

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

ROMILDO TORRES DA SILVA

**Efeito da fotobiomodulação em diferentes parâmetros de
irradiação no processo de reparo em modelo de tendinite
induzida por colagenase em ratos.**

São Paulo
2016

ROMILDO TORRES DA SILVA

Efeito da fotobiomodulação em diferentes parâmetros de irradiação no processo de reparo em modelo de tendinite induzida por colagenase em ratos.

Tese apresentada à Universidade Nove de Julho, para obtenção do Título de Doutor em Biofotônica aplicada às Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos

São Paulo
2016

Silva, Romildo Torres da.

Efeito da fotobiomodulação em diferentes parâmetros de irradiação no processo de reparo em modelo de tendinite induzida por colagenase em ratos. / Romildo Torres da Silva. 2016.

80 f.

Tese (doutorado) — Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2016.

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

1. Tendinite. 2. Laser de baixa intensidade. 3. Fotobiomodulação.
4. Colagenase. 5. Colágeno. 6. Propriedades mecânicas.

I. Marcos, Rodrigo Lahat. II. Título

CDU 615.831

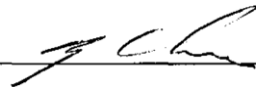
Sao Paulo, 13 de dezembro de 2016

TERMO DE APROVA/O

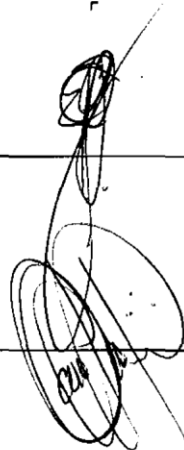
Aluno: Romildo Torres da Silva

Titulo da Tese: Efeito da fotobiomodulaçãO e diferentes parâmetros de irradiaçãO no processo de reparo em modelo de tendinite induzida por colagenase em ratos”

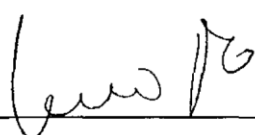
Presidente: PROF. DR. RODRIGO LABAT MARCOS



Membro: PROF. DR. ERNESTO CESAR PINTO LEAL JUNIOR

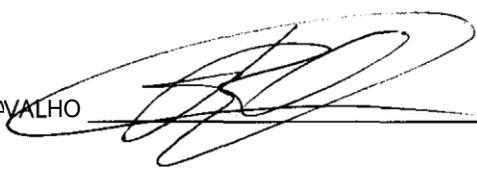


Membro: PROF. DR. PAULO DE TARSO CAMILLO DE CARVALHO



Membro: PROF. DR. LUCIO FRIGO

Membro: PROF. DR. RODRIGO LEAL DE PAIVA CAVALHO



Dedico este trabalho:

À minha esposa Ana Maria.

Aos meus pais Rômulo e Hornelina (in memoriam).

Aos meus filhos e netas

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas conquistas alcançadas.

Ao Doutor Rodrigo Labat Marcos, pela orientação, dedicação e amizade.

Aos Doutores Rodrigo Álvaro Brandão Lopes Martins, Lúcio Frigo, Ernesto Cesar Pinto Leal Junior e Paulo de Tarso C de Carvalho, por colaborar com aparelhos e materiais para as análises realizadas, e pela amizade.

Aos amigos: Rodney Capp Pallota, Patrícia Almeida, Rachel B. Maccheronio Dalmaso, Ana Maria de Souza.

As secretárias da Pós-Graduação-Stricto Sensu: Priscila Kelly Souza Cunha, Ligia Fernanda Barbosa do Nascimento, Camila Camarão Esteves, Andreia Roberto Miyasaki e Juliana Eugenia Ribeiro.

Aos técnicos do laboratório da Biofotônica: Ângela Gomes, Giovanni Julioti Urbano, Marcio José Figueira Chaves.

Ao CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

A todos que participaram e contribuíram para o desenvolvimento do trabalho.

“Para nós os grandes homens não são aqueles que resolveram os problemas, mas aqueles que os descobriram”. (Albert Schweitzer).

RESUMO

TORRES-SILVA, R. **Efeito da fotobiomodulação em diferentes parâmetros de irradiação no processo de reparo em modelo de tendinite induzida por collagenase em ratos.** f 80. Tese Doutorado – Biofotônica aplicada às Ciências da Saúde, Universidade Nove de Julho, São Paulo, 2016.

As tendinopatias são inflamações no tendão, geralmente frequentes e difíceis de serem tratadas. A terapia com laser de baixa intensidade aparece como tratamento promissor na modulação do processo de reparo com ausência de efeitos adversos. **Objetivo:** Estudar o efeito do laser de baixa intensidade, comparando diferentes comprimentos de onda, energia e potência no processo de reparo do tendão. **Material e Métodos:** Ratos wistar foram usados após aprovação do comitê de ética em experimentação animal. A tendinite foi induzida por injeção de 100µg de collagenase diluída em solução salina 0,9% sobre o tendão calcâneo dos ratos. O trabalho foi dividido em 3 fases: Fase 1: Determinação do curso temporal da variação das propriedades mecânicas e quantificação de colágeno em 3,7,14,30,45,60 dias e expressão gênica de Tenascina-C, MMP3 e 13 em 2,6,12,24,48 e 72horas. Fase 2: Comparação entre 2 comprimentos de onda (660nm e 830nm) com grupos experimentais: CTL (Saudável), e tendinite não tratado (NT) ou tratado com LBI em 1 ou 3J, e 100mW de potência. Fase 3: Comparação de diferentes potências em 830nm com os grupos experimentais: CTL, NT e laser 830 com 1J-50mW, 1J-100mW; 3J-50mW e 3J-100mW. Os animais foram eutanasiados e o tendão calcâneo foi removido para análises de propriedades mecânicas e quantificação de colágeno em 30 dias e expressão gênica em 12 e 24 horas, de acordo com o curso temporal determinado na fase 1. **Resultados:** O grupo NT apresentou redução de Fmax e aumento da deformação VS CTL e aumento na expressão de MMP3 e MMP13. O laser em 830nm apresentou melhores resultados nas propriedades mecânicas e proporção de colágeno comparado aos grupos irradiados com 660nm. Quando utilizado laser em 830nm, observamos melhoria nas propriedades mecânicas e na proporção de colágeno I e III no grupo 3J-50mW e 1J-100mW, comparados aos outros grupos, bem como redução de MMP3 e aumento discreto de MMP13. O grupo 1J-100mW apresentou aumento na expressão de Tenascina-C. A tendinite reduziu as

propriedades mecânicas, relacionadas também a alterações na proporção de colágeno I e III. Ambos os grupos irradiados com 660nm ou 830nm melhoraram as propriedades mecânicas com manutenção na proporção de colágeno e redução na expressão de MMP3. Os grupos 3J em 50mW e 1J em 100mW apresentaram os melhores resultados envolvendo todas as análises realizadas.

Conclusão: O LBI 830 3J 50mW e 1J 100mW promoveu o reparo do tendão melhorando as propriedades mecânicas do tendão e a proporção de colágeno I e III. O mecanismo envolvido pode ser a modulação de MMP3 e 13 além da tenascina-C, relacionadas à degradação e organização das fibras de colágeno sendo importantes tanto na fase inflamatória como no remodelamento do tecido.

Palavras-Chave: Tendinite, laser de baixa intensidade, Fotobiomodulação, Colagenase, MMP, Colágeno, propriedades mecânicas.

ABSTRACT

TORRES-SILVA, R. Effect of photobiomodulation in different parameters of irradiation in the repair process in tendinitis induced by collagenase in rats. f 80 - Doctoral Thesis - Biophotonics applied to Health Sciences, University Nine of July, São Paulo 2016.

Tendinopathies are inflammations in the tendon, usually frequent and difficult to treat. Low level laser therapy (LLLT) appears as promising treatment in the modulation of the repair process with no side effects. **Objective:** To study the effect of LLLT, comparing different wavelengths, energy and power in the repair process of the tendon. **Material and Methods:** Wistar rats were used after "animal ethics committee" approval. Tendinitis was induced by collagenase injection (100 µg diluted in 0.9% saline solution) on the calcaneus tendon of the rats. This work was divided in 3 phases: Phase 1: Determination of the time course in the mechanical properties variation and collagen quantification in 3,7,14,30,45,60 days and the gene expression of Tenascina-C, MMP3 and 13 in 2, 6,12, 24,48 and 72 hours. Phase 2: Comparison between 2 wavelengths (660nm and 830nm) with experimental groups: CTL (Healthy), and untreated tendinitis (NT) or treated with LLLT in 1 or 3J, and 100mW. Phase 3: Comparison of different powers at 830nm with the experimental groups: CTL, NT and laser 830 with 1J-50mW, 1J-100mW; 3J-50mW and 3J-100mW. The animals were euthanized and the calcaneus tendon was removed for analysis of mechanical properties and collagen quantification in 30 days and gene expression in 12 and 24 hours. **Results:** The NT group presented reduction of Fmax and increased deformation VS CTL and increased MMP3 and MMP13 expression. The irradiated group (830nm) showed better results in the mechanical properties and collagen proportion compared to the irradiated group (660nm). When using laser at 830nm, we observed improvement in the mechanical properties and the proportion of collagen I and III in the 3J-50mW and 1J-100mW groups compared to the other groups, as well as reduction of MMP3 and discrete increase of MMP13. The 1J-100mW group showed increased expression of Tenascin-C. Tendinitis reduced mechanical properties, also changes the collagen proportion. Both irradiated groups (660nm or 830nm) improved mechanical properties with maintenance on the collagen and

reduction of MMP3 expression. The 3J groups in 50mW and 1J in 100mW presented the best results involving all analyzed performed. **Conclusion:** LLLT (830nm, 3J 50mW and 1J 100mW) promoted repair of the tendon improving the mechanical properties of the tendon and the proportion of collagen type I and III. The mechanism involved may be the modulation of MMP3 and 13 in addition to tenascin-C, related to the degradation and collagen fibers organization being both important in the inflammatory and remodeling phase in tendon.

Keywords: Tendinitis, LLLT, Photobiomodulation, Collagenase, MMP, Collagen, Mechanical properties.

LISTA DE ABREVIações

ANOVA – análise de Variância

DPM – desvio padrão da média

F MAX – Força Máxima

HPRT – Hipoxantina - guanina

IL – Interleucina

I.M – Via Intra-muscular

I.P – Via Intra-peritoneal

JMT – Junção Músculo-tendínea

JOT – Junção Ósteo tendínea

J – Joule

LBI – laser de baixa intensidade

LASER – Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation

MMP – Metaloproteinase da Matriz

mW – MiliWatt

MEC – Matriz extracelular

nm – Nanômetro

RT-PCR – reação de transcriptase reversa – reação em cadeia da polimerase

TNF α – Fator de Necrose Tumoral

TIMP – inibidores de Metaloproteinase do tecido

t – Tempo

β -actina – Anticorpo Policlonal

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1: Organização hierárquica da estrutura do tendão.....	02
Figuras 2: Grupos Experimentais – Curso temporal.....	14/15
Figuras 3: Grupos experimentais tratados com LBI.....	16/17
Figura 4: Curva típica durante a aplicação da força	20
Figura 5: Curva típica de registro durante a aplicação das forças de carregamento e descarregamento.....	21
Figuras 6: Imagens da sequência de etapas utilizadas para quantificar colágeno tipo I e III	23/24/25
Figura 7: Gráfico da Força máxima no momento da ruptura	28
Figura 8: Gráfico da Deformação - Curso Temporal.....	29
Figura 9: Imagens da histologia do tendão – Corte longitudinal	30/31
Figuras 10: Gráfico de quantificação de Colágeno.....	33
Figura 11: Gráfico do curso temporal da Expressão gênica de metaloproteinase de matriz	35
Figura 12: Gráfico do Curso Temporal da Expressão Gênica de Tenascina-C	36
Figura 13: Gráfico da Força máxima no momento da ruptura	38
Figura 14: Gráfico da Deformação	39
Figura 15: Imagens da histologia do tendão – Corte longitudinal. Comparação entre 660nm e 830nm	40/41
Figura 16: Gráfico de quantificação de Colágeno a partir das imagens com lente de polarização	43
Figura 17: Gráfico da expressão gênica de MMP-3	45
Figura 18: Gráfico da expressão gênica de MMP-13.....	47
Figura 19: Gráfico da Força máxima de tração no momento da ruptura.....	49
Figuras 20: Gráfico da Deformação.....	50
Figuras 21: Imagens da histologia do tendão – Corte longitudinal. Comparação entre 50 e 100mW no comprimento de onda de 830nm.....	51/52
Figura 22: Gráfico da quantificação do Colágeno III após 30 dias da indução a tendinite.....	54
Figura 23: Gráfico da expressão gênica de MMPs, 12 horas após a indução da tendinite.....	56

Figura 24: Gráfico da expressão gênica de Tenascina-C, 24 horas após a indução da tendinite 57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tabela dos parâmetros de irradiação utilizados	18
Tabela 2: Sequência de Primers para análise da Expressão de mRNA, pela técnica de RT-PCR em tempo real.....	19
Tabelas 03: Resumo dos resultados	58/59

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	
1.1	Arquitetura do tendão saudável.....	02
1.2	A Inflamação no Tendão	03
1.3	Ação das Metaloproteinases da Matriz (MMPs) no Colágeno	04
1.4	Importância da Tenascina-C no tecido tendíneo	06
1.5	Alterações das propriedades mecânicas do tendão	07
1.6	Tratamentos para Tendinopatias.....	08
1.7	Fotobiomodulação em Tendinopatias	10
2	HIPÓTESE	12
3	OBJETIVOS	12
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
4	MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1	Animais	13
4.2	Indução da tendinite por injeção de colagenase, em tendões calcâneos de ratos	13
4.3	Protocolos experimentais.....	14
4.3.1-	Análises da progressão da Doença - Curso Temporal	14
4.3.2-	Análises dos grupos tratados em diferentes parâmetros de irradiação	16
4.4	- Aplicações da Terapia com Laser de Baixa Intensidade (LBI)	18
4.5-	Análises de Expressão Gênica pela reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa em tempo real (real time RT-PCR).	19
4.6-	Propriedades Mecânicas do Tendão	20
4.7-	Preparação histológica das amostras.....	22
4.8-	Quantificação dos Colágenos I, III e Colágeno total pelo programa ImageJ.....	23
4.9-	Análise Estatística.....	26

5- RESULTADOS	27
5.1) Análise da força máxima de ruptura após a indução da tendinite – Curso temporal.....	28
5.2) Análise do deslocamento máximo no momento da ruptura, após a indução da tendinite – Curso temporal	29
5.3) Análise histológica por luz polarizada: Imagens de colágeno tipo I e III – Curso temporal.....	30
5.4) Análise histológica por luz polarizada: Quantificação de colágeno tipo I e III – Curso temporal	32
5.5) Expressão gênica de Metaloproteinase de Matriz (MMP-3 e MMP-13) – Curso Temporal.....	34
5.6) Expressão gênica de Tenascina-C – Curso temporal.....	36
5.7) Análise da força máxima de ruptura após a indução da tendinite – Comparação entre 660nm e 830nm	38
5.8) Análise do deslocamento máximo no momento da ruptura, após a indução da tendinite	39
5.9) Análise histológica por luz polarizada: Imagens de colágeno tipo I e III – Comparação entre 660nm e 830nm.	40
5.10) Análise histológica por luz polarizada: Quantificação de colágeno tipo I e III – Comparação entre 660nm e 830nm.....	42
5.11) Expressão gênica de MMP-3 – Comparação entre 660nm e 830nm.....	44
5.12) Expressão gênica de MMP-13 – Comparação entre 660nm e 830nm.....	46
5.13) Análise da força máxima de ruptura após a indução da tendinite – Comparação entre 50mW e 100mW para 1 ou 3J – laser de 830nm.....	49
5.14) Análise do deslocamento máximo no momento da ruptura, após a indução da tendinite – Comparação entre 50mW e 100mW para 1 ou 3J – laser de 830nm	50
5.15) Histologia Grupos tratados Colágeno I e III – Comparação entre 50mW e 100mW para 1 ou 3J – laser de 830nm.....	51
5.16) Análise histológica por luz polarizada: Quantificação de colágeno	

tipo I e III – Comparação entre 50mW e 100mW para 1 ou 3J – laser de 830nm.....	53
5.17) Análises da Expressão Gênica da MMP-3 e MMP13 - Comparação entre 50mW e 100mW para 1 ou 3J – laser de 830nm.....	55
5.18) Análises da Expressão Gênica de Tenascina-C: Comparação entre 50mW e 100mW para 1 ou 3J – laser de 830nm.....	57
5.19) Resumo dos resultados obtidos neste trabalho.	58
6) DISCUSSÃO	60
7) CONCLUSÕES.....	66
8) REFERÊNCIAS	67
9) ANEXOS.....	79

1. INTRODUÇÃO

As tendinopatias são alterações no tendão, geralmente frequentes e difíceis de serem tratadas, especialmente quando consideramos o tendão calcâneo, o patelar e o do cotovelo onde a cronificação destas doenças é comum, incapacitando desde atletas profissionais e recreacionais até pessoas comuns em seu local de trabalho. ⁽¹⁾

Em virtude de sua ocorrência, do custo do tratamento, da redução da funcionalidade laboral e do desencadeamento de co-morbidades, as tendinopatias necessitam de recursos financeiros consideráveis, direcionados ao acompanhamento da saúde dos indivíduos vítimas destas patologias, principalmente nos casos em que a incapacidade no trabalho persiste além do tempo médio para o retorno às atividades laborativas, tornando-se um grande problema sócio-econômico onde as intervenções médicas e terapias para a reabilitação são ainda limitadas. ^(2, 3, 1)

Um exemplo do impacto econômico causado por estas doenças foi observado nos Estados Unidos, onde em uma década foi registrado aumento de 39% dos gastos com indenizações e 62% com custo médico relacionado às doenças músculo-esqueléticas. No Brasil, estima-se um aumento das doenças articulares relacionadas tanto ao esforço repetitivo quanto pelo envelhecimento da população e embora não sejam consideradas como doenças fatais, estas doenças reduzem a qualidade de vida do indivíduo, que necessita de freqüente atendimento médico, constituindo um desafio terapêutico, principalmente nos casos crônicos onde é observado um aumento considerável dos recursos despendidos pelo empregador, relacionados ao afastamento e a necessidade de relocação e qualificação de outro funcionário para o exercício da função, gerando um alto custo ao sistema de saúde. ^(4, 5, 6, 7)

Neste sentido, não só atividades preventivas são necessárias para reduzir o número de indivíduos doentes, mas a identificação das causas associadas ao aparecimento das tendinopatias e a promoção do retorno seguro às atividades laborativas são estratégias fundamentais, sendo utilizadas como tema de estudos no campo da saúde pública. ⁽⁸⁾

1.1) Arquitetura do tendão saudável

Tendões são estruturas anatômicas, formadas por fibras de colágeno dispostas de forma hierárquica (Fig1), interpostas entre músculos e ossos, que transmitem a força gerada no músculo para o osso, tornando possível o movimento articular. ⁽⁹⁾ Os tendões saudáveis apresentam coloração branca brilhante e textura fibroelástica, mostrando grande resistência a tensões mecânicas. ⁽¹⁰⁾

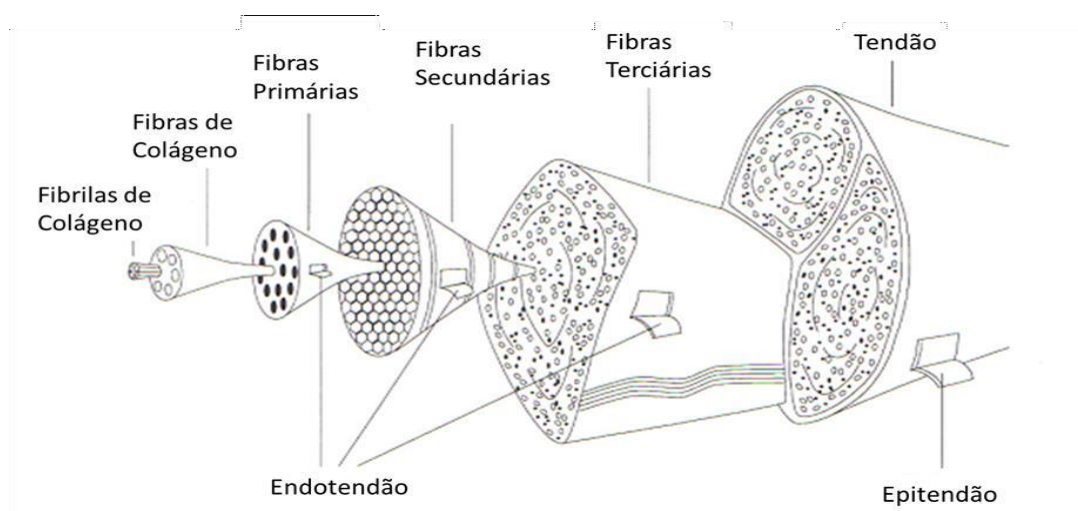


Figura 1: Organização hierárquica da estrutura do tendão (das fibrilas de colágeno até o tendão propriamente dito) ⁽¹¹⁾

Este tecido é constituído por tenócitos e tenoblastos que correspondem entre 90 à 95% de suas células e por uma rede de matriz extracelular. ⁽¹²⁾ Os tenócitos são importantes na adaptação de mudanças durante a homeostase, na manutenção e no remodelamento do tecido. Além de sintetizarem colágenos e componentes da matriz, os tenócitos são ativos à geração de energia tanto aeróbica quanto anaeróbica, esta última mais destacada com o aumento da idade. ⁽¹³⁾

Os tendões são formados por 70% de água e por 30% de massa seca, esta rica em colágeno, considerado a proteína mais abundante do organismo, classificados em: (1) colágenos que formam longas fibrilas; (2) colágenos associados a fibrilas; (3) colágeno que forma rede e (4) colágeno de ancoragem. O

colágeno que forma os tendões fornecendo sua força tênsil está incluso no 1º Grupo. (14, 15)

A característica viscoelástica do tendão está relacionada ao comportamento das fibras de colágeno associadas aos filamentos de actina da célula que promove as características tênsis do tecido. Estas fibras de colágeno do tendão apresentam dobras durante o repouso e tornam-se mais paralelas durante o estado de tensão do tecido, podendo sofrer perturbações importantes nesta organização após um processo lesivo. (16)

1.2) A Inflamação no Tendão

A tendinite é considerada uma doença inflamatória aguda no Tendão com possibilidade de cronificação, provavelmente devido às características do tecido e das dificuldades no tratamento. (1)

Em geral, a resposta inflamatória visa combater o agente agressor e eliminar produtos resultantes da destruição celular, promovendo condições ideais para o reparo do tecido lesado. (17) No caso da tendinite, a causa mais comum é o esforço exagerado de extensão sobre os tendões, responsável por 30% das lesões. (18) Podendo ocorrer também à distensão das fibras de colágeno, que por não suportarem a tração mecânica, acabam apresentando rupturas parciais com desenvolvendo de intensa e dolorosa reação inflamatória local, contribuindo para a degradação de colágeno e outras deficiências teciduais, que se não forem tratadas leva ao estado crônico da doença. (19)

Além da sobrecarga mecânica podem ocorrer processos lesivos repentinos, assim como o próprio envelhecimento natural que também contribuem para a degeneração do tendão. (20)

Os tendões apresentam maiores risco de ruptura, quando uma força é aplicada de forma rápida e indireta, como exemplo, as contrações musculares, durante o exercício excêntrico. (21) Estas rupturas resultam em hemorragia de arteríolas e capilares locais e formação de hematoma no seu interior, podendo

estender-se para o paratendão. O resultado imediato é a deposição de fibrina, que atrai neutrófilos para a região, a congestão e acúmulo de fluidos no local da agressão levando a uma isquemia tecidual e morte celular progredindo para uma necrose tecidual, de acordo com o grau de comprometimento vascular. ⁽²²⁾

O processo inflamatório nestes tecidos tem gerado controvérsias devido a sua atipicidade relacionada à baixa vascularização dos tendões. Na porção central do tendão, grandes vasos formam plexos vasculares menores atingindo as bainhas sinoviais e fornecendo suprimento sanguíneo para o epitendão, mesotendão e endotendão. ⁽²³⁾

No entanto, existem algumas regiões do tendão onde este suprimento é comprometido. Assim, determinados fatores tais como o envelhecimento associado à presença de cargas mecânicas pode comprometer ainda mais este suprimento, reduzindo em até 20% o fluxo sanguíneo no tendão. ⁽²⁴⁾

Nestas regiões próximas as junções e em locais onde existe formação de torção, atrito ou compressão, o suprimento de sangue no tecido tendíneo pode variar, dependendo da região analisada apresentando um sistema intrínseco, próximo às junções osteotendíneas e miotendíneas e extrínseco no corpo central do tendão. Assim, uma pequena quantidade de vasos sanguíneos musculares auxilia o suprimento sanguíneo intrínseco, na primeira parte do tendão, próximo à junção, enquanto do outro lado, o fornecimento na junção osteotendínea também acontece, porém de maneira escassa e limitada. ⁽¹²⁾

Durante o processo inflamatório do tendão, ocorre o remodelamento da bainha tendínea e do tecido sinovial, enchendo este espaço com células inflamatórias. Neste caso é possível observar um aumento na expressão de determinadas enzimas como a ciclooxygenase-2 e determinadas metaloproteinases de matriz (MMPs), interferindo nos níveis de determinados mediadores inflamatórios, entre eles a prostaglandina E2 e o TNF- α . ⁽²⁵⁾ Os processos celulares e moleculares ainda não são bem conhecidos, mas estudos indicam que as MMPs podem mediar, pelo menos em parte as mudanças na composição da matriz extracelular durante a lesão e o reparo do tendão. ^(26, 27)

