

ERICA MARTINHO SALVADOR LARAIA

**ANÁLISE DOS EFEITOS DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA (660nm)
SOBRE OS NÍVEIS DE EXPRESSÃO PROTÉICA DE MEDIADORES
INFLAMATÓRIOS APÓS LESÃO CORTANTE DO TENDÃO
CALCÂNEO COMUM DE RATOS WISTAR**

CAMPO GRANDE

2011

ERICA MARTINHO SALVADOR LARAIA

**ANÁLISE DOS EFEITOS DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA (660nm)
SOBRE OS NÍVEIS DE EXPRESSÃO PROTÉICA DE MEDIADORES
INFLAMATÓRIOS APÓS LESÃO CORTANTE DO TENDÃO
CALCÂNEO COMUM DE RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Saúde e Desenvolvimento na Região
Centro-Oeste da Universidade
Federal de Mato Grosso do Sul, para
obtenção do título de Mestre.

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

CAMPO GRANDE

2011

FOLHA DE APROVAÇÃO

ERICA MARTINHO SALVADOR LARAIA

ANÁLISE DOS EFEITOS DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA (660nm) SOBRE OS NÍVEIS DE EXPRESSÃO PROTÉICA DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS APÓS LESÃO CORTANTE DO TENDÃO CALCÂNEO COMUM DE RATOS WISTAR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Resultado _____

Campo Grande (MS), _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo de Tarso Camillo de Carvalho

Instituição: Universidade Nove de Julho

Prof. Dra. Iandara Schettert Silva,

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof. Dr. Baldomero Antonio Kato da Silva

Instituição: Anhanguera Educacional Ltda.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Ariovaldo e Rosa**, fonte de amor e perseverança.

Ao meu marido e filha, **Sérgio e Beatriz**, razões da minha vida.

À minha família, pelo incentivo e carinho em todos os momentos, especialmente à
Fernanda e Lucas.

Aos **amigos** (*de perto, de longe, do trabalho...*), que sempre torceram por mim.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Paulo de Tarso Camillo de Carvalho**, por confiar em minha capacidade, abrindo caminhos profissionais e no campo da pesquisa científica.

A **Prof. Dra. Iandara Schettert Silva**, sem a qual a realização deste trabalho não seria possível. Meus agradecimentos mais sinceros e admiração por seu conhecimento e amor a profissão.

Aos professores e funcionários do **Programa de Pós Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste**, pela contribuição intelectual e pessoal.

Ao **Prof. Msc. Daniel Martins Pereira**, cuja colaboração foi essencial para a finalização deste trabalho.

Ao **Prof. Msc. Filipe Abdala dos Reis** pelo auxílio no decorrer desta caminhada.

À **Prof. Msc. Naila de Campos Soares**, amiga para todas as horas, a pessoa que me estimulou a seguir a área acadêmica e me fez enxergar minhas habilidades profissionais.

Aos amigos **José Luis** e **Rosalbina** pelo incentivo, colaboração e compreensão neste e em todos os momentos.

“O sucesso é ir de fracasso em fracasso sem perder entusiasmo”.
Winston Churchill

RESUMO

LARAIA EMS. Análise dos efeitos do laser de baixa potência (660nm) sobre os níveis de expressão protéica de mediadores inflamatórios após lesão cortante do tendão calcâneo comum de ratos Wistar. Campo Grande; 2011. [Dissertação – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul]

Objetivo: Analisar os efeitos do LBP InGaALP (660nm) sobre os níveis de expressão protéica de mediadores inflamatórios após lesão cortante de tendão calcâneo comum de ratos Wistar. **Métodos:** 30 *Rattus norvegicus*, de linhagem Wistar albino, machos foram submetidos a lesão cortante parcial do tendão calcâneo comum esquerdo, divididos em três grupos de 10 animais de acordo com o tempo de eutanásia após a lesão: 6, 24 e 72 horas. Cada grupo foi subdividido em grupo controle e submetido a laserterapia (LBP) com potência de 100mW (densidade de potência de $3,57 \text{ W/cm}^2$), área do feixe de $0,028 \text{ cm}^2$. A aplicação foi sob forma de um único ponto pelo método transcutâneo na região posterior sobre o tendão calcâneo comum, com densidade de energia de 214 joules/cm^2 , energia de 6 joules e tempo de 60 segundos. Os animais dos grupos LBP foram tratados todos os dias até o período de eutanásia estipulado para cada grupo. A avaliação dos mediadores inflamatórios IL-1 β , IL-6 e IL-10 das amostras dos tendões foram realizadas pelo teste imunoenzimático ELISA. **Resultados:** Os três grupos tratados com LBP (6h: 36.6 ± 4.8 ; 24h: 36.7 ± 18.7 ; 72h: 9.7 ± 1.8) apresentaram redução significativa da IL-1 β quando comparados aos grupos controles (6h: 53.1 ± 14.3 , $p=0.0401$; 24h: 110.7 ± 29.7 , $p=0.0015$; 72h: 24.1 ± 11.2 , $p=0.0463$). A análise da IL-6 demonstrou redução significativa apenas no grupo LBP 72h (4.8 ± 0.7) com relação ao controle (7.1 ± 2.3 ; $p=0.0179$) enquanto a IL-10 apresentou aumento significativo nos grupos tratados (6h: 32.8 ± 11.9 ; 24h: 36.6 ± 9.2 ; 72h: 25.0 ± 3.3) na comparação com os grupos controles relacionados (6h: 10.2 ± 0.9 , $p=0.0007$; 24h: 27.7 ± 5.7 , $p=0.0256$; 72h: 10.3 ± 7.3 , $p<0.0001$). **Conclusão:** Conclui-se que a LBP InGaALP (660nm), potência de 100mW e energia de 6J é um importante modulador de mediadores inflamatórios durante o processo de reparo tecidual após lesão cortante de tendão calcâneo comum de ratos Wistar.

Palavras-chave: interleucina-6, interleucina-10, citocinas, lasers, tendão do calcâneo

ABSTRACT

LARAIA EMS. Analysis of the effects of low power laser (660nm) on the levels of protein expression of inflammatory mediators after injury of the Achilles tendon cutting common rats. Campo Grande, 2011. [Dissertation – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. UFMS,]

Objective: To analyze the effects of low power laser - LBP InGaAlP (660nm) on the levels of protein expression of inflammatory mediators after cutting the Achilles tendon injury common rats. Methods: 30 *Rattus norvegicus*, Wistar strain of albino male underwent partial incisions of the left common calcaneal tendon, divided into three groups of 10 animals according to the time of euthanasia after injury: 6, 24 and 72 hours. Each group was divided into control group and underwent laser therapy (LBP) with a power of 100 mW (power density of 3.57 W/cm²), the beam area of 0.028 cm². The application was in the form of a single point by transcutaneous method in the posterior region of the Achilles tendon common with energy density of 214 Joules/cm², 6 joules of energy and time to 60 seconds. The LBP group animals were treated every day until the time of euthanasia established for each group. The evaluation of the inflammatory mediators IL-1 β , IL-6 and IL-10 tendon samples were performed by ELISA assay. Results: The three groups treated with LBP (6h: 36.6 $\pm$ 4.8, 24h: 36.7 $\pm$ 18.7; 72h: 9.7 $\pm$ 1.8) showed significant reduction of IL-1 β compared to control groups (6h: 53.1 $\pm$ 14.3, p = 0.0401; 24h: 110.7 $\pm$ 29.7, p = 0.0015; 72h: 24.1 $\pm$ 11.2, p = 0.0463). The analysis of IL-6 showed significant reduction only in the LBP group 72 h (4.8 $\pm$ 0.7) compared to the control (7.1 $\pm$ 2.3, p = 0.0179) while IL-10 showed a significant increase in the treated groups (6h: 32.8 $\pm$ 11.9; 24h: 36.6 $\pm$ 9.2, 72h: 25.0 $\pm$ 3.3) compared with groups related controls (6h: 10.2 $\pm$ 0.9, p = 0.0007; 24h: 27.7 $\pm$ 5.7, p = 0.0256; 72h: 10.3 $\pm$ 7.3, p <0.0001). Conclusion: We conclude that the LBP InGaAlP (660nm) 100mW power and energy of 6J is an important modulator of inflammatory mediators during the process of tissue repair after injury to the Achilles tendon cutting common Wistar rats.

Keywords: IL-6, IL-10 cytokine, low-power laser, Achilles tendon

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Delineamento experimental dos períodos de tratamento e eutanásia dos grupos, Campo Grande – 2011 (n=30).....	32
Tabela 2 - IL-1 β para os grupos controle e LBP nos períodos de 6, 24 e 72 horas, Campo Grande – 2011 (n=30)	35
Tabela 3 - IL-6 para os grupos controle e LBP nos períodos de 6, 24 e 72 horas, Campo Grande – 2011 (n=30)	36
Tabela 4 - IL-10 para os grupos controle e LBP nos períodos de 6, 24 e 72 horas, Campo Grande – 2011 (n=30)	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura interna do tendão	17
Figura 2 -	Vista posterior do tendão calcâneo	18
Figura 3 -	Ruptura de tendão calcâneo	19
Figura 4 -	Interação de citocinas sobre tenócitos	23
Figura 5 -	Comprimento de onda de alguns lasers médicos e cirúrgicos	25
Figura 6 -	Coeficiente de absorção de acordo com comprimento de onda	26
Figura 7 -	Photon Lase III - DMC®	31
Figura 8 -	Kit <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> , ELISA.....	33
Figura 9 -	IL1 β para os grupos controle e LBP nos períodos de 6, 24 e 72 horas.....	36
Figura 10 -	IL-6 para os grupos controle e LBP nos períodos de 6, 24 e 72 horas.....	37
Figura 11 -	IL-10 para os grupos controle e LBP nos períodos de 6, 24 e 72 horas.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AESA	Anhanguera Educacional Sociedade Anônima
ATP	Adenosina Trifosfato
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COX-2	Ciclo-oxigenase
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EUA	Estados Unidos da América
h	horas
IFN- γ	interferon γ
IL	interleucina
LASER	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i>
LBP	laser de baixa potência
LPS	lipopolissacarídeos
MMPs	metaloproteinases da matriz
NK	<i>natural killer</i>
ns	Não significativo
PGE ₂	Prostaglandinas
Ph	Potencial hidrogênico
s	segundos
STAT3	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>
TGF- β	Fator de transformação de crescimento beta
Th-1	<i>T helper 1</i>
Th-2	<i>T helper 2</i>
TMB	tetrametilbenzidina
TNF- α	Fator alfa de necrose tumoral
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
vs	versus

LISTA DE SÍMBOLOS

AsGa	Arseneto de Gálio
Ca ⁺⁺	Cálcio
ClO	Cloro
cm ²	Centímetro(s) quadrado(s)
CO ₂	Dióxido de carbono
g	gramas
GaAlAs	Arseneto de Gálio e Alumínio
H ₂ O	Água
HeNe	Hélio Neônio
InGaAlP	Fosfeto de Índio Gálio Alumínio
J	joules
K ⁺	Potássio
Kg	quilogramas
mg	miligramas
mL	mililitro
mW	miliwatts
Na ⁺	Sódio
nm	nanômetros
O ₂	Oxigênio
°C	Graus Celsius
PBST	Solução tampão fosfato salina
pg	picogramas
W	Watts
λ	(Lambda) Comprimento de onda
μl	microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Tendão	16
2.1.1 <u>Tendão calcâneo</u>	17
2.1.2 <u>Ruptura de tendão</u>	18
2.1.3 <u>Ruptura de tendão calcâneo</u>	19
2.2 Reparo tecidual	20
2.3 Mediadores inflamatórios	21
2.4 Laser de baixa potência	24
3 OBJETIVOS	29
3.1 Objetivos específicos	29
4 MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 Animais de experimentação	30
4.2 Grupos experimentais	30
4.3 Procedimento cirúrgico	30
4.4 Aplicação do laser Fosfeto Índio-gálio-alumínio (InGaAlP)	31
4.5 Protocolos de tratamento	32
4.6 Eutanásia	32
4.7 Avaliação dos níveis de mediadores inflamatórios (IL-1B, IL-6 E IL-10)	32
4.8 Análise estatística	34
5 RESULTADOS	35
6 DISCUSSÃO	39
7 CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS.....	45
ANEXO	56

1 INTRODUÇÃO

O tendão é constituído por tecido conjuntivo denso e sua função é transmitir a força produzida pelo músculo para o osso a fim de promover movimento articular (ARRUDA *et al.*, 2007). Sua matriz extracelular é composta em sua maior parte por fibras colágenas longas e cristalinas e altamente alinhadas, o que ocasiona em alta resistência mecânica para forças de tração, além de fibras de elastina, proteoglicanas, glicoproteínas, mucopolissacarídeos e fibroblastos, estes últimos externos à matriz extracelular (ENWEMEKA, REDDY, 2000).

