroscopia do tendão calcâneo de camundongos com tendinite e irradiados com LEDterapia craniana que foram coabitados com animais saudáveis (CI COAB+saudável). Corte longitudinal com aumento de 20X (10A) e 40X (10B). ....	34
<b>Figura 11:</b> Fotomicroscopia do tendão calcâneo de camundongos com tendinite e sem tratamento que foram coabitados com animais com tumor (NT COAB+tumor). Corte longitudinal com aumento de 20X (11A) e 40X (11B).	35
<b>Figura 12:</b> Fotomicroscopia do tendão calcâneo de camundongos com tendinite	

e irradiados com LEDterapia craniana, que foram coabitados com animais com tumor (CI COAB+tumor). Corte longitudinal com aumento de 20X (9A) e 40X (9B). .....36

**Figura 13:** Fotomicroscopia do tendão calcâneo de camundongos com tendinite. Em (A) grupo tendinite coabitado com animais saudáveis e sem tratamento; Em (B) grupo tendinite coabitado com animais saudáveis e com LEDterapia. ....37

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Parâmetros de irradiação. Aparelho BIOλ®. Irradiação por contato e perpendicular a área da superfície irradiada. Irradiação craniana .....25

**Tabela 2:** Sequência de Primers.....26

## RESUMO

A Coabitação está relacionada ao ato de conviver com pessoas portadoras de determinadas doenças podendo haver alterações psicológicas, comportamentais e imunológicas. As tendinopatias são alterações no tendão, geralmente difíceis de serem tratadas, onde a terapia por fotobiomodulação vem apresentando bons efeitos. São raros os trabalhos relacionando alterações no modelo de coabitação e seu reflexo no reparo tendíneo na fase aguda da inflamação. No mesmo sentido, estudo do efeito da fotobiomodulação craniana na modulação do processo inflamatório periférico como nas tendinopatias são inexistentes. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da fotobiomodulação sobre o processo inflamatório do tendão em camundongos coabitados com animais com tumor de bexiga induzido. Material e Métodos: Quarenta camundongos C57BL/6 fêmeas foram distribuídas em 4 grupos: (Grupo 1): Animais com tendinite induzida, sem tratamento e coabitado com camundongos saudáveis; (Grupo 2): Animais com tendinite induzida, tratado com LEDterapia craniana e coabitado com camundongos saudáveis; (Grupo 3): Animais com tendinite induzida, sem tratamento e coabitado com camundongos com tumor de bexiga; (Grupo 4): Animais com tendinite induzida, tratado com LEDterapia craniana e coabitado com camundongos com tumor. A tendinite foi realizada após 2 semanas de coabitação. Os 20 animais saudáveis foram induzidos a tendinite com injeção de colagenase (100ml/kg) na região do tendão calcâneo. Os parâmetros de irradiação foram: (LED 810nm; 3J; 160mW; 30s). Após 12h da indução da tendinite, os animais dos 4 grupos foram eutanasiados com hiperdose de Xilasina e quetamina. Os tendões foram removidos e armazenados para análises moleculares e histológicos. Resultados: Os animais do grupo 3 reduziram a expressão de COX-2; IL1 $\beta$ ; IL6 e aumentaram NK-1. Resultados similares foram observados com os animais do grupo 2. O infiltrado inflamatório também foi reduzido nos grupos 2, 3 e 4. Conclusão: Animais com tendinite em coabitação com animais com tumor de bexiga apresentam menor cenário inflamatório que os animais que coabitaram com camundongos saudáveis. A terapia por fotobiomodulação craniana utilizando LED foi eficaz na redução da inflamação tendinea em animais coabitados com camundongos saudáveis. No entanto são necessários outras análises para a determinação do mecanismo de ação envolvido.

Palavras-chave: Coabitação; Tendinite; Fotobiomodulação; Laser de Baixa Intensidade, Mediadores inflamatórios.

## ABSTRACT

Cohabitation is related to the act of living with people with certain diseases and there may be psychological, behavioral and immunological changes. Tendinopathies are changes in the tendon, usually difficult to treat, where photobiomodulation therapy has been shown to have good effects. The works relating changes in the cohabitation model and its reflex in tendon repair in the acute phase of inflammation are rare. In the same sense, a study of the effect of cranial photobiomodulation on the modulation of the peripheral inflammatory process as in tendinopathies is non-existent. The objective of this work was to evaluate the effect of photobiomodulation on the inflammatory process of the tendon in mice cohabited with animals with induced bladder tumor. *Material and Methods:* Forty female C57BL / 6 mice were divided into 4 groups: (Group 1): Animals with induced tendonitis, untreated and cohabited with healthy mice; (Group 2): Animals with induced tendinitis, treated with LED cranial therapy and cohabited with healthy mice; (Group 3): Animals with induced tendonitis, untreated and cohabited with mice with bladder tumor; (Group 4): Animals with induced tendinitis, treated with LED cranial therapy and cohabited with mice with tumor. Tendonitis was performed after 2 weeks of cohabitation. The 20 healthy animals were induced to tendinitis with collagenase injection (100ml / kg) in the region of the calcaneus tendon. The irradiation parameters were: (LED 810nm; 3J; 160mW; 30s). After 12 h of tendinitis induction, the animals of the 4 groups were euthanized with hyperdose of Xilasina and ketamine. The tendons were removed and stored for molecular and histological analysis. *Results:* Group 3 animals reduced COX-2 expression; IL1 $\beta$ ; IL6 and increased NK-1. Similar results were observed with the animals of group 2. The inflammatory infiltrate was also reduced in groups 2, 3 and 4. *Conclusion:* Animals with tendinitis in cohabitation with animals with bladder tumor present a lower inflammatory scenario than animals that cohabited with healthy mice. Cranial photobiomodulation therapy using LED was effective in reducing tendinitis inflammation in cohabitated animals with healthy mice. However, further analysis is required to determine the mechanism of action involved.

*Keywords:* Cohabitation; Tendonitis; Photobiomodulation; Low Intensity Laser, Inflammatory Mediators.

## Sumário

1	Introdução .....	12
1.1	<b>Sistema Nervoso Central e Inflamação</b> .....	12
1.2	<b>Efeito da Coabitação no organismo</b> .....	13
1.3	<b>Tendinite</b> .....	14
1.4	<b>Alterações Estruturais e Moleculares na Tendinite</b> .....	16
1.5	<b>Tratamento Farmacológico na Tendinite</b> .....	18
1.6	<b>Terapia Laser de baixa intensidade (LBI)</b> .....	19
2	<b>Objetivo</b> .....	22
2.1	<b>Objetivo geral</b> .....	22
2.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	22
3	<b>Material e métodos</b> .....	23
3.1	<b>Animais</b> .....	23
3.2	<b>Protocolo Experimental</b> .....	23
3.3	<b>Indução do tumor de bexiga</b> .....	24
3.4	<b>Indução da Inflamação em Tendão Calcâneo de Camundongos</b> .....	25
3.5	<b>Terapia por Fotobiomodulação</b> .....	25
3.6	<b>Reação em Cadeia da Polimerase após Transcrição Reversa em tempo real (real time RT-PCR)</b> .....	26
3.7	<b>Análise Histológica do Tendão Calcâneo</b> .....	26
3.8	<b>Análise Estatística</b> .....	27
4	<b>Resultados</b> .....	28
4.1	<b>Expressão Gênica de COX-2</b> .....	28
4.2	<b>Expressão Gênica de IL-1<math>\beta</math></b> .....	29
4.3	<b>Expressão Gênica de IL-6</b> .....	30
4.4	<b>Expressão Gênica de IL-10</b> .....	31
4.5	<b>Expressão Gênica de NK-1</b> .....	32
4.6	<b>Aspectos Histológicos do tendão</b> .....	33
6	<b>Conclusão</b> .....	41
	<b>Referências</b> .....	42
	<b>Anexos</b> .....	47

# 1 Introdução

## 1.1 Sistema Nervoso Central e Inflamação

O Sistema Nervoso Autônomo (SNA) é constituído por dois componentes clássicos: o Sistema Nervoso Simpático (SNAS) e Sistema Nervoso Parassimpático (SNAPS). O SNA assume uma função de manutenção da homeostasia, influenciando desde a função cardiovascular, respiratória e gastrointestinal até ao controle dos níveis glicêmicos e a temperatura corporal<sup>1</sup>.

Nas últimas décadas têm-se verificado que a influência do SNA também se estende ao sistema imunológico. Embora classicamente o Sistema imunológico seja considerado como um sistema autônomo, fora do alcance do sistema nervoso, tal conceito foi desafiado à medida que se verificou que o Sistema Nervoso Central (SNC) possuía capacidade de modular a resposta inflamatória/imune, primeiro através do eixo Hipotálamo-Hipófise-Supra Renal (HHSR) e seguidamente através do SNA<sup>1</sup>.

A Inflamação é uma resposta de defesa que ocorre após dano celular que pode ser causada por vários fatores. A reação inflamatória aguda caracteriza-se por uma série de eventos inter-relacionados, entre os quais aumento no fluxo sanguíneo e permeabilidade vascular na região afetada, exsudação de fluido (edema), dor localizada, migração e acúmulo de leucócitos inflamatórios dos vasos sanguíneos para dentro do tecido, formação de tecido de granulação e reparo tecidual<sup>2</sup>.

As respostas de defesa, incluindo inflamação, são geralmente benéficas ao organismo, agindo para limitar a sobrevivência e proliferação dos patógenos invasores, promover a sobrevivência do tecido, reparo e recuperação, e conservar a energia do organismo. Entretanto, uma inflamação extensiva, prolongada ou não regulada é altamente prejudicial ao organismo. Processos pró-inflamatórios são regulados por uma série equivalente de processos anti-inflamatórios teciduais<sup>2</sup>.

Na literatura existem fortes evidências que a inflamação no SNC está envolvida na patogênese de doenças neurodegenerativas agudas e crônicas,



incluindo doenças de Parkinson, Alzheimer, esclerose lateral amiotrófica, trauma do cérebro e medula espinhal e acidente vascular encefálico.

A neurodegeneração mediada por inflamação envolve acionamento dos macrófagos residentes no encéfalo (microglia), que liberam fatores neurotóxicos e pró-inflamatórios, incluindo citocinas, radicais livres, óxido nítrico e eicosanóides que podem lesar neurônios e células da glia <sup>3</sup>. Além dos macrófagos residentes, neutrófilos e também os macrófagos derivados de monócitos da corrente sanguínea podem induzir neurodegeneração <sup>4</sup>.

No final do século passado surgiu a "hipótese inflamatória" para explicar diferenças nas alterações do sistema imune observadas nos idosos. Essa hipótese toma por base a origem de várias doenças relacionadas com o envelhecimento após exposição prévia a agentes infecciosos e outras fontes geradoras de respostas inflamatórias, incluindo as ambientais, em fases mais precoces da vida, e, também, a forma como o organismo de cada indivíduo reage a elas. Esse processo denominado como *inflammaging*, provoca um acúmulo de lesões crônicas e tem sido considerado como determinante de doenças neurodegenerativas, aterosclerose, diabetes tipo II e sarcopenia. Infecções subclínicas, acúmulo de tecido adiposo e tabagismo contribuem para a manutenção do processo inflamatório crônico <sup>5</sup>.

## 1.2 Efeito da Coabitação no organismo

O modelo de coabitação é uma técnica utilizada que consegue simular alterações imunológicas e comportamentais relacionadas ao estresse causado pelo convívio entre indivíduos saudáveis e doentes. A Coabitação relacionada ao ato de conviver com pessoas portadoras de um tumor ou de patologias crônicas debilitantes tem demonstrando evidências de alterações psicológicas podendo progredir para alterações comportamentais e imunológicas. Testes experimentais utilizando o modelo experimental de tumor de *Ehrlich* induzido foram utilizados para entender a relação entre a coabitação e alterações imunológicas <sup>6,7</sup>.