1.3) Ação das Metaloproteinases da Matriz (MMPs) no Colágeno

Os processos inflamatórios, fisiológicos ou patológicos, são dependentes de múltiplos fatores e as Metaloproteinases da matriz (MMPs) contribuem em geral para este processo, promovendo ou reprimindo a inflamação a partir de processos proteolíticos diretos, ativando, inativando ou alterando a função de quimiocinas e citocinas. ⁽²⁸⁾ Estas enzimas possuem ação proteolítica com um importante papel na modulação da matriz extracelular do tendão, entretanto o mecanismo desta modulação ainda permanece obscuro. ⁽²⁹⁾

As MMPs foram caracterizadas inicialmente como proteases de degradação, pela capacidade de degradar os componentes da matriz extracelular, influenciando em processos importantes como a proliferação, diferenciação, migração e morte celular, bem como pela interação entre células, quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento, apresentando um papel crucial em muitos processos fisiológicos e em muitas condições patológicas. ⁽³⁰⁾

As MMPs são divididas basicamente em collagenases (MMP-1, 8 e 13), gelatinases (MMP-9), estromelina (MMP-3 e 10), MMPs de membrana (MMP-14, 15, 16, 17, 24 e 25) e outras que são classificadas de acordo com suas propriedades bioquímicas. ⁽²⁹⁾. O aumento da expressão de MMP foi observado em várias doenças, no ser humano e em outros animais, onde a inflamação está presente, sugerindo que as MMPs possam proteger ou contribuir para a patologia, possuindo papel modulador no processo inflamatório. ⁽²⁸⁾

O tendão com Tendinite pode apresentar alterações na atividade de várias metaloproteinases particularmente de collagenases (MMP-1, MMP-8 e MMP-13) e gelatinases (MMP-2, MP-9), representando um importante fator nas alterações do tendão podendo levar à degeneração do tecido e a perda da integridade mecânica ocasionando o aumento do tempo de recuperação de determinados pacientes. ^(31, 26, 20)

A degradação da matriz extracelular pelas MMPs, entre elas a MMP2, MMP3 e MMP9, promove um forte sinal quimiotático além de aumentar a liberação de TNF- α e IL-1 β , influenciando no aumento da inflamação ⁽³⁰⁾, alterando o diâmetro das fibras, conduzindo ao enfraquecimento das fibras de colágeno, à inflamação e aumentando as chances de ruptura do tendão. ⁽²⁸⁾ Alterações na expressão de MMP9, bem como o envelhecimento, podem reduzir a habilidade dos tenócitos em remodelar e reparar os tendões. ⁽³²⁾

Em casos de osteodistrofia, artrite reumatóide e tendinopatias, a IL-1b é um dos principais mediadores inflamatórios, responsável pela indução de algumas MMPs, como MMP-1, MMP-3 e MMP-13 e em lesões específicas do tendão, o aumento dos níveis de MMP-13 apresentaria uma ação comparável a MMP-1, significando uma maior degradação da matriz extracelular. ⁽²⁰⁾

As MMPs apresentam atividades irregulares e frequentemente aumentadas, durante o processo inflamatório podendo atuar no recrutamento leucocitário e alterar as funções de citocinas e proteases. Os leucócitos geralmente usam as características das MMPs para degradar proteínas da matriz através de eventos proteolíticos distintos. Seu recrutamento é um

processo complexo em que citocinas quimiotáticas participam da atração destas células no local da lesão, influenciando na resposta inflamatória. As quimiocinas também apresentam um efeito quimiotático eficaz por se aderirem na matriz extracelular e na superfície da célula. ⁽³⁰⁾

Assim, estratégias de inibição de determinadas MMPs poderia ser uma boa opção para reduzir a degeneração da matriz extracelular nas tendinopatias, ⁽²⁰⁾ pois tanto a supressão quanto a inibição destas enzimas estariam relacionados com o reparo do tendão e com a redução dos casos de tendinopatias. ^(29, 33) Porém os efeitos colaterais podem ser elevados, sendo indicado para tratamentos crônicos, onde outras terapias não apresentaram sucesso. ⁽³¹⁾

O desenvolvimento de novos tratamentos para as tendinopatias são tão importantes quanto a prevenção da doença. Ainda é necessário definir a etiologia das tendinopatias, incluindo o desenvolvimento e a validação *in vitro* e *in vivo* dos modelos experimentais, que permitirão investigar a atividade dos tenócitos em conjunto com as tensões mecânicas sofridas pelo tendão, a interação entre célula e matriz, a importância das citocinas, das enzimas e moléculas de sinalização e a definição da importância das metaloproteinases na patologia do tendão, diferenciando os níveis que levam à doença ou à cura. ⁽²⁶⁾

1.4) Importância da Tenascina-C no tecido tendíneo

A tenascina-C é uma importante integrina, sendo classificadas como proteínas de adesão presente na membrana celular, ligando-se fibrina (proteína presente na lâmina basal), formando uma placa de ancoragem, regulando a morfologia celular. ⁽³⁴⁾

A Tenascina-C é uma importante proteína da matriz extracelular e está relacionada com organização das fibras de colágeno como o do tipo I. A deficiência da expressão desta proteína pode causar a síndrome de Ehlers-Danlos, caracterizada por aumento excessivo da flexibilidade e elasticidade dos tecidos, levando, por exemplo, a ruptura de vasos sanguíneos importantes, pelo descontrole da resistência destes tecidos. A tenascina-C é expressa de forma controlada no processo de desenvolvimento, sendo também importante durante estados patológicos, como em infecções e inflamações, influenciando na adesão de células, atuando diretamente na produção de fibronectina. ⁽³⁵⁾

Nos tecidos do sistema músculo-esquelético, durante a homeostasia, os níveis expressos de tenascina-C são muito baixos, porém sua expressão é estimulada durante o processo de reparo tecidual. Nestes casos, a tenascina-C tem relação com as características elásticas do tecido, apresentando em sua estrutura regiões de ligação com outras proteínas da matriz extracelular, bem como com receptores de adesão da membrana celular, podendo ser estendidas várias vezes no seu comprimento inicial de repouso pelas suas características elásticas, estando presente nas regiões onde elevadas forças mecânicas são transmitidas, como nas junções miotendíneas e osteotendíneas. (36)

A expressão da Tenascina C também é regulada a partir de tensões mecânicas, durante o desenvolvimento e na vida adulta, podendo mediar processos inflamatórios, direcionando para um processo de reparo tecidual mais eficaz. (37)

Desta forma, a Tenascina-C é considerada uma importante proteína de matriz extracelular, auxiliando no controle da elasticidade, sendo importante tanto no processo regenerativo quanto no degenerativo, após lesões teciduais. (38)

1.5) Alterações das propriedades mecânicas do tendão

Os tendões apresentam alta resistência mecânica, boa flexibilidade e responde metabolicamente à cargas elásticas, (39) transmitindo a força gerada pelo músculo ao osso, agindo como amortecedores e absorvendo as forças externas e protegendo o músculo de lesões. (18) Durante o movimento do corpo humano, após uma tensão ser aplicada no tendão, este apresenta algumas propriedades elásticas que estão diretamente relacionadas à proporção de fibras de colágeno tipo I e III. (16) Este tecido tem uma alta capacidade de suportar forças tensionais. Medições diretas em calcâneos humanos registraram forças de até 9 kN, durante uma corrida em velocidade de 6 m/s, o que corresponde a 12,5 vezes o peso corporal. Entretanto, hoje sabemos que a força máxima suportada desse tendão é uma variável bastante individual, indicando também uma faixa ampla de suscetibilidade a sobrecargas. (18)

A resistência à ruptura do tendão esta associada à espessura e ao teor de colágeno. Por exemplo, 1cm² de tendão é capaz de suportar entre 500 e 1000 Kg. Assim, a redução de colágeno pode resultar na diminuição da força e potência muscular provocando o aumento da rigidez do tendão. ⁽⁴⁰⁾

O principal objetivo no processo de cura do tendão é a restauração da força mecânica, visto que a lesão induz alterações destas propriedades mecânicas. Para a avaliação destas alterações, alguns modelos são utilizados, entre eles os ensaios de tração monotônico até a ruptura do tecido que fornecem informações importantes sobre a rigidez e alongação, auxiliando no entendimento de aspectos funcionais na progressão da lesão, determinando os aspectos biomecânicos das terapias utilizadas para o reparo tecidual ^(41, 42, 43).

No entanto, poucos trabalhos utilizam ensaios cíclicos de tração, em que é possível examinar outros detalhes funcionais do tecido, como a presença de forças elásticas e sua relação com a concentração de determinados tipos de colágenos, como acontece com o tecido tendíneo. ^(44,45) Estas alterações à partir da lesão, geralmente pela alteração de colágeno, durante a degeneração do tendão pode ser um dos fatores causadores da dor.⁽¹⁸⁾

Apesar de não serem bem compreendidos, os problemas na estrutura destas fibras de colágeno são responsáveis pelas alterações biomecânicas, sendo a base da causa da progressão das tendinopatias. ⁽²⁶⁾

1.6) Tratamentos para Tendinopatias

Os tratamentos para doenças músculo-esqueléticos 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. ^(46, 47)

No início de 2010, Tumilty *et al* publicaram uma meta-análise sobre a utilização do laser de baixa intensidade (LBI) no tratamento das tendinopatias e sua potencial eficácia na redução da inflamação. Contudo, o tratamento mais comum para os casos de tendinite ainda é o conservador, recomendado pela

maioria dos autores como estratégia inicial. Na maioria das vezes consiste em uma abordagem multi-orientada, incluindo modelos de reabilitação combinada como repouso, medicação a base de antiinflamatórios não esteroidais e corticóides, crioterapia, massagem, treinamento de força.

Os antiinflamatórios não esteroidais são as drogas utilizadas com mais frequência, como parte do tratamento inicial, principalmente na redução da dor. Dentre os diversos tipos de drogas nesta classe, os inibidores específicos da enzima ciclo-oxigenase-2 (COX-2) tem apresentado efeito favorável no tratamento destes transtornos. No entanto, o impacto econômico das terapias para desordens músculo-esqueléticas 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 ⁽⁴⁸⁾ com resultados pouco efetivos, levando a lesões recorrentes. ^(49, 50)

Vários métodos de tratamento para lesões do tendão já foram testados, porém seus resultados e sua eficácia ficam distante das características do tendão original. Conseqüentemente é necessário desenvolver novos métodos terapêuticos eficazes que evitem o processo degenerativo da matriz extracelular e o desenvolvimento de uma regeneração rápida sem formação de cicatriz, que alteraria bastante as propriedades mecânicas do tendão. ⁽²⁹⁾

Alguns trabalhos mostraram o aumento na produção de colágeno, redução de estresse oxidativo e da fibrose, redução do edema pós-operatório, redução da dor e melhora funcional e estes efeitos estariam relacionados também a redução de mediadores inflamatórios observados após o tratamento com laser de baixa intensidade. ^(51, 52)

Atualmente especialistas buscam técnicas que acelerem o reparo do tendão, controlando o processo inflamatório e a dor e se possível, restaurando suas propriedades mecânicas iniciais.⁽⁵³⁾ No entanto, 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 novos tratamentos 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.

1.7) Fotobiomodulação em Tendinopatias

O uso do laser de baixa intensidade no tratamento de diferentes doenças, com o objetivo de produzir um efeito anti-inflamatório vem sendo bastante citado em diversas publicações de caráter científico, fazendo com que esta terapia já seja considerada como alternativa terapêutica para várias doenças. (54, 55, 56, 57, 58, 59, 60)

No entanto é importante ressaltar que pouco se conhece a respeito do mecanismo de ação do laser no processo inflamatório e durante o reparo tecidual. Até o momento, existem evidências que o laser pode reduzir a expressão gênica de importantes mediadores pró-inflamatórios ou aumentar a expressão de outros mediadores antiinflamatórios. O laser pode ainda reduzir a expressão de determinadas colagenases (MMPs) e conseqüentemente reduzir a degeneração do tecido, favorecendo o rearranjo das fibras de colágeno, levando a uma melhora nas condições biomecânicas do tendão durante o processo de reparo. (61, 62, 63, 27)

Apesar do tratamento com laser apresentar efeitos anti-inflamatórios conhecidos refletindo na melhora do reparo tecidual, este tratamento ainda é classificado com um nível de eficácia moderado, principalmente devido a poucas informações referentes aos parâmetros de irradiação e ao mecanismo de ação do laser, contribuindo para o número ainda pequeno de evidências clínicas. (64)

A manutenção destas propriedades mecânicas é de grande importância, uma vez que é comum o tecido tendíneo lesionado, durante seu processo de reparo apresentar alteração das propriedades mecânicas, quando comparadas ao tecido original, o que poderia estar relacionado com alterações na proporção dos tipos de colágeno existentes no tendão ou à sua organização alterada. (27)

O laser de baixa intensidade aparece como uma importante ferramenta no tratamento de várias lesões musculoesqueléticas, associada ou não a outras terapias, com um potencial efeito reparador, promovendo o aumento da

expressão de colágeno tipo I ou agindo na reorganização destas fibras. (65, 55, 66, 67) Sua ação na redução do processo doloroso e no auxílio do reparo tecidual, reduz significativamente o tempo de tratamento além de evitar os efeitos adversos relacionados ao uso de medicamentos antiinflamatórios. (68)

Alguns trabalhos com experimentação básica demonstraram que o laser de baixa intensidade pode modular a inflamação, reduzindo determinados mediadores pró-inflamatório, como IL-1, IL-6 e TNF- α ou aumentando mediadores anti-inflamatórios como IL-10. (25, 69, 70) A laserterapia ainda pode estimular fatores de crescimento, como o TGF- β e reduzir algumas metaloproteinases de matriz responsáveis pelo desbalanço na proporção de colágeno tipo I e III, desta forma, auxiliando na manutenção de determinadas propriedades mecânicas do tendão. (33, 69, 70)

Tendo em vista os dados apresentados anteriormente, o estudo de alternativas terapêuticas como, por exemplo, a laserterapia, 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, nas diferentes fases do reparo tecidual, se faz extremamente necessários no auxílio da utilização da laserterapia de forma adequada e segura.

2- HIPÓTESE

A hipótese deste trabalho é de que o laser de baixa intensidade possa auxiliar no processo de reparo do tendão após a indução da tendinite, através da modulação de genes relacionados ao reparo deste tecido, como a Tenascina-C e de enzimas colagenases MMP-3 e 13, auxiliando na organização das fibras de colágeno, contribuindo para a manutenção das propriedades mecânicas do tendão.

3- OBJETIVOS

Estudar o efeito da fotobiomodulação, utilizando laser de baixa intensidade em diferentes parâmetros de irradiação, no reparo tecidual após a indução da tendinite por colagenase.

3.1- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar as alterações temporais:

- Na expressão gênica de MMP3, MMP13 e Tenascina-C;
- Na proporção de colágeno tipo I e III;
- Nas propriedades mecânicas relacionadas a força máxima e deformação no momento da ruptura, em ensaio de tração cíclico.

Comparar os efeitos do laser de baixa intensidade no comprimento de onda de 660nm e 830nm, em diferentes energias, no processo de reparo do tendão, após a indução da tendinite.

Comparar os efeitos do laser de baixa intensidade infravermelho (830nm) em diferentes potências, no processo de reparo do tendão, após a indução da tendinite.

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos pesando entre 150 e 200g (+/- 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, já possui a aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Nove de Julho AN0037/2013.

4.2- Indução da tendinite por injeção de colagenase, em tendões calcâneos de ratos

A indução da tendinite foi realizada em todos os animais exceto o grupo controle (CTL) que apresentará 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 da pata direita, no tendão calcâneo. Após a indução, os animais permaneceram em caixas de contenção separados em diferentes grupos experimentais conforme indicado na figura 2. Após a indução do processo inflamatório pela injeção de colagenase e os específicos tratamentos, os animais foram eutanasiados com hiperdose da mesma associação de anestésicos (cloridrato de quetamina 180mg/Kg e cloridrato de xilasina 30mg/Kg) em diferentes tempos e o tecido do tendão removido para posteriores análises.

4.3- Protocolos experimentais

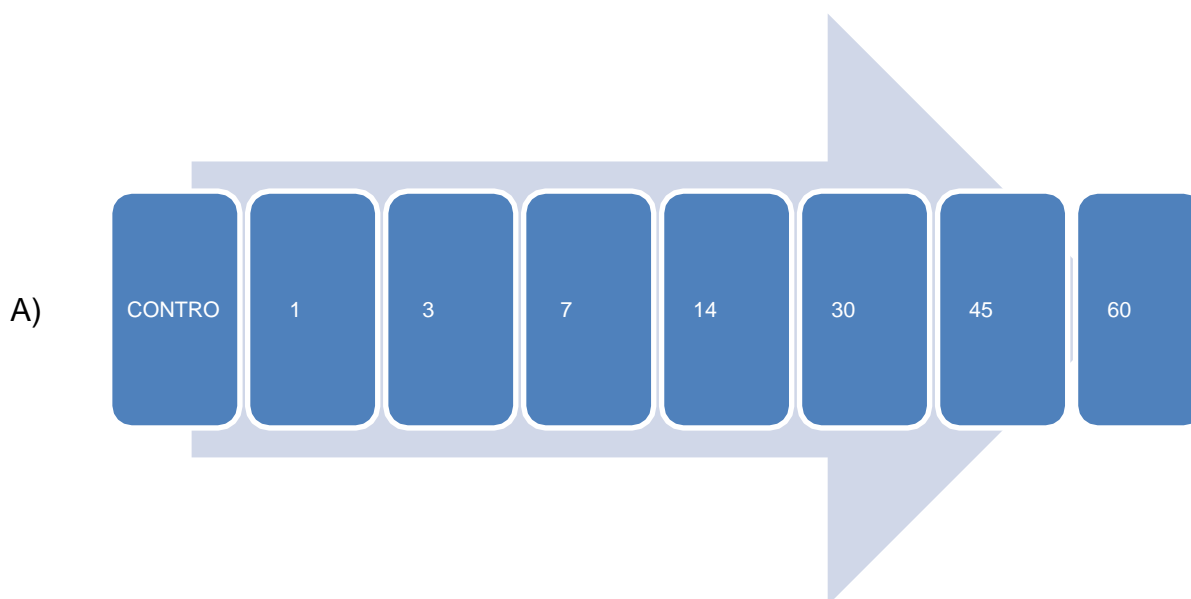
4.3.1- Análises da progressão da Doença - Curso Temporal

Após a indução a tendinite, os animais foram distribuídos em 02 grupos de acordo com os dias de estudo:

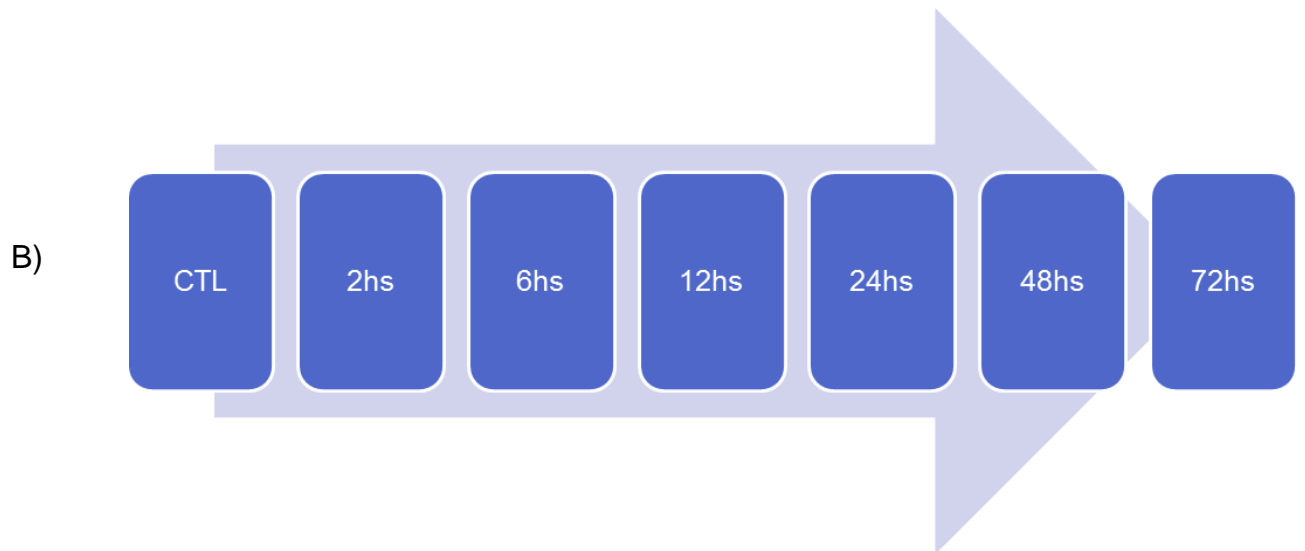
- 1, 3, 7, 14, 30, 45 e 60 dias para a quantificação de Colágeno I e III, e propriedades mecânicas;
- 2, 6, 12, 48, 72 Horas para a análise da expressão gênica de Tenascina-C, MMP 3 e 13.

Durante este período os animais não tiveram nenhum tipo de tratamento. Ao final de cada tempo, os animais foram eutanasiados e as amostras dos materiais coletados do tendão calcâneo foram separadas para as análises indicadas na metodologia abaixo.

Protocolo Experimental – Curso temporal



Em (A): Curso Temporal utilizado para determinação do tempo indicado para as análises da quantificação de Colágeno I, III e propriedades mecânicas.



Em (B): Curso Temporal utilizado para a determinação do tempo indicado para as análises da expressão gênica de Tenascina-C, MMP 3 e 13.

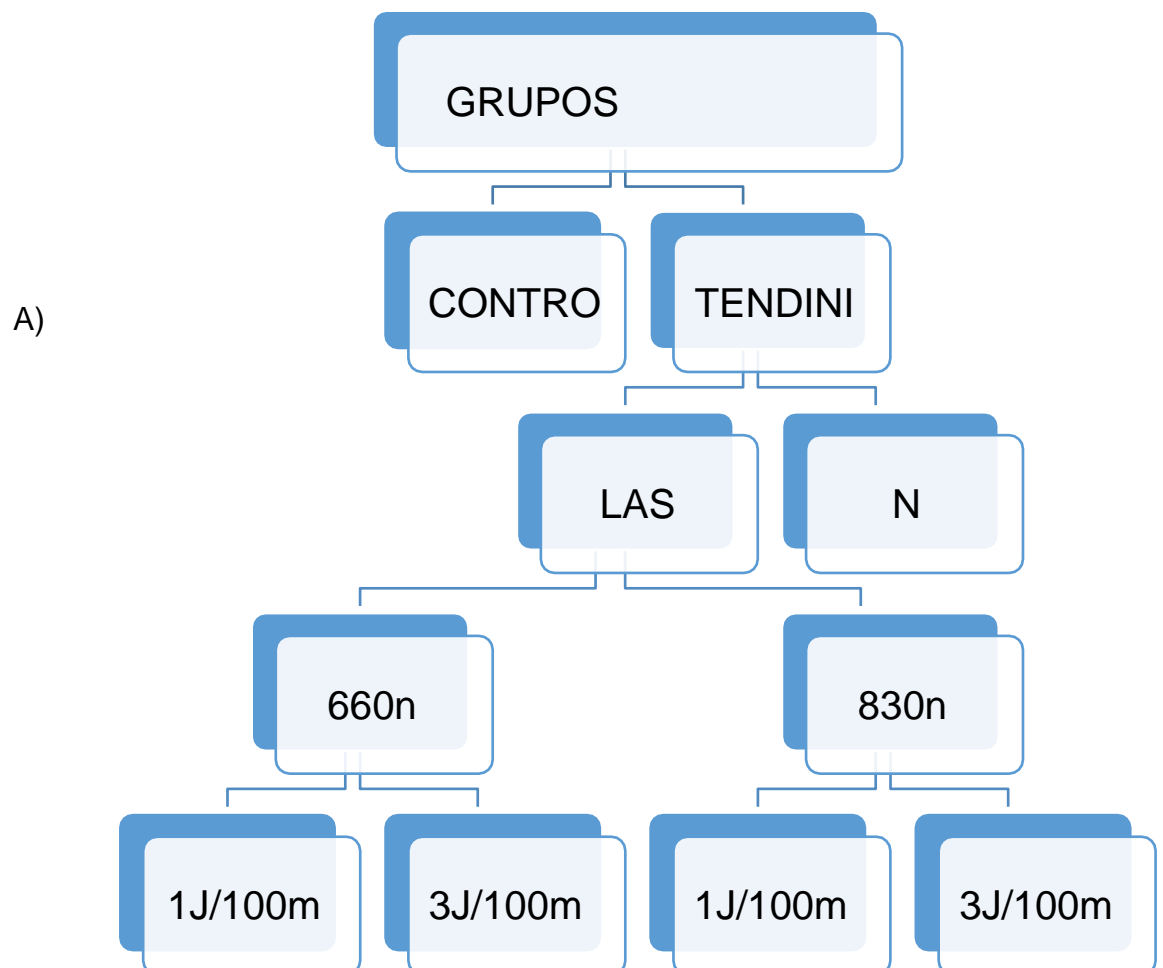
Figuras 2. Grupos Experimentais – Curso temporal

4.3.2- Análises dos grupos tratados em diferentes parâmetros de irradiação

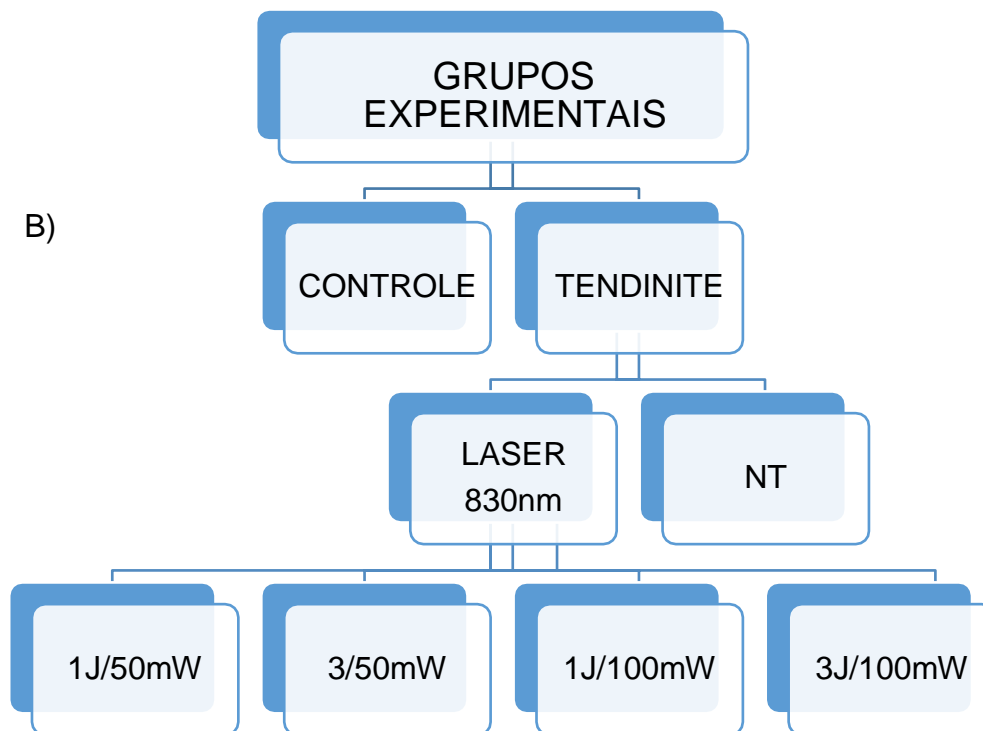
Após a determinação do curso temporal, foi escolhido o tempo de 30 dias para análises histológicas e biomecânicas; 12 horas para expressão de MMP-3 e MMP-13; 24 horas para expressão de Tenascina-C.