A ruptura súbita do tendão, sem precedentes clínicos, tem ocorrência relativamente comum no esporte e na medicina ocupacional, constituindo importante problema profissional, apesar de afetar também atletas recreacionais (FILLIPIN *et al.*, 2005). Tal assertiva é também verdadeira quando se trata do tendão calcâneo, que é considerado o mais forte e espesso tendão do corpo humano e resulta da fusão dos tendões dos músculos gastrocnêmio e sóleo.

A maior incidência de rupturas agudas desse tendão ocorre em homens na terceira ou quarta década de vida, cujos principais mecanismos de lesão incluem súbita flexão plantar forçada, inesperada dorsiflexão e dorsiflexão brusca partindo da flexão plantar. A etiologia baseia-se em diversas teorias, incluindo uso tóxico de corticoesteróides, uso constante de antibióticos, hipertermia induzida por exercícios físicos e alterações biomecânicas do tornozelo, sendo geralmente aceito que um tendão anteriormente degenerado apresenta maior predisposição a lesões (KHAN *et al.*, 2005).

Segundo Khan *et al.* (2005), o tratamento das rupturas tendinosas pode ser cirúrgico, geralmente utilizado em atletas, indivíduos jovens e magros ou conservador, para indivíduos impossibilitados de sofrerem um procedimento cirúrgico ou indivíduos idosos.

A cicatrização de tecidos moles consiste em um processo integrador, que envolve atividade celular associada a respostas vasculares. Diferentes reações estão envolvidas quando se trata da regeneração de tendões, incluindo uma fase inflamatória, uma fase proliferativa ou reparadora e a fase final de remodelação da matriz (FILLIPIN *et al.*, 2005). Yeung; Guo; Ng (2006) citaram que o

amadurecimento da cicatriz é precedido da quimiotaxia de neutrófilos e macrófagos, angiogênese e deposição de colágeno.

Para Longo, Ronga, Maffulli (2009), o reparo tendíneo é um processo complexo e altamente regulado, que é iniciado, sustentado e, eventualmente finalizado por um grande e variável número de moléculas. Corps *et al.* (2002) afirmaram que para a migração e proliferação celular durante este processo, a fase inflamatória é caracterizada pela presença de citocinas que também promovem a interação da fibronectina e regulação da formação e degradação da matriz extracelular.

Em termos gerais, a função das citocinas é regular as respostas imunes e inflamatórias, contrabalançando as ações entre mediadores anti e pró-inflamatórios. (RIGLEY, 2008). De acordo com Pires *et al.* (2011), os sintomas inflamatórios dos tendões podem ser direcionados por interleucinas pró-inflamatórias como o Fator alfa de necrose tumoral (TNF- α), interleucina 1 β (IL-1 β) e interleucina (IL-6) ou antiinflamatórias como a interleucina10 (IL-10).

As citocinas pró-inflamatórias promovem a ativação do processo inflamatório, auxiliando na eliminação de patógenos e na resolução de tal processo. Elevação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias leva à ativação dos macrófagos, células *natural killer* (NK), células T e células B, proliferação de células T e células B; e proliferação e secreção de imunoglobulinas. Além disso, as citocinas são capazes de recrutar células inflamatórias para os sítios da inflamação (MARQUES; CIZZA, STERNBERG, 2007).

A IL-1 β , segundo Archambault *et al.* (2002), pode induzir a expressão e a produção de metaloproteinases da matriz (MMPs), enzimas essas que podem causar alterações degenerativas nos tendões, degradando o colágeno quando as proenzimas armazenadas na matriz são convertidas em enzimas ativas.

De acordo com Azevedo *et al.* (2007), a IL-6 é uma citocina pró-inflamatória envolvida nas fases precoces da resposta inflamatória por trauma e no desenvolvimento das fases precoce e tardia da disfunção orgânica múltipla. Esta interleucina auxilia na ativação de células T, células B, macrófagos, neutrófilos e eosinófilos.

A IL-10, por ser uma citocina antiinflamatória é capaz de reduzir a resposta inflamatória por meio da diminuição das citocinas pró-inflamatórias e da supressão da ativação de monócitos. (MARQUES; CIZZA, STERNBERG, 2007).

Um microambiente pós-traumático inflamado decorrente da lesão tendínea pode adiar a reorganização do colágeno e o realinhamento celular, sendo que este processo ainda pode ser influenciado pela baixa capacidade proliferativa dos tenócitos, e pela disposição estritamente linear das fibrilas de colágeno típicas do tendão (JOHN *et al.*, 2010).

Pesquisas científicas têm sido publicadas sobre lesões tendinosas a fim de otimizar o processo de reparo tecidual (CASALECHI *et al.*, 2008). Para que uma modalidade terapêutica seja considerada eficaz, esta deve reduzir a fase inflamatória aguda e acelerar a regeneração, evitando que esta seja apenas uma cicatriz avançada. Estudos recentes revelam que alguns métodos físicos como o ultrassom terapêutico e o laser de baixa potência (LBP) melhoram a qualidade da cicatriz e apresentam efeitos benéficos na cicatrização de tendão (FILLIPIN *et al.*, 2005).

De acordo com Casalechi *et al.* (2008), pesquisadores ainda estão a procura do melhor recurso para restaurar as funções e promover reparo em tendões, incluindo a laserterapia, capaz de acelerar tal processo fisiológico.

Estudos clínicos demonstraram efeitos do LBP na aceleração da cicatrização tecidual, porém com necessidade de pesquisas que explicitem a forma como essa aceleração ocorre (REDDY; STEHNO-BITTEL; ENWEMEKA, 1998).

Acredita-se que o LBP possua características fotoquímicas ao invés de efeitos térmicos. Tais características promovem a absorção da luz e sua interação com as células orgânicas (cromóforos) que por sua vez modulam atividades celulares (RYAN; SMITH, 2007).

O reparo do tendão é um processo complexo com alteração nas características iniciais do tecido íntegro. Apesar de a cicatriz oferecer continuidade física ao tecido, o deslizamento do tendão pode ser impedido pela proliferação de tecidos adjacentes (RICHETTI *et al.*, 2008). Para Marcos (2010), estas alterações podem ser reduzidas com o controle do processo cicatricial por meio da modulação da inflamação e dos níveis de citocinas anti e pró-inflamatórias envolvidas no reparo.

O desenvolvimento de um estudo sobre os efeitos do LBP de Fosfeto Índio-Gálio-Alumínio (InGaAlP) com comprimento de onda 660nm, aplicado no tendão calcâneo em ratos Wistar submetidos a lesão cortante foi motivado pela possibilidade de restaurar e normalizar a função de tal tendão observando os fatores que interferem na regeneração tecidual relacionados a fase inflamatória aguda.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tendão

Tendões são a interface entre estruturas contráteis e não contráteis do corpo através das quais são controladas as forças geradas durante o movimento (SALATE *et al.*, 2005).

Os principais elementos celulares que formam o tecido tendíneo são os tenócitos e tenoblastos. Outras células como condrócitos, células vasculares, sinoviais e musculares lisas completam essa formação. Sua matriz extracelular é composta por substâncias de sustentação como as proteoglicanas, glicoproteínas, mucopolissacarídeos e por fibras colágenas e elásticas (FILLIPIN *et al.*, 2005; BASTOS; LIZARELI; PARIZOTTO, 2009).

As fibras colágenas são formadas por uma glicoproteína estrutural denominada colágeno, que possui uma composição própria de aminoácidos. Em cerca de 86 a 95% do peso úmido dos tendões está presente o colágeno tipo I, que constitui 90% do colágeno encontrado no corpo dos mamíferos e está presente em tecidos especiais que devem ser fortes ou que possuem propriedades incomuns. Suas fibrilas são longas, cristalinas e altamente alinhadas, por isso são consideradas responsáveis por sua força tênsil (BIRK *et al.*, 1997; CULLAW; CLARK; MERRILEES, 1999; PARKINSON *et al.*, 1997). Formam um espiral por encontrarem-se orientadas longitudinalmente, transversalmente e horizontalmente com fibrilas de colágeno longitudinais, promovendo ao tendão uma capacidade de equilibrar forças unidirecionais durante os movimentos (CULLAW; CLARK; MERRILEES, 1999).

No entanto, as fibras elásticas, formadas pela elastina encontram-se dispostas paralelas a um eixo longitudinal, o que torna o tendão capaz de resistir principalmente a forças unidirecionais (FU *et al.*, 2008).

De acordo com Junqueira; Carneiro (2004), o tendão pode ser circundado pelo paratendão, que permite sua movimentação com relação as estruturas adjacentes e é coberto internamente pelo epitendão, uma camada pouco espessa de tecido conjuntivo ligada a membrana sinovial que contém suprimentos linfáticos, vasculares e nervosos.

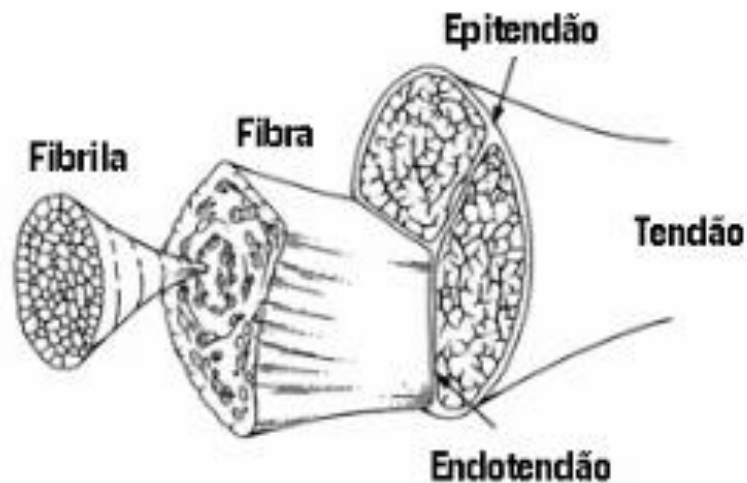


Figura 1 – Estrutura interna do tendão

Fonte: www.aafp.org/afp/20050901/811-f2.jpg

2.2.1 Tendão Calcâneo

O tendão calcâneo, formado pela fusão dos tendões dos músculos gastrocnêmio e sóleo é o tendão mais forte e espesso do corpo humano, capaz de resistir a grandes forças requeridas durante a marcha e descarga de peso (KOEKE *et al.*, 2005; KHAN *et al.*, 2005). Suas fibras colágenas apresentam-se orientadas no eixo longitudinal, com poucos fibroblastos dispostos entre os feixes (ENWEMEKA, 1989).

O tendão calcâneo sofre estresse em diferentes partes por estar envolvido nos movimentos articulares do tornozelo, que ocorrem no plano sagital (flexão plantar e dorsiflexão) e da articulação subtalar, que ocorrem no plano frontal (inversão e eversão) (JÓZSA; KANNUS, 1997).

