

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOFOTÔNICA APLICADA ÀS CIÊNCIAS DA SAÚDE

TERAPIA POR FOTOBIMODULAÇÃO COM LASER DE BAIXA INTENSIDADE E SUA ASSOCIAÇÃO COM DICLOFENACO DE SÓDIO PROMOVE A RESOLUÇÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO EM MODELO EXPERIMENTAL DE TENDINITE INDUZIDA POR COLAGENASE.

Mateus Moura Evaristo

São Paulo, SP

2019

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO

Mateus Moura Evaristo

TERAPIA POR FOTOBIMODULAÇÃO COM LASER DE BAIXA INTENSIDADE E SUA ASSOCIAÇÃO COM DICLOFENACO DE SÓDIO PROMOVE A RESOLUÇÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO EM MODELO EXPERIMENTAL DE TENDINITE INDUZIDA POR COLAGENASE.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biofotônica Aplicada as Ciências da Saúde da Universidade Nove de Julho como cumprimento das exigências da Universidade para obtenção do Título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos

São Paulo, SP

2019

Evaristo, Mateus Moura.

Terapia por fotobiomodulação com laser de baixa intensidade e sua associação com diclofenaco de sódio promove a resolução do processo inflamatório em modelo experimental de tendinite induzida por colagenase. / Mateus Moura Evaristo. 2019.

78 f.

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

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

1. Laser de baixa intensidade. 2. Resolvina. 3. Lipoxina. 4. LÇeucotrieno receptor. 5. Collagenase. 6. Inflamação. 7. Tendinite. 8. Laserterapia. 9. Colagenase. 10. Resolução da inflamação.

I. Marcos, Rodrigo Labat.

II. Título.

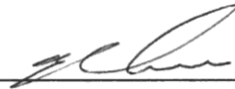
Sgo Paulo, 17 de dezembro de 2019

TERMO DE APROVACAO

Aluno (a): Mateus Moura Evaristo

Titulo da Dissertação: "Terapia por fotobiomodulação promove a resolução do processo inflamatório em modelo experimental de tendinite induzida por colagenase"

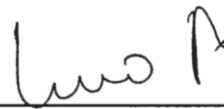
Presidente: PROF. DR. RODRIGO LABAT MARCOS



Membro: PROF^A. DR^A. ADRIANA LINO SANTOS FRANCO



Membro: PROF DR LUCIO FRIGO



Lista de Símbolos, Siglas e Abreviaturas

ASA: Aspirina
ALX: Receptor de Lipoxina
AT: Tendão de Aquilesd
BLT1: Receptor de Leucotrieno B4
COX: Ciclo-oxigenase
CTL: Controle
DIC: Tendinite + anti-inflamatório
DRV1: Receptor de resolvina D
ERV: Receptor de resolvina E
PBMT: Tendinite + laser 3J
PBMT+DIC: Tendinite + associação laser 3J e diclofenaco de sódio
NF-kB: Fator Nuclear-kappa B
IL1-β: Interleucina-1 beta
IL6: Interleucina -6
IL10: Interleucina-10
LASER: Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
LBP: Laser de Baixa Potência
LED: Diodo emissor de luz
LLLT: Terapia com Laser de Baixa Intensidade
LOX: Lipoxigenase
LXA4: Lipoxina A4
LTs: Leucotrienos
MMP: Metaloproteinase da Matriz
MPO: Mieloperoxidase
mW: MiliWatt
nm: Nanômetro
PG: Prostaglandina
PUFA: Ácido graxo poli-insaturado
Rvs: Resolvinas
TNF-α: Fator de Necrose Tumoral-alfa
I.M.: Intramuscular
G: Gramas
ANOVA: Análise de variância
cm²: Centímetro quadrado
J: Joule
J/cm²: Joules por centímetro quadrado
Kg: Kilograma
Mm: Milímetros
15R-HETE: 15R-hidroxieicosatetraenoico

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura anatômica básica do tendão calcâneo	11
Figura 2: Via de metabolização do Ácido Araquidônico	13
Figura 3: Produção de Lipoxinas via metabolização do Ácido Araquidônico	16
Figura 4: Via de metabolização do Ácido Docosaheptaenóico (DHA) e produção das Resolvinas Série D, Protectinas e Maresinas.	17
Figura 5: Via de metabolização do Ácido Eicosapentaenóico (EPA) e produção das Resolvinas Série E.....	18
Figura 6: Grupos experimentais.....	25
Figura 7: Linha temporal de indução, tratamento e eutanásia em modelo experimental de tendinite aguda	25
Figura 8: Imagens microscópicas de cortes histológicos do tendão de Aquiles de ratos Wistar 2 horas após indução da tendinite. Coloração Hematoxilina-eosina.....	29
Figura 9: Imagens microscópicas da região periférica ao tendão de Aquiles de ratos Wistar 2 horas após indução da tendinite. Coloração Hematoxilina-eosina.....	30
Figura 10: Imagens microscópicas do tendão de Aquiles de ratos Wistar 2 horas após indução da tendinite. Coloração Picrosirius Red.....	31
Figura 11: Gráfico da atividade da enzima Mieloperoxidase no tecido tendíneo 2 horas após a indução do processo inflamatório.....	32
Figura 12: Expressão gênica do receptor DRV1 de resolvinas D1, D3 e D5, 2 horas após a indução de tendinite.....	34
Figura 13: Expressão gênica do receptor ERV de resolvinas E1 e E2, 2 horas após a indução de tendinite.....	35
Figura 14: Expressão gênica do receptor BLT1 de leucotrienos B4, 2 horas após a indução de tendinite	36
Figura 15: Expressão gênica do receptor ALX de Lipoxinas A4, além de resolvinas D1, 2 horas após a indução de tendinite.....	37

Lista de Tabelas

Tabela 1: Parâmetros da aplicação da terapia por fotobiomodulação	25
Tabela 2: Lista de primers dos receptores ALX, ERV, DRV1 e BLT1	26

RESUMO

A tendinite em tendão calcâneo é frequente e difícil de ser tratada, porém existe uma variedade de terapias e tratamentos para abordar a lesão do tendão. A mais utilizada hoje são os anti-inflamatórios que apresentam resultados momentâneos, porém pouco satisfatórios devido aos seus efeitos indesejáveis e prejuízos ao reparo tecidual. A terapia com a Fotobiomodulação aparece como terapia promissora na modulação do processo inflamatório agudo e crônico com ausência de efeitos adversos causados pelos anti-inflamatórios. O presente estudo possuiu o objetivo de avaliar a ação do diclofenaco de sódio associado a terapia por fotobiomodulação na resolução da inflamação na tendinite. Ratos wistar machos (CEUA/UNINOVE: 2322171019) foram anestesiados e induzidos a tendinite por injeção de collagenase (100µg/pata) sobre o tendão calcâneo. Os animais foram distribuídos em 4 grupos: Controle (CTL) com tendinite induzida sem tratamento, Tendinite induzida tratado com Diclofenaco de Sódio (DIC) ou tratado com Laser de baixa intensidade (PBM). Foi também incluído grupo com terapias associadas (Laser e Diclofenaco de sódio - PBM+DIC). Duas horas após a indução da tendinite e respectivo tratamento, os animais foram eutanasiados e os tendões isolados para análises histológicas, moleculares (expressão gênica de ALX, ERV, BLT1 e DRV1) e bioquímica (Atividade de Mieloperoxidase – MPO). Resultados: O grupo PBM apresentou aumento na expressão de ALX e ERV, e diminuição de BLT1, comparados ao grupo CTL. O grupo DIC apresentou diminuição na expressão de ALX e ERV, e aumento de BLT1, quando comparados aos grupos irradiados. Todos os grupos tratados apresentaram redução no infiltrado inflamatório comparado ao grupo CTL. O grupo PBM+DIC apresentou aumento na expressão de ALX e ERV, e diminuição de BLT1, quando comparados aos grupos controle e DIC. Nosso trabalho sugere que a terapia com laser de baixa intensidade (810nm – 3J e 30mW) associada ou não com diclofenaco de sódio auxiliou na redução do infiltrado inflamatório e no aumento da expressão de importantes receptores relacionados ao processo de resolução da inflamação.

Palavras-chave: Laser de baixa intensidade, Resolvina, Lipoxina, LÇeucotrieno receptor, Collagenase, Inflamação, Tendinite, Laserterapia, Collagenase, Resolução da inflamação.

ABSTRACT

Achilles tendinitis is frequent and difficult to treat, but there are a variety of therapies and treatments to address tendon injury. The most used today are anti-inflammatory drugs that present momentary but unsatisfactory results due to their undesirable effects and damage to tissue repair. Photobiomodulation therapy appears as a promising therapy in modulating acute and chronic inflammatory process with no adverse effects caused by anti-inflammatory drugs. The present study aimed to evaluate the action of diclofenac sodium associated with photobiomodulation therapy in the resolution of tendinitis inflammation. Male Wistar rats were anesthetized and induced by collagenase injection tendinitis (100µg/paw) on the calcaneal tendon. The animals were divided into 4 groups: Control (CTL) with untreated induced tendinitis, Sodium Diclofenac treated Induced Tendinitis (DIC) or Low Intensity Laser treated (PBM). A group with associated therapies (Laser and Diclofenac sodium - PBM + DIC) was also included. Two hours after tendinitis induction and treatment, the animals were euthanized and the tendons isolated for histological, molecular (gene expression of ALX, ERV, BLT1 and DRV1) and biochemical (Myeloperoxidase Activity - MPO) analysis. Results: The PBM group showed an increase in ALX and ERV expression, and a decrease in BLT1, compared to the CTL group. The DIC group showed a decrease in ALX and ERV expression and an increase in BLT1 when compared to the irradiated groups. All treated groups showed a reduction in inflammatory infiltrate compared to the CTL group. The PBM + DIC group showed an increase in ALX and ERV expression, and a decrease in BLT1 when compared to the control and DIC groups. Our work suggests that low level laser therapy (810nm - 3J and 30mW) associated or not with sodium diclofenac helped to reduce the inflammatory infiltrate and increase the expression of important receptors related to the inflammation resolution process.

Keywords: Low intensity laser, Resolvin, Lipoxin, Leukotriene receptor, Collagenase, Inflammation, Tendinitis, Laser therapy, Collagenase, Resolution of inflammation.

SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO	08
1.1 - Tendinopatias	09
1.2 – Anatomia básica do tendão calcâneo.....	10
1.3 - Lesão do tendão: mecanismo básico da inflamação e do reparo	11
1.3.1 Processo inflamatório do tendão	11
1.3.2 Citocinas na inflamação do tendão	13
1.4 - Mediadores especializados em Pró-resolução (SPMs).....	15
1.4.1 Lipoxinas	16
1.4.2 Resolvinas.....	16
1.4.3 Protectinas	17
1.4.4 Maresinas.....	18
1.5 - Tratamento da Tendinopatia	18
1.5.1 Tratamento com Anti-inflamatórios Não Esteroidais (AINEs)	20
1.5.2 Diclofenaco de sódio.....	20
1.5.3 Terapia por fotobiomodulação (PBM)	21
2-OBJETIVOS	23
2.1 – Objetivo geral.	23
2.2 – Objetivos específicos.	23
3-MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 - Animais.	24
3.2 - Indução da Inflamação em Tendão Calcâneo de Ratos	24
3.3 - Grupos experimentais.....	24
3.4 - Aplicação da Terapia por Fotobiomodulação	25
3.5 - Coloração por Hematoxilina-eosina	26
3.6 - Coloração por Picrosirius Red	26
3.7 - Análises de expressão gênica por RT-PCR	27
3.8 - Análise da atividade de Mieloperoxidase	28
3.9 - Análise Estatística.....	29

4-RESULTADOS.....	30
4.1 – Avaliação dos cortes histológicos.	30
4.1.1 Avaliação do infiltrado inflamatório no tendão propriamente dito em modelo de tendinite aguda	30
4.1.2 Avaliação do infiltrado inflamatório na região periférica ao tendão em modelo de tendinite aguda	31
4.1.3 Avaliação de colágeno tipo I e tipo III com coloração por Picrosirius Red	32
4.2 Atividade da Mieloperoxidase (MPO) na tendinite após tratamento com Diclofenaco de Sódio, Laser e associação Laser com Diclofenaco de Sódio	33
4.3 Expressão gênica do receptor DRV de resolvinas D1, D3 e D5.	34
4.4 Expressão do receptor ERV de resolvinas E1 e E2	35
4.5 Expressão gênica do receptor BLT1, em que se ligam leucotrienos B4	36
4.6 Expressão gênica do receptor ALX de Lipoxinas A4 e B4	37
5-DISCUSSÃO.	38
6-CONCLUSÃO.	45
7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
8-ANEXOS	47
8.1 Carta de aprovação no comitê de ética do uso de animais (CEUA).....	47

1. INTRODUÇÃO

1.1 Tendinopatias

Tendinopatias são distúrbios presentes no sistema músculoesquelético que comprometem a saúde do tendão afetado [1], e podem ser caracterizados pela presença de dor, diminuição de força e movimento local [2]. O termo Tendinopatia pode ser subdividido em tendinite e tendinose. Tendinite é utilizado para englobar a lesão tendínea com presença do processo inflamatório local, enquanto que o termo tendinose refere-se à lesão do tendão sem presença de reação inflamatória, este último está mais associado à degeneração do tendão pelo envelhecimento natural. [3]

Tendinopatias e outros distúrbios relacionados ao tendão são uma fonte de grande preocupação tanto de atletas competitivos e recreativos quanto de indivíduos em ambiente ocupacional, a incidência e a recorrência de lesão levam à morbidade e perda de produtividade, sendo um fator de importância socioeconômica [4]. Segundo Lemme *et al.* [5], de 2012 a 2016 nos EUA ocorreu um aumento significativo na incidência de rupturas no AT, de 1,8 por 100.000 pessoas-ano em 2012 para 2,5 por 100.000 pessoas-ano em 2016, com uma incidência geral de 2,1 por 100.000 pessoa-ano. No Brasil, acidentes de trabalho e doenças ocupacionais somaram 509.062 dias de trabalho perdidos em 2000, responsável por R\$ 8.492.762,00 de gastos com benefícios concedidos pelo INSS, apenas no estado da Bahia. [6]

A causa mais comum de lesão é o esforço exagerado de extensão sobre os tendões, responsável por 30% das lesões [7], podendo provocar ruptura parcial ou total do tendão e interromper a continuidade do tendão caracterizando a lesão aguda [8] com intensa e dolorosa reação inflamatória local, contribuindo para a degradação de colágeno e outras deficiências teciduais que, se não forem tratadas, podem levar ao estado crônico da doença. [9] Fatores de risco intrínsecos e extrínsecos podem contribuir para que ocorra lesões no tendão. Fatores de risco extrínsecos incluem cargas excessivas no corpo, erros de treinamento e condições ambientais. Enquanto que os fatores de risco intrínsecos incluem desalinhamentos, fraqueza muscular, baixa flexibilidade, frouxidão nas articulações, obesidade [10] entre outros [11]. No processo inflamatório crônico do tendão, ocorrem alterações no tecido que provocam a perda de funcionalidade, além de potencializar a migração do processo inflamatório para estruturas vizinhas, como ossos e cartilagens iniciando um quadro pré-artrítico. [12]

O desenvolvimento de novos tratamentos e terapias para a tendinopatia são tão importantes quanto a prevenção da doença e existe a necessidade de definir inteiramente a etiologia da patologia do tendão [13]

1.2 Anatomia básica do tendão calcâneo

Os tendões são estruturas especializadas com textura fibroelástica variando quanto a forma e a maneira com que se ligam, são cercados pelo tecido sinovial, estão interpostas entre os músculos e ossos, que permitem a transmissão de forças geradas do primeiro para o segundo, promovendo movimento articular [14]. O tendão de Aquiles começa na junção músculo-tendínea, são tipicamente esbranquiçados por ter suprimento sanguíneo variável com vasos sanguíneos originários das regiões do perímísio, periósteo e paratendão e mesotendão, com artérias que percorrem o comprimento do tendão; com uma Matriz extracelular (MEC) composta principalmente de colágeno tipo I, elastina, mucopolissacarídeo e proteoglicanos. [15]

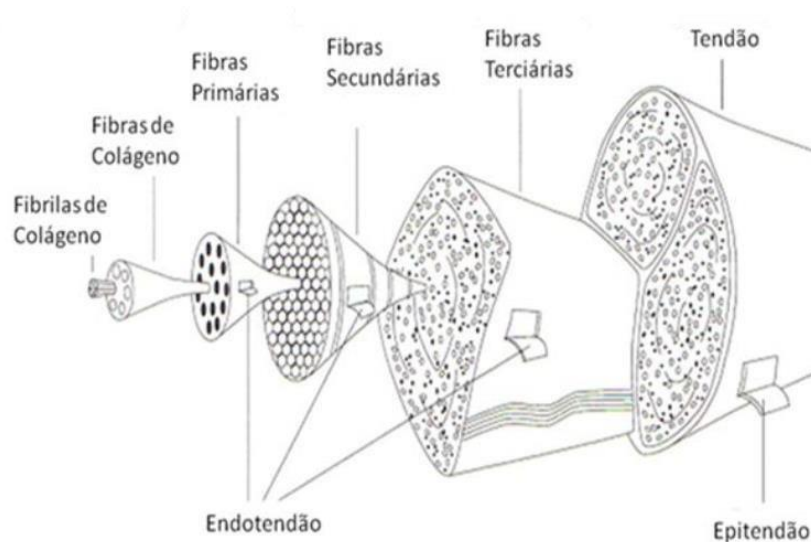


Figura 1. Estrutura anatômica básica do tendão. [16]

1.3 PROCESSO INFLAMATÓRIO

1.3.1 Processo inflamatório do tendão

A inflamação é um mecanismo biológico essencial na defesa do organismo frente à estímulos nocivos, envolvendo um conjunto de eventos que, em cascata, promovem reações locais e sistêmicas do metabolismo na tentativa de eliminar tais estímulos e reparar o tecido. [17][18]