O protocolo experimental para os grupos tratados obedeceu às relações indicadas na figura abaixo:

Grupos experimentais tratados com LBI



Em (A) Comparação entre grupos irradiados com 660nm ou 830nm, em energias de 1 ou 3J, com potência de 100mW



. Em (B) Comparação entre grupos irradiados com LBI 830nm, 1 ou 3J nas potências de 50 ou 100mW.

Figuras 3. Grupos experimentais tratados com LBI

4.4- Aplicações da Terapia com Laser de Baixa Intensidade (LBI)

Após serem submetidos ao modelo de tendinite, os animais receberam o tratamento com Laser de baixa intensidade (Thera Lase, DMC®), na região da lesão, em único ponto, perpendicular ao tecido, numa área de 0,028 cm² por contato, imediatamente após a indução do processo inflamatório.

Para as análises histológicas e biomecânicas, as irradiações foram repetidas até o 7º dia e os animais eutanasiados no 30º dia.

Para as análises de expressão gênica de MMP3, MMP13 e Tenascina-C, os animais foram irradiados imediatamente após a indução da lesão e os animais eutanasiados em 12 horas para MMPs e 24 horas para Tenascina-C, de acordo com o curso temporal definido anteriormente.

Abaixo, os parâmetros de irradiação utilizados para os diferentes grupos.

Tabela 1- Parâmetros de irradiação utilizados nos diferentes grupos.

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)
660	L1J	100	3,5	1	35,71	10 seg	0,028
	L3J	100	3,5	3	107,14	30 seg	
830	L1J	50	1,8	1	35,71	20 seg	0,028
		100	3,5			10 seg	
	L3J	50	1,8	3	107,14	1 min	
		100	3,5			30 seg	

4.5- Análises de Expressão Gênica pela reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa em tempo real (real time RT-PCR).

Após a eutanásia, os tendões foram dissecados, removidos e armazenados (-80°C) para análise da Expressão de mRNA por RT-PCR em tempo real. A expressão gênica dos compostos indicados na tabela abaixo foi quantificada pela reação em cadeia da polimerase reversa (PCR) em tempo real. O RNA total das amostras foi extraído com o reagente Trizol (Gibco BRL, EUA), de acordo com instruções do fabricante. Após tratamento com DNase, a síntese dos cDNAs foi feita pelo método da transcriptase reversa, empregando a enzima SuperScript (Invitrogen, 2 µg de RNA total), na presença de mistura de primers randômicos e oligo dT. A análise das amostras em tempo real obedecerá a um ciclo de desnaturação inicial (10min a 95 °C) e quarenta ciclos de amplificação (30 seg de desnaturação a 95 °C e 1min de anelamento e extensão a 60 °C).

As seqüências dos primers utilizados estão representadas no quadro abaixo. Os resultados da expressão gênica foram interpretados usando-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Ct = número de ciclos necessários para atingir o limiar de fluorescência acima do valor de fundo - background) que relaciona a expressão do gene de interesse comparado àquela do gene controle HPRT

Tabela 2: Seqüência de Primers para análise da Expressão de mRNA, pela técnica de RT-PCR em tempo real.

PRIMER	SEQUÊNCIA
HPRT	FOWARD: AAGCTTGCTGGTGAAAAGGA REVERSE: TGATTCAAATCCCTGAAGTGC
MMP3	FOWARD: CCCGTTTCCATCTCTCTCAA REVERSE: GTGGGTACCACGAGGACATC
MMP13	FOWARD: GATGGGCCTTCTGGTCTTCT REVERSE: GAGCTGCTTGTCCAGGTTTC
TENASCINA-C	FOWARD: GACCTG GCCT ATG AGT AC REVERSE: AGCACGGGTGTTTTATAGC

4.6- Propriedades Mecânicas do Tendão

Como citado anteriormente, após a indução do processo inflamatório pela injeção de colagenase, os animais foram eutanasiados em diferentes tempos e o tecido tendíneo removido para posteriores análises. Parte deste material foi utilizada imediatamente após a retirada, nos ensaios de tração para a avaliação de suas propriedades mecânicas. A atividade normal do tendão é formada por um conjunto de tensões aplicadas no tecido, divididas em forças de carregamento e descarregamento (Fig.6). Desta forma, foi aplicada uma sequência de forças de carregamento e descarregamento a fim de simular as condições de tensões reais do tendão.

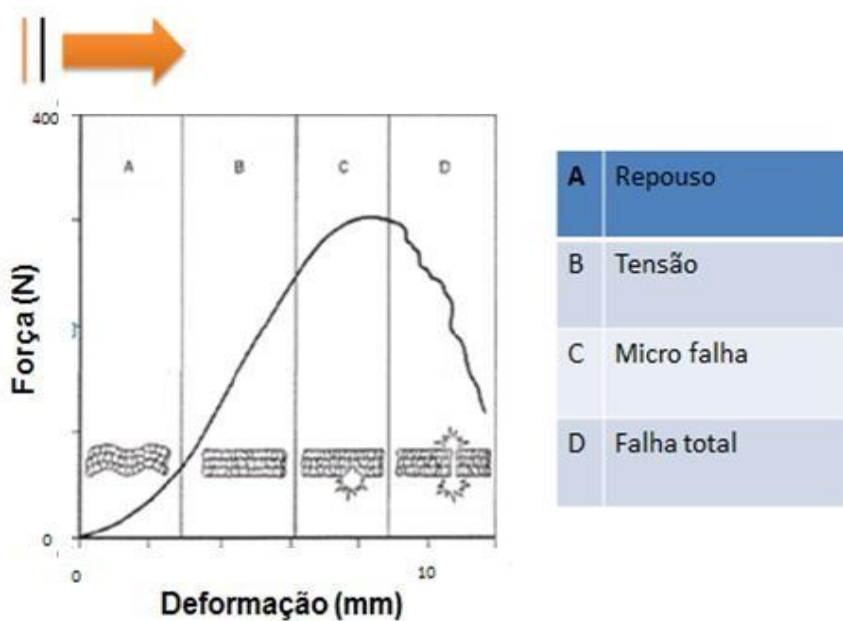


Figura 4: Curva típica durante a aplicação da força até a ruptura da amostra.

Fonte: Biomecânica dos Tendões e Ligamentos. ⁽⁷¹⁾

Primeiramente são realizadas as medidas de comprimento, largura e altura do tendão. Estes valores são utilizados para detalhar as dimensões do material e padronização dos resultados. Os tendões foram fixados no aparelho de teste mecânico (tensiômetro). A região osteotendínea fixada na parte inferior do aparelho e a região músculo-tendíneo fixada na parte superior do tensiômetro. A fim de evitar o ressecamento durante o teste de tração, a região fixada é imersa em solução isotônica (NaCl 0.9%) durante todo o teste. Vários testes de carregamento e descarregamento de forças foram realizados até o momento da ruptura do tecido. As propriedades mecânicas no momento da ruptura foi analisada conforme indicado na figura seguinte:

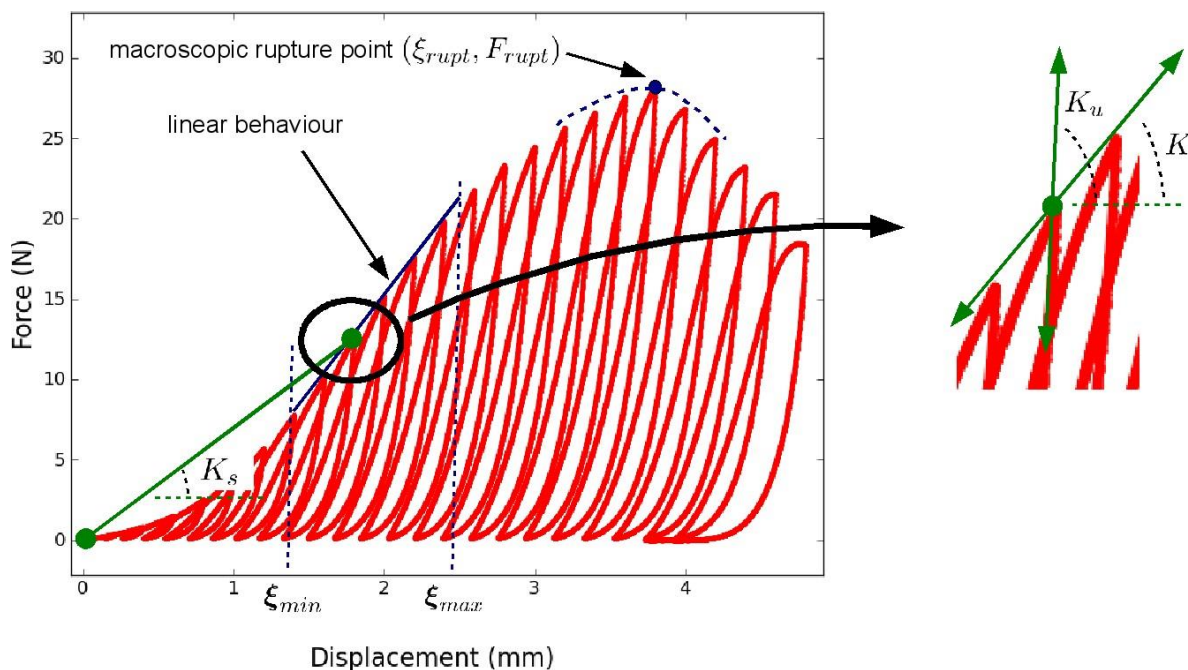


Figura 5: Curva típica de registro durante a aplicação das forças de carregamento e descarregamento. ⁽²⁷⁾

- Força máxima de tração no momento da ruptura do tendão após ensaio cíclico ($F_{max} = N$).
- Deslocamento máximo no momento da ruptura, indicando a capacidade de deformação do tecido ($D_{max} = mm$).

Fmax caracteriza o alcance da força do tendão, ou seja, sua capacidade de suportar forças. Dmax caracteriza a elasticidade dos tendões, podendo revelar a presença de danos neste tecido.

4.7- Preparação histológica das amostras

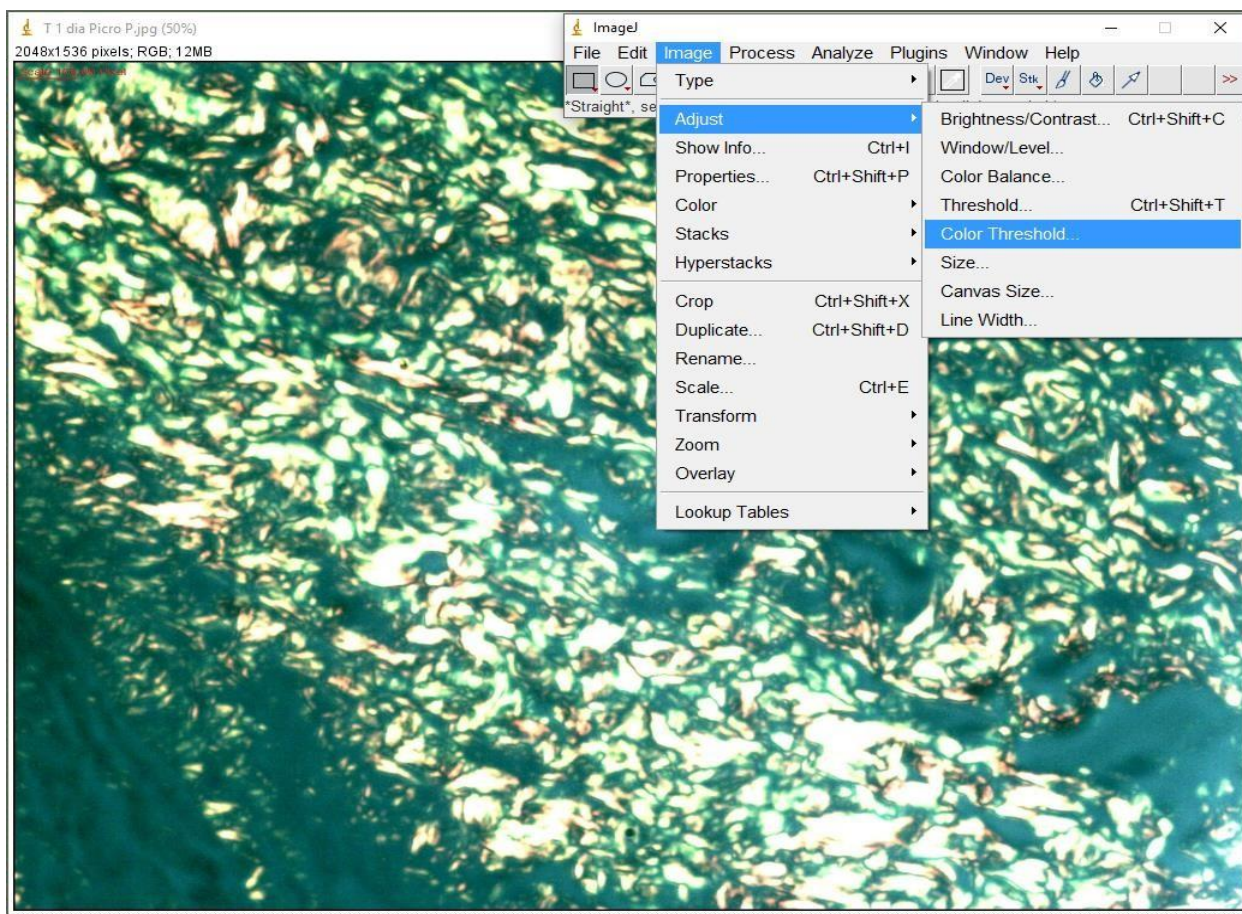
Para a avaliação qualitativa e quantitativa da concentração, estado de agregação e orientação das fibras de colágeno, os tendões passarão por preparações histológicas padrão, começando pela fixação do tecido em formol (10%) durante 24h. Logo após os tendões foram lavados em água corrente e então desidratados 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 passarão 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 semi-seriados na espessura de 7µm e transferidos para lâminas histológicas onde foram desparafinizadas e hidratadas.

Para a microtomia foram realizados cortes com 5 µm de espessura em micrótomo LEICA RM 2125 RT. Uma vez precedido o preparo das amostras os cortes foram colocados em lâminas para serem corados para visualização de colágeno. Após a coloração os cortes foram montados em lâminas permanentes para posterior análise em microscópio óptico e fotografados através de sistema de microfotografia (Olympus System Microscope Model CX 41 – Olympus PM10SP Automatic Photomicrographic System).

4.8- Quantificação dos Colágenos I, III e Colágeno total pelo programa ImageJ:

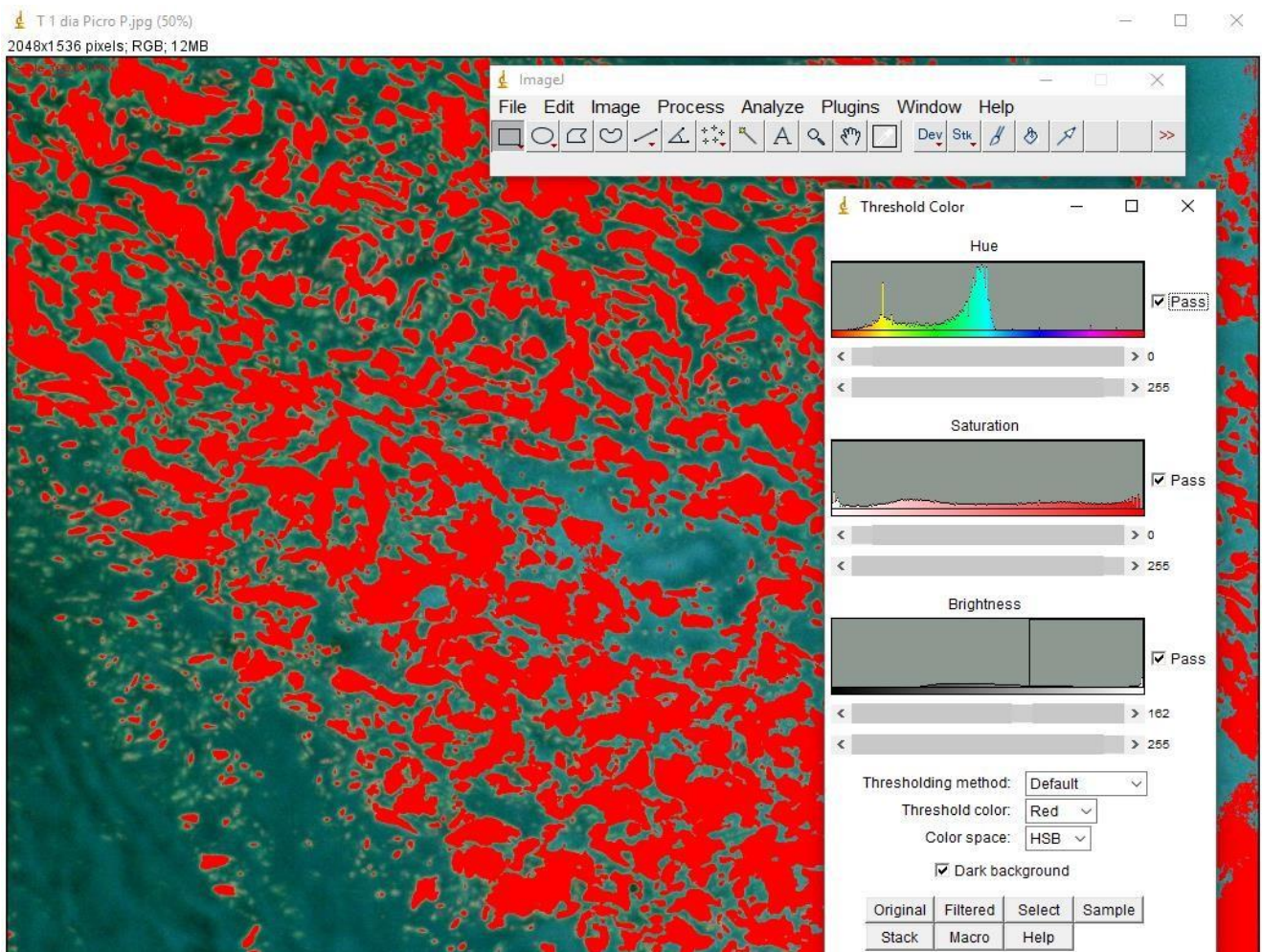
Realizou-se a análise das imagens mediante o software ImageJ 1.50J/ Java 1.8 versão para Windows (RGB), esse programa identifica o tipo de colágeno baseado em cores. Vermelho, amarelo e laranja correspondem a colágeno tipo I (maduro), enquanto que o verde é igual a colágeno tipo III (imaturo). ^(72, 73) Os resultados foram expressos em área percentual e quantificados em pixels, para a análise quantitativa, 05 imagens da área total da lesão por amostras N5 por grupo (aumento de 20X). Foram contabilizadas as percentagens totais de colágeno I, III e de colágeno total.

A)



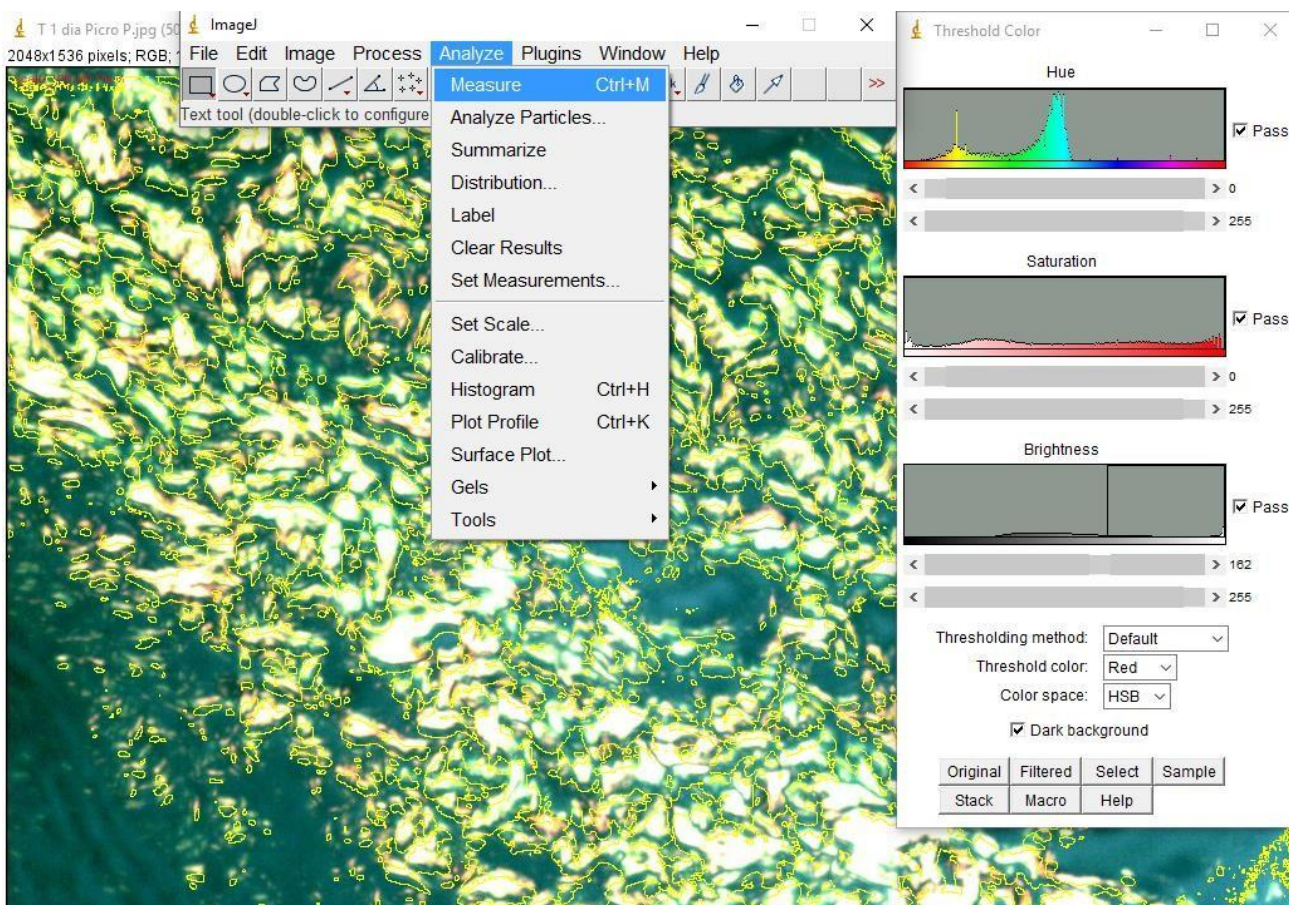
Em (A): seleção da imagem e ajuste da área a ser analisada.

B)



Em (B) utilização de plugin (específico para colágenos) Color threshold do software Image J para definição de cores dos colágenos I e III.

C)



Em (C): Quantificação do colágenos em Pixels, análise da quantificação dos colágenos I e III mensurados por coloração.

Figuras 6: Imagens da sequência de etapas utilizadas para quantificar colágeno tipo I e III.