Para BASTOS, LIZARELLI, PARIZOTTO (2009) rupturas desta estrutura podem ser explicadas pelo fato da vascularização ser escassa em algumas zonas. De acordo com a autora, 35% do suprimento sanguíneo do sistema vascular extrínseco irriga a parte central do tendão calcâneo, sendo que a artéria tibial posterior irriga sua parte proximal e as artérias fibulares irrigam sua porção mais distal.



Figura 2 – Vista posterior do tendão calcâneo

Fonte: eorthopod.com/images/ContentImages/foot/foot_achilles_tendon_anatomy01a.jpg

2.2.2 Ruptura de tendão

A escassa irrigação sanguínea e os pequenos diâmetros dos vasos intratendíneos tornam o tendão um tecido suscetível a degeneração e rupturas (JÓZSA; KANNUS, 1997).

De acordo com Kader *et al.* (2002), o estiramento de aproximadamente 2% do comprimento do tendão faz com que o formato ondulado apresentado em repouso seja perdido. Desde que esse estiramento não ultrapasse 4% do comprimento tendíneo, o tendão pode recuperar-se. No entanto quando a tensão é superior a 8%, ruptura macroscópica pode ocorrer. Aceita-se, porém que as rupturas ocorrem principalmente em tendões previamente degenerados (TALLON; MAFFULLI; EWEN, 2001).

Cawston *et al.* (1998), consideram que outros fatores como a exposição ao excesso de cargas mecânicas, além de fatores individuais como sexo, idade e doenças sistêmicas, podem ser decisivos para que ocorra uma lesão tendínea frente a esforços repetitivos.

2.2.2.1 Ruptura do Tendão Calcâneo

A hipóxia tecidual local ocasionada por microtraumas que levam a degeneração ou alterações inflamatórias no tendão calcâneo é apontada por Almekinders; Deol (1999) como um dos principais fatores para a ruptura do mesmo.

As rupturas súbitas do tendão tem uma ocorrência relativamente comum em atletas recreativos, mas também acometem profissionais, sendo consideradas um importante problema ocupacional (FILLIPIN *et al.*, 2005). São classificadas em ruptura parcial ou total, sendo que no tendão calcâneo a primeira acomete principalmente indivíduos entre a segunda e quarta década de vida e atletas profissionais, enquanto a ruptura total é mais comum no sexo masculino, principalmente em atletas recreacionais (BARRY, MCGUIRRE, 1996).

De acordo com Stheno-Bittel *et al.* (1998), a lesão do tendão calcâneo, além de ser uma lesão grave, é uma das mais comuns e que provoca maior tempo de afastamento, o que demanda atenção especial por parte dos profissionais envolvidos em sua reabilitação.

Os esportes de alto impacto como a corrida e o salto apresentam maior ocorrência deste tipo de lesão quando comparados ao tênis e balé, no entanto o futebol é o esporte apontado como o de grande ocorrência de rupturas súbitas do tendão calcâneo (SALOMÃO *et al.*, 1993; REYNOLDS; WORREL, 1991)



Figura 3 – Ruptura de tendão calcâneo

2.2 Reparo tecidual

O processo de reparo tecidual é caracterizado por uma sucessão de eventos com o objetivo de fechar a lesão e reparar o tecido comprometido. É uma complexa série de reações e interações intracelulares e entre células e matriz que ocorrem por meio de mediadores solúveis. O equilíbrio entre os mediadores inibitórios e excitatórios durante o processo de reparo tecidual é essencial para a homeostasia tecidual após a lesão (PARIZOTTO *et al.*, 2003).

No tendão, o reparo tecidual envolve diversos eventos e divide-se em três fases: inflamatória, com duração de 1 a 7 dias; fase proliferativa, de 5 a 21 dias e, por fim, fase de reorganização da matriz extracelular, que pode perdurar de 14 a 360 dias (ENWEMEKA, 1989; KANNUS; NATRI, 1997).

A fase inflamatória aguda inicia-se imediatamente após a lesão e tem duração de 1 a 3 dias, sendo uma resposta natural do organismo ao trauma lesivo. O primeiro evento a ocorrer é o extravasamento de fluidos teciduais para a área lesada, seguido de vasodilatação local, aumento da permeabilidade capilar, imigração de granulócitos e monócitos. A atração de células inflamatórias para o local da lesão como neutrófilos, leucócitos, plaquetas e eritrócitos reduz o extravasamento de sangue no local. Nessa fase a histamina age no sentido de alterar a permeabilidade vascular e formar edema local (GUYTON; HALL, 2011).

Uma das características da fase inflamatória é a presença de citocinas pró-inflamatórias e antiinflamatórias, que auxiliam na estruturação da fibrina. Dentro de poucas horas após a lesão, grande quantidade de neutrófilos atravessa o endotélio dos capilares sanguíneos ativados por citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , TNF- α e interferon γ (IFN- γ) para a área lesionada, levando a expressão de moléculas de adesão e rolamento de leucócitos.

Após 24 horas da lesão é formada uma estrutura de fibrinas e fibronectina que cessa a hemorragia e promove tensão durante a fase inicial de reparo do tendão (JÓZSA; KANNUS, 1997).

Além da ativação do processo inflamatório, uma resposta imune é gerada pela lesão, formada por linfócitos T e B, que atuam na destruição de toxinas e microorganismos específicos (PARIZOTTO *et al.*, 2003).

A fase proliferativa é marcada pela angiogênese, proliferação de fibroblastos e degradação da matriz. Nesta fase ainda devem surgir colágeno com diâmetro maior que na fase prévia e fibras elásticas imaturas 3 semanas após a lesão (BASTOS, LIZARELLI, PARIZOTTO, 2009).

A formação do tecido de granulação e reestabelecimento vascular da área lesada também são características da fase proliferativa e têm o objetivo de promover melhora da nutrição e oxigenação do tecido que está se formando.

Em torno da segunda semana após a lesão inicia-se a fase de remodelamento da matriz, em que as fibras colágenas já se apresentam bem organizadas, a cicatriz apresenta força própria e as ligações moleculares apresentam-se mais estáveis (ENWEMEKA, 1989).

De acordo com Józsa; Kannus (1997), nesta fase o tecido lesionado apresenta-se mais estável por conta do remodelamento do colágeno, principalmente do tipo I, o que vai ocorrer mais efetivamente após o quinto ou sexto mês de lesão.

2.3 Mediadores inflamatórios

As citocinas são proteínas reguladoras que podem atuar de forma autócrina, parácrina e também como hormônios. Possuem uma ação pleiotrópica (células-alvo múltiplas e múltiplas ações) e muitas delas possuem um espectro de ações sobrepostas. Elas podem também exercer ações antagonistas ou sinérgicas. Portanto, a exposição simultânea a diferentes citocinas pode resultar em respostas qualitativamente diferentes nas células-alvo.

Citocinas e quimiocinas são importantes mediadores envolvidos na manutenção do processo inflamatório, podendo estimular ou inibir a resposta imune.

As citocinas são produzidas na periferia por uma variedade de células do sistema imunológico, como os monócitos, macrófagos, células T ativadas, células B, células NK e fibroblastos. Também são produzidas por outros tipos celulares, como

células musculares lisas, células endoteliais, fibroblastos, queratinócitos, células musculares cardíacas e glândulas sudoríparas écrinas (JONES *et al.*, 1995).

Múltiplos e diversos estímulos regulam a produção de citocinas. A maioria das citocinas pró-inflamatórias é produzida em resposta a patógenos ou a produtos patogênicos, como lipopolissacarídeos (LPS) derivados das paredes celulares de bactérias Gram negativas. Outros indutores clássicos da produção de citocinas pró-inflamatórias incluem infecções virais, trauma, transplante de órgãos ou tecidos, isquemia e lesão de reperfusão. A produção central de citocinas pode ser desencadeada pelo estresse, exercício físico, isquemia, processos neurovegetativos, auto-imunidade e infecção (MARQUES, CIZZA, STERNEBERG, 2007).

A classificação das citocinas baseia-se no tipo de ação ou propriedade, como ações pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias, ou por seu papel como fatores de crescimento ou efeitos hematopoiéticos.

As citocinas pró-inflamatórias promovem a ativação do processo inflamatório, auxiliando na eliminação de patógenos e na resolução do processo inflamatório. Elevação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias levam à ativação dos macrófagos, células NK, células T e células B, proliferação de células T e células B; e proliferação e secreção de imunoglobulinas. No nível sistêmico, as citocinas demonstraram induzir febre e aumentar a síntese de proteínas da fase aguda. Localmente, promovem o recrutamento de células inflamatórias para os sítios da inflamação. São exemplos de citocinas pró-inflamatórias: IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α e IFN- γ (SILVERMAN *et al.*, 2005).

A redução da resposta inflamatória por meio da diminuição das citocinas pró-inflamatórias e da supressão da ativação de monócitos ocorre por meio das citocinas anti-inflamatórias, como IL-4, IL-10, IL-13, Fator de transformação de crescimento beta (TGF- β) (MARQUES, CIZZA, STERNEBERG, 2007).

As citocinas podem também ser classificadas pela fonte de produção do linfócito T *helper*, se produzidas pelos linfócitos T helper 1 (Th-1) ou T helper 2 (Th-2). Os linfócitos Th-1 liberam citocinas que ativam macrófagos, células NK, neutrófilos, linfócitos citotóxicos, ampliando assim a resposta imunológica celular (exemplo: IFN- γ , IL-1, IL-6, TNF- α , IL-2). Por outro lado, as citocinas Th-2 (exemplo: IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, TGF- β) ampliam a resposta humoral por meio da

ativação das células B. As citocinas Th-1 são principalmente pró-inflamatórias, enquanto as citocinas Th-2 são principalmente anti-inflamatórias.

O equilíbrio entre citocinas pró- e anti-inflamatórias é essencial para manter a homeostase no sistema e seu desequilíbrio (Th1 versus Th2) está envolvido na patogênese de muitas doenças humanas, como alergia e doenças autoimunes, doenças infecciosas e septicemia (CAPURON; MILLER, 2004).

A IL-1 β é uma citocina presente na fase aguda da inflamação e no tendão este mediador induz mediadores catabólicos como ciclo-oxigenase (COX-2), prostaglandinas (PGE₂) e MMPs que aceleram a degradação da matriz extracelular quando presentes em excesso no tecido em questão (CORPS *et al.*, 2002; ARCHAMBAULT *et al.*, 2002).

De acordo com Tsuzaki *et al.*, (2003) a presença de IL-1 β causa supressão do colágeno tipo I, induz produção de elastina e provoca alterações no citoesqueleto. John *et al.*, (2010) relataram que a supressão de IL-1 β causa tanto a síntese da matriz extracelular quanto de colágeno tipo I. Esta citocina pode ainda promover boa adaptação das células às cargas a que serão submetidas no tendão (QI *et al.*, 2006)

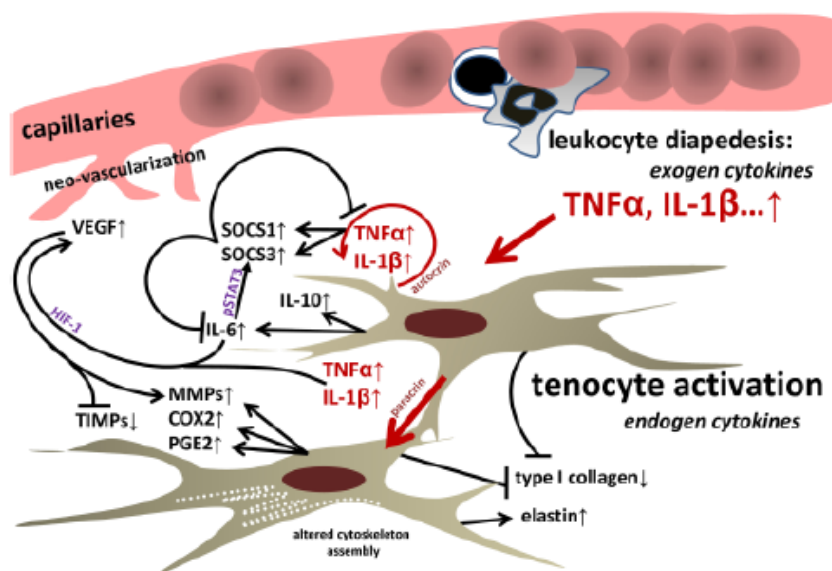


Figura 4 – Interação de citocinas sobre tenócitos. Citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β induzem a expressão de mediadores pró-inflamatórios (COX-2 e PGE₂), enzimas de degradação (MMPs), neoangiogênese (Fator de crescimento vascular endotelial - VEGF), supressão da expressão de colágeno tipo I e indução de inibidores de citocinas.

