

**Rodrigo Labat Marcos**

**EFEITO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA (810 nM) NA  
TENDINITE INDUZIDA POR COLAGENASE EM TENDÃO  
CALCÂNEO DE RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo  
2010

**Rodrigo Labat Marcos**

**EFEITO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA (810 nM) NA  
TENDINITE INDUZIDA POR COLAGENASE EM TENDÃO  
CALCÂNEO DE RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Álvaro Brandão Lopes-Martins

São Paulo  
2010

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Candidato(a): Rodrigo Labat Marcos

Título da Tese: Efeito do laser de baixa potência (810nm) na tendinite induzida por colagenase em tendão calcâneo de ratos

Orientador(a): Dr. Rodrigo Álvaro Brandão Lopes Martins

A Comissão Julgadora dos Trabalhos de Defesa da **Tese de Doutorado**,  
em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou o(a)

Aprovado(a)

Reprovado(a)

**Examinador(a):** Assinatura.....  
Nome.....  
Instituição.....

**Examinador(a):** Assinatura.....  
Nome.....  
Instituição.....

**Examinador(a):** Assinatura.....  
Nome.....  
Instituição.....

**Examinador(a):** Assinatura.....  
Nome.....  
Instituição.....

**Presidente :** Assinatura.....  
Nome.....



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil  
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438  
e-mail: cep@icb.usp.br

## CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **106** nas fls. **20** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Rodrigo Álvaro Brandão Lopes Martins, Coordenador(a) da Linha de Pesquisa "***Efeito das terapias com óxido nítrico inalado e laser de baixa potência no modelo experimental de tendinite induzida por colagenase em ratos***" do qual participou(aram) o Pesquisador Marcelo Nicolas Muscará, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **29.11.2005**.

São Paulo, 30 de novembro de 2005.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima  
Vice-Coordenador em Exercício  
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. Patricia Castelucci  
Secretária Suplente da CEEA

*Dedico este trabalho:*

*À minha esposa, Gisele*

*À minha mãe, Elizabete*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pelos dons.

Ao Doutor Rodrigo Álvaro Brandão Lopes Martins, pela orientação, confiança, oportunidade e amizade.

Aos Doutores Lúcio Frigo, Sócrates Penna, Simone Teixeira pela assessoria na parte científica e pela amizade.

Ao Dr. Jacques Magdalou do Laboratoire de Physiopathologie et Pharmacologie et Ingénierie Articulaires.

Aos professores Dr. Marcelo Nicolás Muscará, Dr<sup>a</sup>. Maria Helena Catelli de Carvalho e Dr<sup>a</sup> Soraia K P Costa por permitir o uso do laboratório e dos aparelhos para as análises realizadas.

Aos amigos do laboratório de Farmacologia e Terapêutica Experimental e de outros laboratórios: Luciano Ramos, Rodney Capp Pallota, Ernesto César Leal Júnior, Maria Carla Petrellis, Patrícia Almeida, Rafael Paolo Rossi, Rodrigo Carvalho, Simone Teixeira, Vanessa Godoi, Carly Coelho, Eduardo Ekundi, Juliano Oliveira, Rosângela Reichler, Simone Bolonheis.

A secretária da Pós Graduação em Farmacologia: Selma Regina Malagueta Rigonati e a secretária do Departamento de Farmacologia: Julieta Aparecida Gomes dos Santos.

A bibliotecária do ICB I: Sra. Maria José, por toda atenção e orientação metodológica.

Ao CNPq e à FAPESP pelo apoio financeiro.

O todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

*Não deixe que a saudade sufoque, que a rotina acomode, que o medo impeça de tentar. Desconfie do destino e acredite em você. Gaste mais horas realizando que sonhando, fazendo que planejando, vivendo que esperando, porque, embora quem quase morre esteja vivo, quem quase vive já morreu. (Luiz Fernando Veríssimo)*

## RESUMO

MARCOS, R. L. **Efeito do laser de baixa potência (810nm) na tendinite induzida por colagenase em tendão calcâneo de ratos.** 111 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Instituto de ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Tendinopatias são distúrbios comuns com uma variedade de tratamentos e terapias e a Laserterapia aparece como uma alternativa no tratamento destas doenças. Nós investigamos os efeitos da irradiação laser no modelo de tendinite induzida por colagenase, em tendões calcâneo de ratos, verificando sua ação em importantes marcadores inflamatórios. **Métodos:** Foram utilizados ratos machos (Wistar) divididos em grupos: Salina e tendinite tratados com Diclofenado de Sódio ou Laser (1J, 3J ou 6J). A tendinite foi induzida por colagenase (100µg/tendão) sobre o tendão calcâneo que foi removido para análises. Foi verificada a expressão de COX-1, 2, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-10, MMP-3, 9 e 13 (RT-PCR), a produção de PGE2 (ELISA) e a expressão de NT, COX-2 e NK-1 (Western Blotting). **Resultados e discussão:** A laserterapia (810nm, 100mW, 3 J), utilizada no tratamento da tendinite induzida por colagenase em tendão calcâneo de ratos, foi eficaz na redução de importantes marcadores inflamatórios, tornando-se uma ferramenta promissora para o tratamento de lesões tendíneas.

**Palavras-chave:** Tendinite. Inflamação Aguda. Tendão calcâneo. Colagenase. Laser de baixa potência



## ABSTRACT

MARCOS, R. L. **Effect of the low level laser therapy (810nm) in the induced tendinitis by collagenase in aquilles tendon of rats.** 111 p. PhD.Thesis (Pharmacology) – Instituto de ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Tendinopathy is a common disease with a variety of treatments and therapies. Laser therapy appears as a alternative treatment. We research the effects of the laser irradiation in tendinitis model induced by collagenase injection on Achilles tendon rats, verified its action in important inflammatory markers. **Methods:** The male rats (Wistar) were used and divided in groups: Saline and tendinitis, treated with Sodium diclofenac or Laser (1J, 3J or 6J). The tendinitis was induced by collagenase (100µg/tendon) on the Achilles tendon which was removed for analyzes. The genic expression for COX-1, 2; TNF-α; TGF-β; IL-10; MMP-3, 9, 13 (RT-PCR); PGE2 production (ELISA kits) and NT, COX-2, NK-1 expression (Western Blotting) was measured. **Results and discussion:** The Laser therapy (810nm, 100mW, 3 J) used in the treatment of the tendinitis induced by collagenase in Achilles tendon in rats, was effective in the reduction of important inflammatory markers, becoming a promising tool for the treatment of tendon diseases.

**Word-key:** Tendinitis. Acute inflammation. Achilles tendon.Collagenase. Low intensity laser therapy

## LISTA DE ABREVIÇÕES

A – Área

AA – Ácido Araquidônico

ANOVA – Análise de Variância

AP – Fosfatase Alcalina

AsGaAl – Arsênio Gálio Alumínio

ATP – Adenosina Trifosfato

cDNA – DNA Complementar

COX – Ciclo-Oxigenase

DE – Densidade de Energia

DNase – Enzima catalizadora do Ácido Desoxirribonucléico

DP – Densidade de Potência

DPM – Desvio Padrão da Média

E – Energia

ELISA – Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

FP – Fibrinogênio Plasmático

HPETE – hydroperoxyeicosatetraenoic acids

HILT - High Intensity Laser Treatment

I.M – Via Intra-muscular

I.P – Via Intra-peritoneal

IL – Interleucina

JMT – Junção Músculo-tendínea

JOT – Junção Ósteo-tendínea

LASER – Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation

LBP – Laser de Baixa Potência

LILT - Low Intensity Laser Treatment

MMP – Metaloproteinase da Matriz

MPO – Mieloperoxidase

mW – MiliWatt

NF- $\kappa$ B – nuclear factor kappa beta

NK – Natural Killer

NK-1 – Neurocinina 1

nm– Namômetro

NT – Nitrotirosina

P – Potência

PAF – Fator de Ativação Plaquetária

PBS – Tampão Fosfato Salina

PGE2 – Prostaglandina E2

PMNs – Polimorfonucleares

RNA – Ácido Ribonucléico

RNAm – Ácido Ribonucléico mensageiro

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

SDS – Solução tampão Sódio Dodecil Sulfato

SP – Substância P

T – Tempo

TBSt – Tampão Tris Salina com Tween

TGF- $\beta$  – Fator Transformador do Crescimento -  $\beta$

TIMP – Inibidores de metaloproteinases do tecido

TNF- $\alpha$  – Fator de Necrose Tumoral

$\beta$ -actina – Anticorpo Policlonal

## LISTAS DE FIGURAS

Figura 1. Tendão calcâneo (Aquiles) de humano. (vista posterior). .....	19
Figura 2. Organização hierárquica da estrutura do tendão (das fibrilas de colágeno até o tendão propriamente dito). (KASTELIC et al. 1978). .....	20
Figura 3. Ultrassonografia da região tendínea (Calcâneo) antes (A) e após (B) atividade física.....	24
Figura 4. Esquema de grupos utilizados. ....	51
Figura 5. Equipamento Thera-lase e contentor para ratos, utilizados nas irradiações. ....	52
Figura 6. Seqüência de Primers utilizados na análise da Expressão de mRNA, pela técnica de RT-PCR em tempo real.....	55
Figura 7. Curso temporal do edema formado no tendão de ratos. (A) Edema: [peso úmido – peso seco]. (B) Edema formado pelo concentração de azul de Evans extravasado no tecido .....	59
Figura 8. Curso temporal da formação dos resíduos de nitrotirosina. Aumento do estresse oxidativo induzido por collagenase nos tendões de ratos.....	61
Figura 9. Curso temporal da expressão de COX-1 e COX-2 nos animais com tendinite. (A) Expressão gênica de COX-2, (B) Expressão gênica de COX-1.....	62
Figura 10. Edema formado através da diferença de massas inicial e final (A) e da concentração de azul de Evans no tecido (B). ....	64
Figura 11. Atividade da enzima Mieloperoxidase no tecido tendíneo 12 horas após indução do processo inflamatório (ELISA). ....	65
Figura 12. Formação dos resíduos de nitrotirosina 12 horas após indução da tendinite. Aumento do estresse oxidativo induzido por collagenase nos tendões de ratos e tratamento com Laser 810nm – 100mW. ....	66
Figura 13. Expressão protéica da enzima COX-2, 12 horas após a indução da tendinite.....	68
Figura 14. Expressão gênica de COX-2 em animais com tendinite. Material analisado 2 horas após a indução por collagenase. ....	69
Figura 15. Expressão gênica de COX-1 em animais com tendinite. Material analisado 2 horas após a indução por collagenase. ....	70

Figura 16. Expressão gênica de TNF- $\alpha$ em tendões calcâneo de ratos. Grupos: Controle (Salina) e tendinite, não tratado (ST) e tratado com Diclofenaco de Sódio (D) ou com Laser 810nm (1Joules e 3Joules).....	71
Figura 17. Expressão gênica de IL-10 em tendões calcâneo de ratos. Grupos: Salina (Controle) e tendinite sem tratamento (ST) ou tratado com Diclofenaco de Sódio (D) ou com Laser 810nm – 100mW nas energias de 1Joules ou 3Joules. ....	72
Figura 18. Expressão gênica de TGF- $\beta$ em tendões calcâneo de ratos. Grupos: Controle (Salina) e tendinite, não tratado (ST) e tratado com Laser 810nm (1J e 3J). .....	73
Figura 19. Expressão gênica de MMP-3 em tendões calcâneo de ratos. Grupos: Salina (Controle) e tendinite, sem tratamento (ST) e tratado com Diclofenaco de Sódio (D) ou com Laser 810nm (1Joules e 3Joules na potência de 100mW).....	74
Figura 20. Expressão gênica de MMP-9 em tendões calcâneo de ratos. Grupos: Salina (Controle) e tendinite, sem tratamento (ST) e tratado com Diclofenaco de Sódio (D) ou com Laser 810nm (1Joules e 3Joules na potência de 100mW).....	75
Figura 21. Expressão gênica de MMP-13 em tendões calcâneo de ratos. Grupos: Salina (Controle) e tendinite, sem tratamento (ST) e tratado com Diclofenaco de Sódio (D) ou com Laser 810nm (1 Joules e 3 Joules na potência de 100mW).....	76
Figura 22. Geração de PGE2 derivada de COX-1 (A) e derivada de COX-2 (B), 12 h após a indução da tendinite.....	77
Figura 23. Expressão protéica de NK1 em tendões de ratos 12 horas após a indução da tendinite. (A) Membrana representativa e (B) Gráfico da densitometria (relação NK1 / Tubulina).....	79
Figura 24. Resultados obtidos pelo tratamento com Laserterapia e Diclofenaco de sódio na tendinite induzida em ratos. ....	80

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
1.1	O Processo Inflamatório	15
1.2	Doenças músculo-esquelética e tendíneas	17
1.3	Anatomia do tendão saudável	18
1.4	Arquitetura interna dos tendões	20
1.4.1	Zona do Tendão	20
1.4.2	Fibrocartilagem	21
1.4.3	Fibrocartilagem mineralizada	21
1.4.4	Tecido Colágeno	21
1.5	Inflamação no Tendão	22
1.5.1	Atividade da Mieloperoxidase (MPO)	25
1.5.2	Fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ )	27
1.5.3	Interleucina IL-10	28
1.5.4	Fator transformador do crescimento (TGF- $\beta$ )	31
1.5.5	Metaloproteinases da Matriz (MMPs)	33
1.5.6	A Prostaglandina E2 (PGE2)	38
1.5.7	Receptores Neurocinina 1 (NK-1)	39
1.6	Tratamentos	41
1.7	Terapia Laser de baixa potência (LBP)	43
<b>2</b>	<b>HIPÓTESE</b>	<b>48</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>49</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>50</b>
4.1	Animais	50
4.2	Indução da Inflamação em Tendão Calcâneo de Ratos	50
4.3	Grupos Experimentais	51
4.4	Aplicação da Terapia com Laser de Baixa Potência (LBP)	52
4.5	Avaliação do Edema do Tendão – Diferença entre as massas.	53
4.6	Avaliação do Extravasamento Plasmático - Concentração de Azul de Evans no tecido	53
4.7	Análise de expressão gênica pela reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa em tempo real (real time RT-PCR)	54

4.8	Análise da Expressão Protéica de Ciclooxigenase (COX-1 e COX-2), de Neurocinina 1 (NK1) e de Resíduos de nitrotirosina (NT) por Western-Blotting. ..	56
4.9	Análise da atividade de Mieloperoxidase (MPO) .....	57
4.10	Análise da geração de PGE2 (in vitro).....	58
4.11	Análise Estatística:.....	58
5	RESULTADOS.....	59
5.1	Formação do edema – Curso temporal .....	59
5.2	Estresse oxidativo – Resíduos de Nitrotirosina (NT) – Curso temporal .....	61
5.3	Expressão Gênica de COX-1 e COX-2 – Curso temporal .....	62
5.4	Edema (diferença de massas e extravasamento plasmático) após tratamento com laser. ....	63
5.5	Atividade da Mieloperoxidase (MPO) na tendinite após tratamento com laser.....	65
5.6	Estresse oxidativo – Resíduos de Nitrotirosina (NT) e tratamento Laser ...	66
5.7	Expressão protéica de COX-2 e tratamento Laser .....	67
5.8	Expressão Gênica de COX-2 e tratamento Laser .....	69
5.9	Expressão Gênica de COX-1 e tratamento Laser .....	70
5.10	Expressão Gênica de TNF- $\alpha$ na tendinite e tratamento Laser .....	71
5.11	Expressão Gênica de IL-10 na tendinite e tratamento Laser .....	72
5.12	Expressão Gênica de TGF- $\beta$ na tendinite e tratamento Laser .....	73
5.13	Expressão Gênica de MMP-3 na tendinite e tratamento Laser .....	74
5.14	Expressão Gênica de MMP-9 na tendinite e tratamento Laser .....	75
5.15	Expressão Gênica de MMP-13 na tendinite e tratamento Laser .....	76
5.16	Efeito do laser de baixa potência sobre a Geração de PGE2 (in vitro) .....	77
5.17	Efeito do laser sobre a expressão protéica de NK-1 .....	78
5.18	Efeito do Laserterapia (810nm) em diferentes marcadores inflamatórios ..	80
6	DISCUSSÃO .....	81
7	CONCLUSÕES .....	93
	REFERÊNCIAS.....	94

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 O Processo Inflamatório

A reação inflamatória é o mecanismo fisiopatológico básico em resposta a diversas doenças sendo representada por um conjunto de reações locais e gerais do organismo. Ela é composta por uma série de fenômenos complexos que se associam e se complementam, formando uma reação em cascata, que envolve células inflamatórias, como: neutrófilos, linfócitos e monócitos/ macrófagos (TEDGUI e MALLAT, 2001).

A resposta inflamatória visa, em última instância, combater o agente agressor e eliminar produtos resultantes da destruição celular, promovendo condições ideais para a reparação do tecido lesado. Inicialmente, a defesa inata, não induzida, objetiva solucionar o problema, com a ativação do sistema complemento e pelos macrófagos residentes. No entanto, se o agente agressor não for neutralizado nessa etapa de defesa inicial, uma segunda via de resposta é induzida: a resposta inflamatória aguda ou defesa inata induzida (SIQUEIRA et al., 1997).

O processo inflamatório agudo é caracterizado pelos sinais cardinais clássicos calor, rubor, tumefação e dor, podendo levar a perda de função, num estágio crônico da doença. Isso ocorre devido ao aumento do fluxo sanguíneo, da permeabilidade vascular, do infiltrado de leucócitos e da liberação de mediadores inflamatórios.

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

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



Em geral, as alterações do fluxo e do calibre vascular iniciam-se rapidamente após a agressão e se desenvolvem em velocidades variáveis que dependem da capacidade lesiva do agente irritante, das características do tecido afetado, da espécie animal e da coexistência de estados patológicos (ALI et al.; 1997).

Os mediadores podem originar-se do plasma, das células ou possivelmente do tecido agredido. E podem ser divididos nos seguintes grupos:

- Aminas vasoativas: histamina e serotonina.
- Proteases plasmáticas:
  - O sistema (cinina bradicinina e calicreína);
  - O sistema complemento (C3a; C5a; C5b-C9);
  - O sistema coagulação-fibrinolítica (fibrinopeptídeos, produtos de degradação da fibrina).
- Metabólitos do ácido araquidônico (AA):
  - Via ciclooxigenase (endoperóxidos, prostaglandinas, tromboxano);
  - Via lipoxigenase (leucotrieno; HPETE; HETE).
- Constituintes lisossômicos (proteases).
- Radicais livres derivados do oxigênio.
- Fatores ativadores das plaquetas (PAF).
- Citocinas.
- Fatores de crescimento.

A presença de mediadores químicos no processo inflamatório faz com que a inflamação mantenha características uniformes, mesmo sendo produzida por diferentes irritantes.

As prostaglandinas, produtos do ácido araquidônico por ação das enzimas ciclooxigenases, são mediadores lipídicos que desempenham importantes papéis no processo inflamatório, e a interferência em sua síntese determina uma sensível redução nas alterações proporcionadas pela inflamação (BAKHLE et al., 1996). A inibição da síntese de prostaglandinas é o mecanismo de ação de muitos antiinflamatórios não-hormonais.

A inflamação crônica possui características singulares. O ponto fundamental da inflamação crônica está na presença de infiltrados celulares, por exemplo, células

mononucleares, principalmente macrófagos, linfócitos e plasmócitos; proliferação de fibroblastos e, em muitos casos, de pequenos vasos sanguíneos; aumento do tecido conjuntivo (fibrose); e destruição celular (COTRAN et al. 2000).

O estudo da reação inflamatória e o desenvolvimento de novas drogas ou terapias sempre dependeram da existência de modelos animais apropriados. Apesar da maioria das doenças inflamatórias severas apresentarem Nat.za crônica os modelos de inflamação aguda são importantes e necessários

## **1.2 Doenças músculo-esquelética e tendíneas**

Tendinopatias, osteoartrite e afecções dolorosas na coluna vertebral são os distúrbios músculo-esqueléticos mais comuns da sociedade moderna (FELSON et al., 2000; CARMONA et al., 2001; CHERRY et al., 2001). Para estas doenças, uma grande variedade de terapias e tratamentos está em uso atualmente, como: drogas aplicadas localmente ou por via oral, eletroterapias, técnicas de mobilização articular, cinesioterapia, terapias comportamentais e alternativas, (JOHANSSON et al., 1999; DEEKS et al., 2002; JORDAN et al., 2003).

Enquanto combinações de adaptações dos locais de trabalho, terapias com exercícios e tratamentos cognitivos parecem surtir bom efeito em longo prazo (BROX et al., 1999; MORLEY et al., 1999), intervenções com Fármacos Antiinflamatórios Não Esteroidais (DAINES), assim como injeções de fármacos esteroidais, são amplamente utilizadas para o alívio da dor em curto prazo (VAN DER WINDT et al., 1995; PILIGIAN et al., 2000). Os efeitos em curto prazo destas drogas foram estudados em culturas de células, modelos animais e estudos clínicos em humanos, e seus mecanismos se encontram hoje, razoavelmente bem entendidos. A magnitude de seus efeitos clínicos também é bem conhecida em condições agudas, mas os efeitos em longo prazo são investigados em menor extensão.

Uma importante meta-análise publicada no British Medical Journal, Bjordal et al. (2004) analisaram mais de 13.000 pacientes com doenças inflamatórias crônicas e a utilização de antiinflamatórios não esteroidais, incluindo fármacos de ação específica como os coxibs. Neste, os autores demonstraram que os fármacos

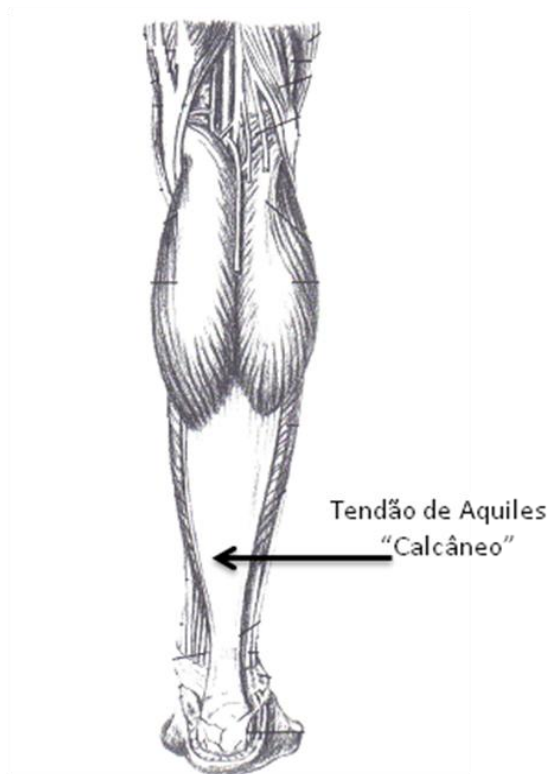
antiinflamatórios apresentam efeito similares ao placebo, não justificando o uso de tais fármacos nas referidas doenças. Este artigo suscitou grande polêmica na comunidade científica e não científica, a respeito de novas terapias que possam ser utilizadas em doenças inflamatórias, assim como, a comprovação de sua eficácia terapêutica.

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 (UEDA et al., 2008).

Sendo assim, a investigação de novas terapias para utilização em doenças inflamatórias crônicas, especialmente não farmacológica, assume papel de destaque na área médica. Neste cenário, a Laserterapia tem despontado como uma das grandes promessas para a clínica médica.

### **1.3 Anatomia do tendão saudável**

Tendões saudáveis apresentam coloração branca brilhante e textura fibroelástica, mostrando grande resistência a tensões mecânicas. Eles podem variar muito quanto à forma, e ainda quanto à maneira como estão ligados ao osso. Além disso, a junção miotendínea também mostra variações anatômicas entre diferentes músculos.

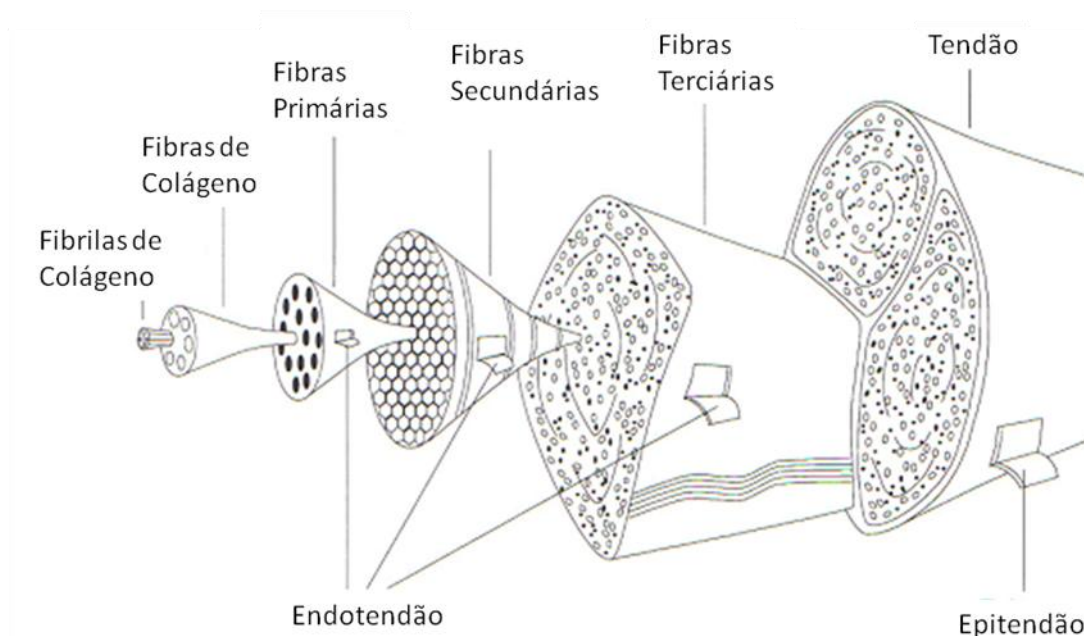


**Figura 1.** Tendão calcâneo (Aquiles) de humano. (vista posterior).

Tendões são estruturas anatômicas interpostas entre músculos e ossos (figura 1), que transmitem a força gerada no músculo para o osso, tornando possível o movimento articular (JÓZSA e KANNUS, 1997; KHAN et. al., 1999). Os elementos básicos dos tendões são fibras de colágeno, células e matriz extracelular, uma substância rica em proteoglicanas. O colágeno fornece a força tênsil ao tendão, enquanto a matriz fornece suporte estrutural para as fibras de colágeno e regula a transformação extracelular de pró-colágeno em colágeno maduro (ASTROM, 1997). Os tenoblastos, células achatadas e distribuídas entre as fibras de colágeno sintetizam tanto a matriz extracelular, quanto o pró-colágeno. O colágeno é arranjado hierarquicamente em níveis de complexidade crescente, começando com protocolágeno, fibras, fascículos, bandas terciárias e, finalmente, o tendão propriamente dito (JÓZSA e KANNUS, 1997; ASTROM, 1997; KHAN et al., 1999).

## 1.4 Arquitetura interna dos tendões

O tendão é completamente coberto pelo epitendão, uma camada fina de tecido conjuntivo contendo suprimentos nervosos, vasculares e linfáticos. O epitendão se estende profundamente no tendão, entre as bandas terciárias e o endotendão (figura 2). Mais superficialmente, o epitendão é envolvido pelo paratendão, um tecido conjuntivo areolar contendo basicamente fibrilas de colágeno (KVIST et al., 1985), algumas fibrilas elásticas e uma linha interna de células sinoviais (WILLIAMS, 1986).



**Figura 2.** Organização hierárquica da estrutura do tendão (das fibrilas de colágeno até o tendão propriamente dito).  
Fonte: Kastelic et al. (1978).

### 1.4.1 Zona do Tendão

Os autores Junqueira e Carneiro (2004) descrevem aspectos microscópicos do tendão. A parte tendínea da Junção Ósteo-Tendínea (JOT) consiste de bandas de colágeno densas com tenoblastos interpostos. As fibras de colágeno possuem de 10 a 55  $\mu\text{m}$  de diâmetro, com fibrilas de 25 a 100 nm de espessura. As fibrilas contêm material granular e filamentoso. Em algumas regiões, fibras elásticas

também podem ser encontradas. Em direção a camada de fibrocartilagem, a quantidade de matriz aumenta. Entre as fibrilas, uma grande quantidade de glicosaminoglicanas, especialmente condroitina sulfato, pode ser observada.

#### **1.4.2 Fibrocartilagem**

Vista sob o microscópio óptico, a transição entre o tecido do tendão para a fibrocartilagem é gradual. Esta zona é especialmente delgada em crianças, diferente dos adultos. Gradualmente estas células perdem sua aparência alongada e tornam-se arredondadas, e ficam parecidas com condrócitos.

#### **1.4.3 Fibrocartilagem mineralizada**

A Fibrocartilagem é separada da região mineralizada (calcificada) por uma borda distinta conhecida como linha azul, assim denominada devido à intensa afinidade da linha quando fixada e corada com hematoxilina e eosina, A transição para a fibrocartilagem mineralizada é abrupta. A largura da fibrocartilagem mineralizada é de 100 a 300  $\mu\text{m}$ . As células desta região são similares aos condrócitos da fibrocartilagem. Isto significa que muitas destas células permanecem vivas, embora estejam circundadas por tecido mineral. A degeneração celular, entretanto, não é um fenômeno raro. Ao mesmo tempo, a quantidade de condroitina sulfato é significativamente maior.

#### **1.4.4 Tecido Colágeno**

As fibras formadas por colágeno representam dois dos três principais tipos de fibras do tecido conjuntivo, as fibras colágenas e as reticulares. As fibras elásticas são formadas pela proteína elastina.

O colágeno é a proteína mais abundante do organismo, representando cerca de 30% do peso seco e pode ser classificado nos seguintes grupos: (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, ossos, dentina, derme e outros tecidos, está incluídos no 1º Grupo.

A síntese de colágeno foi primeiramente atribuída a uma variedade restrita de tipos celulares como fibroblastos, osteoblastos e condroblastos. Atualmente, existem evidências convincentes de que outros tipos celulares são capazes de sintetizar o colágeno (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

## **1.5 Inflamação no Tendão**

Historicamente, tendões são conhecidos como partes vulneráveis do corpo humano. Hipócrates reportou que se o tendão de Aquiles (calcâneo) fosse lesado, poderia causar febre aguda, convulsões, inconsciência e finalmente a morte. Felizmente, lesões no calcâneo nos dias de hoje não estão associadas com morte, mas algumas vezes podem causar condições crônicas dolorosas e de difícil tratamento.

No processo inflamatório crônico, ocorre o remodelamento da bainha tendínea e do tecido sinovial, enchendo o espaço sinovial de células inflamatórias. Estas alterações no tecido tendíneo conduzem a um distúrbio maciço do tendão, reduzindo sua funcionalidade. Outra complicação está no fato que os tendões usam suas extremidades para se ligarem em outras estruturas como ossos e cartilagens e uma vez alterado, este processo inflamatório pode migrar para outros tecidos iniciando um quadro pré-artrítico. Esta pode ser a explicação sobre como os tendões são as estruturas mais afetadas pela inflamação crônica e como a tendinite pode influenciar no aparecimento e evolução de doenças inflamatórias nos ossos e cartilagens (HAYER et al., 2007).