Tendões são propensos a lesões agudas e crônicas devido a movimentos bruscos e repetitivos [19], havendo a lesão, o processo inflamatório do organismo frente ao estímulo nocivo é desencadeado, envolvendo as fases de inflamação, proliferação e remodelamento, fundamentais para que o reparo do tendão aconteça. Deste modo, diversos componentes inflamatórios são gerados provocando os cinco sinais cardinais da inflamação: dor, rubor, calor, edema e podendo provocar a perda de função, com consequente produção de moléculas, como por exemplo as Prostaglandinas (PGs), que participarão do processo inflamatório. [20]

Na inflamação, ocorrem muitos eventos importantes para o reparo tecidual, como a cascata do Ácido Araquidônico (AA) resumidamente ilustrada na figura 2, ela é iniciada com a ação da Fosfolipase A2 na membrana celular liberando AA que sofre ação de enzimas, como a COX, Lipoxigenase (LOX) e citocromo P450, levando à geração de lipídios inflamatórios bioativos ou eicosanoides, como as PGs, Tromboxanos (TXs) e Leucotrienos (LTs), além disso, determinados metabólitos derivados do AA são gerados e podem promover resposta anti-inflamatória e pró-resolutiva frente à inflamação. [21]

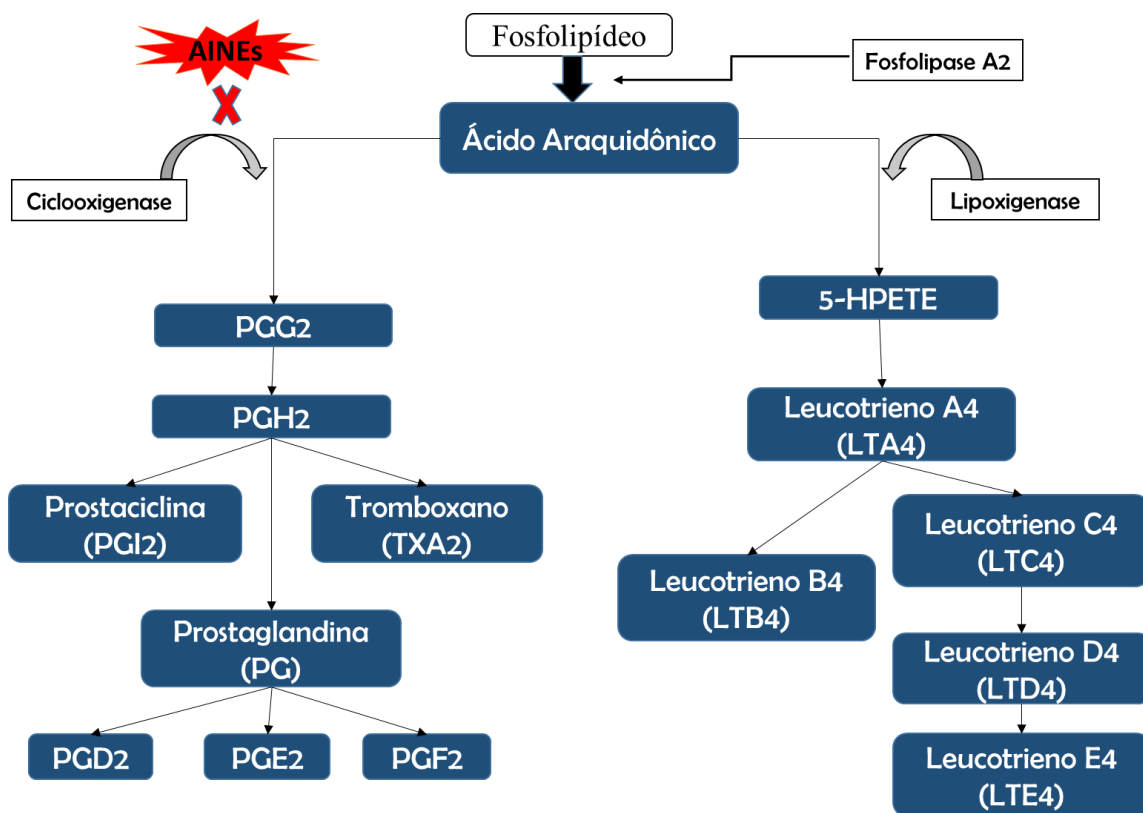


Figura 2. Via de metabolização do Ácido Araquidônico (AA). Adaptado de Harizi [119]

COX-1 é constitutivamente expressa em muitos tipos de células e está relacionada a processos fisiológicos ligados a proteção da mucosa do estômago, agregação plaquetária e função renal [22], por outro lado, a COX-2 é expressa indutivamente, ela catalisa a conversão de AA em mediadores lipídicos durante a inflamação [23]. As PGs produzidas via COX-2 amplificam e sustentam a resposta inflamatória [24], atuando nos tecidos através de receptores de superfície celular específicos acoplados à proteína G (GPCRs) desempenhando papel importante na ativação da resposta inflamatória. [25]

No reparo do tendão, a MEC fornece integridade mecânica e um modelo de tecido para orientar a remodelação, envolvendo células do epitendão e endotendão, que removem barreiras do tecido entre os compartimentos intrínsecos e extrínsecos, desencadeando um conjunto de eventos que incluem sangramento, formação de coágulos, recrutamento de células, formação de tecido de granulação e remodelação tecidual envolvendo o processo de resolução da inflamação [26]. A fase de remodelamento presente no tendão lesionado é caracterizada por uma diminuição da celularidade, redução na síntese de matriz, diminuição do colágeno tipo III e aumento da síntese de colágeno tipo I. Porém, o tecido reparado não atinge as características iniciais de um tendão, podendo ter

a funcionalidade reduzida. [27]

1.3.2 Citocinas na inflamação do tendão

As citocinas desempenham a função principal de comunicação entre as células, ligando-se à receptores específicos e promovendo respostas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias que interagem entre si, regulando componentes importantes como migração celular, as fases inflamatórias e alterações da MEC. [28] O Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α) é uma citocina produzida por diversas células, mas principalmente pelos macrófagos, sendo uma das primeiras citocinas a ser liberada pelas células após o contato com o agente agressor ou estímulo, também é capaz de induzir a síntese de outras citocinas, como Interleucina-1 (IL-1) e Interleucina-6 (IL-6) [29], também pode fazer com que os tenócitos reduzam a deposição de colágeno tipo I durante o processo de cura do tendão [30]

A IL-1 pode ser produzida por macrófagos, monócitos, fibroblastos e células endoteliais ativadas durante a lesão celular, invasão e inflamação [31], ela possui propriedades imunológicas, degradativas, promotoras do crescimento e inflamatórias [32], como por exemplo, induzir a expressão de moléculas de adesão e integrinas, promover infiltração de células polimorfonucleares (PMNs) e reparo tecidual [33]. Já IL-6 regula a expressão de componentes envolvidos na proliferação, diferenciação e sobrevivência celular, ela é capaz de induzir a produção de IL-1, TNF- α e sua expressão está aumentada em doenças inflamatórias, pode também agir durante o processo de cura do tendão induzindo a produção de colágeno no tendão. [34]

Outra citocina importante no processo inflamatório é a interleucina-10 (IL-10) pois ela é considerada imunorreguladora e, em alguns casos, anti-inflamatória[35]. Ela pode ser secretada por macrófagos, linfócitos T helper 1 (Th1) e T helper 2 (Th2), células dendríticas, células T citotóxicas, linfócitos B, monócitos e mastócitos, podendo atuar na regulação da expressão de outras citocinas como IL-1, IL-6, Interleucina-8 (IL-8), Interleucina-12 (IL-12) e TNF- α , bem como no infiltrado celular pelos PMNs. [36]

Além das citocinas, as MMPs são importantes agentes no processo de reparo e remodelamento do tendão. MMPs são enzimas com atividade proteolítica e participam da modulação da MEC do tendão, estão entre as poucas enzimas capazes de clivar fibrilas intactas. MMP1, MMP-2, MMP-8, MMP-13 e MMP-14 possuem atividade de colagenase com ação regulada pelos inibidores teciduais de metaloproteinasas (TIMPs) [37,38]. O prolongamento da atividade de MMP-1, MMP-3 e MMP-13 poderia levar a uma perda das

propriedades biomecânicas do tendão, pois estas MMPs foram associadas a alterações degenerativas observadas na tendinopatia crônica [39,40]

1.4 RESOLUÇÃO DA INFLAMAÇÃO

1.4 Mediadores especializados em Pró-resolução (SPMs)

A resolução do processo inflamatório é uma resposta altamente regulada e ativa que busca a homeostasia das estruturas locais, resolvendo a inflamação aguda, não progredindo para o estado crônico. [41] O processo de resolução da inflamação tem suas origens no início da resposta inflamatória, através de circuitos biossintéticos que promovem a produção de componentes reguladores de mediadores químicos envolvidos nas respostas inflamatória e de resolução. [42]

Os mediadores especializados em pró-resolução (SPMs) são derivados de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) ω -3 e ω -6 (como EPA, DHA e LXs) e agem de forma ativa frente a resposta inflamatória com potentes funções anti-inflamatórias, protetoras dos tecidos e estimulantes da resolução, são eles: Lipoxinas (LXs), Resolvinas (Rvs), Protectinas e Maresinas.[43] Atuando como agonistas em receptores específicos, como ALX [44], BLT1, receptor de resolvina D (DRV) e receptor de resolvina E (ERV), os SPMs podem desencadear um espectro de respostas específicas que agem sobre o processo inflamatório, causando a remoção do estímulo, a inibição do tráfego de leucócitos, o catabolismo de mediadores pró-inflamatórios, a fagocitose das células apoptóticas, depuração de PMNs e remoção de restos celulares, sem que ocorra danos adicionais por hidrolases e proteases secretadas por células inflamatórias, como os PMNs. [45][46]

Os macrófagos são importantes células envolvidas nos processos inflamatórios e de reparo, eles realizam fagocitose de células apoptóticas migram do tecido alvo para o sistema linfático, promovendo diminuição da resposta pró-inflamatória intensa e auxiliando no processo de resolução da inflamação, refletido na diminuição das concentrações de citocinas e quimiocinas responsáveis pela manutenção da inflamação. [47]

Nesse sentido, inicialmente o perfil celular e de eicosanoides presente no local inflamado é pró-inflamatório, posteriormente, esse gradiente muda para um perfil pró-resolutivo porque ocorre a troca de classe lipídica de PGs e LTs para os SPMs. [48]

1.4.1 Lipoxinas e o receptor ALX

LXs são mediadores especializados derivados do AA, especificamente, produtos de interações das Lipoxigenases (LOX), primeiramente descritos por Serhan *et al*, que são geradas, principalmente, nas mucosas e vasos sanguíneos. [49] LXs possuem funções anti-inflamatórias e pró-resolutivas em relação ao processo inflamatório, como inibir a transmigração de leucócitos PMNs [50] reduzir a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelos PMNs, inibir a proliferação de fibroblastos e MMP-3 [51], regular a ativação de Fator Nuclear-kappa B (NF-kB), e inibir a produção de alguns mediadores pró-inflamatórios. [52] Existem três vias principais (figura 3) descritas na biossíntese de LXs: a interação entre 5-LOX e 15-LOX [53], entre 5-LOX e 12-LOX [54] e por acetilação de COX-2, esta última envolvendo o uso de Aspirina (ASA) para promover a produção de Lipoxinas derivadas de Aspirina (ATLs). [55]

O receptor de lipoxina ou receptor formil peptídeo 2 (ALX/FPR2), nome dado pela alta afinidade da LX ao receptor ALX, é um receptor acoplado a proteína G e possui diversos ligantes que podem ativar a mobilização de cálcio como LXA4, ATL e RvD1 [147], além de peptídeos/proteínas derivados de bactérias e hospedeiros, peptídeos/proteínas do envelope do HIV-1 e peptídeos neurotóxicos e sintéticos [148]. A maioria dos peptídeos ligantes ao receptor ALX requerem níveis micromolares para desencadear respostas dependentes do ALX, nesse sentido, os ligantes LXA4 e ATL são os agonistas mais potentes e seletivos já descritos. [149]

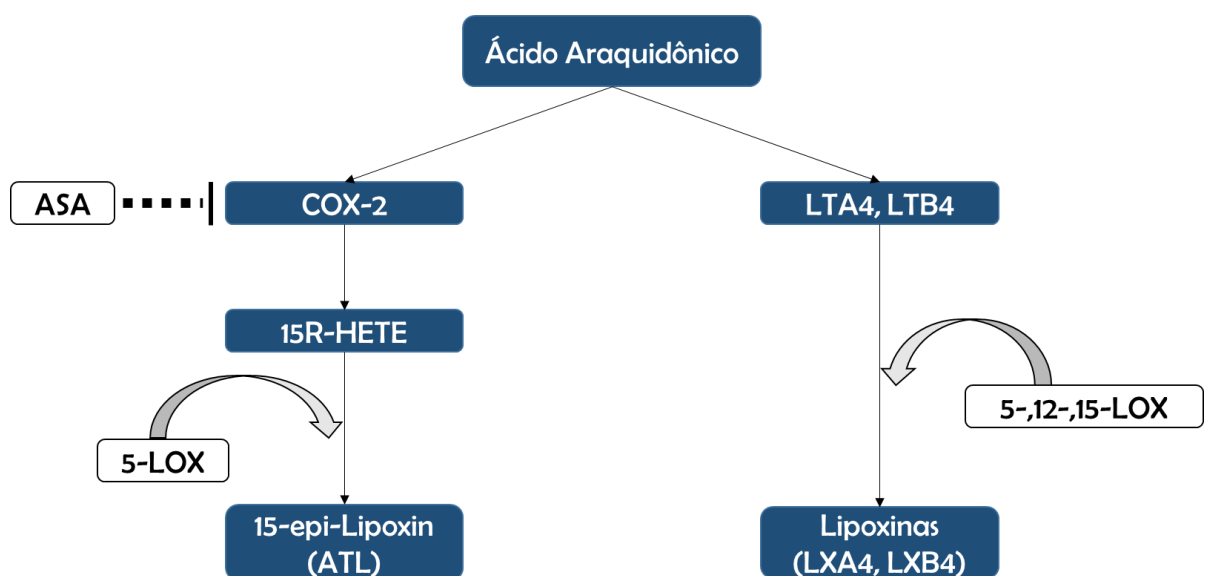


Figura 3. Produção de Lipoxinas via metabolização do Ácido Araquidônico. Adaptado de Romano57

1.4.2 Resolvinas D e E e os receptores DRV1 e ERV

Rvs são moléculas geradas a partir de PUFA do ω -3 e participam do processo da resolução da inflamação, elas são classificadas em série D (RvD1-RvD6), derivadas de DHA (Figura 3), e série E (RvE1-RvE3) geradas a partir de EPA (Figura 4). O DHA também pode ser convertido em outros compostos, como Protectina D1 (PD1) e Maresinas (MaR1). [56]

As Rvs D são mediadores que se ligam de forma agonista aos receptores de resolvina D (DRV), ou GPR32 [57], são capazes de provocar diversas funções sobre o processo de resolução como limitar a migração PMNs, regular a produção de quimiocinas pró-inflamatórias, aumentar o recrutamento não-flogístico de monócitos e a fagocitose. [58] Além dos receptores descritos acima, a RvD1 pode ligar-se ao receptor ALX, estimulando a fagocitose de macrófagos. A ASA também exerce efeito sobre as Rvs D1, já que com a utilização desse fármaco são encontradas Rvs D derivadas da acetilação da COX-2 pela ASA, além de receptores análogos estáveis. [59]

O receptor DRV1 de resolvinas D é um receptor acoplado a proteína G (também chamado receptor 32 - GPR32, ou DRV1/GPR32) e, possivelmente, tem sua ativação por variados agonistas em diversas potências que podem evocar segundos mensageiros diferentes após a ativação de DRV1, neste receptor se ligam de forma agonista as resolvinas D1, D3 e D5. [142][150]

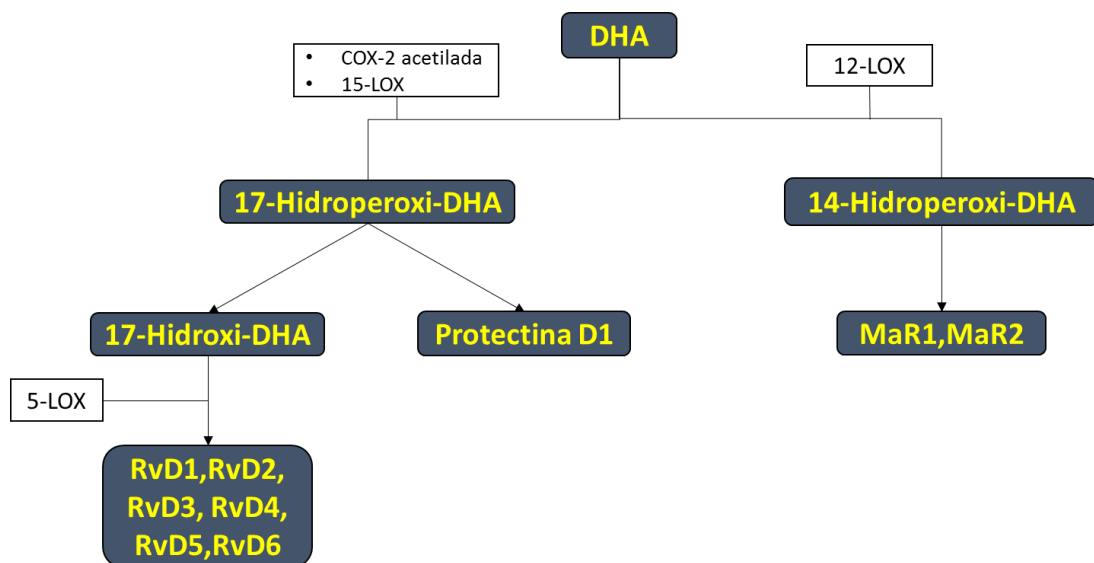


Figura 4. Via de metabolização do Ácido Docosahexaenóico (DHA). Adaptado[43]

Rvs E são uma série de mediadores que se ligam de forma agonista aos receptores de resolvina E (ERV) que, anteriormente, já foi descrito como Chem23. [60] O ERV também está relacionado aos receptores de LT, Rvs E1 e E2 ligam-se ao BLT1 e exercem função antagonista neste receptor inibindo a mobilização de cálcio e ativação de NF-kB, o que pode explicar a capacidade que estas Rvs têm de controlar o tráfego de PMN para o local inflamado [61], bem como a depuração de fagócitos e proteção contra fibrose tecidual, por outro lado, a interação das Rvs E1 estimulam a fagocitose de macrófagos por vias de sinalização de fosforilação, diminui interleucinas pró-inflamatórias, promove reparo e regeneração tecidual. Além da produção das Rvs E1 através da ação de LOX, a via COX-2 acetilada pela ASA também fornece consideráveis concentrações de Rvs E1 análogas para os tecidos. [62] Entretanto, em indivíduos saudáveis as concentrações de Rv E1 são suficientes na promoção dos efeitos biológicos de interesse sem que haja a necessidade de ingerir ASA.