Hamamoto e colaboradores (2014) realizaram um estudo experimental e demonstraram que animais em coabitação (animais saudáveis convivendo com animais com tumor induzido (Ehrlich-TAE)) após 14 dias produziram alterações

comportamentais, neuroquímicas, endocrinológicas e imunológicas. No mesmo trabalho foi observado um aumento da resposta inflamatória pulmonar alérgica nos camundongos coabitados, sendo justificada como consequência do estresse psicológico induzido pela coabitação forçada com o parceiro doente.

A integração de modelos biológicos e psicológicos torna-se cada vez mais importante para o estudo da neuroimunologia, uma vez que cada animal se comunica com outros de sua ou de outra espécie através de mecanismos que são característicos dentro de seus respectivos grupos <sup>5</sup>.

Ressalte-se que, a coabitação leva ao estabelecimento de relações como o comensalismo e o mutualismo, na qual uma ou mais partes se beneficia. Essas relações se baseiam na capacidade de um organismo de adquirir energia e retê-la consigo, e o sistema imune existe para defender o indivíduo de invasores externos, como qualificar sua atuação contra processos “internos”, como exemplo a presença de neoplasias <sup>5</sup>.

### **1.3 Tendinite**

As tendinites são alterações na saúde do tendão, difíceis de serem tratadas, acometem desde atletas profissionais e recreacionais até pessoas comuns impossibilitando-as não somente às atividades laborais como também em limitações do dia a dia <sup>8</sup>.

Devido essa ocorrência, do custo do tratamento, da redução da funcionalidade laboral e do desencadeamento de co-morbidades, as tendinites necessitam de recursos financeiros consideráveis, direcionados ao acompanhamento da saúde dos indivíduos vítimas destas patologias, principalmente nos casos em que a incapacidade no trabalho persiste além do tempo médio para o retorno às atividades laborais, tornando-se um grande problema de saúde pública, socioeconômico onde as intervenções médicas e terapias para a reabilitação são ainda limitadas e de difícil acesso pela maior parte das pessoas <sup>9</sup>.

A tendinite é considerada uma doença inflamatória aguda com possibilidade de cronificação, provavelmente devido às características do tecido e da dificuldade no tratamento <sup>8</sup>.

Em geral, a resposta inflamatória visa combater o agente agressor e eliminar produtos resultantes da destruição celular, promovendo condições ideais para o reparo do tecido lesado <sup>10</sup>.

No caso da tendinite, a causa mais comum é o esforço exagerado de extensão sobre os tendões, responsável por 30% das lesões<sup>11</sup>, podendo ocorrer também à distensão das fibras de colágeno, que por não suportarem a tração mecânica, acabam apresentando rupturas parciais com desenvolvimento de intensa dor local, reação inflamatória e limitação funcional (Figura 1), que se não forem tratadas leva ao estado crônico da doença <sup>12</sup>, além da sobrecarga mecânica e esforços repetitivos, o próprio envelhecimento natural também contribuem para a degeneração do tendão <sup>13</sup>.



**Figura 1. Tendinite em Tendão calcâneo (Aquiles) de humano (vista lateral). Fonte: Wikipédia.org**

Estudos sugerem que o estado emocional de um indivíduo pode causar alterações da resposta imunológica. Por exemplo, pacientes imunodeprimidos podem apresentar alterações articulares em cartilagens e tendões. O tratamento com fármacos que reestabeleçam a resposta imunológica pode auxiliar no quadro inflamatório destas doenças articulares. No entanto, o mecanismo de ação ainda não está claro, mas sabe-se que existe relação com a atividade de alguns linfócitos como o CD4 e CD8 <sup>10</sup>.

#### 1.4 Alterações Estruturais e Moleculares na Tendinite

Em geral, a resposta inflamatória visa combater o agente agressor e eliminar produtos resultantes da destruição celular, promovendo condições ideais para o reparo do tecido lesionado <sup>14</sup>.

Os tendões apresentam maiores risco de ruptura, quando uma força é aplicada de forma rápida e indireta, como exemplo, as contrações musculares, durante o exercício excêntrico.<sup>15</sup>

Estas rupturas resultam em hemorragia de arteríolas e capilares locais e formação de hematoma no seu interior, podendo estender-se para o paratendão. O resultado imediato é a deposição de fibrina, que atrai neutrófilos para a região, a congestão e acúmulo de fluidos no local da agressão levando a uma isquemia tecidual e morte celular progredindo para uma necrose tecidual, de acordo com o grau de comprometimento vascular.<sup>16</sup>

O processo inflamatório nestes tecidos tem gerado controvérsias devido a sua atipicidade relacionada à baixa vascularização dos tendões. Na porção central do tendão, grandes vasos formam plexos vasculares menores atingindo as bainhas sinoviais e fornecendo suprimento sanguíneo para o epitendão, mesotendão e endotendão.<sup>17</sup> No entanto, existem algumas regiões do tendão onde este suprimento é comprometido. Assim, determinados fatores, tais como, o envelhecimento associado à presença de cargas mecânicas pode comprometer ainda mais este suprimento, reduzindo em até 20% o fluxo sanguíneo no tendão.<sup>16</sup>

Durante o processo inflamatório do tendão, ocorre o remodelamento da bainha tendínea e do tecido sinovial, enchendo este espaço com células inflamatórias e é possível observar um aumento na expressão de determinadas enzimas como a ciclooxigenase-2 e determinadas metaloproteinases de matriz (MMPs), interferindo nos níveis de determinados mediadores inflamatórios, entre eles a prostaglandina E2 e o TNF- $\alpha$ .<sup>18</sup> Os processos celulares e moleculares ainda não são bem conhecidos, mas estudos indicam que as MMPs podem mediar, pelo menos em parte as mudanças na composição da matriz extracelular durante a lesão e o reparo do tendão.<sup>19</sup>

O fator de necrose tumoral (TNF $\alpha$ ) é uma citocina produzida por diversas células, mas principalmente pelos macrófagos, sendo considerado o principal mediador inflamatório, por ser a primeira citocina a ser liberada pelas células após o contato com o agente agressor e suas substâncias. Estudos demonstram que TNF $\alpha$  induz a síntese de outros mediadores, como IL-1 e IL-6.<sup>19</sup>

O recrutamento de células fagocitárias para o sítio de injúria promove a liberação local de substâncias pro-inflamatórias, as citocinas que possuem propriedades tróficas, miogênica e quimiotáticas. Destas citocinas as mais importantes são as interleucinas ( IL-1,IL-2, IL-6 e IL-8) e o fator de necrose tumoral ( TNF) por produzirem as respostas pro-inflamatórias, mobilização, ativação de leucócitos polimorfonucleares e indução da enzima ciclo-oxigenase.

20

As prostaglandinas são sintetizadas a partir do ácido araquidônico, por estímulos nas membranas celulares, que podem ser de natureza fisiológica, farmacológica ou patológica aumentando a sensibilidade das terminações nervosas das fibras C, interferindo na sensibilidade a dor.<sup>21</sup>

Além das prostaglandinas, outros mediadores inflamatórios também estão presentes no processo inflamatório e na manutenção da dor. A IL-1 é primeiramente produzida por macrófagos e monócitos, assim como por células não imunológicas, tais como fibroblastos e células endoteliais ativadas durante a lesão celular, invasão e inflamação. A IL1  $\beta$  é expressa em neurônio nociceptivo do gânglio da raiz dorsal e produz inflamação sistêmica através da ativação da COX 2 formando a PGE2 no hipotálamo anterior, causando febre além de produzir substância P, óxido nítrico e moléculas de adesão endotelial tendo uma importância no desenvolvimento e manutenção da dor pós-operatória.<sup>22</sup>

A IL-6 é uma glicoproteína secretada por muitos tipos de células, como macrófagos, monócitos, eosinófilos, hepatócitos e da glia induzida potentemente por TNF- $\alpha$  e IL-1 como demonstrado na figura 1. É uma citocina pró-inflamatória e uma das mais precoces e importantes mediadoras de indução e controle da síntese e liberação de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos durante um estímulo doloroso, como trauma, infecção, cirurgia e queimadura. Promove maturação e ativação de neutrófilos, maturação de macrófagos e diferenciação/manutenção de linfócitos T.<sup>23</sup> Após a lesão, a concentração de IL-6 no plasma

são detectáveis em 60 minutos, com pico entre 4 a 6 horas, podendo persistir por 10 dias.<sup>24</sup>

A IL-10 é um polipeptídeo não glicosilado<sup>7</sup> sintetizado em células imunológicas e tecidos neuroendócrinos e neurais. Essa citocina inibe citocinas pró-inflamatórias, principalmente TNF $\alpha$ , IL-1 e IL-6 estimulando a produção endógena de citocinas anti-inflamatórias aumentando a proliferação de mastócitos impedindo a produção de IFN $\gamma$  controlando o processo inflamatório.<sup>24</sup>

Ainda em relação ao processo doloroso, outras neurocininas como a substância P também participam da modulação da sensibilidade. A Substância P é a principal neurocinina liberada no processo inflamatório produzida por macrófagos, eosinófilos e linfócitos. A IL-6 e TNF $\alpha$  favorece sua síntese em neurônios sensitivos, é um neuropeptídeo que quando liberado atua como neurotransmissor e neuromodulador, fator trófico por meio da ligação de seus receptores, as neurocinina-1 (NK1) ocasionando a modulação e transmissão da dor.<sup>25</sup>

Os receptores NK1 são distribuídos por todo o corpo, principalmente nas células endoteliais e quando ativados pela SP, podem atuar como mediador pró-inflamatório, aumentando a permeabilidade vascular e a migração leucocitária durante o processo inflamatório. São acoplados a proteínas G e sinalizam os efeitos da SP, sendo expressos em várias células como linfócitos T e B, monócitos, macrófagos e neutrófilos durante o processo inflamatório ou imonológico.<sup>26</sup>

### **1.5 Tratamento Farmacológico na Tendinite**

Em virtude de sua ocorrência, do custo do tratamento, da redução da funcionalidade laboral e do desencadeamento de co-morbidades, as tendinopatias necessitam de recursos financeiros consideráveis, direcionados ao acompanhamento da saúde dos indivíduos vítimas destas patologias, principalmente nos casos em que a incapacidade no trabalho persiste além do tempo médio para o retorno às atividades laborativas, tornando-se um grande problema socioeconômico onde as intervenções médicas e terapias para a reabilitação são ainda limitadas.<sup>27</sup>

Os tratamentos para doenças musculoesqueléticas têm por finalidade a redução da inflamação, que se persistir pode provocar alterações nos feixes das fibras de colágeno e aumentar a atividade de determinadas enzimas, prolongando assim as fases inflamatória e proliferativa, favorecendo a deposição excessiva de tecido cicatricial, alterando algumas características como a redução da resistência em comparação ao tendão original.<sup>16</sup>

Os anti-inflamatórios não esteroidais são as drogas utilizadas com mais frequência, como parte do tratamento inicial, principalmente na redução da dor.<sup>10</sup> Dentre os diversos tipos de drogas nesta classe, os inibidores específicos da enzima ciclo-oxigenase-2 (COX-2) tem apresentado efeito favorável no tratamento destes transtornos. No entanto, o impacto econômico das terapias para desordens musculoesqueléticas com o uso de drogas anti-inflamatórias é consideravelmente alto, devido aos custos da medicação, hospitalização e toxicidade destes agentes, principalmente com relação a efeitos adversos gastrintestinais com resultados pouco efetivos, levando a lesões recorrentes.<sup>28</sup>

Atualmente, mais pesquisas relacionadas ao reparo do tendão, incluindo o estudo da redução da inflamação e reorganização das fibras de colágeno conduzindo para uma melhora na sua função biomecânica, são necessárias para permitir o desenvolvimento de estratégias e tratamentos específicos para esta doença. Sendo assim, a investigação de novas terapias para utilização em doenças inflamatórias do tendão, especialmente não farmacológica, como o uso da Fotobiomodulação, assume papel de destaque na área médica<sup>29</sup>.