De maneira Geral, o tendão humano tem uma alta capacidade de suportar forças tensionais. Medições diretas em calcâneos humanos registraram forças de até 9 kN (correspondente a 12,5 vezes o peso corporal) durante uma corrida em velocidade de 6 m/s. Entretanto, hoje sabemos que a força máxima suportada desse tendão é uma variável bastante individual, indicando também uma faixa ampla de suscetibilidade a sobrecargas.

Dores crônicas nos tendões são relativamente comuns, especialmente considerando o tendão de calcâneo, o patelar e o do cotovelo (KVIST, 1994; ASTROM, 1997; MOVIN, 1998). Porém, a etiologia e a patogenia das tendinopatias não foram totalmente explicadas. Existe um grande número de sugestões quanto a fatores etiológicos, mas são poucas as comprovações científicas (ALFREDSON e LORENTZON, 2000).

A causa determinante mais comum da tendinite é o esforço exagerado de extensão sobre os tendões, ocorrendo distensão de suas fibras, que por não suportarem a tração mecânica, podem apresentar rupturas parciais desenvolvendo intensa e dolorosa reação inflamatória local (THOMASSIAN, 1996).

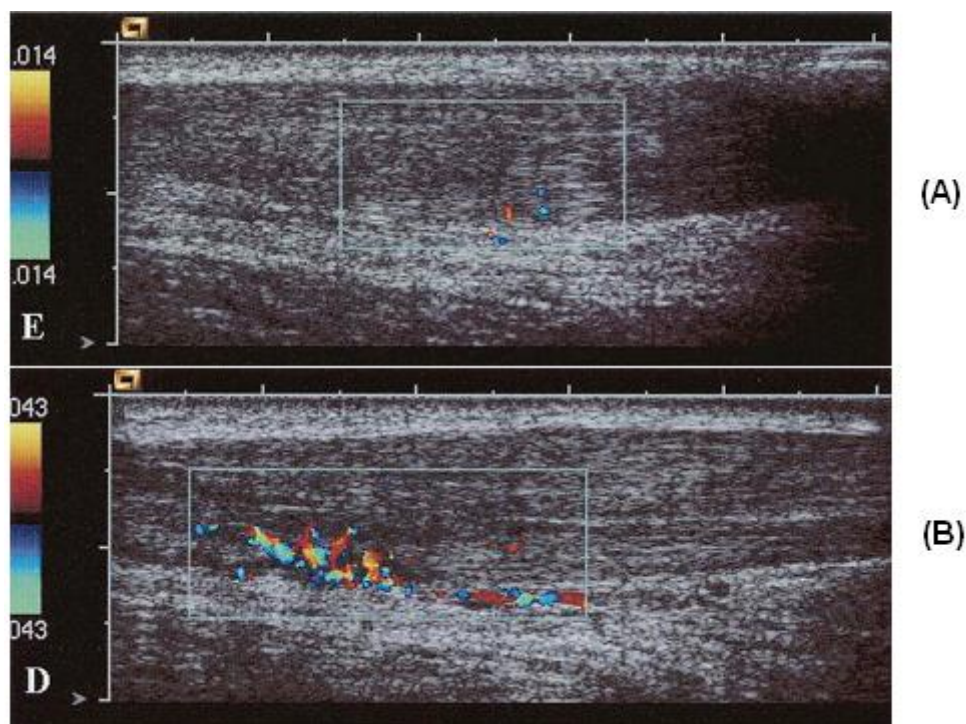
Além da sobrecarga mecânica conhecida como o principal fator causador dessas tendinopatias existem processos lesivos repentinos e o envelhecimento que também contribuem para a degeneração do tendão que pode ocorrer na ausência (tendinose) ou na presença (tendinite) de resposta inflamatória (SUN et al., 2008).

As rupturas do tendão 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. Congestão e acúmulo de fluidos ocorrem no local da agressão, podendo observar também isquemia e necrose de tenócitos. Esta necrose varia de acordo com o grau de comprometimento vascular (ALVES e MIKAIL, 2006).

Devido à baixa vascularização dos tendões, o processo inflamatório nestes tecidos tem gerado bastantes controvérsias devido a sua atipicidade. Em análise histológica, o tendão inflamado é caracterizado por um aumento de celularidade, deposição de substância proteoglicana e degradação da matriz extracelular, provavelmente pela presença de colagenases como MMP1 e MMP13 (FU et al., 2007).

Um resultado de nosso grupo de pesquisa (figura 3) identificou o aumento do fluxo sangüíneo intratendíneo após o exercício em pacientes com lesão parcial de tendão, representando um dos sinais clássicos do processo inflamatório, o qual não é comumente observado em estado de repouso.





**Figura 3.** Ultrassonografia da região tendínea (Calcâneo) antes (A) e após (B) atividade física.

Alguns trabalhos mostram a presença de alterações no tendão precedendo outras doenças como a Artrite reumatóide e Osteoartrite. Nestes casos, a mudança patológica inicial é apresentada pela migração de células inflamatórias para a região da bainha do tendão, direcionando para um estágio mais avançado da doença (HAYER et al., 2007).

O reparo do tecido tendíneo é complexo e a sobreposição sequencial das fases do processo inflamatório é uma etapa importante para a cura. Sem os estágios iniciais da inflamação, o processo de reparo do tecido pode não prosseguir normalmente. A exposição a algumas citocinas pró-inflamatórias como IL1 e TNF- $\alpha$  pode aumentar a expressão de TGF- $\beta$  em células endoteliais. IL1 e IL6 podem seletivamente induzir algumas isoformas de TGF- $\beta$  (FENWICK et al., 2001).

O tendão após a lesão apresenta alterações das propriedades mecânicas em comparação ao tecido normal. Após a cura, sendo a restauração da força mecânica o principal objetivo na cura do tendão. O remodelamento da matriz do tendão também é um fator importante para restaurar sua característica tênsil. Entre as várias substâncias encontradas na matriz extracelular dos tendões, as fibras de colágeno são as principais responsáveis pela força. Os colágenos I e III são

sintetizados para promover este reparo. As fibras de colágeno III são mais finas e extensíveis e possuem habilidade de dar forma rápida as ligações transversais da fibras de colágeno e durante o processo de cicatrização do tendão, aparecem de forma transitória, promovendo a estabilização do local da reparação. Porém, o aumento de colágeno tipo III pode causar uma redução da resistência a tração do tendão (HOU et al., 2009).

Na segunda parte do reparo, parte do colágeno tipo III é substituído pelo colágeno tipo I que aumenta as características tênsis do tendão. Alguns estudos mostram que o TGF- $\beta$ 1 consegue diminuir a expressão gênica de pro-colágeno tipo III e aumentar a expressão de procolágeno tipo I. Desta forma, a regulação entre o colágeno tipo III para o tipo I influenciaria na regulação das forças mecânicas do tendão (HOU et al., 2009).

Uma combinação de estudos biológicos, histológicos, bioquímicos e moleculares indicou que existe um equilíbrio entre a síntese e a degradação de componentes da matriz extracelular do tendão e este equilíbrio é interrompido durante lesões e nos processos inflamatórios do tendão, ocasionando alterações histológicas com ou sem presença de infiltrado inflamatório (CORPS et al., 2006; JONES et al., 2006).

Outros fatores da resposta inflamatória podem estar associados com o desenvolvimento de tendinopatia, como o aumento da expressão da ciclooxygenase-2 e alterações nos níveis de citocinas inflamatórias, entre elas a prostaglandina E2, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, detectadas na tendinite (FREDBERG e STENGAARD-PEDERSEN, 2008).

### **1.5.1 Atividade da Mieloperoxidase (MPO)**

A inflamação, tanto aguda como crônica, é caracterizada por alguns eventos, entre eles, a formação de exsudato de proteínas do plasma, o recrutamento de leucócitos e a ativação de células e de mediadores inflamatórios. Embora a inflamação seja essencial para os processos de reparo e defesa, quando não controlada, ela pode contribuir para a degradação e deficiência tecidual e promoção de um estado crônico (QUEIROZ-JUNIOR et al., 2009).

A migração leucocitária ocorre geralmente durante o processo inflamatório sendo caracterizado pelo acúmulo no tecido de células de defesa como leucócitos polimorfonucleares após o agente lesivo. Localmente, os neutrófilos liberam mediadores antimicrobiais e inflamatórios que atuam sinergicamente na proteção do tecido (MENEZES et al., 2002; MÜLLER 2002).

Os neutrófilos quando estimulados, secretam a enzima Mieloperoxidase (MPO) que é um componente ativo localizado nos grânulos das células polimorfonucleares, atuando como um mecanismo de defesa. Sua determinação é de grande importância no processo inflamatório por ser um indicador da presença e da atividade das células polimorfonucleares, sendo amplamente usado como um marcador inflamatório em circunstâncias agudas e crônicas, associados igualmente na severidade de muitas doenças (SCHIERWAGEN et al., 1990; FAITH et al.; 2008). O aumento da atividade desta enzima pode significar não só a implantação da inflamação ou infecção mas igualmente à degeneração tecidual no local da lesão (LEE et al., 1995; VAN DYKE et al., 2003). Em alguns modelos animais de indução da osteoartrite, o tecido inflamado pode apresentar atividade de MPO aumentada (MARCINKIEWICZ et al., 2004). A atividade de MPO também é aumentada no modelo de periodontite crônica, quando comparados com animais saudáveis (WOLFF et al., 1988; YAMALIK et al., 2000). Porém, em algumas análises histológicas, o índice elevado de MPO pode não correlacionar com a presença de células inflamatórias (Pacheco et al., 2007; QUEIROZ-JUNIOR et al., 2009).

O tratamento com o uso de anti-inflamatórios podem reduzir os níveis de MPO no tecido (CARTER et al., 1999; QUEIROZ-JUNIOR et al., 2009). Em modelo de artrite antígeno induzida, o tratamento com indometacina e dexametazona reduziu a atividade da MPO, junto à redução do edema e do infiltrado inflamatório (KUWABARA et al., 2002). A utilização de peptídeos no tratamento de lesões do tendão em modelos animais também reduziu a atividade da Mieloperoxidase junto a redução do infiltrado inflamatório (KRIVIC et al., 2008)

### 1.5.2 Fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ )

O fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) é uma citocina pleitrópica relacionada tanto na sobrevivência e proliferação celular como na morte celular no processo apoptótico. Esta citocina também é distribuída e expressa em tenócitos em condições inflamatórias onde a apoptose e a proliferação celular é acentuada (HOSAKA et al., 2005).

O TNF- $\alpha$  é considerado uma citocina chave na origem de várias doenças osteomusculares, como Artrite Reumatóide, Osteoartrite e Tendinite (HAYER et al., 2007), porém, seu papel na doença do tendão ainda não foram bem determinada. Sabe-se que em tendões de equinos, o TNF- $\alpha$  pode apresentar ações anti-apoptóticas e apoptóticas, controlando o número de células, sendo um fator importante no progresso de degeneração do tecido tendíneo (HOSAKA et al., 2005).

Os tendões são bastante afetados pela inflamação também por estarem sujeitos a forças específicas e cargas mecânicas prolongadas (HAYER et al., 2007). Nestas condições patológicas, o tecido tendíneo pode apresentar aumento dos receptores de TNF- $\alpha$  (R1 e R2) (HOSAKA et al., 2005).

Os níveis de TNF- $\alpha$  são aumentados nos tecidos músculo-tendíneos, em situações pós traumáticas (ELSAID et al., 2008). As cirurgias de tendão, cartilagem e osso é outro fator que pode dar início a um processo inflamatório. Após uma lesão, seja por um acidente ou por uma intervenção médica, os níveis de citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL são aumentados (AKESSEN et al., 2009).

Os tendões são cercados pelo tecido sinovial e suas bainhas apresentam uma composição similar a este tecido. Durante um quadro inflamatório, esta região pode apresentar acúmulo de líquidos (edema), desorganização nas fibras de colágeno e aumento de células inflamatórias como granulócitos e macrófagos, células encontradas na fase inicial do processo inflamatório, sendo o primeiro evento patológico induzido pelo aumento da expressão de TNF- $\alpha$ . A inflamação pode não ficar restrita ao tendão, se espalhando para tecidos vizinhos como ossos e cartilagens, ligados diretamente a ele (HAYER et al., 2007).

O TNF- $\alpha$  também pode induzir a liberação de MMPs. Esta associação da presença de TNF- $\alpha$  com a produção de enzimas colagenases MMPs (Matriz Metaloproteinase) está relacionada com a degradação da matriz extracelular. As

MMPs são enzimas geralmente liberadas de condrócitos, fibroblastos, leucócitos e outras células sinoviais. Em situações de homeostasia, existe um equilíbrio entre os níveis de MMPs e de seu inibitor, as TIMPs e este equilíbrio tem um importante papel tanto na regeneração e recuperação tecidual como na remodelagem tecidual. O aumento da TIMP ajuda a suprimir os efeitos negativos da atividade proteolítica das MMPs (AKESEN et al., 2009). Atualmente estas enzimas fazem parte de um grande número de publicações relacionadas principalmente com alterações em tendões e cartilagens.

### **1.5.3 Interleucina IL-10**

Após a lesão do tendão, o organismo inicia uma série de eventos para o promoção do reparo tecidual que pode ter como resultado a alteração do tecido e formação de cicatriz (LIN et al., 2006). A cicatriz inicialmente fornece a continuidade física do tecido, porém pode provocar a formação de tecidos adjacentes indesejáveis, impedindo o mecanismo de deslizamento do tendão (BEREDJIKLIAN et al., 2003). Já a inflamação intensa, com grande migração leucocitária e formação de citocinas pró inflamatórias também promoveria a alteração do tecido, pelo aumento de fibroblastos e possível mudança da matriz extracelular (LIECHTY et al., 2000). Uma maneira de reduzir estas alterações seria controlar o processo de cicatrização pela modulação do processo inflamatório e dos níveis de citocinas anti e pró-inflamatórias envolvidas no reparo (RICCHETTI et al., 2008). Entre estas citocinas, as interleucinas teriam um papel importante na modulação da inflamação do tendão (LIN et al., 2006).

No processo inflamatório agudo do tendão, observamos um aumento expressivo de granulócitos e neutrófilos na bainha sinovial do tendão, geralmente ativados pelo aumento de IL1 e IL6. A presença destas duas citocinas esta diretamente relacionada a progressão da tendinite (HAYER et al., 2007).

Algumas interleucinas apresentam um papel importante no reparo tecidual por estarem relacionadas a modulação do processo inflamatório. IL4 e IL10 são igualmente citocinas antiinflamatórias e parecem acelerar o processo de cicatrização com redução da inflamação e manutenção das propriedades mecânicas e

histológicas, ao contrário das interleucinas pró inflamatórias (IL-1, IL-6 e IL-8) que prejudicariam o reparo tecidual (LIN et al., 2006; RICCHETTI et al., 2008).

A IL-10 foi identificada inicialmente por Mosmann et al. (1989), sendo reconhecida por sua atividade antiimunológica e antiinflamatória. Desde sua descrição, a lista de células produtoras de IL-10 se expandiu rapidamente assim como o número de células que são capazes de responder a essa citocina (MOSSER et al., 2008). A IL-10 também é conhecida por inibir a expressão de IL-6 e IL-8 e a migração de células inflamatórias no local da lesão incluindo macrófagos e monócitos (ALAM et al., 1994; RICCHETTI et al., 2008).

O gene da IL-10 é transcrito por uma variedade de células, incluindo células T, células B, NK, monócitos e macrófagos. Alguns subgrupos de células T, monócitos e macrófagos, granulócitos (eosinófilos e mastócitos) e outras células quando estimuladas de forma adequada são capazes de expressar IL-10. Entre seus receptores, o IL-10 R1 é encontrado em células hematopoiéticas, fibroblastos e células epiteliais, apresentando maior afinidade a citocina que seu outro receptor IL-10 R2, encontrado na maioria das células (MOSSER et al., 2008).

Durante a inflamação, o TNF- $\alpha$  pode estimular a expressão de IL-1 e reduzir a expressão de IL-4. Ao contrário, em eventos antiinflamatórios, níveis de IL-10 e IL-13 aparecem aumentados (LEONARDI et al., 2003). Neste caso, o IL-10 pode ter efeito compensatório caso haja redução de IL-4, reduzindo a inflamação e conduzindo a formação de um colágeno mais organizado (LIN et al., 2006). A IL-10, junto com outras citocinas (IL-4 e IL-13) compartilham muitas atividades funcionais, como a supressão de eventos pró-inflamatórios, pela inibição de IL-6 (LIN et al., 2005). IL10 também regula os níveis da citocina pró-inflamatória IL12 (RYAN et al., 2005).

Alguns estudos tem demonstrado diferenças na sinalização de IL-10 e de IL-6 e que o tratamento com IL-10 poderia diminuir a ativação de NF-kb e inibir sua translocação para o núcleo, pela subunidade p65. A inibição de NF-kb pelo IL-10 explicaria também a redução da sensibilidade de alguns genes relacionados a resposta imune após tratamento com IL-10 e a inibição da p65 pode explicar a capacidade de IL-10 em inibir genes inflamatórios (DRIESSLER et al., 2004; MOSSER et al., 2008).

A IL-10 possui uma importante função biológica de inibir a maturação e a diferenciação de células dendrítica em monócitos e de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias por estas células e pelos macrófagos. As principais citocinas

inflamatórias como IL-1, IL-6 e IL-12 e ainda o TNF- $\alpha$  são reprimidas drasticamente após exposição à IL-10 que pode ainda inibir a inflamação, aumentando os receptores antagonistas de IL-1 pelos macrófagos (MOSSER et al., 2008).

Existe evidências de que a IL-10 possui um papel antiinflamatório durante a gravidez, por estar presente no líquido amniótico, impedindo respostas imunes e inflamatórias ao feto (CADET et al., 1995; GORDON et al., 2008). No tecido cutâneo, animais knockout para IL-10 apresentaram redução do reparo tecidual com aumento na formação da cicatriz. Em outro estudo, animais que sofreram lesões no tendão e foram tratados com IL-10 apresentaram suas propriedades mecânicas melhoradas, semelhantes ao grupo controle (RICCHETTI et al., 2008).

A MMPs também podem ser inibidas no tratamento com IL-10 e aumentadas na presença de IL1 e IL6, significando um aumento do quadro inflamatório e progressão da doença (HOSAKA et al., 2005).

Estudos com camundongos geneticamente modificados para IL-10 demonstraram a importância desta citocina na limitação de patologias auto-imunes. Doses de LPS que seriam subletais e infecções bacterianas e parasitárias que são auto-suficientes, geralmente levam estes animais deficientes de IL-10 à morte. Outros modelos de artrite reumatóide e inflamação de intestino, a doença é drasticamente agravada. Ao contrário, o fornecimento de IL-10 como terapia no tratamento de diversos tipos de colites, utilizando para isso, alguns modelos com bactérias fornecedoras de IL-10, modificação genética e nanopartículas, tem apresentado resultados motivadores (GAZZINELLI et al., 2000; BHAVSAR et al., 2008 ; MOSSER et al., 2008).

Porém, foi observado que tratamentos com altas doses de IL-10 em humanos pode estimular a produção de citocinas inflamatórias. Os estudos para a utilização terapêutica de IL-10 em doenças auto-imunes e inflamatórias tem aumentado, porém o fornecimento desta citocina nos locais de inflamação sem afetar outras atividades imunológicas, ainda é um grande desafio (LAUW et al., 2000; MOSSER et al., 2008).

#### 1.5.4 Fator transformador do crescimento (TGF- $\beta$ )

As lesões do tendão (tendinopatias) são frequentemente crônicas e ocorrem geralmente na fase adulta. Esta degeneração está associada a esforços repetitivos com presença de microtraumas e falha no mecanismo de reparo (FENWICK et al., 2001).

As tendinopatias afetam grande parte dos atletas, onde as lesões são comuns e o tratamentos ainda pouco eficazes (SCHNABEL et al., 2006).

O processo inflamatório do tendão é pouco evidente quando comparado a outros tecidos e seu reparo exige um controle coordenado nas sucessivas fases do processo inflamatório, incluindo o recrutamento de células, proliferação celular, síntese e remodelamento da matriz celular. Conseqüentemente, a falha em qualquer destas fases pode dar início a tendinopatia (FENWICK et al., 2001).

Durante o reparo tecidual, o processo inflamatório no tendão lesionado não desaparece totalmente, iniciando um quadro de tendinose, onde a inflamação ainda existe, porém não é claramente detectada. Nestes casos, a tendinite pode apresentar características de doença crônica. O crescimento de células tendíneas junto à reorganização do tecido podem indicar a presença de fatores de crescimento. Neste caso, o aumento da expressão de TGF- $\beta$  na fase inicial do processo inflamatório estaria, pelo menos em parte, envolvido na síntese de matriz extracelular e no reparo do tendão (CHEN et al., 2004).

Existem 3 isoformas de TGF- $\beta$  (b1, b2 e b3) que são expressas em diferentes tecidos, incluindo músculos e ossos e apresentam aparentemente papel semelhante, porém seu mecanismo ainda não é bem compreendido. Sabe-se que o TGF- $\beta$  apresenta uma forma latente (100kDa) e possui um segmento proteolítico (25kDa) que age em seus receptores (TGF- $\beta$  RI e TGF- $\beta$  RII) (FENWICK et al., 2001). O TGF- $\beta$  necessita da presença destes receptores (RI e RII) para a propagação de seu sinal. Conseqüentemente, a falta ou baixos níveis de receptores podem reduzir ou impedir sua ação (LAIHO et al 1990; WRANA et al 1994).

Os receptores de TGF- $\beta$  não são expressos em circunstâncias normais e em tendões chegam a níveis indetectáveis. A presença de tensões mecânicas pode ser um estímulo para o aumento destes receptores. Em tendões de coelhos lesionados, as 3 isoformas do receptor de TGF- $\beta$  foram aumentadas durante o



processo de reparo e na cirurgia óssea, permanecendo elevados 56 dias após a lesão (SCHNABEL et al., 2006).

Ao contrário, a perda da tensão do tendão em situações patológicas como em tendinoses, onde existe microtraumas e lesões crônicas, poderia ser uma fator para a redução da expressão destes receptores (FENWICK et al., 2001).

A proliferação celular e a biosíntese crescente de matriz extracelular e de colágeno (I e III) são cruciais para o retorno da força tensil do tendão. Na patologia humana do tendão, alterações nos níveis de TGF- $\beta$  no tecido conjuntivo em cicatriz e quelóides podem alterar a força motriz do tecido, atuando como um agente exógeno na aceleração do reparo tecidual (FENWICK et al., 2001).

Entre as três isoformas de TGF, o b1 pode ser expresso nos vasos sanguíneos e em tecido conjuntivo, na cicatriz, quelóides e escaras (LEE et al., 1999), o b2 é mais expresso em tendões e o b3 em vasos sanguíneos (GOLD et al., 1997). Em relação aos receptores de TGF- $\beta$ , o RII, expresso em tenócitos, aparecem aumentados durante o processo inflamatório e sua expressão pode ser reduzida com a idade. Assim, TGF- $\beta$ 1 e  $\beta$ 2 estão bastante relacionados com o reparo tecidual na tendinite (FENWICK et al., 2001).

A expressão gênica e protéica de TGF- $\beta$ 1 é aumentada no reparo tecidual após dilaceração aguda do tendão sendo também relacionado com a condrogênese e osteogênese e pode ter um papel importante na mudança condrogênica durante a degeneração de tendões humanos (CHANG et al., 1997).

TGF- $\beta$  é considerado um protagonista na cura de feridas apresentando outras funções como recrutamento de fibroblastos e macrófagos. Ele também consegue estimular a mitogênese de tenócitos, a síntese de matriz extracelular e de colágeno I e III (SCHNABEL et al., 2006).

Na tendinose pode ocorrer aumento da expressão de COX-2 e PGE2 junto com o aumento de TGF- $\beta$ . Porém, neste caso foi observado a interrupção das fibras de colágeno na matriz. O depósito excessivo de colágeno e proteoglicanas também está presente na tendinose.

Em experimentos com tenócitos de coelhos "*in vitro*", o TGF- $\beta$  (b2, b3 e principalmente b1) aumentou a produção de colágeno tipo I e III sendo maior em tenócitos imaturos que em tenócitos maduros, sugerindo um papel importante da idade celular na produção de colágeno e no potencial de reparação do tendão. Assim, o aumento na produção de colágeno pode ser idade-dependente e dose-

dependente, sendo maiores em células imaturas onde as concentrações de TGF- $\beta$ 1 variam de 1 à 200ng/ml (SCHNABEL et al., 2006).

Atualmente especialistas buscam técnicas que acelerem o reparo do tendão, controlando o processo inflamatório, a dor e também restaurando suas propriedades mecânicas iniciais (HOU et al., 2009). Neste sentido, o TGF- $\beta$  vem se destacando pelo seu importante papel na patologia do tendão (ROLF et al., 2001; NEUWIRTH et al., 2006).

A presença de forças mecânicas no tendão pode ser um dos fatores reguladores da expressão gênica de metaloproteinases. (LAVAGNINO et al., 2003; LEE et al., 2005). O TGF- $\beta$  pode inibir a atividade de metaloproteinases e de outras substâncias responsáveis pela redução na produção de matriz intracelular (SCHNABEL et al., 2006). O TGF- $\beta$  também pode ser usado como terapia para promover o reparo do tendão (CHEN et al., 2004). Terapias recentes usam injeções de TGF- $\beta$ 1 no tratamento de tendinites. Em cultura de células do epitendão e do endotendão cultivadas separadamente, foi possível observar o aumento da expressão de procolágeno I e III. O TGF- $\beta$ 1 é capaz de acelerar a síntese de colágeno, a formação dos ligamentos transversais de colágeno e a remodelação da matriz do tendão, melhorando assim, as propriedades mecânicas do tendão. Também consegue aumentar a expressão de colágeno tipo III, nas fases iniciais do reparo tecidual, sendo reduzido após 3 a 4 semanas da lesão, provavelmente pelo aumento da expressão de colágeno tipo I (HOU et al., 2009).

### **1.5.5 Metaloproteinases da Matriz (MMPs)**

As tendinopatias embora sejam comuns, são difíceis de serem tratadas. Alguns tratamentos para conter o processo inflamatório parecem não apresentar bons resultados, uma vez que na maioria delas, dificilmente consegue-se caracterizar o infiltrado inflamatório. Uma das formas do tecido tendíneo responder a doença é alterando a expressão de algumas enzimas de degradação, como collagenases e citocinas inflamatórias que pode levar à degeneração do tecido e a perda da integridade mecânica (NAKAMA et al., 2006; SCOTT A et al., 2007; SUN et al., 2008).

Os processos inflamatórios, fisiológicos ou patológicos, são dependentes de múltiplos fatores e as Metaloproteinasas da matriz (MMPs) contribuem em geral para este processo, modulando os mediadores inflamatórios tais como citocinas e quimiocinas e regulando o movimento de leucócitos no local da lesão. Alguns trabalhos mostraram que as MMPs podem promover ou reprimir a inflamação a partir de processos proteolíticos diretos, ativando, inativando ou alterando a função de quimiocinas e citocinas (MCQUIBBAN et al., 2000; MANICONE et al., 2008).

As MMPs são enzimas de ação proteolítica e possuem um importante papel na modulação da matriz extracelular do tendão, entretanto o mecanismo desta modulação ainda permanece obscuro (UEDA et al., 2008). Estas enzimas 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, assim como a interação entre células, quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento, apresentando um papel crucial em muitos processos fisiológicos e em muitas condições patológicas (MCCAWLEY et al., 2001; VANLINT et al., 2007).

A primeira metaloproteinase descrita foi a MMP-1, em 1962, por Gross e Lapiere, ao estudar como os tadpoles “girinos” perdiam suas caudas e a partir daí, a família das MMPs se expandiu gradualmente chegando a mais de 20 tipos (LOHI et al., 2001; VANLINT et al., 2007). 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 (UEDA et al., 2008). O aumento da expressão de MMP foi observada 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 (PARKS et al., 2004; MANICONE et al., 2008).

O tendão doente apresenta uma expressão gênica aumentada de colágeno tipo I e III enquanto que a matriz extracelular apresenta expressão aumentada de colágeno tipo III. Os níveis de fibronectina e tenascina C também estão aumentados e este quadro pode estar relacionado a resposta de cura do tendão. O aumento de glicosaminoglicanas e proteoglicanas também pode consistir na resposta adaptativa do tendão à sobrecarga. Ocorrem também mudanças na expressão e na atividade de várias metaloproteinasas e conseqüentemente, em seus inibidores de

metaloproteinases no tecido (TIMPs) (RILEY, 2008). Trabalhos recentes mostraram um aumento de MMPs em situações de tendinopatias, particularmente por collagenases (MMP-1, MMP-8 e MMP-13) e gelatinases (MMP-2, MP-9), representando um importante fator no processo patológico do tendão ocasionando o aumento do tempo de recuperação de determinados pacientes (FU et al., 2002; ORCHARD et al., 2008)

As MMPs podem controlar indiretamente o influxo de células inflamatórias através das quimiocinas. A degradação da matriz extracelular pelas MMPs promove um forte sinal quimiotático e estimula a progressão do processo inflamatório. Porém o aumento da inflamação não ocorre somente pela ação das quimiocinas. Algumas MMPs (MMP-1, MP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-12, MMP-14, MMP-17) podem aumentar a liberação de TNF- $\alpha$  pela célula. A MMP-3 e MMP-9 também pode estimular a ação de IL-1 $\beta$ , influenciando no aumento da inflamação (SCHONBECK et al., 1998; VANLINT et al., 2007).

A degradação da matriz extracelular também pode alterar o diâmetro das fibras, conduzindo ao enfraquecimento das fibras de colágeno, à inflamação e aumentando as chances de ruptura do tendão. Desta forma, a supressão de algumas MMPs poderia auxiliar no reparo do tendão (UEDA et al., 2008). Tanto no ser humano como em outros animais com tendinopatias, a MMP-13 poderia apresentar uma ação comparável a MMP-1, e seu aumento poderia significar uma maior degradação da matriz extracelular (SUN et al., 2008).

Em tendões de ratos, a expressão de MMP-13 foi aumentada após a ruptura do tendão. Os processos celulares e moleculares ainda não são bem conhecidos, mas estes estudos indicam que as MMPs podem mediar, pelo menos em parte as mudanças sofridas na composição da matriz extracelular durante a lesão e no reparo (RILEY, 2008). Outras MMPs como MMP2, MMP3 e MMP9 pode estimular a produção de TNF- $\alpha$  e IL-1b (HARO et al., 2000; MANICONE et al., 2008).