O receptor ERV de resolvinas E, também chamado de receptor ChemR23 ou ChemR23/ERV, é um receptor acoplado a proteína G. Atualmente, tem sido mais relacionado ao processo de resolução da inflamação por ter como ligante resolvinas de série E, como RvE1 e RvE2, este último apresenta menor potência em relação a RvE1, sendo RvE2 agonista parcial deste receptor e indicando possivelmente sua ação pró-resolução através de outras interações *in vivo*. [142][151][152] Além disso, resolvinas E1 e E2 ligam-se também ao receptor BLT-1 de forma antagonista. BLT-1 é um receptor inicialmente descrito como receptor de leucotrienos B4 que posteriormente foram descobertos outros ligantes relacionados a este receptor. BLT-1 também é um receptor acoplado à proteína G. [153]

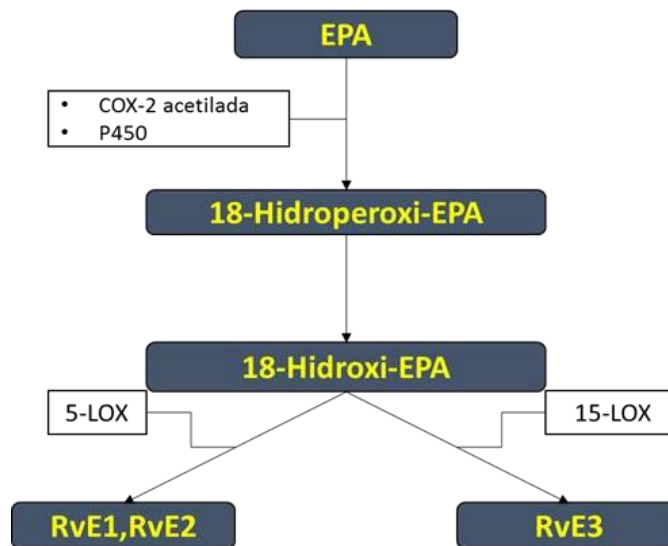


Figura 5. Via de metabolização do Ácido Eicosapentaenóico (EPA). Adaptado [43]

As protectinas também são geradas a partir do DHA, o nome evidência os efeitos anti-inflamatórios observados com ações de proteção em tecidos, inclusive nos sistemas neurais (Neuroprotectinas). As Protectinas param a infiltração de PMN e reduzem a expressão de citocinas, reduzem lesão na retina e na córnea, reduzem os danos do AVC e melhoram a cicatrização de feridas em alguns modelos experimentais. [63]

Maresinas são mediadores presentes na fase de resolução da inflamação aguda, são produzidas por macrófagos, via LOX, através de reações enzimáticas que envolvem o DHA para gerar, principalmente, Maresina 1 (MaR1) e Maresina 2 (MaR2). [64] MaR1 têm funções de limitar infiltração de PMN, aumentar a fagocitose e eferocitose dos macrófagos, encurtar o tempo de resolução, melhorar regeneração tecidual e contra-regular mediadores pró-inflamatórios. Ainda, MaR2 têm funções semelhantes à MaR1, como limitar infiltração de PMN e aumentar a fagocitose por macrófagos. [65]

1.5 TRATAMENTO DA 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 das 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. [66][67]

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. [68]

Os principais tratamentos disponibilizados incluem repouso, medicamentos anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) e injeções locais de corticosteroides [69], ou seja, em sua maioria de origem farmacológica. AINEs são amplamente utilizados, porém só parecem ser eficazes para o controle da dor presente fazendo com que os pacientes ignorem os primeiros sintomas e isso pode levar a danos adicionais do tendão e adiar a cura definitiva. [70] Métodos conservadores não atingem a eficácia mínima para resolver os sintomas em cerca de 30% dos pacientes e cirurgia pode ser necessária. [71]

1.5.1 Tratamento com Anti-inflamatórios Não Esteroidais (AINEs)

AINEs convencionais são inibidores não seletivos de ambas as isoformas, COX-1 e COX-2 [72], provocando efeitos anti-inflamatórios e de analgesia [73] através de sua ação na COX-2, enquanto sua ação na COX-1, que regula várias funções fisiológicas homeostáticas do sistema gastrointestinal e os rins, é responsável pelos possíveis efeitos colaterais [74], no caso de inibidores seletivos da COX-2 (Coxibs) alguns efeitos colaterais nos sistemas renal, gastrointestinal e de coagulação, podem ser evitados. [75] Os resultados de estudos clínicos prospectivos e de meta-análises indicam que os inibidores de COX-2 exercem um importante efeitos cardiovasculares adversos, que incluem infartos do miocárdio, acidentes vasculares cerebrais, insuficiência cardíaca, insuficiência renal e hipertensão. [76]

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. [77]

1.5.2 Diclofenaco de sódio

Como a maioria dos AINEs, o diclofenaco de sódio possui propriedades analgésicas, anti-inflamatórias e antipiréticas, sendo o AINE mais prescrito desde a sua introdução na década de 1990 [78], sua atividade envolve a inibição não seletiva da COX e uma série de mediadores inflamatórios e vias intracelulares [79], apresentando uma eficácia relevante no

alívio da dor, porém apresenta importantes efeitos adversos como: úlceras gástricas, dano gastrointestinal e complicações renais. [80]

Um estudo [81] descreve que a administração de diclofenaco de sódio em ratos com tendão lesionado, não previne a degradação do colágeno e promove perda da força tênsil no início da lesão. O uso da terapia anti-inflamatória ainda é controverso, a maioria dos estudos sugere que o tratamento anti-inflamatório tem apenas efeitos benéficos em curto prazo, mas a longo prazo podem ser prejudiciais. [82]

Vários métodos de tratamento para lesões do tendão já foram testados, porém seus resultados e sua eficácia ficam distantes das características do tendão original.[83] 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, assume papel de destaque na área médica e, neste cenário, a laserterapia tem despontado como uma das promessas na clínica médica.

1.5.3 Terapia por fotobiomodulação (PBM)

A luz é definida como uma onda eletromagnética. A PBM pode ser definida como o uso da luz como agente modulador de diversos efeitos, inibitórios ou estimulatórios de acordo com os parâmetros adotados, agindo nas diferentes estruturas biológicas do organismo. Vários mecanismos já foram sugeridos para explicar a ação do laser e seus efeitos, como o aumento do metabolismo energético e síntese de ATP; estimulação das defesas contra o estresse oxidativo; prevenção e reparação de danos musculares; modulação da expressão gênica por ativação de fatores de transcrição; possível aumento na excitabilidade dos tecidos; entre outros. [84] A Fotobiomodulação incide sobre as reações não térmicas da luz com o tecido, gerando efeitos fotoquímicos, bioestimulantes, anti-inflamatório, anti-edematoso, álgico dentre outros benefícios.

O LASER (amplificação da luz por emissão estimulada de radiação) produz radiação eletromagnética considerada monocromática, coerente e colimada, diferentemente do LED (Diodo Emissor de Luz). A LLLT tem sido utilizada no tratamento de danos nos tecidos e processos inflamatórios desde os anos 60, mas foi na década de 1980 que os primeiros relatórios de seus efeitos benéficos sobre lesões de tendão e outros transtornos de sobrecarga desencadeados por atividade foram publicados. [85] Durante a última década,

a atenção foi focada nos efeitos da LLLT em uma variedade de condições patológicas, incluindo feridas, complicações musculoesqueléticas e dor. [86]

Atualmente, existe uma série de estudos descrevendo diversos efeitos do LLLT sobre o processo inflamatório e suas fases. Alguns trabalhos mostraram um aumento significativo na proliferação fibroblástica e diminuição do infiltrado inflamatório [87], o aumento na produção de colágeno, redução de estresse oxidativo e de fibrose, redução da dor e melhora funcional. [88] [89], liberação de fatores de crescimento e síntese de colágeno [90], entre outros. [91] [92] A LLLT apresenta efeitos semelhantes aos AINEs, porém com ação de modular alguns agentes pró-inflamatórios, como COX-2 [93], e anti-inflamatórios, como IL-10. Trabalhos recentes mostraram um potencial efeito reparador do laser na reorganização das fibras de colágeno[94] e a utilização do laser associado com ultrassom no tratamento deste tipo de lesão. [95]

Os tendões de Aquiles lesionados exibem um processo de reparo lento, e essa característica está diretamente associada a atividade de IL-1 β , COX-2 e PGE2. LLLT pode modular esse processo e, conseqüentemente, potencializar o processo de reparo tecidual. [96] Além do uso do laser, outras fontes de luz são utilizadas, como o LED (Diodo Emissor de Luz). Um estudo aplicando LED sobre lesão tendínea encontrou uma redução no número de fibroblastos na fase inicial da lesão e a melhora na qualidade do reparo tecidual durante a fase de regeneração do tendão. [97]

O uso de lasers 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. [98] [99]

A Fotobiomodulação por ser uma terapia não invasiva está em evidência em muitos estudos devido a modulação de diversos componentes pró-inflamatórios e no reparo tecidual, no entanto não existem estudos publicados descrevendo o efeito do LLLT (Terapia com Laser de Baixa Intensidade) sobre o processo de resolução da inflamação em modelo de tendinite.

Em virtude dos dados apresentados anteriormente, a importância da utilização de terapias não medicamentosas representa um fator altamente relevante para o Sistema de Saúde, especialmente em nosso país.

2 – OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da terapia por fotobiomodulação e a associação com o diclofenaco de sódio utilizando laser de baixa intensidade na resolução do processo inflamatório utilizando o modelo de tendinite induzida por colagenase em tendões calcâneos de ratos.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar a terapia por fotobiomodulação isolada ou a associada com terapia farmacológica:

- Efeito sobre o infiltrado inflamatório em tecido tendíneo;
- Atividade da enzima Mieloperoxidase;
- Expressão de receptores relacionados ao processo de resolução da inflamação (ALX, DRV1, ERV) e de receptor pró-inflamatório (BLT1).

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Animais

Foram utilizados 20 ratos Wistar machos pesando entre 450 e 500g (+/- 90 dias de vida), 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 já possui a aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Nove de Julho.

3.2- Indução da Inflamação em Tendão Calcâneo de Ratos

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cloridrato de Cetamina (90mg/Kg) e cloridrato de Xilazina (10mg/Kg). Em seguida, os animais do grupo controle, receberam 100 µl de injeção transcutânea de colagenase na região posterior de ambas as patas (direita e esquerda), no tendão calcâneo. Os animais dos demais grupos receberam 100 µl de injeção transcutânea de colagenase (1 mg/ml; Sigma Chemical Co, Cat. C-6885) na mesma região do tendão calcâneo direito e esquerdo. A seguir, os animais retornaram para as caixas de contenção separados em 4 diferentes grupos experimentais. Após 2 horas da indução da tendinite e depois dos tratamentos propostos, os animais foram eutanasiados com hiperdose da mesma associação de anestésicos (cloridrato de cetamina 270mg/Kg e cloridrato de Xilazina 30mg/Kg). O tecido tendíneo foi dissecado, removido e armazenado para posteriores análises.

3.3- Grupos Experimentais

Os animais foram distribuídos em 4 grupos com 5 animais cada, conforme Figura 6.

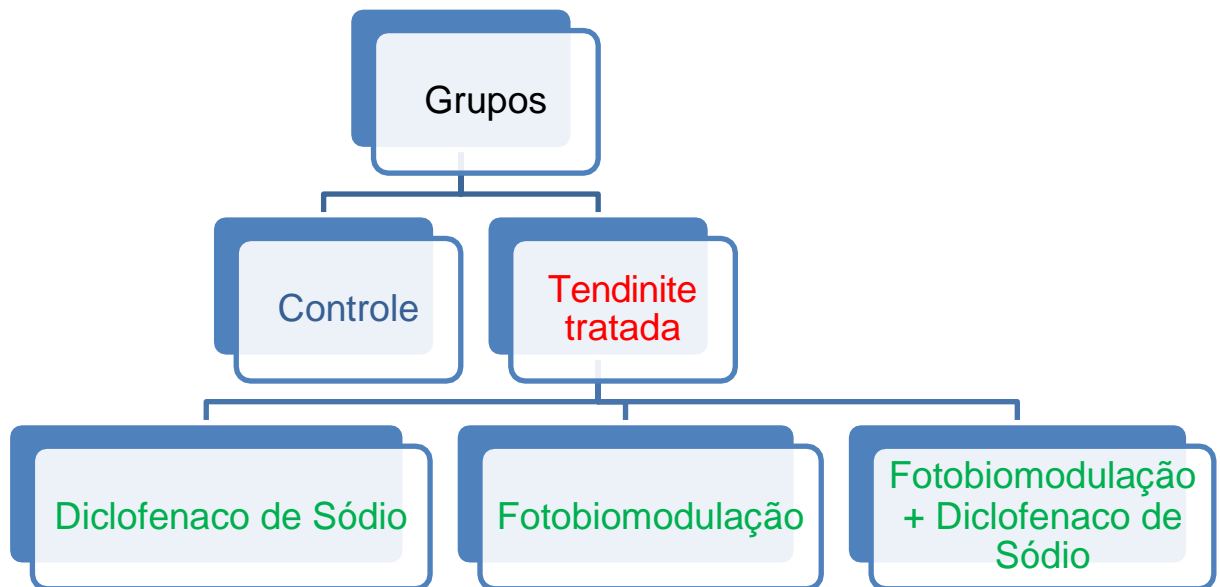


Figura 6. Delineamento experimental.

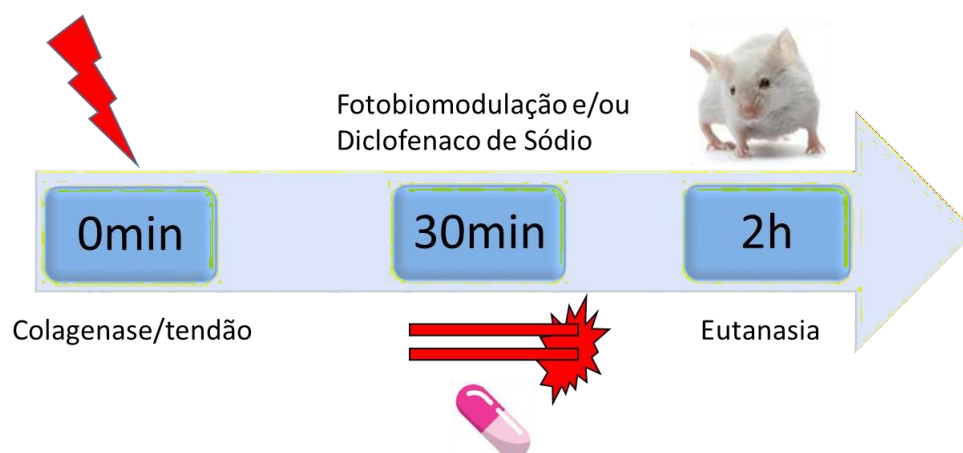


Figura 7. Linha temporal de indução, tratamento e eutanásia em modelo experimental.

- **Controle (CTL):** Injeção de 100µl de colagenase sobre o tendão calcâneo, não tratado;
- **Diclofenaco de Sódio (DIC):** Após 30 min da indução da tendinite, os animais receberam tratamento único com Diclofenaco de Sódio (IM) (1mg/kg I.M.);
- **Fotobiomodulação (PBM):** Após 30 minutos da indução da tendinite os animais

receberam tratamento com laser de baixa intensidade nos seguintes parâmetros (810nm; 30mW; 3J);

- **Fotobiomodulação + Diclofenaco de Sódio (PBM+DIC):** Após 30 minutos da indução da tendinite, os animais foram tratados com Laser de baixa intensidade, nos parâmetros descritos anteriormente. Em seguida, receberam o tratamento com injeção de diclofenaco de sódio na região peritendínea.

3.4- Aplicação da Terapia por Fotobiomodulação

Após serem submetidos ao modelo de inflamação pela injeção de colagenase, os animais do grupo Diclofenaco foram tratados com diclofenaco de sódio após 30 minutos da indução; L3J e Diclofenaco+3J foram acondicionados no contêntor e irradiados durante 30 segundos após a indução da lesão, com laser de baixa intensidade nos parâmetros indicados na Tabela 1, num único ponto e por contato.

Tabela 1: Parâmetros usados de irradiação com laser de baixa intensidade.

