

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO

**Programa de Pós-Graduação em Biofotônica Aplicada às
Ciências da Saúde**

Soraya Piccirillo

**Efeito da Fotobiomodulação na expressão de NK1 e na Alodinia em
modelo de tendinite induzida por colagenase**

São Paulo, SP

2017

SORAYA PICCIRILLO

**Efeito da Fotobiomodulação na expressão de NK1 e na Alodínia em
modelo de tendinite induzida por colagenase**

Pesquisa apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde da Universidade Nove de Julho, como requisito para a etapa de defesa de Dissertação de Mestrado.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos

São Paulo, SP

2017

Piccirillo, Soraya.

Efeito da fotobiomodulação na expressão de NK1 e na Alodinia em modelo de tendinite induzida por colagenase. / Soraya Piccirillo. 2017.

48 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2017.

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

1. Tendinite. 2. Fotobiomodulação. 3. Alodinia. 4. Nocicepção 1. 5. NK1.

I. Marcos, Rodrigo Labat.

II. Título.

CDU 615.831

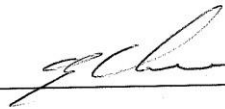
São Paulo, 14 de dezembro de 2017.

TERMO DE APROVAÇÃO

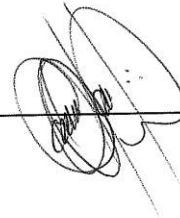
Aluna: SORAYA PICCIRILLO.

Título da Dissertação: "Efeito da fotobiomodulação na expressão de NK1 e na alodínia em modelo de tendinite induzida por colagenase em ratos".

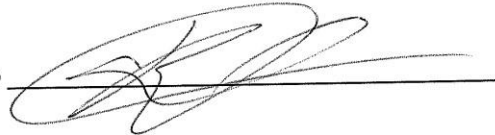
Presidente: PROF. DR. RODRIGO LABAT MARCOS



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



Membro: PROF. DR. RODRIGO LEAL DE PAIVA CARVALHO



Dedico este trabalho:

À minha amada filha, Sophia

AGRADECIMENTOS

A Deus, o Grande criador do Céu e da Terra, sem Ele não teria conseguido.

À minha família...

Meus pais Valdemar e Neusa que me ensinaram os verdadeiros valores de um ser humano: honestidade, humildade e compaixão...

À minha querida filha Sophia, a qual foi minha inspiração e principal motivo para que eu sempre buscasse a me tornar um ser humano melhor e exemplo para ela...

À minha querida irmã pelo apoio, palavras de conforto e fé...

Ao meu amor Edvan Charley, que foi meu companheiro durante toda essa jornada, me apoiando, sempre ao meu lado, com paciência e dedicação nos momentos mais difíceis...·.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos, pela orientação nos trabalhos desenvolvidos, dedicação apoio e amizade.

Aos amigos que me ajudaram no desenvolvimento desse trabalho Patrícia, Rachel, Torres, Rodney, Paulo, Marília, Marcia e companheiras de profissão Rita de Cassia e Cristina Capeola....

E por último mas não menos importante, Profa. Dra. Daniela Teixeira que esteve comigo me apoiando nos momentos de grande emoção...

MUITO OBRIGADA!!!!

*Deus não escolhe os capacitados... Capacita os escolhidos.
Fazer ou não fazer algo só depende de nossa vontade e perseverança.*

(Albert Einstein)

RESUMO

As tendinites são distúrbios na saúde do tendão que além da inflamação causam muita dor e limitação de movimento, sendo freqüentes e difíceis de serem tratadas. O tratamento mais utilizado ainda hoje é o farmacológico para o alívio da dor, porém com resultados pouco satisfatórios devido aos seus efeitos colaterais no uso prolongado. Neste contexto, a busca por terapias principalmente não farmacológicas no tratamento da tendinite, assume papel importante na área da saúde. A fotobiomodulação tem sido utilizada em doenças articulares com efeitos analgésicos. Contudo o mecanismo de ação ainda não foi totalmente elucidado. O objetivo do trabalho foi de avaliar o efeito da fotobiomodulação na expressão de neurocinina NK1, COX-2, no infiltrado inflamatório e na alodinia mecânica. Foram utilizados 32 ratos wistar machos. Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cloridrato de quetamina e Xilasina (90mg/Kg e 10mg/Kg) e foram distribuídos em 4 grupos: CTL (Controle), NT (Tendinite Não Tratado), DIC (Tendinite tratado com Diclofenaco IP) e L3J (Tendinite tratado com laser 830nm, 3J, 100mW). Os grupos NT, DIC e L3J receberam 100 µl de injeção transcutânea de colagenase (1mg/ml) na mesma região do tendão calcâneo. O teste de alodínia foi realizado após 24h da indução da tendinite. Em seguida os animais foram eutanasiados e o tendão removido para análise histológica e bioquímica. Resultados: Foi observado maior infiltrado inflamatório no grupo NT, comparado ao grupo DIC e L3J. Houve também aumento da expressão proteica de COX-2 no grupo NT e diminuição nos grupos DIC e L3J. A alodinia mecânica aumentou no grupo NT comparado aos grupos tratados (DIC e L3J). Conclusão: A fotobiomodulação (830nm, 100mW, 3J), utilizada no tratamento da tendinite induzida por colagenase em ratos, foi eficaz na melhora da alodinia nociceptiva. O mecanismo envolvido está relacionado a redução do processo inflamatório pela redução da expressão de COX-2, bem como a redução da expressão gênica de receptores NK1, demonstrando também diminuição do infiltrado inflamatório.

Palavras-Chave: Tendinite, Fotobiomodulação, Laser de baixa intensidade, Alodinia, Nocicepção, Neurocinina 1, NK1.

ABSTRACT

Tendinopathys is a disturbance in tendon health which, in addition to inflammation, causes a lot of pain and movement limitation, being frequent and difficult to treat. The most widely used treatment today is the pharmacological treatment for pain relief, but with unsatisfactory results due to its side effects in prolonged use. In this context, the search for therapies mainly non-pharmacological in the treatment of tendinitis, assumes important role in the health area. Photobiomodulation has been used in joint diseases with analgesic effects. However the mechanism of action has not yet been fully elucidated. The objective of this work was to evaluate the effect of photobiomodulation on the expression of neurokinin NK1, COX-2, inflammatory infiltrate and mechanical allodynia. Thirty-two male Wistar rats were used. The animals were anesthetized with intraperitoneal injection of ketamine hydrochloride and Xilasina (90mg / kg and 10mg / kg) and were divided into 4 groups: CTL (Control), NT (Tendonitis Untreated), DIC (Tendonitis treated with Sodium Diclofenac IP) and L3J (830nm laser treated tendinitis, 3J, 100mW). Groups NT, DIC and L3J received 100 µl of transcutaneous injection of collagenase (1mg / ml) in the same region of the calcaneus tendon. The allodynia test was performed after 24 hours of tendinitis induction. Then the animals were euthanized and the tendon removed for histological and biochemical analysis. Results: Greater inflammatory infiltrate was observed in the NT group, compared to the DIC and L3J groups. There was an increase in the protein expression of COX-2 and NK1 in the NT group and a decrease in the DIC and L3J groups. Mechanical allodynia presented a greater alteration in the NT group compared to the treated groups (DIC and L3J). Conclusion: Photobiomodulation (830nm, 100mW, 3J), used in the treatment of collagenase-induced tendinitis in rats, was effective in improving nociceptive allodynia and modulating COX-2 and NK1 protein expression, also demonstrating a decrease in inflammatory infiltrate.

Keywords: Tendonitis, Photobiomodulation, LLLT, Allodynia, Nociception, Neurokini 1, NK1.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	Tendinite.....	14
1.2	Inflamação e Nocicepção.....	15
1.3	Tratamentos para tendinite.....	19
1.4	Fotobiomodulação.....	20
2	HIPÓTESE.....	24
3	OBJETIVOS.....	25
3.1	Objetivos Específicos.....	26
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1	Animais.....	26
4.2	Indução da Inflamação em tendão calcâneo de ratos.....	26
4.3	Grupos Experimentais.....	27
4.4	Aplicações da fotobiomodulação.....	28
4.5	Análise Histológica: Observação da migração leucocitária.....	28
4.6	Análise da expressão de Neurocinina-1 (NK1) por Western Blotting... ..	29
4.7	Análise de Alodinia Mecânica.....	30
4.8	Análises estatísticas.....	31
5	RESULTADOS.....	32
5.1	Resultados histológicos.....	32
5.2	Resultados da Expressão Proteica de COX-2.....	37
5.3	Resultados da Expressão Proteica de NK-1.....	38
5.4	Resultados da Alodinia Mecânica.....	40
6	DISCUSSÃO.....	41
7	CONCLUSÕES.....	45
8	REFERÊNCIAS.....	46

LISTA DE SIGLAS

ANOVA – Analise of Variance (análise de variância)

Laser – Light amplified by stimulated emission of radiation (amplificação da luz por emissão estimulada de radiação)

LLLT – Low level laser therapy (terapia laser de baixa potência)

RPM – rotações por minuto

TGF- β – Transforming growth factor beta (Fator de transformação do crescimento beta)

LISTA DE SIMBOLOS E ABREVIATURAS

λ - comprimento de onda

AsGaAl – Arseneto de Galio e Aluminio

cm² – centímetro quadrado

g – grama

J – joule

J/cm² – joules por centímetro quadrado

kg – quilograma

Ks – rigidez

mL – mililitro

mm- milímetro

mW – miliwatt

NK- - Neurocinina 1

nm – nanômetro

S – Segundos

μ L – 10⁻⁶ litros

m - micrometros

W – Watts

COX-2 – Cicloxigenase 2

CTL- controle

HE – hematoxilina e eosina

IL – 1- Interleucina 1

IL – 6- Interleucina 6

NT – lesão não tratado

LISTAS DE FIGURAS

- Figura 1. Tendinite em tendão calcâneo (Aquiles) de humano (vista lateral).....pag. 15
- Figura 2. Grupos experimentais do projeto de pesquisa..... pag. 27
- Figura 3: Fotomicrografia de . um corte . longitudinal do tendão sadio de rato do grupo controle (CTL), Presença de .vasos sanguíneos (V) na .região . peritendínea (PR). 100X. pag.32
- Figura 4: Fotomicrografia de um corte longitudinal do tendão rato, região peritendinea do grupo tendinite sem tratamento (NT). Presença de vasos sanguíneos (V) e neutrófilos (N) na região peritendínea (PR). 100X pag.33
- Figura 5: Fotomicrografia de um corte longitudinal do tendão calcâneo de ratos do grupo tendinite tratado com diclofenaco (DIC). Presença de vasos sanguíneos (V) e neutrófilos (N) na região peritendínea (PR). 100X..... pag.34
- Figura 6: Fotomicrografia de um corte longitudinal do tendão calcâneo de ratos do grupo tendinite tratado com fotobiomodulação (L3J). Presença de vasos sanguíneos (V) e neutrófilos (N) na região peritendínea (PR). 100X. pag. 35
- Figura 7. Resultados da expressão proteica de COX-2..... pag.38
- Figura 8. Resultados da expressão proteica de neurocinina-1 (NK1)..... pag.39
- Figura 9. Análise de Alodinia Mecânica..... pag.40

LISTAS DE QUADROS

Quadro 1: Parâmetros do laser de baixa intensidadepag.28

Quadro 2. Comparação das fotomicrografias conforme tratamentos realizados..... .pag.35

1 INTRODUÇÃO

A nocicepção ou algesia é um termo utilizado para a recepção de estímulos aversivos. A transmissão, modulação e percepção de estímulos agressivos são caracterizadas uma experiência sensitiva e emocional desagradável associada ou relacionada a uma lesão real ou potencial dos tecidos sendo uma das grandes preocupações da humanidade até os dias de hoje¹.