Algumas MMPs como a MMP-2 são conhecidas pela capacidade de inativar algumas quimiocinas pela produção de poderosos antagonistas, podendo também apresentar um efeito anti-inflamatório, influenciando no recrutamento celular, alterando a resposta inflamatória (DEAN et al., 2007; VANLINT et al., 2007). Outras MMPs, ao contrário, podem potencializar a reação inflamatória. Alguns exemplos como a MMP8, MMP9, MMP13 e MMP14 podem aumentar a atividade biológica destas quimiocinas pela fragmentação destas moléculas, produzindo segmentos

menores com efeito quimiotáxico ou agindo em conjunto com citocinas inflamatórias como IL-8, prolongando a atividade biológica e realçando a resposta neutrofílica (GOGER et al., 2002). Este conceito, de que as MMPs podem aumentar a ação de quimiocinas, podem ter um sério impacto na progressão de diversas patologias relacionadas com neutrófilos e outras células polimorfonucleares. A MMP-9 pode promover a migração de neutrófilos e eosinófilos em modelos de asma e a MMP-3 pode facilitar indiretamente a migração de neutrófilos em condrócitos (WARNER et al., 2001; VANLINT et al., 2007).

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 (PARKS et al., 2004; VANLINT et al., 2007). 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 quimiotáxicas participam da atração destas células no local da lesão, influenciando na resposta inflamatória. As quimiocinas também apresentam um efeito quimiotáxico eficaz por se aderirem na matriz extracelular e na superfície da célula (GOGER et al., 2002; VANLINT et al., 2007).

A atividade das MMPs é regulada durante sua transcrição, ativação e inibição, podendo ser detectadas em situações de reparo e nos processos patológicos, alterando seu nível de expressão nos processos inflamatórios e degenerativos e apesar de sua importante ação proteolítica durante estes processos, sua inibição, pelas TIMPs podem causar síndromes osteomusculares semelhantes as tendinopatias e reduzir significativamente as propriedades mecânicas dos tendões (MCCAWLEY et al., 2001; JONES et al., 2006; RILEY, 2008).

Em casos de osteodistrofia, artrite reumatóide e tendinopatias, a IL-1b seria o principal mediador inflamatório responsável pela indução de algumas MMPs, como MMP-1, MMP-3 e MMP-13 e em lesões específicas do tendão, os níveis de MMP-13 também aparecem aumentados. Outro trabalho in vitro, mostrou que MMP-13 é em parte dependente do aumento de IL-1b e que estratégias de inibição de determinadas MMPs poderia ser uma boa opção para reduzir a degeneração da matriz extracelular nas tendinopatias (ARCHAMBAULT et al., 2001; HERNANDEZ et al., 2006; SUN et al., 2008).

As MMPs podem alterar a atividade biológicas das citocinas através de processos proteolíticos, aumentando tanto os níveis de IL-1 como seu receptor IL-1RII (BELLEHUMEUR et al., 2005). Mesmo na ausência de células inflamatórias durante a lesão do tendão, pode haver a presença de mediadores inflamatórios nas tendinopatias. Os níveis de prostaglandina E2, tromboxano, bradicinina e interleucina (IL-6) mostram-se aumentados durante a tendinite com sinais dolorosos. A COX-2 e o fator de crescimento TGF- $\beta$  também aparecem aumentados na tendinopatia patelar e nos processos dolorosos do tendão pode haver aumento de substância P. Algumas MMPs (MMP-2, MMP-3, MMP-9) podem tanto estimular a liberação de TGF- $\beta$  latente como reduzir sua produção (VANLINT et al., 2007). Contudo, estas alterações podem fazer parte da resposta do tecido tendíneo no processo de reparo do tendão (LANGBERG et al., 2002; BURSSSENS et al., 2005; RILEY, 2008).

Outro estudo mostrou que não somente a IL-1 $\beta$  como o TNF- $\alpha$  podem aumentar a expressão de MMP-13 em modelos de tendinite. Porém esta metaloproteinase também aparece expressa em células de tendões saudáveis, sugerindo a participação de MMP-13 na manutenção da homeostasia da matriz extracelular do endotendão (NOMURA et al., 2007).

As MMPs podem promover a abertura de barreiras endoteliais pela sua ação proteolítica, sendo um mecanismo que permite a passagem de proteínas do plasma e de células inflamatórias. Animais deficientes de MMP9 podem desenvolver sepses e o envelhecimento também pode reduzir a habilidade dos tenócitos em remodelar e reparar os tendões (RENCKENS et al., 2006). Inibidores de MMPs podem melhorar em 69% os casos de tendinopatias porém os efeitos colaterais podem ser elevados, sendo indicado para o tratamentos crônicos, onde outras terapias não apresentaram sucesso (ORCHARD et al., 2008).

O desenvolvimento de novos tratamentos e terapias para as tendinopatias são tão importantes quanto a prevenção da doença. Ainda é necessário definir inteiramente 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 (RILEY, 2008).

### 1.5.6 A Prostaglandina E2 (PGE2)

As inflamações do tendão são consideradas como um grave problema para seres humanos e animais, pela dificuldade de cura e pelo processo doloroso que ela causa, com redução de movimento e do desempenho (MURRAY et al., 2001). O uso excessivo dos tendões podem danificar o tecido, provocando morte celular, aumentando a atividade de colagenases induzindo respostas bioquímicas como a produção de prostaglandina E2 (DEVKOTA, 2007).

A PGE2 é um mediador inflamatório com importantes ações no tendão. A ciclooxigenase é a primeira enzima no caminho de conversão do Ácido Araquidônico em Prostaglandina. A produção de PGE2 via COX-2 é regulada nas regiões onde o processo inflamatório foi instalado e sua produção está associada diretamente a geração de dor (LIPSKY et al., 1999; NARUMIYA et al., 1999).

A aplicação de tensões no tendão humano, durante o exercício pode alterar a concentração intersticial de PGE2 e seus níveis podem aumentar cerca de 2,5 vezes, durante atividade física intensa (KJAER, 2009). Seus níveis também são aumentados após o exercício de tensão repetitivo com carga nos tendões patelar e calcâneo e em cultura celular de tendão, o aumento de PGE2 pode reduzir significativamente a proliferação das células indiferenciáveis no tecido tendíneo e acelerar a diferenciação destas células para adipócitos e osteócitos, reduzindo o número de tenócitos. Este estudo sugere que níveis elevados de PGE2 no tecido tendíneo estimulado pelo exercício repetitivo pode conduzir à mudanças degenerativas no tendão, prejudicando o reparo e produzindo tendões espessos e calcificados. (JIANYING, 2010). Neste caso, a PGE2 pode ser um contribuinte chave nas tendinopatias. (DEVKOTA, 2007).

Em outros modelos animais, a indução da lesão no tendão rotador do ombro de coelhos provocou o aumento significativo da interleucina IL-1b no primeiro dia após o ferimento e um pico nos níveis de PGE2 no sétimo dia diminuindo após 21 dias. No mesmo estudo, resultados imunohistológicos mostraram que tanto a região do tendão, quanto o tecido cartilaginoso apresentaram expressão alta de COX-2, sugerindo a participação dos tecidos adjacentes na lesão e da produção de prostaglandina E2 via COX-2. (KOSHIMA, 2007). Níveis elevados de algumas

citocinas como a IL-1 e IL-6 também podem aumentar a produção de PGE2, via COX-2 (O'NEILL et al., 1987; MITSUI, 2010).

Terapia utilizando injeções intra-articulares de ácido hialurônico, em pacientes com processo inflamatório no tendão rotator do punho, pode reduzir a expressão gênica de PGE2 via COX-2, porém o mecanismo de ação desta terapia ainda não foi esclarecido. (MITSUI, 2010). Atualmente, terapias farmacológicas que visam inibir a enzima COX-2 são utilizadas na redução do processo inflamatório e redução da dor, porém, os efeitos secundários podem prejudicar o tratamento.

### **1.5.7 Receptores Neurocinina 1 (NK-1)**

Uma das características do processo inflamatório é a presença de dor que é um sinal de advertência do corpo para a proteção contra o dano tecidual sendo causada pela sensibilização ou ativação de neurônios do nervo aferente. Esta ativação nociceptora provoca a liberação local de peptídeos como a substância P e outros mediadores pró-inflamatórios (SANN et al., 1998).

A substância P (SP) foi descrita inicialmente em 1978 por Krause et al., como sendo um neuropeptídeo envolvido na dor. Este neuropeptídeo pode ser sintetizado não somente pelos neurônios sensoriais, mas também por células imunes e outras fontes não neuronais. Esta substância é formada por onze aminoácidos biologicamente ativos do grupo das taquicinas e quando liberada pelas terminações nervosas periféricas agem nos receptores NK1, desencadeando alterações intracelulares envolvidas na contração da musculatura lisa, na modulação da resposta inflamatória neurogênica e imunológicas e na transmissão da dor. (RAWLINGSON et al., 2004).

O tecido inflamado normalmente produz diversos níveis de dor, definido como hiperalgesia inflamatória. Nos nervos periféricos este fenômeno é resultado da ação direta de mediadores inflamatórios ou químicos como PGE2, leucotrienos, adenosina, serotonina, epinefrina, endotelina e fatores de crescimento (TREEDE et al., 1992) atuando em receptores ligados a proteína G e que mesmo em concentrações fisiológicas podem ativar ou sensibilizar os neurônios nociceptores



nos terminais nervosos periféricos e alterar a excitabilidade dos canais de sódio nos terminais nervosos (GOLD et al., 1996).

Numerosos estudos mostraram a resposta do sistema nervoso central nos ferimentos e na inflamação e níveis de SP e de receptores NK1 aumentados no corno dorsal da medula espinal, em modelos de dor inflamatória periférica (ABBADIE et al., 1996; DELANDER et al., 1997; ALLEN et al., 1999; MCCARSON, 1999; CRUCE et al., 2001; ROTHMAN et al., 2005).

Por ser um dos eventos da inflamação, a dor está intimamente ligada ao extravazamento plasmático e com a ativação de neutrófilos (MIAO et al., 2000). Estes 2 eventos podem aumentar os níveis de SP que regulam a transcrição e liberação de TNF- $\alpha$ , ajudando na ativação do receptor NK1 em modelos de inflamação induzida de joelho (KEEBLE et al 2005).

Os receptores NK1 são acoplados a proteína G e que sinalizam os efeitos da SP, sendo expressos em várias células como linfócitos T e B, monócitos, macrófagos e neutrófilos durante o processo inflamatório ou imunológico.(HO et al., 1997 ; LAMBRECHT et al., 1999). Conseqüentemente, a SP pode se ligar aos receptores NK1, realçando e induzindo a produção de diversas citocinas inflamatórias, como IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  (LOTZ et al., 1988; PALMA et al., 1998) e ainda atuar na transdução de sinais mecânicos em condrócitos, regulando a função celular de maneira autócrina ou parácrina, através do receptor NK1 (MILLWARD et al., 2003).

Os receptores NK1 e distribuído por todo o corpo, principalmente nas células endoteliais e quando ativados pela SP, podem atuar como mediador pró-inflamatório, aumentando a permeabilidade vascular e a migração leucocitária durante o processo inflamatório (KEEBLE et al., 2005).

Estes receptores também possuem papel importante na regulação da permeabilidade microvascular aumentada pela indução da inflamação em modelo de artrite temporo-mandibular. Seu bloqueio conduz a diminuição da permeabilidade vascular e inibição de TNF- $\alpha$  que por sua vez inibe a produção de IL-1b remodelando a ativação e migração de neutrófilo (DENADAI-SOUZA et al., 2009).

A Substância P também pode ligar-se ao receptor NK1 e ativar NF-kb aumentando a síntese de mediadores pró-inflamatórios e ainda atuar na inflamação intestinal, induzindo MMPs e liberando TGF- $\beta$ , conduzindo a proliferação celular (KOON e POTHOUKAKIS, 2006). A ativação dos receptores NK1 é importante para

a manutenção da hiperalgesia em modelos de artrite de joelho em ratos (GAO et al., 2003, CASTRO et al., 2006).

O aumento dos níveis de SP no líquido sinovial está diretamente relacionado ao aumento da temperatura intra-articular e a intensidade da dor em paciente com artrite temporomandibular (APPELGREN et al., 1991). Resultados imunohistoquímicos mostraram a presença da SP e de receptores NK1 em tendões flexores humanos ligados ao epicôndilo medial, evidenciando a participação da dor neurogênica na tendinopatia do cotovelo de tenistas (BJÖRN-OVE, et al., 2006). Estes estados inflamatórios crônicos da dor, apesar de não serem totalmente compreendidos, frequentemente seguem alguns padrões e episódios da inflamação aguda (LEVINE et al., 2006).

## **1.6 Tratamentos**

Condições inflamatórias de tendões estão associadas a uma ampla variedade de tratamentos propostos, algumas delas com poucas evidências científicas que apoiem seu uso (KVIST, 1994; KHAN et al., 1999; ALFREDSON e LORENTZON, 2000; ANDRES et al., 2008; BJORDAL et al., 2008).

Os tratamentos da tendinite têm por finalidade a redução da inflamação, que persistir, promove alterações nos feixes das fibras de colágeno e aumento da atividade de determinadas enzimas, prolongando-se 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 (FERNANDES et al., 2003).

O tratamento mais comum 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.

A eficácia do tratamento aumenta com a determinação da fase em que o processo inflamatório no tendão se encontra. Na fase inicial do processo de reparação, podem ser instituídas práticas hidroterápicas frias, visando-se reduzir o

metabolismo na região, e agentes antiinflamatórios esteroidais ou não-esteroidais (ALVES e MIKAIL, 2006).

Os corticosteróides são bem absorvidos em qualquer sítio de administração, (tópica, oral, subcutânea, intramuscular, intralesional e intravenosa), porém podem provocar efeitos deletérios no uso intralesional (POOL et al., 1980).

Os antiinflamatórios não esteroidais são as drogas utilizadas com mais freqüência, como parte do tratamento inicial, principalmente na redução da dor, embora seja comum encontrarmos amostras de tendões durante a tendinopatia, com ausência de células inflamatórias que justifique esta preferência (ALFREDSON et al., 2003; ANDRES et al., 2008).

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 gastrintestinais (PELOSO e SCHEIMAN, 2001).

Nos Estados Unidos, os efeitos colaterais gastrointestinais (GI) resultam em mais de 76 mil hospitalizações e 7.600 mortes a cada ano. Mais de 50% dos usuários crônicos de AINEs apresentam algum tipo de lesão da mucosa gastroduodenal. Outro levantamento mostrou que são gastos anualmente 61,2 bilhões de dólares no tratamento da dor derivada de desordens musculoesqueléticas como artrite, osteoartrite, tendinite e outras inflamações. Porém, grande parte dos tratamentos são considerados ineficazes (HAYER et al., 2007). No Brasil, estima-se um gasto de US\$ 2 bilhões ao ano com tratamento dos efeitos indesejáveis decorrentes do uso de AINEs (PORTAL SÃO FRANCISCO, 2004).

O custo total de doenças músculo-esqueléticas no Canadá em 1994 foi estimado em 25,6 Bilhões de dólares canadenses, com a possibilidade de duplicar em 30 anos. Medicação e hospitalização representaram 80% deste custo total. Em 1995, foi estimado que 40 milhões de cidadãos (15% da população americana) apresentam problemas músculo-esqueléticos como artrite, tendinites, osteoartrite etc. Esta porcentagem tende a subir para 19% até 2020. No Brasil, mais de 15 milhões de pessoas sofrem de osteoartrite. Nos Estados Unidos, 2 milhões de americanos sofrem de artrite reumatóide, sendo 60 % mulheres (PELOSO e

SCHEIMAN, 2001). Para casos de tendinite e tendinose, ainda não se tem dados precisos, mas sua predominância elevada, junto ao fato delas se tornarem frequentemente crônicas, faz das tendinopatias um grande problema sócio-econômico onde as intervenções, tratamentos médicos e terapias para a reabilitação ainda são limitados (LANGBERG e KONGS-GAARD, 2008).

### **1.7 Terapia Laser de baixa potência (LBP)**

Vários trabalhos foram publicados para melhorar o entendimento dos efeitos da terapia LASER no tratamento de doenças inflamatórias. Porém, apesar de todas as investigações realizadas e do importante uso clínico do laser de baixa potência, o conhecimento básico de seus mecanismos de ação ainda é muito deficiente.

No Brasil, a introdução da tecnologia do laser foi bastante tardia em comparação com outros países, principalmente países da Europa e os Estados Unidos. Os trabalhos pioneiros nesta área remontam à segunda metade da década de 80. (BRUGNERA JR. e PINHEIRO, 1998)

O termo Laser é um acrônimo para “Light Amplification by emission of radiation” (amplificação da luz pela emissão estimulada da radiação). Embora Albert Einstein originalmente tenha delineado os princípios subjacentes à geração deste tipo de luz no início deste século, foi somente em 1960 que Maiman produziu o primeiro feixe de luz de laser e baseado neste protótipo surgiram vários aparelhos. As características que diferem a luz laser de uma lâmpada são: monocromaticidade, colimação e coerência (SCHAWLOW, 1995).

A coerência é uma das propriedades da luz laser, como citada acima, mas ao penetrar no tecido, esta propriedade se perde nos primeiros extratos da pele. Isto ocorre devido à grande variedade de estruturas celulares que compõe a pele (MICKILEY et al., 1988; HACZEKI et. al., 1989). Segundo esses autores, apesar da perda da coerência no interior dos tecidos, a irradiação ainda é absorvida pelas células, gerando alterações no seu metabolismo tanto em tecidos superficiais como profundos (SVAASAND, 1990).

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

Em geral, quase todas as aplicações com HILT tomam por base os efeitos fototérmicos e fotoablativos do laser no tecido, sendo usados para cortar, destruir, soldar, remover tatuagens, entre outros efeitos. Em contraste, nas décadas de 60 e 70 os pesquisadores voltaram-se para as aplicações com LILT e essas se baseiam nas interações atérmicas da luz laser com o tecido, produzindo efeitos de Biomodulação (KARU, 1998; BASFORD,1995).

A terapia com laser de baixa potência (LBP), incide sobre as reações atérmicas da luz com o tecido, ocasionando efeitos fotoquímicos (SCHAFFER et al., 2000; HONMURA et al.,1993), ou seja, radiações com baixa densidade de potência (DP)  $0,01 \text{ w/cm}^2$  à  $1 \text{ w/cm}^2$  e também baixa densidade de energia (DE), de 1 à  $10 \text{ J/cm}^2$  (SCHINDL et al., 2000). Nesses limites se produz um pequeno e não significativo aumento de temperatura, o qual não ultrapassa 1 grau Celsius (KARU,1987).

O tecido biológico é pouco homogêneo do ponto de vista óptico, assim toda a radiação eletromagnética ao incidir sobre o tecido, se desdobra, uma parte sendo refletida e a outra absorvida. A reflexão varia com o ângulo de incidência da luz e as propriedades ópticas da superfície do tecido. Anderson et al. (1981) comprovaram que a reflexão da luz laser na pele é de 4-7%, quando esta for incidida de forma perpendicularmente, variando para mais com a aplicação de pomadas, líquidos e secreção sebácea. Então, de 93-97% da irradiação incidente na superfície penetra nos substratos subsequentes, na pele e na derme, encontrando substâncias com índice de refração diferentes. Dessa forma os fótons vão se distribuir de acordo com a absorção de cada estrutura, pois a função fotorreguladora determina qual comprimento de onda que cada estrutura é capaz de absorver e com isso promover transformações na atividade funcional e metabólica da célula.

O Laser de baixa potência parece agir sobre organelas celulares (mitocôndrias e membranas), gerando aumento da síntese de ATP e modificando o transporte iônico. Dessa forma o laser, em curto prazo, acelera a glicólise e a oxidação fosforilativa e em longo prazo a transcrição e a replicação do DNA (KARU, 1987).

Acredita-se que a ação do laser de baixa potência sobre o tecido está relacionada 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 (CAMPANA et al., 1998; CAMPANA et al., 1999); inibir a síntese das prostaglandinas (SATTAYUT et al., 2000; BJORDAL et al., 2006) além de inibir o esfíncter pré-capilar, através de mediadores químicos.

Estudos adicionais sobre o efeito antiinflamatório do laser de baixa potência ainda se fazem bastante necessários e seu mecanismo de ação deve ser investigado a fim de compreender suas ações nos diferentes modelos experimentais em que vem sendo utilizados.

Campana et al. (1998) quantificaram o nível de fibrinogênio plasmático (FP) em modelo de lesão tecidual induzida por laparotomia e tratada com LBP e diclofenaco de sódio. Nesse modelo experimental os resultados mostraram que o nível de FP que se encontrava aumentado nos tecidos lesados retornaram a níveis normais após o tratamento com LBP sendo semelhante ao tratamento com diclofenaco de sódio. Esses resultados sugerem que a resposta inflamatória pode ser normalizada ou reduzida pela ação fotoquímica do LBP, sugerindo uma ação seletivo da COX-2, visto que a redução do FP obtida com LBP foi semelhante ao tratamento farmacológico.

Sattayut et al. (1999), investigaram o efeito do laser As-Ga-Al (820nm) com densidade de energia de  $4\text{J}/\text{cm}^2$  e  $19\text{J}/\text{cm}^2$  na produção de  $\text{PGE}_2$  em culturas de células estimulada com IL-1 e observaram que a inibição da síntese de  $\text{PGE}_2$  ocorreu com  $19\text{J}/\text{cm}^2$ , sugerindo ser este o mecanismo analgésico para as dores músculo - esqueléticas.

Campana et al. (1999) avaliaram a inflamação em modelo de artrite reumatóide, em ratos, induzida por hidroxapatita e tratada com LBP (632,8nm) com densidade de energia de  $8\text{J}/\text{cm}^2$  em 24 e 48 horas após o estímulo e obtiveram como resultados que o nível de FP,  $\text{PGE}_2$  plasmático e  $\text{PGE}_2$  sinovial estavam reduzidos em relação ao controle, entretanto, as lesões histológicas permaneceram sem diferenciação entres os grupos tratados e não tratados, sugerindo que o LBP é capaz de inibir os efeitos quimiotáticos dos estágios iniciais da inflamação ou podem interferir na formação de mediadores químicos derivados da cicloxigenase.

Goldman et al. (1980), relatam que pacientes com artrite reumatóide que foram tratados com laser diodo Ga-Al-As (780 nm) a 31 J/seg/cm<sup>2</sup> apresentaram melhora no quadro inflamatório.

England et al. (1989), encontraram uma melhora significativa da dor, mobilidade e função em pacientes com tendinites bicipitais e do músculo supra-espinhoso do ombro após 2 semanas de aplicações com laser de AsGa em comparação com os tratamentos empregando drogas como o naproxeno sódico (550mg). Brosseau et al. (2000), estudaram a terapia de laser de baixa potência em artrite reumatóide e observaram 70% de redução da dor em relação ao placebo e aumento de 1,3cm de flexibilidade. Reddy et al. (1998) utilizaram laser de He-Ne (632,8) 1J/cm<sup>2</sup> durante 14 dias consecutivos em pacientes com cirurgia de tendão (pós-cirúrgico) e observaram melhora nas condições biomecânicas com aumento na força tênsil e melhora no processo de reparação. Huang et al. (2000), realizaram um estudo de revisão sobre o tratamento de diferentes doenças (bursites, tendinites e Distúrbios Osteomusculares Relativos ao Trabalho (DORT) e a terapia com laser de baixa potência e observaram melhora dos pacientes tratados com laser em relação aos grupos placebo e controle.

O uso de lasers na prática clínica objetivando o efeito antiinflamatório em diferentes doenças baseia-se em um número já razoável de publicações de caráter científico.

Nos últimos anos, inúmeros estudos clínicos aleatorizados, placebo-controle foram realizados, fazendo com que a terapia laser já seja considerada como alternativa terapêutica para várias doenças. Alguns autores apresentaram trabalhos em colaboração, publicando estudos experimentais e clínicos com a aplicação do Laser da Baixa Potência em diferentes situações (FRIGO, 2009; CHOW, 2009; LEAL JR et al., 2008; BJORDAL et al., 2008; STERGIOULAS et al., 2008; CORREA et al., 2007; BJORDAL et al., 2007; AIMBIRE et al., 2007; AIMBIRE et al., 2006a,b; LOPES-MARTINS et al., 2006a,b; BJORDAL et al., 2006a,b,c; LOPES-MARTINS et al., 2005; AIMBIRE et al., 2005; ALBERTINI et al., 2002, 2004; SANTOS et al., 2002a,b). À partir destes trabalhos, foi possível caracterizar o efeito da Terapia com Laser de Baixa Potência na reação inflamatória, no edema de pata, na pleurisia e dermatite, na hiperreatividade de vias aéreas em ratos e camundongos, na tendinite em humanos e induzida em animais e no processo doloroso. No entanto, é muito importante ressaltar que muito pouco se conhece a respeito do mecanismo de ação

dos lasers infravermelhos. Neste sentido, os estudos experimentais com estes comprimentos de onda assumem grande relevância para o esclarecimento do mecanismo de ação da terapia.



## **2 HIPÓTESE**

Atualmente os lasers de comprimento de onda na faixa do infravermelho são os mais utilizados em doenças inflamatórias articulares e músculo-esqueléticas. Tendo em vista os dados apresentados anteriormente em que relatamos o impacto desta doença na população mundial e a baixa eficiência de muitas terapias utilizadas, a importância do desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas representa um fator altamente relevante para o Sistema de Saúde, especialmente em países subdesenvolvidos. No entanto, o estabelecimento de parâmetros clínicos para a utilização desta técnica é extremamente necessário, visto que a terapia laser muitas vezes é utilizada sem embasamento científico que comprove sua ação.

A hipótese deste trabalho é de que o laser de baixa potência (810nm), infravermelho, possa reduzir o processo inflamatório agudo induzido pela injeção de colagenase em tendões calcâneo de ratos, contribuindo para o reparo tecidual e redução da dor.

### **3 OBJETIVOS**

Dentro do cenário de novas tecnologias e estratégias terapêuticas utilizadas para o tratamento das disfunções osteomusculares, entre elas, a inflamação aguda do tendão (tendinite), objetivamos estudar o efeito do laser de baixa potência na inflamação aguda do tendão, investigando a eficácia e os possíveis mecanismos de ação desta terapia no modelo de tendinite em tendão calcâneo de ratos, estabelecendo bases para o desenvolvimento de um protocolo experimental e clínico eficaz, capaz de ampliar conhecimentos sobre mecanismo de ação do LASER infravermelho (810nm).

## **4 MATERIAIS 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 do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada e ciclo claro/escuro de 12 horas.

Nossos protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB – USP) ( nº 106, fls. 20 do livro 2).

### **4.2 Indução da Inflamação em Tendão Calcâneo de Ratos**

Os animais foram anestesiados por via inalatória com halotano e receberam 100 µl de injeção transcutânea de collagenase (1 mg/ml; Sigma Chemical Co, Cat. C-6885) na região posterior da pata direita, no Tendão calcâneo. Animais do grupo controle receberam como veículo, 100 µl de salina estéril 0,9%. A seguir, os animais retornaram para as caixas de contenção separados em diferentes grupos experimentais.

Após a indução do processo inflamatório pela injeção de collagenase, os animais foram sacrificados após 2, 4, 6, 12, 24, 48 horas e 7 dias. Para o sacrifício os ratos receberam “overdose” de anestésico (halotano) seguido de deslocamento cervical. O tecido do tendão foi então removido para posteriores análises.

### 4.3 Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em diferentes grupos conforme o esquema abaixo:

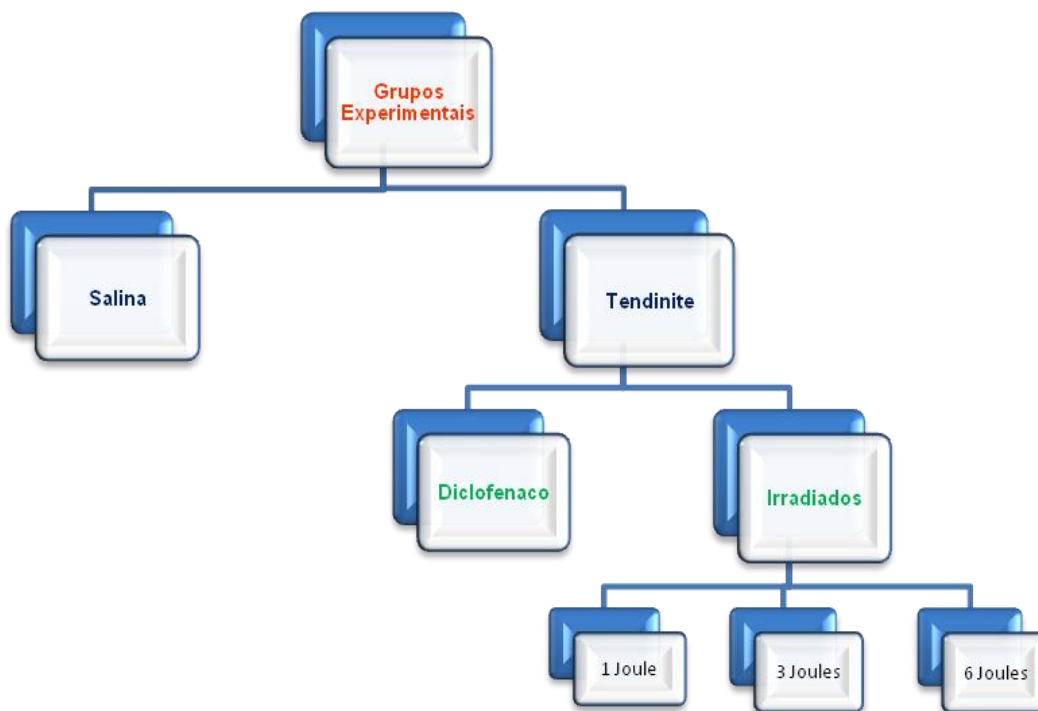


Figura 4. Esquema de grupos utilizados.

- **Grupo Controle (Salina):** Tendões de animais que receberam como veículo, 100 $\mu$ l de solução salina estéril (0,9%) na região Peritendínea.

- **Grupo Colagenase – Tendinite sem tratamento (ST):** Tendões de animais que receberam 100 $\mu$ g de Colagenase.

- **Grupo Diclofenaco (D):** Receberam injeções com 100 $\mu$ g de Colagenase e foram pré-tratados com Diclofenaco de Sódio (1mg/kg I.M.), 30 minutos antes da indução.

- **Grupos Irrradiados:** Receberam injeção com 100 $\mu$ g de Colagenase na região Peritendínea e os tendões foram irradiados, na região da injeção, num único ponto e por contato, recebendo energias de **1J**, **3J** e **6J** para cada grupo irradiado, 1 hora após a indução

#### 4.4 Aplicação da Terapia com Laser de Baixa Potência (LBP)

Após serem submetidos ao modelo de inflamação aguda pela injeção de colagenase, os animais acondicionados no contenedor, receberam tratamento com laser de baixa potência 810 nm e 100mW de potência (Thera Lase, DMC<sup>®</sup>) (figura 5), 1 hora após a indução do processo inflamatório



**Figura 5.** Equipamento Thera-lase e contendor para ratos, utilizados nas irradiações.

O tempo de Irradiação é variável para cada energia apresentada, de acordo com a seguinte Fórmula da Densidade de Energia (DE):

$$DE = E / A \quad \text{ou} \quad DE = P * t / A$$

Para:

DE = Densidade de Energia (J/cm<sup>2</sup>)

E = Energia (Joules)

A = Área (cm<sup>2</sup>)

P = Potência (Watts)

t = tempo (segundos)

#### **4.5 Avaliação do Edema do Tendão – Diferença entre as massas (peso seco - peso úmido).**

Para a avaliação do edema produzido no tendão calcâneo dos animais, os tendões foram dissecados e submetidos à pesagem (peso úmido em mg) . Após, foram levados à estufa e após 24h, o tendão desidratado foi avaliado (peso seco em mg). O edema inflamatório foi representado pela diferença entre as massas (peso seco – peso úmido).