Grupo	Comprimento de onda (nm)	Potência (mW)	Diâmetro do feixe (cm ²)	Densidade de potência (W/cm ²)	Energia (J)	Densidade de Energia (J/cm ²)	Tempo por ponto(s)
PBMT	810	30	0.028	1.07	3	107.14	100
PBMT+DIC	810	30	0.028	1.07	3	107.14	100

3.5- Coloração por Hematoxilina-eosina

Após 2h da indução da lesão, os animais foram eutanasiados com hiperdose de anestésico (Cloridrato de Xilasina e Quetamina). Em seguida os tendões foram dissecados e parte das amostras passaram por preparações histológicas padrão, começando pela fixação do tecido em formol (10%) durante 24h. Logo após os tendões foram lavados em água corrente e então desidratados em soluções crescentes de álcool etílico (70%, 80%, 90% e 100%), 1h em cada solução. Em seguida os tendões foram diafanizados em solução de álcool/xilol 1:1 por 1h, em seguida passaram por 2 banhos de xilol puro, 1h cada. Os tendões foram retirados do xilol e colocados imediatamente em parafina líquida (60°C), dentro de uma estufa, por 2h. Posteriormente, os blocos foram confeccionados para obtenção dos cortes histológicos. Os tendões inclusos nos blocos de parafina foram cortados longitudinalmente em cortes na espessura de 5µm e transferidos para lâminas histológicas onde foram desparafinizados e hidratados. As lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina. A região peritendínea e do tendão propriamente dito foram

analisadas e observada a presença de infiltrado inflamatório e organização do tecido tendíneo. A aquisição das imagens foi realizada utilizando microscópio óptico Olympus (BX serie) e câmera fotográfica Olympus QColor 3 acoplada ao microscópio, com objetivas de 20X e 40X, com uma lente ocular de 10X. A análise das imagens foi feita de modo observacional.

3.6 – Picrosirius Red

Após a retirada dos tendões, iniciamos o protocolo de coloração: A) os tendões foram hidratados em água, em seguida, aplicamos a solução vermelha Sirius por 1h; B) Remover o excesso de corante lavando duas vezes em água (2-3 minutos). C) Desidratar as lâminas em álcool etanol 70%, 90%, 95% e 100% (2-3 minutos cada). D) Enxaguar as lâminas em um segundo etanol 100%. Imergir em duas soluções de xileno sucessivas. E) Montar a lâmina com lamínula e observar ao microscópio com polarização [101][102]. Nesse trabalho, as fibras foram analisadas usando um microscópio óptico Nikon Eclipse E2000 com objetivas de 20X e 40X, com uma lente ocular de 10X. O microscópio possui um filtro de luz polarizado para observar os tecidos corados com Picrosirius Red. A captação das fotos foi feita com uma câmera fotográfica Opton (1.3 MP) e o processamento foi feito através do software ISCapture (Versão 4.1.3). A análise e quantificação do colágeno foram feitas através do software Image Pro Plus (versão 4.5).

3.7– Análises de expressão gênica por RT-PCR

Os tendões removidos foram imediatamente armazenados à -80 °C para análise da expressão gênica das citocinas indicadas na tabela abaixo, pela reação em cadeia da polimerase reversa (PCR) em tempo real. O RNA total das amostras foi extraído com o reagente Trizol[®] Reagent (Invitrogen, EUA), de acordo com instruções do fabricante. Após o processo de homogeneização e tratamento das amostras com enzimas, primers e oligo dT, o RNA foi extraído e armazenado. A partir da obtenção, foi preparada uma solução com concentração final de 2µg de RNA (cDNA). A análise das amostras em tempo real obedeceu um ciclo de desnaturação inicial (10min à 95 °C) e quarenta ciclos de amplificação (30 seg de desnaturação à 95 °C e 1 min de anelamento e extensão à 60 °C).

Para cada processo de ciclagem (corrida) foram utilizados um gene de padrão endógeno (HPRT) e os genes de interesse sintetizados a partir das seguintes sequências: ALX/FPRA2, ERV/Chem23, DRV1/GPR32 e BLT1. (Tabela 2)

A interpretação dos resultados foi estabelecida a partir da relação: *expressão do*

gene interesse x expressão do gene *HPRT* (controle interno).

Tabela 1. Lista de primers dos receptores ALX, ERV, DRV1 e BLT1.

Receptor	Sequência do primer 5' → 3'
B-actina	Forward: AAGATTTGGCACCACACTTTCTACA Reverse: CGGTGAGCAGCACAGGGT
Chem23	Forward: ACCGTGTGGTTTGTCAACCT Reverse: CCGAACACCCAGTGGTAGTC
DRV1	Forward: TCGTCGGCAGAGATTTCCAG Reverse: CCACCCTCTGTCGAGGTACT
BLT1	Forward: GTCCTTGTGTACCGCACAGT Reverse: AAGACTTTATGCCCGTCGCT
ALX/FPR2	Forward: GGGGTAACACTGCTGAAGAACTA Reverse: AAGCCACAACACTGCTGTAAGGA

3.8 – Análise da atividade de Mieloperoxidase (MPO)

O método da medida de MPO baseia-se na velocidade de oxidação do substrato *o*-dianisidina na presença de água oxigenada, que é evidenciada pela mudança de absorvância medida por espectrofotometria a 460 nm.

Após os animais serem sacrificados, a pele da região do tendão foi retirada e o tendão calcâneo cuidadosamente dissecado e transferido para tubos com adição com igual volume de brometo de hexadeciltrimetilamônia (HTAB, Sigma Chem. Co., EUA) seguido de homogeneização com centrifuga em tubos contendo esferas homogeneizadoras. Em seguida, os tubos foram aquecidos durante 2h à 60°C em estufa, para inativação da atividade endógena de Catalase, e então centrifugados a 16.000rpm durante 10 min. Vinte microlitros do sobrenadante pipetados (em duplicata) em microplaca de 96 poços e acrescidos com 180 µL de uma solução de tampão fosfato de potássio (pH=6) contendo 0,164 mg/mL de dihidrocloro de *o*-dianisidina (Sigma Chemical Co., EUA) e 0,0005% de peróxido de hidrogênio (Merck, Alemanha). A mudança de absorvância a 460 nm foi medida em um leitor de microplacas (Espectra Max plus 384, EUA) durante 2 min., e a atividade de MPO calculada a partir da velocidade máxima da reação por segundo. O resultado é expresso em Unidade de MPO / tendão, sendo que uma unidade de MPO é definida como a quantidade em µmol de H₂O₂ degradado por minuto. [103]

3.9 - Análise Estatística

Os dados foram descritos em valores médios com os respectivos desvios padrão. As análises estatísticas foram feitas através do GraphPad Prism (Versão 8.0.1). Para os dados foi utilizado o teste de One-way ANOVA com post-hoc utilizando teste de Turkey e avaliado intervalo de confiança de 10%. O nível de significância estatístico foi para $p < 0,05$.

4 – RESULTADOS

4.1 Avaliação dos cortes histológicos

4.1.1 Avaliação do infiltrado inflamatório no tendão propriamente dito

O painel 1 mostra imagens de cortes histológicos, obtidos após 2 horas da indução de tendinite em modelo experimental. O infiltrado inflamatório dos grupos com indução de tendinite e tratados foi reduzido quando comparado ao grupo controle (A). O grupo tratado com diclofenaco de sódio (B) apresentou discreta redução do infiltrado inflamatório quando comparado ao grupo tratado somente com laser (C). O grupo tendinite induzida irradiado e tratado com diclofenaco de sódio (PBM+DIC) apresentou a maior redução do infiltrado inflamatório quando comparado aos demais grupos.

PAINEL 1

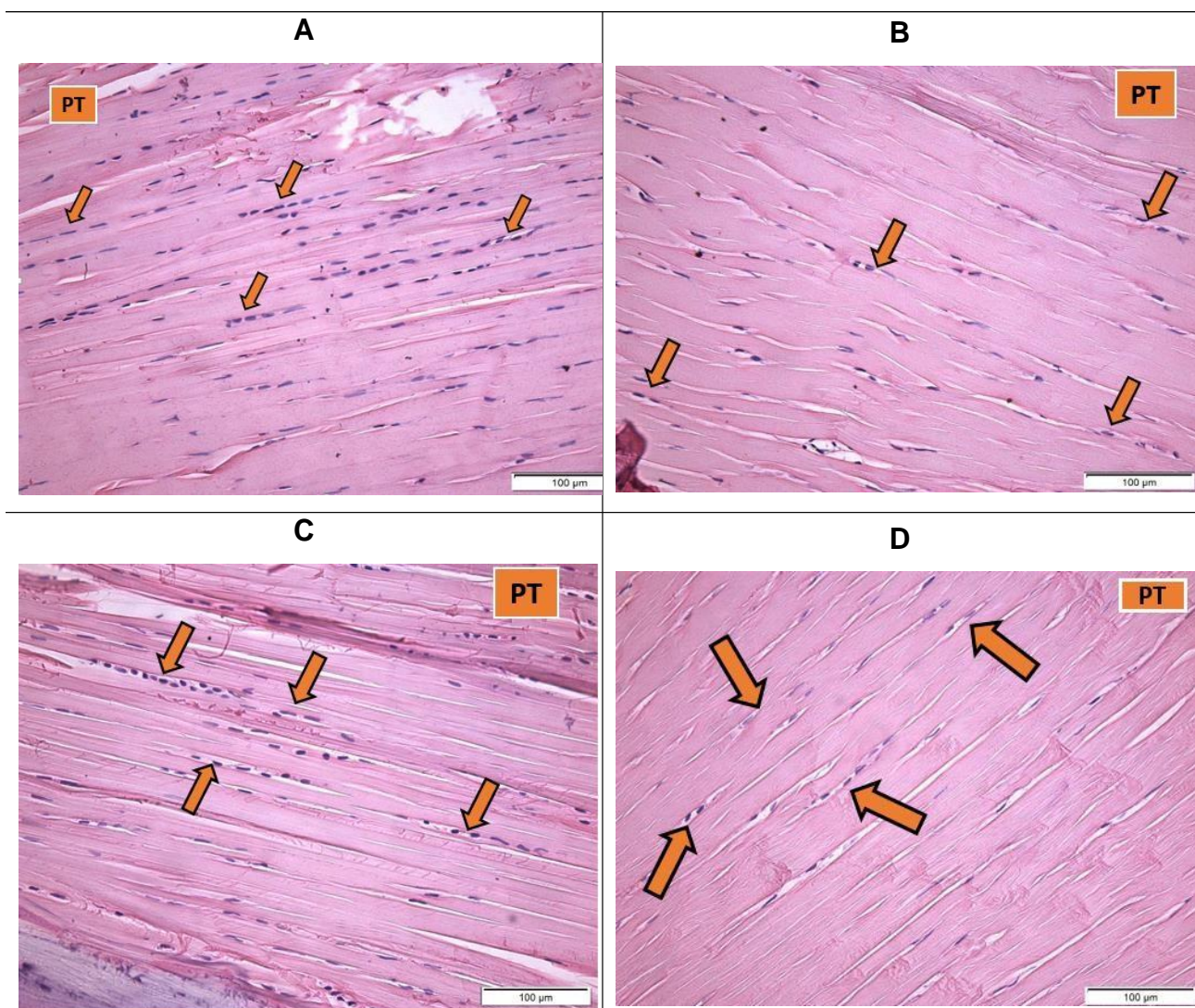


Figura 8. Imagens microscópicas de cortes histológicos do tendão de Aquiles de ratos Wistar 2 horas após indução da tendinite. Coloração Hematoxilina-eosina. As setas em laranja indicam a localização de células do infiltrado inflamatório. (A) Grupo controle. (B) Grupo tendinite induzida tratado com diclofenaco de sódio. (C) Grupo tendinite induzida tratado com laser (810nm;3j;30mW). (D) Grupo tendinite induzida

tratado com a associação de laser (810nm;3j;30mW) e diclofenaco de sódio. PT= tendão propriamente dito. Imagens obtidas em aumento de 20X, com lente ocular de 10X.

4.1.2 Avaliação do infiltrado inflamatório na região periférica ao tendão

No painel 2 são observadas imagens de cortes histológicos, obtidos após 2 horas da indução de tendinite em modelo experimental.

O grupo controle (A) apresentou aumento do infiltrado inflamatório na região periférica ao tendão quando comparado aos grupos irradiados PBM e PBM+DIC (B). O grupo PBM (C) apresentou discreta redução do infiltrado inflamatório na região periférica ao tendão quando comparado ao grupo tratado com diclofenaco de sódio (B). O grupo tendinite induzida irradiado e tratado com diclofenaco de sódio (D) apresentou redução do infiltrado inflamatório na região periférica ao tendão quando comparados aos demais grupo.

PAINEL 2

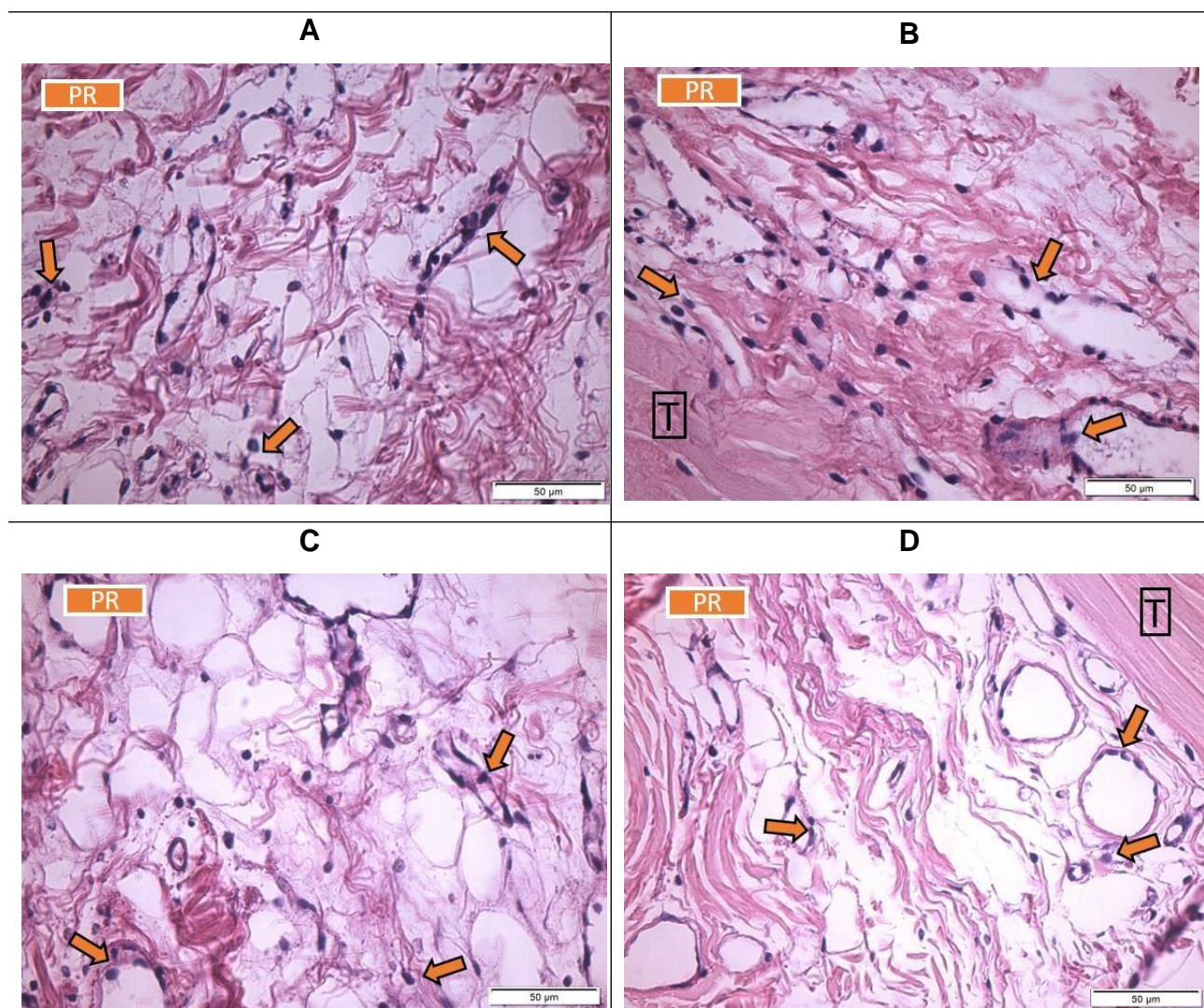


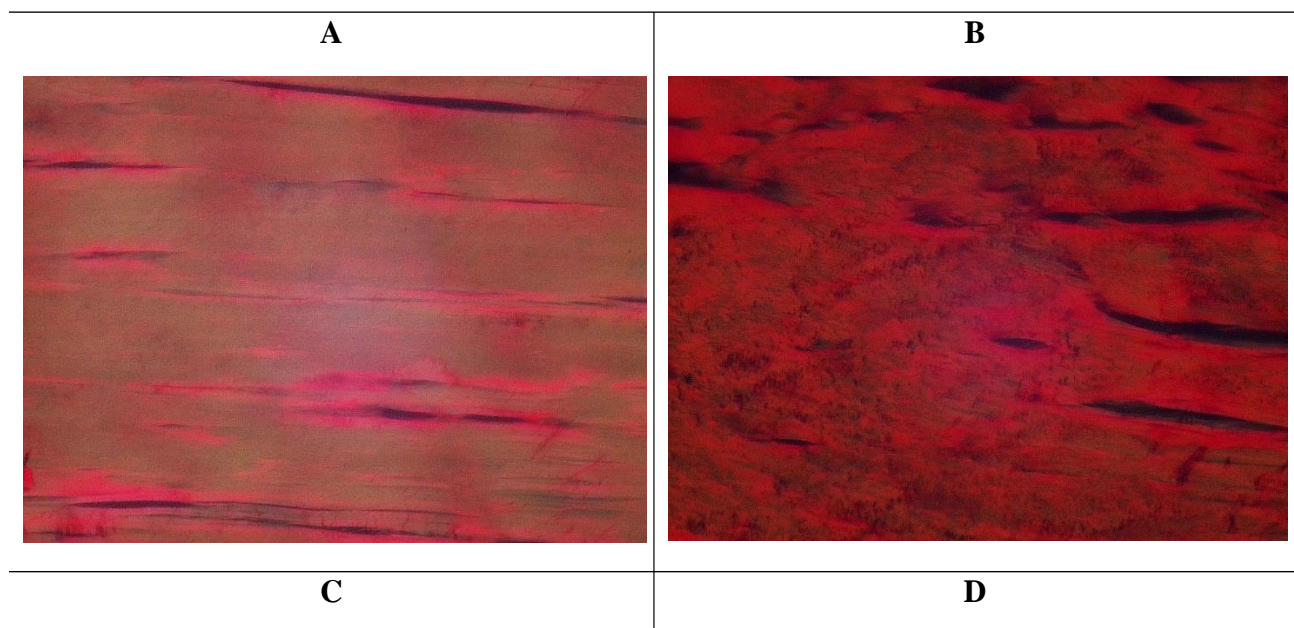
Figura 9. Imagens microscópicas da região periférica ao tendão de Aquiles de ratos Wistar 2 horas após indução da tendinite. Coloração Hematoxilina-eosina. As setas em laranja indicam a localização de células

do infiltrado inflamatório. **(A)** Grupo controle. **(B)** Grupo tendinite induzida tratado com diclofenaco de sódio. **(C)** Grupo tendinite induzida tratado com laser (810nm;3j;30mW). **(D)** Grupo tendinite induzida tratado com a associação de laser (810nm;3j;30mW) e diclofenaco de sódio. PR = região periférica; T=tendão. Imagens obtidas em aumento de 20X, com lente ocular de 10X.