## **1.6 Terapia Laser de baixa intensidade (LBI)**

A luz tem sido utilizada como agente terapêutico por séculos. 1917 Albert Einstein elucidou a emissão estimulada de radiação, quando expos os princípios físicos da emissão estimulada. Desde o final da década de 60 houve um grande avanço nos equipamentos de laser e em suas aplicabilidades na área da saúde.<sup>30</sup>

A Fotobiomodulação incide sobre as reações não térmicas da luz com o tecido, gerando efeitos fotoquímicos, bioestimulantes, anti-inflamatório, anti-edematoso, algico dentre outros benefícios<sup>31</sup>.

Os principais mecanismos do laser na ação anti-inflamatória é a modulação desencadeada pela radiação do laser, que promove o aumento da microcirculação, promoção da angiogênese, vasodilatação, inibição dos mediadores inflamatórios, como a PGE<sub>2</sub>, ativação de células de defesa, efeitos antioxidantes e aceleração da cicatrização celular, todos esses efeitos podem ocorrer simultaneamente resultando no efeito modulador na resposta inflamatória, que envolve ações pró-inflamatórias e anti-inflamatórias.<sup>32</sup>

A ação analgésica pode ser explicada a partir da modulação inflamatória e alterando a excitação, condução nervosa dos neurônios periféricos e pela liberação de endorfinas endógenas estimuladas pelo laser.<sup>32</sup>

Uma meta-análise sobre a utilização do laser de baixa intensidade no tratamento das tendinopatia e sua potencial eficácia na redução da inflamação. Contudo, o tratamento mais comum para os casos de tendinite ainda é o conservador, recomendado pela maioria dos autores como estratégia inicial. Na maioria das vezes consiste em uma abordagem multi-orientada, incluindo modelos de reabilitação combinada como repouso, medicação a base de anti-inflamatórios não esteroidais e corticoides, crioterapia, massagem, treinamento de força.<sup>33</sup>

O uso de laser na prática clínica objetivando o efeito anti-inflamatório em diferentes doenças baseia-se em um número já razoável de publicações de caráter científico. Nos últimos anos, inúmeros estudos clínicos aleatorizados, placebo-controle foram realizados, fazendo com que a terapia com o laser já seja considerada como alternativa terapêutica para várias doenças. Trabalhos recentes mostraram um potencial efeito reparador do laser, no aumento da expressão de colágeno tipo I e na reorganização destas fibras e a utilização do laser associado com ultrassom no tratamento deste tipo de lesão.<sup>34,35</sup>

No entanto, é muito importante ressaltar que pouco se conhece a respeito do mecanismo de ação do laser. Neste sentido, existem evidências que o laser pode reduzir a expressão gênica de alguns mediadores inflamatórios como PGE<sub>2</sub>, IL, TNF- $\alpha$  e aumentar a expressão de outros mediadores anti-inflamatórios como IL-10. O laser pode ainda reduzir a expressão de determinadas colagenases (MMPs) e conseqüentemente reduzir a degeneração do tecido, favorecendo o rearranjo das fibras de colágeno, levando a uma melhora nas condições biomecânicas do tendão durante o processo de reparo.<sup>36</sup>



Alguns trabalhos mostraram o aumento na produção de colágeno, redução de estresse oxidativo e da fibrose, redução do edema pós-operatório, redução da dor e melhora funcional e estes efeitos estariam relacionados também a redução de mediadores inflamatórios observados após o tratamento com o laser de baixa intensidade.<sup>37</sup>

Até o momento não foram encontrados estudos com o uso da terapia por fotobiomodulação com irradiação craniana na modulação de processos inflamatórios periféricos como a tendinite. Na mesma forma, não existem trabalhos que correlacionam modelos de coabitação com fotobiomodulação. Neste sentido, torna-se importante o estudo da ação da fotobiomodulação pela irradiação craniana sobre modelos de inflamação periférica, bem como a verificação dos efeitos da LEDterapia em modelos de coabitação.

## **2 Objetivo**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar a influência da terapia por fotobiomodulação na região craniana na modulação do reparo tendíneo em modelo de coabitação com animais com tumor de bexiga induzido

### **2.2 Objetivos específicos**

Verificar se o modelo de coabitação entre animais com tendinite e animais com tumor altera o processo de reparo tendíneo.

Avaliar se a terapia por fotobiomodulação com irradiação craniana auxilia o processo de reparo após indução da tendinite entre camundongos coabitados com animais com tumor

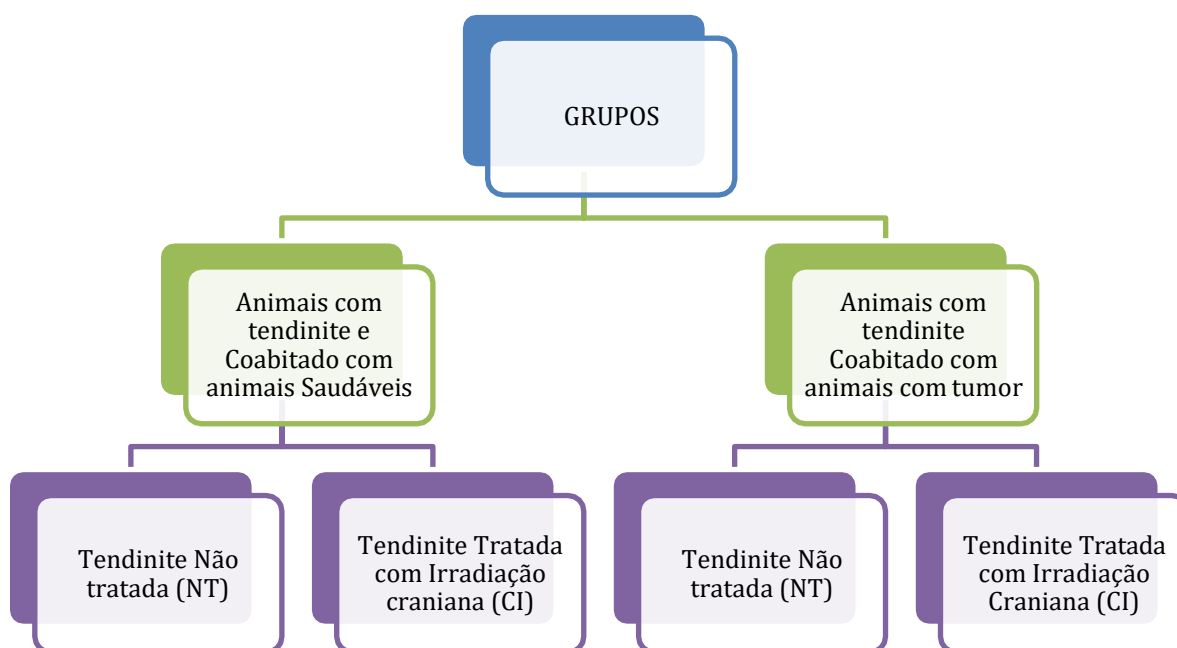
### 3 Material e métodos

#### 3.1 Animais

Foram utilizados 40 camundongos C57BL/6 fêmeas, pesando entre 20g à 30g, com livre acesso a água e ração, provenientes do Biotério da Universidade Nove de Julho. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada e ciclo claro/escuro de 12 horas. Este protocolo experimental, de indução da tendinite pela injeção de colagenase, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Nove de Julho, CEUA no 4537120618

#### 3.2 Protocolo Experimental

Os animais foram distribuídos de acordo com os grupos experimentais indicados na Figura 2.



**Figura 2: grupos experimentais**

**GRUPO 1:** Animais com tendinite e sem tratamento (NT), coabitados com animais saudáveis;

**GRUPO 2:** Animais com tendinite e com tratamento com irradiação craniana de LEDterapia (CI), coabitados com animais saudáveis;

**GRUPO 3:** Animais com tendinite e sem tratamento (NT), coabitados com animais com tumor de bexiga induzido;

**GRUPO 4:** Animais com tendinite e com tratamento com irradiação craniana de LEDterapia (CI), coabitados com animais com tumor de bexiga induzido;

Os animais foram distribuídos em grupos coabitados com animais saudáveis ou coabitados com animais com tumor.

O protocolo de indução do tumor, início da coabitação, indução da tendinite, tratamento e eutanásia foi obedecido de acordo com a figura 3.



**Figura 3: Protocolo Experimental**

### 3.3 Indução do tumor de bexiga

As células MB49 foram cultivadas com meio RPMI 1640, suplementado com SFB 10% e antibióticos. Após atingirem o crescimento em toda a garrafa de cultura, as células foram descoladas da garrafa, diluídas em PBS estéril e contadas em câmara de Neubauer.

Iniciou com a anestesia do animal através de injeção intraperitoneal com

cetamina e xilazina (100mg/kg e 10mg/kg). Após anestesiados, foram inoculadas 500.000 células em um volume de 0,1 mL no espaço subcutâneo na região posterior da coxa do animal, de acordo com modelo descrito na literatura (Gan et al., 1999). Os animais foram mantidos aquecidos até o retorno da anestesia.

### 3.4 Indução da Inflamação em Tendão Calcâneo de Camundongos

A indução da tendinite foi realizada em todos os animais exceto o grupo controle que apresentou tendão saudável, sem lesão. Os animais dos grupos lesionados foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cloridrato de quetamina (90mg/Kg) e cloridrato de Xilazina (10mg/Kg). Em seguida, receberam 100 µl de injeção transcutânea de colagenase (1 mg/ml; Sigma Chemical Co, Cat. C-6885) na região posterior de ambas as patas, no tendão calcâneo. Após a indução da tendinite, os animais retornaram para as caixas de contenção. Após 12 horas da indução da tendinite, os animais foram eutanasiados com hiperdose da mesma associação de anestésicos (cloridrato de quetamina 180mg/Kg e cloridrato de xilasina 30mg/Kg) e o tecido do tendão foi então dissecado e removido para análise histológica e molecular.

### 3.5 Terapia por Fotobiomodulação

A irradiação foi realizada 1 hora após a indução da tendinite, na porção central do crânio do camundongo, próximo aos ossos temporais, por contato e perpendicular a superfície de contato.

Foi utilizado o aparelho da BIOλ®, LED infravermelho, com os parâmetros de irradiação descritos na Tabela 1.

GRUPO	COMPRIMENTO DE ONDA (NM)	POTÊNCIA MÉDIA DE SAÍDA (MW)	ENERGIA (J)	TEMPO POR PONTO (S)	ÁREA DO FEIXE (CM <sup>2</sup> )
(CI)	810	160	3	30	4,15

**Tabela 1: Parâmetros de irradiação. Aparelho BIOλ®. Irradiação por contato e perpendicular a área da superfície irradiada. Irradiação craniana.**

### 3.6 Reação em Cadeia da Polimerase após Transcrição Reversa em tempo real (real time RT-PCR)

Os tendões removidos foram armazenados rapidamente em nitrogênio líquido (-80°C) até a análise ser realizada. O RT-PCR permite quantificar a expressão gênica do IL-6, TNF $\alpha$ . O RNA total das amostras foi extraído seguindo o protocolo Trizol<sup>®</sup> (Thermo/USA), conforme instruções do fabricante.