No Brasil e outros países a nocicepção está presente em mais de 70% dos pacientes que buscam atendimento na área da saúde². Esse argumento enfatiza a importância da busca terapêutica que permitam uma melhor abordagem da nocicepção.

As lesões osteomusculares, dentre elas as tendinites, são consideradas como lesões que causam inflamação aguda e imediata acompanhado por dor e limitações mecânicas, implicando em afastamentos laborais tornando-se assim uma preocupação de saúde pública³.

Sabe-se que ainda hoje o tratamento farmacológico é o mais utilizado, porém com resultados pouco satisfatórios devido aos seus efeitos colaterais. Diante desse cenário essas lesões estão sendo cada vez mais estudadas na tentativa de se realizar uma terapêutica mais eficaz e sem efeitos adversos⁴.

A fotobiomodulação tem se mostrado bastante eficiente em processos inflamatórios⁵, no entanto, novas pesquisas são necessárias para conhecer a ação no mecanismo da nocicepção. Estudos indicam que a fotobiomodulação está sendo capaz de reduzir o nível de nocicepção de forma não invasiva, sem efeitos colaterais, sendo de grande aplicabilidade, contudo otimizar a dosimetria é um fator determinante para o sucesso dessa terapia.

1.1 TENDINITE

As tendinites são alterações na saúde do tendão, difíceis de serem tratadas, acometem desde atletas profissionais e recreacionais até pessoas comuns impossibilitando-as não somente às atividades laborais como também em limitações do dia a dia⁶.

Devido essa ocorrência, do custo do tratamento, da redução da funcionalidade laboral e do desencadeamento de co-morbidades, as tendinites necessitam de recursos financeiros consideráveis, direcionados ao acompanhamento da saúde dos indivíduos vítimas destas patologias, principalmente nos casos em que a incapacidade no trabalho persiste além do tempo médio para o retorno às atividades laborais, tornando-se um grande problema de saúde pública, sócio-econômico onde as intervenções médicas e terapias para a reabilitação são ainda limitadas e de difícil acesso pela maior parte das pessoas⁷.

A tendinite é considerada uma doença inflamatória aguda com possibilidade de cronificação, provavelmente devido às características do tecido e da dificuldade no tratamento⁶.

Em geral, a resposta inflamatória visa combater o agente agressor e eliminar produtos resultantes da destruição celular, promovendo condições ideais para o reparo do tecido lesado⁸.

No caso da tendinite, a causa mais comum é o esforço exagerado de extensão sobre os tendões, responsável por 30% das lesões⁹, podendo ocorrer também à distensão das fibras de colágeno, que por não suportarem a tração mecânica, acabam apresentando rupturas parciais com desenvolvimento de intensa dor local, reação inflamatória e limitação funcional, que se não forem tratadas leva ao estado crônico da doença¹⁰, além da sobrecarga mecânica e esforços repetitivos, o próprio envelhecimento natural também contribuem para a degeneração do tendão¹¹.



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

1.2 Inflamação e Nocicepção

A reação inflamatória é o mecanismo fisiopatológico básico em resposta a diversas doenças sendo representada por um conjunto de reações locais e gerais do organismo. Ela é composta por uma série de fenômenos complexos que se associam e se complementam, formando uma reação em cascata, que envolve células inflamatórias, como: neutrófilos, linfócitos e monócitos/macrófagos⁸.

Durante a resposta inflamatória ocorre estimulação de mediadores químicos, conhecido como mediadores inflamatórios. Esses mediadores inflamatórios visam combater o agente agressor e eliminar produtos resultantes da destruição celular, promovendo condições ideais para a reparação do tecido lesado. Inicialmente, a defesa inata, não induzida, objetiva solucionar o problema com a ativação do sistema complemento e pelos macrófagos residentes. No entanto, se o agente agressor não for

neutralizado nessa etapa de defesa inicial, uma segunda via de resposta é induzida: a esposta inflamatória aguda¹².

Durante a resposta inflamatória aguda observa-se: 1) Mudança de calibre e fluxo na microcirculação, que leva a uma vasodilatação arteriolar. 2) Aumento da permeabilidade vascular, que leva a formação de exsudato rico em proteínas e edema local. 3) Migração de leucócitos do sangue circulante para o local da lesão. Este leucócito tem a função decisiva no combate ao estímulo lesivo, não somente devido a sua função fagocitária, como também pela produção e liberação de mediadores químicos.

O aumento da permeabilidade promove extravasamento de proteínas plasmáticas para o espaço intersticial que somando ao aumento de pressão hidrostática de filtração e pressão osmótica intersticial, leva a formação do edema.

Em geral, as alterações do fluxo e do calibre vascular iniciam-se rapidamente após a agressão e se desenvolvem em velocidades variáveis que dependem da capacidade lesiva do agente irritante, das características do tecido afetado, da espécie animal e da coexistência de estados patológicos¹³.

As prostaglandinas, produtos do ácido araquidônico por ação das enzimas ciclooxigenase, são mediadores lipídicos que desempenham importantes papéis no processo inflamatório e nociceptivo, e a interferência em sua síntese determina uma sensível redução nas alterações proporcionadas pela inflamação¹⁴.

A inibição da síntese de prostaglandinas é o mecanismo de ação de muitos antiinflamatórios não-hormonais, sendo assim a PGE₂ é um mediador inflamatório com importantes ação no tendão. A ciclooxigenase é a primeira enzima no caminho de conversão do Ácido Araquidônico em Prostaglandina. A produção de PGE₂ via COX-2 é regulada nas regiões onde o processo inflamatório foi instalado e sua produção está diretamente ligada com a dor.

A nocicepção é um mecanismo de defesa do organismo, que alerta de que seus tecidos podem estar em perigo. A nocicepção envolve componentes sensoriais, comportamentais, emocionais e culturais¹⁵.

O organismo possui um sistema de controle da nocicepção. Um dos locais que controlam essa nocicepção é o Tronco Cerebral. Existem várias formas que o organismo usa para inibir a nocicepção. Durante o estímulo nociceptivo, várias áreas são ativadas no cérebro. Substâncias são estimuladas e liberadas atuando em vários pontos do neurônio. Este sistema de controle ameniza a alodinia e permite uma reação mais adequada a nocicepção. A inflamação e a nocicepção, frequentemente seguem alguns padrões entre seus mediadores e substâncias liberadas¹⁶.

Os Receptores Sensoriais, nos casos os Nociceptores, captam um sinal e traduzem em um estímulo elétrico (potencial de ação) que percorre por um neurônio até chegar na parte posterior da medula, passa do sistema periférico para o sistema central, interpretado pelo córtex como nocicepção¹⁷.

No terminal do axônio, os receptores encapsulados, através da estimulação de uma área, abrem os canais de sódio, graduado de acordo com o estímulo. Por exemplo, se o estímulo for pequeno como um corte na pele a entrada pelo canal de sódio também será pequena. Se o primeiro potencial de ação não atingir o limiar, os canais de sódio da fibra nervosa não se abrem¹⁸.

Os receptores são encontrados em qualquer área do corpo humano e podem gerar alodinia nociceptiva tanto externamente quanto internamente. Temos como exemplo, a nocicepção externa, produzida em tecidos como a pele, cujo estímulo é captado por neuroceptores cutâneos. Existem 4 (quatro) etapas da nocicepção: Transdução, Transmissão, Modulação e Percepção¹⁹.

Durante a fase de inflamação vários mediadores são liberados e estimulados, dos quais, podemos considerar e citar as Neurocininas 1, sendo a Substancia P uma das neurocininas de suma importância nesse processo, pois age como um neurotransmissor

que se liga ao seu receptor NK1 que estão diretamente relacionado com a alodinia nociceptiva, e evidenciam a participação da nocicepção na tendinite²⁰.

A Neurocinina Substância P é um Neurotransmissor neuropeptídeo, presente nos processos inflamatórios, e está diretamente envolvido na nocicepção. Pode ser encontrado tanto no sistema nervoso central quanto no periférico. Possui um grande número de funções, dependendo do receptor. Quando a inervação dos terminais nervosos da Substância P é danificada, as células pós-sinápticas compensam a perda aumentando a sensibilidade dos receptores pós-sinápticos. Essa condição, conhecida como hipersensibilidade por denervação, resulta em uma excessiva sensibilidade nociceptiva¹⁷.

A Substância P tende a se ligar no receptor NK1 para facilitar a transmissão e sinais de nocicepção para o sistema nervoso central (SNC). Envolvidos nessa transmissão nociceptiva, conduz as comunicações entre as células nervosas (neurônios). A substância P está diretamente associada em dores e inflamação músculo-esquelética. Essa substância tramita pelo fluido espinal (líquido cefalorraquidiano) pela medula espinal até chegar no córtex. A substância P tende a deixar as fibras-C menos tolerante a dor. Essas fibras C são prolongações delgadas dos neurônios, exatamente dentro do axônio, mais de 50% das fibras sensoriais são do tipo C. Sendo assim, os níveis aumentados de substância P aumentam a nocicepção¹⁷.

Os receptores NK1 são distribuídos por todo o corpo, principalmente nas células endoteliais e quando ativados pela SP, podem atuar como mediador pró-inflamatório, aumentando a permeabilidade vascular e a migração leucocitária durante o processo inflamatório sendo também importante na nocicepção, pois através dos receptores NK1 é realizada a manutenção da alodinia nociceptiva. O aumento dos níveis de SP no líquido sinovial está diretamente relacionado ao aumento da temperatura intra-articular e na alodinia nociceptiva¹⁵.

1.3 Tratamentos para tendinite

Os tratamentos para tendinite têm por finalidade a redução da inflamação, diminuição da alodinia nociceptiva e conseqüentemente melhora da função motora. Caso não se busque tratamento conseqüências como o aumento de determinadas enzimas, prolongando assim as fases inflamatória e proliferativa podem ocorrer, piorando a alodinia nociceptiva, favorecendo a deposição excessiva de tecido cicatricial, alterando algumas características como a redução da resistência em comparação ao tendão original e causando um prejuízo ainda maior na função motora²¹.