Fonte: Schulze-Tanzil *et al.* (2011)

A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina multifuncional Th2 que possui funções imunes e obviamente desempenha um papel essencial no reparo tecidual do tendão (SKUTEK *et al.*, 2001). É uma citocina pró-inflamatória envolvida nas fases precoces da resposta inflamatória por trauma e participa da remodelação do tecido conjuntivo (AZEVEDO *et al.*, 2007).

De acordo com Lin *et al.* (2006), a presença de IL-6 está relacionada a importantes alterações teciduais, inclusive com relação ao aumento de fibroblastos e alterações na matriz extracelular, situações essas relacionadas a inflamação do tendão. Para Schulze-Tanzil *et al.* (2011), além da fase inflamatória, a IL-6 pode desempenhar um papel na fase de proliferação via *Signal Transducer and Activator of Transcription 3* (STAT3) por estimular a proliferação celular e assim dar condições de sobrevivência à célula.

Algumas interleucinas são consideradas de extrema importância durante o processo de reparo tecidual por apresentarem a capacidade de modular o processo inflamatório presente na fase inicial da cicatrização. A IL-10 é uma citocina antiinflamatória que acelera o processo de cicatrização com redução da inflamação, principalmente por inibir a expressão de IL-6 e IL-8 e a migração de macrófagos e monócitos no local da lesão. Ao mesmo tempo a IL-10 é capaz de manter as propriedades mecânicas e histológicas dos tecidos (ALAM *et al.*, 1994; LIN *et al.*, 2006; RICHETTI *et al.*, 2008).

A IL-10 tem um papel biológico importante que consiste na inibição da maturação e diferenciação de células dendríticas em monócitos e na inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6 e IL-12, além de aumentar os receptores antagonistas de IL-1 pelos macrófagos (MOSSER; ZHANG, 2008).

2.4 Laser de Baixa Potência

A palavra Laser (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* – Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação) refere-se a uma fonte de luz coerente de um feixe estreito monocromático nas faixas visível, infravermelho ou ultravioleta do espectro. Consiste em uma onda eletromagnética constituída por um

feixe de fótons de mesma frequência em coluna, com comprimento de onda em fase.

Classifica-se de acordo com o nível de potência empregado pelo emissor. O laser de alta potência é utilizado principalmente devido aos seus efeitos fototérmicos e fotoablativos no tecido, possuindo assim um potencial destrutivo e pode ser utilizado em procedimentos cirúrgicos, para cortar, destruir, soldar, remover tatuagens, entre outros efeitos. Como exemplos podem ser citados o laser CO₂ e Argônio.

O LBP não apresenta potencial destrutivo e seus efeitos baseiam-se nas interações atômicas do tecido produzindo efeitos de biomodulação e fotoquímicos (KARU *et al.*, 1998; BASFORD, 1995).

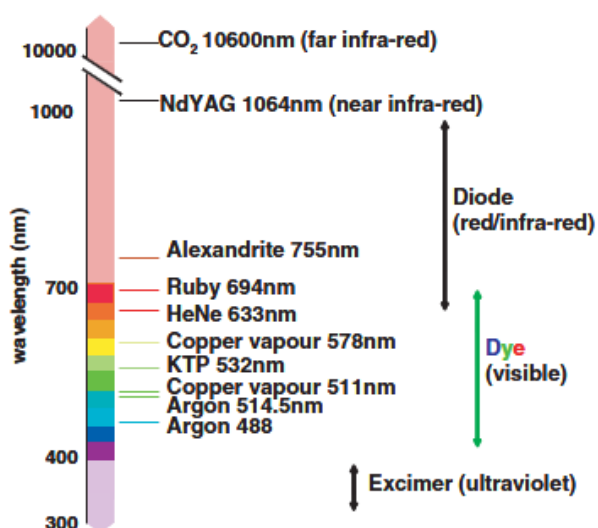


Figura 5 – Comprimento de onda de alguns lasers médicos e cirúrgicos

Fonte: COTTON, (2004)

O uso terapêutico do LBP, de acordo com ORTIZ *et al.* (2001), possui parâmetros como comprimento de onda, densidade de energia, área do feixe, forma de aplicação (contato ou varredura), área irradiada, polaridade, potência média e de pico e forma de onda (contínua e pulsada).

De acordo com Schawlow (1995), os princípios que diferem a luz laser de uma lâmpada são a monocromaticidade, colimação e coerência.

A monocromaticidade é o princípio que o caracteriza como biomodulador e consiste no agrupamento da maior parte da radiação emitida pelo aparelho em torno de um comprimento de onda. Este princípio determina os efeitos terapêuticos do laser sobre os tecidos. Por meio desta característica o LBP é capaz de alterar o

comportamento celular sem que seja necessária a produção de calor. Portanto, este parâmetro determina quais as biomoléculas específicas absorverão a radiação. A radiação visível tem uma via mitocondrial e a invisível (infravermelho) tem ação sobre os cromóforos da membrana celular (BASFORD, 1995; BAXTER, 1998; ARRUDA *et al.*, 2007).

A capacidade individual de o tecido absorver a energia de acordo com o comprimento de onda, afetando a permeabilidade da membrana celular é uma explicação aceita para a interação do laser com o tecido biológico (ALMEIDA-LOPES *et al.*, 2001).

De acordo com Baxter (1998), a base fotobiológica da laserterapia são as biomoléculas com capacidade de excitação pelos fótons incidentes da luz laser. Os aminoácidos têm alta absorção intermediária do espectro ultravioleta e em comprimentos de onda menores; os ácidos nucleicos têm espectro de absorção nas mesmas faixas dos aminoácidos, além da região vermelha e os cromóforos como a hemoglobina e melanina absorvem luz na região visível do espectro.

Cada comprimento de onda e seu respectivo cromóforo determinam a absorção, sendo que para lasers de 488 e 515nm (Argônio) tem-se a hemoglobina e no caso do laser de CO₂, cujo comprimento de onda é de 10.600nm, a biomolécula é a água. Já para os lasers com comprimento de onda na região do vermelho e infravermelho próximo, como o HeNe (632,8nm), GaAlAs (630 a 830nm) e AsGa (904nm), cujo espectro é intermediário, há maior capacidade de penetração por não haver fortes cromóforos (BASFORD, 1995; COTTON, 2004).

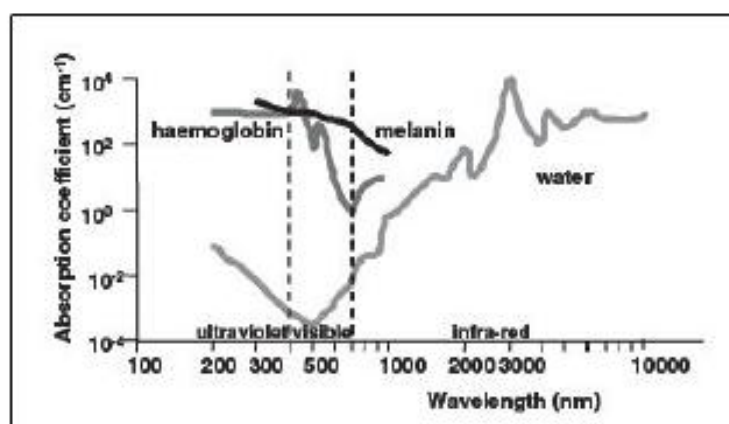


Figura 6: Coeficiente de absorção de acordo com comprimento de onda

Fonte: COTTON, 2004

A colimação ou princípio da unidirecionalidade relaciona-se ao fato de haver pouca ou nenhuma divergência da radiação emitida durante a propagação ao longo da distância percorrida. Isto porque os feixes de laser permanecem paralelos por conta da coerência espacial (SCHAWLOW, 1995).

A coerência é uma das propriedades da luz laser definida como o sincronismo entre tempo e espaço dos fótons emitidos pelo laser, denominadas coerência temporal e espacial respectivamente (BAXTER, 1998).

Esses dois últimos princípios, apesar de importantes não são determinantes durante a irradiação cutânea uma vez que ao atingir a pele, a luz perde essas características pelo espalhamento nas primeiras camadas (COTTON, 2004).

Para Karu; Pyatibrat; Kalendo (2004) a ativação do metabolismo celular ocasionada pela radiação visível (vermelho) ocorre decorrente da absorção da luz pela enzima citocromo-c-oxidase da mitocôndria, acelerando o transporte de elétrons na cadeia respiratória, elevando o potencial elétrico da membrana e ativando a síntese de adenosina trifosfato (ATP).

O aumento da síntese de ATP afeta os níveis de hidrogênio da célula, ativando outros íons como o sódio (Na^+) e potássio (K^+) e alterando o fluxo de cálcio entre mitocôndria e citoplasma, além de estimular atividade enzimática para obter restauração de processos fisiológicos (KARU, 1988).

A cadeia respiratória, a Na^+/K^+ - ATPase e o N^+/H^+ “*exchangers*” (grupo de proteínas transmembrana responsáveis pelo PH intracelular, volume celular, transporte de íons e proliferação celular) são os sinalizadores entre membrana plasmática, mitocôndria e núcleo celular. Estes estão envolvidos na adesão celular que é uma condição importante para a síntese de ATP (KARU, PYATIBRAT, KALENDO, 2004).

Klebanov *et al.* (2001) consideraram como cromóforos da irradiação laser vermelho as porfirinas endógenas, atuando como fotossensibilizadoras e induzindo as reações de radicais livres. Os autores observaram aumento da permeabilidade da membrana plasmática aos íons cálcio (Ca^{++}) em leucócitos após a absorção de energia, ativando processos dependentes de cálcio e incrementando o potencial funcional das células.

O aumento do potencial funcional de leucócitos também é acompanhado pela produção de agentes bioativos como oxigênio (O_2), água (H_2O), cloro (ClO) e várias

citocinas, podendo afetar microcirculação sanguínea ou apresentar propriedades bactericidas (KLEBANOV *et al.*, 2001).

De acordo com Vladimirov, Osipov, Klebanov (2004) os efeitos antiinflamatórios do LBP, a melhora da circulação sanguínea e seus benefícios relacionados a regeneração tecidual devem-se aos seguintes efeitos: ativação da síntese de proteínas e citocinas; vasodilatação; aceleração da divisão e crescimento celular; aumento de atividade celular (leucócitos, fagócitos) e de cálcio no citoplasma celular. Colls (1984) considerou que os efeitos antiinflamatórios devem ser atribuídos a dois fatores: interferência na síntese de prostaglandinas e estímulo à microcirculação, garantindo um aporte eficiente de elementos nutricionais e defensivos para a região lesionada, favorecendo sua resolução.

Os efeitos cicatrizantes do LBP são considerados o de maior destaque (RODRIGUES; GUIMARÃES, 1998) e são caracterizados por estimular neoangiogênese, elevar microcirculação, elevar a síntese de proteínas por intermédio das mitocôndrias e a produção de ATP, aumentando a atividade mitótica (COLLS, 1984; HERRERO, 1988; RODRIGUES; GUIMARÃES, 1998). Além disso, o estímulo à produção de colágeno em cicatrizações teciduais, foi demonstrado por Reddy *et al.* (1998) em coelhos submetidos a laserterapia após tenotomia no tendão calcâneo que demonstraram aumento de 26% da matriz colágena quando comparados ao grupo controle.