Após o tratamento com DNase, a síntese de cDNA foi efetuada pelo método de transcriptase reversa (SuperScript<sup>®</sup>-Thermo) utilizando 2 $\mu$ g de RNA total e na presença de primers randômicos e oligo dT. Para o protocolo de amplificação, desnaturação, anelamento e extensão foi utilizado o reagente de fluorescência SyberGreen<sup>®</sup>(Invitrogen) e os parâmetros de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados foram interpretados utilizando a fórmula de comparação  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Ct: número de ciclos necessários para atingir o limiar de fluorescência acima do valor de fundo), entre o gene de interesse e o gene controle B-actina.

OLIGOS	FOWARD	REVERSE
IL-1 $\beta$	TTGACGGACCCCAAAGATG	AGAAGGTGCTCATGTCCTCAT
IL-6	GAGCCACCAAGAACGATAG	TCAGTCCCAAGAAGGCAACT
IL-10	CAGCCGGGAAGACAATAACT	ATGTTGTCCAGCTGGTCCTT
NK-1	TCAATGACAGGTTCCGTCTG	GGTCTTCGAGTTGCTTCGAG
COX-2	TGAGCACAGGATTTGACCAG	CCTTGAAGTGGGTCAGGATG

**Tabela 2: Sequência de Primers.**

### 3.7 Análise Histológica do Tendão Calcâneo

Os tendões removidos foram armazenados e fixados em formalina tamponada a 10% (Merck) por 72 horas, descalcificadas em EDTA 4% (Merck), desidratadas através de uma série gradativa de banhos de álcool começando em 50% e terminando em álcool absoluto (100%) e embebida em blocos de parafina fundida e deixado para endurecimento completo. Estes blocos foram

cortados no sentido longitudinal em micrótomo (LEICA RM 2125 RT) em fatias com espessura de 5 $\mu$ m e foram montados em lâminas e coradas com Hematoxilina-Eosina (H.E.) Depois os cortes foram montados em lâminas permanentes e feito uma análise histopatológica qualitativa, utilizando um microscópio óptico (Olympus System) e fotografadas através de sistema de fotomicrografia. As lâminas histológicas foram fotografadas com aumento de 20X e 40X. Foram observadas as regiões do tendão propriamente dito e a região peritendínea. Foram analisadas as áreas de infiltrado inflamatório e a organização das fibras tendíneas.

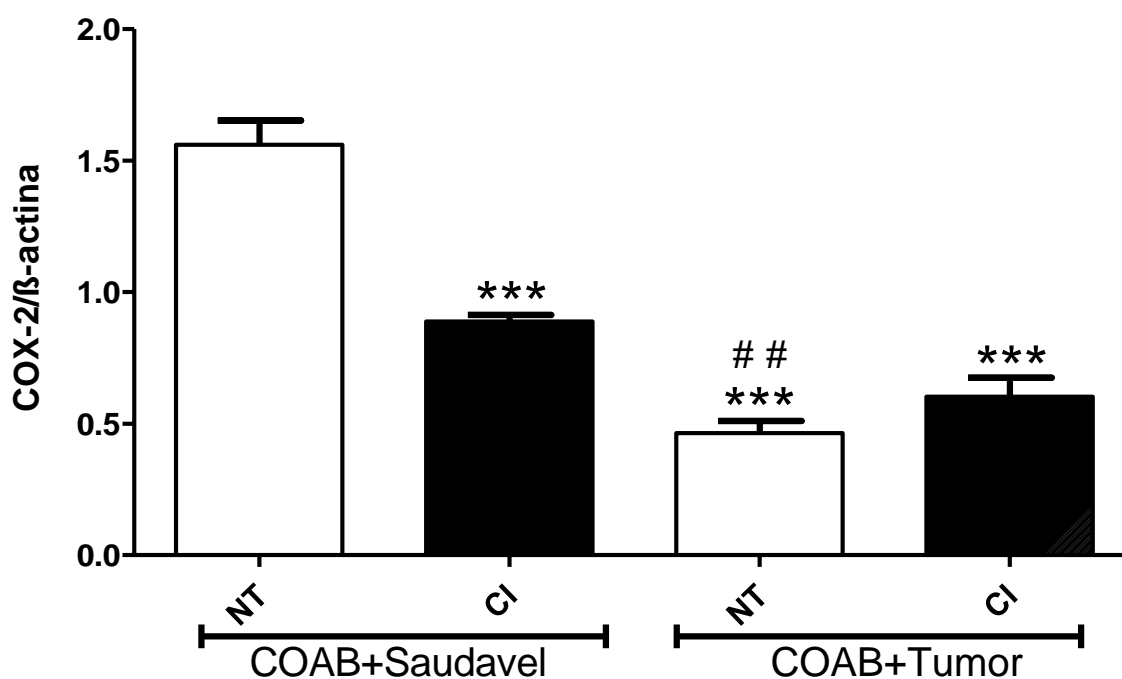
### **3.8 Análise Estatística**

Os dados foram expressos pela média e seu respectivo desvio padrão. Todos os valores foram submetidos a análise de variância (ANOVA) com post-test de Bonferoni. Foi utilizado o programa GraphPad Prisma 5 para confecção dos gráfico e análises estatísticas. Foi considerado o nível de significância estatístico de  $p < 0,05$ .

## 4 Resultados

### 4.1 Expressão Gênica de COX-2

No Gráfico da Figura 4 é apresentada a expressão gênica de COX-2 em tendões com tendinite induzida por collagenase e coabitados ou com animais saudáveis ou com animais com tumor induzido de bexiga. Foi observada expressiva redução na expressão de COX-2 no grupo NT (COAB+Tumor) quando comparado ao grupo NT (COAB+saudável). O grupo CI (COAB+saudável) reduziu a expressão de COX-2 comparado ao grupo NT (COAB+Saudável).

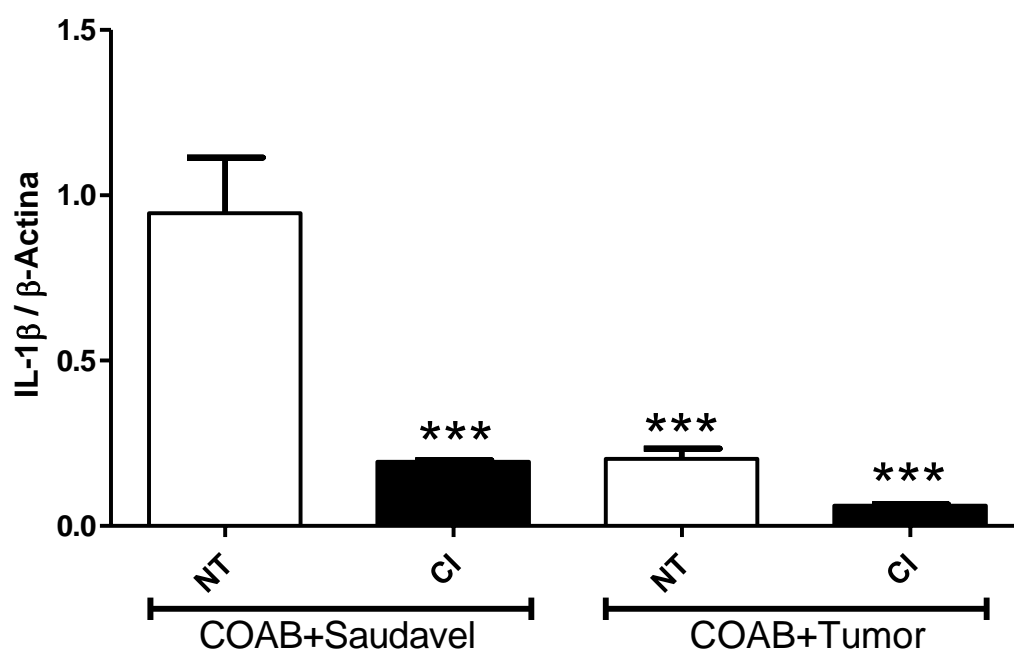


**Figura 4:** Gráfico da expressão gênica de COX-2 em animais com tendinite coabitados com animais saudáveis ou com animais com tumor induzido. Não tratados (NT) ou tratados com LED Infravermelho (830nm) na região craniana (CI). \*\*\*  $p < 0,001$  Vs COAB SAUDAVEIS NT; ##  $p < 0,01$  Vs COAB SAUDAVEIS CI.



## 4.2 Expressão Gênica de IL-1 $\beta$

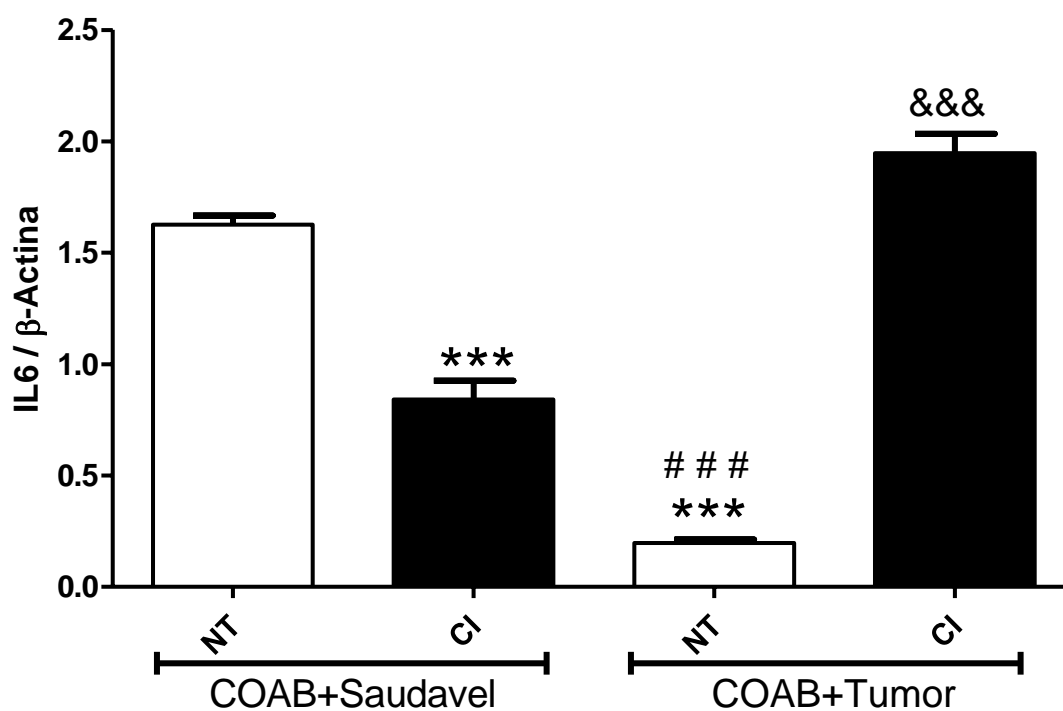
No Gráfico da Figura 5 é apresentada a expressão gênica de IL-1 $\beta$  em tendões com tendinite induzida por colagenase e coabitados ou com animais saudáveis ou com animais com tumor induzido de bexiga. Similarmente ao apresentado no gráfico 4, foi observada expressiva redução na expressão de IL-1 $\beta$  no grupo NT (COAB+Tumor) quando comparado ao grupo NT (COAB+saudável). O grupo CI (COAB+saudável) reduziu a expressão de IL-1 $\beta$  comparado ao grupo NT (COAB+Saudável).



**Figura 5:** Gráfico da expressão gênica de IL-1 $\beta$  em animais com tendinite coabitados com animais saudáveis ou com animais com tumor induzido. Não tratados (NT) ou tratados com LED Infravermelho (830nm) na região craniana (CI). \*\*\*  $p < 0,001$  Vs COAB SAUDAVEIS NT.