Os antiinflamatórios não esteroidais são as drogas utilizadas com mais freqüência, como parte do tratamento inicial, principalmente na redução da dor²². Dentre os diversos tipos de drogas nesta classe, os inibidores específicos da enzima ciclo-oxigenase-2 (COX-2) tem apresentado efeito favorável no tratamento destes transtornos. No entanto, o impacto econômico das terapias para a melhora da tendinite com o uso de drogas antiinflamatórias é consideravelmente alto, devido aos custos da medicação, hospitalização e toxicidade destes agentes, principalmente com relação a efeitos adversos gastrointestinais e cardiovasculares²³ com resultados pouco efetivos, levando a lesões recorrentes²⁴.

Vários métodos de tratamento para tendinite já foram testados, porém seus resultados e sua eficiência ficam distante das características de um tendão original e sadio. Conseqüentemente é necessário desenvolver novos métodos terapêuticos eficazes que evitem o processo inflamatório e de dor na tendinite²⁵.

Atualmente especialistas buscam técnicas que acelerem o reparo do tendão, controlando o processo inflamatório a nocicepção e possivelmente, restaurando suas propriedades mecânicas iniciais²⁶. No entanto, mais pesquisas relacionadas ao reparo do tendão, incluindo o estudo da redução da inflamação e da reorganização dos neurotransmissores nociceptivos, conduzindo assim para uma melhora na sua função

mecânica, são necessárias para permitir o desenvolvimento de estratégias e tratamentos específicos para esta doença. Sendo assim, a investigação de novas terapias para utilização em tendinites, especialmente não farmacológica, assume papel de destaque na área da saúde e neste cenário.

1.4 Fotobiomodulação

Na última década, diversos trabalhos científicos ajudaram na compreensão dos efeitos fotobiomoduladores do laser de baixa intensidade em diversas patologias relacionadas ao processo inflamatório e no controle da dor. Porém, apesar de todas as investigações realizadas e do importante uso clínico da fotobiomodulação, o conhecimento de seu mecanismo ainda não foi totalmente esclarecido.

O termo LASER, (Light Amplification by emission of radiation) quer dizer amplificação da luz pela emissão estimulada da radiação, sendo que as características que definem a luz de uma lâmpada são: Monocromaticidade, colimação e coerência²⁷.

A coerência sendo uma das propriedades da luz laser, ao penetrar no tecido, esta propriedade se perde nos primeiros extratos da pele. Isto ocorre devido a grande variedade de estruturas celulares que compõe a pele²⁸. Segundo esses autores, apesar da perda da coerência no interior dos tecidos, a irradiação ainda se absorve pelas células, gerando alterações no seu metabolismo tanto em tecidos superficiais como profundos²⁹.

Os lasers podem ser classificados em dois grandes grupos, os lasers cirúrgicos de alta intensidade (HLT - High Intensity Laser Treatment) e lasers não cirúrgicos de baixa intensidade (LLT – Low Intensity Laser Treatment).

Em geral, quase todas as aplicações com HLT tomam por base os efeitos fototermicos e fotoablativos do laser no tecido, sendo usados para cortar, destruir, soldar,

remover tatuagens, entre outros efeitos. Em contraste, nas décadas de 60 e 70 os pesquisadores voltaram-se para as aplicações com LLT e essas se baseiam nas interações atômicas da luz laser com o tecido, produzindo efeitos de Biomodulação³⁰.

O tecido biológico apresenta pouca homogeneidade do ponto de vista óptico, assim toda a radiação eletromagnética ao incidir sobre o tecido, se desdobra uma parte sendo refletida e a outra absorvida. A reflexão varia com o ângulo de incidência da luz e as propriedades ópticas da superfície do tecido. Alguns trabalhos comprovam que a reflexão da luz laser na pele apresenta 4-7%, quando esta for incidida forma perpendicularmente, variando para mais com a aplicação de pomadas, líquidos e secreção sebácea³¹. Então, de 93-97% da irradiação incidente na superfície penetra nos substratos subsequentes, a pele e na derme, encontrando substâncias com índice de refração diferente. Dessa forma os fótons vão se distribuir de acordo com a absorção de cada estrutura, pois a função fotorreguladora determina qual comprimento de onda de cada estrutura será capaz de absorver e com isso promover transformações na atividade funcional e metabólica da célula.

A fotobiomodulação parece agir sobre organelas celulares (mitocôndrias e membranas), gerando aumento da síntese de ATP e modificando o transporte iônico. Dessa forma o laser, em curto prazo, acelera a glicólise e a oxidação fosforilativa e em longo prazo a transcrição e a replicação do DNA³⁰.

Acredita-se que a ação da fotobiomodulação sobre o tecido está relacionado à possibilidade de inibição do aparecimento de fatores quimiotáticos nos estágios iniciais da inflamação, de interferir com o efeito dos mediadores químicos induzidos pela inflamação³², inibir a síntese das prostaglandinas³³, além de inibir o esfíncter pré-capilar, através de mediadores químicos.

A terapia de fotobiomodulação no tratamento de diferentes doenças, com o objetivo de produzir um efeito anti-inflamatório e analgésico vem sendo bastante citado em diversas publicações de caráter científico, fazendo com que esta terapia já seja considerada como alternativa terapêutica para várias doenças³⁴.

É importante ressaltar que ainda pouco se conhece a respeito do mecanismo de ação da fotobiomodulação no processo nociceptivo, devido a isso muitas pesquisas ainda estão sendo realizadas, porém com resultados promissores. Até o momento, existem evidências que a fotobiomodulação pode reduzir a expressão de importantes mediadores pró-inflamatórios e aumentar a expressão de outros mediadores antiinflamatórios, reduzirem os mediadores responsáveis pela alodinia nociceptiva e melhorar a função mecânica.

Diante de tantas pesquisas e trabalhos publicados, o estudo de alternativas terapêuticas como, por exemplo, a fotobiomodulação, representa um fator altamente relevante para o Sistema de Saúde. No entanto, o estabelecimento de parâmetros experimentais, com estudos relacionados à sua dosimetria e ao seu mecanismo de ação, nos diferentes marcadores de nocicepção e inflamação, se faz extremamente necessários no auxílio da utilização da fotobiomodulação de forma adequada e segura.

Acredita-se que a ação da fotobiomodulação sobre o tecido esta relacionada a possibilidade de inibição do aparecimento de fatores quimiotáticos nos estágios iniciais da inflamação, de interferir com o efeito dos mediadores químicos induzidos pela inflamação³², inibir a síntese das prostaglandinas²⁰ além de inibir o esfíncterpre-capilar, através de medidores químicos.

Estudos adicionais sobre o efeito da fotobiomodulação sugerem que a resposta inflamatória pode ser normalizada ou reduzida pela ação fotoquímica da fotobiomodulação, sugerindo uma ação seletiva da COX-2. Foram investigados os efeitos do laser de baixa intensidade em cultura de células e observaram que ocorreu a inibição

da síntese de PGE2 sugerindo ser este o mecanismo analgésico para dores músculo-esqueléticas³³. Em estudos no processo de inflamação da tendinite, observaram redução da PGE2 plasmático e PGE2 sinovial³², sugerindo que a fotobiomodulação foi capaz de inibir os efeitos quimiotáticos dos estágios iniciais da inflamação ou podem interferir na formação de mediadores químicos derivados da ciclooxigenase.

Nos últimos anos, inúmeros estudos foram realizados para que a fotobiomodulação seja considerada como alternativa terapêutica para várias doenças entre elas as doenças musculares esqueléticas como a tendinite.

Estudos adicionais sobre o efeito anti-inflamatório e analgésico da fotobiomodulação ainda se fazem bastante necessários e seu mecanismo de ação deve ser investigado a fim de compreender suas ações nos diferentes modelos experimentais em que vem sendo utilizados.

2 HIPÓTESE

A fotobiomodulação poderia promover analgesia pela modulação no processo inflamatório, melhorando a dor através da alteração na expressão de neurocinina, alterando assim a manutenção da inflamação com melhora em parâmetros funcionais.

3 OBJETIVOS

Estudar o efeito da fotobiomodulação na nocicepção após a indução da tendinite pela injeção de colagenase, investigando substâncias neurotransmissoras da dor, características histológicas e alodinia mecânica do tendão de ratos.

3.1 Objetivos Específicos

- Avaliar a síntese protéica de COX-2 e Neurocinina-1 (NK1) em modelo experimental de tendinite induzida por colagenase;

- Observar a presença de infiltrado inflamatório a partir das análises histológicas do tendão de ratos em modelo experimental de tendinite induzida por colagenase;

- Avaliar a interferência dos tratamentos farmacológico e de fotobiomodulação na alodinia mecânica dos tendões de ratos em modelo experimental de tendinite induzida por colagenase ;

- Comparar os tratamentos utilizados entre farmacoterapia e fotobiomodulação em modelo experimental de tendinite induzida por colagenase.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados 32 ratos Wistar machos pesando entre 300 e 350g (+/- 60 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, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Nove de Julho AN0037/2013.

4.2 Indução da Inflamação em Tendão Calcâneo de Ratos

A indução da tendinite foi realizada em todos os animais exceto o grupo controle que apresentou tendão saudável, sem lesão. Os animais dos grupos lesionados foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cloridrato de quetamina (90mg/Kg) e cloridrato de Xilazina (10mg/Kg). Em seguida, receberam 100 µl de injeção transcutânea de colagenase (1 mg/ml; Sigma Chemical Co, Cat. C-6885) na região posterior de ambas as patas, no tendão calcâneo. Após a indução da tendinite, os animais retornaram para as caixas de contenção e foram distribuídos em 4 grupos experimentais. Uma hora (1h) após a indução do processo inflamatório pela injeção de colagenase os animais dos grupos DIC e L3J foram tratados com diclofenado ou laser, respectivamente. Após 24h foi analisada a alodinia mecânica e os animais foram eutanasiados com hiperdose da mesma associação de anestésicos (cloridrato de quetamina 180mg/Kg e cloridrato de xilasina 30mg/Kg) e o tecido do tendão foi então dissecado e removido para análise histológica e bioquímica.