A marcação do colágeno foi quantificada por segmentação de cores (colour deconvolution), utilizando o plugin Threshold Color e medição automática utilizando o software Image J (Fig. 8). Expressos como densidade óptica média integrada (IOD) 83.

Foram examinadas 5 imagens histológicas e os dados foram submetidos à análise estatística.

4.9- Análises Estatísticas

Os resultados da expressão gênica, propriedades mecânicas e proporção de colágeno foram descritos em valores médios com os respectivos desvios padrão. Foi realizado o teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade

Os valores foram considerados normais, sendo posteriormente utilizado o teste one-way ANOVA com post-hoc Tukey-Kramer. O nível de significância estatística foi a partir de $p < 0,05$.

5- RESULTADOS

Os resultados deste trabalho foram separados em 3 fases: conforme sequência a seguir:

- **Fase I:** Foram apresentados o curso temporal de todas as análises realizadas, entre elas:
 - Curso temporal das propriedades mecânicas (força máxima de tração e deslocamento ou deformação no momento da ruptura);
 - Curso temporal das imagens histológicas e da quantificação de colágeno;
 - Curso temporal da expressão gênica de MMP-3, MMP-13 e Tenascina-C.

- **Fase II:** Foram apresentados os resultados histológicos, biomecânicos e de expressão gênica dos grupos tratados com laserterapia.

Foi realizada a comparação da irradiação laser no comprimento de onda vermelho (660nm) e infravermelho (830nm) na energia de 1 e 3J.

- **Fase III:** A partir dos resultados obtidos na Parte II, foram apresentados os resultados dos grupos experimentais comparando diferentes potências (50 e 100mW) para o mesmo comprimento de onda (830nm).

Fase I – Determinação do curso temporal

5.1) Análise da força máxima de ruptura após a indução da tendinite – Curso temporal.

Foram avaliadas a força máxima de tração no momento da ruptura e a deformação indicada pelo deslocamento neste mesmo ponto.

O gráfico abaixo mostra a Força máxima obtida no momento da ruptura, durante o ensaio de tração cíclico. Os grupos apresentados são: CTL (grupo controle) e grupos com Tendinite induzido por colagenase após 1, 3, 6, 14, 30, 45 e 60 dias.

Após 1 dia da indução da lesão, os tendões apresentaram apenas 7% de força máxima de ruptura comparado ao grupo CTL. Os grupos 3, 7 e 14 dias apresentaram respectivamente 36%, 44% e 41% desta mesma força. Os grupos 30 e 45 apresentaram forças de 55% e 59% respectivamente. O grupo 60 apresentou 81% da força máxima de ruptura comparada ao grupo CTL, sendo significativamente maior que os demais grupos lesionados.

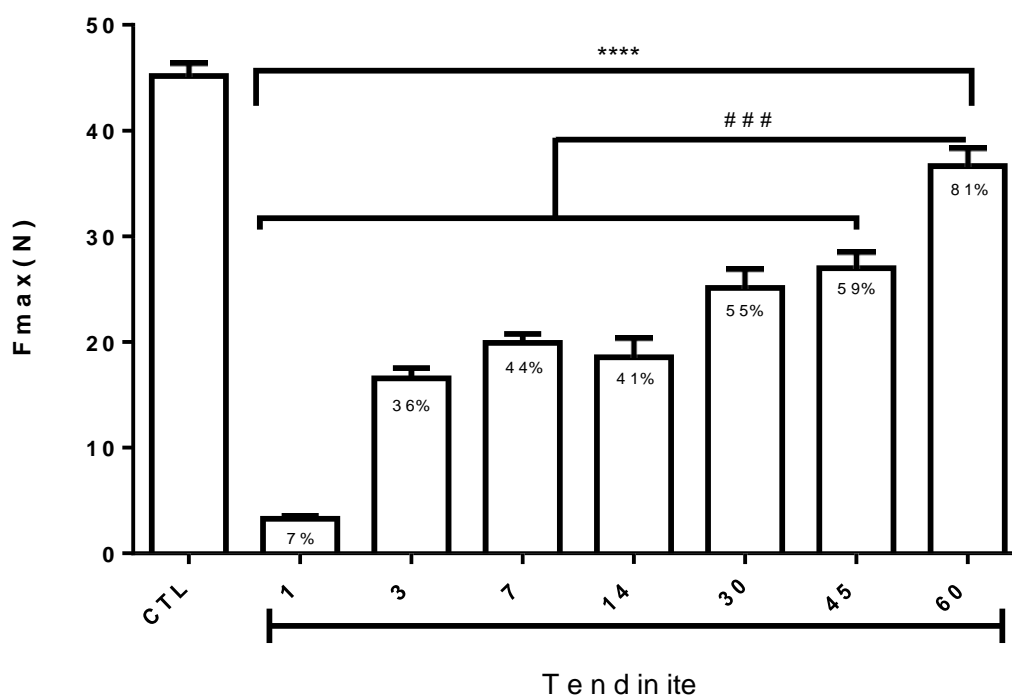


Figura 7: Gráfico da Força máxima no momento da ruptura - Curso Temporal da tendinite em tendão calcâneo de ratos, lesão induzida por injeção de colagenase, grupos apresentados são: CTL (grupo controle), e grupos Tendinite após 1 dia, 3 dias, 6 dias, 14 dias, 30 dias, 45 dias e 60 dias. Os valores estão representados pela média + DPM. N = 5 animais/grupo (**** $p < 0,0001$ vs CTL; ### $p < 0,001$ vs 60).

52) Análise do deslocamento máximo no momento da ruptura, após a indução da tendinite – Curso temporal.

O gráfico abaixo mostra o deslocamento registrado pelos tendões durante o ensaio de tração cíclico, no momento da ruptura do tecido. O deslocamento foi indicado no gráfico como a deformação do tecido tendíneo.

Os grupos apresentados no gráfico são: grupo controle (CTL) com tendões íntegros e grupos com tendinite, analisados em 1, 3, 7, 14, 30, 45 e 60 dias.

Todos os grupos apresentaram aumento da deformação quando comparados ao grupo controle. Houve uma tendência maior de deformação nos grupos 1, 3 e 14. A partir do 30º dia, foi observado redução da deformação, comparados aos grupos 3 e 14 e esta redução foi mantida nos dias 45 e 60.

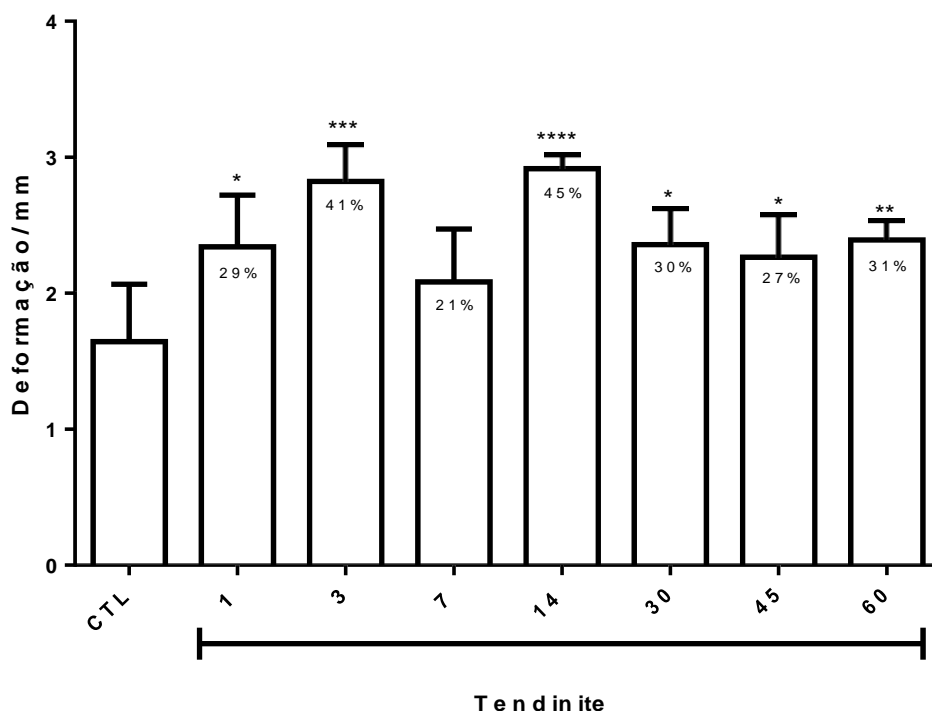
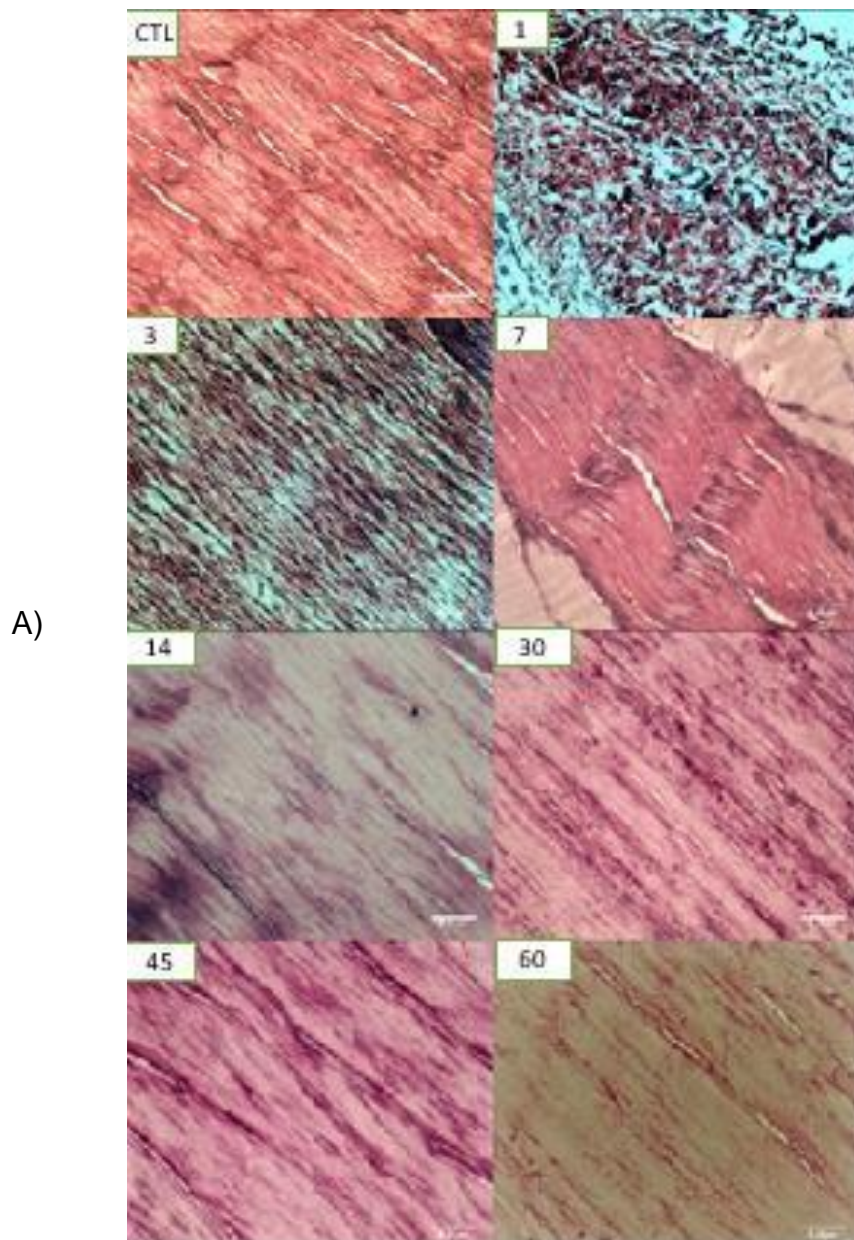


Figura 8: Gráfico da Deformação - Curso Temporal da tendinite em tendão calcâneo de ratos, lesão induzida por injeção de collagenase, grupos apresentados são: CTL (grupo controle), e grupos Tendinite após 1 dia, 3 dias, 6 dias, 14 dias, 30 dias, 45 dias e 60 dias. Os valores estão representados pela média + DPM. N = 5 animais/grupo (* p < 0,05 e ****p < 0,0001 vs CTL).

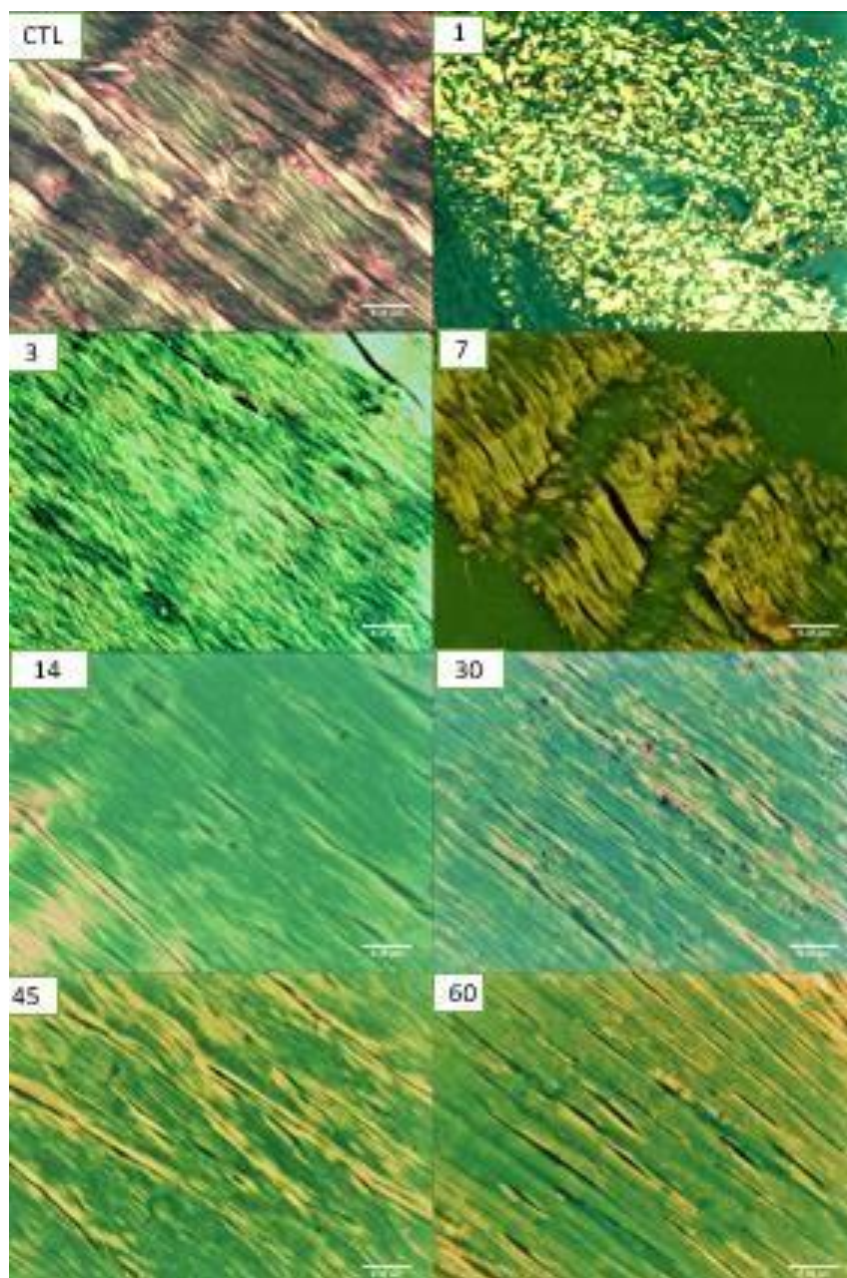
5.3) Análise histológica por luz polarizada: Imagens de colágeno tipo I e III – Curso temporal

As figuras abaixo indicam a histologia do tendão íntegro (CTL) ou após indução da tendinite, obtidas após 1, 3, 7, 14, 30, 45 e 60 dias da indução por collagenase. Tanto em (A) como em (B) é possível observar alteração da organização das fibras do tecido tendíneo, principalmente dos primeiros dias após a indução. Os grupos 1, 3 e 7 apresentaram maiores alterações comparados ao grupo CTL. A partir do 14º dia houve uma melhora na organização do tecido, progredindo nos dias 30, 45 e 60.



Em (A) Imagens coradas com Picosirius Red, sem polarização.

B)



Em (B) Imagem polarizada

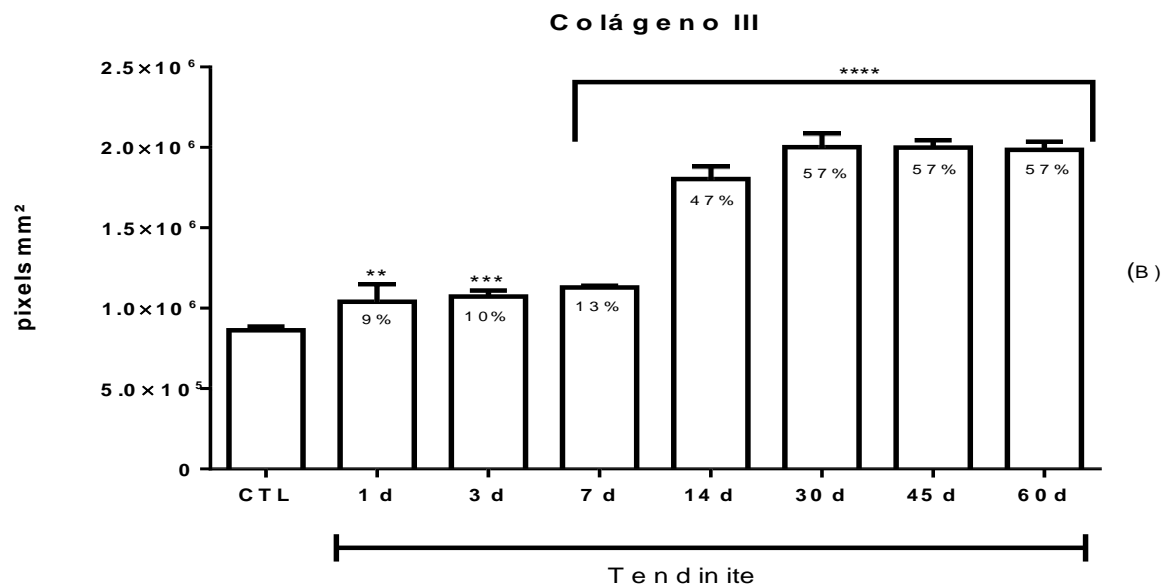
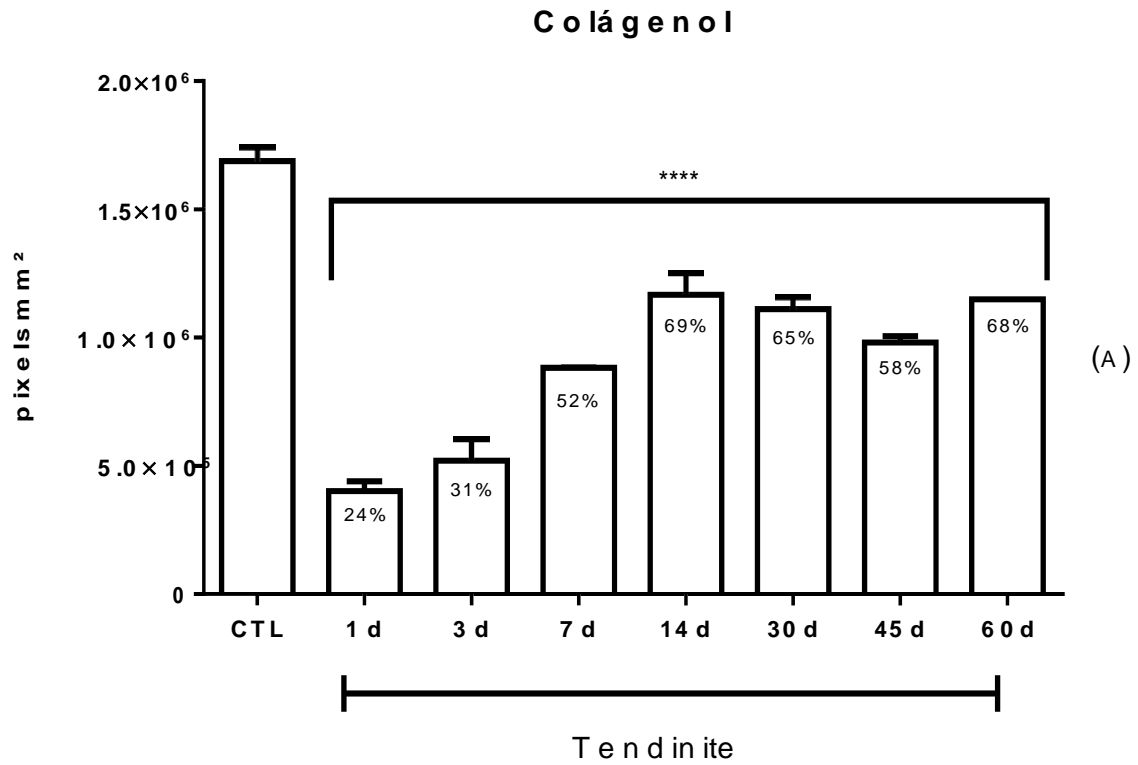
Figuras 9: Imagens da histologia do tendão calcâneo de ratos – Corte longitudinal – Curso temporal. Grupos: controle saudável (CTL) e tendinite com 1, 3, 7, 14, 24, 30, 45 e 60 dias. Aumento 200X.

5.4) Análise histológica por luz polarizada: Quantificação de colágeno tipo I e III – Curso temporal

O gráfico abaixo representa a quantificação de colágeno obtidas a partir da análise das imagens, utilizando o programa ImageJ e uso de plug-in específico com valores expressos em “pixels”, como indicado anteriormente na metodologia

Em (A), todos os grupos apresentaram redução na proporção de colágeno tipo I quando comparados ao grupo controle. A redução foi mais acentuada nos primeiros dias após a indução da tendinite, representados pelos grupos 1, 3 e 7. A partir do 14^o dia houve um aumento da proporção de colágeno I, mantida nos grupos (30 e 60).

Em (B), foi observado um aumento da proporção de colágeno III a partir do 7^o dia quando comparado ao grupo controle. Houve também um expressivo aumento da proporção de colágeno III após o 14^o dia e mantida nos grupos 30, 45 e 60.



Figuras 10: Gráfico de quantificação de Colágeno a partir das imagens com lente de polarização – Curso Temporal. Em (A) temos a quantificação de colágeno I e em (B) a quantificação de colágeno III. Grupos apresentados são: CTL (grupo controle), e grupos Tendinite após 1, 3, 6, 14, 30, 45 e 60 dias após a indução da tendinite. Valores representados pela média + DPM. N = 5 animais/grupo (Em A e B, *p < 0,05 e ****p < 0,0001 vs CTL).

5.5) Expressão gênica de Metaloproteinase de Matriz (MMP-3 e MMP-13) – Curso Temporal.

A fim de verificar o momento de maior variação da expressão gênica de MMP-3 e MMP-13, foi realizado o curso temporal nos tempos de 2, 6, 12, 24, 48 e 72 horas após da indução da tendinite. O tempo de maior variação foi utilizado para análise destes mesmos genes, porém nos grupos tratados com laser de baixa intensidade.

Em (A) temos a expressão gênica da MMP-3 durante o processo inflamatório induzido pela colagenase nos tendões calcâneos dos animais. Foi observado aumento da expressão deste gene em praticamente todos os tempos do curso temporal utilizado, com maior aumento em 12 horas. A partir deste dado, foi utilizada a expressão de MMP-3 em 12 horas para os próximos grupos tratados com laser de baixa intensidade.

Em (B) temos o curso temporal da expressão gênica de MMP-13 em tendões onde a tendinite foi induzida. Neste caso, foi observado aumento da expressão gênica de MMP-13 nos tempos de 2, 12 e 48 horas. Foi escolhido igualmente ao gene anterior (MMP-3) o tempo de 12 horas para estudo da variação na expressão tanto de MMP-3 como de MMP-13.