A determinação da evolução do edema foi realizada nos tempos de 6, 12, 24 e 48 horas e também 7 dias, para os grupos controle e colagenase.

#### **4.6 Avaliação do Extravasamento Plasmático pela Concentração de Azul de Evans no tecido.**

##### **Material:**

- Azul de Evans a 2,5%, MERCK<sup>®</sup>, artigo 3169
- Solução fisiológica 0,45%
- Formamida MERCK<sup>®</sup>, artigo 9684.1000
- Membrana esterilizante: 0,22 $\mu$ , MILLIPORE<sup>®</sup>

Foi preparada uma solução de Azul de Evans (25mg/ml), filtrada em membrana milliper 0,22  $\mu$ m e conservada em temperatura de 4 °C. Os animais dos grupos controle, colagenase e tratados com Laser, foram anestesiados com associação de cloridrato de xilazina e cloridrato de ketamina (1mg/kg), via intraperitoneal. Uma hora antes do término de cada período de sacrifício, os animais receberam injeção endovenosa peniana de Azul de Evans na concentração de 25 mg/Kg, (0,1 ml/100g de animal; agulha 13 x 4,5mm).

Uma hora após a injeção de Azul de Evans, os animais foram sacrificados com “overdose” de Halotano seguido se deslocamento cervical.

Os tendões foram removidos, dissecados, submetidos a pesagem (mg) e depois imersos em tubos de vidro contendo Formamida (4ml/g). Estas amostras

foram mantidas em em estufa (37 °C, 24h) e finalmente agitados mecanicamente por 15 segundos (agitador PHOENIX® modelo AT 56). O corante extraído pela formamida foi conservado à temperatura de -20 °C para posterior leitura espectrofotométrica.

A determinação espectrofotométrica do Azul de Evans foi realizada com alíquotas de 150µl de cada amostra dispostas em placa de 96 poços (análise em duplicata) e a leitura em leitor de ELISA (BIOTEK, 618 - 620nm). Foi utilizada 150µl de formamida para padronizar o branco para o teste e a curva padrão foi feita utilizando diluições de Azul de Evans. As leituras foram interpoladas por regressão linear em uma curva padrão do corante e as concentrações foram calculadas (µg Azul de Evans / mg de tecido).

#### **4.7 Análise de expressão gênica pela reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa em tempo real (real time RT-PCR).**

Após a indução da tendinite, os animais dos grupos controle, colagenase e tratados com laser foram sacrificados com “overdose” de halotano seguido de deslocamento cervical. Os tendões removidos foram 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 obedeceu 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 na figura 6 conforme Wang et al. (2004). 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 B-actina.

<b>PRIMER</b>	<b>SEQUÊNCIA</b>
$\beta$ -ACTINA	FOWARD: AAGATTTGGCACCACACTTTCTACA REVERSE: CCGTGAGCAGCACAGGGT
COX-1	FOWARD: CCTCACCAGTCATTCCCTGT REVERSE: CCGTGCGAGTACAGTCACAT
COX-2	FOWARD: AGATCAGAAGCGAGGACCTG REVERSE: CCATCCTGGAAAAGTCGAAG
TNF $\alpha$	FOWARD: CAGAGGGAAGAGTTCCCCAG REVERSE: CCTTGGTCTGGTAGGAGACG
TGF $\beta$ 1	FOWARD: CCCCACTGATACGCCTGAGT REVERSE: AGCCCTGTATTCCGTCTCCTT
MMP3	FOWARD: CCCGTTTCCATCTCTCTCAA REVERSE: GTGGGTACCACGAGGACATC
MMP9	FOWARD: CAATCCTTGCAATGTGGATG REVERSE: TTCCTCCGTGATTGAGAAC
MMP13	FOWARD: GATGGGCCTTCTGGTCTTCT REVERSE: GAGCTGCTTGTCCAGGTTTC
IL-10	FOWARD: CATGGGTCTTGGGAAGAGAA REVERSE: GCTTTCGAGACTGGAAGTGG

**Figura 6.** Seqüência de Primers utilizados na análise da Expressão de mRNA, pela técnica de RT-PCR em tempo real.



#### **4.8 Análise da Expressão Protéica de Ciclooxygenase (COX-1 e COX-2), de Neurocinica 1 (NK1) e de Resíduos de nitrotirosina (NT) por Western-Blotting.**

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

Foram utilizados 25 µl da proteína presente nas amostras, separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo Lauril Sulfato de Sódio (SDS – PAGE), conforme originalmente descrito por Laemmli (1970). As bandas protéicas foram transferidas eletroforéticamente através de sistema submerso para uma membrana de nitrocelulose (Hybond-ECL, Amersham Pharmacia;. 150 mA, 2 horas). Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados mediante incubação da mesma com solução de caseína à 0,2%, preparada em tampão TBS-t (TRIS 20 mM + NaCl 137 mM contendo 0,1% de Tween 20).

A seguir as membranas foram incubadas com os anticorpos primários específicos para COX-1 e COX-2, NK1 e NT e após lavagem apropriada em TBS-t (6 lavagens de 10 minutos cada), as membranas foram incubadas com anticorpos secundários (anti-camundongo conjugado com fosfatase alcalina (1:3000; Bio Rad, EUA).

As membranas foram submetidas a uma nova série de lavagens em TBS-t e as bandas imunoreativas foram reveladas por quimiluminescência (Lumiphos, Pierce, EUA). As imagens foram captadas mediante sistema Chemilmager (Alpha Innotech, EUA) e as intensidade das bandas (como medida do grau de expressão da proteína) foi determinada por análise densitométrica. Um controle da quantidade de proteínas aplicada em cada poço foi realizado corando-se a membrana com solução Ponceau 0,2%. Os resultados de densitometria foram expressos em % em relação ao grupo controle (100%).

#### 4.9 Análise da atividade de Mieloperoxidase (MPO)

A presença de neutrófilos foi avaliada pela dosagem da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), considerada um marcador específico da presença deste tipo celular. Avaliou-se portanto, a atividade desta enzima como um indicador da presença e da quantidade de neutrófilos presente no tecido tendíneo 12 horas após a injeção de colagenase.

O método da medida de atividade de MPO baseia-se na velocidade de oxidação do substrato *o*-dianisidina na presença de água oxigenada, que é evidenciada pela mudança de absorbância medida por espectrofotometria a 460 nm (77).

Após os animais serem sacrificados, a pele da região do tendão foi retirada e o tendão calcâneo foi cuidadosamente dissecado e transferido para uma cuba e foi adicionados igual volume de brometo de hexadeciltrimetilamônia (HTAB, Sigma Chem. Co., EUA), seguido de homogeneização em vórtex (Heidolph DiAx 900, Alemanha) e ultrasonicação durante 20 segundos. Os tubos foram aquecidos durante 2 h à 60 °C em estufa, para inativação da atividade endógena de Catalase (SATO, et al., 2003), e então centrifugados a 12.000g durante 2 min. Dez microlitros do sobrenadante foram pipetados (em duplicata) em microplaca de 96 poços e acrescidos com 200 µL de uma solução de tampão fosfato de potássio (pH=6) contendo 0,164 mg/mL de dihidroclorato de *o*-dianisidina (Sigma Chemical Co., EUA) e 0,0005% de peróxido de hidrogênio (Merck, Alemanha). A mudança de absorbância a 460 nm foi medida em um leitor de microplacas (Espectra Max plus 384, EUA) durante 10 min., e a atividade de MPO foi calculada a partir da velocidade máxima da reação por segundo. O resultado foi expresso em Unidade de MPO / tendão, sendo que uma unidade de MPO é definida como a quantidade em µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> degradado por minuto.

#### **4.10 Análise da geração de PGE2 (in vitro)**

Os tendões dos grupos controle, collagenase e tratados com laser foram removidos, limpos e pesados. As amostras foram trituradas em solução tampão PBS (1ml) e incubadas (1h e 37 °C) para permitir a geração de PGE2.

Amostras independentes foram incubadas com PBS acrescido de inibidor de COX-1 e COX-2 (indometacina, 20µg/ml), e os valores obtidos foram considerados como branco farmacológico da produção de PGE2.

Outras amostras foram incubadas com PBS e inibidor seletivo de COX-2 (etoricoxib, 2µg/ml). Estes valores permitiram saber qual foi a PGE2 proveniente exclusivamente da isoforma COX-1.

Após 1 hora, as amostras com tendões em PBS e as amostras com etoricoxib receberam indometacina (20µg/ml) para finalizar a geração de PGE2. Assim, descontando estes valores da geração total obtivemos a produção devida à COX-2.

As concentrações de PGE2 foram medidas nos meios de incubação por ELISA e relacionadas ao peso de cada amostra de tendão. Os valores foram expressos em ng de PGE2 por g de tecido por hora. A quantificação de prostaglandina E2 (PGE2), foi feita através do *kit* - RD System contendo anticorpo anti-PGE2 aderido à placa.

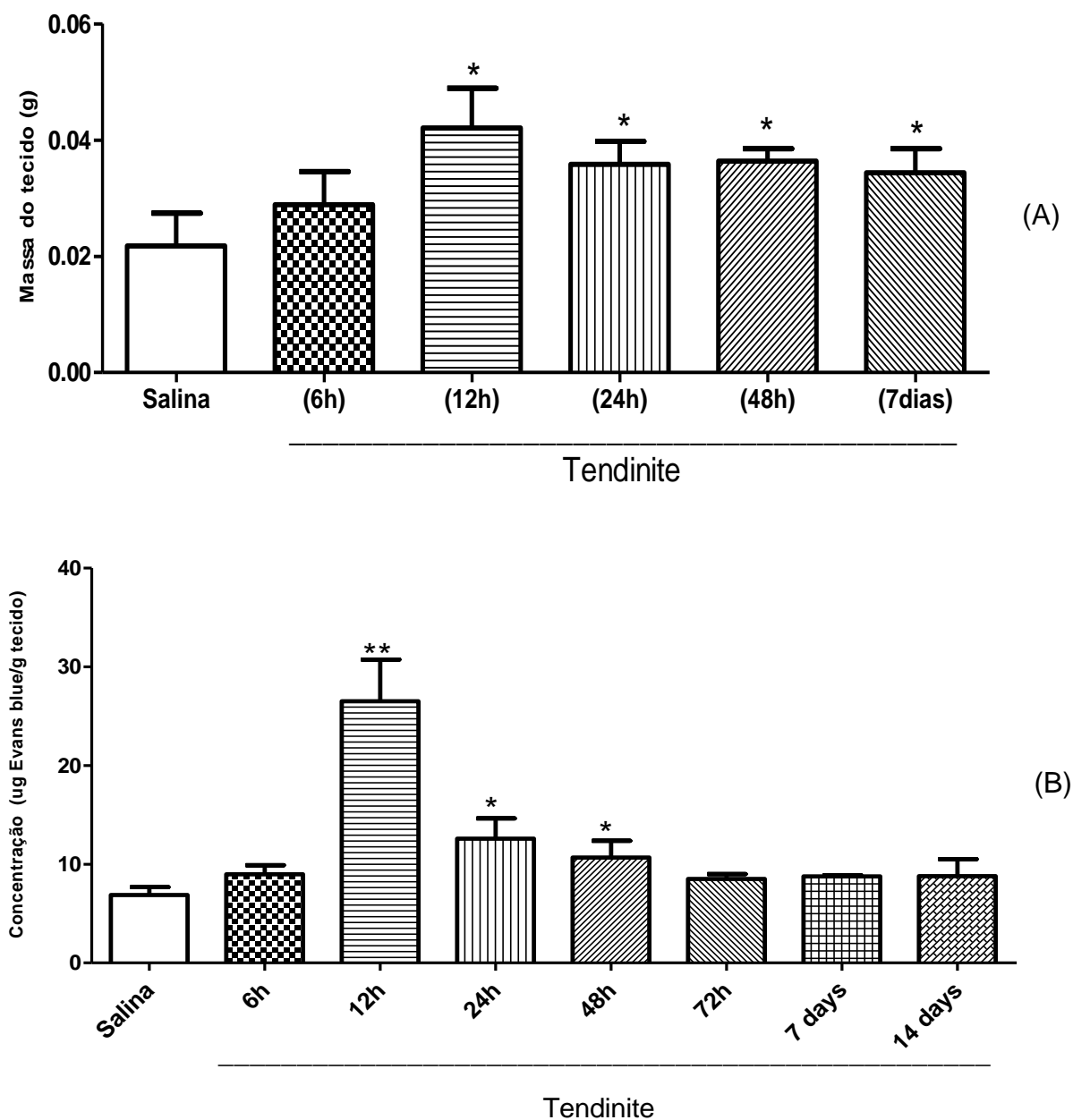
#### **4.11 Análise Estatística:**

Os dados foram expressos pela média e pelo desvio padrão da média ( $\pm$  D. P. M.)

Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) onde os valores  $p < 0.05$  e  $p < 0,01$  foram considerados significativos.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Formação do edema – Curso temporal



**Figura 7.** Gráfico do curso temporal do edema formado no tendão de ratos. (A) Edema: [peso úmido – peso seco]. (B) Edema formado pelo concentração de azul de Evans extravasado no tecido. Os valores estão representados pela Média + DPM. N = 5 animais/grupo (\* p<0,05 e \*\* p<0,01) vs controle salina.

Os gráficos anterior mostram a formação do edema pela diferença entre as massas iniciais e finais do tendão (A) e pelo concentração do corante azul de Evans extravasado no tecido (B).

Os grupos apresentados são: Salina (grupo controle) e grupos com tendinite induzido por colagenase após 6h, 12h, 24h, 48h, 72h, 7 e 14 dias.

Em (A) após 12 horas houve um aumento significativo no valor da diferença entre a massa inicial e final, relacionado ao edema, quando comparado ao grupo salina (controle) e este aumento foi reduzido após 24 horas, mas manteve valores maiores que o grupo controle até 7 dias após a indução da tendinite.

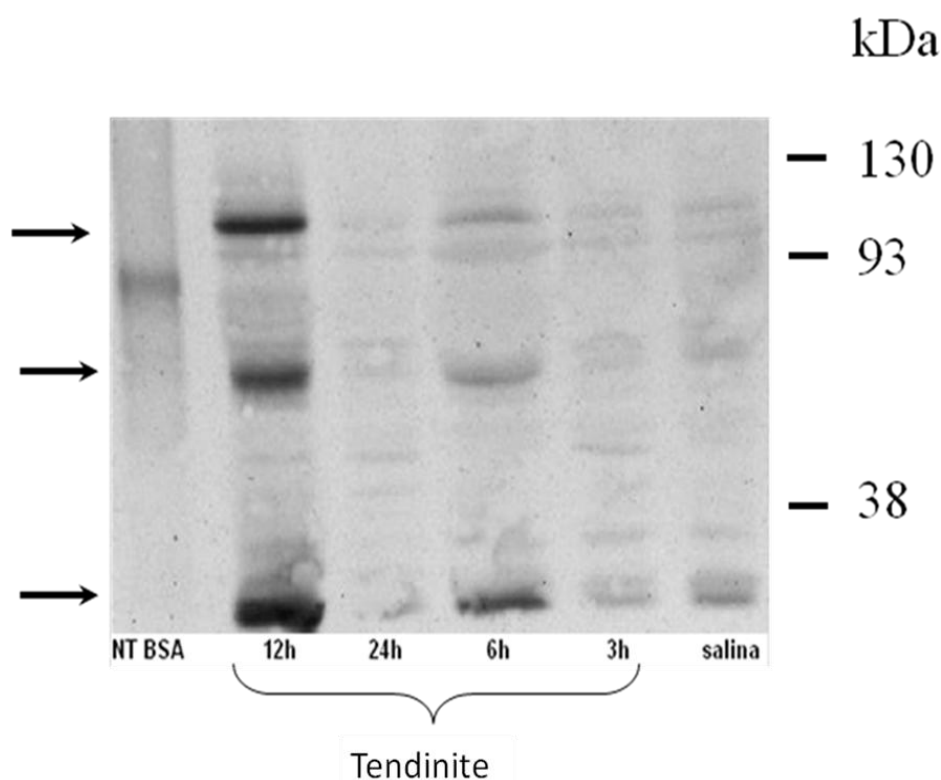
Este aumento também foi evidenciado no gráfico da concentração de azul de Evans. Em (B), a concentração maior também foi observada em 12 horas e à partir de 48 horas este valor foi reduzido, mas manteve-se maior que o grupo salina sem indução da tendinite.

Após 72 horas, não foi observado diferença significativa da concentração do corante quando comparado ao primeiro grupo.

## 5.2 Estresse oxidativo – Resíduos de Nitrotirosina (NT) – Curso temporal

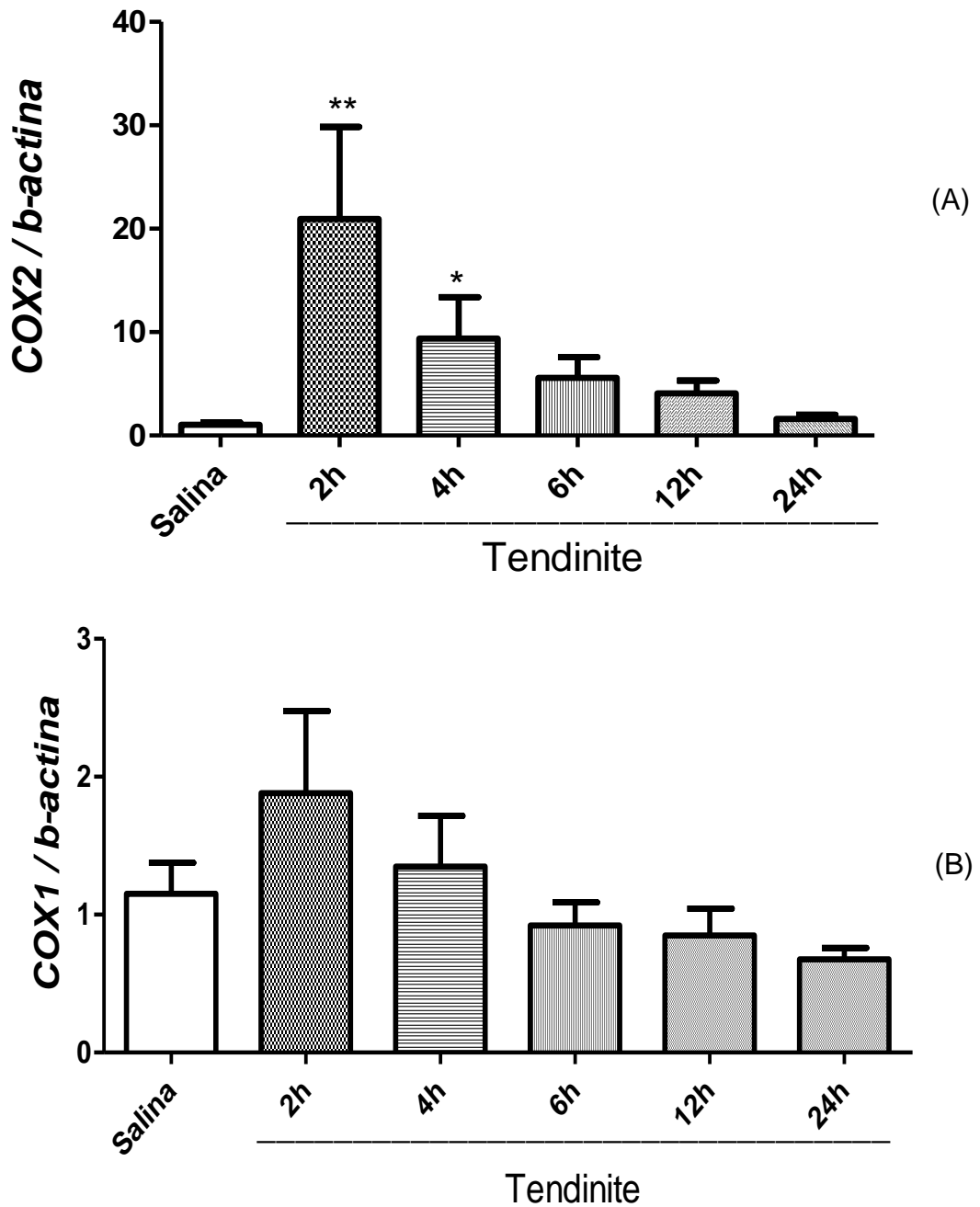
A figura 8 mostra a formação de resíduos de nitrotirosina por Western-Blotting, após a indução da tendinite em ratos. São apresentados grupos salina e tendinite nos intervalos de tempo de 3h, 6h, 12h e 24 horas.

É possível observar um aumento na intensidade das bandas à partir de 6 horas e a maior intensidade em 12 horas quando comparadas ao grupo salina. Após 24 horas, esta intensidade aparece reduzida.



**Figura 8.** Gráfico do curso temporal da formação dos resíduos de nitrotirosina. Aumento do estresse oxidativo induzido por collagenase nos tendões de ratos. Membrana representativa, (Técnica de Western Blotting – Resíduos de Nitrotirosina). Os valores estão representados pela Média + DPM. N = 4 animais/grupo.

### 5.3 Expressão Gênica de COX-1 e COX-2 – Curso temporal



**Figura 9.** Curso temporal da expressão de COX-1 e COX-2 nos animais com tendinite. (A) Expressão gênica de COX-2, (B) Expressão gênica de COX-1. (Técnica de RT-PCR em tempo real). Os valores estão representados pela Média + DPM. N = 5 animais/grupo. (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  vs grupo controle salina).

O gráfico da figura 9 apresenta a expressão gênica de COX-1 e COX-2 durante o processo inflamatório induzido pela colagenase.

A figura 9(A) mostra o aumento da expressão gênica de COX-2 em tendões saudáveis e inflamados. Podemos observar um aumento significativo da expressão gênica desta enzima 2 horas após a indução da tendinite.

Após 4 horas a expressão continua aumentada, porém numa intensidade menor que em 2 horas e nos tempos seguintes (6h, 12h e 24h) estes valores são reduzidos.

A figura 9(B), mostra a expressão gênica de COX-1 em tendões saudáveis (salina) e com tendinite. No tempo de 2 horas também houve um discreto aumento na expressão, porém não significativo quando comparado ao grupo salina.

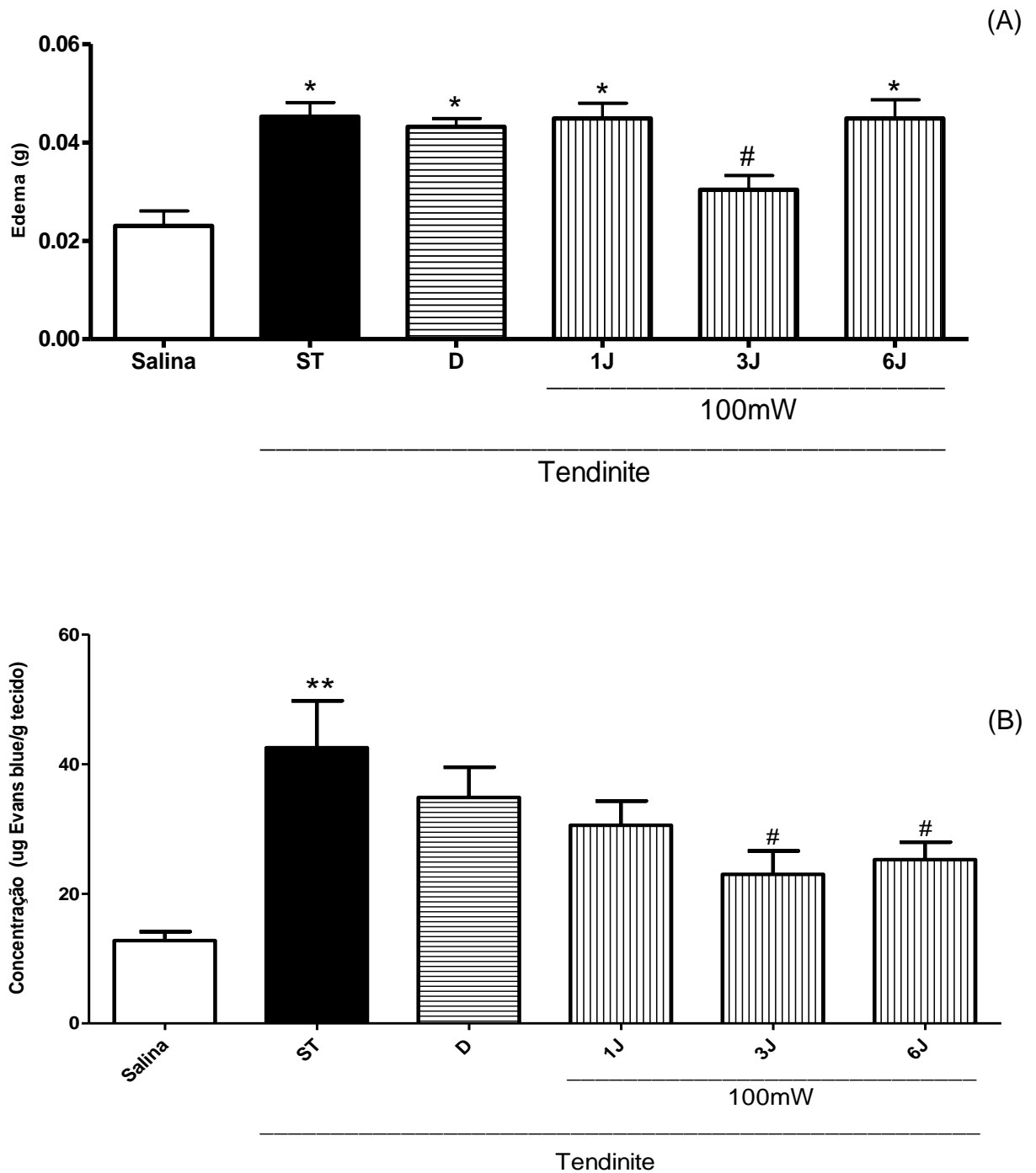
#### **5.4 Edema (diferença de massas e extravasamento plasmático) após tratamento com laser.**

A figura 10(A) mostra a diferença entre as massas iniciais e finais dos tendões de ratos 12 horas após a indução da tendinite relacionados a formação do edema. Neste gráfico, podemos observar que o grupo tendinite sem tratamento apresentou valores significativamente maiores que o grupo salina.

A diferença entre as massas também manteve-se aumentada nos grupos tratados com Diclofenaco de Sódio e Irradiados com 1 Joule e 6 Joules. Somente o grupo tendinite irradiado com energia de 3 Joules apresentou uma redução significativa na diferença das massas.

Em (B), segue-se um padrão parecido, onde a concentração de azul de Evans aparece aumentada no grupo tendinite sem tratamento assim como o grupo tendinite tratado com diclofenaco e o grupo irradiado com 1J que apresentaram discreta redução, mas sem valores significativos. O grupo irradiado com 3J aparece novamente com concentração do corante significativamente reduzida, junto com o grupo 6J.

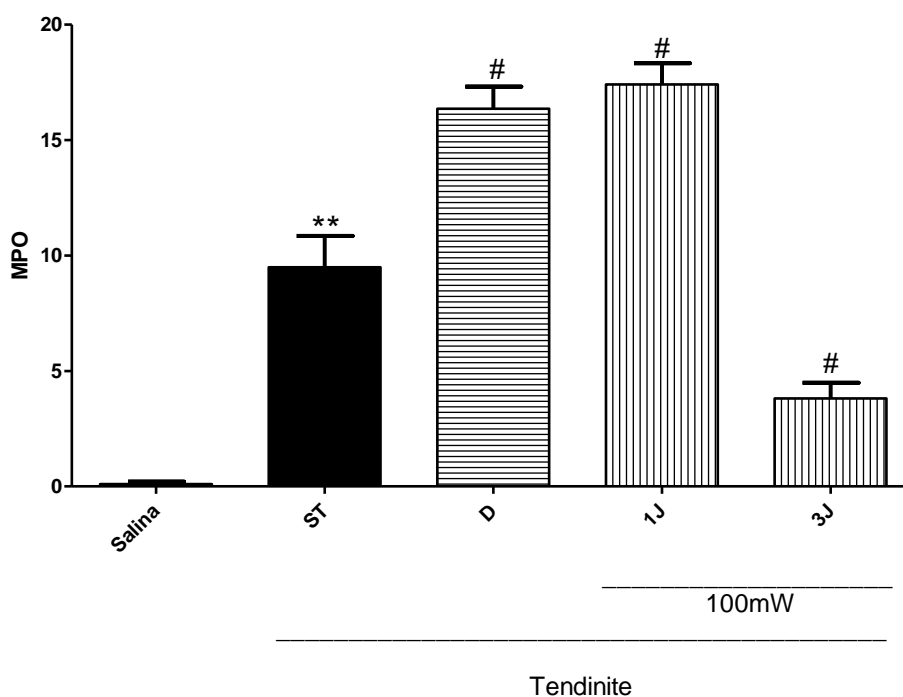




**Figura 10.** Gráfico do edema formado através da diferença de massas inicial e final (A) e da concentração de azul de Evans no tecido (B). Grupos: Salina (Controle), tendinite sem tratamento (ST) e tendinite tratado com diclofenaco de sódio (D) e com irradiação laser nas energias de 1Joule, 3Joules e 6Joules e potência de 100mW. (\*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$  vs controle salina e #  $p < 0,05$  e vs grupo ST).