4.1.3 Avaliação de colágeno tipo I e tipo III com coloração por Picrosirius Red

O painel 3 mostra as imagens representativas de cortes histológicos de tendões calcâneos de ratos Wistar, 2 horas após a indução da tendinite. As análises histológicas com Picrosirius Red possibilitam uma análise qualitativa das fibras de colágeno do tipo I e III presentes no tecido conjuntivo, através da interpretação das amostras coradas [145, 146]. Podemos observar que o grupo CTL (A) apresentou redução da área com coloração rosa, quando comparado ao grupo com terapia associada (D). O grupo diclofenaco (B) e fotobiomodulação (C) também apresentou menor coloração rosa quando comparado ao grupo com terapia associada (D). O grupo DIC (B) apresentou menor organização das fibras tendíneas. Já os grupos PBM (C) e PBM+DIC (D) apresentaram fibras tendíneas mais organizadas.

PAINEL 3



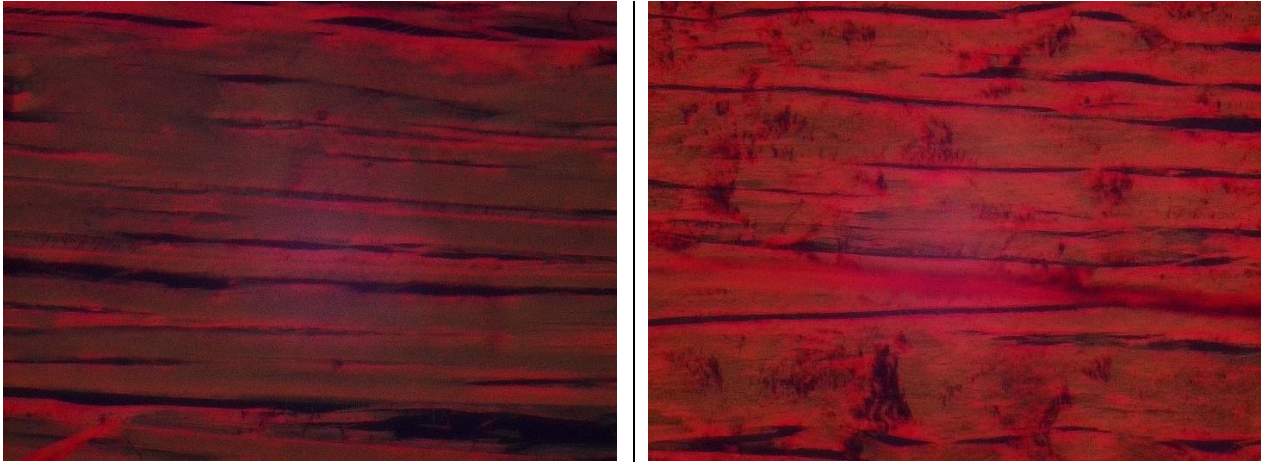


Figura 10. Imagens microscópicas do tendão de Aquiles de ratos Wistar 2 horas após indução da tendinite. Coloração Picrosirius Red. Fibras de colágeno tipo I apresentam-se na cor vermelha e fibras de colágeno tipo III na cor esverdeado. **(A)** Grupo controle. **(B)** Grupo tendinite induzida tratado com diclofenaco de sódio. **(C)** Grupo tendinite induzida tratado com laser (810nm;3j;30mW). **(D)** Grupo tendinite induzida tratado com a associação de laser (810nm;3j;30mW) e diclofenaco de sódio. Imagens obtidas em aumento de 20X e 40X, com lente ocular de 10X.

4.2 Atividade da Mieloperoxidase (MPO) na tendinite após tratamento com Diclofenaco de Sódio, Laser e associação Laser com Diclofenaco de Sódio.

A figura 11 mostra a atividade da enzima Mieloperoxidase em tendões de ratos 2 horas após a indução da tendinite. Ambos os grupos PBM ($2,52 \pm 2,3$) e PBM+DIC ($2,81 \pm 0,6$) apresentaram redução significativa da atividade de MPO quando comparados ao grupo DIC ($14,95 \pm 6,16$) e ao CTL ($25,2 \pm 1,95$). O grupo DIC apresentou redução da atividade de MPO quando comparado ao grupo CTL.

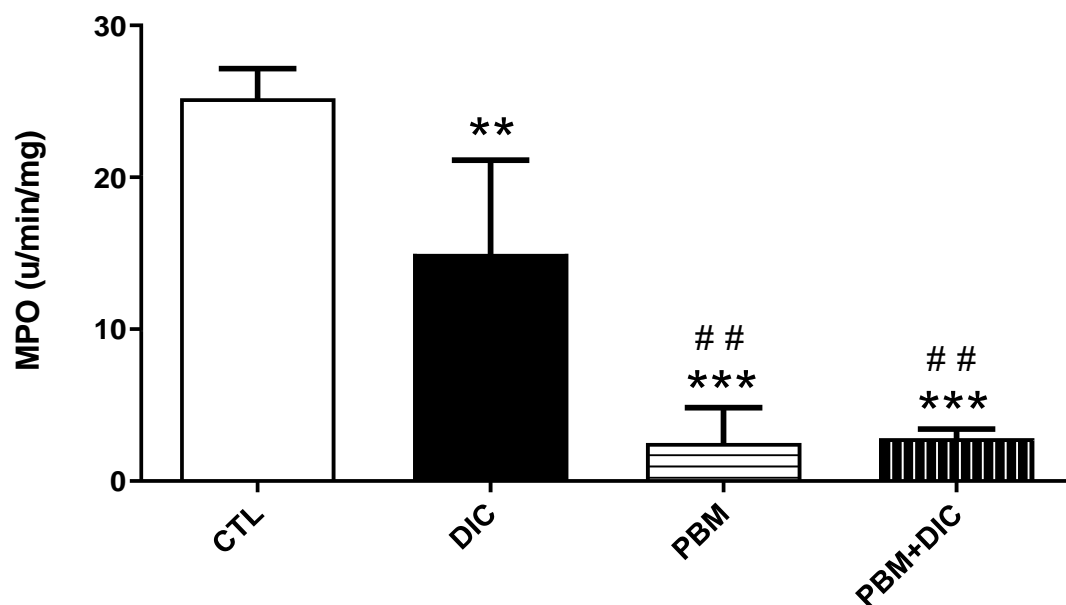


Figura 11. Gráfico da atividade da enzima Mieloperoxidase no tecido tendíneo 2 horas após a indução do processo inflamatório. Grupos: controle (CTL), tendinite tratada com diclofenaco de sódio (DIC), tendinite tratada com laser (PBM) e tendinite tratada com associação de laser e diclofenaco de sódio (PBM+DIC). Os valores estão representados pela média + DVM. N = 5 animais/grupo. **p<0,01 e ***p<0,001 Vs CTL; ##p<0,01 Vs DIC.

4.3 Expressão gênica do receptor DRV1/GPR32 de resolvinas D1, D3 e D5

A figura 12 mostra a expressão gênica do receptor DRV1, 2 horas após a indução de tendinite. O grupo tendinite induzida tratado com diclofenaco apresentou aumento na expressão do receptor DRV1 ($2,92 \pm 0,36$) quando comparado ao grupo controle. Nos demais grupos não houveram diferenças estatísticas significativas.

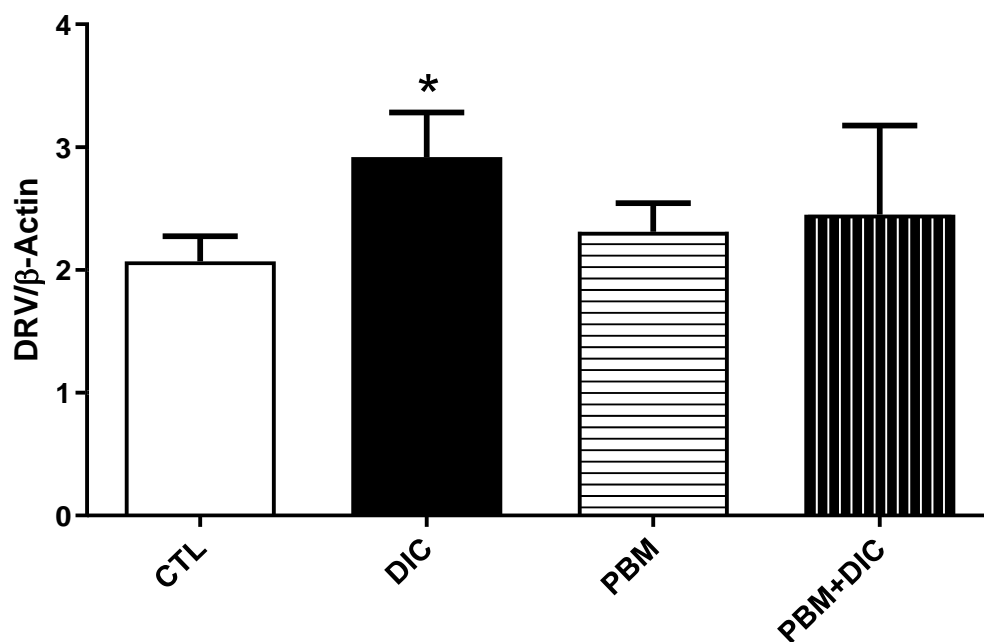


Figura 12. Expressão gênica do receptor DRV1 de resolvinas D1, D3 e D5, 2 horas após a indução de tendinite. Grupos: controle (CTL), tendinite tratada com diclofenaco de sódio (DIC), tendinite tratada com laser (PBM) e tendinite tratada com associação de laser e diclofenaco de sódio (PBM+DIC). Os valores estão representados pela média + DVM. N = 5 animais/grupo. * $p < 0,05$ Vs. CTL

4.4 Expressão do receptor ChemR23/ERV de resolvinas E1 e E2

A figura 13 mostra a expressão do receptor ERV, 2 horas após a indução de tendinite. O grupo tendinite induzida irradiado (PBM) apresentou aumento na expressão do receptor ERV ($1,21 \pm 0,17$) quando comparado ao grupo controle.

O grupo tendinite tratado com laser e diclofenaco (PBM+DIC) também apresentou aumento na expressão do receptor ERV ($2,36 \pm 0,20$) quando comparado ao grupo controle. O mesmo grupo (PBM+DIC) apresentou, também, diferença significativa quando comparado ao grupo tendinite tratado com diclofenaco de sódio ($0,89 \pm 0,11$). O grupo tendinite induzida tratado com diclofenaco de sódio (DIC) não apresentou diferença estatística significativa quando comparado aos grupos controle e tendinite tratado irradiado (PBM).

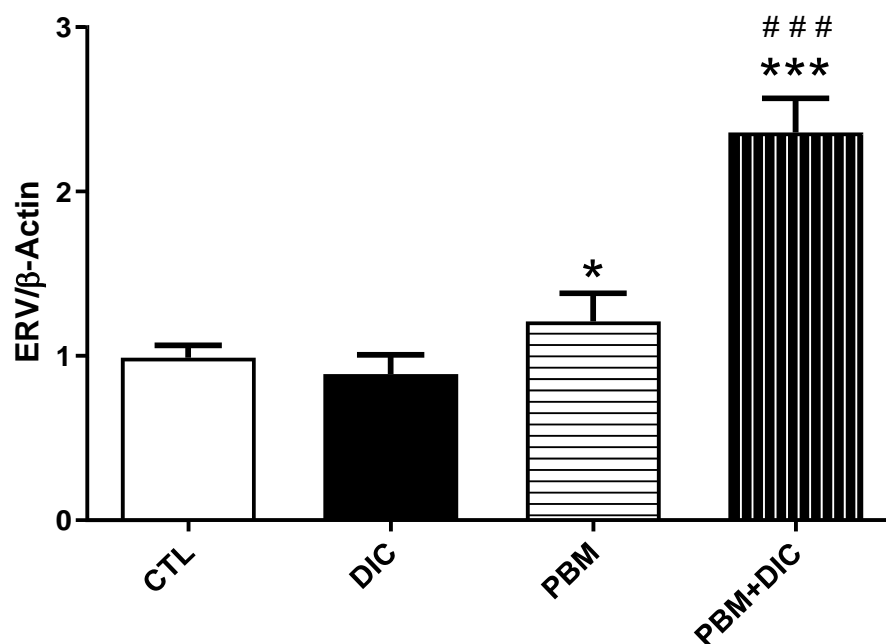


Figura 13. Expressão gênica do receptor ERV de resolvinas E1 e E2, 2 horas após a indução de tendinite. Grupos: controle (CTL), tendinite tratada com diclofenaco de sódio (DIC), tendinite tratada com laser (PBM) e tendinite tratada com associação de laser e diclofenaco de sódio (PBM+DIC). Os valores estão representados pela média + DVM. N = 5 animais/grupo. * $p < 0,01$ Vs. CTL; *** $p < 0,0001$ Vs. CTL; ### $p < 0,0001$ Vs. DIC.

4.5 Expressão gênica do receptor BLT1

A figura 14 mostra a expressão gênica do receptor BLT1, 2 horas após a indução de tendinite. O grupo tendinite irradiado (PBM) apresentou redução da expressão gênica do receptor BLT1 ($1.09 \pm 0,32$) quando comparado ao grupo tendinite tratado com diclofenaco (DIC). O grupo tendinite irradiado e tratado com diclofenaco (PBM+DIC) também apresentou redução significativa ($0,91 \pm 0,13$) quando comparado ao grupo DIC.

O grupo DIC apresentou aumento significativo ($1,66 \pm 0,38$) da expressão gênica do receptor BLT1 quando comparado ao grupo controle (CTL).

Não houveram diferenças estatísticas significativas da expressão do receptor BLT1 nos grupos irradiados, PBM e PBM+DIC, quando comparados ao grupo CTL.

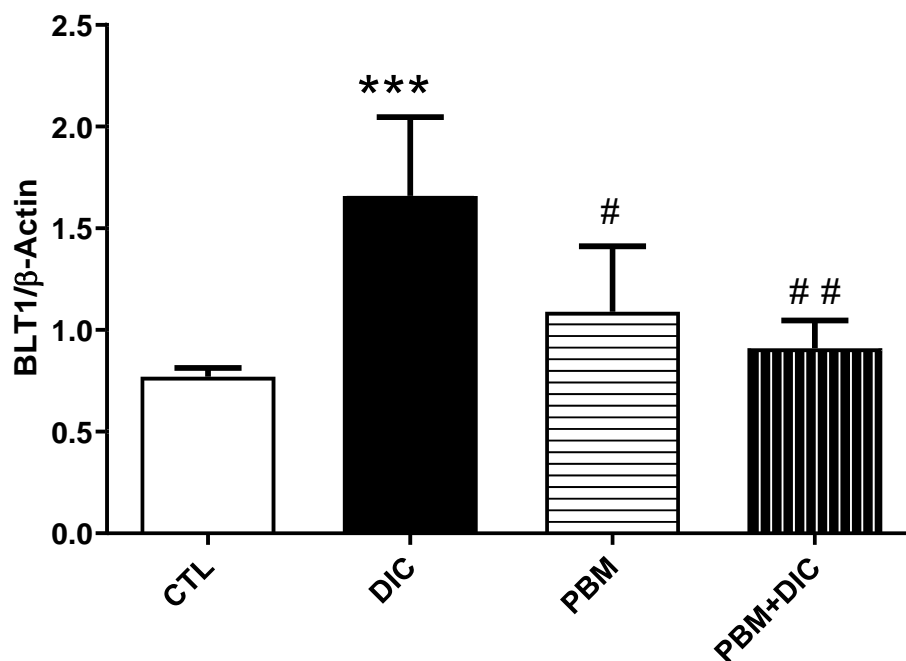


Figura 14. Expressão gênica do receptor BLT1 de leucotrienos, 2 horas após a indução de tendinite. Grupos: controle (CTL), tendinite tratada com diclofenaco de sódio (DIC), tendinite tratada com laser (PBM) e tendinite tratada com associação de laser e diclofenaco de sódio (PBM+DIC). Os valores estão representados pela média + DVM. N = 5 animais/grupo. *** $p < 0,05$ Vs. CTL; # $p < 0,05$ Vs. DIC; ## $p < 0,05$ Vs. DIC.

4.6 Expressão gênica do receptor ALX/FPR2 de Lipoxinas A4

A figura 15 mostra a expressão gênica do receptor ALX/FPR2, 2 horas após a indução de tendinite. Ambos os grupos irradiados PBM ($2,27 \pm 0,27$) e PBM+DIC ($1,87 \pm 0,23$) quando comparados ao grupo controle (CTL).

O grupo tendinite tratado com diclofenaco de sódio (DIC) não apresentou diferenças estatísticas significativas da expressão do receptor ALX quando comparado ao grupo CTL.