### 4.3 Expressão Gênica de IL-6

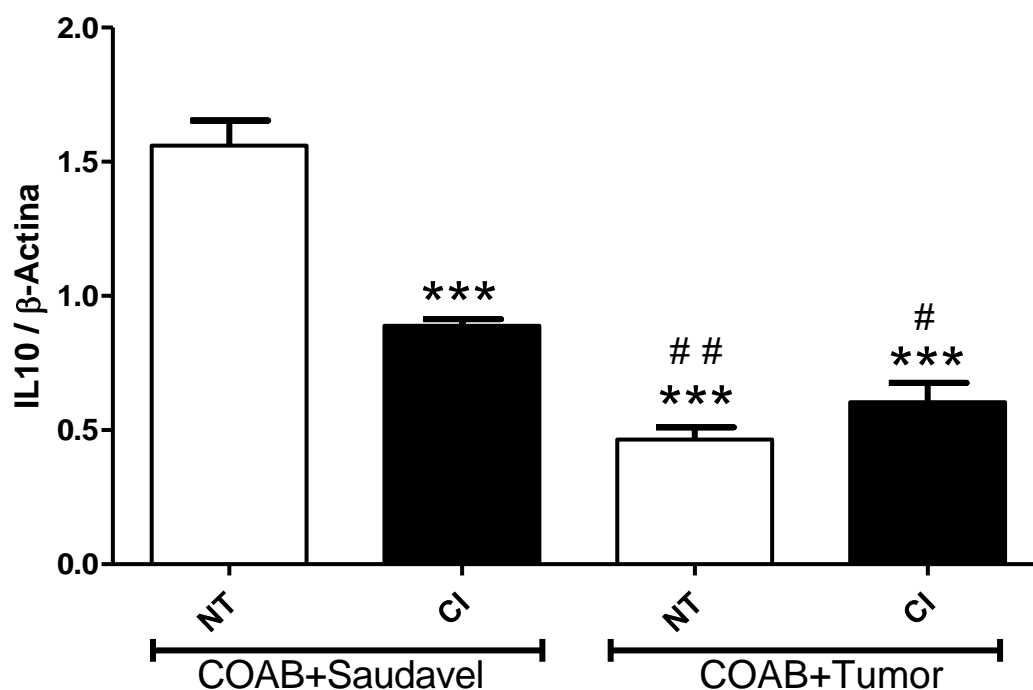
No Gráfico da Figura 6 é apresentada a expressão gênica de IL-6 em tendões com tendinite induzida por colagenase e coabitados ou com animais saudáveis ou com animais com tumor induzido de bexiga. Similarmente ao apresentado no gráfico 4 e 5, foi observada expressiva redução na expressão de IL-6 no grupo NT (COAB+Tumor) quando comparado ao grupo NT (COAB+saudável). O grupo CI (COAB+saudável) reduziu a expressão de IL-6 comparado ao grupo NT (COAB+Saudável). Neste gráfico, foi ainda observado o aumento da expressão de IL-6 no grupo CI (COAB+Tumor), quando comparado ao grupo NT (COAB+Tumor).



**Figura 6:** Gráfico da expressão gênica de IL-6 em animais com tendinite coabitados com animais saudáveis ou com animais com tumor induzido. Não tratados (NT) ou tratados com LED Infravermelho (830nm) na região craniana (CI). \*\*\*  $p < 0,001$  Vs COAB SAUDAVEIS NT; ###  $p < 0.001$  Vs COAB SAUDAVEIS CI; &&&  $p < 0.001$  Vs COAB TUMOR NT.

#### 4.4 Expressão Gênica de IL-10

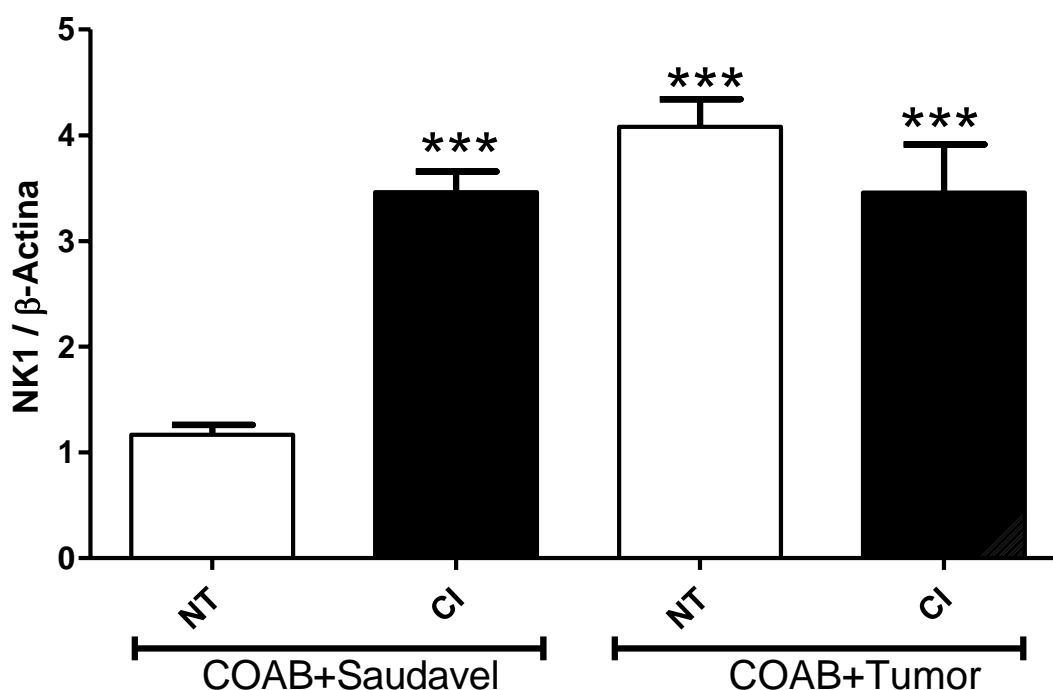
No Gráfico da Figura 7 é apresentada a expressão gênica de IL-10 em tendões com tendinite induzida por colagenase e coabitados ou com animais saudáveis ou com animais com tumor induzido de bexiga. Todos os grupos apresentaram redução na expressão de IL-10 quando comparado ao grupo NT (COAB+Saudável).



**Figura 7:** Gráfico da expressão gênica de IL-10 em animais com tendinite coabitados com animais saudáveis ou com animais com tumor induzido. Não tratados (NT) ou tratados com LED Infravermelho (830nm) na região craniana (CI). \*\*\*  $p < 0,001$  Vs COAB SAUDAVEIS NT; #  $p < 0,05$  e ##  $p < 0,01$  Vs COAB SAUDAVEIS CI.

#### 4.5 Expressão Gênica de NK-1

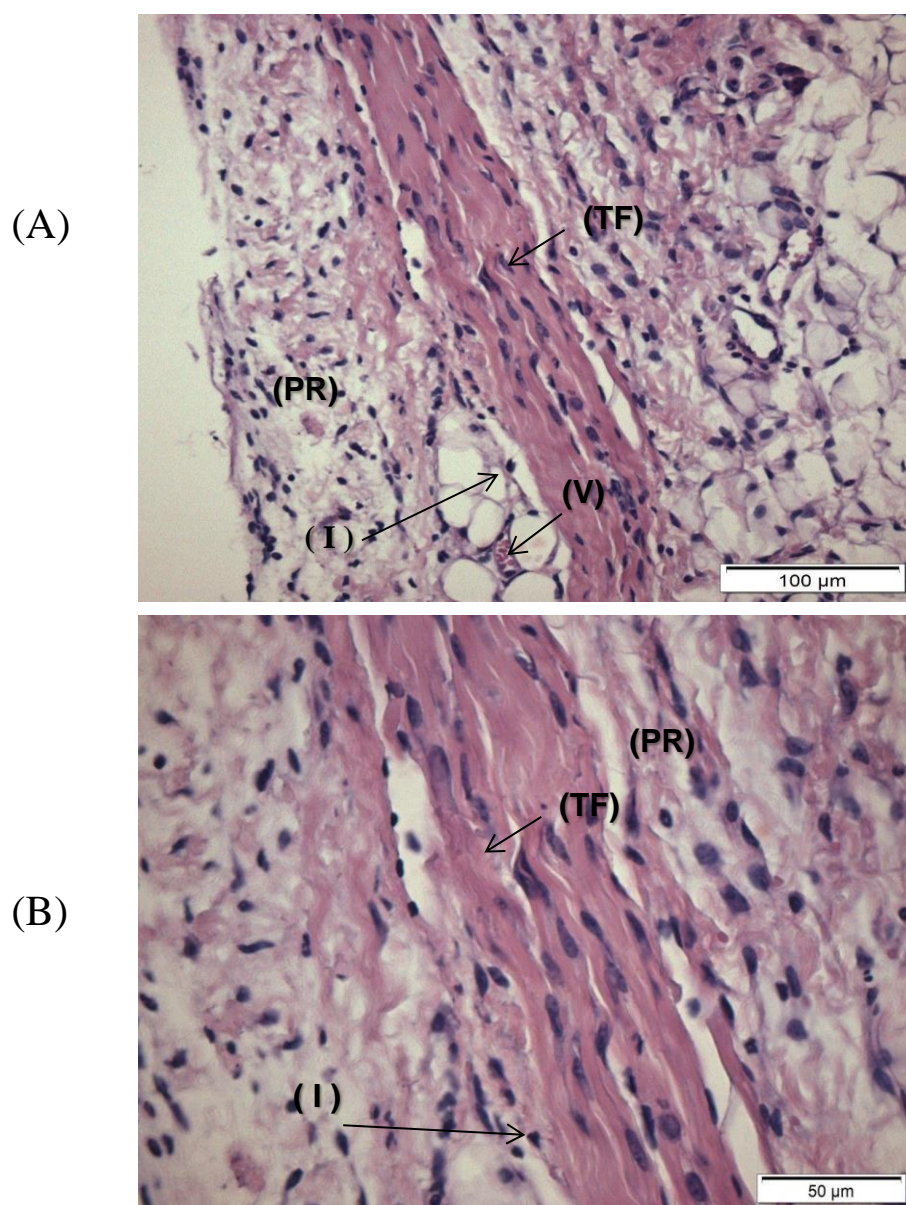
No Gráfico da Figura 8 é apresentada a expressão gênica de NK-1 em tendões com tendinite induzida por colagenase e coabitados ou com animais saudáveis ou com animais com tumor induzido de bexiga. Foi observado aumento na expressão de NK-1 no grupo NT (COAB+Tumor) quando comparado ao grupo NT (COAB+saudável). O grupo CI (COAB+saudável) também apresentou aumento na expressão de NK-1 comparado ao grupo NT (COAB+Saudável). Não houve alteração entre os grupos coabitados com animais com tumor induzido “CI (COAB+Tumor)” e “NT (COAB+Tumor)”.



**Figura 8:** Gráfico da expressão gênica de NK-1 em animais com tendinite coabitados com animais saudáveis ou com animais com tumor induzido. Não tratados (NT) ou tratados com LED Infravermelho (830nm) na região craniana (CI). \*\*\*  $p < 0,001$  Vs COAB SAUDAVEIS NT.