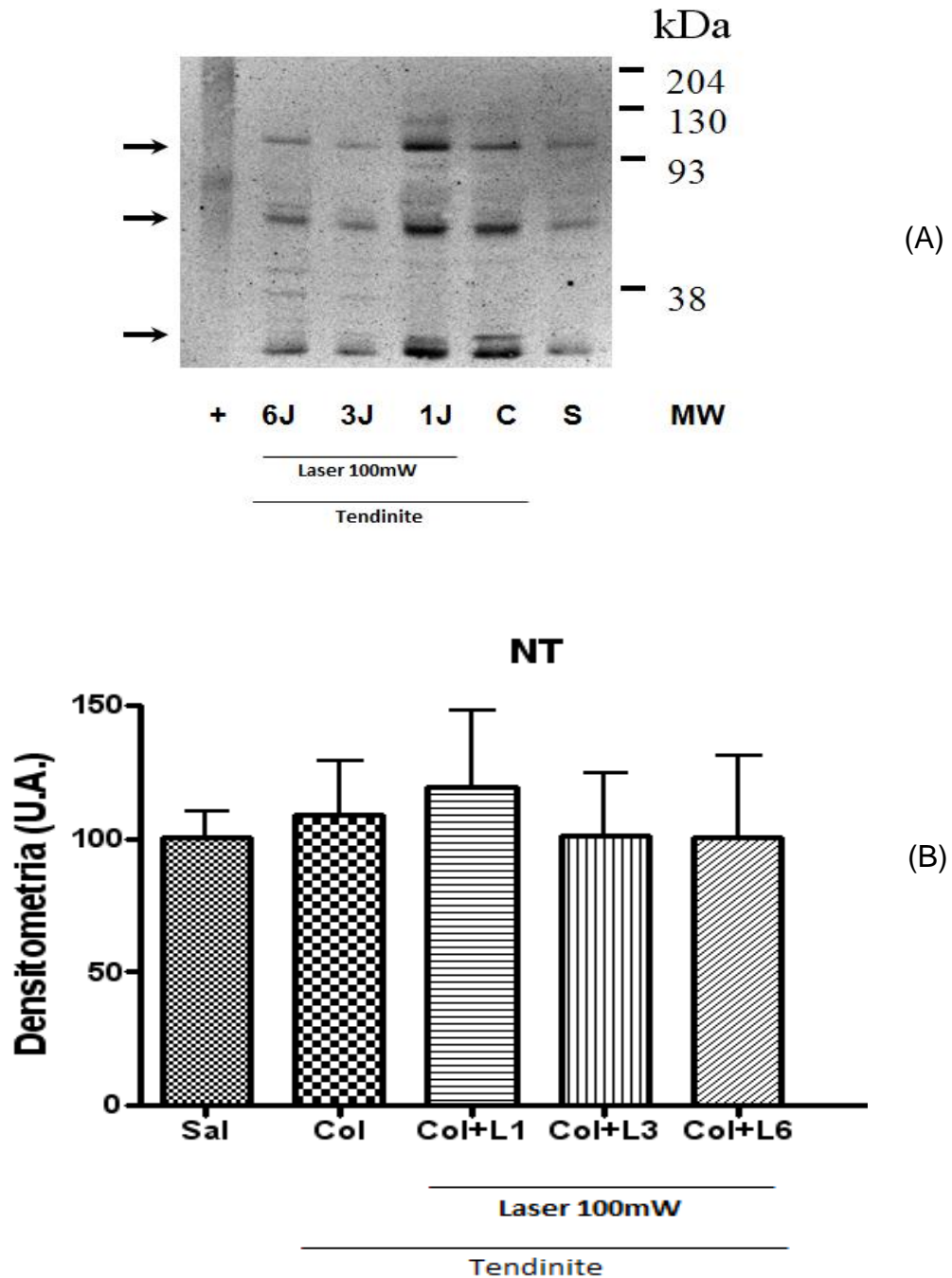
## 5.5 Atividade da Mieloperoxidase (MPO) na tendinite após tratamento com laser.

O gráfico abaixo mostra a atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO) em tendões de ratos, 12 horas após a indução da tendinite. Os grupos com tendinite, exceto o grupo irradiado com 3 joules, apresentaram aumento da atividade de MPO quando comparados ao grupo salina (controle). O grupo tendinite não tratado apresentou aumento significativo da atividade de MPO quando comparado ao grupo salina. O grupo tendinite tratado com diclofenaco de sódio e o grupo tendinite tratado com laser na energia de 1 Joule aumentaram ainda mais a atividade de MPO. Somente o grupo com tendinite e tratado com laser na energia de 3 Joules foi capaz de reduzir a atividade da MPO.



**Figura 11.** Gráfico da atividade da enzima Mieloperoxidase no tecido tendíneo 12 horas após indução do processo inflamatório (ELISA). Grupos: Controle (Salina) e tendinite, não tratado (ST) e tratado com Diclofenaco de Sódio (D) ou com Laser 810nm (1Joules e 3Joules). Os valores estão representados pela Média + DPM. N = 6 animais/grupo. \*\* $p < 0,01$  vs salina. #  $p < 0,05$  ##  $p < 0,01$  vs não-tratado.

## 5.6 Estresse oxidativo – Resíduos de Nitrotirosina (NT) e tratamento Laser



**Figura 12.** Gráfico da formação dos resíduos de nitrotirosina 12 horas após indução da tendinite. Aumento do estresse oxidativo nos tendões de ratos e tratamento com Laser 810nm – 100mW. Grupos: Salina (Controle), tendinite induzida por collagenase e sem tratamento (C) e tendinite tratada com irradiação laser nas energias de 1Joule, 3Joules e 6Joules e potência de 100mW. (A) Membrana representativa (B) Densitometria. (Técnica de Western Blotting – Resíduos de Nitrotirosina). Os valores estão representados pela Média + DPM. N = 4 animais/grupo.

A figura 12(A) mostra os resíduos de nitrotirosina por Western Blotting, após a indução da tendinite em ratos.

Podemos observar um discreto aumento da intensidade das bandas no grupo tendinite sem tratamento (Colagenase) em comparação ao grupo salina.

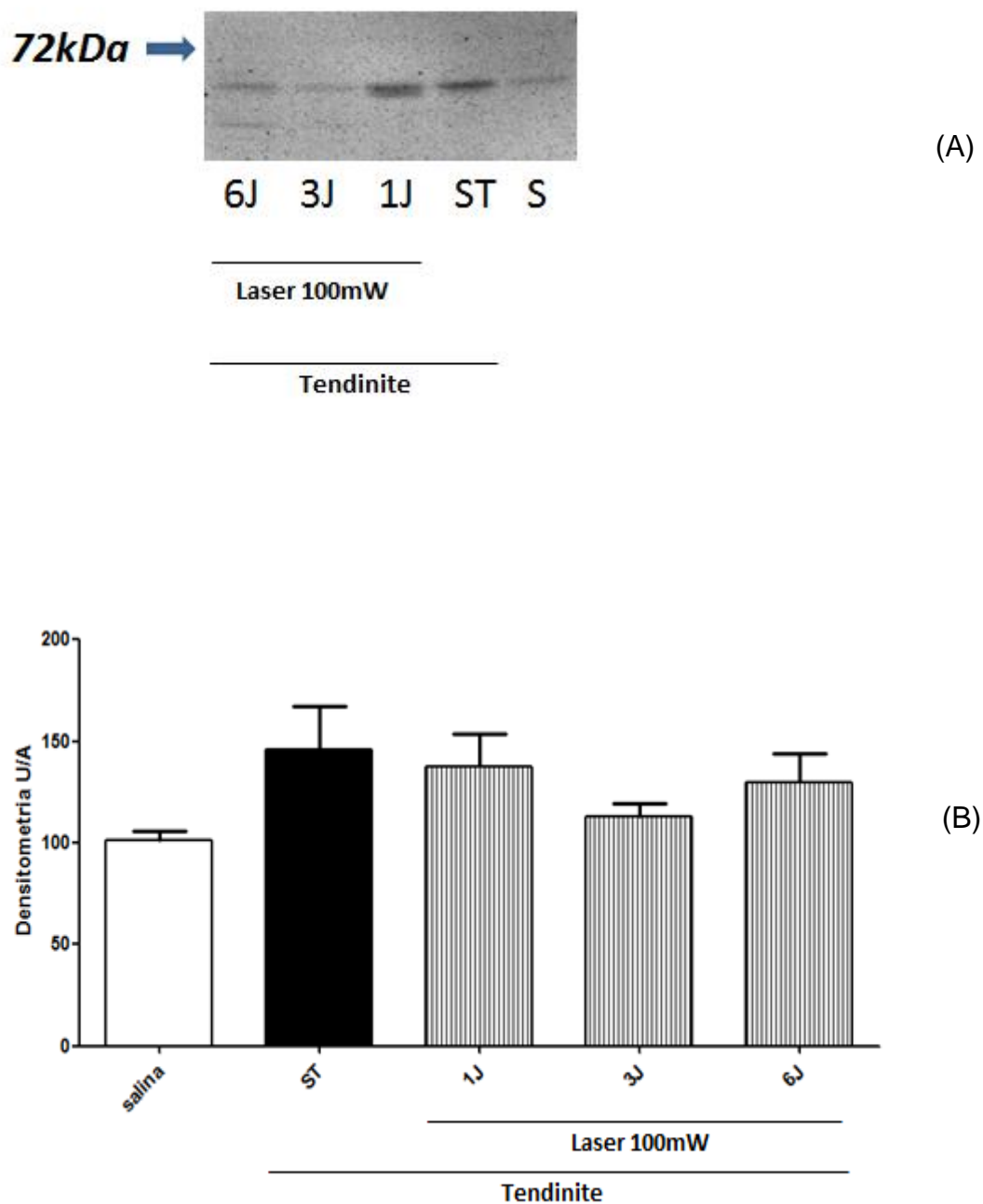
O grupo com tendinite e tratado com irradiação laser na energia de 1Joule também apresentou aumento na intensidade das bandas de nitrotirosina quando comparado ao grupo salina. Os grupos com tendinite e irradiados com 3Joules e 6Joules apresentaram discreta redução na intensidade das bandas em comparação ao grupo tendinite sem tratamento (Colagenase).

## **5.7 Expressão protéica de COX-2 e tratamento Laser**

A figura 13, mostra a expressão protéica da enzima COX-2, 12 horas após a indução da tendinite.

Podemos observar que o grupo tendinite sem tratamento apresentou um discreto aumento na expressão protéica de COX-2 em comparação ao grupo saudável (salina).

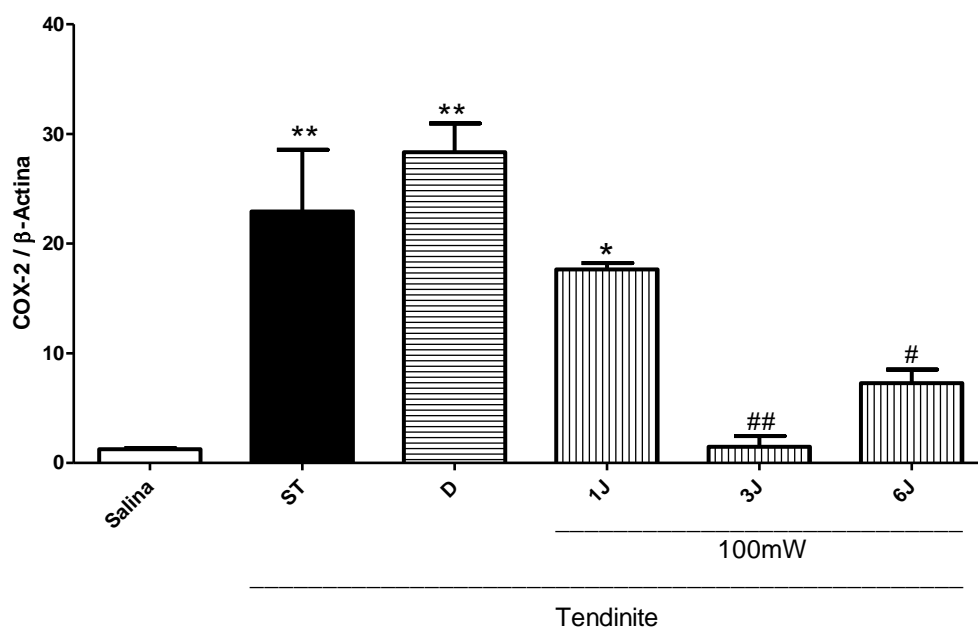
O grupo com tendinite e tratado com laser na energia de 3 Joules, apresentou discreta redução na expressão protéica de COX-2.



**Figura 13.** Expressão protéica da enzima COX-2, 12 horas após a indução da tendinite. Grupos: salina (controle), tendinite sem tratamento (ST) e grupos com tendinite e tratados com Laser 810nm – 100mW na energia de 1J, 3J e 6J. N = 4 animais/grupo. (A) Membrana representativa (B) Densitometria. (Técnica de Western Blotting). Os valores estão representados pela Média + DPM. N = 4 animais/grupo.

## 5.8 Expressão Gênica de COX-2 e tratamento Laser

A figura 14 mostra a expressão gênica da enzima COX-2 após 2 horas da indução da tendinite em tendões saudáveis e doentes. É possível observar o aumento desta expressão no grupo tendinite sem tratamento quando comparado ao grupo salina. Os grupos tendinite tratado com diclofenaco de sódio e o grupo irradiado com laser na energia de 1 Joule também apresentaram aumento da expressão de COX-2. Somente os grupos irradiados com 3J e 6J apresentaram redução desta expressão quando comparados ao grupo sem tratamento. O grupo irradiado com 3 Joules apresentou significativa redução da expressão protéica de COX-2, chegando a valores próximo do grupo salina.



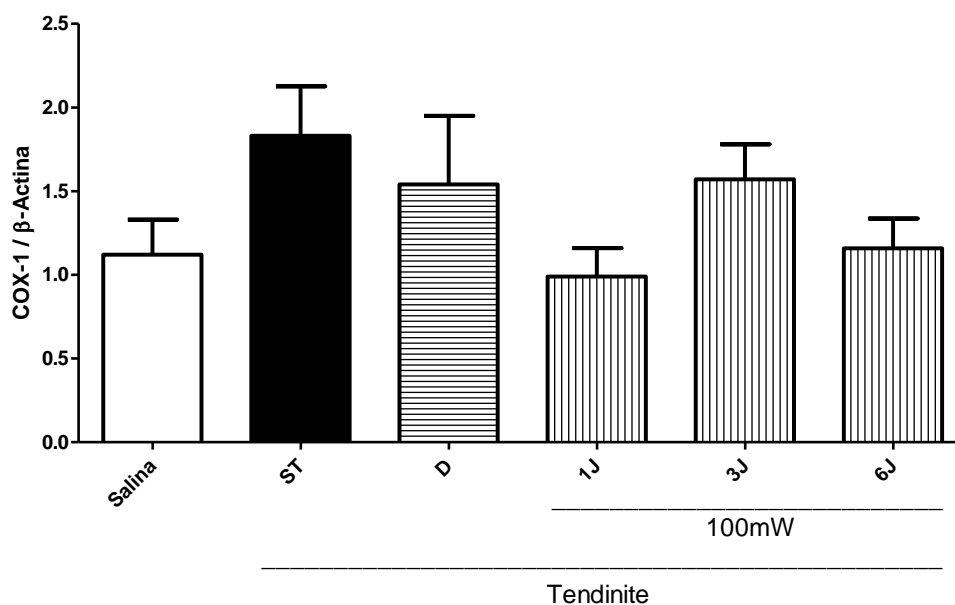
**Figura 14.** Gráfico da expressão gênica de COX-2 em animais com tendinite. Material analisado 2 horas após a indução por collagenase. Grupos: salina (controle), tendinite sem tratamento (ST) e grupos com tendinite e tratados com Diclofenaco de sódio e com Laser 810nm – 100mW na energia de 1J, 3J e 6J. Os valores estão representados pela Média + DPM. N = 5 animais/grupo. (\*p<0,05 e \*\*p<0,01 vs controle salina e #p<0,05 e ##p<0,01 vs ST).

## 5.9 Expressão Gênica de COX-1 e tratamento Laser

A figura 15 mostra a expressão gênica da enzima COX-1, 2 horas após a indução da tendinite. Observa-se um discreto aumento na expressão de COX-1 nos animais com tendinite sem tratamento quando comparados ao grupo salina.

Os grupos irradiados com 1J e 6J apresentaram pequena redução desta expressão, quando comparados ao grupo sem tratamento.

Os outros grupos (Diclofenaco e irradiado com 3J) não apresentaram diferenças em relação ao grupo salina ou em relação ao grupo sem tratamento.



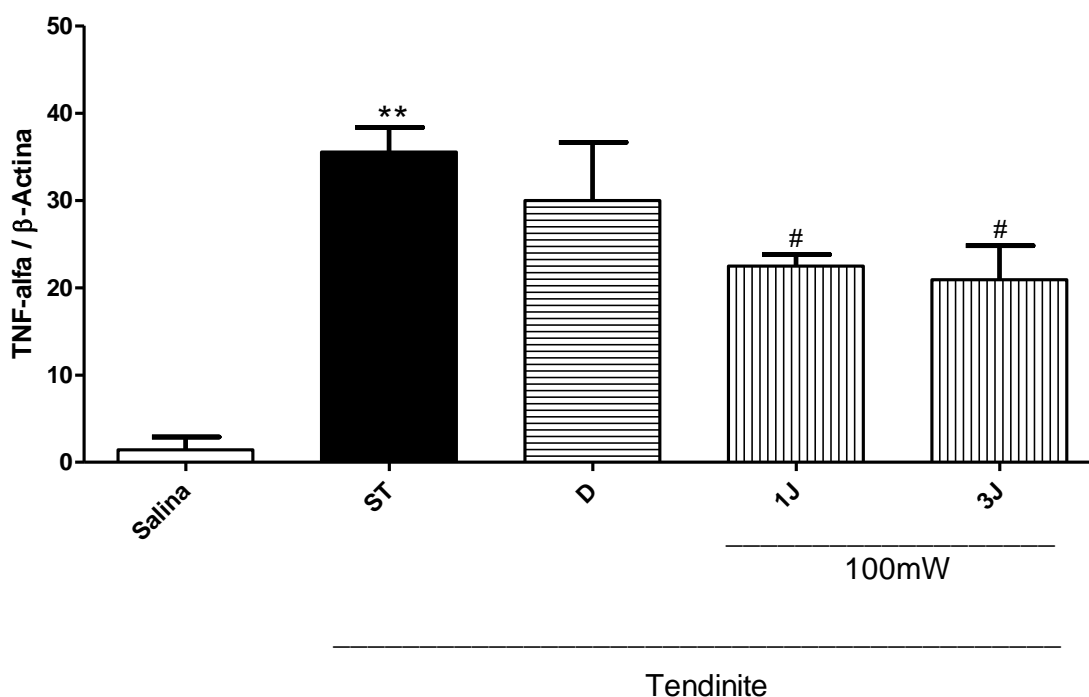
**Figura 15.** Gráfico da expressão gênica de COX-1 em animais com tendinite. Material analisado 2 horas após a indução por colagenase. Grupos: salina (controle), tendinite sem tratamento (ST) e grupos com tendinite e tratados com Diclofenaco de sódio e com Laser 810nm – 100mW na energia de 1J, 3J e 6J. Os valores estão representados pela Média + DPM. N = 5 animais/grupo.

## 5.10 Expressão Gênica de TNF-a na tendinite e tratamento Laser

O gráfico seguinte mostra a expressão gênica de TNF-alfa, 2 horas após a indução do processo inflamatório pela injeção de collagenase, sendo composto por um grupo controle (salina) onde não houve a indução da tendinite. Os outros grupos apresentam tendinite e estão divididos em grupo não tratado (ST) e grupos tratados com diclofenaco (D) ou com laser em duas energias diferentes (1J e 3J).

Podemos observar que todos os grupos, exceto o grupo salina apresentaram um valor acentuado na expressão gênica de TNF-alfa. O 2º grupo (sem tratamento) e o 3º grupo (tratado com diclofenaco de sódio) apresentaram um aumento maior que os grupos irradiados.

Ao comparar os grupos tratados (diclofenaco e laser) com o grupo não tratado, observamos que enquanto o grupo diclofenaco não apresentou significativa alteração, os grupos irradiados apresentaram redução significativa na expressão gênica de TNF-alfa.



**Figura 16.** Gráfico da expressão gênica de TNF- $\alpha$  em tendões calcâneo de ratos. Grupos: Controle (Salina) e tendinite, não tratado (ST) e tratado com Diclofenaco de Sódio (D) ou com Laser 810nm (1Joules e 3Joules). Os valores estão representados pela Média + DPM. N = 5 animais/grupo. \*\* $p < 0,01$  vs salina e # $p < 0,05$  vs ST.

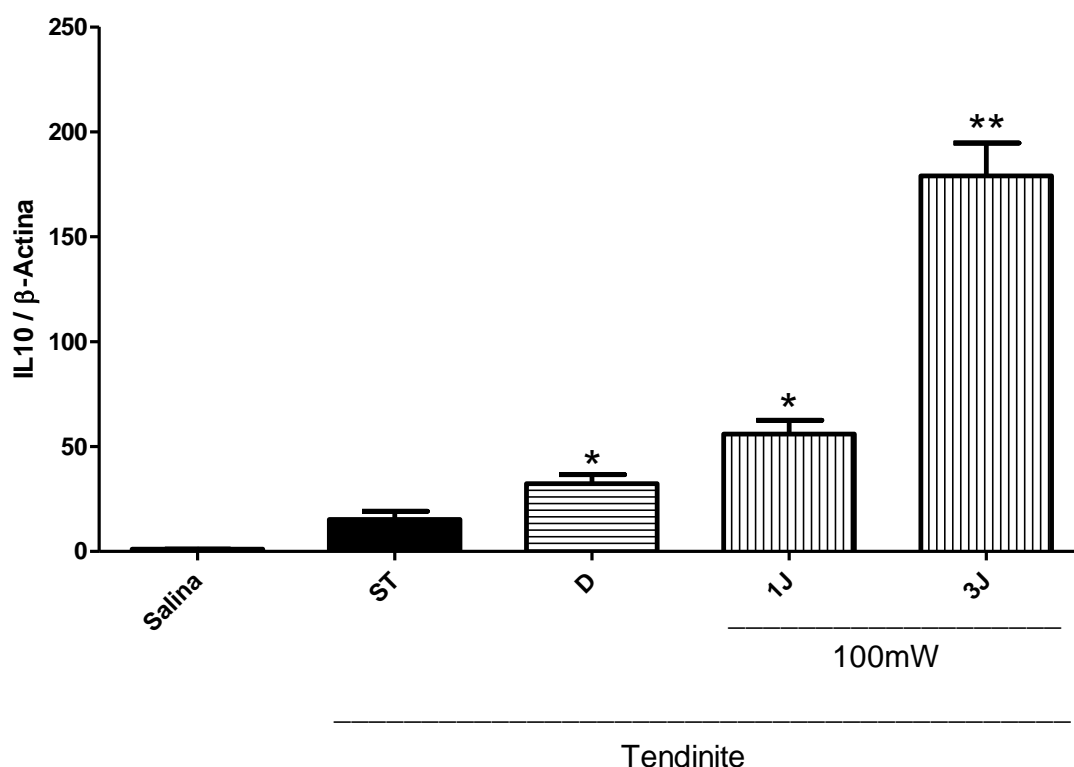


### 5.11 Expressão Gênica de IL-10 na tendinite e tratamento Laser

O gráfico seguinte nos mostra a expressão gênica de IL-10 em tendões calcâneo, 2 horas após a indução do processo inflamatório pela injeção de collagenase.

Neste gráfico podemos observar que o grupo sem tratamento apresentou discreto aumento da expressão de IL-10, porém não significativo quando comparado ao grupo salina. Todos os grupos com tendinite e que receberam tratamento, apresentaram aumento significativo na expressão de IL-10 em comparação ao grupo salina.

O grupo irradiado com energia de 3 Joules apresentou o maior aumento desta expressão em relação aos outros grupos tratados.

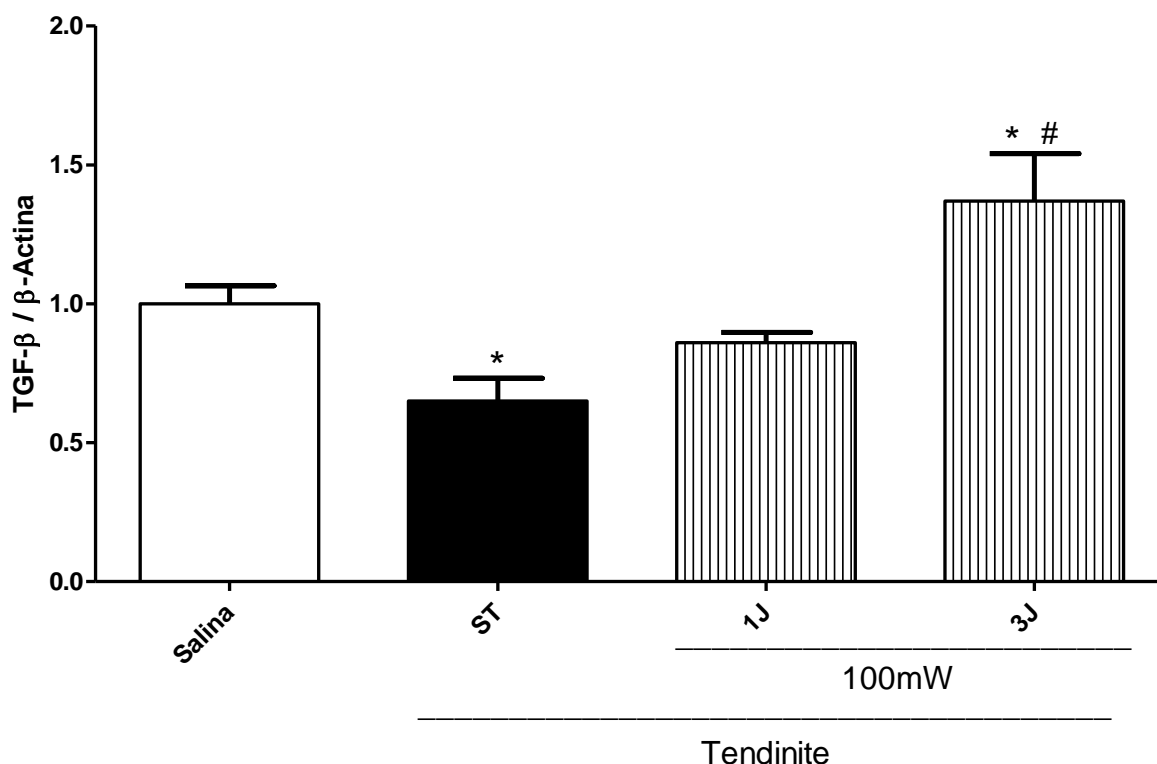


**Figura 17.** Gráfico da expressão gênica de IL-10 em tendões calcâneo de ratos. Grupos: Salina (Controle) e tendinite sem tratamento (ST) ou tratado com Diclofenaco de Sódio (D) ou com Laser 810nm – 100mW nas energias de 1Joules ou 3Joules. Os valores estão representados pela Média + DPM. N = 6 animais/grupo. \*p<0,05 e \*\*p<0,01 vs ST.

## 5.12 Expressão Gênica de TGF- $\beta$ na tendinite e tratamento Laser

O gráfico seguinte mostra a expressão gênica de TGF- $\beta$ , duas horas após a indução da tendinite. O primeiro grupo (salina) é o grupo controle onde não houve indução do processo inflamatório. Os outros grupos, não tratado e grupo tratado com laser em duas energias diferentes (1J e 3J) receberam a injeção de colagenase.

Podemos observar que a expressão gênica de TGF- $\beta$  está reduzida no grupo não tratado quando comparada ao grupo salina (controle). O grupo irradiado com energia de 3 Joules apresentou um aumento da expressão gênica de TGF- $\beta$  quando comparado ao grupo controle e ao grupo não tratado. O grupo tratado com laser na energia de 1 Joule não apresentou diferença significativa ao grupo salina ou ao grupo não tratado.



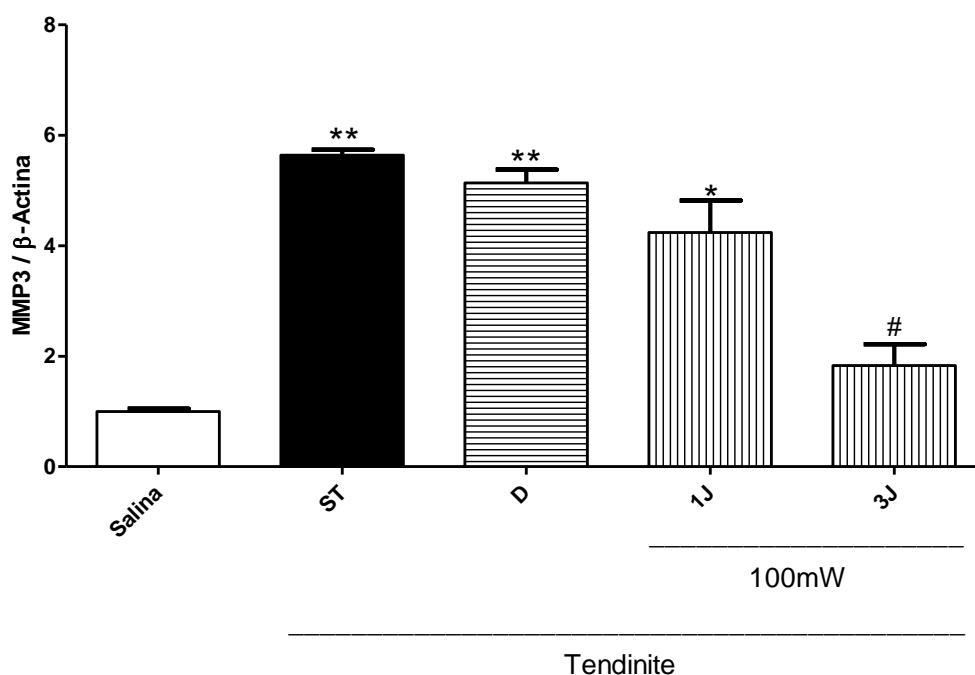
**Figura 18.** Gráfico da expressão gênica de TGF- $\beta$  em tendões calcâneo de ratos. Grupos: Controle (Salina) e tendinite, não tratado (ST) e tratado com Laser 810nm (1J e 3J). Os valores estão representados pela Média + DPM. N = 5 animais/grupo. \* $p < 0,05$  vs salina e #  $p < 0,05$  vs ST.

### 5.13 Expressão Gênica de MMP-3 na tendinite e tratamento Laser

No gráfico seguinte, a expressão gênica de MMP-3 no grupo sem tratamento (ST) é aumentada significativamente após a indução da tendinite quando comparado ao grupo salina (controle).

O grupo com tendinite e tratado com diclofenaco de sódio (D) não conseguiu reduzir a expressão gênica de MMP-3 e o grupo irradiado com 1 joule apresentou discreta redução quando comparado ao grupo com tendinite sem tratamento.

O grupo irradiado com 3 Joules reduziu significativamente a expressão gênica de MMP-3 quando comparado ao grupo ST.