Para Demir *et al.* (2004), o laser é efetivo para analgesia e modulação do processo inflamatório, mostrando-se importante na cura de lesões tendíneas. De acordo com Campana *et al.* (1999); Bjordal; Lopes-Martins; Iversen (2006) a ação do LBP sobre o tecido relaciona-se à possibilidade de inibição do aparecimento de fatores quimiotáticos nos estágios iniciais da inflamação, de interferir com o efeito dos mediadores químicos induzidos pela inflamação e a síntese de PGE₂.

3 OBJETIVO

Analisar os efeitos do LBP InGaALP (660nm) sobre os níveis de expressão protéica de mediadores inflamatórios após lesão cortante de tendão calcâneo comum de ratos Wistar.

3.1 Objetivos específicos

- Avaliar os níveis de expressão protéica das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-6 nos períodos 6, 24 e 72 horas após lesão cortante parcial de tendão calcâneo comum por meio do teste imunoenzimático ELISA, comparando grupos controle e tratados com LBP.
- Avaliar os níveis de expressão protéica da citocina antiinflamatória IL-nos períodos 6, 24 e 72 horas após lesão cortante parcial de tendão calcâneo comum por meio do teste imunoenzimático ELISA, comparando grupos controle e tratados com LBP.

4 MATERIAS E MÉTODOS

4.1 Animais de experimentação

O estudo foi realizado no mês de maio de 2011 no Biotério da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS).

Foram utilizados 30 ratos (*Rattus norvegicus*), de linhagem Wistar albino, machos com idade aproximada de 90 dias com peso corporal variando de 250 a 300 gramas, mantidos em condições controladas de luminosidade e temperatura, com água e alimentação (Ração Nuvilab CR1 – Nuvital Nutrientes®) *ad libitum*.

Todos os procedimentos experimentais foram submetidos à avaliação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Anhanguera Educacional S/A (CEUA/AESA) sob o parecer: 2-046/10 (ANEXO A) e estão de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aos padrões de experimentação animal do *International Council for Laboratory Animal Science*.

4.2 Grupos Experimentais

O cálculo amostral foi realizado com base nos estudos de Joensen *et al.* (2011), considerando a aplicação do teste estatístico ANOVA, com poder de teste de 80 e nível alfa de 0,05 resultando em uma amostra mínima de 30 animais.

Os animais foram distribuídos de forma aleatória em três grupos distintos, de acordo com o tempo de eutanásia após a lesão cortante do tendão calcâneo (6 horas (h), 24 horas e 72 horas), sendo cada grupo subdividido em controle – animais que sofreram a lesão e não foram submetidos a LBP e tratamento – animais submetidos a lesão e tratados com LBP. Assim, foram constituídos os grupos: Controle 6 horas, LBP 6 horas, Controle 24 horas, LBP 24 horas, Controle 72 horas e LBP 72 horas, cada um contendo 5 animais.

4.3 Procedimento Cirúrgico

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de quetamina (10%) mais xilazina (2%), associadas em uma única seringa, na proporção de 1ml de quetamina (100mg) para 1ml de xilazina (20mg) onde foi administrado 0,1mL da mistura para cada 100g de peso vivo do animal.

Após tricotomia do membro inferior esquerdo na parte posterior da articulação tíbio-társica, sobre técnica asséptica foi realizado o acesso caudal ao tendão calcâneo comum (Aquiles) e após divulsão para separar dos tecidos adjacentes, feita a tenotomia parcial deste. A síntese da pele foi realizada com ponto simples de nylon monofilamento 5/0.

Não foi administrado analgésico uma vez que o laser possui tal efeito de acordo com Colls (1984), explicado pelos seguintes fatores além do fator antiinflamatório: por manter o potencial da membrana através da inversão da polaridade, o que reduz a sensação dolorosa; liberar beta endorfinas; manter limiar de excitabilidade dos receptores dolorosos por reduzir a síntese de prostaglandinas.

4.4 Aplicação do Laser Fosfeto Índio-Gálio-Alumínio (InGaAlP)

Foi utilizado o Laser Fosfeto Índio-Gálio-Alumínio-Fósforo (InGaAlP) da marca DMC® modelo Photon Lase III, com potência de 100mW (densidade de potência de $3,57 \text{ W/cm}^2$), área do feixe de $0,028 \text{ cm}^2$, e comprimento de onda de λ 660nm. A aplicação foi sob forma de um único ponto pelo método transcutâneo na região posterior sobre o tendão calcâneo comum, com densidade de energia de 214 J/cm^2 , energia de 6 J e tempo de 60 segundos. Para alcançar a densidade de energia de 6 J/cm^2 , foi utilizado um afastador de 1 cm^2 . A aplicação foi iniciada logo após o ato operatório e se estendeu de acordo com o grupo experimental, ou seja, 6, 24 e 72 horas.



Figura 7 – Photon Lase III - DMC®

4.5 Protocolos de Tratamento

Os três grupos tratados (LBP 6h, LBP 24h e LBP 72h) iniciaram o tratamento imediatamente após a indução da lesão. Foram estabelecidos três períodos de eutanásia de acordo com o grupo experimental, sendo 6, 24 e 72 horas após a lesão tendínea (Tabela 1). Os animais foram tratados todos os dias até o período de eutanásia estipulado para cada grupo.

Tabela 1 - Delineamento experimental dos períodos de tratamento e eutanásia dos grupos, Campo Grande – 2011 (n=15).

Grupo	Início Tratamento	Tratamento (aplicação)	Eutanásia (Após a lesão)
LBP 6h	Após a indução	1	6 horas
LBP 24h	Após a indução	2	24 horas
LBP 72h	Após a indução	4	72 horas

4.6 Eutanásia

Os animais foram submetidos à eutanásia por dose letal de thiopental sódico (150 mg/Kg). A remoção dos 30 tendões calcâneos esquerdos foi realizada por dissecação, desde a inserção calcanear até a junção miotendínea.

4.7 Avaliação dos níveis de mediadores inflamatórios (IL-1 β , IL-6 E IL-10)

A dosagem das citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-10 das amostras dos tendões foram realizadas pelo teste imunoenzimático *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), seguindo instruções do kit comercial (R&D System, EUA).

Para tanto, placas de 96 poços foram sensibilizadas com 100 μ l de anticorpo monoclonal para cada citocina: anti-IL1 β e IL-6 diluídos em tampão carbonato de sódio (0,1M, pH 9,6), enquanto anti IL-10 foi diluído em tampão fosfato de sódio (0,2M, pH 6,5) e após a sensibilização foram incubadas (4°C) por 18 horas.

Para o bloqueio, as placas foram lavadas com PBST (solução PBS contendo 0,05% de Tween 20) por 4 vezes e depois preenchidas com 300 µl/poço de solução de bloqueio (3% gelatina em PBST, Sigma) à 37°C por 3 horas e submetidas a novo ciclo de lavagens.

A seguir, 100µl das amostras devidamente diluídas ou dos padrões das citocinas recombinantes foram adicionados à placa e deixadas por 18 horas em temperatura de 4 °C. Após lavagem, 100µl dos respectivos anticorpos biotinilados específicos de detecção para cada citocina foram acrescentados e deixados por 1 hora em temperatura ambiente.

Após lavagem das placas, o volume de 100µl de estreptavidina – peroxidase foi adicionado e deixado por 1 hora em temperatura ambiente (22 °C) seguida de novas lavagens.

A reação foi revelada pela adição de 100 µl/poço da solução de 3.3'5.5' tetrametilbenzidina (TMB) e interrompida pela adição de 50 µl/poço de ácido sulfúrico (2 N).

A leitura foi realizada em espectrofotômetro Espectra Max plus 384 (Sunnyvale, CA, EUA) em comprimento de onda de 450nm com correção a 570nm. As concentrações das amostras foram calculadas a partir das curvas-padrão obtidas com as citocinas recombinantes. O limite de detecção para IL-1β, IL-10 foi de 1,95 pg/ml, enquanto para IL-6 foi de 3.13 - 300 pg/ml .



Figura 8 - Kit *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, ELISA

Fonte: <http://www.pharmaceutical-sales.net/products/p1/ELISA-KIT/>

4.8 Análise Estatística

Os dados obtidos foram tabulados em Software Microsoft Excel 2003 e analisados no Software GraphPad Prisma 5, tomando como hipótese de nulidade $p > 0,05$.

Inicialmente os dados foram avaliados quanto a sua normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, seguido da aplicação do teste de análise de variância ANOVA e o “*post hoc test*” Teste de Tukey para comparação entre os períodos. O Teste t de Student foi utilizado para comparações entre os grupos controle e LBP.

5 RESULTADOS

Os dados foram analisados em relação à sua distribuição. O teste utilizado foi o teste de Shapiro-Wilk. Os valores observados foram de $p > 0.05$, aceitando-se para os dados uma distribuição normal.

Para todas as comparações foi estabelecido valor de significância em $p \leq 0.05$.

Para as comparações entre os grupos controle e LBP foi utilizado o teste t de Student e para as comparações entre os períodos foi utilizada a análise de variância ANOVA com pós-teste de Tukey.

Tabela 2 – IL-1 β para os grupos controle e LBP nos períodos de 6, 24 e 72 horas, Campo Grande – 2011 (n=30).

Período	Controle	LBP	Teste t
6 horas	53.1 $\pm$ 14.3	36.6 $\pm$ 4.8	0.0401*
24 horas	110.7 $\pm$ 29.7	36.7 $\pm$ 18.7	0.0015*
72 horas	24.1 $\pm$ 11.2	9.7 $\pm$ 1.8	0.0463*
ANOVA	0.0002	0.0035	
Pós-teste de Tukey	6 vs 24*	6 vs 24 ns	
	6 vs 72 ns	6 vs 72*	
	24 vs 72*	24 vs 72*	

(ns) não significativo; (*) valores significativos.

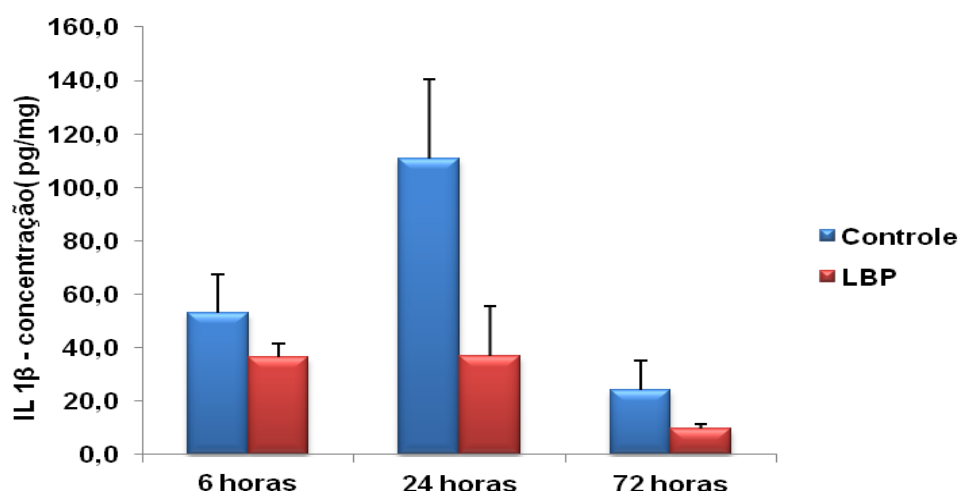


Figura 9 - IL1 β para os grupos controle e LBP nos períodos de 6, 24 e 72 horas.

Tabela 3 – IL6 para os grupos controle e LBP nos períodos de 6, 24 e 72 horas, Campo Grande – 2011 (n=30)

Período	Controle	LBP	Teste t
6 horas	22.8±21.0	19.0±8.3	0.6198 ns
24 horas	27.3±26.9	15.3±9.4	0.2324 ns
72 horas	7.1±2.3	4.8±0.7	0.0179*
ANOVA	0.0889	0.0014	
Pós-teste de Tukey	ns	6 vs 24 ns 6 vs 72* 24 vs 72*	

(ns) não significativo; (*) valores significativos.