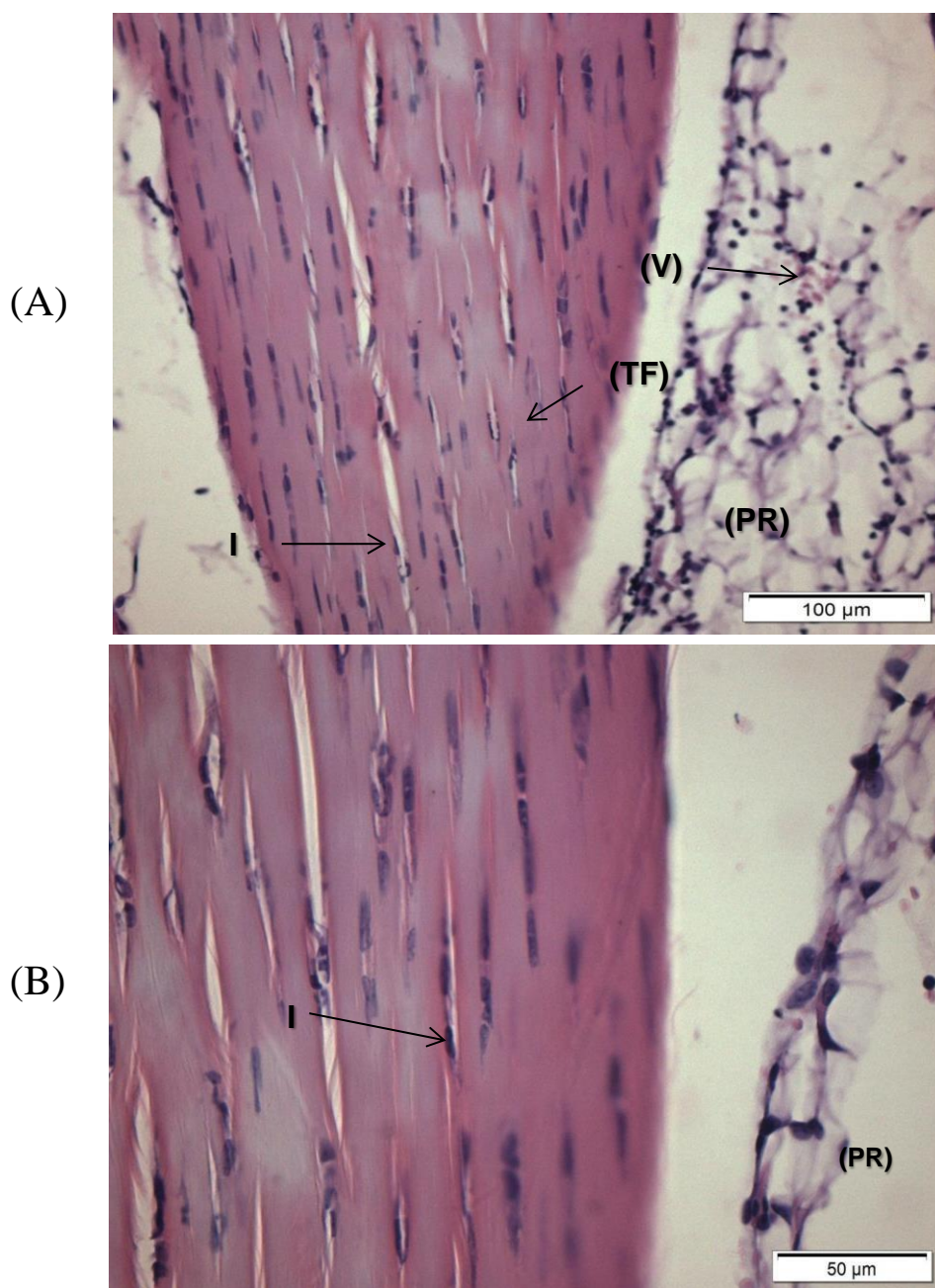
#### 4.6 Aspectos Histológicos do tendão

Foram analisados tendões de camundongos após indução da tendinite. Os animais foram coabitados ou com camundongos saudáveis ou com camundongos com tumor de bexiga induzido. Na Figura 9, os camundongos com tendinite não receberam nenhum tratamento. Foi observado expressivo aumento do infiltrado inflamatório na região peritendínea, bem como do tendão propriamente dito. Foi observado ainda fibras tendíneas bastante desorganizadas.



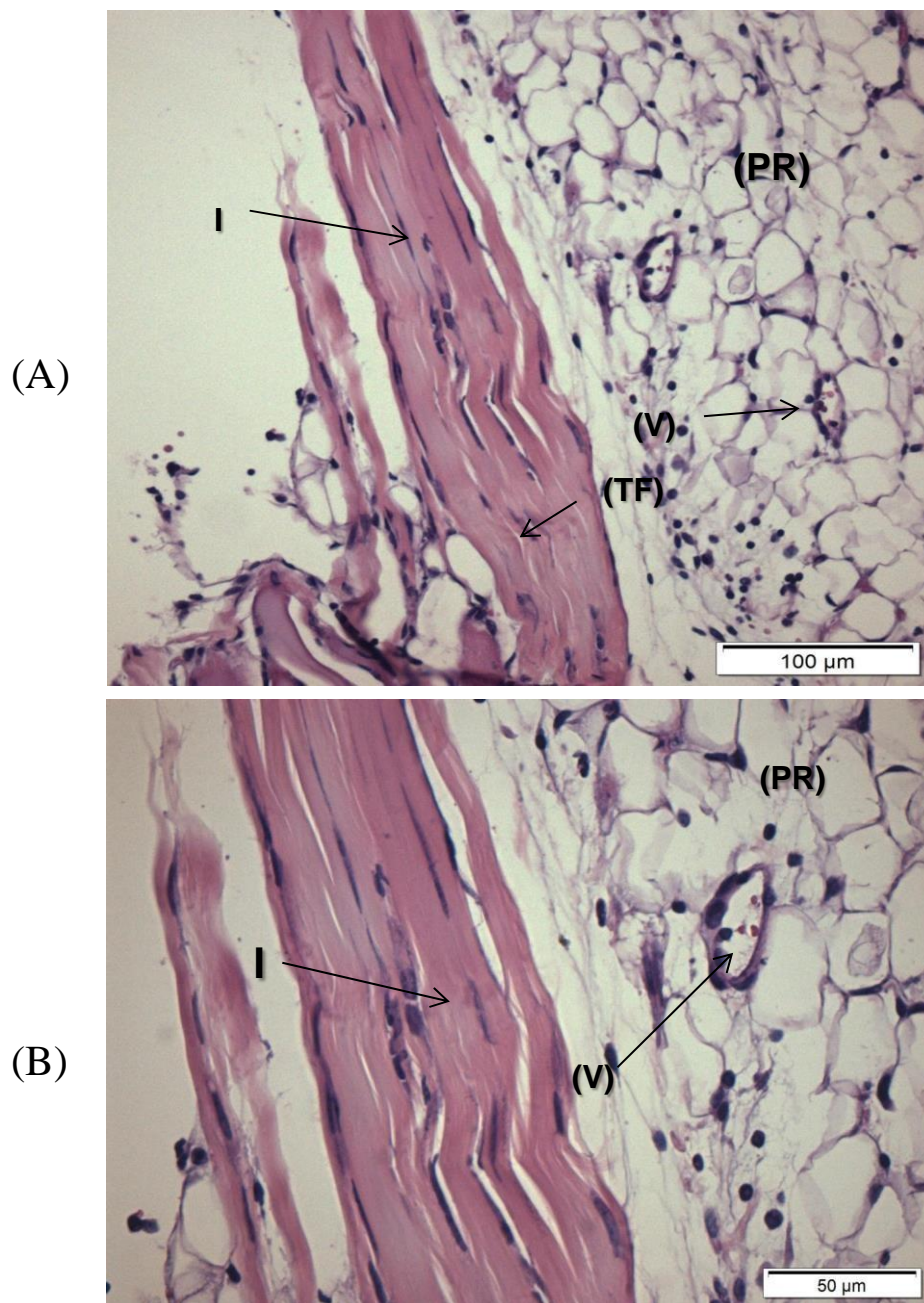
**Figura 9:** Fotomicroscopia do tendão calcâneo de camundongos com tendinite e sem tratamento que foram coabitados com animais saudáveis (NT COAB+saudável). Corte longitudinal com aumento de 20X (9A) e 40X (9B). PR (Região peritendínea); TF (Fibras tendíneas); V (Vaso sanguíneo).

Nas Figuras 10A e 10B os animais com tendinite e coabitados com camundongos saudáveis foram irradiados com LEDterapia craniana. Foi observado infiltrado inflamatório na região peritendínea bem como no tendão propriamente dito. No entanto as fibras tendíneas estavam mais organizadas comparado ao grupo se teve o mesmo tipo de coabitação, mas não foi tratado.



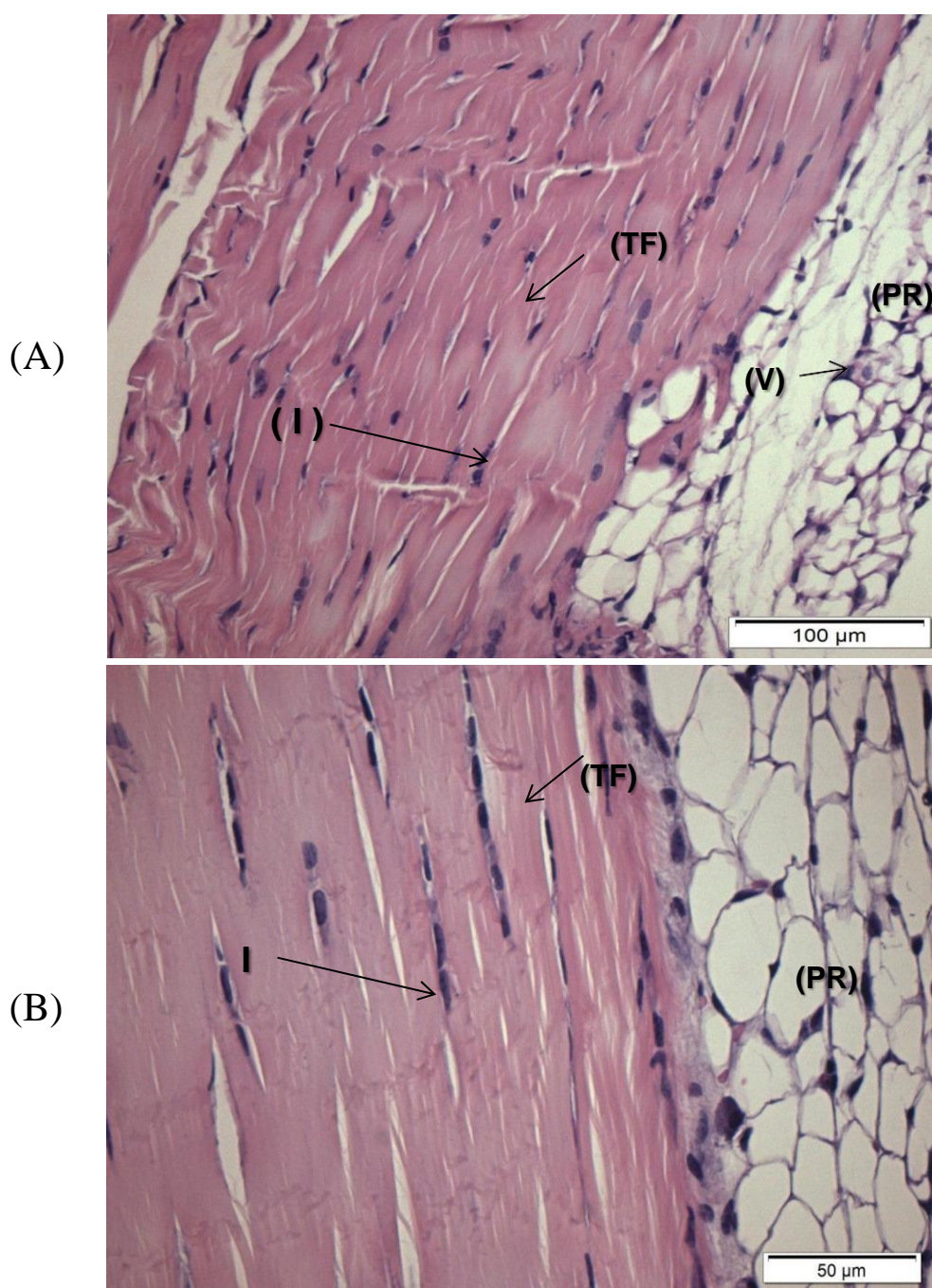
**Figura 10:** Fotomicroscopia do tendão calcâneo de camundongos com tendinite e irradiados com LEDterapia craniana que foram coabitados com animais saudáveis (CI COAB+saudável). Corte longitudinal com aumento de 20X (10A) e 40X (10B). PR (Região peritendínea); TF (Fibras tendíneas); V (Vaso sanguíneo).