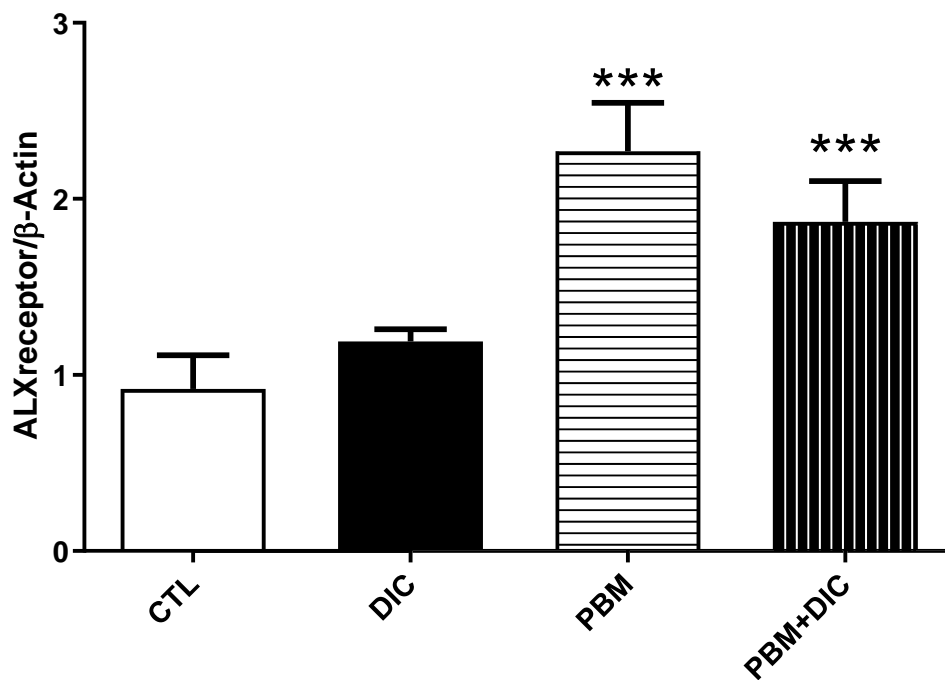


Figura 15. Expressão gênica do receptor ALX de Lipoxinas A4, além de resolvinas D1, 2 horas após a indução de tendinite. Grupos: controle (CTL), tendinite tratada com diclofenaco de sódio (DIC), tendinite tratada com laser (PBM) e tendinite tratada com associação de laser e diclofenaco de sódio (PBM+DIC). Os valores estão representados pela média + D.V.M. N = 5 animais/grupo. *** $p < 0,0001$ Vs. CTL.

5 - DISCUSSÃO

Neste trabalho foi observado que o laser de baixa intensidade associado com o uso de diclofenaco de sódio interferiu na expressão de importantes receptores relacionados ao processo de resolução da inflamação, como o aumento de receptores de lipoxina A4 e resolvina E1 e E2 e reduziu a atividade de MPO no tecido tendíneo e reduziu expressão de BLT1, com redução do infiltrado inflamatório e proteção tecidual pela redução na degradação de colágeno tipo I.

O tratamento com diclofenaco de sódio também reduziu o infiltrado inflamatório tanto da região peritendínea quanto no tendão propriamente dito com redução da atividade de MPO. Contudo foi observado redução de colágeno tipo I, sugerindo baixo efeito protetor. Houve ainda aumento na expressão de receptores de resolvina D (DRV1) e na expressão de receptores de leucotrienos (BLT1). Já a expressão de receptores de Lipoxina A4 (ALX) e resolvina E1 e E2 (ERV) não foram alterados quando comparados ao grupo controle (tendinite sem tratamento). O diclofenaco de sódio é um anti-inflamatório conhecido e bastante utilizado em diversos processos inflamatórios. No entanto, existem trabalhos indicando que este fármaco pode dificultar o processo de reparo tecidual, provavelmente por interferir na fase inflamatória.[104] Além do mais, é conhecido que a terapia farmacológica não apresenta efeitos satisfatórios no tratamento de doenças inflamatórias crônicas, além de produzir importantes efeitos indesejáveis [105]. Gilroy et al. [106] mostraram em modelo de indução por carreginina em ratos que o tratamento com AINEs reduziu o número de células inflamatórias e a formação de exsudatos em 2 horas, entretanto, observando os grupos controle viram que a inflamação foi resolvida enquanto que no grupo com indometacina o número de células aumentou. Em estudo [107] que envolve modelo deficiente em COX-2, o grupo com tal deficiência apresentou lentidão do processo resolutivo, evidenciando a necessidade de haver COX-2 para que ocorra a resolução da inflamação. A terapia com AINES para inibir intensamente a inflamação pode trazer prejuízo ao processo de resolução da inflamação. [108] A Aspirina (ASA) é o AINE mais estudado no processo de resolução da inflamação, ele acetila a COX-2 e induz a produção de lipoxinas derivadas de ASA (15-epi-LXA4) [109] e resolvinas D e E derivadas de ASA (AT-RvD e AT-RvE, respectivamente) [110,111,112]. Níveis de LXA4 já foram associadas com a presença de Prostaglandinas (PGs), um mediador produzido pela ação de COX sobre o AA [113]. Fukunaga et al.[114] verificaram que a inibição farmacológica ou interrupção gênica de COX-2 bloqueavam a resolução de lesão pulmonar induzida. Por outro lado, Marion Man et al. [115] observaram que, em modelo de artrite induzida por

colágeno, a inibição de COX-2 e de PGE2 perpetuou a inflamação, ainda viram que a inibição de COX-2 reduziu LXA4 em um padrão paralelo à perda de PGs.

O modelo de inflamação aguda do tendão induzida por colagenase, frequentemente utilizado no estudo de tendinopatias assemelha-se ao quadro de inflamação aguda do tendão em humanos, com edema e a destruição aguda da MEC similares aos encontrados nas lesões naturais do tendão, permitindo a investigação de alterações moleculares e histológicas “*in vivo*” [116]. Este modelo de indução da tendinite por colágenase é bastante conhecido. Neste trabalho podemos observar que o grupo controle, onde a tendinite foi induzida e não houve tratamento, o aumento do infiltrado inflamatório e aumento da atividade de MPO. Este cenário de aumento da inflamação poderia justificar a redução do colágeno tipo I o que estaria relacionado com a ação da enzima colagenase tipo I utilizada em nosso modelo experimental.

As escolhas da dose (810 nm; 30mW; 3J), do tempo e da aplicação do tratamento com laser de baixa intensidade, foram baseadas em estudo publicado anteriormente para que ocorresse possíveis efeitos sobre a inflamação aguda presente e, possivelmente, no processo de resolução da inflamação tendo em vista que são processos que interagem e se complementam no mecanismo de reparo, com estudo prévio que determinou o curso temporal da expressão gênica de COX-1 e COX-2, com pico de expressão da COX-2 e redução da COX-1, após 2 horas de indução de tendinite. [117] A terapia única, utilizando laser de baixa intensidade mostrou resultados similares quando comparados à terapia associada (Terapia por fotobiomodulação associada a terapia farmacológica). O laser de baixa intensidade no comprimento de onda de 810nm, energia de 3J e potência de 30mW aumentou a expressão de receptores ALX e ERV, novamente com redução da atividade de MPO e redução do infiltrado inflamatório. O efeito anti-inflamatório da terapia por fotobiomodulação em tendinopatias já é conhecido. Trabalhos anteriores demonstraram que o laser de baixa intensidade reduziu a atividade de MPO com consequente redução do infiltrado inflamatório estando relacionados com a redução de importantes citocinas como IL6 e TNFa [118]. Outros estudos [119][120][121] descreveram efeitos da utilização do laser de baixa intensidade como tratamento auxiliar na redução de interleucinas pró-inflamatórias como IL-6, NF-kB e TNF-a. Isso mostra o efeito positivo no tratamento e no mecanismo de reparo na tendinite aguda.

Nossos resultados histológicos mostraram que grupo controle teve aumento significativo do infiltrado inflamatório no tendão propriamente dito (painel 1) e na região periférica ao tendão (painel 2) quando comparado aos demais grupos. Por outro lado,

quando a tendinite é tratada com laser de baixa intensidade (grupo PBM) ou diclofenaco de sódio (grupo DIC) é possível reduzir o infiltrado inflamatório no tendão propriamente dito e região periférica. Quando a tendinite foi tratada em associação com laser de baixa intensidade e fármaco (PBM+DIC) houve significativa redução do infiltrado inflamatório tanto no tendão propriamente dito como na região periférica em comparação aos demais grupos, indicando que a associação dos tratamentos é efetivo na inibição do infiltrado inflamatório.

A MPO é utilizada como marcador inflamatório e indicador da presença e atividade de neutrófilos e macrófagos [122]. A atividade de MPO já foi avaliada em alguns modelos animais de indução da osteoartrite, o tecido inflamado apresentou a atividade de MPO aumentada [123]. Marcos RL [118] investigou uma série de agentes inflamatórios, mostrando que os grupos irradiados tiveram redução da atividade da enzima MPO. Nossos resultados (figura 11) mostraram a redução da atividade de MPO no grupo tratado com diclofenaco de sódio quando comparado ao grupo controle e quando tratamos com o laser de baixa intensidade, mesmo sendo isolado (PBM) ou associado com fármaco (PBM+DIC), observamos uma redução significativa de MPO quando comparado ao grupo controle, além disso, houve redução significativa se compararmos os grupos irradiados ao grupo tratado somente com diclofenaco de sódio (DIC), um anti-inflamatório não-esteroidal. [114]. Isso mostra que o laser de baixa intensidade, nos parâmetros aplicados, exerce efeito sobre a atividade das células do infiltrado inflamatório na tendinite aguda.

Tais resultados podem ser parcialmente explicados quando associamos infiltrado inflamatório e atividade de MPO, pois o grupo controle apresentou níveis de infiltrado inflamatório significativamente aumentados quando comparados aos demais grupos tratados (painel 1), somado à isso, observamos os níveis de MPO (figura 11) no grupo controle (CTL) aumentados quando comparados aos demais grupos, indicando aumento da atividade do infiltrado inflamatório. Tais resultados são esperados na tendinite aguda, considerando que o organismo iniciará naturalmente o processo inflamatório com presença e atividade do infiltrado inflamatório. O grupo tratado associado (PBM+DIC) apresentou redução significativa tanto de infiltrado inflamatório quanto de atividade de MPO, ou seja, levando em conta que quanto menor o número de células menor será as concentrações de MPO, já que estas estão presentes nos grânulos de neutrófilos e macrófagos componentes do infiltrado celular, tal resultado evidencia o efeito da associação das terapias sobre o processo inflamatório. Entretanto, quando observamos o infiltrado inflamatório nos resultados histológicos do grupo tratado somente com laser (PBM), verificamos

considerável infiltrado, porém apresentam redução significativa de sua atividade quando observamos os valores reduzidos de MPO (figura 11). Tal resultado carece de investigações, possivelmente, pode haver a alteração do tipo celular presente no infiltrado inflamatório ou o perfil das células presentes pode ter sido alterado.

A quimiotaxia de leucócitos é fundamental [124]. Neste estudo investigamos o BLT1, pois já foi mostrado a necessidade de sua presença para a migração de neutrófilos para as articulações, por outro lado, sua inibição reduziu o desenvolvimento de artrite. [125] Além disso, antagonistas do receptor BLT1 mostraram atenuar a artrite. [126] Nossos resultados (figura 14) mostraram que o grupo tratado com fármaco (DIC) teve a expressão de BLT1 significativamente aumentada quando comparado aos grupos controle (CTL) e irradiados (PBM e PBM+DIC), não há estudos preliminares que possam explicar esse resultado, sugerimos que pode ser reflexo da ação não seletiva do diclofenaco na inibição da via COX no metabolismo do ácido araquidônico [127], aumentando a produção de agentes pró-inflamatórios via 5-LOX [128][129] e que o diclofenaco pode agir nesse mecanismo. Quando observamos a expressão de BLT1 nos grupos irradiados notamos que não houveram diferenças significativas quando comparamos com o grupo controle, quando consideramos a atividade de MPO reduzida em ambos os grupos irradiados verificamos um efeito inibidor da terapia com laser de baixa intensidade na expressão de BLT1.

Poucos estudos foram publicados em que envolvem lesões tendíneas e resolução da inflamação e nenhum estudo com terapia por fotobiomodulação na tendinite, além disso, somente Da Palma-Cruz et al.[130] publicou estudo que envolve fotobiomodulação usando luz LED sobre modelo de lesão pulmonar induzida por lipopolissacarídeo, em que descrevem o efeito do LED, após 7 dias de tratamento, em aumentar os níveis de LXA4 e em reduzir interleucinas pró-inflamatórias nesse modelo.

Além dos ácidos ômega-3 como substrato para gerar DHA e EPA, ácidos graxos ômega-6 como o AA [131] também participam da formação de mediadores anti-inflamatórios e pró-resolutivos, como nas Lipoxinas (LXs) [132]. LXs ligam-se e ativam de forma agonista o receptor ALX, presente em diferentes células [133,134], como nos neutrófilos e monócitos [135]. Nossos resultados de expressão gênica do receptor ALX mostraram que o grupo tendinite tratado com diclofenaco de sódio (DIC) não houve diferença na expressão de ALX quando comparamos ao grupo controle. Por outro lado, verificamos que ambos os grupos irradiados apresentaram significativo aumento na expressão de ALX quando comparamos ao grupo controle. Sendo assim, a terapia por fotobiomodulação parece exercer efeito sobre o processo de resolução da inflamação, já

que receptores ALX estão diretamente ligados às ações resolutivas. O mecanismo responsável por essa modulação carece de investigação, sugerimos que seja pela ação do laser em modular a clássica via do AA, agindo sobre a COX e provavelmente direcionando a ação para via da LOX, com isso pode ocorrer uma possível mudança de classe de perfil pró-inflamatório para um perfil pró-resolução, já que LXA4 são produzidas pela ação das LOX [136]. Entretanto, não há evidências de que a expressão proteica seja interferida pela expressão gênica deste receptor, pode ser fonte de investigações futuras.

A presença de ERV é relacionada ao processo de resolução da inflamação [137]. [138, 139]. Nossos resultados de expressão gênica do receptor ERV (Figura 13) mostraram que o grupo tendinite induzida tratado com diclofenaco de sódio (DIC) não teve diferença quando comparado ao grupo controle. Porém, nesse modelo de indução quando tratado com laser de baixa intensidade, os níveis de expressão de ERV aumentam em ambos os grupos irradiados quando comparados aos grupos controle. Além disso, quando associamos os dois tratamentos (PBM+DIC), a expressão de ERV aumenta significativamente quando comparado ao grupo tratado com diclofenaco de sódio. Quando olhamos para os resultados de infiltrado inflamatório, MPO e BLT1, vemos que os grupos irradiados reduzem seus níveis quando comparados ao grupo controle. Tais resultados em conjunto podem indicar um possível efeito da terapia com laser no controle da inflamação e na promoção do processo de resolução da inflamação.

Outro receptor descrito na resolução do processo inflamatório é o DRV1. Nesse receptor, se ligam de forma agonista as Rvs D1, D3 e D5 [140, 141]. A presença de DRV1 pode indicar ações anti-inflamatórias e pró-resolutivas, o que é benéfico no controle do processo inflamatório [142]. Nossos resultados de expressão gênica de DRV1 (figura 12) mostraram que a tendinite tratada com diclofenaco (DIC) foi capaz de aumentar DRV1 quando comparamos com o grupo controle. Entretanto, os grupos irradiados (PBM e PBM+DIC) não foram capazes de alterar os níveis de DRV1 quando comparamos ao grupo controle. Além disso, os grupos tratados não apresentaram diferenças significativas entre si. Isso pode sugerir que o tratamento com diclofenaco de sódio interage com as vias que cercam a expressão gênica de receptores ligados a série de resolvinas D, bem como na produção de resolvinas da série D, mas estudos posteriores são necessários para entender o mecanismo. Um alvo de investigação pode ser os seus substratos, já que para produzir Rvs D e E, são usados os ácidos DHA e EPA, respectivamente, por diferentes vias de metabolização [143], como COX e LOX. [144]

Com isso, mesmo como monoterapia ou associado ao diclofenaco de sódio, o laser

de baixa intensidade mostrou favorecer mecanismos de ação pró-resolutivos. Mesmo com tais resultados, há a necessidade de verificar se isso expressa-se em produção protéica além da expressão gênica.

6 - CONCLUSÃO

Podemos concluir que o laser de baixa intensidade (810 nm) na energia de 3 joules foi capaz de auxiliar no processo de resolução da inflamação aumentando a expressão dos receptores ERV e ALX, em modelo de tendinite induzida por colagenase em tendões calcâneos de ratos.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Paavola M, Kannus P, Jarvinen TA, et al. Treatment of tendon disorders. Is there a role for corticosteroid injection? *Foot Ankle Clin.* 2002; 7: 501-513.
2. Xu, Y., & Murrell, G. A. (2008). The basic science of tendinopathy. *Clinical orthopaedics and related research*, 466(7), 1528–1538. doi:10.1007/s11999-008-0286-4.
3. Maffulli, N., Longo, U. G., Loppini, M., Spiezia, F., & Denaro, V. New options in the management of tendinopathy. *Open access journal of sports medicine.* 2010, 1, 29–37.
4. Hopkins, C., Fu, S. C., Chua, E., Hu, X., Rolf, C., Mattila, V. M., ... Chan, K. M. (2016). Critical review on the socio-economic impact of tendinopathy. *Asia-Pacific journal of sports medicine, arthroscopy, rehabilitation and technology*, 4, 9–20. doi:10.1016/j.asmart.2016.01.002
5. Lemme, N. J., Li, N. Y., DeFroda, S. F., Kleiner, J., & Owens, B. D. (2018). Epidemiology of Achilles Tendon Ruptures in the United States: Athletic and Nonathletic Injuries From 2012 to 2016. *Orthopaedic journal of sports medicine*, 6(11), 2325967118808238. doi:10.1177/2325967118808238.
6. Santana, Vilma Sousa, Araújo-Filho, José Bouzas, Albuquerque-Oliveira, Paulo Rogério, & Barbosa-Branco, Anadergh. (2006). Occupational accidents: social insurance costs and work days lost. *Revista de Saúde Pública*, 40(6), 1004-1012. <https://dx.doi.org/10.1590/S0034-89102006000700007>.
7. Almeida, P; Lopes-Martins, RÁ; Tomazoni, SS; Silva, JA JR; Carvalho, PDE T; Bordal, 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.
8. Kannus, P. and Natri, A. Etiology and pathophysiology of tendon ruptures in sports. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports.* 1997, 7: 107-112. doi:10.1111/j.1600-0838.1997.tb00126.x.
9. O'Brien, M. Structure and metabolism of tendons. *Scand J Med Sci Sports.* v.7, p. 55-61, 1997.
10. Goldin, Michael & Malanga, Gerard. Tendinopathy: A Review of the Pathophysiology and Evidence for Treatment. *The Physician and sports medicine.* 2013, 41. 36-49. 10.3810/psm.2013.09.2019.
11. Andarawis-Puri, N; Flatow, E; Soslowsky, LJ. Tendon basic science: Development, repair, regeneration, and healing. *Journal of orthopaedic research: official publication of the*

Orthopaedic Research Society, 2015, 33(6), 780–784. doi:10.1002/jor.22869.