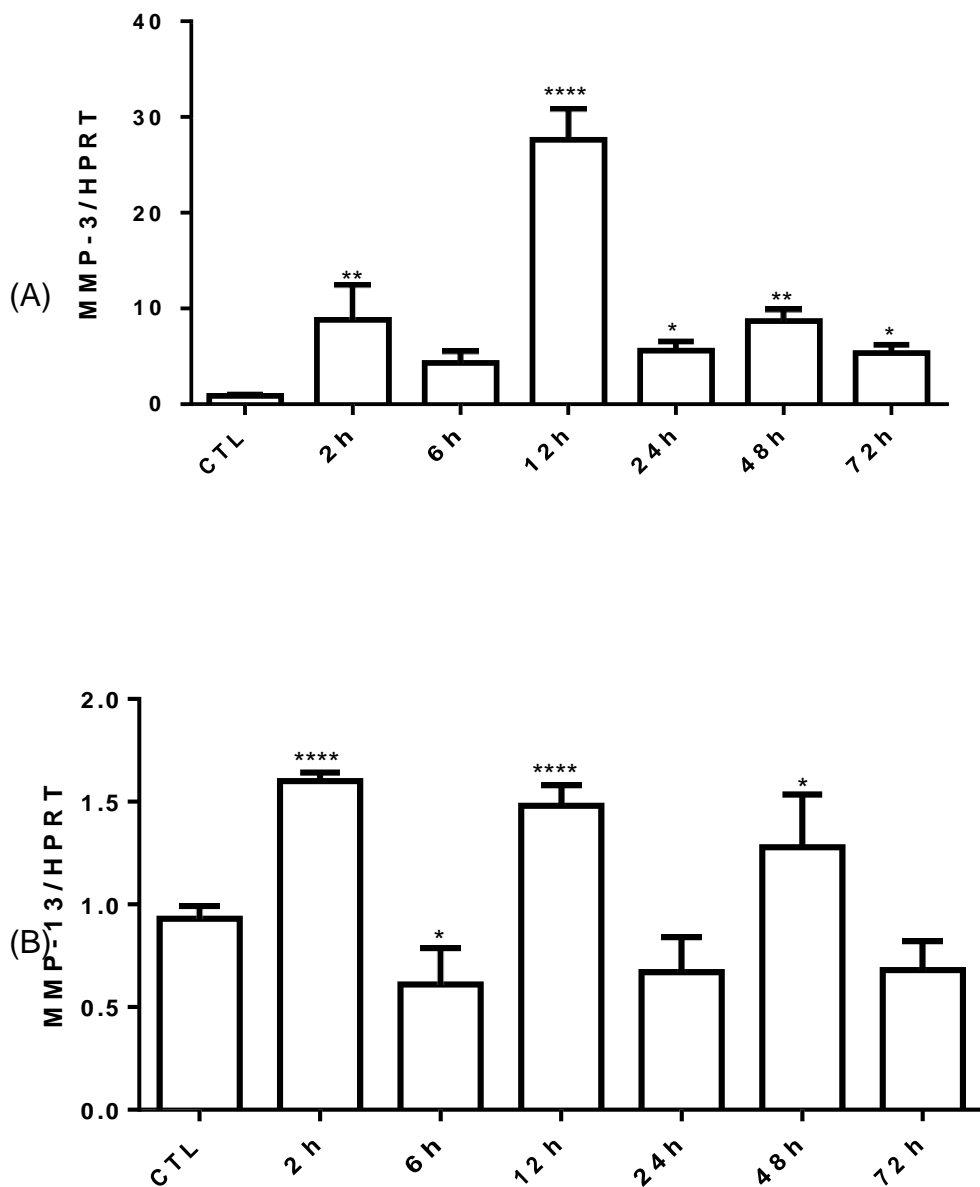


Figura 11: Gráfico do curso temporal da Expressão gênica de metaloproteinase de matriz. Em (A) temos a Expressão Gênica da MMP-3 ($p < 0,05$ e $p < 0,01$) vcs controle. Em (B) temos a Expressão gênica de MMP-13. Grupos: CTL, 2h, 6h, 12h, 24h, 48h, 72h. Valores representados pela média + DPM. N = 5 animais/grupo. (Em A e B: * $p < 0,05$ e **** $p < 0,01$ vs CTL).

5.6) Expressão gênica de Tenascina-C – Curso temporal.

Foi realizado o curso temporal da expressão de Tenascina-C nos tempos de 2, 6, 12, 24, 48 e 72 horas após da indução da tendinite e o tempo de maior variação foi utilizado para análise da expressão deste gene nos grupos tratados.

No gráfico abaixo foi observado aumento da expressão de Tenascina-C em todos os tempos escolhidos no experimento, com pico de expressão em 24 horas após a indução da tendinite. Foi escolhido o tempo de 24 horas para análise da expressão de Tenascina-C nos grupos trabalhos.

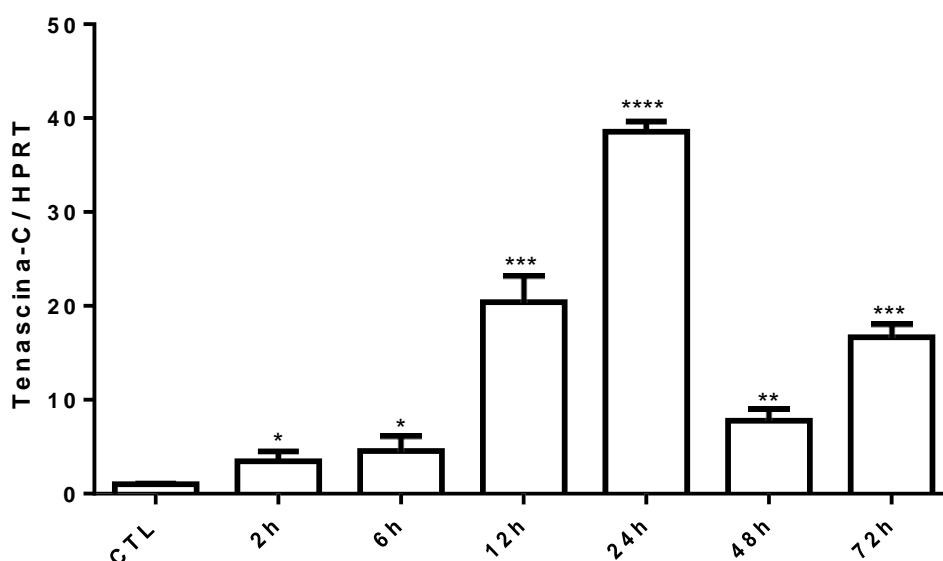


Figura 12: Gráfico do Curso Temporal da Expressão Gênica de Tenascina-C. Grupos: CTL, 2h, 6h, 12h, 24h, 48h, 72h. Os valores estão representados pela média + DPM. N = 5 animais/grupo. (* $p < 0,05$ e **** $p < 0,01$ vs CTL).

Fase II – Comparação entre laser vermelho (660m) e Infravermelho (830nm)

A partir dos resultados obtidos na determinação do curso temporal das diferentes análises, foram escolhidos os tempos determinados a seguir:

- A avaliação das forças máximas e do deslocamento no momento da ruptura obtido no ensaio de tração cíclico, bem como a quantificação do colágeno I e III obtidos a partir da análise das imagens histológicas foi realizada após 30 dias da indução da tendinite no tendão calcâneo dos ratos.

- A determinação da expressão gênica de MMP-3 e MMP-13 nos grupos tratados foi realizada após 12 horas da indução do processo inflamatório. Já a expressão de Tenascina-C foi realizada após 24 da indução da mesma lesão.

Seguem abaixo, os gráficos utilizando a comparação entre grupos irradiados com laser vermelho (660nm) e infravermelho (830nm).

5.7) Análise da força máxima de ruptura após a indução da tendinite – Comparação entre 660nm e 830nm.

O gráfico a seguir mostra a Força máxima obtida no momento da ruptura, durante o ensaio de tração cíclico. Os grupos apresentados são: CTL (grupo controle), NT (tendinite sem tratamento) e grupos irradiados com laser vermelho (660nm, energia de 1J ou 3J, potência de 100mW) ou infravermelho (830nm, energia de 1J ou 3J, potência de 100mW).

Foi observado redução da força máxima de tração no momento da ruptura (Fmax) em todos os grupos onde houve indução da tendinite.

Não houve diferenças entre os grupos NT e L1J em 660nm. Os grupos L3J em 660nm e todos os grupos irradiados com 830nm apresentaram aumento de Fmax quando comparados ao grupo NT, especialmente, o grupo 1J em 830nm apresentou o maior aumento de Fmax comparado ao grupo NT.

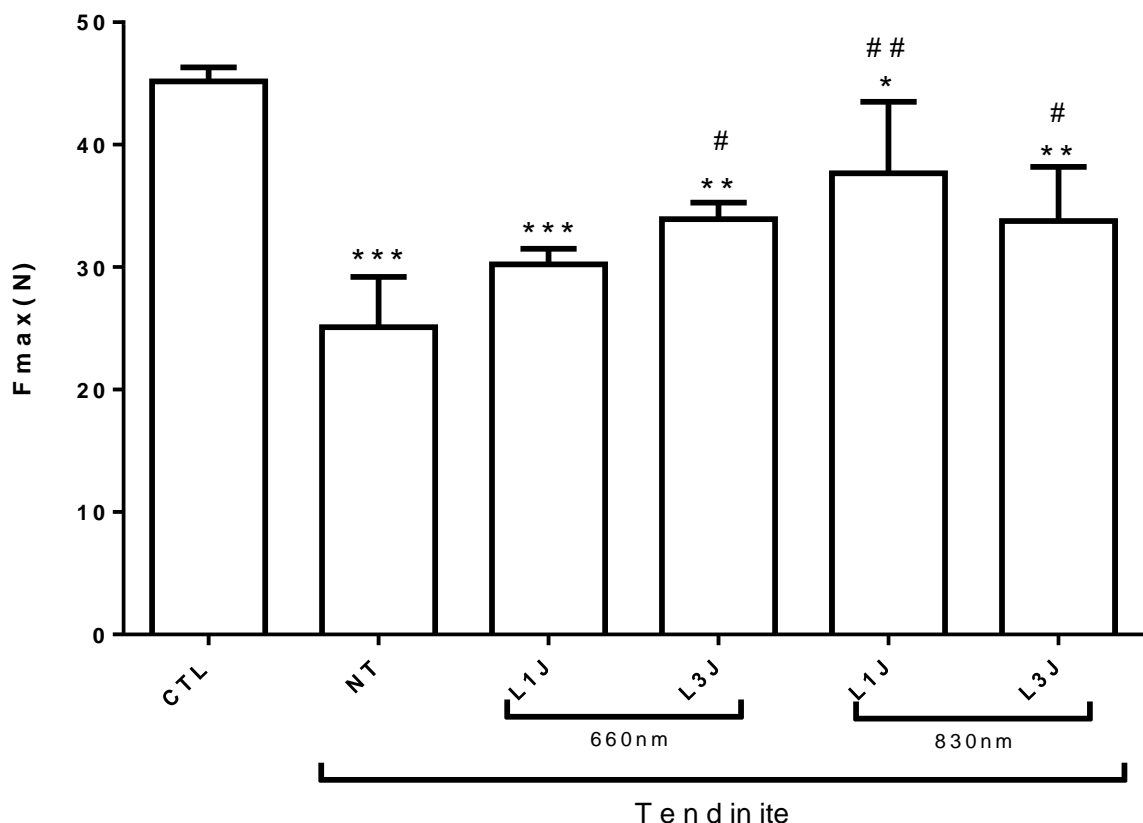


Figura 13: Gráfico da Força máxima no momento da ruptura – Grupos: CTL (Controle) e tendinite NT (sem tratamento) ou irradiado com laser 660nm (L1J e 3J) ou 830nm (1J e 3J). Os valores estão representados pela média + DPM. N = 5 animais/grupo *p < 0,05 e ****p < 0,01 vs CTL; #p<0,05 e ##p<0,03 vs NT).

5.8) Análise do deslocamento máximo no momento da ruptura, após a indução da tendinite – Comparação entre 660nm e 830nm.

O gráfico abaixo mostra o deslocamento registrado pelos tendões durante o ensaio de tração cíclico. Os grupos apresentados são: CTL (grupo controle), NT (tendinite sem tratamento) e grupos irradiados com laser vermelho (660nm, energia de 1J ou 3J, potência de 100mW) ou infravermelho (830nm, energia de 1J ou 3J, potência de 100mW).

O deslocamento foi indicado no gráfico como a deformação máxima do tecido tendíneo até a ruptura.

Foi observado no grupo NT um discreto aumento da deformação, comparado ao grupo CTL. Somente os grupos irradiados com laser 830nm, nas 2 energias (1 e 3J) apresentou redução da deformação quando comparado ao grupo NT.

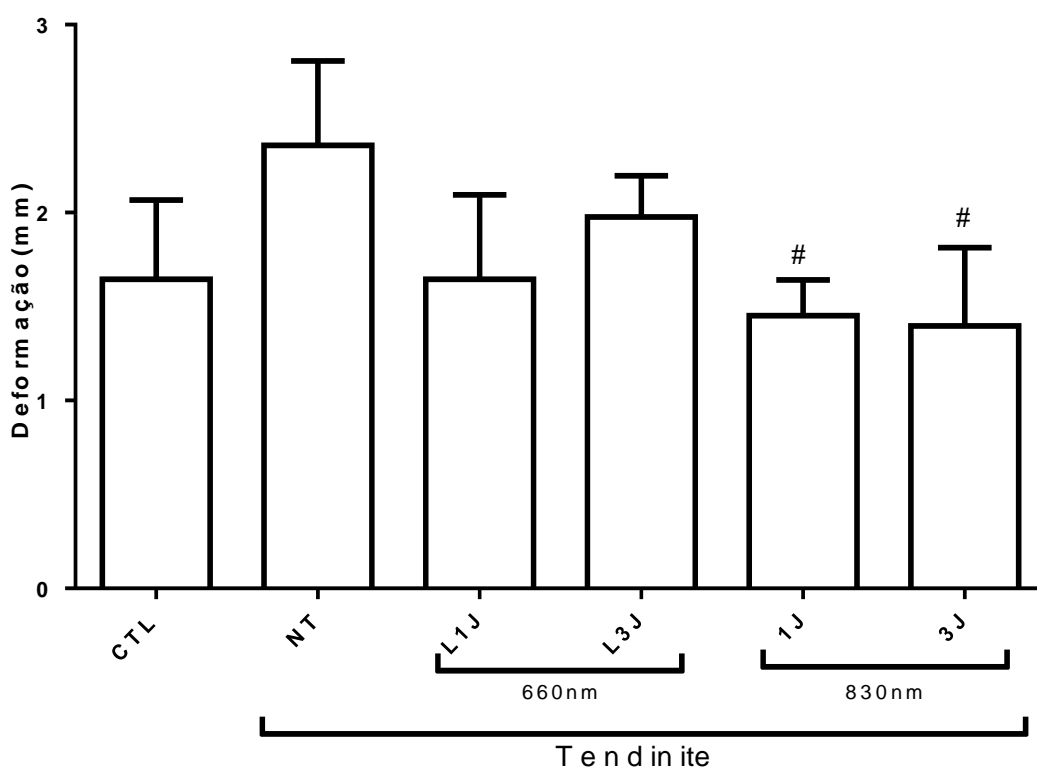


Figura 14: Gráfico da Deformação - Grupos: CTL (Controle) e tendinite NT (sem tratamento) ou irradiado com laser 660nm (L1J e 3J) ou 830nm (1J e 3J). Os valores estão representados pela média + DPM. N = 5 animais/grupo (# p < 0,05 vs NT).

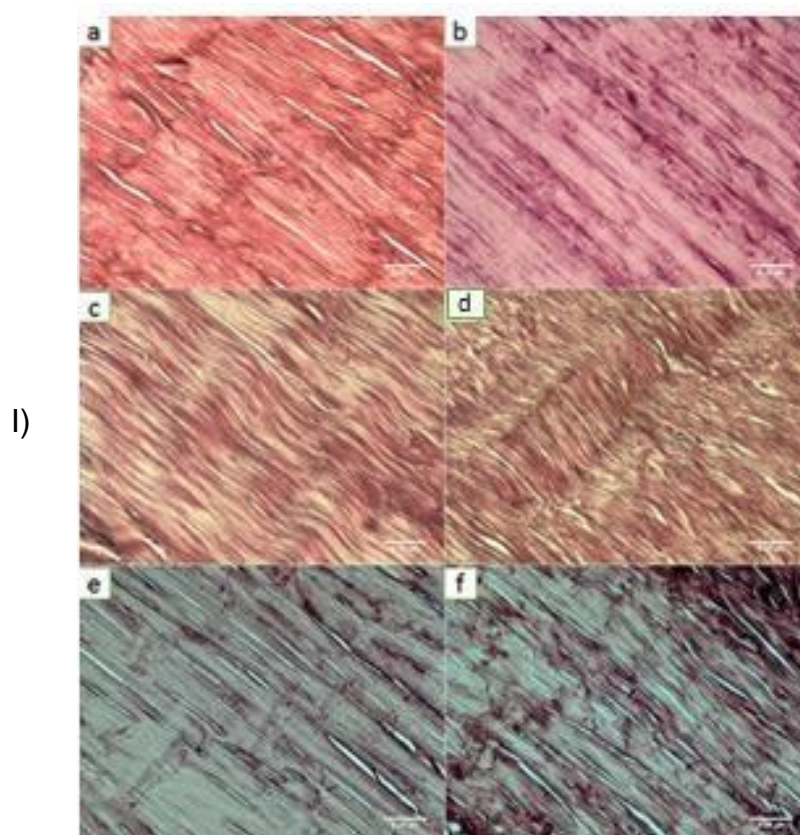
5.9) Análise histológica por luz polarizada: Imagens de colágeno tipo I e III – Comparação entre 660nm e 830nm.

As imagens histológicas representativas a seguir foram organizadas em (a) CTL; (b) NT; (c) e (d) grupos com laser 660 com irradiados cm 1J e 3J respectivamente; (e) e (f) grupos irradiados com laser 830nm em 1J e 3J respectivamente.

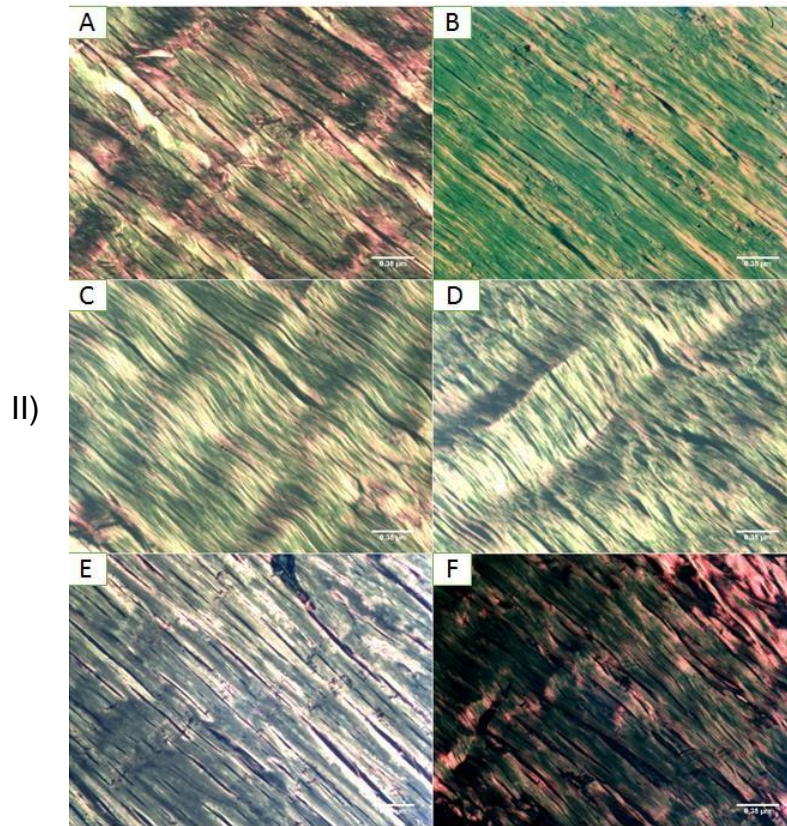
Em (I), o grupo NT aparentemente apresentou alterações na organização das fibras comparado com os demais grupos que apresentaram morfologia aparentemente mais próxima ao grupo CTL

Em (II), o grupo NT e os grupos 1 e 3J para 660nm apresentaram aumento na coloração verde, comparados ao grupo CTL.

Os grupos 1 e 3J para 830nm apresentaram concentração de verde próximo ao grupo CTL.



Em (I) Imagens histológicas do tendão calcâneo de ratos, coradas com Picrosirius Red, sem polarização.



Em Imagens histológicas com polarização do tendão calcâneo de ratos.

Figura 15: Imagens da histologia do tendão – Corte longitudinal. Comparação entre 660nm e 830nm. Grupos: CTL (saudável), grupos tendinites NT (Não tratado) ou irradiado com laser 660nm (1J ou 3J) ou 830nm (1 ou 3J). Aumento 200X.

5.10) Análise histológica por luz polarizada: Quantificação de colágeno tipo I e III – Comparação entre 660nm e 830nm.

O gráfico abaixo representa a quantificação de colágeno obtidas a partir da análise das imagens representativas do item “6,9” pelo programa ImageJ com uso de plug-in específico com valores expressos em “pixels” e traduz de forma quantitativa a proporção de colágeno tipo I para (A) e colágeno III para (B).

Em (A), todos os grupos apresentaram redução na proporção de colágeno tipo I quando comparados ao grupo controle e a menor redução desta proporção foi observada no grupo 3J (660nm) seguido de 1J (830nm). Estes 2 grupos ainda apresentaram proporção de colágeno I aumentados quando foram comparados ao grupo NT.

Em (B), todos os grupos lesionados apresentaram aumento na proporção de colágeno III. No entanto, todos os grupos tratados, ambos com 660 ou 830 apresentaram redução a proporção de colágeno III quando foram comparados ao grupo NT. O grupo irradiado com 830nm apresentou menor proporção de colágeno III quando comparados ao grupo irradiado com 660nm.

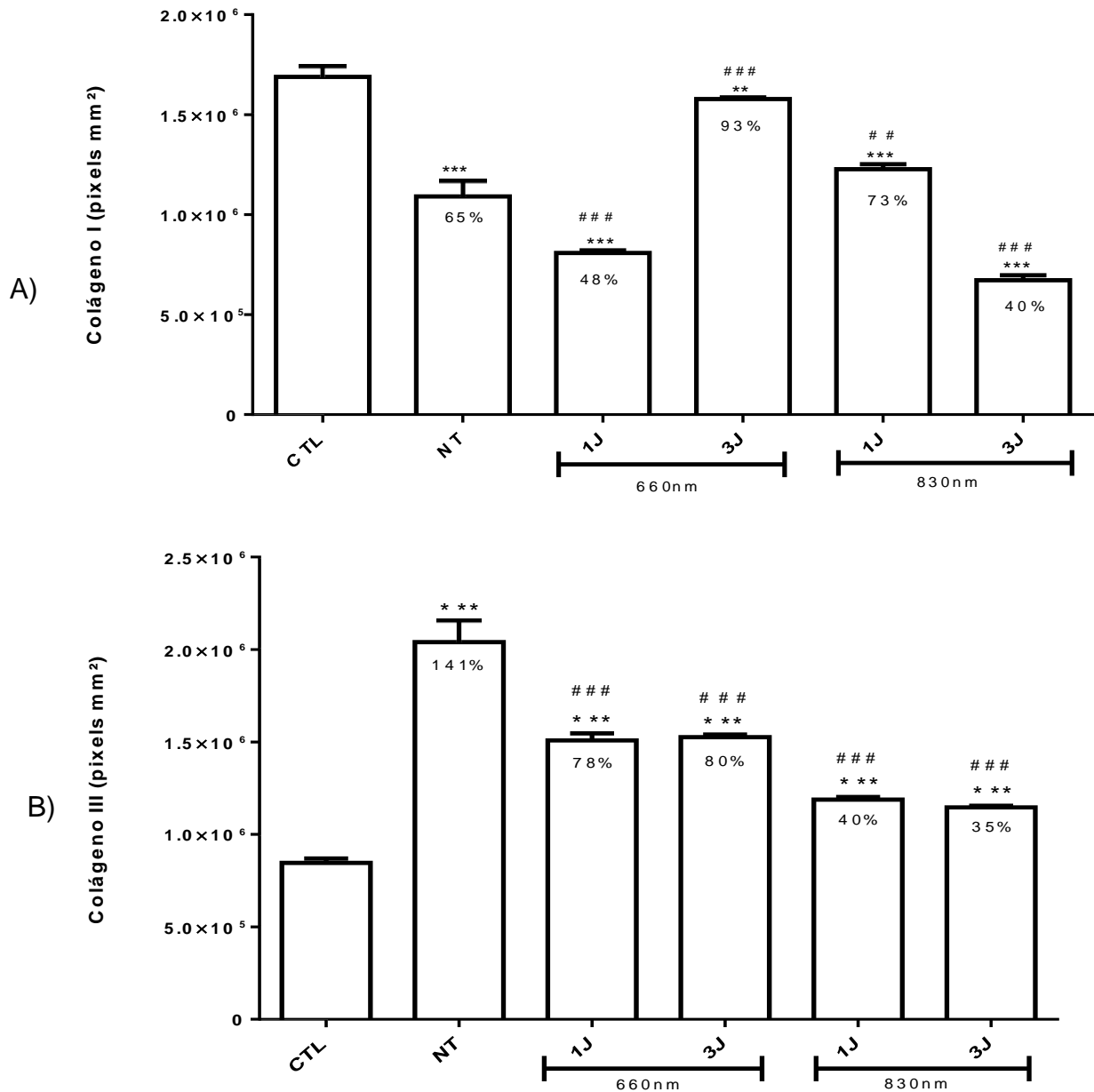


Figura 16: Gráfico de quantificação de Colágeno a partir das imagens com lente de polarização. Em (A) temos a quantificação de colágeno I e em (B) a quantificação de colágeno III. Grupos: CTL (Controle) e tendinite NT (sem tratamento) ou irradiado com laser 660nm (1J e 3J) ou 830nm (1J e 3J). Os valores estão representados pela média + DPM. N = 5 animais/grupo. (Em A e B: ***p < 0,001 vs CTL e # # #p < 0,001 vc NT).

5.11) Expressão gênica de MMP-3 – Comparação entre 660nm e 830nm.

Foi realizada a expressão gênica de MMP-3, comparando os grupos irradiados com laser vermelho e infravermelho.

Em (A) foi observado o aumento da expressão gênica de MMP-3 no grupo NT, comparado ao grupo CTL. Ao contrário, ambos os grupos irradiados com 1 ou 3J em 660nm apresentaram redução da expressão deste mesmo gene quanto comparados ao grupo NT.