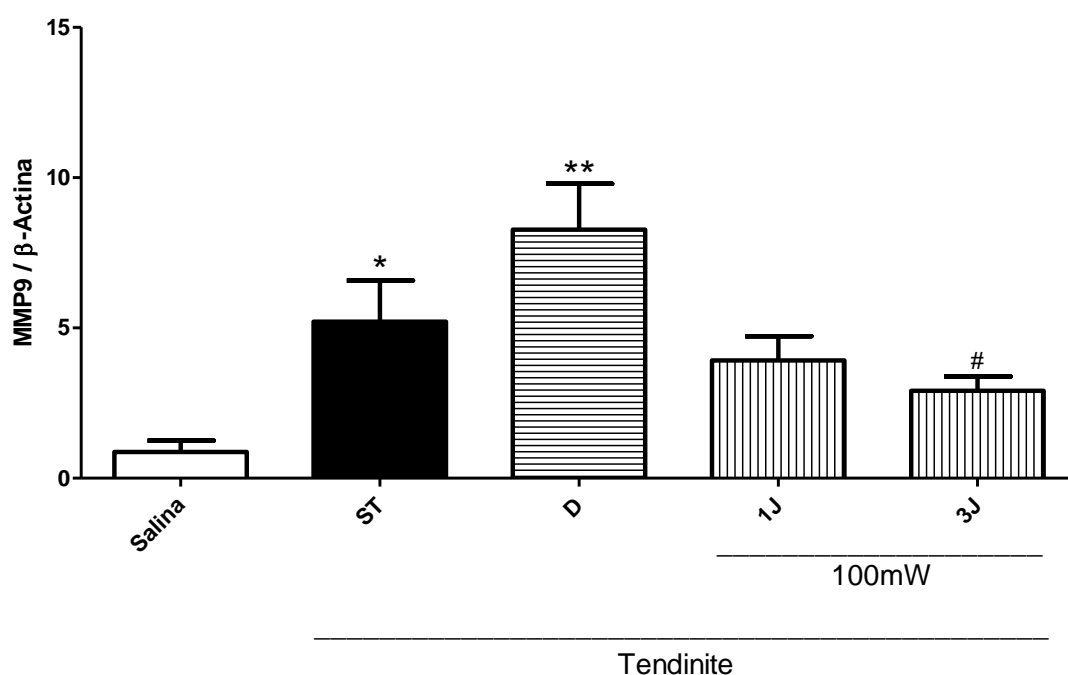
**Figura 19.** Gráfico da expressão gênica de MMP-3 em tendões calcâneo de ratos. Grupos: Salina (Controle) e tendinite, sem tratamento (ST) e tratado com Diclofenaco de Sódio (D) ou com Laser 810nm (1Joules e 3Joules na potência de 100mW). Os valores estão representados pela Média + DPM. N=6 animais/grupo. \*p<0,05; \*\*p<0,01 vs salina e # p<0,05 vs ST.

### 5.14 Expressão Gênica de MMP-9 na tendinite e tratamento Laser

No gráfico seguinte, podemos observar que a expressão gênica de MMP-9 no grupo não tratado (ST) apresentou um aumento significativo quando comparado ao grupo salina (controle).

O grupo tendinite tratado com diclofenaco de sódio apresentou aumento da expressão de MMP-9 quando comparado ao grupo sem tratamento. O grupo com tendinite e irradiado com 1 Joule apresentou discreta redução, mas não significativa em relação ao grupo ST.

O grupo irradiado com 3 Joules apresentou redução da expressão de MMP-9 quando comparado ao grupo ST.



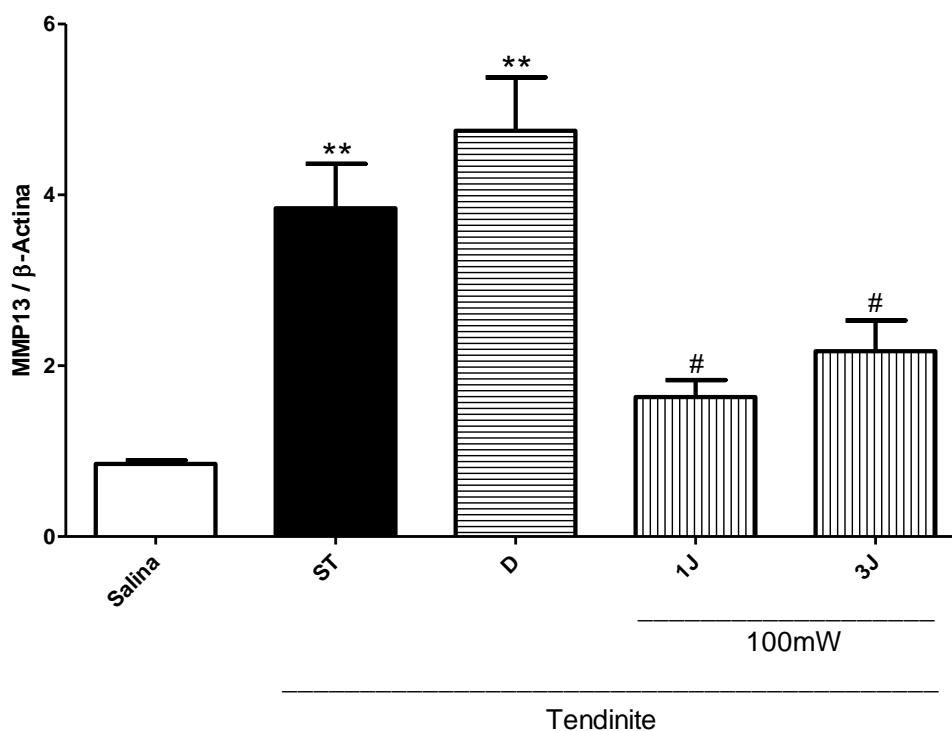
**Figura 20.** Gráfico da expressão gênica de MMP-9 em tendões calcâneo de ratos. Grupos: Salina (Controle) e tendinite, sem tratamento (ST) e tratado com Diclofenaco de Sódio (D) ou com Laser 810nm (1Joules e 3Joules na potência de 100mW). Os valores estão representados pela Média + DPM. N=6 animais/grupo. \*p<0,05; \*\*p<0,01 vs salina e # p<0,05 vs ST.

### 5.15 Expressão Gênica de MMP-13 na tendinite e tratamento Laser

O gráfico abaixo nos mostra a expressão gênica da metaloproteinase 13 (MMP-13) em tendão de ratos, 2 horas após a indução da tendinite e o tratamento farmacológico e com laser de baixa potência.

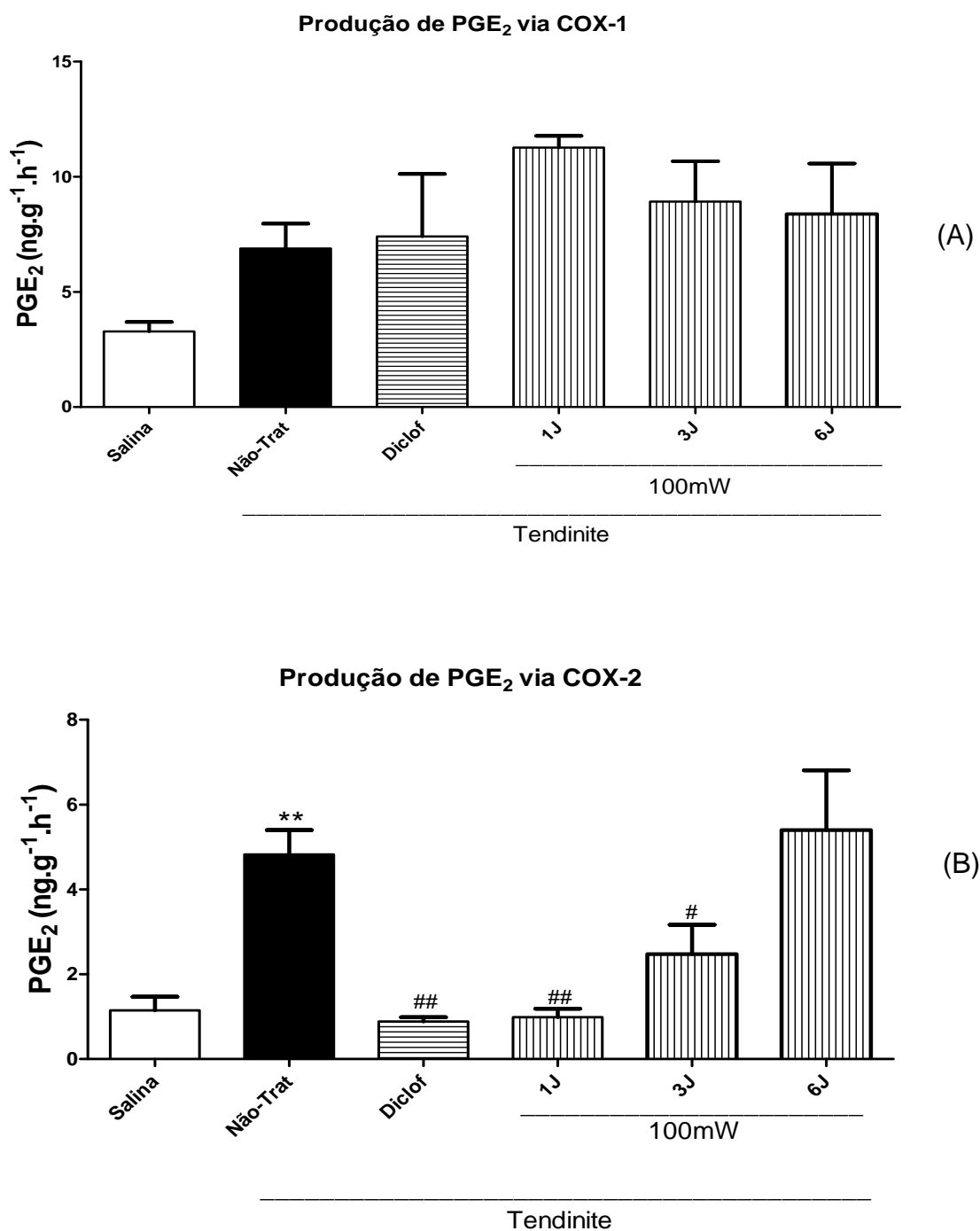
O grupo com tendinite e sem tratamento (ST) apresentou um aumento significativo da expressão de MMP-13 em comparação ao grupo salina. O grupo tratado com diclofenaco de sódio (D) não mostrou redução na expressão de MMP-13 quando comparado ao grupo não tratado.

Ambos os grupo irradiados com laser na energia de 1 Joule ou em 3 Joules reduziram a expressão de MMP-13.



**Figura 21.** Gráfico da expressão gênica de MMP-13 em tendões calcâneo de ratos. Grupos: Salina (Controle) e tendinite, sem tratamento (ST) e tratado com Diclofenaco de Sódio (D) ou com Laser 810nm (1 Joules e 3 Joules na potência de 100mW). Os valores estão representados pela Média + DPM. N=6 animais/grupo. \*\*p<0,01 vs salina e # p<0,05 vs ST.

## 5.16 Efeito do laser de baixa potência sobre a Geração de PGE2 (in vitro)



**Figura 22.** Gráfico da geração de PGE<sub>2</sub> derivada de COX-1 (A) e derivada de COX-2 (B), 12 h após a indução da tendinite. Grupos: salina (controle), tendinite sem tratamento (ST) e grupos com tendinite e tratados com Diclofenaco de sódio e com Laser 810nm – 100mW na energia de 1J, 3J e 6J. Os valores estão representados pela Média + DPM. N = 5 animais/grupo. Em (B), \*\*p<0,01 vs salina; #p<0,05 e ## p<0,01 vs ST.

No gráfico da figura 22, podemos observar a geração de prostaglandina E2 em tendões de ratos 2 horas após a indução da tendinite. Em (A), na presença de inibidor de COX-2 (etoxicoxib) foi observado a geração de PGE2 via COX-1.

Neste gráfico podemos observar um aumento dos níveis de PGE2 em todos os grupos com tendinite quando comparados ao grupo controle salina.

O gráfico (B) mostra a geração de PGE-2 derivado da COX-2. Neste gráfico podemos observar que o grupo com tendinite sem tratamento apresentou aumento significativo na geração de PGE-2 em comparação ao grupo salina.

Os grupos com tendinite porém tratados com diclofenaco de sódio ou irradiado com laser na energia de 1J e 3J apresentaram redução destes níveis, quando comparados ao grupo sem tratamento.

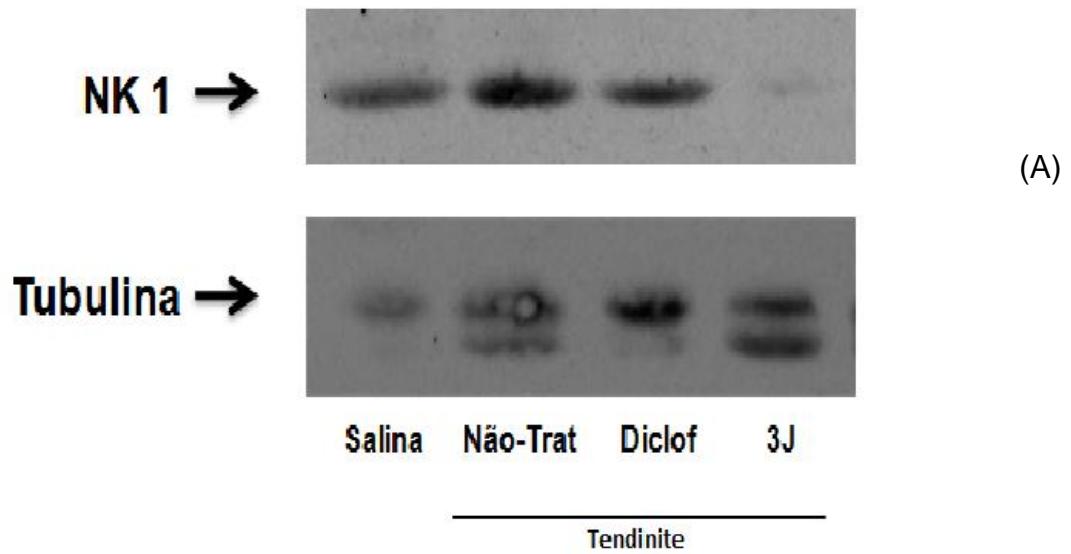
O grupo irradiado com 6J não acompanhou os grupos tratados, apresentando um aumento da geração de PGE-2.

### **5.17 Efeito do laser sobre a expressão protéica de NK-1**

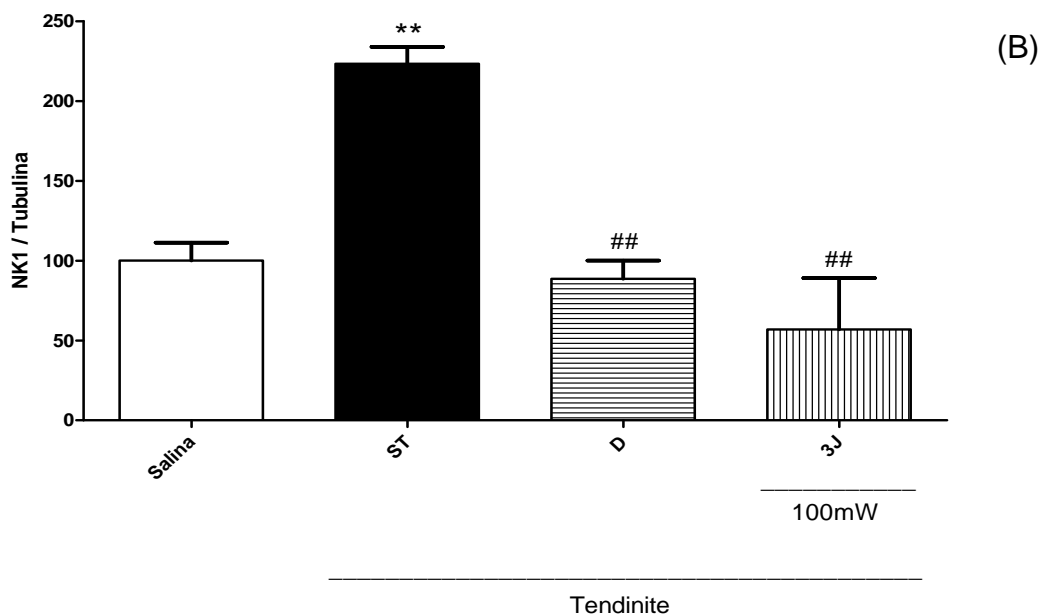
O gráfico da figura 23 mostra a expressão protéica do receptor NK1 em tendões calcâneo de ratos 12 horas após a injeção de colagenase. O grupo tendinite sem tratamento (ST) apresentou um aumento significativo na expressão de NK1 quando comparado ao grupo salina.

Os grupos tendinite com tratamento (farmacológico ou laser) apresentaram uma redução na expressão protéica de NK1, quando comparado ao grupo tendinite sem tratamento.

Não houve alterações significativas entre o grupo salina e os grupos tratados com Diclofenaco de sódio ou com laser na energia de 3 joules.



**Expressão Protéica de NK1 por Western Blotting na tendinite induzida por colagenase - Densitometria**



**Figura 23.** Expressão protéica de NK1 em tendões de ratos 12 horas após a indução da tendinite. (A) Membrana representativa e (B) Gráfico da densitometria (relação NK1 / Tubulina). Grupo Controle (Salina) e grupos tratados com Diclofenaco de sódio (D) e Laser (energia de 3 Joules). Os valores estão representados pela Média + DPM. N = 4 animais/grupo. \*\*p<0,01 vs salina e ## p<0,01 vs ST.



### 5.18 Efeito do Laserterapia (810nm) em diferentes marcadores inflamatórios

A tabela abaixo apresenta um resumo dos marcadores inflamatórios avaliados e suas alterações após a indução da tendinite, nos grupos sem tratamento ou tratados com diclofenaco de sódio ou laser. A coluna ST apresenta resultados do grupo não tratado comparados aos resultados do grupo salina. As demais colunas (D, 1J, 3J e 6J) apresenta resultados em comparação ao grupo sem tratamento (ST).

	Grupos				
	ST	D	1J	3J	6J
Edema (Diferenças de Peso)	↑	↑	↑	↓	↑
Edema (Azul de Evans)	↑	↑	↑	↓	↓
Atividade MPO	↑	↑	↑	↓	Ø
Resíduos Nitrotirosina (NT)	↑	Ø	↑	↓	↓
Expressão Protéica COX-2	↑	Ø	↑	↓	↑
COX-1 (PCR-RT)	↑	=	=	=	=
COX-2 (PCR-RT)	↑	↑	↑	↓	↓
TNF- $\alpha$ (PCR-RT)	↑	↑	↓	↓	Ø
IL-10 (PCR-RT)	↓	↑	↑	↑	Ø
TGF- $\beta$ (PCR-RT)	↓	Ø	=	↑	Ø
MMP-3 (PCR-RT)	↑	↑	↑	↓	Ø
MMP-9 (PCR-RT)	↑	↑	=	↓	Ø
MMP-13 (PCR-RT)	↑	↑	↓	↓	Ø
PGE2 via COX2	↑	↓	↓	↓	↑
PGE2 via COX1	↑	↑	↑	↑	↑
Expressão Protéica NK-1	↑	↓	Ø	↓	Ø

**Figura 24.** Resultados obtidos pelo tratamento com Laserterapia e Diclofenaco de sódio na tendinite induzida em ratos. Grupos: Salina (S), tendinite sem tratamento (ST) e tratados com diclofenaco de sódio (D) ou com laser nas energias de 1J, 3J e 6J. Resultados de ST comparado a Salina. Resultados de D, 1J, 3J, 6J comparados a ST. ↑ aumento; ↓ redução; = sem alteração; Ø não realizado

## 6 DISCUSSÃO

Processos inflamatórios como a tendinite são desordens comuns na sociedade moderna (FELSON et al., 2000). Estas desordens geralmente produzem dor crônica e podem levar a degeneração do tecido.

Segundo meta-análises recentes, dos poucos estudos em longo prazo, realizados a respeito de tendinopatias, não há nenhuma intervenção totalmente eficaz na regeneração tecidual e redução da dor (BJORDAL et al., 2004). Os estudos atuais visam a descoberta de novas alternativas terapêuticas que promovam a inibição de citocinas como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  e inibidores de metaloproteinases (KRASNOKUTSKY *et.al* , 2007). Neste sentido, a tendinite aparece como alvo de preocupação tanto da medicina do esporte quanto da medicina do trabalho.

A Terapia com Laser de Baixa Potência vem sendo explorada desde a década de 60 (MESTER et al., 1969) e aparece como uma alternativa terapêutica com boa perspectiva de uso. Em nosso estudo, investigamos os efeitos da laserterapia de baixa potência, uma alternativa terapêutica não farmacológica, sobre importantes mediadores inflamatórios envolvidos na inflamação aguda do tendão, utilizando para isto, o modelo de tendinite induzida, em tendões calcâneo de ratos. O antiinflamatório não-esteroidal diclofenaco de sódio foi escolhido como grupo farmacológico e os grupos irradiados com laser em 3 diferentes energias (1, 3 ou 6 Joules) a fim de determinar os melhores parâmetros para o tratamento.

Dentre os vários modelos experimentais, foi escolhido o modelo de inflamação aguda do tendão induzida por colagenase, muito utilizado no estudo de tendinopatias, por tratar-se de um dos modelos que se assemelha ao quadro de inflamação aguda do tendão em humanos. Este modelo de indução da inflamação é bem conhecido no estudo da tendinite em que o edema e a destruição aguda da matriz extracelular são similares aos encontrados nos ferimentos naturais do tendão, sendo considerado um excelente modelo que permite investigar alterações moleculares e histológicas *“in vivo”* (WARDEN, 2007). O tecido tendíneo após a indução da tendinite apresenta características típicas de inflamação aguda, com extravazamento e infiltração maciça de eritrócitos. A integridade do tendão é reduzida, sendo visível a formação de edema e pontos de necrose (CHEN et al., 2004).

As respostas biológicas, no processo inflamatório agudo do tendão originado por um agente lesivo, promovem o combate do agente agressor e elimina produtos resultantes da destruição celular, buscando promover condições ideais para o reparo do tecido lesado. Neste trabalho tentamos entender o processo inflamatório agudo do tendão e as alterações biológicas após a lesão. Foi utilizado inicialmente análises bioquímicas para avaliar as possíveis alterações durante a inflamação e no tratamento com o laser de baixa potência.

A análise dos resíduos de Nitrotirosina é um dado utilizado para quantificar a lesão celular. Os resíduos são formados a partir de fragmentos da membrana celular após a morte da célula. A lesão pode provocar um aumento na formação de radicais livres que podem ser relacionados ao aumento do estresse oxidativo. Desta forma, o aumento na intensidade das bandas relacionadas aos resíduos de nitrotirosina obtido por Western Blotting pode ser interpretado como aumento da lesão induzida pela colagenase. Neste trabalho, a intensidade das bandas de nitrotirosina foi aumentada no intervalo de 12 horas após a indução da tendinite.

Outro fator observado foi o edema formado neste tecido. Foram utilizados 2 métodos de verificação da progressão do edema. O primeiro foi o cálculo da diferença entre a massa inicial e final (peso úmido – seco) dos tendões expostos ao procedimento com colagenase. O segundo método foi a mensuração do extravasamento plasmático, pela técnica de extração do corante Azul de Evans no tecido.

Na avaliação do edema pela diferença do peso úmido e seco, foram utilizados 2 grupos (salina e tendinite sem tratamento). Neste primeiro ensaio, ambos os grupos passaram pelo procedimento de receber a injeção, porém, um grupo recebeu apenas salina estéril (0,9%) enquanto o outro grupo recebeu colagenase diluída. O grupo salina foi utilizado como controle para verificar se apenas a lesão da agulha seria suficiente para causar edema e se a técnica com a utilização de colagenase poderia induzir o processo inflamatório agudo do tendão.

A segunda técnica utilizada para mensurar o edema foi através do cálculo do extravasamento protéico pela obtenção da concentração de azul de Evans no tecido. Nesta técnica, é possível determinar a formação de edema no tecido pelo extravasamento do corante Azul de Evans que se liga a albumina plasmática, determinando assim, os valores de referência e o aumento máximo do fluxo transcapilar do corante no tendão.

Durante condições fisiológicas normais, não ocorre passagem de proteínas plasmáticas dos capilares ao espaço intersticial. Entretanto, na inflamação há essa passagem, com uma estimativa em torno de cinco a sete vezes maior em relação a um vaso normal (MOITRA et al., 2007).

A formação do edema é uma característica desta inflamação aguda, que pode ser resultado do aumento no extravasamento protéico formado, junto ao exudato rico em proteínas, somado a fatores osmóticos e hidrostáticos, resultados de alterações no fluxo vascular, no calibre dos vasos, na permeabilidade vascular e na exsudação leucocitária (YASUDA et al., 2007). A presença de mediadores químicos na inflamação também podem alterar o fluxo transcapilar. A liberação inicial de substâncias como histamina, serotonina e bradicinina, além de causar dilatação arteriolar, induzem o aumento da permeabilidade vascular, permitindo o extravasamento de macromoléculas protéicas do plasma para o interstício. A atividade edematogênica desses mediadores pode ser potencializada pela ação concomitante de prostaglandinas vasodilatadoras (RAKOS et al., 2007).

Nestas condições patológicas, a permeabilidade vascular é alterada e os níveis de albumina nos tecidos elevam significativamente (YASUDA et al., 2007). Desta forma, o corante azul de Evans, combinado com a albumina, sofre deslocamento do espaço intravascular em direção ao espaço extravascular e deposita-se no interstício do tecido, como foi observado neste estudo, na formação do edema. Nossos resultados mostraram que a técnica de indução da tendinite, conseguiu simular um processo inflamatório pelo aumento significativo do edema, 12 horas após os tendões receberem colagenase.

Através da determinação do curso temporal dos resíduos de nitrotirosina e da análise do edema, foi possível escolher este intervalo de tempo em que os valores do edema e dos resíduos de nitrotirosina foram maiores quando comparados ao grupo controle e utilizá-lo para os experimentos seguintes, a fim de avaliar a formação de mediadores inflamatórios e comparar os valores encontrados nos diferentes grupos experimentais entre animais tratados e não tratados.

Nesta etapa, foi acrescentado grupos irradiados com LBP em diferentes energias e um grupo tratado com diclofenaco de Sódio. Observamos que neste último grupo, o fármaco não conseguiu reduzir o edema provocado pela colagenase. Algumas terapias farmacológicas podem não apresentar resultados eficazes na redução do edema, como foi o caso do Diclofenaco de Sódio na dose de 1mg/kg

(I.M.), um fármaco bastante indicado como terapia farmacológica inicial. Este resultado pode estar relacionado as características do tendão, por ser um tecido pouco vascularizado. Neste caso, a escolha de outra via de administração, como o tratamento tópico ou injeções locais poderiam apresentar redução na inflamação, porém podem haver efeitos secundários.

Já os animais do grupo irradiados com 3J e 6J apresentaram uma redução significativa do edema. Os resultados obtidos pela técnica da Extração do Azul de Evans corroboram com os obtidos pela diferença entre o peso úmido e seco do tendão, mostrando o efeito anti-edematogênico do Laser, no modelo de indução da tendinite.

O Efeito da Laserterapia na redução do edema já é conhecido na literatura. Yousefi-nooraie (2007) e Schindl et al. (2000), também relataram a ação do laser de baixa potência na reabsorção de exsudatos, na eliminação de substâncias alógenas, redução na síntese de prostaglandinas e na manutenção da permeabilidade normal de vênulas e arteríolas, porém, o mecanismo de ação deste efeito anti-edematogênico ainda não foi totalmente explicado, mas pode estar relacionado a um segundo efeito importante de inibição da migração leucocitária, principalmente de neutrófilos (LOPES-MARTINS et al., 2005, 2006; CORREA et al., 2008).

Assim, outro fator importante avaliado foi o comportamento celular no tecido após o agente lesivo verificando a atividade destas células de defesa nos diferentes tratamentos. A mieloperoxidase é uma enzima localizada nos grânulos das células polimorfonucleares e sua presença pode indicar a presença e atividade de células de defesa como os neutrófilos. No caso do tendão, nem sempre este tecido apresentará infiltrado inflamatório devido suas características de apresentar pouca vascularização ou pelo fato deste tecido transitar entre períodos de tendinose e tendinite, variando alguns sintomas da inflamação. Porém o aumento da atividade desta enzima pode significar uma degeneração tecidual decorrente do processo inflamatório (DYKE et al., 2003; QUEIROZ-JUNIOR et al., 2009).

Neste trabalho, a atividade de MPO no grupo tendinite sem tratamento foi 10 vezes maior que no grupo salina (saudável). Este resultado pode indicar tanto a instalação do processo inflamatório quanto a degeneração tecidual.

Um aumento maior da atividade desta enzima foi observado no grupo tendinite tratado com diclofenaco de sódio e no grupo tendinite irradiado na energia de 1 Joule apresentando uma atividade 50% maior que o grupo não tratado. Estes 2

grupos apresentaram uma discreta tendência (porém não significativa) na redução do edema mas não conseguiram reduzir o atividade neutrofílica e provavelmente a inflamação.

Ao contrário, o grupo irradiado com 3 Joules apresentou cerca de 50% de redução na atividade da MPO em comparação ao grupo tendinite sem tratamento, sendo o grupo onde o edema foi menor. Provavelmente a energia de 3 Joules teve um efeito protetor pela redução da atividade da MPO, desta forma reduzindo os danos causados pela inflamação. No entanto, apesar da grande redução da atividade de MPO, este grupo ainda apresentou discreto aumento deste índice quando comparado ao grupo controle.

Estas análises mostram a ação do LBP na redução do edema e na atividade neutrofílica. Porém existem outros fatores importantes que participam da inflamação. Assim, tornou-se importante investigar o comportamento da expressão de enzimas como a COX-1 e COX-2 e de determinados mediadores químicos, no processo inflamatório em questão para melhor compreender os possíveis mecanismos de ação da Laserterapia no processo inflamatório do tendão.

A inflamação que se desenvolve frente a um estímulo danoso é um evento benéfico que visa à restauração do tecido e a remoção do agente agressor, visando um retorno a homeostase. Porém, durante este processo ocorre a formação de vários mediadores químicos de ação pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias. Estes mediadores da inflamação também são produzidos pelas vias da ciclooxigenase (COX-1 e COX-2) e lipoxigenase, a partir do metabolismo do ácido araquidônico e outros ácidos graxos. A oxidação do ácido araquidônico pode ser realizada por duas vias enzimáticas: ciclooxigenase e lipoxigenase. A enzima COX possui duas isoformas, COX-1 e COX-2, codificadas por dois diferentes genes, com distintos padrões de expressão. A diferença importante entre as duas isoformas da COX é a maneira com que elas são reguladas. A premissa inicial era de que havia uma distinção simples: COX-1 seria uma enzima constitutiva, envolvida em processos fisiológicos, como proteção da mucosa GI e vasodilatação renal. Ao contrário, COX-2 seria uma enzima induzida, com expressão aumentada em processos inflamatórios e de transformação celular.

Assim, foi realizada a quantificação da expressão protéica de COX-2 e dos resíduos de Nitrotirosina por Western Blotting, para verificar possíveis alterações na expressão desta enzima ou no estresse oxidativo proveniente da lesão tecidual e

comparar ao grupo tratado. As membranas obtidas a partir desta técnica mostraram um aumento dos resíduos de nitrotirosina nos tendões inflamados pela ação da collagenase, quando comparados com os tendões que receberam apenas salina. Na expressão protéica de COX-2, observamos também uma alteração na intensidade das bandas, novamente aumentadas nos grupos tendinite sem tratamento, quando comparados ao grupo salina, sugerindo um aumento do processo inflamatório provocado no grupo onde a tendinite foi induzida. Estes resultados, do aumento dos resíduos de nitrotirosina e da expressão protéica para COX-2, no grupo tendinite sem tratamento é bastante compreensível, devido a lesão tecidual implantada no local da indução da inflamação.