4.3 Grupos Experimentais

Os animais foram distribuídos em 4 grupos (fig 2) descritos a seguir:

- Grupo 1: (CTL): Grupo controle. Animais com tendões íntegros (N=8).
- Grupo 2: (NT): Tendinite induzida por colagenase no tendão calcâneo (N=8).
- Grupo 3: (DIC): A lesão foi induzida e os animais foram tratados com injeção de Diclofenaco de Sódio (1mg/Kg) na região intraperitoneal, 1 hora após a indução da tendinite (N=8).
- Grupo 4: (L3J): A lesão foi induzida e os animais foram tratados com laser de baixa intensidade (830nm; 3J; 100mW) pontual e perpendicular, no local da lesão (N=8)

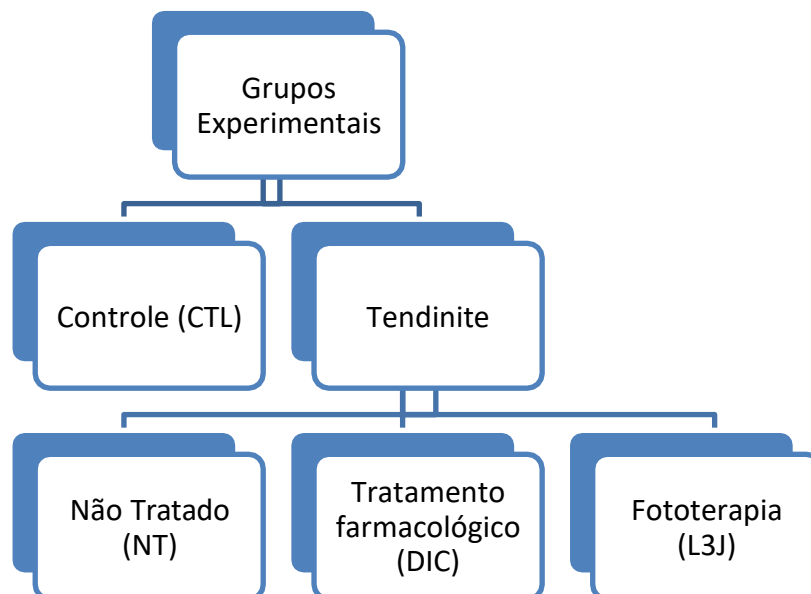


Figura 2: Grupos experimentais do projeto de pesquisa.

4.4 Aplicações da fotobiomodulação

Após o processo de indução da tendinite pela injeção de colagenase, os animais receberam irradiações com Laser de baixa intensidade com comprimento de onda 830nm, com 100mW de potência (Thera Lase, DMC®), na região da lesão, em único ponto, perpendicular ao tecido, numa área de 0,028 cm² por contato, com energia de 3J, de acordo com o grupo experimental, em uma única irradiação durante 30 segundos 01 hora após a indução do processo inflamatório. O tempo de Irradiação e os parâmetros de irradiação foram os indicados no quadro abaixo:

Comprimento de Onda (nm)	Grupo	Potência média de saída (mW)	Densidade de potência (W/cm ²)	Energia (J)	Densidade de energia (J/cm ²)	Tempo por ponto (s)	Área do feixe (cm ²)
830	L3J	30	3.5	3	107,14	30	0,028

Quadro 1. Parâmetros do laser de baixa intensidade.

4.5 Análise histológica: Observação da migração leucocitária no tecido tendíneo

Após os tratamentos e eutanásia, os tendões removidos foram mantidos em formol (10%). Em seguida passaram pelo processo de desidratação, diafanização, impregnação por parafina, cortes longitudinais, hidratação e montagem das lâminas histológicas. As lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) e a região peritendínea foram

observadas e fotografadas com objetiva de 10X. Foi analisada a presença de infiltrado inflamatório.

4.6 Análise da Expressão Protéica de COX-2 e NK1 por Western-Blotting.

Após os tendões serem homogeneizados, o conteúdo proteico presente no sobrenadante foi determinado pelo método de Bradford (1976) empregado kit comercial (Bio Rad, EUA).

Foram utilizados 25 μ l da proteína presente nas amostras, separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo Lauril Sulfato de Sódio (SDS-PAGE), conforme originalmente descrito por Laemmli (1970). As bandas proteicas foram transferidas eletroforéticamente através de sistema submerso para a membrana de nitrocelulose (Hybond-ECL, Amersham Pharmacia; 150 mA, 2 horas).

Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo à membrana foram bloqueados mediante incubação da mesma com solução de caseína à 0,2%, preparada em tampão TBS+t (TRIS 20 mM + NaCl 137 mM contendo 0,1% de Tween 20).

A seguir as membranas foram incubadas com os anticorpos primários específicos para Neurocinina 1 e após lavagem apropriada em TBS-t (6 lavagens de 10 minutos cada), as membranas foram incubadas com anticorpos secundários (anti-camundongo conjugado com fosfatase alcalina 1:3000; Bio Rad, EUA).

As membranas foram submetidas a uma nova série de lavagens em TBS-t e as bandas imunoreativas foram reveladas por quimiluminescência (Lumiphos, Pierce, EUA). As imagens foram captadas mediante sistema Chemilmager (Alpha Innotech, EUA) e as intensidades das bandas (como medida do grau de expressão da proteína) foram determinadas por análise densitométrica. Um controle da quantidade de proteínas aplicada em cada poço foi realizado corando-se a membrana com solução Ponceau 0,2%.

Os resultados de densitometria serão expressos em % em relação ao grupo controle (100%).

4.7 Análise de Alodinia Mecânica

Para a avaliação da alodinia mecânica, foi utilizado o teste de Von Frey que é um método para avaliar a sensibilidade tecidual ao estímulo mecânico.

O experimento foi realizado com um algômetro de pressão eletrônico, que consiste em um transdutor de pressão adaptado a um contador digital de força expressa em gramas (g). O contato do transdutor de pressão com a região calcânea do animal é realizado através de uma ponta descartável de polipropileno.

Os animais foram colocados em caixas de acrílico durante 15-30 minutos para adaptação. O assoalho da caixa é feito de arame não maleável na forma de rede. As alterações nos limiares nociceptivos foram avaliadas exercendo-se uma pressão linearmente crescente na região calcânea do rato onde foi induzida a inflamação até a produção de uma resposta caracterizada de dor, normalmente a retirada da pata pelo animal.

A intensidade de hipernocicepção é quantificada como a variação na pressão obtida subtraindo-se a média de três valores expressos em gramas observadas antes do procedimento experimental da média de três valores em gramas observado após a administração dos estímulos, que variam de acordo com o experimento.

Foram realizadas leituras durante 3 dias antes da indução da tendinite, com 3 valores de leitura em cada dia e de cada animal. No 4º dia foi realizada a indução da tendinite pela injeção de colagenase. Após 24hs da indução da tendinite e durante os próximos 3 dias, foram realizadas as leituras também com 3 valores de leitura de cada

animal por dia, Após 7 dias de testes os animais foram eutanasiados para remoção dos tendões e análises histológicas e bioquímicas, descritos anteriormente.

Desse modo foi avaliado o aumento da sensibilidade tecidual bem como a variação do limiar de alodinia de cada grupo experimental.

4.8 Análise Estatística

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

5 RESULTADOS

5.1 Resultados Histológicos

Foram analisados e comparados os tendões sadios e tendões 24 horas após a indução da tendinite em tratados ou não. Foi analisada a presença de infiltrado inflamatório na região peritendínea.

Na figura 3, foi observada a presença de vasos sanguíneos, porém não foram encontrados infiltrados inflamatório.

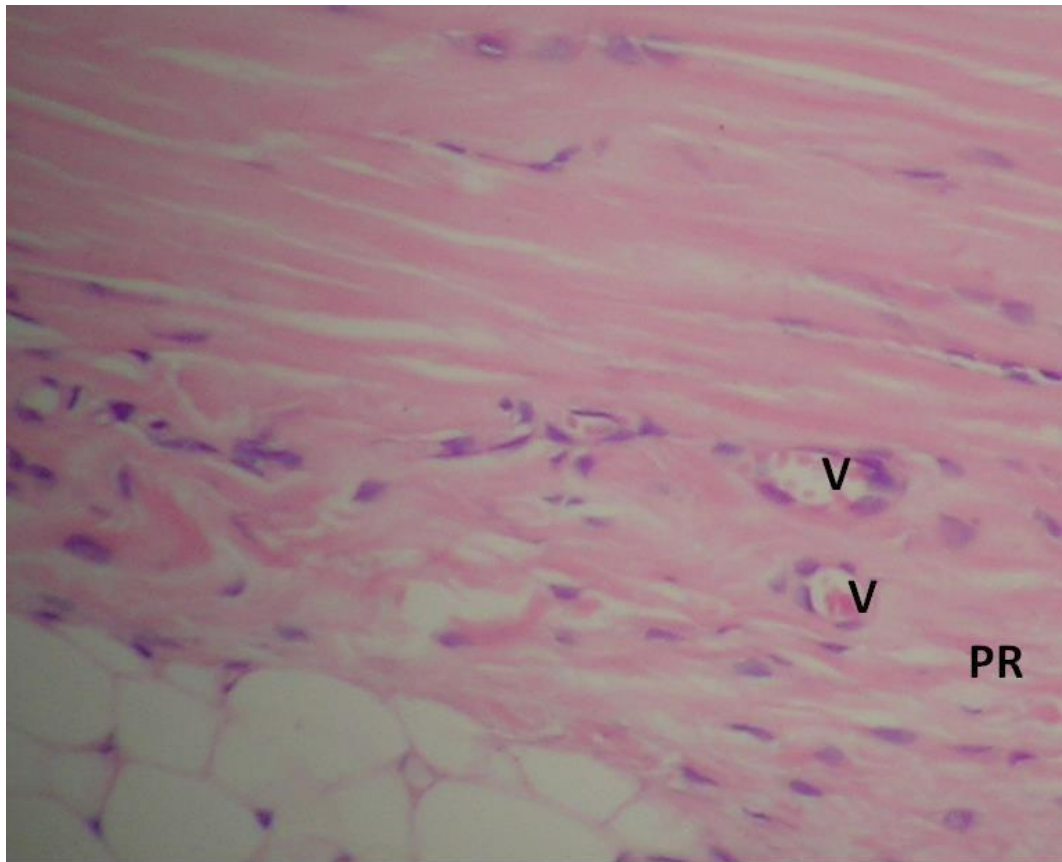


Figura 3: Fotomicrografia de um corte longitudinal do tendão sadio de rato do grupo controle (CTL), Presença de vasos sanguíneos (V) na região peritendínea (PR). 100X.

Figura 4 representa a fotomicrografia da região do tendão calcâneo do grupo tendinite sem tratamento (NT). Foi observado intenso infiltrado inflamatório e vasos sanguíneos aumentados em toda região peritendínea.

