

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE (CCBS)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA



**EFEITO DA MODULAÇÃO LASER DE BAIXA
INTENSIDADE NA REGENERAÇÃO DE TENDÕES
DE RATOS JOVENS E ADULTOS**

CHARLES TACIRO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

**“EFEITO DA MODULAÇÃO LASER DE BAIXA
INTENSIDADE NA REGENERAÇÃO DE TENDÕES
DE RATOS JOVENS E ADULTOS”**

CHARLES TACIRO

**Tese Apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Fisioterapia da
Universidade Federal de São Carlos,
como parte dos requisitos para
obtenção do Título de Doutor em
Fisioterapia**

Orientador Nivaldo Antonio Parizotto

São Carlos
2011

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

T118em

Taciro, Charles.

Efeito da modulação laser de baixa intensidade na regeneração de tendões de ratos jovens e adultos / Charles Taciro. -- São Carlos : UFSCar, 2011.
69 f.


Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Fisioterapia. 2. Laserterapia. 3. Envelhecimento. 4. Tendão de Aquiles. I. Título.


CDD: 615.82 (20^a)

CHARLES TACIRO, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, em 15 de julho de 2011

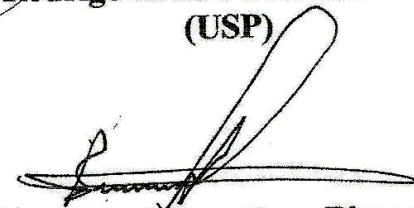
Banca Examinadora:



**Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto
(UFSCar)**



**Prof. Dr. Rodrigo Alvaro Brandão Lopes Martins
(USP)**



**Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel
(UNICAMP)**



**Prof. Dr. João Luiz Quaghotti Durigan
(UFSCar)**



**Prof.ª Dr.ª Sabrina Peviani Messa
(UFSCar)**

DEDICO ESTE TRABALHO

... à Roberta, por dar sentido à minha vida;

... à minha Mãe, pelo eterno amor e dedicação incondicionais e exemplo de garra, perseverança e humanidade;

... ao meu Pai (*in memoriam*), por tudo que você foi e representa para mim;

... aos meus irmãos, William e Alexis pelo companheirismo, compreensão e paciência.

AGRADECIMENTOS

Complexa não é a compreensão dos mecanismos que envolvem a vida, mas sim as leis que regem a humanidade: amizade, compreensão, companheirismo e o amor. É somente a partir delas que as verdadeiras realizações são possíveis. Sendo assim, gostaria de agradecer imensamente a TODOS àqueles que me acompanharam e apoiaram durante este período, e destacar algumas pessoas que nesta trajetória, foram fundamentais:

À minha família que sempre me apoiou e se esforçou para que eu conseguisse vencer os meus obstáculos;

À Roberta, pelo amor, carinho e paciência nesta jornada;

Ao meu amigo, guru, mentor e orientador Prof. Nivaldo, por acreditar em mim, me incentivar e fazer parte do que alcancei. Por toda paciência e generosidade, obrigado;

À Profa Tânia de Fátima Salvini e ao Prof. Edson Rosa Pimentel, pelo incentivo e exemplo de profissionalismo;

Ao amigo Rodrigo L. Carregaro e Aline Toledo, inestimáveis cuja solidariedade e amizade são intermináveis;

Meus amigos Davilene, Livia, Vivian e Thiago que sem a ajuda deles, este trabalho não seria possível;

Ao Prof. Heraldo Possolo de Sousa e Profa. Ana Iochabel Soares Moretti, do Laboratório de Emergências Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, pela colaboração e auxílio ao desenvolvimento deste trabalho;