12. Leal-Junior, E. C.; Lopes-Martins, R. A.; Vanin, AA.; Baroni, B. M.; Grosselli, D.; De Marchi, T.; Iversen, V. V.; Bjordal, J. M. Effect of 830 nm low-level laser therapy in exercise-induced skeletal muscle fatigue in humans. *Lasers Med. Sci.*, v. 24, n. 3, p. 425-431, 2008.

13. Sharma, P; Maffulli, N. Tendon injury and tendinopathy: healing and repair. *J Bone Joint Surg Am.* 2005 Jan;87(1):187-202. DOI: 10.2106/JBJS.D.01850.

14. Kannus P. Structure of the tendon connective tissue. *Scand J Med Sci Sports.* 2000;10:312–320.

15. O'Brien M (2005) The anatomy of the Achilles tendon. *Foot Ankle Clin N Am* 10:225–238.

16. Kastelic J, Galeski A, Baer E. The multicomposite structure of tendon. *Connect Tissue Res* 1978;6:11–23.

17. Doral, M.N., Alam, M., Bozkurt, M. et al. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* (2010) 18: 638. <https://doi.org/10.1007/s00167-010-1083-7>.

18. Alessandra Bordoni, Francesca Danesi, Dominique Dardevet, Didier Dupont, Aida S. Fernandez, Doreen Gille, Claudia Nunes dos Santos, Paula Pinto, Roberta Re, Didier Rémond, Danit R. Shahar & Guy Vergères(2017) Dairy products and inflammation: A review of the clinical evidence, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57:12, 2497-2525, DOI: 10.1080/10408398.2014.967385.

19. Lin TW, Cardenas L, Soslowsky LJ. Biomechanics of tendon injury and repair. *Journal Biomech.* 2004;37(6):865–877.

20. MARTINS,EJ.;VIEIRA,FF.;FERREIRA,LAB.;THOME,MR.;PEREIRA,WM. Ação do Laser de Baixa Potencia na Redução de Edema após indução de Ácido Araquidônico em pata de cobaias. 2009 1123-1126.

21. Tallima H, El Ridi R. Arachidonic acid: Physiological roles and potential health benefits - A review. *J Adv Res.* 2018 May;11 33-41. doi:10.1016/j.jare.2017.11.004. PMID: 30034874; PMCID: PMC6052655.

22. Vane, J.R. & Botting, Regina. (2003). The mechanism of action of aspirin. *Thrombosis research.* 110. 255-8. 10.1016/S0049-3848(03)00379-7.

23. Freire, M. O., & Van Dyke, T. E. (2013). Natural resolution of inflammation. *Periodontology* 2000, 63(1), 149–164. doi:10.1111/prd.12034.

24. Su, B., & O'Connor, J. P. (2013). NSAID therapy effects on healing of bone, tendon, and the enthesis. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md. : 1985), 115(6), 892–899. doi:10.1152/jappphysiol.00053.2013.

25. Seo, Min-Ju & Oh, Deok-Kun. (2017). Prostaglandin synthases: Molecular characterization and involvement in prostaglandin biosynthesis. *Progress in lipid research*. 66. 10.1016/j.plipres.2017.04.003.

26. Snedeker JG, Follen J. Tendon injury and repair - A perspective on the basic mechanisms of tendon disease and future clinical therapy. *Acta Biomater*. 2017 Nov;63:18-36. doi: 10.1016/j.actbio.2017.08.032. Epub 2017 Sep 1.

27. James R, Kesturu G, Balian G, Chhabra AB. Tendon: biology, biomechanics, repair, growth factors, and evolving treatment options. *J Hand Surg Am*. 2008 Jan;33(1):102-12. doi: 10.1016/j.jhsa.2007.09.007.

28. Evans, C. H. (1999). Cytokines and the role they play in the healing of ligaments and tendons. *Sports Medicine*, 28(2), 71-76. <https://doi.org/10.2165/00007256-199928020-00001>.

29. 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.

30. Ackermann, Paul & Arverud, Erica & Leclerc, Patrick & Amoudrouz, P & Nader, GA. (2012). Anti-inflammatory cytokine profile in early human tendon repair. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy: official journal of the ESSKA*. 21. 10.1007/s00167-012-2197-x.

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

32. Voronov, E., Shouval, D. S., Krelin, Y., Cagnano, E., Benharroch, D., Iwakura, Y., ...Apte, R. N. (2003). IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(5), 2645–2650. doi:10.1073/pnas.0437939100.

33. Yaron Carmi, Elena Voronov, Shahar Dotan, Nitzah Lahat, Michal A. Rahat, Mina Fogel, Monika Huszar, Malka R. White, Charles A. Dinarello, Ron N. Apte. The Role of Macrophage-Derived IL-1 in Induction and Maintenance of Angiogenesis. *J Immunol*. 2009 Oct 1;183(7):4705-14. doi: 10.4049/jimmunol.0901511. Epub 2009 Sep 14.

34. Simi T. Ahmed, Lionel B. Ivashkiv. Inhibition of IL-6 and IL-10 Signaling and Stat Activation by Inflammatory and Stress Pathways. *The Journal of Immunology* November 1, 2000, 165 (9) 5227-5237; DOI: 10.4049/jimmunol.165.9.5227.

35. Mosser, D. M., & Zhang, X. (2008). Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunological reviews*, 226, 205–218. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00706.x.

36. Trifunović, J., Miller, L., Debeljak, Ž., & Horvat, V. (2015). Pathologic patterns of interleukin 10 expression--a review. *Biochemia medica*, 25(1), 36–48. doi:10.11613/BM.2015.004.
37. Riley GP, Curry V, DeGroot J, van El B, Verzijl N, Hazleman BL, Bank RA. Matrix metalloproteinase activities and their relationship with collagen remodelling in tendon pathology. *Matrix Biol.* 2002 Mar;21(2):185-95.
38. G. Riley, The pathogenesis of tendinopathy. A molecular perspective, *Rheumatology*, Volume 43, Issue 2, February 2004, Pages 131–142, <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keg448>.
39. Rees, J. D., Stride, M., & Scott, A. (2013). Tendons--time to revisit inflammation. *British journal of sports medicine*, 48(21), 1553–1557. doi:10.1136/bjsports-2012-091957.
40. Maffulli, N., Sharma, P., & Luscombe, K. L. (2004). Achilles tendinopathy: aetiology and management. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 97(10), 472–476. doi:10.1258/jrsm.97.10.472.
41. Medzhitov R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell*. 2010;140(6):771–776. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.006.
42. Haworth, O., & Levy, B. D. (2007). Endogenous lipid mediators in the resolution of airway inflammation. *The European respiratory journal*, 30(5), 980–992. doi:10.1183/09031936.00005807.
43. Duvall, M. G., & Levy, B. D. (2015). DHA- and EPA-derived resolvins, protectins, and maresins in airway inflammation. *European journal of pharmacology*, 785, 144–155. doi:10.1016/j.ejphar.2015.11.001.
44. Cooray SN, Gobbetti T, Montero-Melendez T, et al. Ligand-specific conformational change of the G-protein-coupled receptor ALX/FPR2 determines proresolving functional responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(45):18232-7.
45. Krishnamoorthy S, Recchiuti A, Chiang N, Fredman G, Serhan CN. D1 receptor stereoselectivity resolution and control of inflammation and pro-resolution microRNAs. *J Pathol*. 2012; 180 : 2018-202.
46. Kurihara T, Jones CN, Yu YM, AJ Fischman, Watada S, RG Tompkins, Fagan SP, Irimia D. Resolvin D2 restaura direccionalidade neutrófilos e melhora a sobrevivência após queimaduras. *FASEB J*.2013; 27: 2270–2281.
47. Dakin, S. G., Werling, D., Hibbert, A., Abayasekara, D. R., Young, N. J., Smith, R. K., & Dudhia, J. (2012). Macrophage sub-populations and the lipoxin A4 receptor implicate

active inflammation during equine tendon repair. *PloS one*, 7(2), e32333. doi:10.1371/journal.pone.0032333.

48. Levy BD, Clish CB, Schmidt B, Gronert K, Serhan CN. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nat Immunol* 2001;2:612–9.

49. Sordi, Regina & Menezes de Lima Jr, Octavio & Assreuy, Jamil. (2012). Biossíntese e funções das lipoxinas na resolução da inflamação. *Publicatio UEPG: Ciências Biológicas e da Saude*. 18. 7-13. 10.5212/Publ.Biologicas.v.18i1.0001.

50. Clària, J., & Serhan, C. N. (1995). Aspirin triggers previously undescribed bioactive eicosanoids by human endothelial cell-leukocyte interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(21), 9475–9479.

51. Mario Romano, Eleonora Cianci, Felice Simiele, Antonio Recchiuti. Lipoxins and aspirin-triggered lipoxins in resolution of inflammation. *Eur J Pharmacol*. 2015 Aug 5;760:49-63. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.03.083. Epub 2015 Apr 18.

52. Börgeson E. et al. Lipoxin A4 attenuates adipose inflammation. *FASEB J*. 2012 Oct;26(10):4287-94. doi: 10.1096/fj.12-208249. Epub 2012 Jun 14.

53. Mark E. Brezinski, Michael A. Gimbrone, K.C. Nicolaou, Charles N. Serhan, Lipoxins stimulate prostacyclin generation by human endothelial cells, *FEBS Letters*, Volume 245, Issues 1–2, 1989, Pages 167-172, ISSN 0014-5793, [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(89\)80214-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(89)80214-5).

54. Romano, M., Chen, X. S., Takahashi, Y., Yamamoto, S., Funk, C. D., & Serhan, C. N. (1993). Lipoxin synthase activity of human platelet 12-lipoxygenase. *The Biochemical journal*, 296 (Pt 1)(Pt 1), 127–133.

55. Iolanda M. Fierro et al. Lipoxin A4 and Aspirin-Triggered 15-epi-Lipoxin A4 Inhibit Human Neutrophil Migration: Comparisons Between Synthetic 15 Epimers in Chemotaxis and Transmigration with Microvessel Endothelial Cells and Epithelial Cells. *The Journal of Immunology* March 1, 2003, 170 (5) 2688-2694; DOI: 10.4049/jimmunol.170.5.2688.

56. Qu Q., Xuan W., Fan GH. Roles of resolvins in the resolution of acute inflammation. *Cell Biol Int*. 2015 Jan;39(1):3-22. doi: 10.1002/cbin.10345. Epub 2014 Sep 17.

57. Li, D., Hodges, R., Jiao, J. et al. Resolvin D1 and aspirin-triggered resolvin D1 regulate histamine-stimulated conjunctival goblet cell secretion. *Mucosal Immunol* 6, 1119–1130 (2013) doi:10.1038/mi.2013.7.

58. Serhan CN. Systems approach to inflammation resolution: identification of novel anti-inflammatory and pro-resolving mediators. *J Thromb Haemost*. 2009 Jul;7 Suppl 1:44-8. doi: 10.1111/j.1538-7836.2009.03396.x.

59. Krishnamoorthy S, Recchiuti A, Chiang N, Fredman G, Serhan CN. Estereoselectividade do receptor da Resolvin D1 e regulação da inflamação e microRNAs pró-resolução. *Am J Pathol.* 2012; 180 : 2018-2027.

60. Li N, He J, Schwartz CE, Gjorstrup P, Bazan HEP. Resolvin E1 Improves Tear Production and Decreases Inflammation in a Dry Eye Mouse Model. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2010; 26 : 431.

61. Arita M, Ohira T, Sun YP, Elangovan S, Chiang N, Serhan CN. Interação seletivamente com Resolvin E1 leucotrienos B₄ receptor BLT1 e ChemR23 para regular a inflamação. *J. Immunol.* 2007; 178 : 3912–3917.

62. Schwab JM, Chiang N, Arita M, Serhan CN. Resolvin e1 e protectin d1 ativam programas de resolução de inflamação. *Natureza.* 2007; 447: 869–874.

63. Serhan CN. Controlling the resolution of acute inflammation: a new genus of dual anti-inflammatory and pro-resolving mediators. *J Periodontol.* 2008 Aug;79(8 Suppl):1520-6. doi: 10.1902/jop.2008.080231.

64. Freire, M. O., & Van Dyke, T. E. (2013). Natural resolution of inflammation. *Periodontology 2000*, 63(1), 149–164. doi:10.1111/prd.12034.

65. Shi Tang, Ming Wan, Wei Huang, R. C. Stanton, and Yong Xu, “Maresins: Specialized Pro-resolving Lipid Mediators and Their Potential Role in Inflammatory-Related Diseases,” *Mediators of Inflammation*, vol. 2018, Article ID 2380319, 8 pages, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/2380319>.

66. GUERRA FDA R, VIEIRA CP, ALMEIDA MS, OLIVEIRA LP, DE ARO AA, PIMENTEL ER. LLLT improves tendon healing through increase of MMP activity and collagen synthesis. *Lasers Med Sci.* 2013 Sep; 28(5):1281-8.

67. KILSZTAJN S, ROSSBACH A, da CÂMARA MB, do CARMO MSN. Serviços de saúde, gastos e envelhecimento da população brasileira. *Revista Brasileira de Estudos de População*, v20, n1. 2003.

68. ASTROM, M. On the Nat. and etiology of chronic achilles tendinopathy. Ph. D. Thesis - Lund University, 1997.

69. Andres, B. M., & Murrell, G. A. (2008). Treatment of tendinopathy: what works, what does not, and what is on the horizon. *Clinical orthopaedics and related research*, 466(7), 1539–1554. doi:10.1007/s11999-008-0260-1.

70. Zafar MS, Mahmood A, Maffulli N. Basic science and clinical aspects of achilles tendinopathy. *Sports Med Arthrosc Rev.* 2009 Sep;17(3):190-7. doi: 10.1097/JSA.0b013e3181b37eb7.

71. Abbassian A., Khan R. Achilles tendinopathy: pathology and management strategies. *Br J Hosp Med (Lond)*. 2009 Sep;70(9):519-23.
72. Cannon GW., Breedveld FC. Efficacy of cyclooxygenase-2-specific inhibitors. *Am J Med*. 2001 Feb 19; 110 Suppl 3A:6S-12S.
73. Lisowska, B., Kosson, D., & Domaracka, K. (2018). Positives and negatives of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in bone healing: the effects of these drugs on bone repair. *Drug design, development and therapy*, 12, 1809–1814. doi:10.2147/DDDT.S164565.
74. Boursinos LA, Karachalios T, Poultsides L, Malizos KN. Do steroids, conventional non-steroidal anti-inflammatory drugs and selective Cox-2 inhibitors adversely affect fracture healing?. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2009 Jan-Mar;9(1):44-52.
75. Lilly KF. Athletes, NSAID, coxibs, and the gastrointestinal tract. *Curr Sports Med Rep*. 2010 Mar-Apr; 9(2):103-5. doi: 10.1249/JSR.0b013e3181d405a9.
76. KERPPRS,II.;MARTINS,EJ.;VIEIRA,FF.;FERREIRA,LAB.;THOME,MR.;PEREIRA,WM. Ação do Laser de Baixa Potência na Redução de Edema após indução de Ácido Araquidônico em pata de cobaias. 2009 1123-1126.
77. KJAER M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiol Rev*. v. 84, p. 649–698, 2004.
78. Tong J. Gan. Diclofenac: an update on its mechanism of action and safety profile, *Current Medical Research and Opinion*, 2010. 26:7, 1715-1731, DOI: 10.1185/03007995.2010.486301.
79. Atzeni, F., Masala, I. F., & Sarzi-Puttini, P. (2018). A Review of Chronic Musculoskeletal Pain: Central and Peripheral Effects of Diclofenac. *Pain and therapy*, 7(2), 163–177. doi:10.1007/s40122-018-0100-2.
80. Kraychete, DC.;Calasans, MTA.;Valente, CMT. Citocinas Pró-inflamatórias e Dor. *Rev Bras Reumatol*, v 46 n.3 199-206, mai/junh, 2006.
81. Bertolini, GRF; Silva, TS; Ciena, AP; Trindade, DL. Effects of the low Level Laser Over pain and Edema in Tendon trauma of rats. *Ver Bras Med Esporte Vol 14*, nº 4 Julh-Ago 362-366, 2008.
82. Tang, Chenqi & Chen, Yangwu & Huang, Jiayun & Zhao, Kun & Chen, Xiao & zi, Yin & Heng, Boon & Chen, Weishan & Shen, Weiliang. The roles of inflammatory mediators and immunocytes in tendinopathy. *Journal of Orthopaedic Translation*, 2018, 14. 10.1016/j.jot.2018.03.003.
83. REEVES ND, NARICI MV, MAGANARIS CN. Strength training alters the viscoelastic

properties of tendons in elderly humans. *Muscle Nerve*. v. 28, p. 74-81, 2003.

84. Ferraresi C, Hamblin MR, Parizotto NA. Laser de baixa intensidade (LLLT) no tecido muscular: desempenho, fadiga e reparo beneficiados pelo poder da luz. *Fotônica Lasers Med*. 2012; 1 (4): 267-286. doi: 10.1515 / plm-2012-0032.

85. Lopes-Martins, Rodrigo Alvaro. Tendinitis, an Open Avenue for Low-Level Laser Therapy. *Photomedicine and laser surgery*, 2014. 32. 369-370. 10.1089/pho.2014.9859.