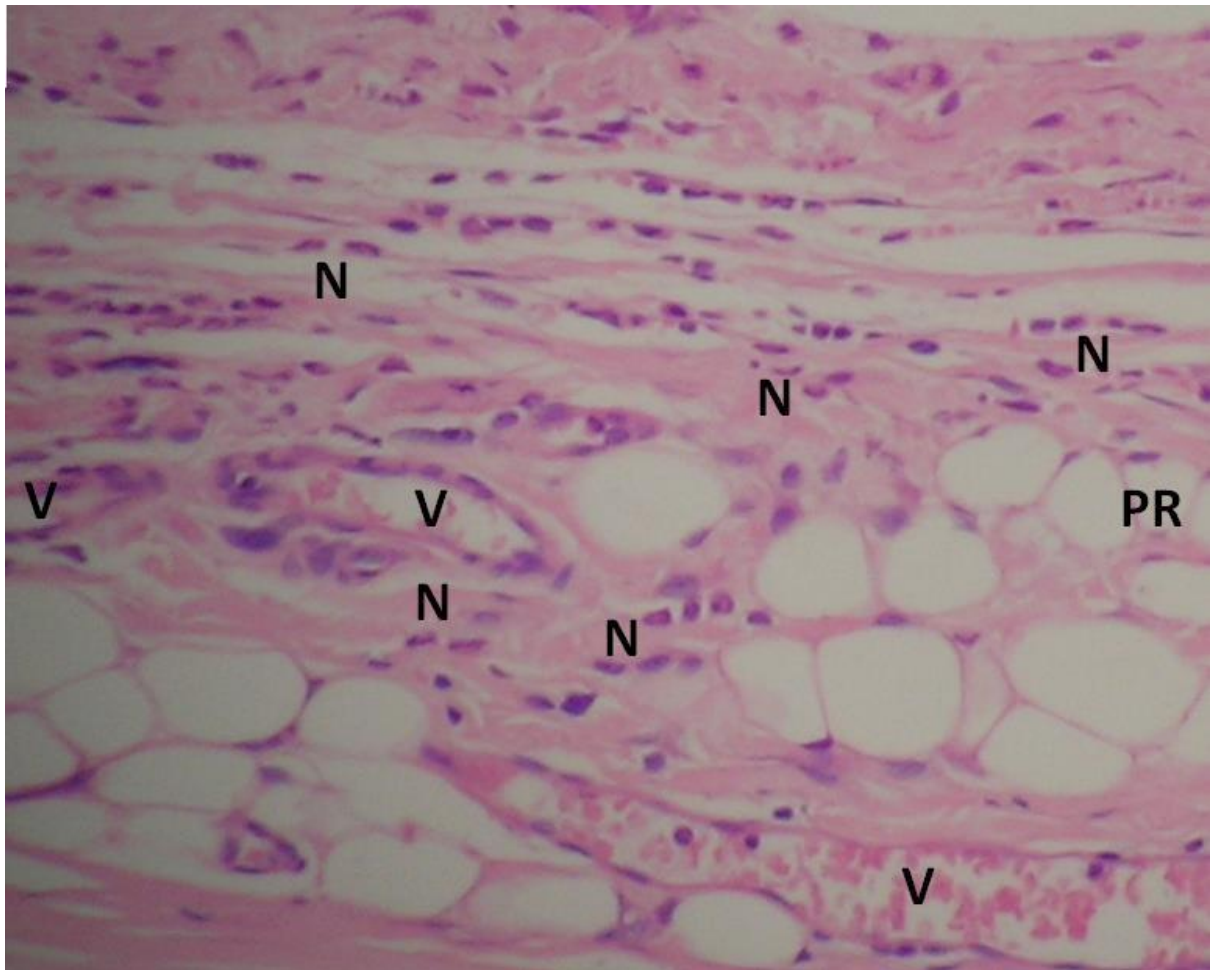


Figura 4: Fotomicrografia de um corte longitudinal do tendão rato, região peritendínea do grupo tendinite sem tratamento (NT). Presença de vasos sanguíneos (V) e neutrófilos (N) na região peritendínea (PR). 100X.

A figura 5 representa a fotomicrografia de um corte longitudinal da região do tendão calcâneo de ratos do grupo tendinite tratado com diclofenaco de sódio (DIC). Foi observado regiões com presença de infiltrado inflamatório (N) e vasos sanguíneos (V) ainda aumentados na região peritendínea.

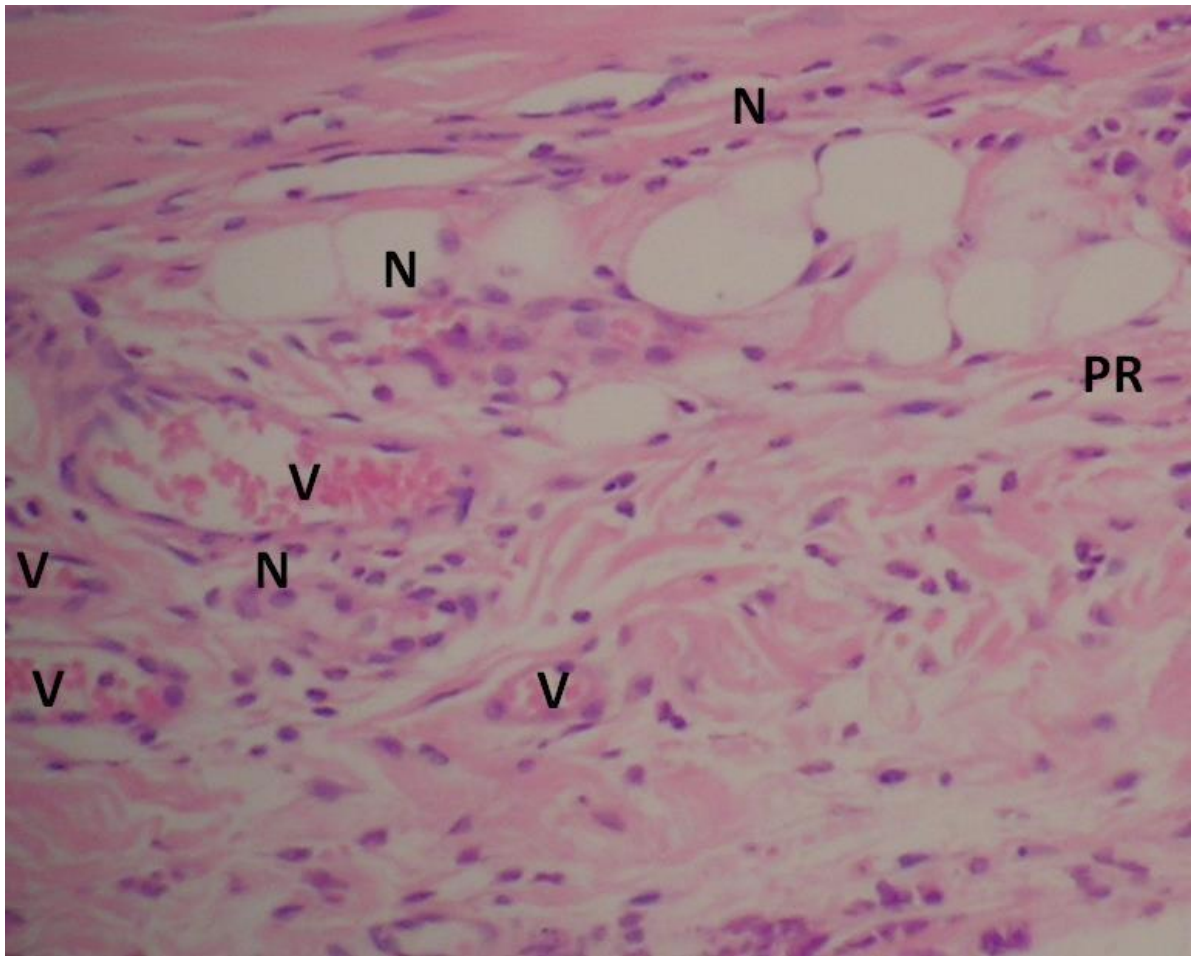


Figura 5: Fotomicrografia de um corte longitudinal do tendão calcâneo de ratos do grupo tendinite tratado com diclofenaco (DIC). Presença de vasos sanguíneos (V) e neutrófilos (N) na região peritendínea (PR). 100X.

A figura 6 representa a fotomicrografia de um corte longitudinal da região do tendão calcâneo de ratos do grupo tendinite tratado com fotobiomodulação (L3J). Foram observadas poucas regiões com infiltrado inflamatório (N) e vasos sanguíneos (V) pouco aumentados na região peritendínea.

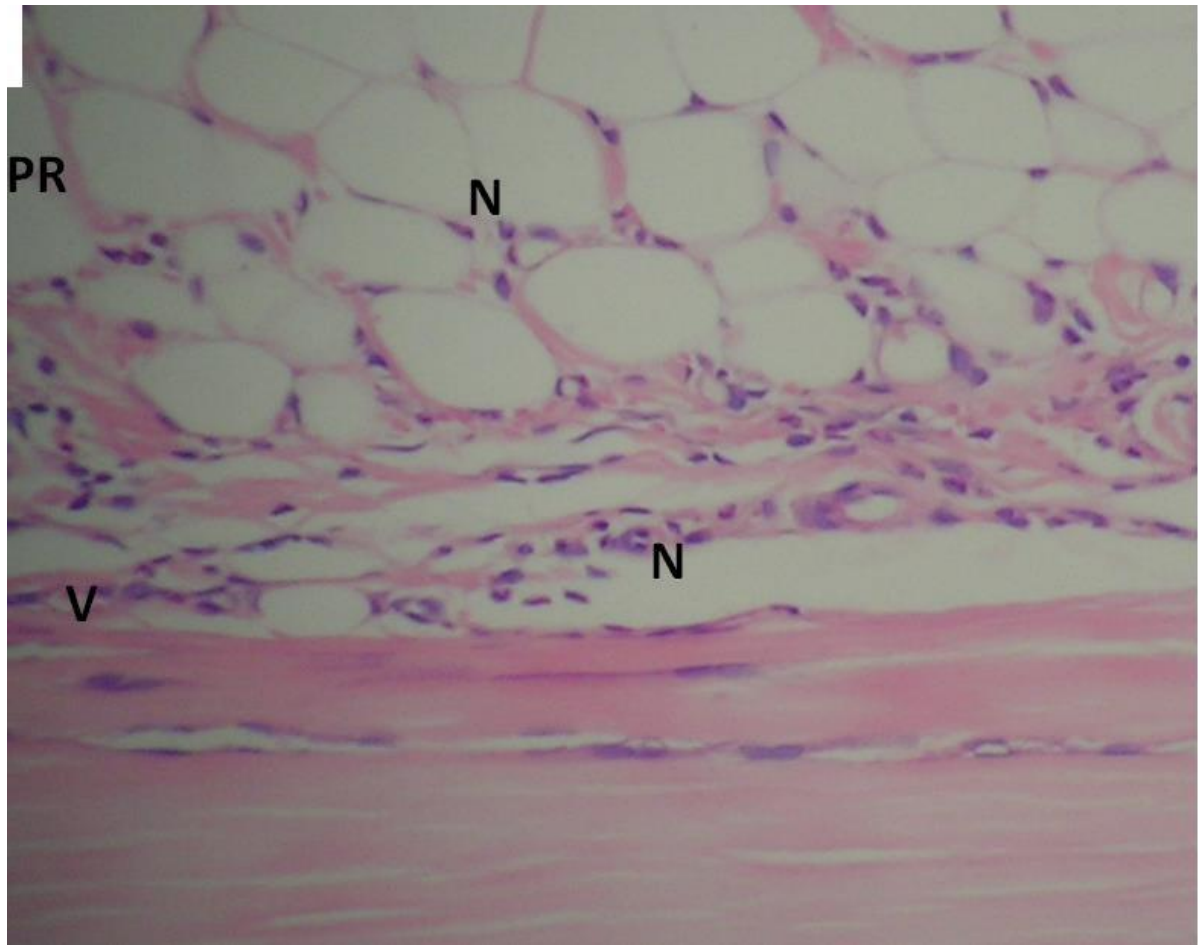


Figura 6: Fotomicrografia de um corte longitudinal do tendão calcâneo de ratos do grupo tendinite tratado com fotobiomodulação (L3J). Presença de vasos sanguíneos (V) e neutrófilos (N) na região peritendínea (PR). 100X.