As figuras 11A e 11B representam o grupo de animais com tendinite sem tratamento e que foram coabitados com camundongos com tumor. Foi possível observar pequeno infiltrado inflamatório na região peritendínea, quando comparado ao grupo sem tratamento e coabitado com camundongos saudáveis. Porém, as fibras tendíneas apresentam-se ainda desorganizadas.



**Figura 11:** Fotomicroscopia do tendão calcâneo de camundongos com tendinite e sem tratamento que foram coabitados com animais com tumor (NT COAB+tumor). Corte longitudinal com aumento de 20X (11A) e 40X (11B). PR (Região peritendínea); TF (Fibras tendíneas); V (Vaso sanguíneo).

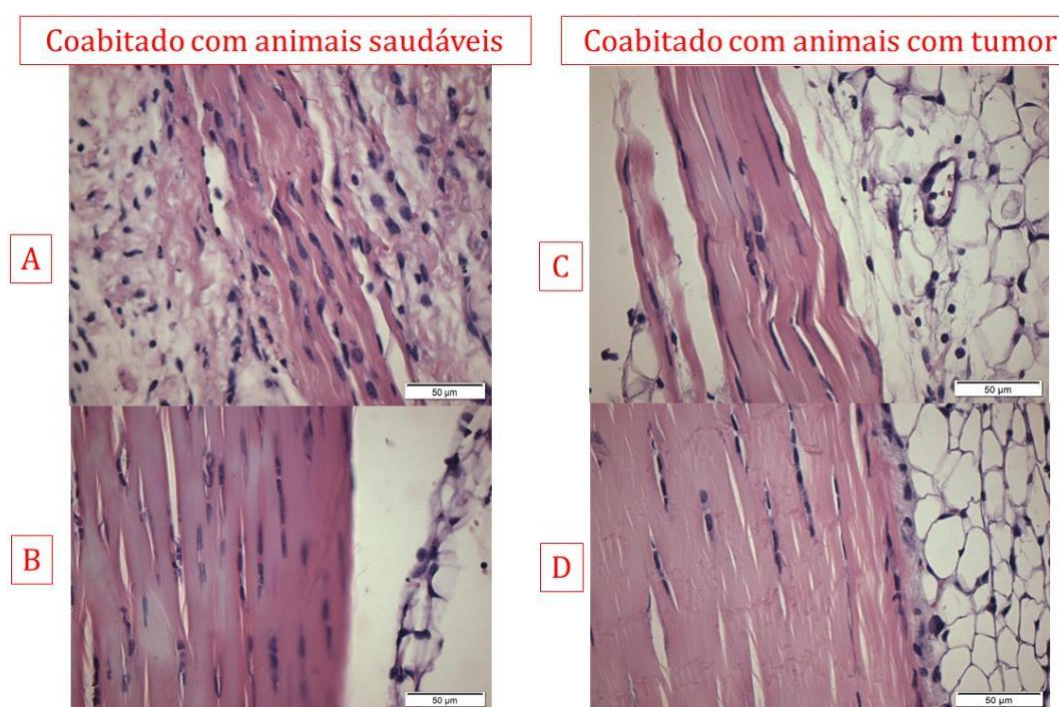
As imagens representativas do grupo de animais com tendinite e que receberam irradiação com LEDterapia craniana após coabitação com camundongos com tumor, foram representadas pelas Figuras 12A e 12B. presença de infiltrado inflamatório similar ao grupo com a mesma coabitação mas que não foi tratado. No entanto, as fibras tendíneas estão mais organizadas que o grupo anterior.



**Figura 12:** Fotomicroscopia do tendão calcâneo de camundongos com tendinite e irradiados com LEDterapia craniana, que foram coabitados com animais com tumor (CI COAB+tumor). Corte longitudinal com aumento de 20X (9A) e 40X (9B). PR (Região peritendínea); TF (Fibras tendíneas); V (Vaso sanguíneo).



A Figura 13 apresenta um painel com as imagens representativas no aumento de 40X de todos os grupos experimentais. Na comparação é possível observar o aumento do infiltrado inflamatório bem como a acentuada desorganização tecidual em (13A) comparado aos demais grupos. A imagem em (13B) mostra importante redução do infiltrado inflamatório quando comparado com (13A). Todos os grupos que receberam a LEDterapia craniana (13B e 13 D) apresentaram melhor organização das fibras tendíneas comparado com ambos os grupos sem tratamento (13A e 13C).



**Figura 13:** Fotomicroscopia do tendão calcâneo de camundongos com tendinite. Em (A) grupo tendinite coabitado com animais saudáveis e sem tratamento; Em (B) grupo tendinite coabitado com animais saudáveis e com LEDterapia; Em (C) grupo tendinite coabitado com animais com tumor e sem tratamento; Em (D) grupo tendinite coabitado com animais com tumor e tratados com LEDterapia. Corte longitudinal com aumento de 20X (9A) e 40X (9B). PR (Região peritendínea); TF (Fibras tendíneas); V (Vaso sanguíneo).

## 5 Discussão

No presente trabalho foi avaliado o efeito da fotobiomodulação craniana utilizando a luz LED infravermelha (810nm; 3J; 160mW; 30s) sobre a tendinite induzida por colagenase em camundongos coabitados com animais saudáveis ou com tumor induzido de bexiga. Foi observado que a LEDterapia craniana foi capaz de reduzir a expressão gênica de importantes marcadores inflamatórios, como COX-2, IL-1 $\beta$  e IL-6, além de aumentar a expressão de receptores de neurocinina (NK-1). A COX-2 é induzida principalmente nas células inflamatórias, facilitando a resposta inflamatória quando ativadas durante uma inflamação. A IL-1 $\beta$  é a principal citocina pró- inflamatória é geralmente produzida por monócitos e macrófagos e estimula a produção de IL-6. A LEDterapia ainda promoveu a redução do infiltrado inflamatório e melhorou a organização das fibras tendíneas nos mesmos animais.

Os animais com tendinite induzida que não foram tratados com a LEDterapia (Grupo 1) apresentaram aumento do processo inflamatório além de alterações no tecido tendíneo, com grande quantidade de infiltrado inflamatório e desorganização das fibras tendíneas. Este modelo de lesão tendínea pela indução de colagenase é bem conhecido e simula facilmente um processo inflamatório agudo do tendão. Marcos e colaboradores observaram, com o mesmo modelo, alterações tanto nos marcadores inflamatórios (COX-2, IL6 e IL10) quanto na qualidade do tecido tendíneo, onde é comum a presença de infiltrado inflamatório e desorganização de fibras entre 6 e 12 horas após a indução da tendinite. A IL10 inibe as citocinas pró-inflamatórias e estimula a produção endógena de citocinas anti-inflamatórias.

Já nos animais do grupo 2, que recebem a irradiação craniana com luz LED, foi observada a redução dos marcadores inflamatórios, bem como melhora das características morfológicas do tecido tendíneo. A ação anti-inflamatória da terapia por fotobiomodulação em modelo de tendinite já foi bem demonstrada em diversos trabalhos. A fotobiomodulação pode reduzir a expressão de mediadores inflamatórios como IL6, além da prostaglandina, sendo relacionado ainda com o efeito analgésico da fototerapia.<sup>34</sup>

Este efeito analgésico da fotobiomodulação no tecido tendíneo provavelmente não está apenas relacionada com a redução do processo

inflamatório e de PGE2. A modulação dos receptores de neurocinina (NK-1) pode ter relação direta com o efeito analgésico em tempos menores o que teria efeito somatório com a redução de PGE2. <sup>29</sup>

Ainda quando analisamos os animais do Grupo 2, que receberam a irradiação craniana, apesar de observarmos a redução dos mediadores inflamatórios (COX-2, IL1 $\beta$ , IL-6), houve aumento na expressão de receptores de NK1. Similarmente, os animais com tendinite que foram coabitados com animais com tumor (Grupo 3) também apresentaram redução na expressão de COX-2, IL-1 $\beta$  e IL-6 e novamente houve aumento de NK-1. Em geral, os modelos de coabitação podem estar relacionados com o aumento do estresse. Nestes casos, pode haver aumento na produção de cortisol, devido a estimulação do eixo Hipotálamo Hipófise Adrenal (HHA) onde a produção deste glicocorticoide endógeno seria estimulada pelo estresse ou pelo estado de alerta, porém, neste último caso, haveria a participação do sistema nervoso autônomo simpático. O Cortisol é um importante hormônio chamado também de glicocorticoides, conhecido pelo seu efeito anti-inflamatório, além de outras funções como a depressão do sistema imunológico. Neste caso, a redução dos mediadores inflamatórios poderia estar relacionada ao aumento na produção de cortisol provocado pelo estresse causado pela coabitação dos animais com tendinite em convívio com os animais com tumor.

Se considerados os animais do Grupo 4, que foram irradiados e estavam coabitados com animais com tumor, não houve diferença significativa na expressão gênica de COX-2 ou IL1 $\beta$ , comparados aos animais sem tratamento do Grupo 3. No entanto, a expressão de IL6 foi aumentada. A hipótese para este aumento seria novamente vinculada ao Cortisol. Neste caso, a irradiação craniana poderia provocar o aumento da produção de cortisol via eixo HHA, e que em seguida poderia haver um feedback negativo e redução do estímulo na produção de cortisol. Neste caso, sem a presença do inflamatório endógeno, o processo inflamatório no tendão poderia acentuar.

Da mesma forma, o provável aumento de cortisol poderia promover aumento da sensibilidade e dor. Este fator poderia justificar o aumento na expressão de NK-1 nos grupos que receberam irradiação craniana.

São escassos os trabalhos que estudam irradiação craniana e seu efeito na redução do processo inflamatório. Lee et al (2017) realizou irradiação com

LEDterapia na região craniana em pacientes com lesões cerebrais e verificou o aumento a melhora do quadro isquêmico após a irradiação. Salehpour et al (2017) utilizou irradiação craniana para melhora do quadro cognitivo em camundongos <sup>36,37</sup>. No entanto, não foram encontrados trabalhos científicos que utilizam a irradiação craniana para a modulação de processos inflamatórios periféricos. No presente trabalho, a laserterapia craniana conseguiu reduzir vários marcadores inflamatórios em uma lesão periférica como a da tendinite induzida por colagenase. O mecanismo de ação sugerido seria a ação do fotobiomodulação sobre o hipotálamo, o que induziria a produção de hormônio liberador de corticotropina ou na hipófise, com a própria produção de corticotropina, o que levaria a produção de cortisol pelas suprarrenais.

Um fator limitante para este trabalho é a necessidade de quantificação do cortisol dos camundongos. Outro ponto importante seria a análise de tempos maiores de coabitação, para verificar se o eixo HHA, que estaria desregulado, poderia reajustar e equilibrar os níveis de cortisol.

Seria também necessário incluir testes funcionais como o de alodinia mecânica para verificar se a alteração na expressão de NK1 ou dos mediadores inflamatórios direcionaria para alterações na sensibilidade a dor.

Neste trabalho, foi utilizada irradiação com LED infravermelho na região central do crânio. No entanto, é importante investigar se existem áreas específicas para esta irradiação, ou mesmo se os parâmetros utilizados seriam os melhores na redução do processo inflamatório periférico, uma vez que a dose de irradiação utilizada foi escolhida a partir de trabalhos anteriores para o tratamento de lesões tendineas, porém para irradiações no local da lesão.