Porém, quando analisamos os resultados obtidos nos grupos tratados com LBP, observamos um aumento na intensidade das bandas, tanto dos resíduos de Nitrotirosina, quanto da Expressão Protéica de COX-2, nos animais irradiados com 1 Joule de energia. O grupo irradiado com 3 Joules apresentou menor intensidade das bandas que o grupo tendinite sem tratamento. A partir destes resultados, podemos sugerir que, enquanto o grupo tendinite sem tratamento apresenta um aumento do processo inflamatório, pelo aumento dos resíduos de Nitrotirosina e da expressão protéica de COX-2, o grupo irradiado com 3 Joules estaria reduzindo o processo inflamatório, pela redução destes mesmos índices.

Os resultados de expressão protéica e da formação do edema nos mostram um panorama do processo inflamatório agudo do tendão, onde tanto as alterações na permeabilidade quanto a presença de fragmentos protéicos obtidos pela morte celular, já estão presentes. Através do RT-PCR em tempo real, podemos analisar a expressão gênica destas enzimas e de outros mediadores inflamatórios antes da formação da proteína e comparar com os resultados obtidos anteriormente.

Inicialmente, foi realizado um experimento utilizando apenas grupos tendinite sem tratamento e grupos salina e então analisada a expressão gênica para COX-1 e COX-2 em diferentes intervalos de tempo para a determinação do curso temporal na expressão destas enzimas. Nosso resultado mostrou uma maior expressão de mRNA para COX-2, no tempo de 2 horas após a indução da tendinite. Assim, utilizamos este intervalo de tempo para as demais análises por RT-PCR em tempo real, a fim de investigar se os diferentes tratamentos alterariam esta expressão.

Ao analisar os resultados da expressão gênica de COX-2 e após comparar os resultados dos grupos tratados e não tratados com LBP, observamos a redução

desta expressão em alguns grupos irradiados, quando comparados ao grupo tendinite sem tratamento.

Os grupos irradiados com 3 e 6 Joules, apresentaram redução da expressão gênica de COX-2, enquanto o grupos tendinite sem tratamento e tendinite irradiado com 1J apresentaram um aumento do mesmo índice. O primeiro resultado mostra uma ação anti-inflamatória clássica, próxima a de outros fármacos de ação antiinflamatória, sugerindo a redução do processo inflamatório pela redução na expressão gênica de COX-2 nos grupos irradiados com 3 e 6 Joules.

De forma semelhante, quando analisamos os resultados da expressão de mRNA para COX-1, verificamos que apesar dos valores da expressão gênica serem inferiores aos valores de COX-2, o grupo tendinite sem tratamento também apresentou um aumento na expressão desta enzima. Os grupos irradiados apresentaram perfis opostos ao apresentado em COX-2. Neste caso, seria interessante investigar se a alteração na expressão gênica de COX-2 pode alterar a expressão gênica de COX-1.

O grupo tendinite e tratado com 3 Joules apresentou redução tanto na expressão gênica quanto na expressão protéica de COX-2. Este resultado sugere uma possível ação antiinflamatória do tratamento laser na energia de 3 Joules, pela redução na formação desta enzima.

Além da liberação de Prostaglandina pela via da ciclooxigenase, esta enzima apresenta funções não de apenas propagar a resposta inflamatória, mas também de resolução da mesma. Um estudo feito em animais “knock out” para COX-2, foi verificado que mesmo após indução do agente lesivo, havia uma resposta, sugerindo que não apenas a COX-2 propaga a inflamação mas também a COX-1, e neste mesmo estudo foi demonstrado que os animais desenvolviam peritonite supurativa constituindo em uma inflamação crônica. Isto sugere que a COX-2 possui propriedades de resolução da inflamação (RAJAKARIAR et al., 2006).

Desta forma, os resultados obtidos com o grupo diclofenaco e com o grupo 1J poderia indicar uma possível resolução da inflamação, já que estes grupos também apresentaram redução na geração de PGE<sub>2</sub>, *in vitro*. Porém, este mecanismo deve ser melhor investigado a fim de verificar se este aumento da expressão protéica de COX-2 em 1 Joule estaria relacionado com a resolução do processo inflamatório.



O reparo do tendão é um processo complicado com frequente formação de cicatriz e alteração das características iniciais do tecido íntegro. A cicatriz inicialmente fornece a continuidade física do tecido, porém a proliferação de tecidos adjacentes é indesejável por impedir o mecanismo de deslizamento do tendão (RICCHETTI et al., 2008). Uma maneira de reduzir estas alterações seria controlar o processo de cicatrização pela modulação do processo inflamatório e dos níveis de citocinas anti e pró-inflamatórias envolvidas no reparo.

O TNF- $\alpha$  é um fator que pode modular este processo inflamatório no tendão. Seus níveis geralmente são aumentados na presença de doenças osteomusculares, como a tendinite, sendo importante no processo de degeneração do tecido por induzir o aumento de células inflamatórias (HAYER et al., 2007).

Assim, o aumento da expressão gênica de TNF- $\alpha$  nos grupos onde a tendinite foi induzida significaria o aumento do processo inflamatório. O grupo tendinite sem tratamento estaria mais sujeito a degeneração tecidual pelo índice aumentado desta citocina. Por outro lado, a redução da expressão gênica de TNF- $\alpha$  nos grupos tratados com laser na energia de 1J e 3J poderia significar uma diminuição da inflamação pela redução na expressão desta citocina.

As interleucinas também são citocinas relacionadas à progressão da tendinite. A IL-10, junto com outras citocinas compartilham de muitas atividades funcionais, como a supressão de eventos pró-inflamatórios. IL-10 pode inibir a inflamação pela inibição de citocinas inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-12 e ainda TNF- $\alpha$  ou pelo aumento de receptores antagonistas de IL-1 nos macrófagos. IL-10 ainda pode inibir algumas MMPs que poderiam prejudicar o reparo tecidual (LIN et al., 2005).

Desta forma, o aumento da expressão gênica de IL-10 apresentado pelos grupos com tendinite que receberam tratamento farmacológico ou irradiação laser poderia significar a inibição de citocinas inflamatórias como a PGE2 promovendo a redução da inflamação no tendão. Novamente, o grupo tendinite irradiado com 3 Joules apresentou um resultado interessante pelo aumento significativo na expressão de IL-10, onde a redução do processo inflamatório poderia ter sido maior e o reparo tecidual acelerado, já que a IL-10 pode regular a atividade de determinadas MMPs.

Outro fator importante no processo inflamatório é o fator de crescimento TGF- $\beta$  que está envolvido na síntese e remodelação da matriz extracelular e na

produção de colágeno tipo I e III, sendo importante na aceleração do reparo do tendão. Sua redução pode significar a quebra da homeostasia, já que esta condição é encontrada em situações patológicas como nas tendinopatias (FENWICK et al., 2001).

Em nosso estudo, a redução deste fator nos grupos onde a tendinite foi induzida e onde não houve tratamento, pode significar que o processo inflamatório foi instaurado e provavelmente a síntese e remodelação da matriz celular e de colágeno esteja comprometida. Novamente, o grupo com tendinite e que recebeu tratamento com irradiação laser na energia de 3 Joules apresentou um aumento na expressão de TGF- $\beta$ , indicando que a terapia laser aplicada nesta energia pode facilitar o reparo tecidual durante o processo lesivo.

Uma das características do processo inflamatório é a presença de dor provocada pela liberação local de mediadores pró-inflamatórios e de peptídeos como a substância P que pode ligar-se ao receptor NK1 e ativar NF-kb aumentando ainda mais a síntese de mediadores inflamatórios. O aumento dos níveis de substância P está diretamente relacionado com a intensidade da dor e a ativação dos receptores NK1 na manutenção da hiperalgesia. (CASTRO et al., 2006; BJÖRN-OVE et al., 2006).

Nossos resultados mostraram um significativo aumento da expressão protéica destes receptores nos grupos com tendinite e sem tratamento. Isso pode significar que durante o processo inflamatório intenso provocado pela injeção de colagenase nos tendões, ocorra um aumento da hiperalgesia e formação de dor. Ao contrário, os tendões onde o agente lesivo foi aplicado mas que receberam tratamentos farmacológico ou irradiação laser, a expressão desta proteína foi reduzida. Tanto o diclofenaco de sódio quanto a irradiação laser são terapias conhecidas pelo seu efeito analgésico. Em nosso estudo, a irradiação laser pode ter reduzido o processo doloroso, pela redução dos receptores NK1, mostrados na redução da expressão protéica.

Outra etapa importante, que possibilita uma melhor compreensão das alterações no processo inflamatório agudo e na hiperalgesia foi o estudo dos níveis do mediador inflamatório Prostaglandina E2. Sob condições fisiológicas normais, as prostaglandinas têm um papel essencial na citoproteção da mucosa gástrica, homeostase e fisiologia renal. Os produtos do metabolismo do ácido araquidônico compõem um conjunto de mediadores que modulam a resposta inflamatória e a

imunológica. Esses mediadores só ocorrem após a estimulação das células, e são provenientes da oxidação do ácido araquidônico, o qual é gerado pela ação da enzima fosfolipase A2 sobre fosfolípidos da membrana celular.

Mediadores inflamatórios como a PGE2 estimula a inflamação local, onde há um recrutamento de células inflamatórias, principalmente neutrófilos e causam a desregulação entre a atividade anabólica e catabólica, inibindo as TIMPs, promovendo a liberação de agreganases e a ativação de MMPs. Assim, a presença de mediadores inflamatórios como a produção de PGE2 poderia nos mostrar a evolução do processo inflamatório agudo induzido nos tendões.

Neste estudo foi possível observar um aumento expressivo da geração de Prostaglandina E2, via COX-2 no grupo tendinite sem tratamento. Ao contrário, o grupo tendinite tratado com diclofenaco de sódio e os grupos irradiados com 1 e 3 Joules conseguiram reduzir a geração de PGE2 a partir da COX-2.

Embora o gráfico da geração de PGE2 derivados de COX-1 mostra uma tendência no aumento destes índices para o grupo tendinite sem tratamento, estes resultados não foram significativos quando comparados ao grupo controle. Já o grupo irradiado com 6J não apresentou redução significativa de PGE2, quando comparado ao grupo tendinite sem tratamento, tanto para COX-1 quanto para COX-2.

Outra forma do tecido tendíneo responder a doença é alterando a expressão de algumas enzimas de degradação, como colagenases e citocinas inflamatórias que pode levar à degeneração do tecido e a perda da integridade mecânica. Neste contexto, as MMPs podem modular alguns mediadores inflamatórios tais como citocinas e quimiocinas, regulando o infiltrado inflamatório (MANICONE et al., 2008).

Algumas metaloproteinases como a MMP-1, MMP-3, MMP-9 e MMP-13 são responsáveis por processos catabólicos no tendão em situações de tendinopatias (DEMOS et al., 2009). MMP3 degrada principalmente colágeno tipo III que confere características viscoelástica ao tendão, a MMP9 degrada o colágeno tipo IV e V presentes na lâmina basal e a MMP13 degrada principalmente colágeno tipo II além de I e III. Em geral, estas MMPs também podem degradar a matriz extracelular e favorecer a formação de edema.

MMP-3 e MMP-9 também podem aumentar a liberação de TNF- $\alpha$  pela célula, estimulando a ação de IL-1 $\beta$  e aumentando a expressão de MMP-13,

influenciando no aumento da inflamação, conduzindo ao enfraquecimento das fibras de colágeno, aumentando as chances de ruptura (VANLINT et al., 2007).

Neste sentido, a inibição de determinadas MMPs poderia ser uma boa opção para reduzir a degeneração da matriz extracelular nos casos de tendinopatias (SUN HB et al., 2008).

Neste trabalho, os grupos com tendinite e sem tratamento apresentaram um significativo aumento da expressão protéica de MMP3, MMP9 e MMP13 quando comparados ao grupo salina. O aumento destas MMPs pode significar uma piora do quadro inflamatório e aumento na degradação deste tecido. O aumento destas MMPs também estaria relacionado com o aumento do edema apresentado pelo grupo tendinite sem tratamento e poderia justificar o aumento de outros mediadores inflamatórios como a PGE2, TNF- $\alpha$  e alterações da atividade de MPO. Em resumo, o grupo com tendinite sem tratamento apresentou indícios de aumento do processo inflamatório pelo aumento de mediadores pró-inflamatórios, aumento de MMPs e aumento da atividade neutrofílica.

O grupo tendinite tratado com diclofenaco não apresentou sinais de redução do processo inflamatório. Neste grupo, observamos que o edema não foi significativamente reduzido e a atividade de MPO e a expressão TNF- $\alpha$  continuaram aumentadas. Contudo, foi observada significativa redução na geração de PGE2 e de NK1, mostrando um papel importante do diclofenaco de sódio no processo doloroso em tendões inflamados.

O grupo onde a tendinite foi induzida e que recebeu tratamento com laser, nas energias de 1 Joule ou 6 Joules apresentaram alguns resultados que sugerem a redução do processo inflamatório. Porém nem todos os marcadores apresentaram resultados positivos na redução da inflamação. O grupo irradiado com 1 Joule apresentou redução nos níveis de PGE2 via COX-2, na expressão de TNF- $\alpha$ , na expressão de MMP-13 e aumento na expressão de IL-10 porém alguns fatores que podem caracterizar a inflamação como o edema, estresse oxidativo pelos resíduos de nitrotirosina, expressão de COX-2, atividade de MPO e expressão de MMP-3 não foram reduzidos em comparação ao grupo sem tratamento.

Já o grupo irradiado com 6 Joules apresentou redução no edema e na expressão de COX-2, porém um fator que pode caracterizar aumento da inflamação ou da hiperalgesia como a geração de PGE-2 via COX-2 não foi reduzido. Desta

forma o tratamento laser nas energias de 1J e 3J não foi totalmente eficiente na redução da inflamação.

Analisando o grupo com tendinite e tratado com laser na energia de 3 Joules, podemos observar que os resultados deste grupo sugere uma redução do processo inflamatório e redução da dor ou da hiperalgesia pela normalização de vários mediadores inflamatórios. Os tendões irradiados com 3 Joules reduziram a atividade de MPO e o edema, reduziram a expressão da COX-2 e de mediadores inflamatórios como TNF- $\alpha$  e PGE2, reduziram a expressão dos receptores NK1, aumentaram a expressão de TGF- $\beta$  e IL-10 e reduziram a expressão das metaloproteinases MMP-3, MMP-9 e MMP-13.

A somatório destes fatores é um forte indício de que a terapia com laser de baixa potência 810nm na energia de 3 Joules e potência de 100mW pode ser eficaz na redução do processo inflamatório agudo induzido por colagenase em tendões calcâneos de ratos. Nossos resultados também sugerem melhora no reparo tecidual pela redução da expressão de MMPs e aumento de TGF- $\beta$ .

Neste trabalho mostramos algumas efeitos da irradiação Laser no processo inflamatório do tendão de ratos, iniciado pela aplicação da colagenase. Dentre eles, podemos observar um efeito anti-edematogênico do laser, dependente da intensidade da energia aplicada e alterações na atividade de células de defesa no local da inflamação apresentada nos animais tratados. O laser na energia de 3J apresentou os melhores resultados no tratamento da inflamação, reduzindo a formação de importantes mediadores pró-inflamatórios e estimular a expressão de mediadores anti-inflamatórios.

Porém, é necessário analisar as características histológicas e o efeito da laserterapia na migração celular a fim de entender a estreita diferença e alterações nos quadros de tendinite e tendinose e analisar as propriedades mecânicas do tecido tratado, para avaliar o reparo tecidual após o tratamento com laser de baixa potência.

Sugere-se também a comparação com irradiações de diferentes comprimentos de onda e potência para que possamos aproximar de um protocolo com parâmetros de irradiação mais definidos para este tipo de inflamação.

Outras análises são necessárias para determinar a existência de um quadro inflamatório crônico.

## **7 CONCLUSÕES**

Podemos concluir que o laser de baixa potência (810nm, infravermelho) na energia de 3 Joules foi eficaz na redução do processo inflamatório no modelo de tendinite induzida por collagenase em tendões calcâneo de ratos, atuando na redução do edema, da atividade neutrofílica, da expressão de COX-2 e na modulação de importantes mediadores inflamatórios.

## REFERÊNCIAS\*

AIMBIRE, F.; ALBERTINE, R.; DE MAGALHAES, R. G.; LOPES-MARTINS, R. A.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; ZANGARO, R. A.; CHAVANTES, M. C.; PACHECO, M. T. Effect of LLLT Ga-Al-As (685 nm) on LPS-induced inflammation of the airway and lung in the rat. **Lasers Med. Sci.**, v. 20, n. 1, p. 11-20, 2005.

AIMBIRE, F.; BJORDAL, J. M.; IVERSEN, V. V.; ALBERTINI, R.; FRIGO, L.; PACHECO, M. T.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; CHAVANTES, M. C.; LABAT, R. M.; LOPES-MARTINS, R. A. Low level laser therapy partially restores trachea muscle relaxation response in rats with tumor necrosis factor alpha-mediated smooth airway muscle dysfunction. **Lasers Surg. Med.**, v. 8, n. 38, p. 773-778, 2006.

AIMBIRE, F.; LOPES-MARTINS, R. A.; ALBERTINI, R.; PACHECO, M. T.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; MARTINS, P. S.; BJORDAL, J. M. Effect of low-level laser therapy on hemorrhagic lesions induced by immune complex in rat lungs. **Photomed. Laser Surg.**, v. 2, n. 25, p. 112-117, 2007.

ANDRES, B. M.; MURRELL, G. A. Treatment of tendinopathy: what works, what does not, and what is on the horizon. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v. 466, n. 7, p. 1539-1554, 2008.

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

ALAM, R.; KUMAR, D.; ANDERSON-WALTERS, D.; FORSYTHE, P. A. Macrophage inflammatory protein-1 alpha and monocyte chemoattractant peptide-1 elicit immediate and late cutaneous reactions and activate murine mast cells in vivo. **J. Immunol.**, v. 2, p. 1298-1303, 1994.

ALBERTINI, R.; ISHIDA, F. C.; RIBEIRO, W.; COGO, J. C.; ANTUNES, E.; TEIXEIRA, S.; DE NUCCI, G.; FARAI-NETO, H. C. C.; AIMBIRE, F. S. C.; ZÂNGARO, R. A.; LOPES-MARTINS, R. A. B. Análise do efeito do laser de baixa potência (As-Ga-Al) no modelo de inflamação de edema de pata em ratos. **Fisiot. Brasil**, v. 3, n. 1, p. 5-15, 2002.

ALFREDSON, H.; LORENTZON, R. Chronic Achilles tendinosis. Recommendations for treatment and prevention. **Sports Med.**, v. 29, n. 2, p. 135-146, 2000.

---

\* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ALFREDSON, H.; OHBERG, L.; FORSGREN, S. Is vasculo-neural ingrowth the cause of pain in chronic Achilles tendinosis? An investigation using ultrasonography and colour Doppler, immunohistochemistry, and diagnostic injections. **Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.**, v. 11, n. 5, p. 334-338, 2003.

ALVES, A. L. G.; MIKAIL, S. Afecções tendíneas e ligamentares. **Fisiot. Vet.**, São Paulo, p. 199-208, 2006.

ANDERSON, R. R.; PARRISH, J. A. Microvasculature can be selectively damaged using dye lasers: a basic theory and experimental evidence in human skin. **Lasers Surg. Med.**, v. 1, n. 3, p. 263-276, 1981.

APPELGREN, A.; APPELGREN, B.; ERIKSSON, S.; KOPP, S.; LUNDEBERG, T.; NYLANDER, M. Neuropeptides in temporomandibular joints with rheumatoid arthritis: a clinical study. **Scand. J. Dent. Res.**, v. 99, p. 519-521, 1991.

ARCHAMBAULT, J. M.; HART, D. A.; HERZOG, W. Response of rabbit Achilles tendon to chronic repetitive loading. **Connect. Tissue Res.**, v. 42, p. 13-23, 2001.

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

BARKER, J. E.; BAKHLE, Y. S.; ANDERDON, J.; TREASURE, T.; PIPER, P. J. Reciprocal inhibition of nitric oxide and prostacyclin synthesis in human saphenous vein. **Br. J. Pharmacol.**, v. 118, n. 3, p. 643-648, 1996.

BASFORD, J.R. Low intensity laser therapy – still not na established clinical tool. **Lasers Surg. Med.**, v. 16, n. 4, p. 331-342, 1995.

BELLEHUMEUR, C.; COLLETTE, T.; MAHEUX, R.; MAILLOUX, J.; VILLENEUVE, M.; AKOUM, A. Increased soluble interleukin-1 receptor type II proteolysis in the endometrium of women with endometriosis. **Hum. Reprod.**, v. 20, p. 1177-1184, 2005.

BEREDIKLIAN, P. K.; FAVATA, M.; CARTMELL, J. S.; FLANAGAN, C. L.; CROMBLEHOLME, T. M.; SOSLOWSKY, L. J. Regenerative versus reparative healing in tendon: a study of biomechanical and histological properties in fetal sheep. **Ann. Biomed. Eng.**, v. 31, p. 1143-1152, 2003.

BHAVSAR, M. D.; AMIJI, M. M. Oral IL-10 gene delivery in a microsphere-based formulation for local transfection and therapeutic efficacy in inflammatory bowel disease. **Gene Ther.**, v. 15, p. 1200-1209, 2008.



BJORDAL, J. M.; JOHNSON, M. I.; LOPES-MARTINS, R. A.; BOGEN, B.; CHOW, R.; LJUNGGREN, A. E. Short-term efficacy of physical interventions in osteoarthritic knee pain. A systematic review and meta-analysis of randomised placebo-controlled trials. **BMC Musculoskelet. Disord.**, v. 8, n. 22, p. 51, 2007.

BJORDAL, J. M.; KLOVNING, A.; LOPES-MARTINS, R. A.; ROLAND, P. D.; JOENSEN, J.; SLØRDAL, L. Overviews and systematic reviews on low back pain. **Ann. Intern. Med.**, v. 10 n. 148, p. 789-790, 2008.

BJORDAL, J. M.; LOPES-MARTINS, R. A.; JOENSEN, J.; COUPPE, C.; JUNGGREN, A. E.; STERGIOULAS, A.; JOHNSON, M. I. A systematic review with procedural assessments and meta-analysis of low level laser therapy in lateral elbow tendinopathy (tennis elbow). **BMC Musculoskelet. Disord.**, v. 9, n. 29, p. 75, 2008.

BJORDAL, J. M.; LOPES-MARTINS, R. A.; IVERSEN, V. V. 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.**, v. 40, n. 1, p. 76-80, 2006.

LJUNG, B. O.; ALFREDSON, H.; FORSGREN S. Neurokinin 1-receptors and sensory neuropeptides in tendon insertions at the medial and lateral epicondyles of the humerus Studies on tennis elbow and medial epicondylalgia. **J. Orthop. Res.**, v. 22, p. 321-327, 2006.

BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, D. A. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **J. Invest. Dermatol.**, v. 78, n. 3, p. 206-209, 1982.

BROSSEAU, L.; WELCH, V.; TUGWELL, P.; BIE, R.; GAM, A.; HARMAN, K.; SHEA, B.; MORIN, M. Low level laser therapy for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: A metaanalysis **J. Rheumatol.**, v. 27; n . 8, p. 1961-1969, 2000.

BROX, J. I.; GJENGEDAL, E. Arthroscopic surgery versus supervised exercises in patients with rotator cuff disease (stage II impingement syndrome): a prospective, randomized, controlled study in 125 patients with a 2 1/2-year follow-up. **J. Shoulder Elbow Surg.**, v. 8 n. 2, p. 102-111, 1999.

BRUGNERA, A.; PINHEIRO, A. L. **Laser Odont Mod.**, São Paulo, 1998.

BURSSSENS, P. Exogenously administered substance P and neutral endopeptidase inhibitors stimulate fibroblast proliferation, angiogenesis and collagen organization during Achilles tendon healing. **Foot. Ankle. Int.**, v. 26, p. 832-839, 2005.

CADET, P.; RADY, P. L.; TYRING, S. K.; YANDELL, R. B.; HUGHES, T. K. Interleukin-10 messenger ribonucleic acid in human placenta: implications of a role for interleukin-10 in fetal allograft protection. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 173, p. 25-29, 1995.

CAMPANA, V. R.; MOYA, M.; GAVOTTO, A.; SORIANO, F.; JURI, H. O.; SPITALE, L. S.; SIMES, J. C.; PALMA, J. A. The relative effects of He-Ne laser and meloxicam on experimentally induced inflammation Laser Therapy. **Lasers Med. Surg.**, v. 11, n. 2, p. 6-10, 1999.

CAMPANA, V.; MOYA, M.; GAVOTO, A.; JURI, H.; PALMA, J. A. Effects of diclofenac sodium and HeNe laser irradiation on plasmatic fibrinogen levels in inflammatory processes. **Lasers Med. Surg.**, v. 16, n. 6, p. 317-320, 1998.

CARMONA, L.; BALLINA, J. The burden of musculoskeletal diseases in the general population of Spain: results from a national survey. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 60, n. 11, p. 1040-1045, 2001.

CARTER, J. S.; KRAMER, S.; TALLEY, J. J. Synthesis and activity of sulfonamide-substituted 4,5-diaryl thiazoles as selective cyclooxygenase-2 inhibitors. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 9, n. 8, p. 1171-1174, 1999.

CASTRO, A. R.; PINTO, M.; LIMA, D.; TAVARES, L. Secondary hyperalgesia in the monoarthritic rat is mediated by GABAB and NK1 receptors of spinal dorsal horn neurons: a behavior and c-fos study. **Neuroscience**, v. 141, p. 2087-2095, 2006.

CHANG, J.; MOST, D.; STELNICKI, E.; SIEBERT, J. W.; LONGAKER, M. T.; HUI, K. Gene expression of transforming growth factor beta-1 in rabbit zone flexor tendon wound healing: evidence for dual mechanisms of repair. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 100, p. 937-944, 1997.

CHEN, Y. J.; WANG, C. J.; YANG, K. D.; KUO, Y. R.; HUANG, H. C.; HUANG, Y. T.; SUN, Y. C.; WANG, F. S. Extracorporeal shock waves promote healing of collagenase-induced Achilles tendinitis and increase TGF- $\beta$ 1 and IGF-I expression. **J. Orthop. Res.**, v. 22, p. 854-861, 2004.

CHERRY, N. M.; MEYER, J. D. The reported incidence of work-related musculoskeletal disease in the UK. **Occup. Med.**, v. 51, n. 7, p. 450-455, 2001.

CHOW, R. T.; JOHNSON, M. I.; LOPES-MARTINS, R. A.; BJORDAL, J. M. Efficacy of low-level laser therapy in the management of neck pain: a systematic review and meta-analysis of randomised placebo or active-treatment controlled trials. **Lancet**, v. 374, n. 9705, p. 1897-1908, 2009.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. Patologia estrutural e funcional. 6 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 2000.

CORPS, A. N.; ROBINSON, A. H. N.; MOVIN, T.; COSTA, M. L.; HAZLEMAN, B. L.; RILEY, G. P. Increased expression of aggrecan and biglycan mRNA in Achilles tendinopathy. **Rheumatism**, v. 45, p. 291-294, 2006.

CORREA, F.; MARTINS, R. A.; CORREA, J. C.; IVERSEN, V. V.; JOENSON, J.; BJORDAL, J. M. Low-level laser therapy (GaAs  $\lambda = 904$  nm) reduces inflammatory cell migration in mice with lipopolysaccharide-induced peritonitis. **Photomed. Laser Surg.**, v. 25, n. 4, p. 245-249, 2007.

DEAN, R. A.; OVERALL, C. M. Proteomics discovery of metalloproteinase substrates in the cellular context by iTRAQ™ labeling reveals a diverse MMP-2 substrate degradome. **Mol. Cell Proteomics**, v. 6, p. 611-623, 2007.

DEEKS, J. J.; SMITH, L. A. Efficacy, tolerability, and upper gastrointestinal safety of celecoxib for treatment of osteoarthritis and rheumatoid arthritis: systematic review of randomised controlled trials. **BMJ**, v. 325, n. 7365, p. 619, 2002.

DEMOS, M.; JOOSTEN, L. A.; OPERS-WALGREEN, B.; VAN SCHIE, J. T.; JAHR, H.; VAN OSCH, G. J.; VERHAAR, J. A. Tendon degeneration is not mediated by regulation of Toll-like receptors 2 and 4 in human tenocytes. **J. Orthop. Res.**, v. 27, p. 1043-1047, 2009.

DENADAI-SOUZA, A.; CAMARGO, L. D. E. L.; RIBELA, M. T.; KEEBLE, J. E.; COSTA, S. K.; MUSCARÁ, M. N. Participation of peripheral tachykinin NK1 receptors in the carrageenan-induced inflammation of the rat temporomandibular joint. **Eur. J. Pain**, v. 13, p. 812-819, 2009.

DEVKOTA, C. A.; TSUZAKI, M.; ALMEKINDERS, L. C.; AMARGURAS, A. J.; WEINHOLD, P. S. Distributing a fixed amount of cyclic loading to tendon explants over longer periods induces greater cellular and mechanical responses. **J. Orthop. Res.**, v. 25, p. 1078-1086, 2007.

DRIESSLER, F.; VENSTROM, K.; SABAT, R.; ASADULLAH, K.; SCHOTTELIUS, A. J. Molecular mechanisms of interleukin-10-mediated inhibition of NF- $\kappa$ B activity: a role for p50. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 135, p. 64-73, 2004.

ELSAID, K. A.; FLEMING, B. C.; OKSEND AHL, H. L.; MACHAN, J. T.; FADALE, P. D.; HULSTYN, M. J. Decreased lubricin concentrations and markers of joint inflammation in the synovial fluid of patients with anterior cruciate ligament injury. **Arthritis Rheum.**, v. 58, p. 1707-1715, 2008.

ENGLAND, S. Low power laser therapy of shoulder tendonitis. **Scand. J. Rheumatol.**, v.18, p. 427-431, 1989.

FAITH, M.; SUKUMARAN, A.; PULIMOOD, B.; JACOB, M. How reliable an indicator of inflammation is myeloperoxidase activity? **Clin. Chim. Acta**, v. 396, n. 1-2, p. 23-25, 2008.

FELSON, D. T.; LAWRENCE, R. C.; DIEPPE, P. A.; HIRSCH, R.; HELMICK, C. G.; JORDAN, J. M.; KINGTON, R. S.; LANE, N. E.; NEVITT, M. C.; ZHANG, Y.; SOWERS, M.; MCALINDON, T.; SPECTOR, T. D.; POOLE, A. R.; YANOVSKI, S. Z.; ATESHIAN, G.; SHARMA, L.; BUCKWALTER, J. A.; BRANDT, K. D.; FRIES, J. F. Osteoarthritis: new insights. Part 1: the disease and its risk factors. **Ann. Intern. Med.**, v. 133, n. 8, p. 635-646, 2000.