QUADRO 2. COMPARAÇÃO DAS FOTOMICROGRAFIAS CONFORME TRATAMENTO REALIZADO.

RESULTADOS:

1. ANÁLISE HISTOLÓGICA

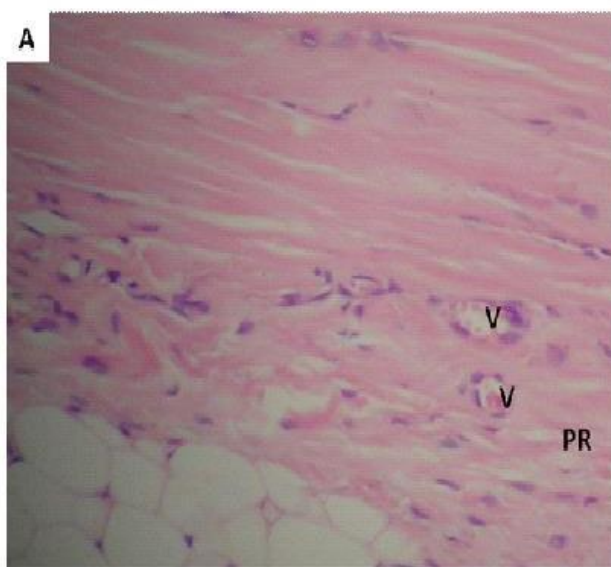


Imagem A: Grupo Controle, (PR) Peritendínea, (V) Vaso.

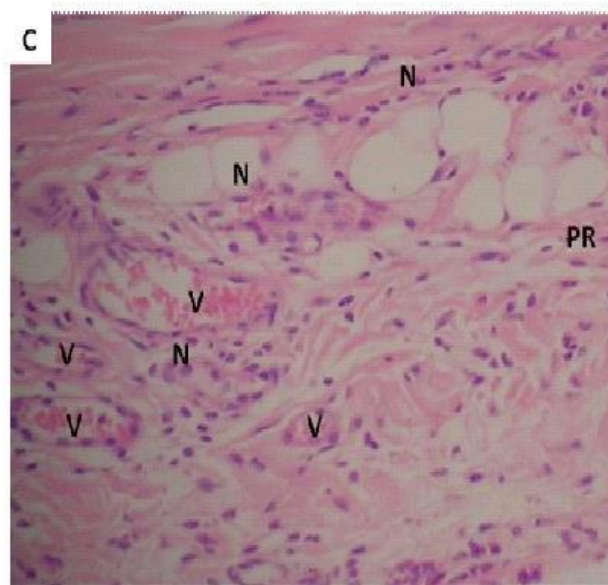


Imagem C: Grupo Tendinite, (PR) Peritendínea, (V) Vaso (N) Infiltrado Inflamatório.

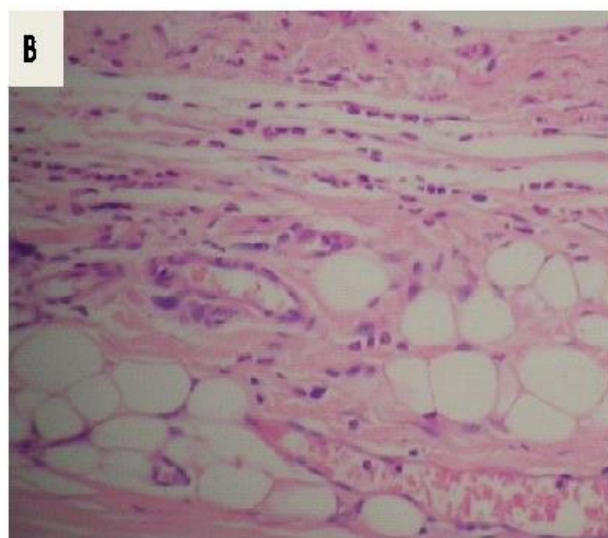


Imagem B: Grupo tratado Diclofenaco, (PR) Peritendínea, (V) vaso, (N) Infiltrado Inflamatório

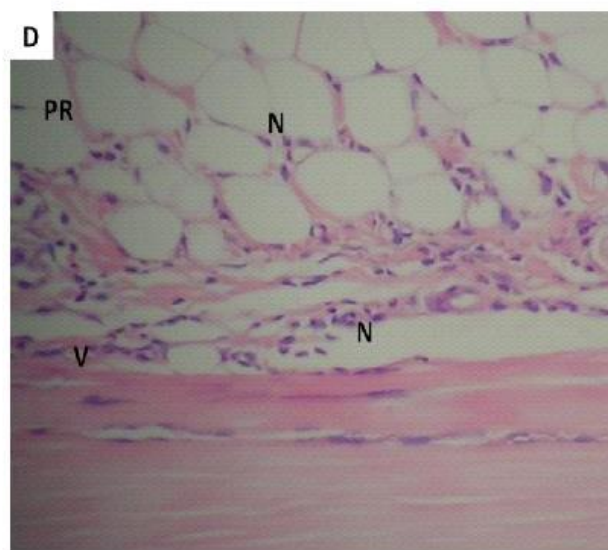


Imagem D: Grupo tratado Laser 3J, (PR) Peritendínea, (V) vaso.

O quadro 2 mostra a comparação das fotomicrografias entre os tratamentos

realizados. Na figura A (grupo controle), foi observada a presença de vasos sanguíneos, porém não foram encontrados infiltrados inflamatório. Na figura C (grupo tendinite) foi observado intenso infiltrado inflamatório e vasos sanguíneos aumentados em toda região peritendínea em relação ao grupo A. Na figura B (tratado com diclofenaco) foram observadas regiões com presença de infiltrado inflamatório (N) e vasos sanguíneos (V) ainda aumentados na região peritendínea em comparação as figuras A e C. Na figura D (tratado com laser) foram observadas poucas regiões com infiltrado inflamatório (N) e vasos sanguíneos (V), sugerindo uma melhora do processo inflamatório em comparação as figuras B e C.

5.2 Resultados da Expressão Proteica de COX-2

O gráfico da figura 7 mostra a expressão proteica da COX-2 em tendões calcâneos de ratos 24 horas (01 dia) após a injeção de colagenase.

O grupo tendinite (NT) apresentou um aumento significativo na expressão de COX-2 quando comparado ao grupo controle (CTL).

Ambos os grupos DIC e L3J apresentam uma redução na expressão de COX-2 quando comparado ao grupo tendinite (NT), porém não apresentaram diferença comparados ao grupo CTL.

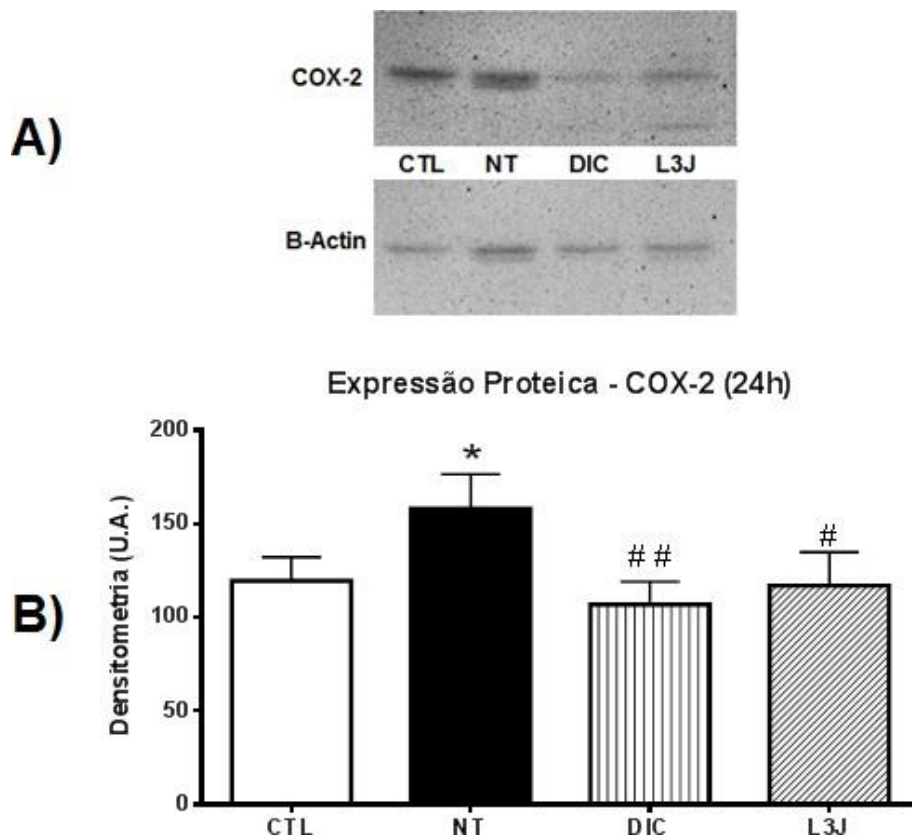


Figura 7.: Expressão protéica de COX-2. Técnica Western Blotting. Em (A) membrana representativa da expressão de COX-2 e B-Actina. Em (B) o gráfico com a densitometria dos valores das membranas. Grupos experimentais: (CTL) Grupo Controle, (NT) Grupo Tendinite, (DIC) Grupo tendinite tratado com diclofenaco sódico, (L3J) Grupo tendinite tratado com Laser. * <math><0,01</math> VS CTL; ## <math><0,001</math> VS NT. Os valores estão representados pela Média+DPM. N=5 animais grupo. (*

5.3 Resultados da Expressão Proteica de Neurocinina 1 (NK1)

O gráfico da figura 8 mostra a expressão proteica da neurocinina 1 (NK1) em tendões calcâneos de ratos 24 horas (01 dia) após a injeção de colagenase.

O grupo tendinite (NT) apresentou um aumento significativo na expressão de NK1 quando comparado ao grupo controle (CTL).

Os grupos tendinite com tratamento (farmacológico ou laser) apresentam uma redução na expressão de neurocinina 1(NK1) quando comparado ao grupo tendinite (NT).