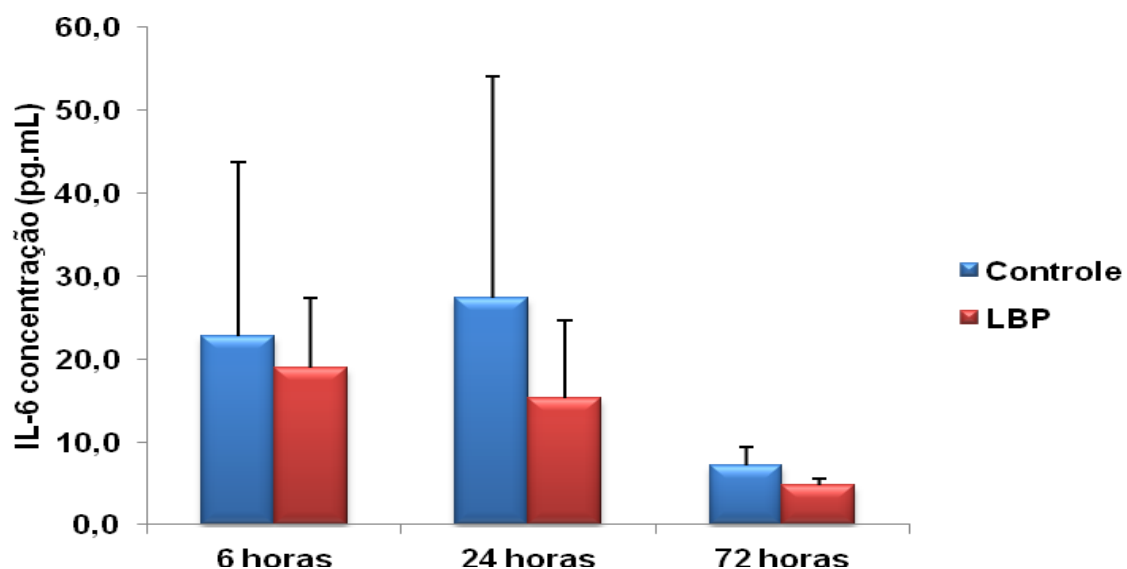


Figura 10 – IL-6 para os grupos controle e LBP nos períodos de 6, 24 e 72 horas.

Tabela 4 – IL-10 para os grupos controle e LBP nos períodos de 6, 24 e 72 horas, Campo Grande – 2011 (n=30)

	Controle	LBP	Teste t
6 horas	10.2±0.9	32.8±11.9	0.0007*
24 horas	27.7±5.7	36.6±9.2	0.0256*
72 horas	10.3±7.3	25.0±3.3	<0.0001*
ANOVA	<0.0001	0.0301	
Pós-teste de Tukey			
	6 vs 24*	6 vs 24 ns	
	6 vs 72 ns	6 vs 72 ns	
	24 vs 72*	24 vs 72*	

(ns) não significativo; (*) valores significativos.

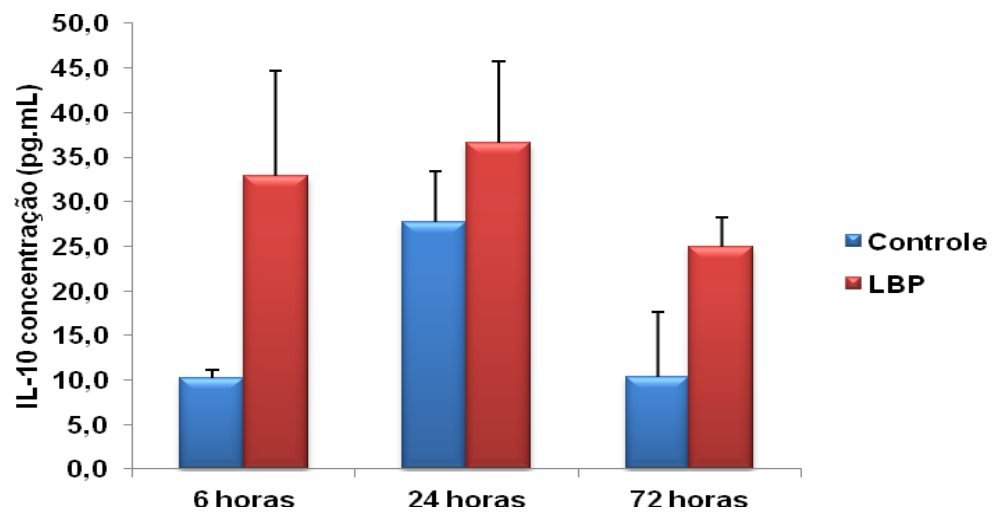


Figura 11 – IL-10 para os grupos controle e LBP nos períodos de 6, 24 e 72 horas.

6 DISCUSSÃO

O tecido tendíneo, quando comparado aos demais tecidos conectivos é considerado o mais rígido e resistente devido a alta proporção de colágeno em suas fibras e por conta da disposição compacta e paralela das fibras com relação a força que é aplicada sobre as mesmas. No entanto, rupturas agudas do tendão calcâneo são relativamente comuns, principalmente na presença prévia de alterações degenerativas intratendíneas (FILLIPIN *et al.*, 2005; KHAN *et al.*, 2005).

Estudos recentes têm sido realizados na busca de alternativas terapêuticas eficazes para o tratamento conservador das rupturas de tendão, bem como das alterações degenerativas deste tecido (ARCHAMBAULT *et al.*, 2002; DEMIR *et al.*, 2004; SALATE *et al.*, 2005; ARRUDA *et al.*, 2007). A LBP vem sendo apontada como importante facilitadora do processo de reparo tecidual por influenciar na modulação de processos fisiológicos (BJORDAL; LOPES-MARTINS; IVERSEN, 2006). Porém esta ainda é uma área controversa que necessita determinar os melhores parâmetros a serem utilizados na prática clínica e identificar de que maneira este recurso promove benefícios na regeneração do tendão (CASALECHI *et al.*, 2008). O presente estudo verificou os efeitos da LBP sobre os níveis de expressão protéica de mediadores inflamatórios após ruptura parcial do tendão calcâneo comum em ratos Wistar.

O modelo experimental utilizado baseou-se no trabalho de Murrel *et al.* (1994), por ter sido considerado um veículo rápido e econômico para o estudo de diversas modalidades terapêuticas sobre o reparo tendinoso (KURTZ *et al.*, 1999). Além disso, modelos animais são bem aceitos por possibilitar o controle de variáveis de acordo com as necessidades da pesquisa, o que pode ser difícil em estudos realizados em humanos. O fato de permitirem o uso de técnicas invasivas de avaliação da modalidade terapêutica utilizada, bem como exame tecidual detalhado, inclusive análise de substâncias bioquímicas também estimulam o uso deste modelo para estudos científicos (JOENSEN *et al.*, 2011).

O tempo de tratamento (72 horas) utilizado em nosso estudo baseou-se no fato da fase inflamatória do reparo tecidual ter duração de 1 a 7 dias, sendo que a inflamação aguda inicia-se imediatamente após a lesão e pode perdurar até 3 dias (GUYTON; HALL, 2011).

A inflamação que se desenvolve frente a um estímulo danoso é um evento benéfico que visa a restauração do tecido e remoção do agente agressor, visando o retorno a homeostase. Wojciak; Crossan (1993) observaram a presença de infiltrado inflamatório na bainha sinovial do tendão e epitendão durante a cicatrização do mesmo, com linfócitos e macrófagos. Schulze-Tanzil *et al.* (2011), relatam que a ruptura de tendão induz a uma resposta inflamatória local caracterizada pela indução de citocinas pró-inflamatórias.

Os níveis da expressão protéica de mediadores pró e antiinflamatórios (IL-1 β , IL-6 e IL-10) foram mensurados no presente estudo no sentido de observar a influência da LBP na fase inflamatória do reparo tecidual do tendão calcâneo. Foi detectada importante elevação do nível de expressão protéica da IL-1 β no grupo que sofreu a eutanásia 24 horas após a lesão do tendão calcâneo e não recebeu LBP, demonstrando diferença entre este e os outros dois grupos controles (controle 6h e controle 72h), o que pode sugerir um período de pico desta citocina após lesão cortante de tendão calcâneo em modelo experimental.

No entanto, o grupo LBP 24 horas apresentou níveis muito próximos dos demonstrados pelo grupo LBP 6h, sugerindo que o tratamento proposto inibiu a elevação do nível desta interleucina no período de 24 horas conforme ocorreu com o grupo controle. Além disso, quando comparados os grupos controles com os grupos de animais submetidos a LBP, nos três períodos de eutanásia houve diferenças significativas.

Em trabalho realizado com coelhos, o nível da IL-1 β apresentou-se elevado na presença de lesão de bainha do tendão de acordo com Berglund; Hart; Wiig (2007). A IL-1 β provoca degradação da matriz extracelular do tendão, supressão do colágeno tipo I, o que provoca redução de rigidez tendínea e indução da elastina, causando aumento da elasticidade deste tecido (Qi *et al.*, 2006). Outros efeitos da presença desta interleucina no tecido tendíneo são apontados como a indução de mediadores inflamatórios e catabólicos como a COX-2, PGE₂ e MMPs, que aceleram a degradação da matriz extracelular do tendão e causam a perda de resistência biomecânica e durabilidade deste tecido. (ARCHAMBAULT *et al.*, 2002; CORPS *et al.*, 2002; YANG;WANG, 2005).

Os trabalhos supra-citados, bem como outros estudados por Bjordal; Lopes-Martins; Iversen (2006) foram realizados em animais, o que os estimulou a realizar uma pesquisa sobre os efeitos anti-inflamatórios da LBP (904nm, 5,4J por ponto,

densidade de potência de 20mW/cm^2) em tendões calcâneos de humanos. Os autores puderam confirmar tais efeitos por meio da redução da concentração de prostaglandinas (PGE_2) 75, 90 e 105 minutos após a LBP comparado as concentrações pré tratamento. Tais resultados sugerem houve redução da $\text{IL-1}\beta$ pela radiação LBP já que as PGE_2 são induzidas por esta interleucina.

Marcos *et al.* (2011), após indução de tendinite calcânea por collagenase em tendões de ratos observaram redução da expressão gênica da COX-2 e PGE_2 após o uso da LBP com comprimento de onda 810nm, potência de 100mW, por 30s, densidade de energia 5W/cm^2 e energia de 3J. Apesar de não ter mensurado os níveis de $\text{IL-1}\beta$, o fato desta citocina interferir na expressão de COX-2 e PGE_2 sugere que o LBP possa tê-la reduzido.

Ao contrário do presente estudo, Pires *et al.* (2011) em trabalho realizado com LBP (780nm) em tendinite induzida por collagenase não observaram redução da $\text{IL-1}\beta$. Isto pode ter ocorrido pelo fato da mensuração dos mediadores inflamatórios ser feita apenas 7 e 14 dias após a lesão, período este não mais considerado inflamação aguda.

De acordo com Skutek *et al.* (2001) a IL-6 desempenha um papel essencial no reparo tecidual do tendão. Os níveis protéicos de IL-6 não foram alterados pela LBP nos grupos 6 e 24 horas na presente pesquisa segundo a análise estatística. Já na comparação entre os grupos controle e LBP 72 horas houve uma redução significativa deste mediador pró-inflamatório.