Em (B) foi também observado aumento da expressão gênica de MMP-3 no grupo NT, quando comparado ao grupo CTL. Os grupos irradiados com 1 e 3J em 830nm apresentaram redução da expressão do mesmo gene, quando comparados ao grupo NT.

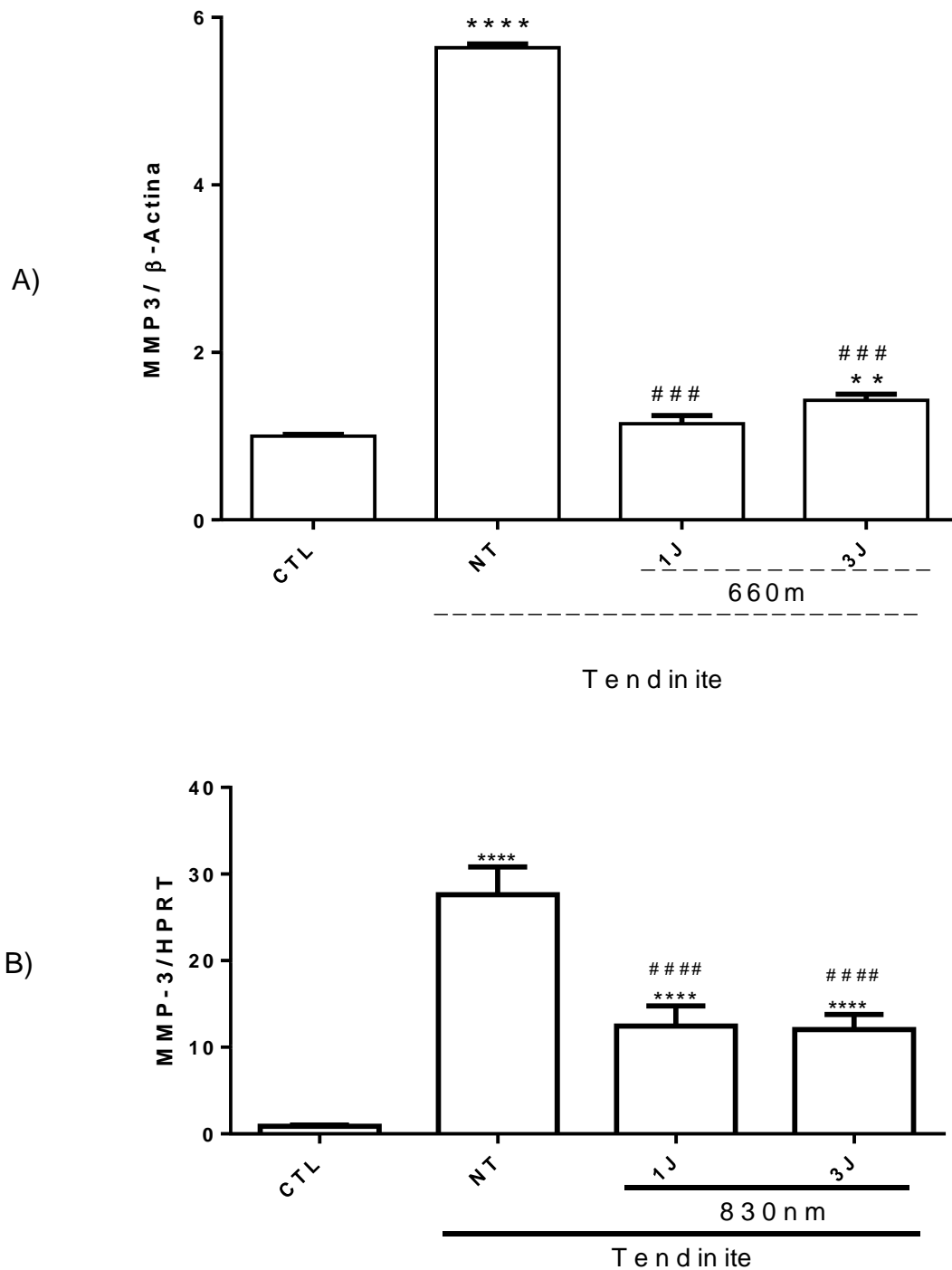


Figura 17: Gráfico da expressão gênica de MMP-3. Em (A): grupos irradiados com 1 ou 3J em 660nm após 2 horas. Em (B): grupos irradiados com 1 ou 3J em 830nm após 12 horas. Valores representados pela média + DPM. N = 5. (Em A e B: ****p < 0,0001 vs CTL e ###p < 0,0001 vc NT).

5.12) Expressão gênica de MMP-13 – Comparação entre 660nm e 830nm.

Os gráficos abaixo indicam a expressão gênica de MMP-13 no tendão calcâneo de ratos após a indução da tendinite, tratados ou não com laser de baixa intensidade em 660 ou 830nm.

Em (A) foi observado o aumento da expressão gênica de MMP-13 no grupo NT, comparado ao grupo CTL e nos grupos irradiados com 1 ou 3J em 660nm foi observada uma redução significativa na expressão deste mesmo gene quanto comparados ao grupo NT.

Em (B), ambos os grupos NT e 1J (830nm) apresentaram aumento da expressão gênica de MMP-13, comparados ao grupo CTL. O grupo irradiado com 3J em 830nm não apresentou alteração na expressão gênica deste mesmo gene, quando comparado ao grupo CTL.

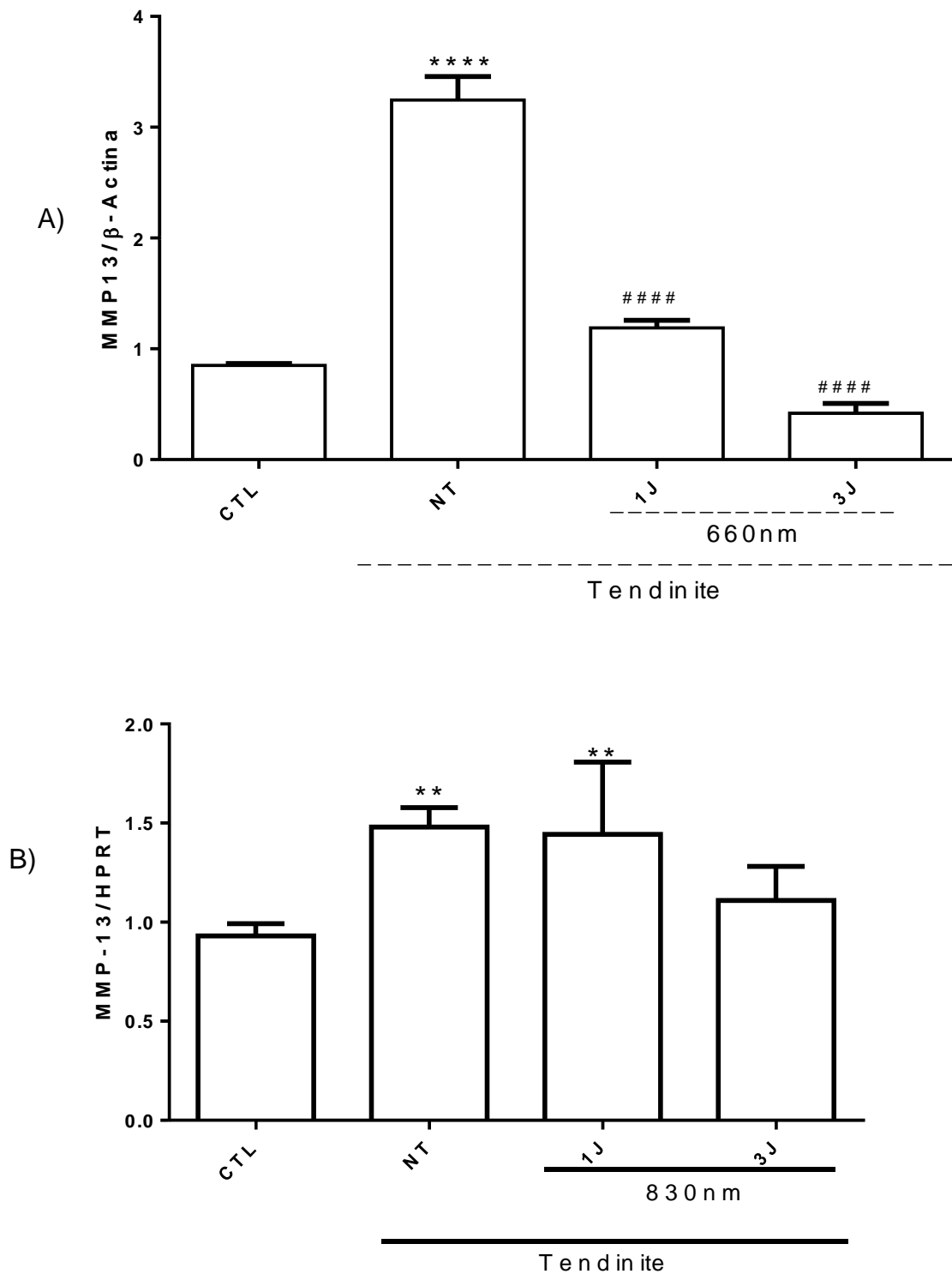


Figura 18: Gráfico da expressão gênica de MMP-13. Em (A): grupos irradiados com 1 ou 3J em 660nm após 2 horas. Em (B): grupos irradiados com 1 ou 3J em 830nm após 12 horas. Valores representados pela média + DPM. N = 5. (Em A e B: ****p < 0,0001 vs CTL e ####p<0,0001 vc NT).

Fase III – Avaliação do tratamento com laser infravermelho (830nm) em diferentes potências.

A partir dos resultados obtidos na fase II, foi escolhido o laser no comprimento de onda de 830nm para o grupo tratado.

Foi utilizado energias de 1 ou 3J nas potências de 50 ou 100mW.

Foi realizada análise biomecânica, histológica e de expressão gênica de MMP-3, MMP-13 e Tenascina-C.

5.13) Análise da força máxima de ruptura após a indução da tendinite – Comparação entre 50mW e 100mW para 1 ou 3J – laser de 830nm.

O gráfico abaixo mostra as alterações da Força máxima do tendão calcâneo do rato, no momento da ruptura.

Os grupos utilizados nesta 3ª fase foram: CTL; NT; 1J, 50mW; 1J, 100mW; 3J, 50mW e 3J, 100mW; todos irradiados com laser de baixa intensidade no comprimento de onda de 830nm.

Foi observada redução da força máxima durante a tração do tendão no grupo NT, comparado ao grupo CTL.

Todos os grupos irradiados apresentaram aumento da força máxima quando comparados ao grupo NT.

O grupo irradiado com 1 e 3J na potência de 50mW e o grupo irradiado com 1J em 100mW apresentaram as menores diferenças quando comparados ao grupo CTL.

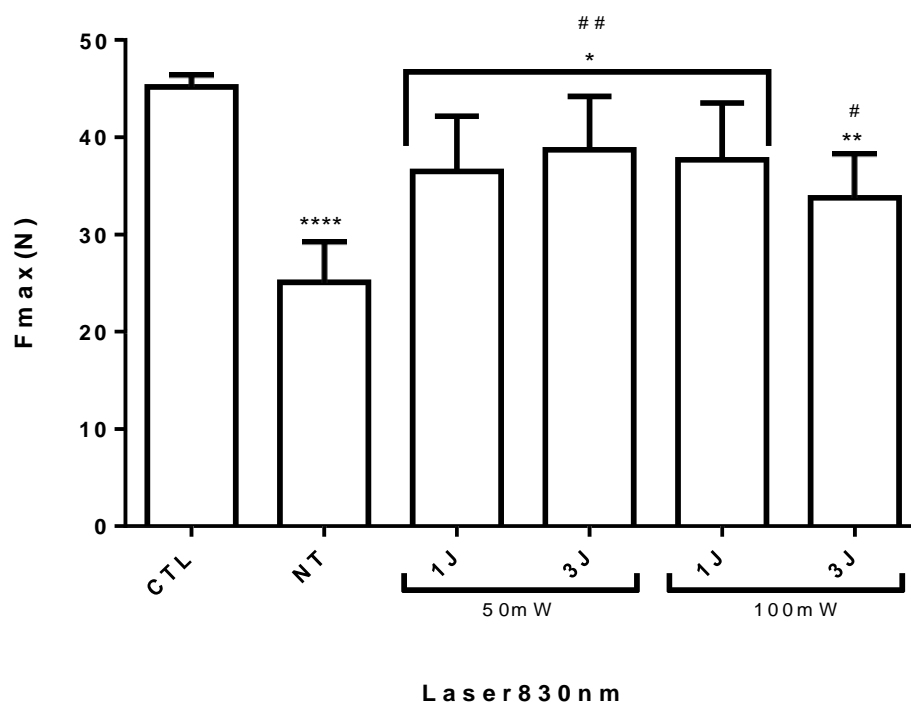


Figura 19: Gráfico da Força máxima de tração no momento da ruptura – Grupos: CTL (grupo controle), grupos com Tendinite NT (sem tratamento), grupos tratados laser 830nm (1J/50mW), (3J/50mW), (1J/100mW) e (3J/100mW). Valores estão representados pela média + DPM. N = 5. (*p < 0,05 e ****p < 0,0001 vs CTL; #p < 0,05 e ##p < 0,03).

5.14) Análise do deslocamento máximo no momento da ruptura, após a indução da tendinite – Comparação entre 50mW e 100mW para 1 ou 3J – laser de 830nm.

O gráfico abaixo mostra o deslocamento registrado pelos tendões durante o ensaio de tração cíclico.

Os grupos utilizados foram: CTL; NT; 1J, 50mW; 1J, 100mW; 3J, 50mW e 3J, 100mW; todos irradiados com laser de baixa intensidade no comprimento de onda de 830nm.

Foi observado aumento da deformação do tendão apenas no grupo NT.

Todos os grupos irradiados não apresentaram diferenças na deformação quando comparados ao grupo CTL.

O grupo 3J – 50mW e os grupos 1J e 3J ambos com 100mW apresentaram redução da deformação comparados ao grupo NT.

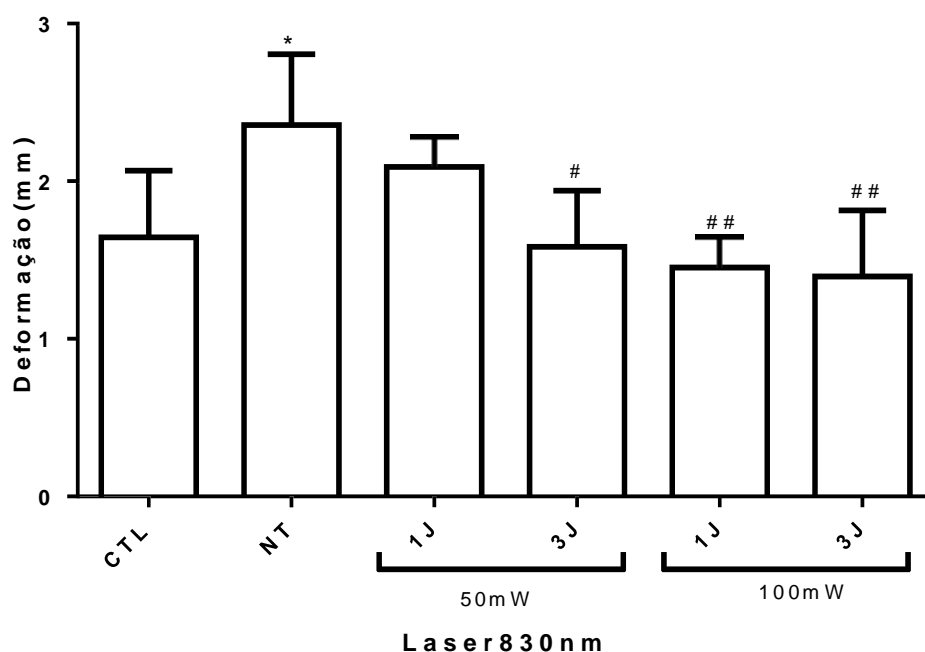


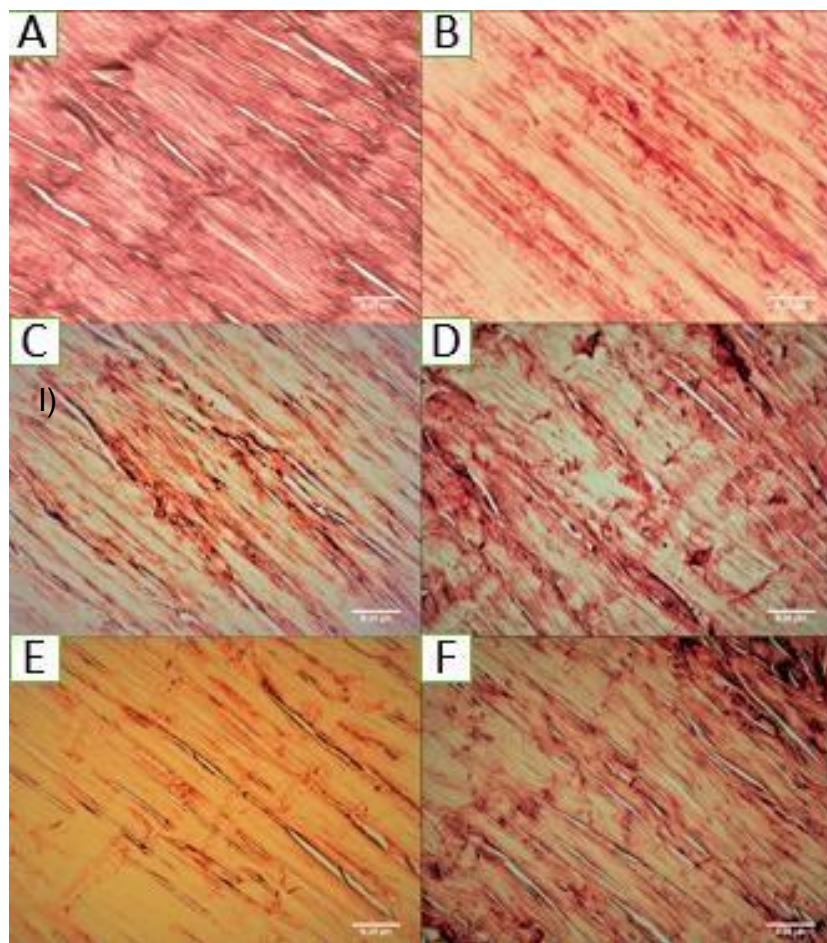
Figura 20: Gráfico da Deformação - Grupos: CTL (grupo controle), grupos com Tendinite NT (sem tratamento), grupos tratados laser 830nm (1J/50mW), (3J/50mW), (1J/100mW) e (3J/100mW). Valores representados pela média + DPM. N = 5. (*p < 0,05 vs CTL; #p < 0,05 e ##p < 0,03).

5.15) Histologia Grupos tratados Colágeno I e III – Comparação entre 50mW e 100mW para 1 ou 3J – laser de 830nm.

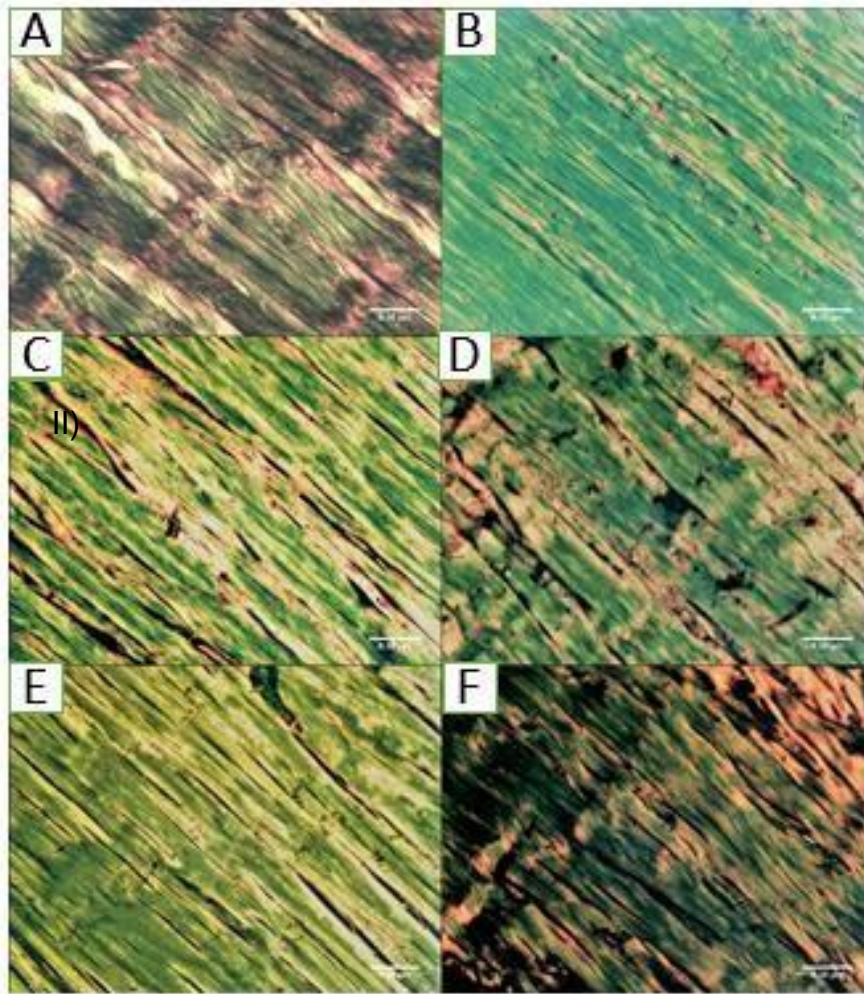
As figuras abaixo são imagens histológicas representativas dos grupos irradiados com laser infravermelho em diferentes potências, na seguinte ordem: (A) CTL; (B) NT; (C) e (D) grupos com laser 830nm irradiados com 1J ou 3J em 50mW; (E) e (F) grupos com laser 830nm irradiados com 1J ou 3J em 100mW.

Em (I), foi observado aparente alteração na organização das fibras em (B), comparado ao grupo CTL (A).

Em (II), o grupo NT (B) apresentou aparente aumento nos tons de verde, quanto comparados aos demais grupos.



Em (I) Imagens histológicas do tendão calcâneo de ratos coradas com Picrosirius Red, sem polarização.



Em (II) Imagem polarizada.

Figuras 21: Imagens da histologia do tendão calcâneo de ratos – Corte longitudinal. Comparação entre 50mW e 100mW no comprimento de onda de 830nm. Grupos: grupos tratados laser 830nm (1J/50mW), (3J/50mW), (1J/100mW) e (3J/100mW). Aumento 200X.

5.16) Análise histológica por luz polarizada: Quantificação de colágeno tipo I e III – Comparação entre 50mW e 100mW para 1 ou 3J – laser de 830nm.

O gráfico abaixo representa a quantificação de colágeno após 30 dias da lesão, obtidas a partir da análise das imagens representativas do item “6,15” pelo programa ImageJ com uso de plug-in específico com valores expressos em “pixels” e traduz de forma quantitativa a proporção de colágeno tipo I para (A) e colágeno III para (B).

Em (A), todos os grupos apresentaram redução em diferentes proporções, na taxa de colágeno tipo I, comparados ao grupo CTL.

Ambos os grupos 1 e 3J com potência de 50mW e o grupo irradiado com 1J e 100mW apresentaram aumento na proporção de colágeno I comparados ao grupo NT. O grupo 3J – 100mW apresentou a menor proporção de colágeno I, comparado aos demais grupos.

Em (B), todos os grupos lesionados apresentaram aumento na proporção de colágeno III, comparados ao grupo CTL.

O grupo NT apresentou o maior aumento na proporção de colágeno III, seguido do grupo irradiado com 1J com 50mW de potência em 830nm.

Todos os grupos irradiados apresentaram redução na proporção de colágeno III quando comparados ao grupo NT.

O grupo 3J com 50mW foi o mais próximo do grupo CTL.