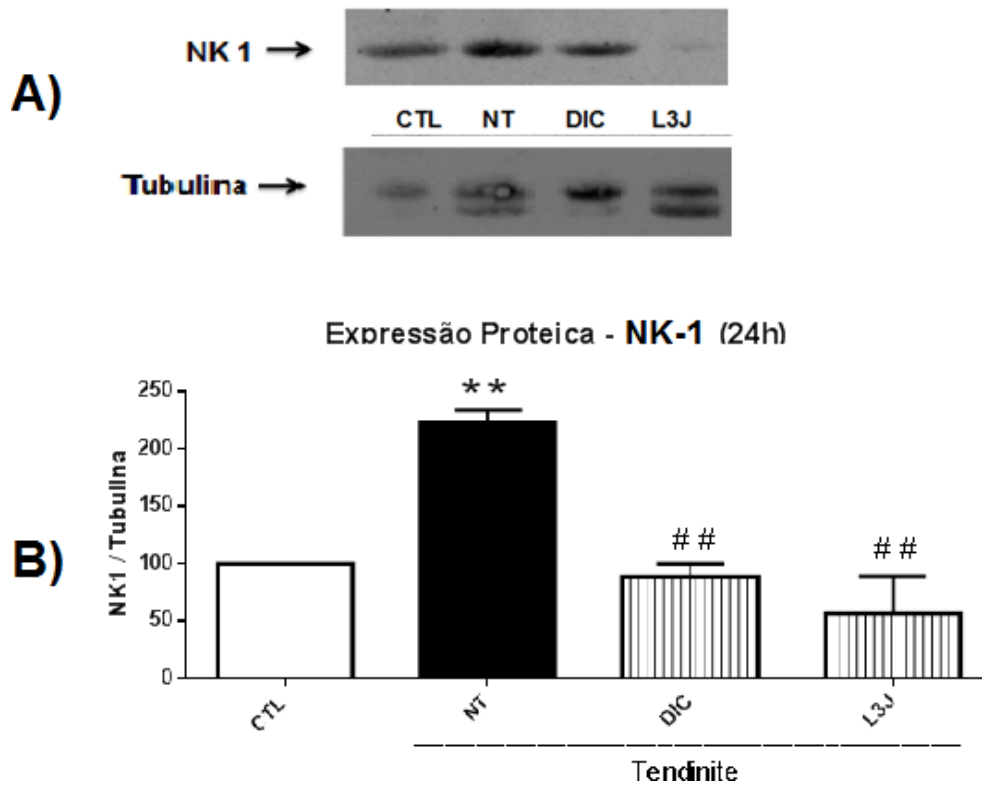


Figura 8.: Expressão protéica de NK-1. Técnica Western Blotting. Em (A) membrana representativa da expressão de NK-1 e Tubulina. Em (B) o gráfico com a densitometria dos valores das membranas. Grupos experimentais: (CTL) Grupo Controle, (NT) Grupo Teninite, (DIC) Grupo tendinite tratado com diclofenaco sódio, (L3J) Grupo tendinite tratato com Laser. ** <0,001 VS CTL; ## <0,001 VS NT.

Houve diminuição significativa da expressão da neurocinina 1 (NK1) no grupo tratado com laser (L3J) comparando com o grupo tratado com fármaco (DIC).

O grupo tratado com fármaco (DIC) e o grupo tratado com laser (L3J) apresentam expressão de NK1 próximas quando comparado ao grupo controle.

5.4 Resultados da Alodinia Mecânica

O gráfico da figura 9 mostra um aumento significativo na alodinia mecânica do grupo tendinite (NT) em relação ao grupo controle (CTL).

Ao contrário, foi observada diminuição significativa na alodinia dos grupos tratados com fármaco (DIC) e grupo laser (L3J) em relação ao grupo não tratado (NT).

Não foi observada diferença significativa entre os grupos fármaco (DIC) e laser (L3J).

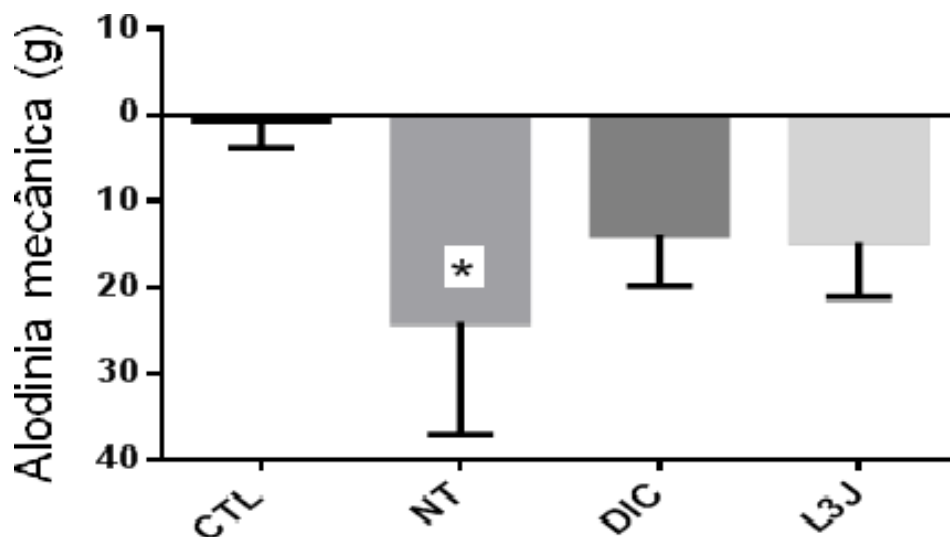


Figura 9.: Gráfico da Alodinia mecânica. Valores expressos pela subtração entre a pressão Final e Inicial ($V_{final} - V_{inicial}$). Grupos experimentais: (CTL) Grupo Controle, (NT) Grupo Teninite, (DIC) Grupo tendinite tratado com diclofenaco sódio, (L3J) Grupo tendinite tratado com Laser. * <0,01 VS CTL.

6. DISCUSSÃO

As doenças osteomusculares como a tendinite ocasionam um processo inflamatório acompanhado por dor, levando a limitações funcionais e afastamentos laborais, com importante impacto socioeconômico em diversos países⁵. Em geral, o processo doloroso é atribuído ao aumento do processo inflamatório e a presença de mediadores pró-inflamatórios com ações hiperálgicas. No entanto, pouco ainda se sabe sobre a ação da fotobiomodulação na alteração da hiperalgesia pela alteração na expressão de neurocinina1.

Neste trabalho foi utilizado um modelo de indução de tendinite por injeção de colagenase nos tendões calcâneos de ratos. Também foi proposta a utilização de terapia farmacológica com o uso de diclofenaco de sódio ou pela terapia por fotobiomodulação com o uso de laser de baixa intensidade (830nm; 3 Joules de energia e 100mW de potência).

Foram observadas que ambas as terapias utilizadas (farmacológica e fototerapia) reduziram a expressão de COX2 e NK1, além de reduzirem a alodínia mecânica. Também foi observada redução no infiltrado inflamatório em ambos os tratamentos.

Ao analisar o infiltrado inflamatório, foi observado aumento em todos os grupos onde a tendinite foi induzida. No grupo NT o infiltrado inflamatório foi ainda mais intenso. Ao contrário, o grupo DIC e L3J apresentou redução do infiltrado inflamatório além de diminuição do calibre dos vasos sanguíneos na região peritendínea. É comum, durante o processo inflamatório haver o aumento de células inflamatórias além de aumento no calibre de vasos. Estas alterações estão relacionadas a defesa do organismo frente um processo lesivo³⁵.

Em relação a expressão de COX-2, podemos perceber que houve aumento no grupo NT. No entanto, a expressão desta enzima foi reduzida em ambos os grupos

tratados (DIC e L3J). O aumento da expressão gênica de COX-2 já havia sido demonstrado anteriormente e seria relacionado com o aumento do processo inflamatório, junto com a presença de outros mediadores inflamatórios como IL-1, IL-6, TNF- α ⁵. A COX-2 também está relacionada com aumento na produção de prostaglandina E2 com ação direta no processo doloroso³⁶.

No entanto, o processo doloroso é amplo e complexo, estando relacionado a diversos mecanismos de ação, entre eles a alterações na condução de impulsos nervosos e receptores que facilitam esta transmissão. Neste contexto, algumas neurocininas como a substância P são importantes no aumento da hiperalgesia, pois se ligam aos receptores de neurocininas, facilitando a propagação do impulso³⁷.

Também foi observado aumento na expressão proteica de NK1 no grupo NT. Ao contrário, houve redução da expressão desta substância nos grupos tratados (DIC e L3J).

O grupo tendinite (NT) apresentou um aumento significativo na expressão de NK1 quando comparado ao grupo controle (CTL). Os grupos tendinite com tratamento (farmacológico ou laser) apresentam uma redução na expressão de NK1 quando comparado ao grupo tendinite (NT). Houve diminuição significativa da expressão NK1 no grupo tratado com laser (L3J) comparando com o grupo tratado com fármaco (DIC). Não houve alteração significativa entre os grupos tratados com fármaco (DIC) e grupo tratado com laser (L3J) comparado ao grupo controle.

Algumas neurocininas como a NK1 é conhecida por promover a manutenção do processo inflamatório estando relacionadas diretamente com o aumento da dor³⁸. Observamos que, tanto o tratamento farmacológico pelo uso do diclofenaco de sódio, como a fotobiomodulação estariam promovendo efeito analgésico tanto por dificultar a manutenção do processo inflamatório, como por reduzir a transmissão do potencial de ação³⁹.

Neste sentido, ao analisar a alodinia mecânica, foi observado que o grupo NT apresentou aumento da hiperalgesia, quando comparado ao grupo CTL. Novamente, ambos os tratamentos farmacológicos e a fotobiomodulação reduziram a hiperalgesia no teste de alidinia mecânica por vonfrey.

Apesar da somatória dos resultados desta pesquisa indicar para um efeito analgésico da fotobiomodulação, é importante entender se os receptores de neurocinina 1 também estariam sendo modulados pela fotobiomodulação. É importante ainda analisar outros mecanismos envolvidos no processo doloroso, como a via dos receptores opióides ou ainda se existe alterações na excitabilidade da membrana, o que facilitaria a propagação do impulso nociceptivo.

Uma das características do processo inflamatório é a presença de dor provocada pela liberação local de mediadores pró-inflamatórios e de peptídeos como a substância P que pode ligar-se ao receptor NK1 aumentando ainda mais a síntese de mediadores inflamatórios. O aumento dos níveis de substância P está diretamente relacionado com a intensidade da dor e ativação dos receptores NK1 e na manutenção da hiperalgesia³⁸.

Nossos resultados mostraram um significativo aumento da expressão proteica de COX-2 e NK1 nos grupos com tendinite sem tratamento assim comparado a outros trabalhos⁵. Isso pode significar que durante o processo inflamatório intenso provocado pela injeção de colagenase nos tendões, ocorra um aumento da hiperalgesia e formação de dor. Ao contrario, os tendões onde o agente lesivo foi aplicado mas que receberam tratamentos farmacológicos ou irradiação laser, a expressão desta proteína foi reduzida. Tanto o diclofenaco de sódio quanto a irradiação laser são terapias conhecidas pelo seu efeito analgésico. Em nosso estudo , a fotobiomodulacao pode ter reduzido o processo doloroso, pela redução de NK1, mostrado na redução da expressão proteica.