Mais análises e novos ensaios são necessários para que se possa esclarecer o provável mecanismo de ação tanto no efeito do estresse sobre a progressão de doenças articulares, como o efeito de irradiações cranianas sobre o processo inflamatório em tecidos periféricos.

## 6. CONCLUSÃO

Podemos concluir que o modelo de coabitação aguda diminui o processo inflamatório em animais com tendinite induzida, pela redução de importantes marcadores inflamatório (COX2; IL-1 $\beta$ ; IL-6) e do infiltrado inflamatório no tecido tendíneo, além de aumentar a expressão do receptor de neurocinina (NK1).

A terapia por fotobiomodulação com irradiação craniana, similarmente ao modelo de coabitação, promove a redução do processo inflamatório no tendão também pela redução de marcadores inflamatórios (COX2; IL-1 $\beta$ ; IL-6), redução de infiltrado inflamatório. No entanto, aumenta a expressão de receptor de neurocinina (NK1).

A irradiação craniana não apresentou efeito adicional na expressão de COX2, IL-1 $\beta$ , IL-10, NK1 e no infiltrado inflamatório no tecido tendíneo, apesar de mostrar discreta melhora na organização das fibras tendíneas, no modelo de tendinite induzida por colagenase.

Sugere-se que o modelo de coabitação aguda estimula o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e a produção de cortisol, que, por ter efeito anti-inflamatório sistêmico, interferiria no processo inflamatório em tecidos periféricos como no modelo de tendinite induzida por colagenase em tendões calcâneos de camundongos, além de aumentar a sensibilidade a dor.

Outros experimentos precisam ser realizados para a confirmação do mecanismo de ação sugerido neste trabalho.

## Referências

1. Czura CJ Tracey KJ. Autonomic neural regulation of immunity. *J InternMed.* 2005;257(2):156-66.
2. Abbas AK, Janeway CA. Immunology: Improving on Nature in the Twenty-First Century. *Cell.* 2000;100:129-138.
3. Lima RR, Costa AMR, Souza RD, Gomes-Leal E. Inflamação em doenças neurodegenerativas. *Rev. Para. Med.* 2007; 21(2): 29-34.
4. Wyss-Coray T, Mucke L. Inflammation in Neurodegenerative Disease Double Edged Sword. *Neuron.* 2002;35:419-432.
5. Franceschi C, Capri M, Monti D, Giunta S, Olivieri F, Sevini F et al. Inflammaging and anti-inflammaging: A systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mech Ageing Dev.* 2007;128:92-105.
6. Alves, GJ. Coabitação com um parceiro doente: consequências sobre o comportamento, a atividade imune inata e o crescimento tumoral. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2005. Dissertação de Mestrado.
7. Hamasato KJ, Lima APN, Oliveira APL, Francoc ALS, Limad WT, Palermo-Neto J. Cohabitation with a sick partner increases allergic lung inflammatory response in mice. *Brain, behavior, and immunity.* 2014;42:109-117.
8. Langberg H, Bjorn C, Boushel R, Hellsten Y, Kjaer M. Exercise-induced increase in interstitial bradykinin and adenosine concentrations in skeletal muscle and peritendinous tissue in humans. *J. Physiol.* 2002;542:977-983.

9. Martins L, Iversen VV. A randomised, placebo controlled trial of low level laser therapy for activated Achilles tendinitis with microdialysis measurement of peritendinous prostaglandin E2 concentrations. *Br J. Sports Med.* 2006 Jan;40(1):76-80.
10. Tedgui A, Mallat Z. Anti-inflammatory mechanisms in the vascular wall. *Circulation Res.* 2001;8:877-887.
11. Ueda H, Meguri N, Minaguchi J, Watanabe T, Nagayasu A., Hosaka Y et al. Effect of collagen oligopeptide injection on rabbit tenositis. *J. Vet. Med. Sci.* 2008;70(12):1295-300.
12. Queiroz-Junior CM, Pacheco CMF, Maltos KLM, Caliari MV. Duarte IDG, Francischi JN. Role of systemic and local administration of selective inhibitors of cyclo-oxygenase 1 and 2 in an experimental model of periodontal disease in rats. *J. Periodontal Res.* 2000;44(2):153-160.
13. Sun HB, Li Y, Fung DT, Majeska RJ, Schaffler MB. Flatow EL. Coordinate regulation of IL-1beta and MMP-13 in rat tendons following subrupture fatigue damage. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2008;466(7):1555-1561.
14. Chen YJ; Wang CJ; Yang KD; Kuo, YR; Huang, HC.; Huang, YT; SUN, YC; WANG, FS. Extracorporeal shock waves promote healing of collagenase-induced Achilles tendinitis and increase TGF- $\beta$ 1 and IGF-I expression. *J. Orthop. Res.* 2004 v. 22, 854-861.
15. NAKAMA K, GOTOH M, YAMADA T et al. Interleukin-6-induced activation of signal transducer and activator of transcription-3 in ruptured rotator cuff tendon. *J Int Med Res.* 34:624-31. 2006.
16. QUEIROZ-JUNIOR, C. M.; PACHECO, C. M. F.; MALTOS, K. L. M.; CALIARI, M. V.; DUARTE, I. D. G; FRANCISCHI, J. N. Role of systemic and local

administration of selective inhibitors of cyclo-oxygenase 1 and 2 in an experimental model of periodontal disease in rats. *J. Periodontal Res.*, v. 44, n. 2, p. 153-160, 2009.

17. KVIST M. Achilles tendon injuries in athletes. *Sports Med.* 18(3). 173-201.1994.

18. Rang & Dale. *Farmacologia*. 12ª Edição. ELSEVIER. 2018.

19. ALVES AC, ALBERTINI R, DOS SANTOS SA, LEAL-JUNIOR EC, SANTANA E, SERRA AJ, SILVA JA JR, DE CARVALHO PD. 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. 2013.

20. AKESEN, B.; DEMIRAG, B.; BUDAK, F. Evaluation of intra-articular collagenase, TIMP-1, and TNF-alpha levels before and after anterior cruciate ligament reconstruction. *Acta Orthop. Traumatol. Turc.*, v. 43, n. 3, p. 214-218, 2009.

21. KRAYCHETE,DC.;CALASANS MTA.;VALENTE,CMT. Citocinas Pró-inflamatórias e Dor . *Rev Bras Reumatol*, v 46 n.3 199-206, mai/junh, 2006.

22. VALE,FM. Dor. Novos aspectos fisiopatológicos e consequentes estratégias farmacológicas.*Rfmlv.5n.5p.291-304,2003.*

23. OLIVEIRA, CMB.;SAKATA,RK.;ISSY,AM.;GEROLA,LR. Citocina e Dor. *Ver Bras Anesthesiol*, 61:2:255-265 , 2011.

24. TORRES-SILVA R, et al. 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.



25. BOUSHEL R, LANGBERG H, GREEN S, SKOVGAARD D, BULOW J, KJAER M. Blood flow and oxygenation in peritendinous tissue and calf muscle during dynamic exercise in humans. *J Physiol.* v. 524(Pt 1), p. 305-313, 2000.
26. LEVERSEDGE FJ, DITSIOS K, GOLDFARB CA, SILVA MJ, GELBERMAN RH, BOYER MI. Vascular anatomy of the human flexor digitorum profundus tendon insertion. *J Hand Surg.* v. 27, p. 806-812, 2002.
27. ALMEIDA P, LOPES-MARTINS RÁ, TOMAZONI SS, SILVA JA JR, CARVALHO PDE T, BJORDAL JM, LEAL JUNIOR EC. Low-level Laser Therapy Improves Skeletal Muscle Performance, Decreases Skeletal Muscle Damage and Modulates mRNA Expression of COX-1 and COX-2 in a Dose-dependent Manner. *Photochem Photobiol.* 2011 Sep-Oct;87(5):1159-63.
- 28 LANGBERG, H.; KONGSGAARD, M. Eccentric training in tendinopathy – more questions than answers. *Scand. J. Med. Sci. Sports*, v. 18, n. 5, p. 541-542, 2008.
29. MARCOS, R.L.. Efeito do laser de baixa intensidade (810nm) na tendinite induzida por colagenase em ratos. Tese de Doutorado – USP. 2010.
30. OLIVEIRA, MX. Efeitos da terapia LED de baixa intensidade em tendinites em modelo experimental. Tese Doutorado, 2009
31. LIAN O, HOLEN KJ, ENGBRETSSEN L, BAHR R. Relationship between symptoms of jumper's knee and the ultrasound characteristics of the patellar tendon among high level male volleyball players. *Scand J Med Sci Sports.* v. 6, p. 291–296, 2006.
32. MENEGUZZO, DT. Fototerapia com laser em baixa intensidade em processo inflamatório agudo induzido por carragenina em pata de camundongos- estudos de dosimetria. Tese de Doutorado, 2010.
33. PIRES D, XAVIER M, ARAÚJO T, SILVA JA JR, AIMBIRE F, ALBERTINI R. Low-level laser therapy (LLLT; 780 nm) acts differently on mRNA expression of

anti- and pro-inflammatory mediators in an experimental model of collagenase-induced tendinitis in rat. *Lasers Med Sci.* 2011 Jan;26(1):85-94.

34. Marcos RL, Leal-Junior EC, Arnold G, Magnenet V, Rahouadj R, Wang X, Demeurie F, Magdalou J, de Carvalho MH, Lopes-Martins RÁ. 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.

35. BISPO, LB. A nova tecnologia do laser terapêutico no controle da dor. *Rev.bras.odontol,rio de janeiro,v.66n.1,p.107-111, jan-jun, 2009.*

36. Salehpour F, Rasta SH. The potential of transcranial photobiomodulation therapy for treatment of major depressive disorder. *Rev Neurosci.* 2017 May 24;28(4):441-453.

37. Lee HI, Park JH, Park MY, Kim NG, Park KJ, Choi BT, Shin YI, Shin HK. Pre-conditioning with transcranial low-level light therapy reduces neuroinflammation and protects blood-brain barrier after focal cerebral ischemia in mice. *Restor Neurol Neurosci.* 2016;34(2):201-14.

## Anexos



Comissão de Ética no  
Uso de Animais

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "ESTUDO EXPERIMENTAL DA FOTOBIMODULAÇÃO DO REPARO TENDINEO EM MODELO DE COABITAÇÃO ENTRE CAMUNDONGOS SAUDÁVEIS E INDUZIDOS COM TUMOR DE BEXIGA", protocolada sob o CEUA nº 4537120618 (10 000018), sob a responsabilidade de **Rodrigo Labat Marcos** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Nove de Julho (CEUA/UNINOVE) na reunião de 12/06/2018.

We certify that the proposal "EXPERIMENTAL STUDY OF PHOTOBIMODULATION OF TENDON REPAIR IN COHABITATION MODEL BETWEEN HEALTHY AND INDUCED MOUSE WITH BLADDER TUMOR", utilizing 40 Isogenics mice (40 females), protocol number CEUA 4537120618 (10 000018), under the responsibility of **Rodrigo Labat Marcos** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Nove de Julho University (CEUA/UNINOVE) in the meeting of 06/12/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **06/2018** a **06/2022**

Área: **Biofotônica Aplicada Às Ciências da Saúde**

Origem: **Biotério - Unidade Vergueiro**

Espécie: **Camundongos isogênicos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **6 a 8 semanas**

N: **40**

Linhagem: **C57Bl/6**

Peso: **20 a 30 g**

Local do experimento: **Sala de cirurgia (Uninove - Vergueiro)**

São Paulo, 31 de janeiro de 2019

Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Nove de Julho

Profa. Dra. Stella Regina Zamuner  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Nove de Julho