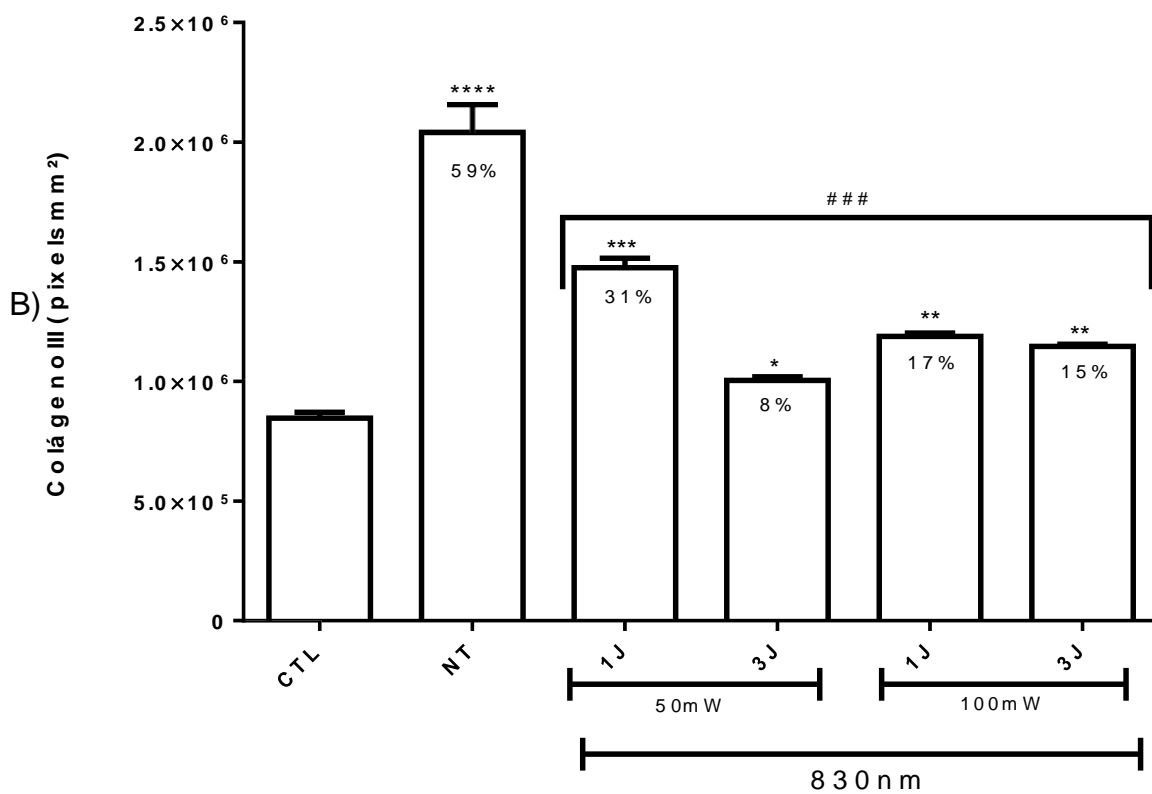
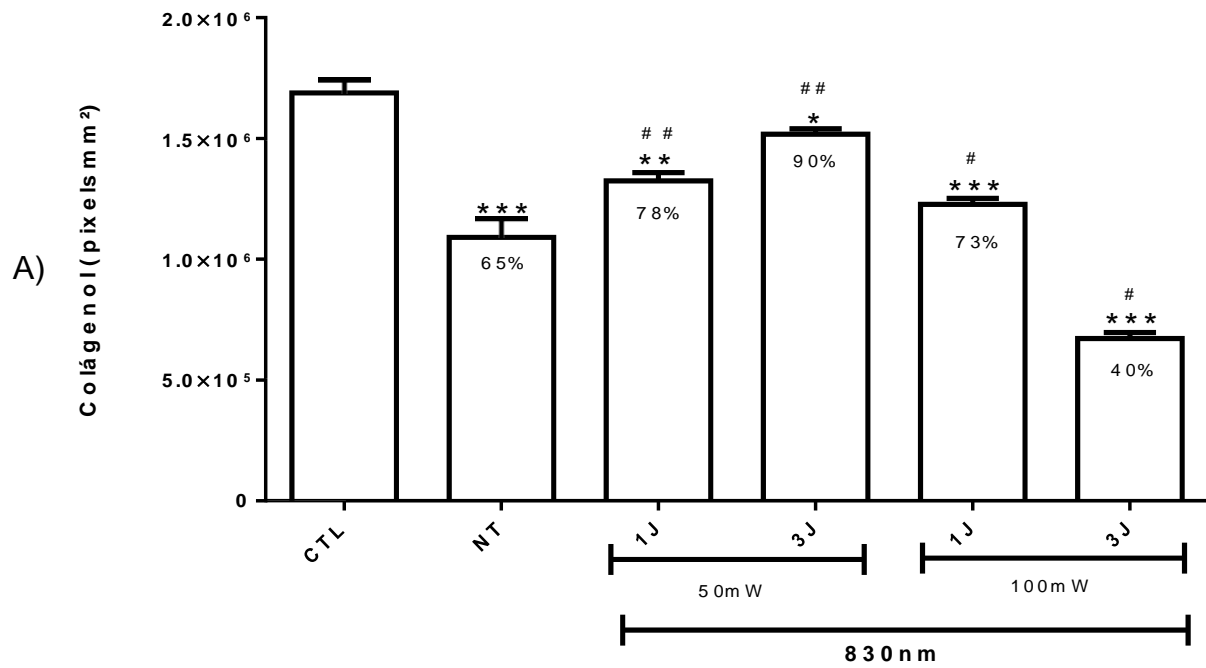


Figura 22: Gráfico da quantificação do Colágeno III após 30 dias da indução a tendinite. Grupos: CTL (grupo controle), grupos com Tendinite induzido por collagenase NT (sem tratamento), grupos tratados laser 830nm (1J/50mW),

(3J/50mW), (1J/100mW) e (3J/100mW). Os valores estão representados pela média + DPM. N = 5. (*p < 0,05 e ****p < 0,0001 vs CTL; ###p < 0,001 vs NT.

5.17) Análises da Expressão Gênica da MMP-3 e MMP13 - Comparação entre 50mW e 100mW para 1 ou 3J – laser de 830nm.

Os gráficos abaixo mostram a expressão gênica de MMP-3 e MMP-13 após 12 horas da indução da tendinite em tendões saudáveis e com lesão.

Em (A), foi observado aumento da expressão gênica de MMP-3 em todos os grupos lesionados, porém o aumento foi mais significativo no grupo NT (sem tratamento) e 1J – 50mW em 830nm.

Ambos os grupos 1 e 3J em 100mW e o grupo 3J em 50mW apresentaram redução na expressão gênica de MMP-3 quando comparados ao grupo NT.

Em (B) foi observado aumento na expressão gênica de MMP-13 apenas nos grupos NT e 1J com 100mW de potência.

Os demais grupos não apresentaram diferenças estatísticas quando comparados ao grupo CTL.

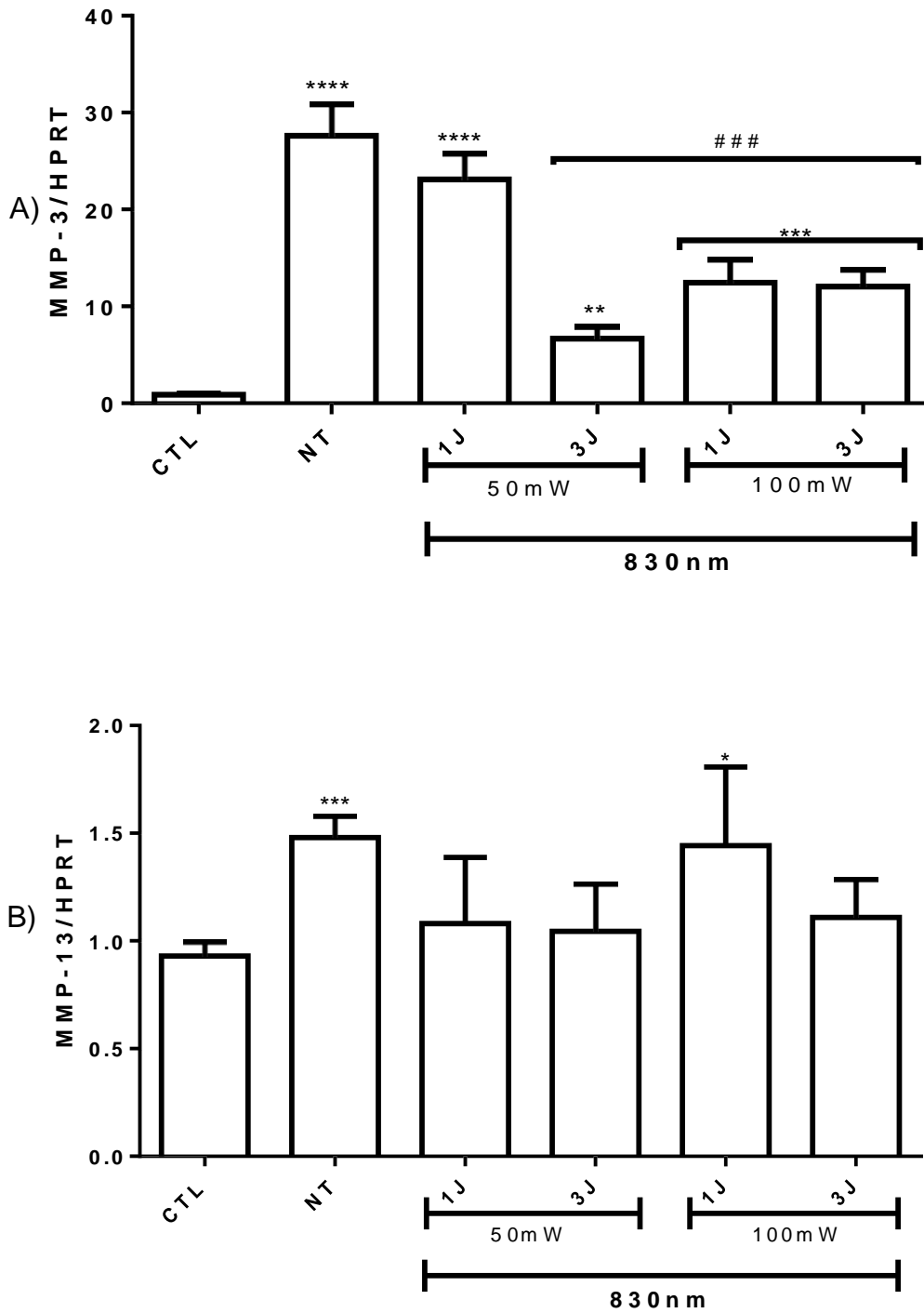


Figura 23: Gráfico da expressão gênica de MMPs, 12 horas após a indução da tendinite. Em (A) expressão gênica de MMP-3 e (B) expressão gênica de MMP-13. Grupos: CTL (grupo controle), grupos com Tendinite NT (sem tratamento), grupos tratados laser 830nm (1J/50mW), (3J/50mW), (1J/100mW) e (3J/100mW). Valores representados pela média + DPM. N = 5. (* $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ vs controle; ### $p < 0,001$ vs NT).

5.18) Análises da Expressão Gênica de Tenascina-C: Comparação entre 50mW e 100mW para 1 ou 3J – laser de 830nm.

O gráfico abaixo mostra a expressão gênica de Tenascina C após 24 horas da indução da tendinite em tendões saudáveis e com lesão. É possível observar o aumento desta expressão no grupo NT (sem tratamento) e nos grupos irradiados com 1 e 3J com 100mW, quando comparados ao grupo CTL (controle). O grupo tendinite tratado com laser na energia de 1J com 100mW de potência apresentou o maior aumento da expressão gênica de Tenascina-C, comparado também ao grupo CTL e NT.

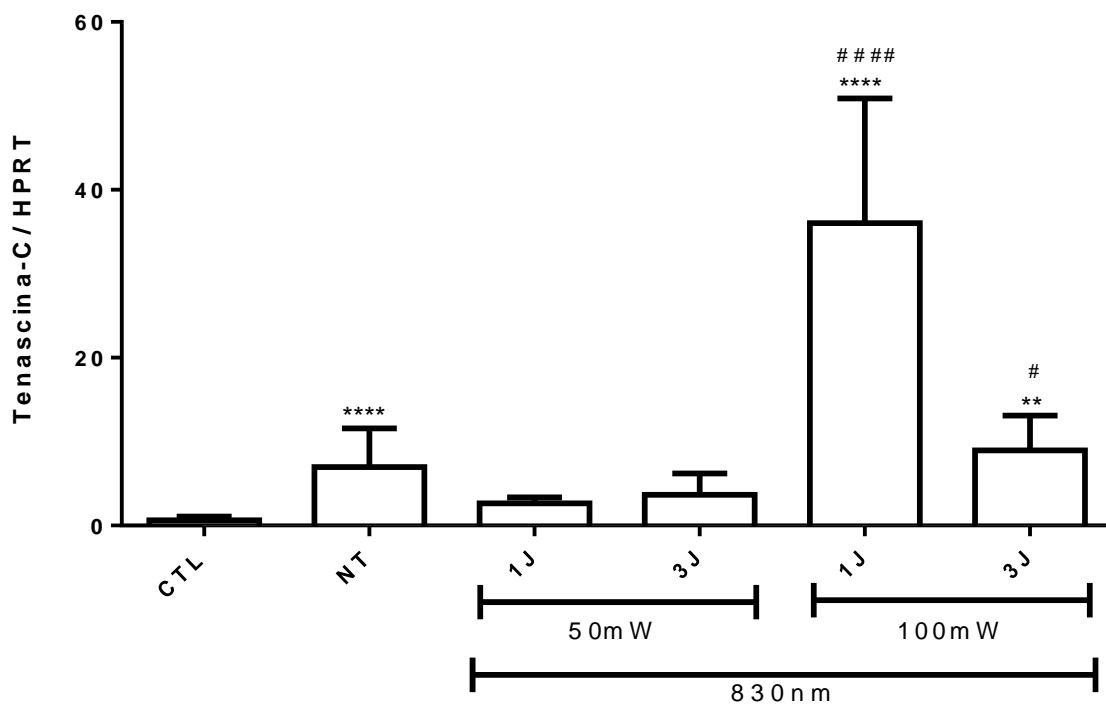


Figura 24: Gráfico da expressão gênica de Tenascina-C, 24 horas após a indução da tendinite. Grupos: CTL (grupo controle), grupos com Tendinite NT (sem tratamento), grupos tratados laser 830nm (1J/50mW), (3J/50mW), (1J/100mW) e (3J/100mW). Valores representados pela média + DPM. N = 5. (****p < 0,0001 vs controle; ####p<0,0001 vs NT).

5.19) Resumo dos resultados obtidos neste trabalho:

As tabelas abaixo apresentam o resumo de todos os resultados apresentados neste trabalho, foram avaliadas as alterações da força máxima, deformação, quantificação dos Col I e III, expressão Gênica das MMPs 3 e13 e da Tenascina- C, nos grupos sem tratamento (NT) e tratados com laser de baixa potência. A coluna (NT) apresenta resultados do grupo não tratado em comparação ao grupo CTL. As demais colunas dos grupos tratados com laser de baixa intensidade apresentam resultados em comparação ao grupo sem tratamento (NT)

Tabelas 03. Resumo dos resultados

Fase 2

GRUPOS					
		660nm		830nm	
	NT	1J/100mW	3J/100mW	1J/100mW	3J/100mW
Força máxima	↓	↑	↓	↑	↑
Deformação	↑	=	↑	↓	↓
Colágeno I	↓	↓	=	↑	↓
Colágeno III	↑	↑	↑	↑	↑
MMP-3	↑	=	↑	↑	↑
MMP-13	↑	↑	↑	↓	=
Tempo		10 seg	30 seg	10 seg	30 seg

Fase 3

GRUPOS					
830nm					
	NT	1J/50mW	3J/50mW	1J/100mW	3J/100mW
Força máxima	↓	↑	↑	↑	↑
Deformação	↑	↑	=	↓	↓
Colágeno I	↓	↑	↑	↑	↓
Colágeno III	↑	↑	=	↑	↑
MMP-3	↑	↑	↑	↑	↑
MMP-13	↑	=	=	↓	=
Tenascina-C	↑	=	=	↑	↑
Tempo		20 seg	1 min	10 seg	30 seg

Tabelas 03. Resumo dos resultados - obtidos pelo tratamento com laser de baixa intensidade na tendinite induzida por colagenase em tendão calcâneo de ratos. Fase 2 e 3. Grupos sem tratamento (NT) e tratados com laser de baixa intensidade com 660nm e 830nm, na energia de 1J, 3J com 50mW e 100mW de potência. Resultados do grupo sem tratamento (NT) comparado ao grupo (CTL). Resultados dos Grupos tratados comparados a NT.

(↑) aumento; (↓) redução; (=) sem alteração em relação ao grupo CTL.

6- DISCUSSÃO

As lesões no tendão são ocorrências comuns em atividades normais, no local de trabalho ou a partir de atividades esportivas. Um estudo publicado em 2009 mostrou uma incidência em torno de 3 a 5 milhões de indivíduos com lesões de tendões e ligamentos em todo o mundo. Os tratamentos oferecidos neste tipo de evento estão divididos em conservadores (reabilitação e alívio da dor), ou cirúrgicos. Independentemente de qual destas rotas de tratamento primário são seguidos, quando ocorre a cura, o tendão não apresenta características funcionais como ao do tecido original. Esta dificuldade na recuperação do tendão somada com a baixa eficiência de determinadas terapias surgem a necessidade de buscar outras estratégias de tratamento. (74, 70)

O laser de baixa intensidade tem demonstrado ser uma importante ferramenta no tratamento de doenças músculos esqueléticos, apresentado efeitos reparadores associados a manutenção do colágeno I, bem como na reorganização das fibras . Porém, existe uma dificuldade em estabelecer parâmetros de irradiação eficazes, devido a variedade de aparelhos que trabalham em diferentes comprimentos de onda, variando ainda a energia e potência aplicada. Além disso, as informações sobre a ação do laser de baixa intensidade na modulação do colágeno tipo I e III durante o processo de reparo do tendão, bem como a relação com suas propriedades mecânicas ainda são superficiais. (25, 70)

Neste trabalho, observamos que o laser de baixa intensidade em ambos os comprimentos de ondas (660nm e 830nm) melhorou as propriedades mecânicas do tendão comparadas aos grupos não trabalhos. O laser infravermelho apresentou discreto aumento da força máxima de rutpura comparado aos grupos irradiados com laser vermelho. Em relação à diferença de potência, os dados sugerem que o laser infravermelho 830nm, na energia de 3J e 50mW de potência ou na energia de 1J e 100mW de potência, apresentaram os melhores resultados no processo de reparo, comparado aos demais grupos.

Para chegar a este resultado, o trabalho foi separado em 3 fases, a fim de otimizar a utilização de animais e material.

Em resumo, a fase I foi utilizada para padronizar tempos experimentais a partir do curso temporal em diferentes análises. O tempo escolhido de 30 dias para análises funcionais e histológicas e de 12 ou 24 horas de expressão gênica foi utilizado na fase I para comparação da ação do laser em diferentes comprimentos de onda e na fase II para comparar diferentes potências.

Na fase I, para a determinação do curso temporal, foram utilizadas análise de propriedades mecânicas e capacidade de deformação do tecido, durante ensaio de tração cíclico além de análise histológica de colágeno tipo I e III.

Nesta primeira fase, foi observado redução importante de Fmax em 1 dia e nos primeiros 14 dias. No 30º dia o Fmax chegou a valores próximo de 50% do grupo CTL.

No mesmo sentido, foi analisada a capacidade de deformação e observado um aumento progressivo até o 14º dia.

Nas análise histológicas foi observado proporcional de colágeno tipo I e III entre o 14º e 30º dia.

A partir destes resultados foi escolhido o 30º dia para as análises com os grupos irradiados.

Da mesma forma, foi realizado o curso temporal da expressão gênica de MMP3, 13 e Tenascina-C, com a intenção de identificar o tempo de maior expressão gênica destes marcadores de reparo tendíneo a fim de utilizar nos grupos tratados, para verificar se o laser de baixa intensidade teria algum tipo de modulação.

Para expressão gênica de MMP3 e 13 identificamos aumento na 12ª hora após a indução da tendinite. Para Tenascina-C o tempo de maior expressão foi na 24ª hora.

Depois de finalizada a fase I, foi iniciada a fase II que teve como objetivo a comparação de diferentes comprimentos de onda (660nm e 830nm) no processo de reparo do tendão.

As maiorias dos trabalhos utilizam o laser infravermelho para o tratamento da tendinite, porém são poucos os que justificam esta escolha que geralmente está relacionada com a capacidade de penetração do laser

infravermelho quando comparado ao vermelho. Porém, este fator deve ser levado em consideração quando se utiliza irradiação em humanos ou animais de grande porte, o que não é o caso de nosso modelo de tendinite.

Na comparação entre comprimentos de onda (vermelho e infravermelho) observamos que ambos os lasers aumentaram F_{max} , comparados ao grupo NT, com maior evidência para o parâmetro “830nm, 1J – 100mW”.

Ao analisar a deformação, também observamos redução de todos os grupos irradiados, comparados ao grupo NT.

Os resultados histológicos também corroboraram com os resultados de propriedades mecânicas, mostrando aumento de colágeno I tanto em 3J-100mW 660nm quanto em 1J-100mW 830. Porém foi observada uma redução de colágeno III nos grupos 830nm quando comparados ao grupo NT e 660nm.

A capacidade de deformação pode ser relacionada com os níveis de colágeno III no tecido. Geralmente, enquanto existe o processo de reparo, o colágeno ainda continua em formação, sendo reduzido a valores basais quando o tecido está próximo do fim de seu reparo. ⁽⁷⁵⁾

Ainda na comparação entre 660nm e 830nm, foi observado importante redução da expressão gênica de MMP3 nos grupos irradiados com 660nm, chegando a valores próximos do grupo CTL. Da mesma forma, foi observada redução na expressão de MMP13 em ambas as energias (1 ou 3J).

Com relação aos grupos irradiados com 830nm, observou ainda uma redução da expressão de MMP3 comparado ao grupo NT, porém, com valores superiores ao grupo CTL. No mesmo sentido, a expressão de MMP13 manteve aumentada comparada ao grupo CTL, mas sem alterações quando comparadas ao grupo NT.

As metaloproteinases de matriz são enzimas importantes para o reparo tecidual e apesar de atuarem na degradação de colágeno, apresentam diferentes funções durante a reparação do tendão.

Na fase inflamatória, os níveis de MMP3 e 13 podem estar aumentados, indicando degradação de colágeno e tecidual. Geralmente, nesta fase é interessante o controle destas enzimas, a fim de reduzir o processo de degeneração, reflexo do processo inflamatório. Neste sentido, o laser de baixa intensidade é conhecido por modular MMPs e reduzem a degradação de colágeno. ⁽³³⁾

Por outro lado, estas metaloproteinases são importantes no final do reparo, na fase de remodelamento. Por exemplo, alguns estudos mostraram que a MMP-3 diminuiu em tendinopatias tanto na fase aguda quanto crônica, sugerindo que uma diminuição da MMP-3 pode refletir em falha na remodelação e na manutenção. Contudo, em tendões saudáveis não é interessante que estas enzimas estejam aumentadas. ⁽⁷⁶⁾ Desta forma, a redução da expressão de MMP3 em relação ao grupo NT, mas a manutenção desta enzima em relação ao grupo CTL pode ser um fator interessante para a promoção do reparo, principalmente durante o remodelamento tecidual, sendo um fator importante para a melhora das propriedades mecânicas do tendão.

A partir destes resultados escolhemos os grupos irradiados com laser de baixa intensidade com 830nm para verificar, na fase III se em potências menores a utilizada teríamos resultados melhores. Desta forma, foram estudados grupos irradiados com laser de baixa intensidade (830nm) com 1 ou 3 Joules e potência de 50 ou 100mW.

Os resultados biomecânicos indicaram uma melhora da força máxima de ruptura em todos os grupos tratados, comparados ao grupo CTL, principalmente entre 1 e 3J para 50mW e 1J para 100mW.

Em relação a deformação, todos os grupos irradiados também não apresentaram diferenças na capacidade de deformação comparados ao grupo CTL. Porém apenas os grupos 3J em 50mW e 1J e 3J em 100mW apresentaram redução significativa comparados ao grupo NT.

Na análise histológica, ambos os grupos com 3J-50mW e 1J-100mW apresentaram aumento de colágeno comparado ao grupo NT, porém, menores que o grupo CTL. Em relação a proporção de colágeno III, o grupo 1J-50mW apresentou ainda um aumento do colágeno III e o grupo mais próximo ao grupo CTL foi 3J-50mW seguido de 1 e 3J-100mW.

A proporção entre colágeno I e III é muito importante para o tendão e geralmente estão relacionadas diretamente com suas propriedades mecânicas. O colágeno III é considerado um colágeno “jovem” e conforme o tecido vai se remodelando, parte deste colágeno III se torna maduro, passando para colágeno I com características de serem mais resistentes. Assim, durante um processo lesivo, ocorrem mudanças estruturais acompanhadas por alterações na expressão de colágeno I e III. Da mesma forma, o acúmulo de colágeno III

no tendão tem sido associada à microtraumas, formação de cicatrizes, bem como a uma diminuição da resistência mecânica. ⁽⁷⁵⁾

Estas alterações das fibras de colágenos também estão relacionadas a perturbações na estrutura normal e linear do tendão, com seu conseqüente enfraquecimento, estando relacionados com a rigidez e ressecamento do tendão, comprometendo suas funções. ⁽⁷⁷⁾

Em relação à expressão gênica de MMP3 e 13, mais uma vez todos os grupos irradiados apresentaram redução da expressão gênica de MMP3 comparados ao grupo CTL, porém com valores menores comparados ao grupo NT. Quando a expressão de MMP-13, os grupos irradiados com potência de 50mW não apresentaram diferenças comparados ao grupo CTL. Somente o grupo 1J-100mW apresentou discreto aumento desta expressão.

Quando avaliamos a expressão de tenascina-C, observamos aumento discreto nos grupos com 50mW de potência, mas sem valores significativos quando comparados ao grupo CTL. Os grupos irradiados com 1 ou 3J em 100mW apresentaram expressivo aumento na expressão de Tenascina-C, comparados tanto ao grupo CTL quanto ao grupo NT.

A Tenascina C é uma importante proteína da Matriz extracelular, atuando no fornecimento de elasticidade para tecidos musculoesqueléticos, sendo de grande importância nos processos degenerativos e regenerativos quando a biomecânica do tendão sofre perturbação. ⁽⁷⁸⁾

Alguns autores demonstraram que a tenascina-C tem sua expressão aumentada de forma transitória somente na fase aguda do processo inflamatório voltando aos níveis normais, em tempos posteriores. O aumento de Colágeno I também pode reduzir a expressão de tenascina C. ⁽⁷⁹⁾

Como a análise da expressão foi realizada ainda durante o processo inflamatório, o aumento de Tenascina-C poderia indicar um aumento também das características elásticas do tecido tendíneo, provavelmente pelo fato do colágeno I inibir esta expressão.