Outro fator importante, que possibilita uma melhor compreensão das alterações no processo inflamatório e na hiperalgesia foi o estudo dos níveis do mediador inflamatório Prostaglandina E2³⁹.

O mecanismo de ação na dor através da fotobiomodulação ainda não foi totalmente elucidado, porém existem diversas pesquisas, como as citadas em nosso trabalho que sugerem que o laser possui efeito analgésico.

Estas análises mostram o efeito da fotobiomodulação na melhora da dor. Porém existem outros fatores importantes que participam da dor, tornando assim necessário outros estudos para investigar o comportamento de outras enzimas e seus respectivos receptores para melhor entender os possíveis mecanismos da ação da fotobiomodulação no processo de dor.

7. CONCLUSÕES

Podemos concluir que a fotobiomodulação (830nm, infravermelho) na energia de 3 Joules e a terapia farmacológica, pelo uso do diclofenaco de sódio foram eficazes na redução da alodinia no modelo de tendinite induzida por colagenase em tendões calcâneos de ratos, atuando na diminuição tanto do processo inflamatório, como na hiperalgesia pela modulação da expressão de neurocinina-1 (NK1).

8. REFERÊNCIAS

1. GRANGEIRO. M.V.T. Alencar, Doenças relacionadas ao trabalho, novembro de 2008, 175-189.
2. HEYMANN, R. E., Tendências e tratamento para dores articulares. Revista Brasileira de Ortopedia e Traumatologia. P. 467-476, 2016.
3. FELSON. D. T., Osteoarthritis, new insights Part. 1: the disease and its risk factor. Ann. Intern. Med., v. 133. N. 8. P 635-646, 2000.
4. VAN DER RIJST JA, VAN DER WERF KO, BENNINK ML, DIJKSTRA PJ, FEIJEN J. Micromechanical testing of individual collagen fibrils. Macromol Biosci. 2006; 6:697–702. [PubMed: 16967482]
5. MARCOS, RL; LEAL JR, ECP; BJORDAL, JM; LOPES-MARTINS, RAB. Infrared (810 nm) low-level laser therapy in rat Achilles tendinitis: A consistent alternative to drugs. Photochemistry and Photobiology. 2011.
6. LANGBERG, H.; BJORN, C.; BOUSHEL, R.; HELLSTEN, Y.; KJAER, M. Exercise-induced increase in interstitial bradykinin and adenosine concentrations in skeletal muscle and peritendinous tissue in humans. J. Physiol., v. 542, p. 977-983, 2002
7. MARTINS, L., IVERSEN VV. A randomised, placebo controlled trial of low level laser therapy for activated Achilles tendinitis with microdialysis measurement of peritendinous prostaglandin E2 concentrations. Br J Sports Med. 2006 Jan;40(1):76-80.
8. TEDGUI, A.; MALLAT, Z. Anti-inflammatory mechanisms in the vascular wall. Circulation Res., v. 8, p. 877-887, 2001.
9. UEDA, H.; MEGURI, N.; MINAGUCHI, J.; WATANABE, T.; NAGAYASU, A.; HOSAKA, Y.; TANGKAWATTANA, P.; KOKAI, Y.; TAKEHANA, K. Effect of collagen oligopeptide injection on rabbit tenositis. J. Vet. Med. Sci., v. 70, n.12, p. 1295-300, 2008.
10. QUEIROZ-JUNIOR, C. M.; PACHECO, C. M. F.; MALTOS, K. L. M.; CALIARI, M. V.; DUARTE, I. D. G; FRANCISCHI, J. N. Role of systemic and local administration of selective inhibitors of cyclo-oxygenase 1 and 2 in an experimental model of periodontal disease in rats. J. Periodontal Res., v. 44, n. 2, p. 153-160, 2009.
11. SUN, H. B.; LI, Y.; FUNG, D. T.; MAJESKA, R. J.; SCHAFFLER, M. B.; FLATOW, E. L. Coordinate regulation of IL-1beta and MMP-13 in rat tendons following subrupture fatigue damage. Clin. Orthop. Relat. Res., v. 466, n. 7, p. 1555-1561, 2008.
12. BOUSHEL R, LANGBERG H, GREEN S, SKOVGAARD D, BULOW J, KJAER M. Blood flow and oxygenation in peritendinous tissue and calf muscle during dynamic exercise in humans. J Physiol. v. 524(Pt 1), p. 305-313, 2000

13. CARTER, J. S.; KRAMER, S.; TALLEY, J. J. Synthesis and activity of sulfonamide substituted 4,5-diary triazoles as selective cyclooxygenase-2 inhibitors. *Med. Chem. Lett.*, v. 9. N. 8. P. 1171-1174, 1999.
14. ROCHE AJ, CALDER JD. Achilles tendinopathy: A review of the current concepts of treatment. *Bone Joint J.* 2013 Oct 1;95-B(10):1299-307
15. LOPES-MARTINS, R. A.; ALBERTINI, R.; MARTINS, P. S.; BJORDAL, J. M.; FARIA NETO, H. C. Spontaneous effects of low-level laser therapy (650 nm) in acute inflammatory mouse pleurisy induced by carrageenan. *Photomed. Laser Surg.*, v. 23, n. 4, p. 377-381, 2005.
16. LEVINE, J. D.; KHASAR, S. G.; GREEN, P. G. Neurogenic inflammation and arthritis *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 1069. P. 155-167, 2006.
17. BJORDAL, J. M.; KLOVNING, A.; LOPES-MARTINS, R. A.; ROLAND, P. D.; JOENSEN, J.; SLØRDAL, L. Overviews and systematic reviews on low back pain. *Ann. Intern. Med.*, v. 10 n. 148, p. 789-790, 2008
18. ORCHARD, J.; MASSEY, A.; BROWN, R; CARDON-DUNBAR, A.; HOFMANN, J. Successful Management of Tendinopathy With Injections of the MMP-inhibitor Aprotinin. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, v. 466, p. 1625-1632, 2008
19. GOLD . M. S. Hyperalgesic agents increase a tetrodotoxin-resistant Na⁺ current in nociceptores. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, v. 93. P. 1108-1112, 1996.
20. BJORDAL JM, LOPES-MARTINS RA, IVERSEN VV. A randomised, placebo controlled trial of low level laser therapy for activated Achilles tendinitis with microdialysis measurement of peritendinous prostaglandin E2 concentrations. *Br J Sports Med.* 2006 Jan;40(1):76-80.
21. BOUSHEL R, LANGBERG H, GREEN S, SKOVGAARD D, BULOW J, KJAER M. Blood flow and oxygenation in peritendinous tissue and calf muscle during dynamic exercise in humans. *J Physiol.* v. 524(Pt 1), p. 305-313, 2000.
22. ANDRES, B. M., MURRELL, G. A. Treatment of tendinopathy: what works does not, and what is on the horizon. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, v. 466. N. 7. P. 1539-1554, 2008.
23. CARTER, J. S.; KRAMER, S.; TALLEY, J. J. Synthesis and activity of sulfonamide substituted 4,5-diary triazoles as selective cyclooxygenase-2 inhibitors. *Med. Chem. Lett.*, v. 9. N. 8. P. 1171-1174, 1999.
24. LEITZE Z, SELLA EJ, AVERSA JM. Endoscopic decompression of the retrocalcaneal space. *J Bone Joint Surg Am* 2003; 85-A: 1488- 1496.
25. UEDA, H.; MEGURI, N.; MINAGUCHI, J.; WATANABE, T.; NAGAYASU, A.; HOSAKA, Y.; TANGKAWATTANA, P.; KOKAI, Y.; TAKEHANA, K. Effect of collagen oligopeptide injection on rabbit tenositis. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 70, n.12, p. 1295-300, 2008.
26. FELSON. D. T., Osteoarthritis, new insights Part. 1: the disease and its risk factor. *Ann. Intern. Med.*, v. 133. N. 8. P 635-646, 2000.
27. GOLD . M. S. Hyperalgesic agents increase a tetrodotoxin-resistant Na⁺ current in nociceptores. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, v. 93. P. 1108-1112, 1996.
28. HEYMANN, R. E., Tendências e tratamento para dores articulares. *Revista Brasileira de Ortopedia e Traumatologia.* P. 467-476, 2016.

29. LANGBERG, H.; BJORN, C.; BOUSHEL, R.; HELLSTEN, Y.; KJAER, M. Exercise-induced increase in interstitial bradykinin and adenosine concentrations in skeletal muscle and peritendinous tissue in humans. *J. Physiol.*, v. 542, p. 977-983, 2002
30. 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 calcaneus tendon. *Lasers Surg Med.*41(4):271-6. 2009.
31. ROCHE AJ, CALDER JD. Achilles tendinopathy: A review of the current concepts of treatment. *Bone Joint J.* 2013 Oct 1;95-B(10):1299-307.
32. ROWE V, HEMMINGS S, BARTON C, MALLIARAS P, MAFFULLI N, MORRISSEY D. Conservative management of midportion Achilles tendinopathy: a mixed methods study, integrating systematic review and clinical reasoning. *Sports Med.*1;42(11):941-67. 2012
33. ORCHARD, J.; MASSEY, A.; BROWN, R; CARDON-DUNBAR, A.; HOFMANN, J. Successful Management of Tendinopathy With Injections of the MMP-inhibitor Aprotinin. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, v. 466, p. 1625-1632, 2008.
34. SUN, H. B.; LI, Y.; FUNG, D. T.; MAJESKA, R. J.; SCHAFFLER, M. B.; FLATOW, E. L. Coordinate regulation of IL-1beta and MMP-13 in rat tendons following subrupture fatigue damage. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, v. 466, n. 7, p. 1555-1561, 2008.
35. TEDGUI, A.; MALLAT, Z. Anti-inflamatory mechanisms in the vascular wall. *Circulation Res.*, v. 8, p. 877-887, 2001.
36. Marcos RL, Leal-Junior EC, Arnold G, Magnenet V, Rahouadj R, Wang X, Demeurie F, Magdalou J, de Carvalho MH, Lopes-Martins RÁ. Low-level laser therapy in collagenase-induced Achilles tendinitis in rats: analyses of biochemical and biomechanical aspects. *J Orthop Res.* 30(12):1945-51, 2012
37. VAN DER RIJT JA, VAN DER WERF KO, BENNINK ML, DIJKSTRA PJ, FEIJEN J. Micromechanical testing of individual collagen fibrils. *Macromol Biosci.* 2006; 6:697–702. [PubMed: 16967482]
38. Zhang G. Evaluating the viscoelastic properties of biological tissues in a new way. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2005 Mar;5(1):85-90.
39. MARCOS, R.L.. Efeito do laser de baixa potência (810nm) na tendinite induzida por colagenase em ratos. Tese de Doutorado – USP. 2010