FENWICK, S. A.; CURRY, V.; HARRALL, R. L.; HAZLEMAN, B. L.; HACKNEY, R.; RILEY, G. P. Expression of transforming growth factor-beta isoforms and their receptors in chronic tendinosis. **J. Anat.**, v. 199, p. 231-240, 2001.

FERNANDES, M. A. L.; ALVES, G. E. S.; SOUZA, J. C. A. Efeito do ultra-som terapêutico em tendinite experimental de eqüinos: estudo clínico, ultra-sonográfico e histopatológico de dois protocolos. **Arq. B. Med. Vet. Zoot.**, v. 55, n. 1, p. 27-34, 2003.

FREDBERG, U.; STENGAARD-PEDERSEN, K. Chronic tendinopathy tissue pathology, pain mechanisms, and etiology with a special focus on inflammation. **Scand. J. Med. Sci. Sports**, v. 18, n. 1, p. 3-15, 2008.

FRIGO, L.; LUPPI, J. S.; FAVERO, G. M.; PENNA, S. C.; BJORDAL, J. M.; BENSADOUN, R. J.; LOPES-MARTINS, R. A. The effect of low-level laser irradiation (In-Ga-Al-AsP - 660 nm) on melanoma in vitro and in vivo. **BMC Cancer**, v. 20, n. 9, p. 404, 2009.

FU, S. C.; CHAN, B. P.; WANG, W.; PAU, H. M.; CHAN, K. M.; ROLF, C. G. Increase expression of matrix metalloproteinase 1 (MMP1) in 11 patients with patellar tendinosis. **Acta Orthop. Scand.**, v. 73, n. 6, p. 658-662, 2002.

GAO, Y. J.; ZHANG, Y. Q.; ZHAO, Z. Q. Involvement of spinal neurokinin-1 receptors in the maintenance but not induction of carrageenan-induced thermal hyperalgesia in the rat. **Brain Res. Bull.**, v. 61, p. 587-593, 2003.

GAZZINELLI, R. T. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. **J. Immunol.**, v. 157, p. 798-805, 1996.

GOGER, B.; HALDEN, Y.; REK, A.; MOSL, R.; PYE, D.; GALLAGHER, J.; KUNGL, A. J. Different affinities of glycosaminoglycan oligosaccharides for monomeric and dimeric interleukin-8: a model for chemokine regulation at inflammatory sites. **Bioch.**, v. 41, p. 1640-1646, 2002.

GOLD, L. I.; SUNG, J. J.; SIEBERT, J. W.; LONGAKER, M. T. Type I (RI) and type II (RII) receptors for transforming growth factor-beta isoforms are expressed subsequent to transforming growth factor-beta ligands during excisional wound repair. **Am. J. Pathol.**, v. 150, p. 209-222, 1997.

GOLD, M. S. Hyperalgesic agents increase a tetrodotoxin-resistant Na<sup>+</sup> current in nociceptors. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 93, p. 1108-1112, 1996.

GOLDMAN, J. A. Laser therapy of rheumatoid arthritis. **Lasers Surg. Med.**, v. 1, p. 93-101, 1980.

GORDON, A.; KOZIN, E. D.; KESWANI, S. G.; VAIKUNTH, S. S.; KATZ, A. B.; ZOLTICK, P. W. Permissive environment in postnatal wounds induced by adenoviral-mediated overexpression of the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 prevents scar formation. **Wound Repair Regen.**, v. 16, p. 70-79, 2008.

HARO, H.; CRAWFORD, H. C.; FINGLETON, B.; SHINOMIYA, K.; SPENGLER, D. M.; MATRISIAN, L. M. Matrix metalloproteinase-7-dependent release of tumor necrosis factor-alpha in a model of herniated disc resorption. **J. Clin. Invest.**, v. 105, n. 2, p. 143-50, 2000.

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.**, v. 56, n.1, p. 79-88, 2007.

HAZEKI, O.; TAMURA, M. Near infrared quadruple wavelength spectrophotometry of the rat head. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 248, p. 63-69, 1989.

HERNANDEZ, M.; VALENZUELA, M. A.; LOPEZ-OTIN, C.; ALVAREZ, J.; LOPEZ, J. M.; VERNAL, R.; GAMONAL, J. Matrix metalloproteinase-13 is highly expressed in destructive periodontal disease activity. **J. Periodontol.**, v. 77, p. 1863-1870, 2006.

HO, W. Z.; LAI, J. P.; ZHU, X. H.; UVAYDOVA, M.; DOUGLAS, S. D. Human monocytes and macrophages express substance P and neurokinin-1 receptor. **J. Immunol.**, v. 159, p. 5654-5660, 1997.

HONMURA, A.; ISHII, A. Analgesic effect of GaAlAs diode laser irradiation on hyperalgesia in carrageenin-induced inflammation. **Lasers Surg Med.**, v. 13, p. 463-469, 1993.

HOSAKA, Y.; KIRISAWA, R.; UEDA, H.; YAMAGUCHI, M.; TAKEHANA, K. Differences in tumor necrosis factor (TNF)alpha and TNF receptor-1-mediated intracellular signaling factors in normal, inflamed and scar-formed horse tendons. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 67, n. 10, p. 985-991, 2005.

HUANG, H. H.; QUESHI, A. A.; BIUNDO, J. R. Sports and other soft tissue injuries, tendinitis, bursitis, and occupation-related syndromes. **Curr. Opin. Rheumatol.**, v. 12, p. 150-154, 2000.

JIANYING, Z.; WANG, H. C. Production of PGE2 increases in tendons subjected to repetitive mechanical loading and induces differentiation of tendon stem cells into non-tenocytes. **J. Orthop. Res.**, v. 28, p. 198-203, 2010.

JOHANSSON, K.; ADOLFSSON, L. Attitudes toward management of patients with subacromial pain in Swedish primary care. **Fam. Pract.**, v. 16, n. 3, p. 233-237, 1999.

JONES, G. C.; CORPS, A. N.; PENNINGTON, C. J.; CLARK, I. M.; EDWARDS, D. R.; BRADLEY, M. M.; HAZLEMAN, B. L.; RILEY, G. P. Expression profiling of metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in normal and degenerate human Achilles tendon. **Arthritis Rheum.**, v. 54, p. 832-842, 2006.

JORDAN, K. M.; SAWYER, S. The use of conventional and complementary treatments for knee osteoarthritis in the community. **Rheumatism**, v. 43, n. 3, p. 381-384, 2003.

JÓZSA, L.; KANNUS, P. Histopathological findings in spontaneous tendon ruptures. **Scand. J. Med. Sci. Sports**, v. 7, n. 2, p. 113-118, 1997.

JUNQUEIRA, J. C. U.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara, 2004.

KASTELIC, J.; GALESKI, A.; BAER, E. The Multicomposite Structure of Tendon. **Connect. Tissue. Res.**, v. 6, p. 11-23, 1978.

KARU, T. I.; AFANAS'EVA, N. I.; KOL'IAKOV, S. F.; PIATIBRAT, L. V. Change in the absorption spectrum of a monolayer of live cells under low-intensity laser irradiation. **Dokl. Akad. Nauk.**, v. 360, n. 2, p. 267-270, 1998.

KARU, T. I. Photobiological fundamental of low power laser therapy. **J. Quant. Elect.**, v. 23, p. 1703, 1987.

KEEBLE, J.; BLADES, M.; PITZALIS, C.; ROCHA, F. A. C.; BRAIN, S. D. The role of substance P in microvascular responses in murine joint inflammation. **Br. J. Pharmacol.**, v. 144, p. 1059-1066, 2005.

KHAN, K. M.; COOK, J. L.; BONAR, F.; HARCOUT, P.; ASTROM, M. (1999). Hystopathology of common tendinopathies. Update and implications for clinical management. **Sports Med.**, v. 27, n. 6, p. 393-408, 1999.

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.

KOSHIMA, H.; KONDO, S.; MISHIMA, S.; CHOI, H.; SHIMPO, H.; SAKAI, T.; ISHIGURO, N. Expression of interleukin-1beta, cyclooxygenase-2, and prostaglandin E2 in a rotator cuff tear in rabbits. **J. Orthop. Res.**, v. 25, p. 92-97, 2007.

KRASNOUKTSKY, S.; SAMUELS, J.; ABRAMSON, S. B. Osteoarthritis in 2007. **Bull. NYU Hosp. Jt. Dis.**, v. 65, p. 222-228, 2007.

KRIVIC, A.; MAJEROVIC, M.; JELIC, I.; SEIWERTH, S.; SIKIRIC, P. Modulation of early functional recovery of Achilles tendon to bone unit after transection by BPC 157 and methylprednisolone. **Inflamm. Res.**, v. 57, n.5, p. 205-210, 2008.

KUWABARA, K.; JYOYAMA, H.; FLEISCH, J. H.; HORI, Y. Inhibition of antigen-induced arthritis in guinea pigs by a selective LTB4 receptor antagonist LY293111Na. **Inflamm. Res.**, v. 51 n. 11, p. 541-550, 2002.

KVIST M. Achilles tendon injuries in athletes. **Sports Med.**, v. 18, n. 3, p. 173-201, 1994.

KVIST, M.; JOZSA, L.; JARVINEN, M. Fine structural alterations in chronic Achilles paratenonitis in athletes. **Path. Res. Pract.**, v. 180, p. 416-423, 1985.

LAIHO, M.; WEIS, M. B.; MASSAGUE, J. Concomitant loss of transforming growth factor (TGF)-beta receptor types I and II in TGF-beta-resistant cell mutants implicates both receptor types in signal transduction. **J. Biol. Chem.**, v. 265, p. 18518-18524, 1990.

LAMBRECHT, B. N.; GERMONPRE, P. R.; EVERAERT, E. G.; CARRO-MUINO, I.; VEERMAN, M.; FELIPE, C. Endogenously produced substance P contributes to lymphocyte proliferation induced by dendritic cells and direct TCR ligation. **Eur. J. Immunol.**, v. 29, p. 3815-3825, 1999.

LANGBERG, H.; BJORN, C.; BOUSHEL, R.; HELLSTEN, Y.; KJAER, M. Exercise-induced increase in interstitial bradykinin and adenosine concentrations in skeletal muscle and peritendinous tissue in humans. **J. Physiol.**, v. 542, p. 977-983, 2002.

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.

LAUW, F. N.; PAJKRT, D.; HACK, C. E.; KURIMOTO, M.; VAN DEVENTER, S. J.; VAN DER, P. T. Proinflammatory effects of IL-10 during human endotoxemia. **J. Immunol.**, v. 165, p. 2783-2789, 2000.

LAVAGNINO, M.; ARNOCZKY, S. P.; TIAN, T.; VAUPEL, Z. Effect of amplitude and frequency of cyclic tensile strain on the inhibition of MMP1 mRNA expression in tendon cells: an in vitro study. **Connect. tissue Res.**, v. 44, p. 181-187, 2003.

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

LEE, T. Y.; CHIN, G. S.; KIM, W. J. H.; CHAU, D.; GITTES, G. K.; LONGAKER, M. T. Expression of transforming growth factor beta 1, 2 and 3 proteins in keloids. **Ann. Plast. Surg.**, v. 43, p. 179-184, 1999.

LEE, W.; AITKEN, S.; SODEK, J.; MCCULLOCH, C. A. Evidence of a direct relationship between neutrophil collagenase activity and periodontal tissue destruction in vivo: role of active enzyme in human periodontitis. **J. Periodontal Res.**, v. 30, n. 1, p. 23-33, 1995.

LEE, J. H.; FITZGERALD, J. B.; DIMICCO, M. A.; GRODZINSKY, A. J. Mechanical injury of cartilage explants causes specific time-dependent changes in chondrocyte gene expression. **Arthritis Rheum.**, v. 52, p. 2386-2395, 2005.

LEONARDI, A.; CORTIVO, R.; FREGONA, I.; PLEBANI, M.; SECCHI, A. G.; ABATANGELO, G. Effects of Th2 cytokines on expression of collagen, MMP-1, and TIMP-1 in conjunctival fibroblasts. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 44, p. 183-189, 2003.

LEVINE, J. D.; KHASAR, S. G.; GREEN, P. G. Neurogenic inflammation and arthritis. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1069, p. 155-167, 2006.

LIECHTY, K. W.; ADZICK, N. S.; CROMBLEHOLME, T. M. Diminished interleukin 6 (IL-6) production during scarless human fetal wound repair. **Cytokine**, v. 12, p. 671-676, 2000.



LIECHTY, K. W.; KIM, H. B.; ADZICK, N. S.; CROMBLEHOLME, T. M. Fetal wound repair results in scar formation in interleukin-10-deficient mice in a syngeneic murine model of scarless fetal wound repair. **J. Pediatr. Surg.**, v. 35, p. 866-873, 2000.

LIN, T. W.; CARDENAS, L.; GLASER, D. L.; SOSLOWSKY, L. J. Tendon healing in interleukin-4 and interleukin-6 knockout mice. **J. Biomech.**, v. 39, p. 61-69, 2006.

LIN, T. W.; CARDENAS, L.; SOSLOWSKY, L. J. Tendon properties in interleukin-4 and interleukin-6 knockout mice. **J. Biomech.**, v. 38, p. 99-105, 2005.

LIPSKY, P. E. Role of cyclooxygenase-1 and -2 in health and disease. **Am. J. Orthop.**, v. 28, p. 8-12, 1999.

LOHI, J.; WILSON, C. L.; ROBY, J. D.; PARKS, W. C. Epilysin, a novel human matrix metalloproteinase (MMP-28) expressed in testis and keratinocytes and in response to injury **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 10134-10144, 2001.

LOPES-MARTINS, R. A.; ALBERTINI, R.; LOPES-MARTINS, P. S.; DE CARVALHO, F. A.; NETO, H. C.; IVERSEN, V. V.; BJORDAL, J. M. Steroid receptor antagonist mifepristone inhibits the anti-inflammatory effects of photoradiation. **Photomed. Laser Surg.**, v. 2, n. 24, p. 197-201, 2006.

LOPES-MARTINS, R. A.; MARCOS, R. L.; LEONARDO, P. S.; PRIANTI, A. C.; MUSCARÁ, M. N.; AIMBIRE, F.; FRIGO, L.; IVERSEN, V. V.; BJORDAL, J. M. Effect of low-level laser (Ga-Al-As 655 nm) on skeletal muscle fatigue induced by electrical stimulation in rats. **J. Appl. Physiol.**, v. 1, n. 101, p. 283-288, 2006.

LOPES-MARTINS, R. A.; ALBERTINI, R.; MARTINS, P. S.; BJORDAL, J. M.; FARIA NETO, H. C. Spontaneous effects of low-level laser therapy (650 nm) in acute inflammatory mouse pleurisy induced by carrageenan. **Photomed. Laser Surg.**, v. 23, n. 4, p. 377-381, 2005.

LOTZ, M.; VAUGHAN, J. H.; CARSON, D. A. Effect of neuropeptides on production of inflammatory cytokines by human monocytes. **Science**, v. 241, p. 1218-1221, 1988.

MACKENZIE, A.; WRIGHT, M. O.; LEE, H. S.; ELLIOT, K.; GERRARD, L.; FISKERSTRAND, C. E.; SALTER, D. M.; QUINN, J. P. Tachykinin expression in cartilage and function in human articular chondrocyte mechanotransduction. **Arthritis Rheum.**, v. 48, p. 146-156, 2003.

MAIMAN, T. H. Stimulated optical radiation in ruby. **Nature**, v. 187, p. 493, 1960.

MANICONE, A. M.; MCGUIRE, J. K. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation. **Semin. Cell Dev. Biol.**, v. 19, p. 34-41, 2008.

MARCINKIEWICZ, J.; BIEDROŃ, R.; MARESZ, K.; KWAŚNY-KROCHIN, B.; BOBEK, M.; KONTNY, E.; MAŚLIŃSKI, W.; CHAIN, B. Oxidative modification of type II collagen differentially affects its arthritogenic and tolerogenic capacity in experimental arthritis. **Arch. Immunol. Ther. Exp.**, v. 52, n. 4, p. 284-291, 2004.

MCCAWLEY, L. J.; MATRISIAN, L. M. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 13, p. 534-540, 2001.

MCQUIBBAN, G. A.; GONG, J. H.; MCCULLOCH, C. A.; CLARK-LEWIS, I.; OVERALL, C. M. Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3. **Science**, v. 289 n. 5482, p. 1202-1206, 2000.

MENEZES, G. B.; REZENDE, R. M.; PEREIRA-SILVA, P. E. M.; KLEIN, A.; CARA, D. C.; FRANCISCHI, J. N. Differential involvement of cyclooxygenase isoforms in neutrophil migration in vivo and in vitro. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 598, n. 13, p. 118-122, 2008.

MESTER, E.; SZENDE, B.; TOTA, J. G. Effect of low intensity laser radiation, repeatedly administered over a long period, on the skin and inner organs of mice. **Radiobiol. Radiother.**, v. 3, n. 10, p. 371-377, 1969.

MIAO, F. J.; JANIG, W.; LEVINE, J. D. Nociceptive neuroendocrine negative feedback control of neurogenic inflammation activated by capsaicin in the rat paw: role of the adrenal medulla. **J. Physiol.**, v. 527, p. 601-610, 2000.

MITSUI, Y.; GOTOH, M.; NAKAMA, K.; YAMADA, T.; HIGUCHI, F.; NAGATA, K. Hyaluronic acid inhibits mRNA expression of proinflammatory cytokines and cyclooxygenase-2/prostaglandin E2 production via CD44 in interleukin-1-stimulated subacromial synovial fibroblasts from patients with rotator cuff disease. **J. Orthop. Res.**, v. 267, p. 1032-1037, 2010.

MOITRA, J.; SAMMANI, S.; GARCIA, J. G. Re-evaluation of Evans Blue dye as a marker of albumin clearance in murine models of acute lung injury. **Transl. Res.**, v. 150, n. 4, p. 253-65, 2007.

MORLEY, S.; ECCLESTON, C. Systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials of cognitive behaviour therapy and behaviour therapy for chronic pain in adults, excluding headache. **Pain**, v. 80, n. 1, p. 1-13, 1999.

MOSMANN, T. R.; FIORENTINO, D. F.; BOND, M. W. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. **J. Exp. Med.**, v. 170, p. 2081-2095, 1989.

MOSSER, D. M.; ZHANG, X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. **Immunol. Rev.**, v. 226, p. 205-218, 2008.

MÜLLER, W. A. Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response. **Lab. Invest.**, v. 82, n. 5, p. 521-533, 2002.

MURRAY, R. C.; BRICH, H. L.; LAKHANI, K.; GOODSHIP, A. E. Biochemical composition of equine carpal articular cartilage is influenced by short-term exercise in a site-specific manner. **Osteoarthr. Cartil.**, v. 9, n. 7, p. 625-632, 2001

NAKAMA, L. H.; KING, K. B.; ABRAHAMSSON, S.; REMPEL, D. M. VEGF, VEGFR-1, and CTGF cell densities in tendon are increased with cyclical loading: An in vivo tendinopathy model. **J. Orthop. Res.**, v. 24, p. 393-400, 2006.

NARUMIYA, S.; SUGIMOTO, Y.; USHIKUBI, F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. **Physiol. Rev.**, v. 79, p. 1193-1226, 1999.

NEUWIRTH, J.; FUHRMANN, R. A.; VEIT, A.; AURICH, M.; STONANS, I.; TROMMER, T.; HORTSCHANSKY, P.; CHUBINSKAYA, S.; MOLLENHAUER, J. A. Expression of bone morphogenetic proteins in the subacromial bursa of patients with chronic degeneration of the rotator cuff. **Arthritis Res. Ther.**, v. 8, p. 92, 2006.

NOMURA, M.; HOSAKA, Y.; KASASHIMA, Y.; UEDA, H.; TAKEHANA, K.; KUWANO, A.; ARAI, K. Active expression of matrix metalloproteinase-13 mRNA in the granulation tissue of equine superficial digital flexor tendinitis. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 69, n. 6, p. 637-639, 2007.

O'NEILL, L. A.; BARRETT, M. L.; LEWIS, G. P. Induction of cyclooxygenase by interleukin-1 in rheumatoid synovial cells. **FEBS Lett.**, v. 212, p. 35-39, 1987.

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.

OXFORD AND LEAGUE. **Oxford League Table of Analgesics in Acute Pain**. Disponível em: <http://www.jr2.ox.ac.uk/bandolier/booth/painpag/Acutrev/Analgesics/Leagtab.html>. Acesso em: 23/11/2009.

PACHECO, C. M. F.; QUEIROZ, C. M.; MALTOS, K. L. M.; CALIARI, M. V.; ROCHA, O. A.; FRANCISCHI, J. N. Local opioids in a model of periodontal disease in rats. **Arch. Oral Biol.**, v. 52, n. 7, p. 677-683, 2007.

PALMA, C.; MAZINI, S. Substance P induces secretion of immunomodulatory cytokines by human astrocytoma cells. **J. Neuroimmunol.**, v. 81, p. 127-137, 1998.

PARKS, W. C.; WILSON, C. L.; LOPEZ-BOADO, Y. S. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 4, n. 8, p. 617-29, 2004.

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.

PILIGIAN, G.; HERBERT, R. Evaluation and management of chronic work-related musculoskeletal disorders of the distal upper extremity. **Am. J. Ind. Med.**, v. 37, n. 1, p. 75-93, 2000.

POOL, R. R.; WHEAT, J. D.; FERRARO, G. L. Corticosteroid therapy in common joint and tendon injuries in the horse: part II. Effects on tendons. **Proc. Am. Ass. Equine Practns**, v. 26, p. 407-410, 1980.

PORTAL SÃO FRANCISCO. **Artrite Reumatóide**. Disponível em: <http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/reumatismo/artrite-reumatoide.php>. Acesso em 23/11/2009.

QUEIROZ-JUNIOR, C. M.; PACHECO, C. M. F.; MALTOS, K. L. M.; CALIARI, M. V.; DUARTE, I. D. G; FRANCISCHI, J. N. Role of systemic and local administration of selective inhibitors of cyclo-oxygenase 1 and 2 in an experimental model of periodontal disease in rats. **J. Periodontal Res.**, v. 44, n. 2, p. 153-160, 2009.

RAJAKARIAR, R.; YAQOUB, M. M.; GILROY, D. W. COX-2 in inflammation and resolution. **Mol. Interv.**, v. 6, n. 4, p. 199-207, 2006.

RAKOS, G.; KIS, Z.; NAGY, D.; LUR, G.; FARKAS, T.; HORTOBAGYI, T.; VECSEI, L.; TOLDI, J. Evans Blue fluorescence permits the rapid visualization of non-intact cells in the perilesional rim of cold-injured rat brain. **Acta Neurobiol. Exp.**, v. 67, n. 2, p. 149-54, 2007.

RAWLINGSON, A.; COSTA, S. K.; BRAIN, S. D. Role of tachykinins in neurogenic inflammation of the skin and other external surfaces (rev). **Handb. Exp. Pharmacol.**, v. 164, p. 459-490, 2004.

REDDY, G. K.; GUM, S.; STEHNO-BITTEL, L.; ENWEMEKA, C. S. Biochemistry and biomechanics of healing tendon: part II effects of combined laser therapy and electrical stimulation, **Med. Sci. Sports**, v.36, n.6, p.794-800, 1998.

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.

RICCHETTI, E. T.; REDDY, S. C.; ANSORGE, H. L.; ZGONIS, M. H.; VAN KLEUNEN, J. P.; LIECHTY, K. W.; SOSLOWSKY, L. J.; BEREDJIKLIAN, P. K. Effect of interleukin-10 overexpression on the properties of healing tendon in a murine patellar tendon model. **J. Hand Surg. Eur.**, v. 33A, p. 1843-1852, 2008.

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

ROLF, C. G.; FU, B. S.; PAU, A.; WANG, W.; CHAN, B. Increased cell proliferation and associated expression of PDGFR-beta causing hypercellularity in patellar tendinosis. **Rheumatology**, v. 40, p. 256-261, 2001.

RYAN, J. M.; BARRY, F. P.; MURPHY, J. M.; MAHON, B. P. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. **J. Inflamm.**, v. 26, p. 2-8, 2005.

SANN, H.; PIERAU, F. K. Efferent functions of C-fiber nociceptors. **Z. Rheumatol.**, v. 57, n. 2, p. 8-13. 1998.

SATO, H.; OGINO, Y.; TAKAGI, J.; ASANO, S.; OHTA, T.; KOMORIYA, K. Pharmacological profiles of high-concentration (20 microg/g) tacalcitol ointment: effects on cutaneous inflammation, epidermal proliferation, and differentiation in mice. **J. Dermatol.**, v. 30, n. 7, p. 510-24, 2003.

SATTAYUT, S.; HUGES, F.; BRADLEY, P. 820 nm gallium aluminum arsenide laser modulation of prostaglandin E2 production in interleukin I stimulated myoblasts. **Laser Ther.**, v. 11, n. 2, p. 8895, 1999.

SCHAFFER, M.; BONEL, H.; SROKA, R.; ACHAFFER, P. M.; BUCH, M.; REISER, M.; DÜHMKE, E. Effect of 780nm diode laser irradiation on blood microcirculation preliminary findings on time-dependent T1-weighted contrast-enhanced magnetic resonance imaging (MRI). **J. Photochem. Photobiol. B.**, v.54, p. 55-60, 2000.

SCHAWLOW, A. L. Principles of laser **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v. 13, n. 3, 1995.

SCHIERWAGEN, C.; BYLUND-FELLENIS, A. C.; LUNDBERG, D. C. Improved method for quantification of tissue PMN accumulation measured by myeloperoxidase activity. **J. Pharmacol. Methods**, v. 23, n. 3, p. 179–186, 1990.

SCHINDL, A.; SCHINDL, M.; PERNERSTORFER-SCHON, H.; SCHINDL, L. Low-intensity laser therapy : a review. **J. Investig. Med.**, v. 48, n. 5, p. 312-326, 2000.

SCHNABEL, L. V.; MOHAMMED, H. O.; MILLER, B. J.; MCDERMOTT, W. G.; JACOBSON, M. S.; SANTANGELO, K. S.; FORTIER, L. A. Platelet rich plasma (PRP) enhances anabolic gene expression patterns in flexor digitorum superficialis tendons. **J. Orthop. Res.**, v. 25 , p. 230-240, 2006.

SCHONBECK, U.; MACH, F.; LIBBY, P. Generation of biologically active IL-1  $\beta$  by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1  $\beta$  processing **J. Immunol.**, v. 161, p. 3340-3346, 1998.

SCOTT, A.; COOK, J. L.; HART, D. A.; WALKER, D. C.; DURONIO, V.; KHAN, K. M. Tenocyte responses to mechanical loading in vivo: a role for local insulin-like growth factor 1 signaling in early tendinosis in rats. **Arthritis Rheum.**, v. 56, p. 871-881, 2007.

SIQUEIRA, J. F; ARAÚJO, M. C.; GARCIA, P. F.; FRAGA, R. C.; DANTAS, C. J. Histological evaluation of the effectiveness of five instrumentation techniques for cleaning the apical third of root canals. **J. Endod.**, v. 23, n.8, p. 499-502, 1997.

STERGIOULAS, A.; STERGIOULA, M.; AARSKOG, R.; LOPES-MARTINS, R. A.; BJORDAL, J. M. Effects of low-level laser therapy and eccentric exercises in the treatment of recreational athletes with chronic achilles tendinopathy. **Am. J. Sports Med.**, n. 36, v. 5, p. 881-887, 2008.

SUN, H. B.; LI, Y.; FUNG, D. T.; MAJESKA, R. J.; SCHAFFLER, M. B.; FLATOW, E. L. Coordinate regulation of IL-1 $\beta$  and MMP-13 in rat tendons following subrupture fatigue damage. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v. 466, n. 7, p. 1555-1561, 2008.

SVAASAND, L. O. Biostimulation with low-intensity lasers--physics or metaphysics? **Nord Med.**, v.105, n.3, p. 72-75, 1990.

TEDGUI, A.; MALLAT, Z. Anti-inflammatory mechanisms in the vascular wall. **Circulation Res.**, v. 8, p. 877-887, 2001.

THOMASSIAN, A. Afecções do aparelho locomotor. **Enfermidades dos cavalos.**, 3ª ed., p. 157-164. São Paulo: Editora Varela, 1999.

TREEDE, R. D. Peripheral and central mechanisms of cutaneous hyperalgesia. **Prog. Neurobiol.**, v. 38, p. 397–421, 1992.

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.

VAN DER WINDT, D. A. W. M.; KOES, B. Shoulder disorders in general practice: Incidence, patient characteristics and management. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 54, p. 959-964, 1995.

VAN DYKE, T. E.; SERHAN, C. N. Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. **J. Dent. Res.**, v. 82, n. 2, p. 82–90, 2003.

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.

WARDEN, S. J. Animal models for the study of tendinopathy. **Br. J. Sports Med.**, v.41, n.4, p. 232-240, 2007.

WARNER, R. L.; BELTRAN, L.; YOUNKIN, E. M.; LEWIS, C. S.; WEISS, S. J.; VARANI, J.; JOHNSON, K. J. Role of stromelysin 1 and gelatinase B in experimental acute lung injury **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 24, p. 537-544, 2001.

WILLIAMS, J. G. Achilles tendon lesions in sport. **Sports Med.**, v. 3, p. 114-35, 1986.

WOLFF, L. F.; SMITH, Q. T.; SNYDER, W. K. Relationship between lactate dehydrogenase and myeloperoxidase levels in human gingival crevicular fluid and clinical and microbial measurements. **J. Clin. Periodontol.**, v. 15, n. 2, p. 110-115, 1988.

WRANA, J. L.; ATTISANO, L.; WIESER, R.; VENTURA, F.; MASSAGUE, J. Mechanism of activation of the TGF- $\beta$  receptor. **Nature**, v. 370, p. 341-347, 1994.

YAMALIK, N.; CAGLAYAN, F.; KILINC, K.; KILINC, A.; T"UMER, C. The importance of data presentation regarding gingival crevicular fluid myeloperoxidase and elastase-like activity in periodontal disease and health status. **J. Periodontol.**, v. 71, n. 3, p. 460-467, 2000.

YASUDA, S.; IKUTA, K.; UWATOKU, T.; OI, K.; ABE, K.; HYODO, F.; YOSHIMITSU, K.; SUGIMURA, K.; UTSUMI, H.; KATAYAMA, Y.; SHIMOKAWA, H. In vivo Magnetic Resonance Imaging of Atherosclerotic Lesions with a Newly Developed Evans Blue-DTPA-Gadolinium Contrast Medium in Apolipoprotein-E-Deficient Mice. **J. Vasc. Res.**, v.16, n.45, p.123-128, 2007.

YOUSEFI-NOORAIE, R.; SCHONSTEIN, E.; HEIDARI, K.; RASHIDIAN, A.; AKBARI-KAMRANI, M.; IRANI, S.; SHAKIBA, B.; MORTAZ HEJRI, S.; JONAI, A. Low level laser therapy for nonspecific low-back pain. **Cochrane Database Syst. Rev.**, v.17, n. 4, 2007.