Contudo, é importante observar que o laser de baixa intensidade infravermelho, tanto na energia de 1 como em 3J, ambas em potência de 100mW aumentaram a expressão de tenascina-C, sendo uma proteína importante em todas as fases do reparo por exemplo.

A avaliação da expressão gênica é um método ainda aceito, principalmente quando se analisa outras variáveis por métodos diferentes. Porém, nem sempre a expressão gênica determina a tradução da expressão proteica. Provavelmente esta é uma das limitações deste trabalho. Seria necessário avaliar não só a expressão proteica destas metaloproteínas, mas também alguns inibidores de MMPs, por exemplo, TIMPS 1 e 2.

Outro fator foi à análise histologia e determinação da proporção de colágeno I e III utilizando microscópio de polarização. Este método, apesar de aceito pela literatura, encontra resistência por alguns autores, que cobram análise mais específica nesta quantificação. No entanto, sua determinação é importante para entendermos as alterações nas propriedades mecânicas do tendão. Por exemplo, as propriedades mecânicas do tendão estão diretamente relacionadas com determinadas características como sua rigidez e elasticidade e o equilíbrio destas grandezas influenciam na tensão aplicada no tendão bem como nos tecidos adjacentes como músculos e ossos, redistribuindo as tensões e amortecendo o impacto. ⁽⁸⁰⁾ Assim, alterações na proporção de colágeno refletem diretamente nas propriedades biomecânicas do tendão e podem interferir na estabilidade articular e na manutenção do equilíbrio. ^(81, 82)

Embora os resultados apresentados neste trabalho mostrem a importante relação entre a quantificação de colágeno com as propriedades mecânicas do tendão, ainda não foi possível esclarecer todo o mecanismo de ação para este reparo.

O mecanismo de ação mais próximo seria que o laser modularia o processo inflamatório neste modelo de tendinite induzida por colágeno, agindo na modulação de cicloxigenases com consequente redução de IL6, TNFa e aumento de IL10. O laser de baixa intensidade poderia também modular as metaloproteinases de matriz, com importante papel tanto na fase inflamatória quanto no remodelamento. ^(33, 27, 70) Todas estas alterações resultariam em uma melhor proporção de colágeno tipo I e III com reflexo direto na manutenção das propriedades mecânicas do tendão.

Provavelmente, o papel da tenascina-C associada a expressão de fibronectina e tenomodulina seriam fatores importantes para entendermos um pouco mais sobre o processo de reparo tecidual a partir do uso de laser de baixa intensidade.

7- CONCLUSÃO

Concluimos que a irradiação com laser de baixa intensidade promoveu o reparo do tendão melhorando suas propriedades mecânicas bem como auxiliando na manutenção da proporção de colágeno I e III.

O laser de baixa intensidade, no comprimento de onda de 660nm, energia de 3J e potência de 100mW, bem como no comprimento de onda de 830nm, energia de 1J e potência de 100mW promoveu uma melhora nas propriedades mecânicas do tendão, associadas a proporção de colágeno.

O mecanimo envolvido no reparo poderia ser a modulação de MMP3 e 13 além da tenascina-C, relacionadas à degradação e organização das fibras de colágeno sendo importantes tanto na fase inflamatória como no remodelamento do tecido.

8 REFERÊNCIAS

1. Langberg H.; kongsgaard M. ECCENTRIC TRAINING IN TENDINOPATHY – MORE QUESTIONS THAN ANSWERS. SCAND. J. MED. SCI. SPORTS, V. 18, N. 5, P. 541-542, 2008.
2. Lian O, Holen KJ, Engebretsen L, Bahr R. RELATIONSHIP BETWEEN SYMPTOMS OF JUMPER'S KNEE AND THE ULTRASOUND CHARACTERISTICS OF THE PATELLAR TENDON AMONG HIGH LEVEL MALE VOLLEYBALL PLAYERS. SCAND J MED SCI SPORTS. V. 6, P. 291–296, 2006.
3. Arvidsson S, arvidsson B, fridlund B, bergman S. HEALTH PREDICTING FACTORS IN A GENERAL POPULATION OVER AN EIGHT-YEAR PERIOD IN SUBJECTS WITH AND WITHOUT CHRONIC MUSCULOSKELETAL PAIN. HEALTH QUAL LIFE OUTCOMES. 2008 NOV 11;6:98. DOI: 10.1186/1477-7525-6-98.
4. Loisel P, Lemaire J, Poitras S, Durand MJ, Champagne F, Stock S, Diallo B, Tremblay C. COST-BENEFIT AND COST-EFFECTIVENESS ANALYSIS OF A DISABILITY PREVENTION MODEL FOR BACK PAIN MANAGEMENT: A SIX YEAR FOLLOW UP STUDY. OCCUP ENVIRON MED. 2002 DEC; 59(12):807-15.
5. Kilsztajn S, Rossbach A, Camera MB, Carmo MSN. HEALTH SERVICES SPENDING AND AGING OF THE POPULATION. JOURNAL OF POPULATION STUDIES, V20, N1. 2003.

6. Santana VS, Araújo-filho JB, Albuquerque-Oliveira PR, Barbosa-Branco A. [OCCUPATIONAL ACCIDENTS: SOCIAL INSURANCE COSTS AND WORK DAYS LOST]. REV SAUDE PUBLICA. 2006 DEC;40(6):1004-12.

7. Aittomäki A, Lahelma E, Rahkonen O, Leino-arjas P, Martikainen P. THE CONTRIBUTION OF MUSCULOSKELETAL DISORDERS AND PHYSICAL WORKLOAD TO SOCIOECONOMIC INEQUALITIES IN HEALTH. EUR J PUBLIC HEALTH. 2007 APR; 17 (2):145-50. EPUB 2006 SEP 5

8. Barbe MF, Barr AE. INFLAMMATION AND THE PATHOPHYSIOLOGY OF WORK-RELATED MUSCULOSKELETAL DISORDERS. BRAIN BEHAV IMMUN. 2006 SEP;20(5):423-9. EPUB 2006 MAY 2.

9. Khan KM, Cook JL, Bonar F, Harcourt P, Astrom M. HISTOPATHOLOGY OF COMMON TENDINOPATHIES. UPDATE AND IMPLICATIONS FOR CLINICAL MANAGEMENT. SPORTS MED. V. 27, P. 393-408, 1999.

10. Kannus, P.; Jozsa, L.; Jarvinnen, M. BASIC SCIENCE OF TENDONS. IN: GARRETT WJ, SPEER K, KIRKENDALL DT (EDS) PRINCIPLES AND PRACTICE OF ORTHOPAEDIC SPORTS MEDICINE. LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, PHILADELPHIA, USA. P. 21-37, 2000.

11. Kastelic J, Galeski A, Baer E. THE MULTICOMPOSITE STRUCTURE OF TENDON. CONNECT TISSUE RES. 1978;6(1):11-23.PMID: 149646

12. Sharma, P.; Maffulli, N. Tendinopathy and tendon injury: The future. Disability and Rehabilitation. v. 30(20–22), p. 1733–1745, 2008

13. Yang G, Im HJ, Wang JH. REPETITIVE MECHANICAL STRETCHING MODULATES IL-1 BETA INDUCED COX-2, MMP-1 EXPRESSION, AND PGE2 PRODUCTION IN HUMAN PATELLAR TENDON FIBROBLASTS. GENE. V. 363, P. 166–172, 2005.

14. O'brien, M. STRUCTURE AND METABOLISM OF TENDONS. SCAND J MED SCI SPORTS. V.7, P. 55-61, 1997.

15. Mehr, D.; Pardubsky, P.D.; Martin, J.A.; Buckwalter, J.A. TENASCIN-C IN TENDON REGIONS SUBJECTED TO COMPRESSION. J ORTHOP RES. V. 18, P. 537-545, 2000.

16. Kjaer, M.; Langberg, H.; Heinemeier, K.; Bayer, M. L.; Hansen, M.; Holm, L.; Doessing, S.; Kongsgaard, M.; Krogsgaard, M. R.; Magnusson, S. P. From mechanical loading to collagen synthesis, structural changes and function in human tendon. Scand. J. Med. Sci. Sports., v. 19, p. 500-510, 2009.

17. Tedgui, A.; Mallat, Z. Anti-inflammatory mechanisms in the vascular wall. Circulation Res., v. 8, p. 877-887, 2001.

18. Sharma, P.; Maffulli, N. Biology of tendon injury: healing, modeling and remodeling. J Musculoskelet Neuronal. v. 6, p. 181-190, 2006.

19. Queiroz-JR, C. M.; Pacheco, C. M. F.; Maltos, K. L. M.; Caliar, 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.

20. 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.

21. Fyfe I, Stanish WD. The use of eccentric training and stretching in the treatment and prevention of tendon injuries. *Clin Sports Med.* v. 11, p. 601-624, 1992.

22. Alves, A. L. G.; Milkail, S. Tendon and ligament conditions. *Fisiot. Vet., São Paulo*, p. 199-208, 2006.

23. Leversedge FJ, Ditsios K, Goldfarb CA, Silva MJ, Gelberman RH, Boyer MI. Vascular anatomy of the human flexor digitorum profundus tendon insertion. *J Hand Surg.* v. 27, p. 806-812, 2002.

24. 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.

25. 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.

26. Riley, G. Tendinopathy from basic science to treatment. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.*, v. 4, n. 2, p. 82-89, 2008.

27. Marcos RL, Arnold G, Magnenet V, Rahouadj R, Magdalou J, Lopes-martins RA. Biomechanical and biochemical protective effect of low-level laser therapy for Achilles tendinitis. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2014 Sep 9;29C:272-285.

28. Manicone, A. M.; Mcguire, J. K. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation. *Semin. Cell Dev. Biol.*, v. 19, p. 34-41, 2008.
29. 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.
30. Vanlint, V.; Libert, C. Chemokine and cytokine processing by matrix metalloproteinases and its effect on leukocyte migration and inflammation. *J. Leukoc. Biol.*, v. 82, p. 1375-1381, 2007.
31. 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.
32. Renckens, R.; Roelofs, J. J.; Florquin, S.; De vos, A. F.; Lijnen, H. R.; Van't veer, C. Matrix metalloproteinase-9 deficiency impairs host defense against abdominal sepsis. *J. Immunol.*, v. 176, n. 6, p. 3735-3741, 2006.
33. 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.
34. Jinjuan Y, Qianjun Z, Kunfu W, Hao L, Caiyun MA, Hongmei H, Yingjie L. Isolation and Biological characterization of stem cells derived from fetal bovine tendon Open Access artigo 29 de abril de 2016 DOI : 10,1007 / s11626-016-0043-Z

35. Ruth C, Richard P T. Tenascins and the Importance of Adhesion Modulation Cold Spring Harb Perspect Biol. 2011 maio; 3 (5): a004960. doi: 10.1101 / cshperspect.a004960.
36. Järvinen TA, Kannus P, Järvinen TL, Jozsa L, Kalimo H, Järvinen M. Tenascin-C in the pathobiology and healing process of musculoskeletal tissue injury. Scand J Med Sci Sports. 2000 Dec; 10(6):376-82. Review. PMID: 11085568.
37. Halper J1, Kjaer M. Basic components of connective tissues and extracellular matrix: elastin, fibrillin, fibulins, fibrinogen, fibronectin, laminin, tenascins and thrombospondins. Adv Exp Med Biol. 2014;802:31-47. doi: 10.1007/978-94-007-7893-1_3.
38. Al-ani MKH1, Xu K2, SUN Y2, Pan L2, Xu Z2, Yang L2. Study of Bone Marrow Mesenchymal and Tendon-Derived Stem Cells Transplantation on the Regenerating Effect of Achilles Tendon Ruptures in Rats. Stem Cells Int. 2015; 2015:984146. doi: 10.1155/2015/984146. Epub 2015 Aug 3.
39. Bojsen-moller J, Kalliokoski KK, Seppanen M, Kjaer M, Magnusson SP. Low-intensity tensile loading increases intratendinous glucose uptake in the Achilles tendon. J Appl Physiol. v. 101, p. 196–201, 2006.
40. 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.
41. Wilkinson RS, Fukami Y. Responses of isolated Golgi tendon organs of cat to sinusoidal stretch. J Neurophysiol. 1983 Apr;49(4):976-88.

42. Yang G, Rothrauff BB, Tuan RS. Tendon and ligament regeneration and repair: Clinical relevance and developmental paradigm. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2013 Sep;99(3):203-22.

43. Solchaga LA, Bendele A, Shah V, Snel LB, Kestler HK, Dines JS, Hee CK. Comparison of the effect of intra-tendon applications of recombinant human platelet-derived growth factor-BB, platelet-rich plasma, steroids in a rat achilles tendon collagenase model. *J Orthop Res*. 2013 Sep 9.

44. Arampatzis A, Karamanidis K, Albracht K. Adaptational responses of the human Achilles tendon by modulation of the applied cyclic strain magnitude. *J Exp Biol*. 2007 Aug; 210 (Pt 15):2743-53.

45. Arampatzis A, Peper 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.

46. Cherry NM, Meyer JD, Chen Y, Holt DL, McDonald JC. The reported incidence of work-related musculoskeletal disease in the UK: MOSS 1997-2000. *Occup Med (Lond)*. 2001 Oct;51(7):450-5. PMID: 11719615.

47. Fernandes, M. A. L.; Alves, G. E. S.; Souza, J. C. A. Effect of therapeutic ultrasound on experimental equine tendinitis: clinical, ultrasonographic and histopathological study of two protocols *Arq. B. Med. Vet. Zoot.*, v. 55, n. 1, p. 27-34, 2003.

48. Peloso, P. M.; Scheiman, J. M. The Economic Implications of Cyclooxygenase-2-Specific Inhibitors. *Am. J. Med.*, v. 110, n. 3A, p. 50-54, 2001.

49. Leitze Z, Sella EJ, Aversa JM. Endoscopic decompression of the retrocalcaneal space. *J Bone Joint Surg Am* 2003; 85-A: 1488- 1496.
50. 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.
51. Roche AJ, Caldier JD. Achilles tendinopathy: A review of the current concepts of treatment. *Bone Joint J*. 2013 Oct 1;95-B(10):1299-307.
52. Goldin M, Malanga GA. Tendinopathy: a review of the pathophysiology and evidence for treatment. *Phys Sportsmed*. 2013 Sep;41(3):36-49.
53. Hou Y, Mao Z, Wei X, Lin L, Chen L, Wang H, Fu X, Zhang J, Yu C. The roles of TGF-beta1 gene transfer on collagen formation during Achilles tendon healing. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 May 29;383(2):235-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.03.159. PMID: 19345669
54. Courville XF, Coe MP, Hecht PJ. Current concepts review: noninsertional Achilles tendinopathy. *Foot Ankle Int*. 2009 Nov;30(11):1132-42.
55. Wood VT, Pinfildi CE, Neves MA, Parizoto NA, Hochman B, Ferreira LM. Collagen changes and realignment induced by low-level laser therapy and low-intensity ultrasound in the calcaneal tendon. *Lasers Surg Med*. 42(6):559-65, 2010.
56. Renno AC, Iwama AM, Shima P, Fernandes KR, Carvalho JG, De Oliveira P, Ribeiro DA. Effect of low-level laser therapy (660 nm) on the healing of second-degree skin burns in rats. *J Cosmet Laser Ther*. 2011 Oct;13(5):237-42. doi: 10.3109/14764172.2011.606466. PMID: 21774661

57. Ferraresi C, Hamblin MR, Parizotto NA. Low-level laser (light) therapy (LLLT) on muscle tissue: performance, fatigue and repair benefited by the power of light. *Photonics Lasers Med.* 2012 Nov 1;1(4):267-286. PMID: 23626925.

58. Wiegerinck JI, Kerkhoffs GM, Van Sterkenburg MN, Sierevelt IN, Van Dijk CN. Treatment for insertional Achilles tendinopathy: a systematic review. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2013 Jun;21(6):1345-55.

59. Bjordal JM, Lopes-martins RA. Lack of adherence to the laser dosage recommendations from the World Association for Laser Therapy in Achilles study. *Arch Phys Med Rehabil.* 2013 Feb;94(2):408.

60. Childress MA, Beutler A. Management of chronic tendon injuries. *Am Fam Physician.* 2013 Apr 1;87(7):486-90.

61. 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.

62. Pires D, Xavier M, Araújo T, Silva JJR, Aimbire F, Albertini R. Low-level laser therapy (LLLT; 780 nm) acts differently on mRNA expression of anti- and pro-inflammatory mediators in an experimental model of collagenase-induced tendinitis in rat. *Lasers Med Sci.* 2011 Jan;26(1):85-94.

63. 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.

64. 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.

65. 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.

66. Fangel R, Bossini PS, Renno AC, Granito RN, Wang CC, Nonaka KO, Driusso P, Parizotto NA, Oishi J. Biomechanical properties: effects of low-level laser therapy and Biosilicate® on tibial bone defects in osteopenic rats. *J Appl Biomater Funct Mater.* 2014 Dec 30;12(3):271-7. doi: 10.5301/jabfm.5000198. PMID: 24700268.

67. Tonk G, Kumar A, Gupta A. Platelet rich plasma versus laser therapy in lateral epicondylitis of elbow. *Indian J Orthop.* 2014 Jul;48(4):390-3. doi: 10.4103/0019-5413.136260. PMID: 25143643.

68. Lopes-Martins RA. Tendinitis, an open avenue for low-level laser therapy. *Photomed Laser Surg.* 2014 Jul;32(7):369-70. doi: 10.1089/pho.2014.9859. No abstract available.

PMID: 24992270

69. Casalechi HL, Leal-Junior EC, Xavier M, Silva JA Jr, de Carvalho Pde T, Aimbire F, Albertini R. Low-level laser therapy in experimental model of collagenase-induced tendinitis in rats: effects in acute and chronic inflammatory phases. *Lasers Med Sci.* 2013 May; 28(3):989-95. doi: 10.1007/s10103-012-1189-x. PMID: 22926534

70. Torres-Silva R1, Lopes-Martins RA, Bjordal JM, Frigo L, Rahouadj R, Arnold G, Leal-Junior EC, Magdalou J, Pallotta R, Marcos RL. The low level laser therapy (LLLT) operating in 660 nm reduce gene expression of inflammatory mediators in the experimental model of collagenase-induced rat tendinitis. *Lasers Med Sci.* 2015 Sep;30(7):1985-90. doi: 10.1007/s10103-014-1676-3. Epub 2014 Nov 8.

71. Alexandre CR [http://www.slideshare.net/VieiraPersonal/biomecanica-dos-tendes-e-ligamentos? smtNoRedir=1/2013](http://www.slideshare.net/VieiraPersonal/biomecanica-dos-tendes-e-ligamentos?smtNoRedir=1/2013).

72. De ávila SL, Alves JM, Andrade TA, Kajiwara JK, Garcia SB, Gomes FG, Frade MAClinical and immunohistopathological aspects of venous ulcers treatment by Low-Intensity Pulsed Ultrasound (LIPUS). *Ultrasonics.* 2013 Apr;53(4):870-9. doi: 10.1016/j.ultras.2012.12.009. Epub 2012 Dec 23.

73. Dietrich F, L duré G, P klein C, F Bampi V, V Padoin A, D Silva V, Braga-silva J⁴Platelet-Rich Fibrin Promotes an Accelerated Healing of Achilles Tendon When Compared to Platelet-Rich Plasma in Rat. *World J Plast Surg.* 2015 Jul;4(2):101-9

74. Richard B, Tom F, Alasdair K, Nicola M, Nicholas R. Forsyth, PhD, Tendon repair through stem cell intervention: Cellular and molecular approaches Pages 1746-1751 | Published online: 07 Jul 2009.

75. Reuther KE, Thomas SJ, Tucker JJ, Yannascoli SM, Caro AC, Vafa RP, Liu SS, Gordon JA, Bhatt PR, Kuntz AF, Soslowsky LJ. Scapular dyskinesis is detrimental to shoulder tendon properties and joint mechanics in a rat model. *J Orthop Res.* 2014 Nov;32(11):1436-43. doi: 10.1002/jor.22693. Epub 2014 Jul 28.

76. Mccarrel T, Fortier L. Temporal growth factor release from platelet-rich plasma, trehalose lyophilized platelets, and bone marrow aspirate and their effect on tendon and ligament gene expression. *J Orthop Res.* 2009 Aug;27(8):1033-42. doi: 10.1002/jor.20853.
77. Pritsch T, Maman E, Steinberg E, Luger E. Posterior tibial tendon dysfunction. *Harefuah.* 2004 Feb;143(2):136-41, 165. [Article in Hebrew]
78. Mohanad K AA, Kang X, Yanjun S, Lianhong P, Zhiling X, Li Y , *Study of Bone Marrow Mesenchymal and Tendon-Derived Stem Cells Transplantation on the Regenerating Effect of Achilles Tendon Ruptures in Rats Stem Cells Int. 2015; 2015: 984146. Published online 2015 Aug 3. doi: 10.1155/2015/984146
79. Sarah T, Anne T, Dylan N, Clementsgina PLC, Macrory R KW, Smith, Peter DC. Gene expression markers of tendon fibroblasts in normal and diseased tissue compared to monolayer and three dimensional culture systems *BMC Musculoskelet Disord.* 2009; 10: 27. Published online 2009 Feb 26. doi: 10.1186/1471-2474-10-27
80. Matschke V1, Jones JG, Lemmey AB, Maddison PJ, Thom JM. Patellar tendon properties and lower limb function in rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis versus healthy controls: a cross-sectional study. *ScientificWorldJournal.* 2013 Jun 5;2013:514743. doi: 10.1155/2013/514743. Print 2013
81. Onambele GL, Narici MV, Maganaris CN. Calf muscle-tendon properties and postural balance in old age *Journal of Applied Physiology .* 2006; 100 (6): 2048-2056.
82. Maffulli N, Reaper J, Ewen SW, Waterston SW, Barrass V. Chondral metaplasia in calcific insertional tendinopathy of the Achilles tendon. *Clin J Sport Med.* 2006 Jul;16(4):329-34.

9- Anexos

- Aprovação – Comitê de ética



Protocolo de Pesquisa referente ao Projeto nº An0037/2013

Título do Projeto: Efeito do laser de baixa potência no modelo de inflamação aguda do tendão induzida por collagenase em ratos – Aspectos morfológicos e funcionais

Orientador: Rodrigo Labat Marcos

Aluno: Romildo Torres da Silva / Raquel Santos de Faria

Objetivos: Analisar os efeitos do laser de baixa potência na inflamação aguda induzida por collagenase em tendões de Aquiles de ratos.

(X) Aprovado, sendo que este projeto deverá permanecer arquivado por 05 (cinco) anos nesta Secretaria.

() Com pendência (relacionar), devendo o Pesquisador encaminhar as modificações sugeridas, e iniciar a coleta de dados somente após a aprovação do projeto por este Comitê.

() Não-Aprovado

Comentários:

1. Sugere-se que os pesquisadores relatem de forma mais clara o tamanho amostral para os respectivos grupos.
2. Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEUA-UNINOVE, o relatório final sobre a pesquisa (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

São Paulo, 26 de março de 2014

Prof. Dra. Kátia De Angelis
Coordenadora do Comitê de Ética no Uso de Animais
Universidade Nove de Julho

- Artigo publicado, submetido e em construção pelo candidato ao título de Doutorado: Romildo Torres da Silva.

I) Artigo publicado:

[Lasers Med Sci. 2015 Sep;30\(7\):1985-90. doi: 10.1007/s10103-014-1676-3. Epub 2014 Nov 8.](#)

The low level laser therapy (LLLT) operating in 660 nm reduce gene expression of inflammatory mediators in the experimental model of collagenase-induced rat tendinitis.

[Torres-Silva R¹](#), [Lopes-Martins RA](#), [Bjordal JM](#), [Frigo L](#), [Rahouadj R](#), [Arnold G](#), [Leal-Junior EC](#), [Magdalou J](#), [Pallotta R](#), [Marcos RL](#).

 Author information

Abstract

Tendinopathy is a common disease with a variety of treatments and therapies. Laser therapy appears as an alternative treatment. Here, we investigate the effects of laser irradiation in an experimental model of tendinitis induced by collagenase injection on rats' Achilles tendon, verifying its action in important inflammatory markers. Male Wistar rats were used and divided into five groups: control saline (C), non-treated tendinitis (NT) and tendinitis treated with sodium diclofenac (D) or laser (1 J) and (3 J). The tendinitis was induced by collagenase (100 µg/tendon) on the Achilles tendon, which was removed for further analyses. The gene expression for COX-2; TNF-α; IL-6; and IL-10 (RT-PCR) was measured. The laser irradiation (660 nm, 100 mW, 3 J) used in the treatment of the tendinitis induced by collagenase in Achilles tendon in rats was effective in the reduction of important pro-inflammatory markers such as IL-6 and TNF-α, becoming a promising tool for the treatment of tendon diseases.

PMID: 25380666 DOI: [10.1007/s10103-014-1676-3](#)

[PubMed - indexed for MEDLINE]

II) Artigo submetido:

EFFECT OF THE ASSOCIATION OF LASER THERAPY AND PHARMACOTHERAPY IN TENDON WITH ACUTE INFLAMMATION MODEL INDUCED BY COLLAGENASW IN RATS.

III) Artigo submetido:

PHOTOBIOMODULATION USING LASER IRRADIADION (660nm) IMPROVE MECHANICAL PROPERTIES RELATED COLLAGEN PROPORTION IN TENDINITES MODEL BY COLLAGENASE IN RATS.