I - LISTA DE ABREVIATURAS

A10J: Subgrupo adulto 10J/cm²
A3J: Subgrupo adulto 3J/cm²
ACL: Subgrupo adulto controle lesado
APL: Subgrupo adulto placebo
AsGaAl: arseneto de gálio alumínio
ATP: trifosfato de adenosina
BSA: Soro albumina bovina
CaCl²: Cloreto de Cálcio
DNA: ácido desoxirribonucléico
DP: desvio padrão
EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético
FGF: fator de crescimento do fibroblasto
He-Ne: hélio-neônio
IL-1 β : Interleucina-1beta
IL-10: Interleucina-10
IL-6: Interleucina-6
J10J: Subgrupo jovem 10j/cm²
J3J: Subgrupo jovem 3j/cm²
JCL: Subgrupo jovem controle lesado
JPL: Subgrupo jovem placebo
KCl: cloreto de potássio
mJ: milijoule
MMP: metaloproteinases da matriz
mW: miliwatt
NaCl: Cloreto de sódio
NaN³: Azida Sódica
nm: nanômetro
NOx-: Nitrito/nitrato
O₂: oxigênio
OR: Retardo ótico
P.O.: pós-operatório
PDGF: fator de crescimento derivado das plaquetas
PGE1: prostaglandinas E-1
PGE2: prostaglandinas E-2
RNA: ácido ribonucléico
RNA_m: ácido ribonucléico mensageiro
SDS-PAGE: sódio dodecil sulfato-poliacrilamida gel eletroforese
seg: segundos
SOD: superóxido dismutase
TEMED: tetrametiletilenodiamina
TLBI: terapia laser de baixa intensidade
TGF- α : fator de crescimento transformação alfa
TGF- β : fator de crescimento transformação beta
Tris: tris- (hidroximetil)-aminometano
Triton X-100: octilfenoxipolietoxietanol
VEGF: fator de crescimento endotelial vascular
ZnCl²: Clorato de zinco

II - LISTA DE FIGURAS

Parte I

Figura 1. Procedimento cirúrgico, exposição do tendão calcâneo para a tenotomia e sutura da via de acesso;

Figura 2. Equipamento laser utilizado;

Figura 3. Procedimento de radiação laser de baixa intensidade;

Parte II

Artigo 1

Figura 1. Distribuição das medidas de Retardo Ótico (nm) obtidas através da análise por microscopia de polarização;

Figura 2. Distribuição dos valores das MMPs obtidas através da análise de zimografia;

Artigo 2

Figura 1. Procedimento cirúrgico, exposição do tendão calcâneo para a tenotomia e sutura da via de acesso;

Figura 2. Procedimento de irradiação laser;

Tabela 1. Valores da análise descritiva, Média e Desvio Padrão para IL-1 β , IL-10 e NOx-;

Figura 3. Gráfico: Efeito da TLBI sobre os níveis de IL-1 β ;

Figura 4. Gráfico: Efeito da TLBI sobre os níveis de IL-10;

Figura 5. Gráfico: Efeito da TLBI sobre os níveis de NO;

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	I
LISTA DE FIGURAS	II
PARTE I	
1 RESUMO / ABSTRACT	9.
2 CONTEXTUALIZAÇÃO	11.
3 OBJETIVOS	14.
4 MATERIAIS E MÉTODOS	14.
4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS	14.
4.2 MODELO EXPERIMENTAL	15.
4.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS	15.
4.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	15.
4.4.1 Procedimento cirúrgico	15.
4.4.2 Tratamento	16.
4.4.3 Preparação das amostras para análise de birrefringência	18.
4.4.4 Preparação das amostras de Zimografia, IL-1 β , IL-10 e NO	19.
4.5 MICROSCOPIA DE POLARIZAÇÃO	19.
4.6 ZIMOGRAFIA	20.
4.7 MÉTODO ELISA	21.
4.8 PRODUTOS DE ÓXIDO NÍTRICO	22.
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	23.
5 BIBLIOGRAFIA	23.
PARTE II	
6. Manuscritos	
6.1 Influência da idade na organização da matriz extracelular durante o processo de regeneração do tecido tendíneo sob estimulação laser de baixa intensidade	28.
6.2 Influência da idade sobre a fotoestimulação laser de baixa intensidade na regeneração tendínea na concentração de IL-1 β , IL-10 e produção de óxido nítrico	46.
PARTE III	
7 CONCLUSÕES GERAIS	68.
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	68.