86. Reddy GK., Stehno-Bittel L., Enwemeka CS. Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit Achilles tendons. *Lasers Surg Med*. 1998; 22(5):281-7.

87. Rocha Júnior, Adeir Moreira, Oliveira, Rodrigo Guerra de, Farias, Rogério Estevam, Andrade, Luiz Carlos Ferreira de, & Aarestrup, Fernando Monteiro. (2006). Modulação da proliferação fibroblástica e da resposta inflamatória pela terapia a laser de baixa intensidade no processo de reparo tecidual. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 81(2), 150-156. <https://dx.doi.org/10.1590/S0365-05962006000200006>.

88. OLIVEIRA FS, PINFILDI CE, PARIZOTO NA, LIEBANO RE, BOSSINI PS, GARCIA EB, FERREIRA LM. Effect of low-level laser therapy (830 nm) with different therapy regimes on the process of tissue repair in partial lesion calcaneous tendon. *Lasers Surg Med*.41(4):271-6. 2009.

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

90. Lins, Ruthinéia Diógenes Alves Uchôa, Dantas, Euler Maciel, Lucena, Keila Cristina Raposo, Catão, Maria Helena Chaves Vasconcelos, Granville-Garcia, Ana Flávia, & Carvalho Neto, Luiz Guedes. (2010). Biostimulation effects of low-power laser in the repair process. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 85(6), 849-855. <https://dx.doi.org/10.1590/S0365-05962010000600011>.

91. Hong-Yun Li and Ying-Hui Hua, "Achilles Tendinopathy: Current Concepts about the Basic Science and Clinical Treatments," *BioMed Research International*, vol. 2016, Article ID 6492597, 9 pages, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/6492597>.

92. LEAL-JUNIOR, E. C.; LOPES-MARTINS, R. A.; VANIN, A. A.; BARONI, B. M.; GROSSELLI, D.; DE MARCHI, T.; IVERSEN, V. V.; BJORDAL, J. M. Effect of 830 nm low-level laser therapy in exercise-induced skeletal muscle fatigue in humans. *Lasers Med. Sci.*, v. 24, n. 3, p. 425-431, 2008.

93. Piva, Juliana Aparecida de Almeida Chaves, Abreu, Elizângela Márcia de Carvalho, Silva, Vanessa dos Santos, & Nicolau, Renata Amadei. (2011). Effect of low-level laser therapy on the initial stages of tissue repair: basic principles. *Anais Brasileiros de*

Dermatologia, 86(5), 947-954. <https://dx.doi.org/10.1590/S0365-05962011000500013>.

94. LIN Y, WANG ZW, ZHANG B, PAN J, QU TB, HAI Y. Central tendon splitting combined with SutureBridge double-row technique as a surgical treatment for insertional Achilles tendinopathy. *Chin Med J (Engl)*. 2013 Oct;126(20):3860-4.

95. 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.*, n. 36, v. 5, p. 881-887, 2008.

96. de Jesus, J.F., Spadacci-Morena, D.D., dos Anjos Rabelo, N.D. et al. *Lasers Med Sci* (2015) 30: 153. <https://doi.org/10.1007/s10103-014-1636-y>.

97. Xavier, M. , David, D. R., de Souza, R. A., Arrieiro, A. N., Miranda, H. , Santana, E. T., Silva, J. A., Salgado, M. A., Aimbire, F. and Albertini, R. (2010), Anti-inflammatory effects of low-level light emitting diode therapy on achilles tendinitis in rats. *Lasers Surg. Med.*, 42: 553-558. doi:10.1002/lsm.20896.

98. PARENTE, M.; VIEIRA, R.P.; CASALECHI, H.L.; VASCONCELOS, M.S.; LBERTINI, R. Analise do efeito do led terapia em tendinopatia traumáticas em ratos. *Ver conssaude*, 2012.

99. ARAMPATZIS A, PEPPER A, BIERBAUM S, ALBRACHT K. Plasticity of human Achilles tendon mechanical and morphological properties in response to cyclic strain. *J Biomech*. 2010 Dec 1; 43(16):3073-9.

100. Marcos, Rodrigo Labat. Efeito do laser de baixa potência (810 nM) na tendinite induzida por colagenase em tendão calcâneo de ratos [tese]. São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas; 2010. doi:10.11606/T.42.2010.tde-17122010-154634.

101. Rittié, L. (2017). Method for Picrosirius Red-Polarization Detection of Collagen Fibers in Tissue Sections. *Methods in Molecular Biology*, 395–407. doi:10.1007/978-1-4939-7113-8_26.

102. Whittaker P. Polarized light microscopy in biomedical research. *Microscopy and Analysis* 1995; 44, 15-17.

103. Bradley et al., 1982. Measurement of cutaneous inflammation: Estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol*, 78: 206-209. *The Worthington Enzyme Manual*. Peroxidase section 1.11.1.7, pp. 43-45.

104. Naterstad IF, Rossi RP, Marcos RL, et al. Comparison of photobiomodulation and anti-inflammatory drugs on tissue repair on collagenase-induced achilles tendon inflammation in rats. *Photomed Laser Surg*. 2018;36:137-145.

105. Lawrence, T., & Gilroy, D. W. (2007). Chronic inflammation: a failure of resolution?.

International journal of experimental pathology, 88(2), 85–94. doi:10.1111/j.1365-2613.2006.00507.x.

106. Gilroy DW, et al. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat Med.* 1999;5:698–701.

107. Langenbach R, Loftin CD, Lee C, Tian H. Cyclooxygenase-deficient mice. A summary of their characteristics and susceptibilities to inflammation and carcinogenesis. *Ann NY Acad Sci.* 1999;889:52–61.

108. Gilroy, D.W. et al. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat. Med.* 5, 698–701 (1999).

109. Serhan CN. Lipoxinas e 15 epilipoxinas (ATL) desencadeadas por aspirina: uma selva de interações célula-célula ou uma oportunidade terapêutica? . *Prostaglandins.* 1997; 53 : 107–137.

110. Dalli, J., Winkler, J. W., Colas, R. A., Arnardottir, H., Cheng, C. Y., Chiang, N., ... Serhan, C. N. (2013). Resolvin D3 and aspirin-triggered resolvin D3 are potent immunoresolvents. *Chemistry & biology*, 20(2), 188–201. doi:10.1016/j.chembiol.2012.11.010.

111. Goicoechea, Marian et al. Low dose aspirin increases 15-epi-lipoxin A4 levels in diabetic chronic kidney disease patients. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, Volume 125, 8 – 13.

112. Filep, János G. et al. Lipoxins and aspirin-triggered lipoxins in neutrophil adhesion and signal transduction. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, Volume 73, Issue 3, 257 – 262.

113. Chiang N, Arita M, Serhan CN. Anti-inflammatory circuitry: lipoxin, aspirin-triggered lipoxins and their receptor ALX. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2005;73:163–177. doi: 10.1016/j.plefa.2005.05.003.

114. Fukunaga K, Kohli P, Bonnans C, Fredenburgh LE, Levy BD. Cyclooxygenase 2 plays a pivotal role in the resolution of acute lung injury. *J. Immunol.* 2005;174:5033–5039.

115. Chan, M. M., & Moore, A. R. (2010). Resolution of inflammation in murine autoimmune arthritis is disrupted by cyclooxygenase-2 inhibition and restored by prostaglandin E2-mediated lipoxin A4 production. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 184(11), 6418–6426. doi:10.4049/jimmunol.0903816.

116. Warden S. J. (2007). Animal models for the study of tendinopathy. *British journal of sports medicine*, 41(4), 232–240. doi:10.1136/bjism.2006.032342.

117. Marcos RL, Leal Junior EC, Messias Fde M, de Carvalho MH, Pallotta RC, Frigo L,

dos Santos RA, Ramos L, Teixeira S, Bjordal JM, Lopes-Martins RÁ (2011) Infrared (810 nm) low-level laser therapy in rat achilles tendinitis: a consistent alternative to drugs. *Photochem Photobiol* 87:1447–1452.

118. Marcos, Rodrigo Labat. Efeito do laser de baixa potência (810 nM) na tendinite induzida por colagenase em tendão calcâneo de ratos [tese]. São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas; 2010. doi:10.11606/T.42.2010.tde-17122010-154634.

119. Tumilty S, Munn J, Abbott JH, McDonough S, Hurley DA, Baxter GD. Laser therapy in the treatment of achilles tendinopathy: a pilot study. *Photomed Laser Surg*. 2008;26(1):25-30.

120. Stergioulas A, Stergioula M, Aarskog R, Lopes-Martins RA, Bjordal JM. Effects of low-level laser therapy and eccentric exercises in the treatment of recreational athletes with chronic achilles tendinopathy. *Am J Sports Med*. 2008;36(5):881-7.

121. Gavish L, Perez L, Gertz SD (2006) Low-level laser irradiation modulates matrix metalloproteinase activity and gene expression in porcine aortic smooth muscle cells. *Lasers Surg Med* 38(8):779–786.

122. Schierwagen C, Bylund-Fellenius AC, Lundberg C. Improved method for quantification of tissue PMN accumulation measured by myeloperoxidase activity. *J Pharmacol Methods*. 1990 May;23(3):179-86.

123. Marcinkiewicz J, Biedroń R , Maresz K , Kwasny-Krochin B , Bobek H , Kontny E , Maśliński W , Cadeia B. Oxidative modification of type II collagen differentially affects its arthritogenic and tolerogenic capacity in experimental arthritis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2004 Jul-Aug;52(4):284-91.

124. Papayianni A, Serhan CN, Brady HR. Lipoxin A4 and B4 inhibit leukotriene-stimulated interactions of human neutrophils and endothelial cells. *J. Immunol*. 1996;156:2264–2272.

125. Kim ND, Chou RC, Seung E, Tager AM, Luster AD. Um requisito exclusivo para o receptor BLT1 do leucotrieno B4 para recrutamento de neutrófilos na artrite inflamatória. *J Exp Med*. 2006; 203 (4): 829–835. doi: 10.1084 / jem.20052349.

126. Griffiths RJ, et al. Leukotriene B4 plays a critical role in the progression of collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(2):517–521. doi: 10.1073/pnas.92.2.517.

127. Ku EC, Lee W, Kothari HV, et al. Effect of diclofenac sodium on the arachidonic acid cascade. *Am J Med* 1986; 80 Suppl. 4B: 18–23.

128. Tries S, Neupert W, Laufer S. The mechanism of action of the new antiinflammatory

compound ML3000: inhibition of 5-LOX and COX-1/2. *Inflamm Res.* 2002;51(3):135–143.

129. Kazuko Saeki, Takehiko Yokomizo. Identification, signaling, and functions of LTB₄ receptors, *Seminars in Immunology*, Volume 33, 2017.30-36, ISSN 1044-5323. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2017.07.010>.

130. da-Palma-Cruz, M., da Silva, R.F., Monteiro, D. et al. *Lasers Med Sci* (2019) 34: 191. <https://doi.org/10.1007/s10103-018-2688-1>.

131. Martin CA, Almeida VV, Ruiz MR, Visentainer JEL, Matshushita M, Souza NE, Visentainer JV. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. *Rev. Nutr* 2006; 19:761-70.

132. Calder PC. N-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr* 2006 (83): 1505S-19S.

133. Ariel A, Chiang N, Arita M, Petasis NA, Serhan CN. Os análogos de lipoxina A₄ e B₄ desencadeados por aspirina bloqueiam a secreção de TNF-alfa dependente de quinase regulada por sinal extracelular de células T humanas. *J. Immunol.* 2003; 170 : 6266–6272.

134. Bonnans C, Mainprice B, Chanez P, Bousquet J, Urbach V. A lipoxina A₄ estimula um aumento citosólico de Ca²⁺ no epitélio brônquico humano. *J. Biol Chem.* 2003; 278 : 10879-10884.

135. Maddox JF, Hachicha M, Takano T, Petasis NA, Fokin VV, Serhan CN. Os análogos estáveis da lipoxina A₄ são miméticos potentes que estimulam os monócitos humanos e as células THP-1 por meio de um receptor de lipoxina A₄ ligada à proteína G. *J. Biol Chem.* 1997; 272 : 6972–6978.

136. Levy BD, Clish CB, Schmidt B, Gronert K, Serhan CN. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nat Immunol* 2001;2:612–9.

137. Herová M., M. Schmid, C. Gemperle, M. Hersberger. 2015. ChemR23, the receptor for chemerin and resolvin E1, is expressed and functional on M1 but not on M2 macrophages. *J. Immunol.* 194: 2330–2337.

138. Arita M, Ohira T, Sun YP, Elangovan S, Chiang N, Serhan CN. Resolvin E1 selectively interacts with leukotriene B₄ receptor BLT1 and ChemR23 to regulate inflammation. *J Immunol.* 2007;178(6):3912–3917.

139. Bannenberg, G., & Serhan, C. N. (2010). Specialized pro-resolving lipid mediators in the inflammatory response: An update. *Biochimica et biophysica acta*, 1801(12), 1260–1273. doi:10.1016/j.bbalip.2010.08.002.

140. Dalli, J., Winkler, J.W., Colas, R.A., Arnardottir, H., Cheng, C.Y., Chiang, N., Petasis, N.A., and Serhan, C.N. (2013). Resolvin D3 and aspirin-triggered resolvin D3 are potent

immunoresolvents. *Chem. Biol.* 20, 188–201.

141. Clària, J., Dalli, J., Yacoubian, S., Gao, F., and Serhan, C.N. (2012). Resolvin D1 and resolvin D2 govern local inflammatory tone in obese fat. *J. Immunol.* 189, 2597–2605.

142. Serhan, C.N., and Chiang, N. (2013). Resolution phase lipid mediators of inflammation: agonists of resolution. *Curr. Opin. Pharmacol.* 13, 632–640, <http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2013.1005.1012>.

143. Lands WE Bioquímica e fisiologia dos ácidos graxos n-3. *FASEB J.* 1992; 6 : 2530–2536.

144. Araujo, P., Belghit, I., Aarsæther, N., Espe, M., Lucena, E., & Holen, E. (2019). The Effect of Omega-3 and Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids on the Production of Cyclooxygenase and Lipoxygenase Metabolites by Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Nutrients*, 11(5), 966. doi:10.3390/nu11050966.

145. Lattouf, R., Younes, R., Lutomski, D., Naaman, N., Godeau, G., Senni, K., & Changotade, S. (2014). Picrosirius Red Staining: A Useful Tool to Appraise Collagen Networks in Normal and Pathological Tissues. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 62(10), 751–758. <https://doi.org/10.1369/0022155414545787>.

146. Junqueira, LC, Bignolas, G, Brentani, RR (1979). Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J* 11:447-455.

147. Petri, M. H., Thul, S., Andonova, T., Lindquist-Liljeqvist, M., Jin, H., Skenteris, N. T., ... Bäck, M. (2018). Resolution of Inflammation Through the Lipoxin and ALX/FPR2 Receptor Pathway Protects Against Abdominal Aortic Aneurysms. *JACC. Basic to translational science*, 3(6), 719–727. doi:10.1016/j.jacbts.2018.08.005.

148. Chiang, N., Fierro, I. M., Gronert, K., & Serhan, C. N. (2000). Activation of lipoxin A(4) receptors by aspirin-triggered lipoxins and select peptides evokes ligand-specific responses in inflammation. *The Journal of experimental medicine*, 191(7), 1197–1208. doi:10.1084/jem.191.7.1197.

149. Chiang N, Serhan CN, Dahlen SE, Drazen JM, Hay DW, Rovati GE. et al. The lipoxin receptor ALX: potent ligand-specific and stereoselective actions *in vivo*. *Pharmacol Rev.* 2006;58(3):463–87.

150. Nan Chiang, Elena Barnaeva, Xin Hu, Juan Marugan, Noel Southall, Marc Ferrer, Charles N. Serhan. Identification of Chemotype Agonists for Human Resolvin D1 Receptor DRV1 with Pro-Resolving Functions. *Cell Chemical Biology*, Volume 26, Issue 2, 2019, Pages 244-254.e4, ISSN 2451-9456,

doi.org/10.1016/j.chembiol.2018.10.023.

151. Chiang, N., Dalli, J., Colas, R. A. & Serhan, C. N. Identification of resolvin D2 receptor mediating resolution of infections and organ protection. *J. Exp. Med.* 212, 1203–1217 (2015).

152. Oh, S. F., Dona, M., Fredman, G., Krishnamoorthy, S., Irimia, D., & Serhan, C. N. (2012). Resolvin E2 formation and impact in inflammation resolution. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 188(9), 4527–4534. doi:10.4049/jimmunol.1103652.

153. Spite, M., Hellmann, J., Tang, Y., Mathis, S. P., Kosuri, M., Bhatnagar, A., ... Haribabu, B. (2011). Deficiency of the leukotriene B4 receptor, BLT-1, protects against systemic insulin resistance in diet-induced obesity. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 187(4), 1942–1949. doi:10.4049/jimmunol.1100196.

8 - ANEXOS

Carta de aprovação no comitê de ética do uso de animais (CEUA), número: 2322171019



Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "ESTUDO EXPERIMENTAL DA TERAPIA POR FOTOBIMODULAÇÃO NA RESOLUÇÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO E NO CONTROLE DA DOR EM MODELO DE TENDINITE INDUZIDA POR COLAGENASE", protocolada sob o CEUA nº 2322171019 (ID 000196), 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 27/11/2019.

We certify that the proposal "EXPERIMENTAL STUDY OF PHOTOBIMODULATION THERAPY IN RESOLUTION OF THE INFLAMMATORY PROCESS AND CONTROL OF PAIN IN COLLAGENASE-INDUCED TENDINITE", utilizing 55 Heterogenics rats (55 males), protocol number CEUA 2322171019 (ID 000196), 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 11/27/2019.

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

Vigência da Proposta: de **11/2019** a **12/2022**

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

Origem: **Biotério - Unidade Vergueiro**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **3 a 6 meses**

N: **55**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **250 a 350 g**

Local do experimento: **Laboratório de pós graduação 3 subsolo vergueiro Biotério Uninove Vergueiro**

São Paulo, 27 de novembro 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