De acordo com Azevedo *et al.*, (2007); Ghazizadeh; Tosa; Shimizu, (2007) a IL-6 está envolvida na remodelação do tecido conjuntivo e nas fases precoces da resposta inflamatória. Como uma citocina pró-inflamatória é produzida principalmente por linfócitos T e auxilia na ativação de células T, células B, macrófagos, neutrófilos e eosinófilos (STERNEBERG, 2000). Em conjunto, esses aspectos da resposta inflamatória fornecem anticorpos e defesas celulares imediatas não-específicas (inatas) e, posteriormente, específicas (adaptativas) contra infecções e outros ataques. Segundo Liechty *et al.*, (2000) a presença de citocinas pró-inflamatórias como a IL-6 pode ocasionar mudanças no tecido pelo aumento de fibroblastos e alterações na matriz extracelular, o que de acordo com Hayer *et al.* (2007) pode estar relacionado ao desenvolvimento de tendinite.

Os níveis da IL-6 podem encontrar-se elevados na região do tendão e peritendinosa durante exercícios (SKUTEK *et al.*, 2001; LANGBERG; OLESEN;

GEMMER, 2002), no entanto este aumento pode ser considerado lesivo ao tecido tendíneo por alterar as propriedades teciduais (Lin *et al.*, 2006).

Nakama; Gotoh; Yamada (2006) demonstraram produção elevada de IL-6 em ruptura do tendão do manguito rotador, corroborando com os resultados encontrados neste estudo. Para Schulze-Tanzil *et al.*, (2011), além da fase inflamatória, a IL-6 pode desempenhar um papel na fase de proliferação via STAT3 por estimular a proliferação celular e assim dar condições de sobrevivência à célula.

Nas fases aguda e crônica de tendinite induzida por collagenase a LBP (780nm) na dose de 7,7J/cm² foi capaz de reduzir a IL-6, o que está de acordo com o presente trabalho e foi considerada uma alternativa terapêutica eficaz no tratamento de tendinopatias por Pires *et al.*, (2011).

As citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β) reduzem a resposta inflamatória por meio da diminuição das citocinas pró-inflamatórias e da supressão da ativação de monócitos, ou seja, modulam o processo inflamatório. Segundo Reitamo; Remitz; Tamai (1994), a IL-10 é produzida por células do sistema imunológico como macrófagos, linfócitos e células dendríticas e podem desempenhar papel regulador sobre os fibroblastos e condrócitos.

Esta interleucina (IL-10) é descrita como uma citocina que acelera o processo de cicatrização com redução da inflamação e manutenção das propriedades mecânicas e histológicas do tecido além de inibir a expressão de IL-6, IL-8 e IL-12 (RICHETTI; REDDY, 2008).

John *et al.* (2011), sob a hipótese de que os tenócitos responderiam ativamente às citocinas pró-inflamatórias pela indução de citocinas imunorreguladoras e inibidoras (Reitamo; Remitz; Tamai, 1994; Wango; Laban; Cook, 1997; Ghazizadeh; Tosa; Shimizu, 2007), realizaram um trabalho com cultura de tenócitos *in vitro* e, apesar de tanto a IL-6 quanto a IL-10 serem citadas como mediadores inflamatórios envolvidos em remodelação do tecido conjuntivo, esta hipótese não foi confirmada.

No entanto, aparentemente, a inibição de citocinas pró-inflamatórias no processo de reparo tecidual do tendão é o papel mais bem definido da IL-10, já que Schulze-Tanzil *et al.* (2011) sugerem que ainda é necessário esclarecer de que maneira esta citocina contribui para o reparo tecidual dos tendões. A hipótese da IL-10 influenciar na remodelação da matriz extracelular é sustentada pelo aumento das

fibras de elastina e redução do colágeno tipo I quando esta está presente (MOROGUCHI *et al.*, 2004).

Marcos (2010) observou que o LBP (810nm) com dose de 3J produziu aumento significativo na expressão protéica de IL-10 em modelo experimental de tendinite calcânea induzida por collagenase, acelerando o processo inflamatório, o que pode ser confirmado pelo fato desta citocina regular a atividade de determinadas MMPs.

Os resultados do presente estudo corroboram com os de Marcos (2010) pois demonstraram elevação estatisticamente significativa da IL-10 nos 3 grupos tratados com LBP quando comparados aos controles, sendo que o grupo LBP 72 horas foi o que mais se destacou com relação ao controle 72 horas. Esses dados vêm de encontro ainda com os resultados encontrados por Pugliese *et al.* (2003) que demonstraram os efeitos anti-inflamatórios do LBP (AsGa) com diferentes densidades de energia sobre feridas cutâneas em dorsos de ratos.

7 CONCLUSÃO

Conclui-se que a LBP InGaALP (660nm), potência de 100mW e energia de 6J é um importante modulador de mediadores inflamatórios durante o processo de reparo tecidual após lesão cortante de tendão calcâneo comum de ratos Wistar por ocasionar inibição nas citocinas pró-inflamatórias e elevar os níveis da citocina anti-inflamatória.

REFERÊNCIAS

Alam R, Kumar D, Anderson-Walters D, Forsythe PA. Macrophage inflammatory protein-1 alpha and monocyte chemoattractant peptide-1 elici immediate and late cutaneous reactions and activate murine mast cells in vivo. *J Immunol.* 1994; 2: 1298-1304.

Almeida-Lopes L, Rigau J, Zângaro RA, Guidugli-Neto J, Jaeger MMM. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblast proliferation using different irradiance and same fluences. *Lasers Surg Med.* 2001; 29: 179-84.

Almekinders LC, Deol G. The effects of aging, anti-inflammatory drugs, and ultrasound on the in vitro response of tendon tissue. *Am J Sports Med.* 1999; 27 (4), 417-21.

Archambault J, Tsuzaki M, Herzog W, Banes AJ. Stretch and interleukin- 1β induce matrix metalloproteinases in rabbit tendon cells in vitro. *J Orthop Res.* 2002; 36-39.

Arruda ERB, Rodrigues NC, Taciro C, Parizotto NA. Influência de diferentes comprimentos de onda da laserterapia de baixa intensidade na regeneração tendínea do rato após tenotomia. *Rev bras fisioter.* 2007; 11(4): 283-88.

Azevedo RCV, Paiva RB, Ades F, David CMN. Fator de Inibição da Migração de Macrófagos e Interleucina-6 na Síndrome de Esmagamento: Analogia com Gravidade? Relato de Casos. *Rev Bras Ter Int.* 2007; 19(4).

Barry NM, MCGuire JL. Overuse syndromes in adult athlets. *Musculoskeletal Med.* 1996; 22(3), 515- 29.

Basford JR. Low intensity laser therapy – still not an established clinical tool. *Lasers Surg Med.* 1995; 16 (4): 331-42.

Bastos JLN; Lizarelli RFZ; Parizotto NA. Comparative study of laser and LED systems of low intensity applied to tendon healing. *Laser Physics.* 2009; 19:25-31.

Baxter D. Laserterapia de baixa intensidade. In: Kitchen S; Bazin S. *Eletroterapia de Clayton.* São Paulo, Manole, 1998.

Berglund M, Hart DA, Wiig M. The inflammatory response and hyaluronan synthases in the rabbit flexor tendon and tendon sheath following injury. *J Hand Surg Eur Vol* 2007; 32: 581–587.

Birk DE, Zycband EI, Woodruff S, Winkelmann DA, Trelstad RL. Collagen fibrillogenesis in situ: fibril segments become long fibrils as the developing tendon matures. *Dev dyn.* 1997; 208: 291-98.

Bjordal JM, Lopes-Martins RA, Iversen VV. A randomized, 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; 40 (1): 76-80.

Campana VR, Moya M, Gavotto A, Soriano F, Juri HO, Spitale LS, et al. The relative effects of He-Ne laser and meloxicam on experimentally induced inflammation laser therapy. *Lasers Med Surg.* 1999; 11(2): 6-10.

Capuron L, Miller AH. Cytokines and psychopathology: lessons from interferon-alpha. *Biol Psychiatry*. 2004;56(11):819-24.

Casalechi HL, Nicolau RA., Casalechi VL, Silveira Jr L, Paula AMB, Pacheco, MTT. The effects of low-level light emitting diode on the repair process of Achilles tendon therapy in rats. *Lasers Med Science*, 2008.

Cawston TE, Curry VA, Summers CA, Clark IM, Riley GP, Life PF, et al. The role of oncostatin M in animal and human connective tissue collagen turnover and its localization within the rheumatoid joint. *Arthritis Rheum*. 1998; 41: 1760-71.

Colls J. La terapia laser hoy. Barcelona. Centro de Documentación Laser de Meditec. 1894.

Corps AN, Harrall RL, Curry VA, Fenwick SA, Hazleman BL, Riley GP. Ciprofloxacin enhances the stimulation of matrix metalloproteinase 3 expression by interleukin-1beta in human tendon-derived cells. A potential mechanism of fluoroquinolone-induced tendinopathy. *Arthritis Rheum*. 2002; 46: 3034–3040.

Cotton AM. A review of the principles and use of lasers in lower limb problems. *Int j low extrem wounds*. 2004; 3 (3): 133-42.

Cullaw EM, Clark CH, Merrilees MJ. Connective tissue: Matrix composition and its relevance to physical therapy. *Phys Ther*. 1999; 79 (3): 308-19.

Demir H, Menku P, Kirnap M, Calis M, Ikizceli I. Comparison of the Effects of Laser, Ultrasound, and Combined Laser & Ultrasound Treatments in Experimental Tendon Healing. *Lasers surg med*. 2004; 35:84-9.

Enwemeka CS, Reddy K. The biological effects of laser therapy and other modalities on connective tissue repair process. *Laser Therapy*. 2000;12:22-30.

Enwemeka CS. Inflammation, cellularity and fibroblastogenesis in regeneration tendon: implications for tendon rehabilitation. *Phys ther*. 1989; v.69: 816-25.

Enwemeka CS. Effects of therapeutic ultrasound on tendon healing: a biomechanical study. *Am j phys med rehabilit*. 1989; 283-7.

Fillipin LI, Mauriz JL ,Vedovelli K ,Moreira AJ, Zettler CG, Lech O , et al. Low-Level Laser Therapy (LLLT) Prevents Oxidative Stress and Reduces Fibrosis in Rat Traumatized Achilles Tendon. *Lasers Surg and Med*. 2005; 37:293–300.

Fu SC., Shum WT, Hung LK ,Wong MWN, Qin L, Chan KM. Low-Intensity Pulsed Ultrasound on Tendon Healing: A Study of the Effect of Treatment Duration and Treatment Initiation. *Am J Sports Med*. 2008; 36 (9).

Ghazizadeh M, Tosa M, Shimizu H. Functional implications of the IL-6 signaling pathway in keloid pathogenesis. *J Invest Dermatol*. 2007; 127:98–105.

Guyton AC, Hall JE. *Tratado de Fisiologia Médica*. Elsevier: Rio de Janeiro , 12 ed. 2011

Hayer S, Redlich K, Korb A, Hermann S, Smolen J, Schett G. Tenosynovitis and osteoclast formation as the initial preclinical changes in a murine model of inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum*. 2007; 56 (1): 79-88.

Herrero C. Los efectos terapeuticos. Boletim do Centro de Documentación Láser de Meditec. 1988; 15 (16): 22-26.

Joensen J, Gjerdet NR , Hummelsund S , V Iversen , Lopes-Martins RA , Bjordal JM . An experimental study of low-level laser therapy in rat Achilles tendon injury. Lasers Med Sci. 2011.

John T, Lodka D, Kohl B, Ertel W, Jammrath J, Conrad C, Stoll C, Busch C, Schulze-Tanzil G. Effect of proinflammatory and immunoregulatory cytokines on human tenocytes. J Orthop Res 2010; 28: 1071–1077.

Jones AP, Webb LM, Anderson AO, Leonard EJ, Rot A. Normal human sweat contains interleukin-8. J Leukoc Biol. 1995;57(3):434-7.

Józsa L, Kannus P. Histopathological findings in spontaneous tendon rupture. Scand J Med Sci Sports. 1997; 7 (2): 113-18.