PARTE I

Resumo
Contextualização
Objetivo
Metodologia

1. RESUMO:

O envelhecimento é um importante fator relacionado à predisposição do tendão aos processos degenerativos, patológicos e ao retardo da reparação tecidual. Várias modalidades terapêuticas são utilizadas para promover a aceleração e melhora do reparo tendíneo, dentre elas a terapia laser de baixa intensidade (TLBI). Porém os reais efeitos desta terapia associada ao fator potencialmente decisivo na resposta celular como o desenvolvimento e envelhecimento ainda são desconhecidos. Este estudo avaliou os efeitos da TLBI, aplicado na reparação do tendão calcâneo após tenotomia radical do tendão calcâneo de ratos em duas idades diferentes. Um grupo de ratos jovens (4 semanas de idade, $n=56$, massa= 111.3 ± 8.3 g), subdivididos aleatoriamente em 4 subgrupos contendo cada um 14 animais: J3J (dose $3\text{J}/\text{cm}^2$, energia $8.5\text{mJ}/\text{sessão}$ e $5.0\text{seg}/\text{sessão}$), J10J ($10\text{J}/\text{cm}^2$, energia $28.3\text{mJ}/\text{sessão}$ e $15\text{seg}/\text{sessão}$), placebo - JPL (dose $0\text{J}/\text{cm}^2$), controle - JCL (nenhum tratamento); e um grupo adulto (27 semanas de idade, $n=56$, massa= 385.4 ± 34.3 g), subdivididos aleatoriamente em 4 subgrupos: A3J (dose $3\text{J}/\text{cm}^2$, energia $8.5\text{mJ}/\text{sessão}$ e $5.0\text{seg}/\text{sessão}$), A10J ($10\text{J}/\text{cm}^2$, energia $28.3\text{mJ}/\text{sessão}$ e $15\text{seg}/\text{sessão}$), placebo - APL (dose $0\text{J}/\text{cm}^2$), controle - ACL (sem tratamento). O laser utilizado (685nm , $5.4\text{W}/\text{cm}^2$) foi aplicado em 12 sessões, uma vez ao dia, em um único ponto sobre a região da lesão. No 13º dia pós-operatório os animais foram eutanasiados e seus tendões removidos. A organização do colágeno do tendão foi analisada por meio da microscopia de polarização. A atividade das metaloproteases (MMP-2 e MMP-1) foi analisada pela técnica de Zimografia, a produção de óxido nítrico (NO) pelo método Griess e a concentração de Interleucina-1beta (IL-1 β) e Interleucina-10 (IL-10) pelo método ELISA. A análise dos dados mostrou significativa ($p < 0.05$) resposta do tecido à irradiação laser, tanto de forma idade-dependente como dose-dependente, sendo que, os resultados demonstram maiores alterações para o grupo adulto na dose de $3\text{J}/\text{cm}^2$ quando comparado aos outros subgrupos na avaliação da IL-1 β , IL-10 e birrefringência, às quais podemos verificar janelas terapêuticas potencialmente inibitórias e estimulatórias.

Palavras-chave: laserterapia, envelhecimento, tendão.

ABSTRACT:

Aging is an important factor related to the predisposition to tendon degeneration, pathological and delayed tissue repair. Several physical therapy modalities are used to promote acceleration and improvement of tendon healing, among them the low-level laser therapy (LLLT), but the real effects of this therapy associated with the development and aging effects are not yet known. The present study evaluated the effects of LLLT, applied on the calcaneal tendon repair after total tenotomy on calcaneal tendon of rats in two different ages. Young rats (4 weeks old, $n = 56$, body mass = $111.3 \pm 8.3\text{g}$), randomly divided into 4 subgroups containing 14 animals: J3J ($3\text{J}/\text{cm}^2$, $8.5\text{mJ}/\text{session}$, $5.0\text{seg}/\text{session}$), J10J ($10\text{J}/\text{cm}^2$, $28.3\text{mJ}/\text{session}$, $15\text{seg}/\text{session}$), placebo - JPL ($0\text{J}/\text{cm}^2$), control - JCL (no treatment) and an adult group (27 weeks old, $n = 56$, body mass = $385.4 \pm 34.3\text{g}$), randomly divided into 4 subgroups: A3J ($3\text{J}/\text{cm}^2$, $8.5\text{mJ}/\text{session}$, $5.0\text{seg}/\text{session}$), A10J ($10\text{J}/\text{cm}^2$, $28.3\text{mJ}/\text{session}$, $15\text{seg}/\text{session}$), placebo - APL ($0\text{J}/\text{cm}^2$) control - ACL (no treatment). LLLT (685nm , $5.4\text{W}/\text{cm}^2$) was applied in 12 sessions, once a day, at a single point on the injury site. On the 13th postoperative day, the animals were euthanized and their tendons were removed. The tendon collagen organization was analyzed by polarization microscopy. The metalloproteinases activity (MMP-2 and MMP-1) was analyzed by zymography, nitric oxide (NO) production was analyzed by Griess method and the concentration of interleukin-1beta (IL-1 β) and interleukin-10 (IL-10) by ELISA method. The data analysis showed significant ($p < 0.05$) tissue response to LLLT, both age-dependent and dose-dependent, and the results showed major changes to the adult group at $3\text{J}/\text{cm}^2$ when compared to other subgroups in the evaluation of IL-1 β , IL-10 and birefringence, which we can see a potentially inhibitory and stimulatory window.