Junqueira LC, Carneiro J. Histologia Básica. 10ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

Kader D, Saxena A, Movin T, Maffulli N. Achilles tendinopathy: Some aspects of basic science and clinical management. Br J Sports Med 2002;36:239–249.

Kannus P, Natri A. Etiology and pathophysiology of tendon ruptures in sports. Scand J Med Sci Sports 1997;7:107–112.

Karu TI. Molecular mechanisms of the therapeutic effect of low-intensity laser irradiation. *Lasers in Life Sciences*. 1988; 2: 53-74.

Karu TI, Afanasyeva NI, Kolyakov SF, Pyatibrat LV. Change in the absorption spectrum of a monolayer of live cells under low-intensity laser irradiation. *Dokl. Akad. Nauk*. 1998; 360 (2): 267-70.

Karu TI; Pyatibrat LV; Kalendo GS. Photobiological modulation of cell attachment via cytochrome c oxidase. *Photochemical & Photobiology Science*. 2004; 3: 211-16.

Khan JKR, Fick D, Keogh A , Crawford J, Brammar T, Parker M. Treatment of acute achilles tendon ruptures: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *J Bone Joint Surg Am* .2005; 87(10).

Klebanov GI; Kreinina MV; Poltanov EA. Khristoforova TV; Vladimirov YA. Mechanism of therapeutics effect of low-intensity infrared laser irradiation. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2001; 131 (3): 268-89.

Koeke PU, Parizotto NA, Carrinho PM, Salate AC. Comparative study of the efficacy of the topical application of hydrocortisone, therapeutic ultrasound and phonophoresis on the tissue repair process in rat tendons. *Ultrasound Med Biol*. 2005 ;31(3):345-50.

Kurtz CA., Loebig TG, Anderson DD , Demeo PJ, Campbell PG. Insulin-Like Growth Factor I Accelerates Functional Recovery from Achilles Tendon Injury in a Rat Model. *Am J Sports Med*. 1999; 27; 363.

Langberg H, Olesen JL, Gemmer C.. Substantial elevation of interleukin-6 concentration in peritendinous tissue, in contrast to muscle, following prolonged exercise in humans. *J Physiol*. 2002; 542:985–990.

Liechty KW, Adzick NS, Crombleholme TM. Diminished interleukin 6 (IL-6) productin during scarless human fetal wound repair. *Cytokine*. 2000; 12: 671-76.

Lin TW, Cardenas L, Glaser DL, Soslowsky LJ. Tendon healing in interleukin-4 and interleukin-6 knockout mice. *J Biomech* 2006; 39: 61–69.

Longo UG, Ronga M, Maffulli N . Achilles tendinopathy. *Sports Med Arthrosc Rev*. 2009; 17(2):112–26.

Marcos RL. Efeito do laser de baixa potência (810nm) na tendinite induzida por collagenase em tendão calcâneo de ratos [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2010.

Marcos RL, Leal Junior ECP, Messias FM, Carvalho MHC, Pallotta RC, Frigo L, et al. Infrared (810 nm) low-level laser therapy in rat Achilles tendinitis: A consistent alternative to drugs. *Photochem photobiol*. No prelo. 2011.

Marques AH, Cizza G, Sterneberg E. Interações imunocerebrais e implicações nos transtornos psiquiátricos. *Rev Bras Psiquiatr*. 2007;29(Supl I):S27-32.

Marqueti RC , Parizotto NA, Chrigher RS , Perez SEA., Selistre-De-Araujo HS. Androgenic-Anabolic Steroids Associated With Mechanical Loading Inhibit Matrix Metalloproteinase Activity and Affect the Remodeling of the Achilles Tendon in Rats. *Am. J Sports Med*. 2006; 34(8).

Moroguchi A, Ishimura K, Okano K, Wakabayashi H, Maeba T, Maeta H. Interleukin-10 suppresses proliferation and remodeling of extracellular matrix of cultured human skin fibroblasts. *Eur Surg Res* 2004; 36: 39–44.

Mosser DM, Zhang X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev.* 2008; 226: 205-18.

Murrell GAC, Lilly EG, Goldner RD, Seaber AV. Effects of immobilization on Achilles tendon healing in a rat model. *J Orthop Res.* 1994; 12, 582-91.

Nakama K, Gotoh M, Yamada T. Interleukin-6-induced activation of signal transducer and activator of transcription- 3 in ruptured rotator cuff tendon. *J Int Med Res.* 2006 34:624–631.

Ortiz MCS, Carrinho PM, Santos AASS, Gonçalves RC, Parizotto NA. Laser de baixa intensidade: princípios e generalidades- Parte 1. *Fisiot Bras.* 2001; 2 (4): 221-38.

Parizotto NA, Koeke PU, Moreno BGD, Lourencin FTC. Utilização da fonoforese em distúrbios músculo-esqueléticos: uma meta-análise. *Rev Bras Fisiot.* 2003; 7 (1): 49-55.

Parkinson J, Brass A, Canova G, Brechet Y. The mechanical properties of simulated collagen fibrils. *J Biomechanics.* 1997; 30 (6): 549-54.

Pires D, Xavier M, Araújo T, Silva Jr. JA, 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) 26:85–94.

Pugliese LS, Medrado AP, Reis SRA, Andrade ZA. The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. *Pesqui Odontol Bras.* 2003;17(4):307-13.

Qi J, Fox AM, Alexopoulos LG, Chi L, Bynum D, Guilak F, Banes AJ. IL- 1 β decreases the elastic modulus of human tenocytes. *J Appl Physiol* 2006; 101: 189–195.

Reddy GK, Stehno-Bittel L, Enwemeka CS. Laser Photostimulation of Collagen Production in Healing Rabbit Achilles Tendons. *Laser Surg and Med.* 1998; 22:281–87.

Reitamo S, Remitz A, Tamai K. Interleukin-10 modulates type I collagen and matrix metalloprotease gene expression in cultured human skin fibroblasts. *J Clin Invest* 1994:2489–2492.

Reynolds NL, Worrell TW. Chronic Achilles peritendinitis:etiology, pathophysiology and treatment. *JOSPT.* 1991; 13 (4): 171-76.

Ricchetti ET, Reddy SC, Ansorge H, Zgonis MH, Van Kleunen JP, Liechty KW et al. Effect of interleukin-10 overexpression on the properties of healing tendon on a murine patellar tendon model. *J Hand Surg Eur.* 2008; 33A: 1843-52.

Rodrigues EM; Guimarães CS. Manual de Recursos Fisioterapêuticos.Revinter: Rio de Janeiro, 1998.

Ryan T, Smith RKW. An investigation into the depth of penetration of low level laser therapy through the equine tendon in vivo. *Irish Vet J.*2007; 60(5), 295-99.

Salate ACB, Barbosa G, Gaspar P, Koeke PU, Parizotto NA, Benze BG, et al. Effect of In-Ga-Al-P diode laser irradiation on angiogenesis in partial ruptures of Achilles tendon in rats. *Photomed Laser Surg* 2005;23:470-5.

Salomão O, Carvalho AE, Fernandes TD, Traldi Filho IH, Carvalho Neto J. Lesões tendíneas no pé e no tornozelo do esportista. *Rev Bras Ortop.* 1993; 28(10): 731-36.

Schawlow AL. Principles of laser. *J. Clin Laser Med Surg.* 1995; 13(3).

Silverman MN, Pearce BD, Biron CA, Miller AH. Immune modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis during viral infection. *Viral Immunol.* 2005;18(1):41-78.

Schulze-Tanzil G, Al-Sadi O, Wiegand E, Ertel W, Busch C, Kohl B, Pufe T. The role of pro-inflammatory and immunoregulatory cytokines in tendon healing and rupture: new insights. *Scand J Med Sci Sports.* 2011; 21: 337–351.

Skutek M, van Griensven M, Zeichen J, Brauer N, Bosch U. Cyclic mechanical stretching enhances secretion of Interleukin 6 in human tendon fibroblasts. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2001; 9: 322–326.

Sternberg EM. Interactions between the immune and neuroendocrine systems. *Prog Brain Res.* 2000; 122: 35-42.

Tallon C, Maffulli N, Ewen SW. Ruptured Achilles tendons are significantly more degenerated than tendinopathic tendons. *Med Sci Sports Exerc.* 2001; 33:1983-90.

Tsuzaki M, Bynum D, Almekinders L, Yang X, Faber J, Banes AJ. ATP modulates load-inducible IL-1beta, COX 2, and MMP-3 gene expression in human tendon cells. *J Cell Biochem* 2003; 89: 556–562.

Stheno-Bittel L, Reddy GK, Gun S, Enwemeka CS. Biochemistry and Biomechanics of healing tendon: Part I. Effects of rigid plastes casts and functional casts. *Med Sci Sports Exerc.* 1998; 30 (6) 788-93.

Vladimirov YA, Osipov AN, Klebanov GI. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. *Biochemistry*. 2004; 69 (1): 89-90.

Wangoo A, Laban C, Cook HT. Interleukin-10- and corticosteroid-induced reduction in type I procollagen in a human ex vivo scar culture. *Int J Exp Pathol*. 1997; 78:33–41.

Wojciak B, Crossan JF. The accumulation of inflammatory cells in synovial sheath and epitenon during adhesion formation in healing rat flexor tendons. *Clin Exp Immunol*. 1993; 93: 108–114.

Yang G, Im HJ, Wang JH. Repetitive mechanical stretching modulates IL-1 β induced COX-2, MMP-1 expression, and PGE2 production in human patellar tendon fibroblasts. *Gene* 2005; 363: 166–172.

Yeung CK, Guo X, Ng YF. Pulsed Ultrasound Treatment Accelerates the Repair of Achilles Tendon Rupture in Rats. *J orthop Res*. 2006.

ANEXOS

ANEXO A - PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA ANHANGUERA EDUCACIONAL S/A – CEUA/AESA



Anhanguera Educacional S.A.

Alameda Maria Tereza, 2000 - Valinhos - S/P - CEP: 13278-181 - (19) 3512-1700

www.unianhanguera.edu.br

0800 941 4444

GO: Anápolis • MS: Campo Grande, Dourados, Ponta Porã, Rio Verde • RS: Pelotas, Rio Grande • SP: Bauru, Campinas, Indaiatuba, Jacareí, Jundiaí, Leme, Limeira, Matão, Osasco, Piracicaba, Pirassununga, Rio Claro, Santa Bárbara d'Oeste, São José dos Campos, São Paulo, Sorocaba, Taubaté, Valinhos

Nome do Projeto: Análise do efeito do laser de baixa potência (660nm) em lesão cortante do tendão calcâneo comum de ratos Wistar

Pesquisador Responsável: Érica Martinho Salvador Laraia

Unidade: UNIDERP **Curso:** fisioterapia

2. PROJETO

Itens que devem ser avaliados	Atende	Não atende	Atende parcialmente
Descrição sucinta das justificativas e objetivos do projeto.	X		
Descrição de materiais e métodos (incluem Protocolos de anestesia, de eutanásia, caso seja realizada e de manutenção dos animais enquanto estiverem sob experimentação)	X		
Procedência dos animais	X		
Local de realização das várias etapas.	X		
Infra-estrutura necessária e concordância da instituição.	X		

3. PARECER DO RELATOR

X	Favorável
	Desfavorável
	De Recomendações – projeto deve ser alterado e novamente enviado ao CEUA para ver se recomendações foram atendidas antes da execução do mesmo.
	Solicitação de Novas Informações:

4. COMENTÁRIOS /RECOMENDAÇÕES/ SOLICITAÇÃO DE NOVAS INFORMAÇÕES

.Atende o que fora solicitado

5. PARECER DO CEUA

Observações:

Parecer **Favorável**

Pesquisa autorizada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Anhanguera Educacional S/A – CEUA/AESA - em ..05.... / ..07.... / ..10.... nº do parecer: 2-046/10.

Prof. Ms. Ricardo Nery Gallo
Coordenador do CEUA – Anhanguera Educacional