Key-words: Laser therapy, aging, tendon.

2 CONTEXTUALIZAÇÃO

O aumento da expectativa de vida pode ser relacionado ao avanço da ciência e da melhoria das condições gerais de vida, os quais contribuem para prevenir, controlar e tratar muitas doenças e condições responsáveis por alterações degenerativas comuns ao envelhecimento.

A busca por intervenções que minimizem os possíveis efeitos negativos do avanço da idade fisiológica do organismo tem sido uma tendência global por diversos pesquisadores e da população, na busca de novas teorias e práticas, cuja meta foca em deter ou retardar o processo do envelhecimento ou manter a capacidade funcional e sua autonomia nas últimas décadas da vida.

O envelhecimento caracteriza-se por um conjunto de eventos dinâmicos e progressivos como modificações morfológicas, fisiológicas e funcionais desde a infância, puberdade, adolescência e um marcante declínio no período seguinte de meia idade até a idade avançada. Correlaciona-se a esse declínio a senescência, que pode ser entendida como a perda progressiva da capacidade de homeostase (Troen, 2003; Jazwinski, 2000) que pode interferir na capacidade de adaptação do indivíduo ao meio ambiente e ser um fator predisponente à incidência e persistência de processos patológicos (Raha, 2000).

Erros na transcrição e tradução do DNA, modificação nas concentrações de proteínas, minerais e hormônios, redução do metabolismo de determinadas células, diminuição do aporte vascular, capacidade imunológica e modificação de propriedades físicas como a resistência mecânica são características comuns no envelhecimento, às quais podemos correlacionar com as lesões que ocorrem com uma maior incidência na fase adulta, bem como sua lentidão no processo de recuperação, culminando em

diversos problemas que vão desde o desconforto e a dor causados pela lesão até o elevado custo para a previdência social (Leeuwenburgh, 2003; Merry, 2004; Pousson e Valour, 2003; Nestorson et al., 2000, Feng Yao, 2001).

Dentre os efeitos mais preocupantes do envelhecimento, o retardo da regeneração tecidual e os agravos decorrentes deste processo lentificado são aqueles que geram maiores prejuízos para a saúde do indivíduo idoso. Em virtude deste fato é fundamental desenvolvimento de terapias que promovam estímulo adequado para acelerar a reparação de lesões teciduais baseando-se na compreensão dos mecanismos e condições predisponentes envolvidos no quadro clínico, e assim traduzir esses mecanismos em agentes úteis para o retorno mais rápido e eficaz do indivíduo acometido pela lesão às suas funções normais (Bailey, A.J, 2001; Raha e Robinson, 2000).

O processo de regeneração tecidual induzido por diversos recursos terapêuticos tem como base biomodulatória alguns componentes moleculares, celulares e teciduais que podem ser modificados pelo avanço da idade (Vladimirov et al., 2004; Harman, 2006).

O que justifica a teoria de que, as abordagens terapêuticas cuja ação é baseada em processos biológicos alterados pelo envelhecimento devem ser aplicadas de forma a terem seus parâmetros ajustados não somente para o tipo de patologia e período da lesão, mas também para cada idade fisiológica/ cronológica do organismo.

Porém são poucos os estudos sobre as particularidades das modalidades terapêuticas utilizadas na fisioterapia sobre os processos de regeneração tecidual em diferentes idades, como o ultra-som terapêutico, ondas curtas, microondas, correntes elétricas terapêuticas e a terapia laserterapia de baixa intensidade (TLBI).

Apesar de escassos os estudos que relacionam especificamente TLBI ao envelhecimento, resultados positivos desta modalidade de tratamento são encontrados

em processos envolvidos na senescência, como apoptose celular, concentração de radicais livres, produção da superóxido-dismutase (enzima que atenua o dano causado por radicais livres) (Karu, 2010; Klebanov et al., 2005), atividade de fibroblastos, neoangiogênese, inflamação e fluxo sanguíneo (Salate et al, 2005; Enwemeka e Reedy, 2000; Reddy, 2004; Fulop et al., 2009).

Devido ao sustentável corpo de evidências científicas dos efeitos da TLBI sobre a regeneração do tendão (Salate et al., 2005, Oliveira et al., 2009) e às diferentes incidências das tendinopatias nos jovens, adultos e idosos (Wang, 2006; Nestorson et al., 2000) e considerando a possibilidade da influência da idade nas vias da fotobiomodulação, o modelo experimental deste estudo é baseado no tratamento da tenotomia transversal radical do tendão calcâneo de ratos em duas fases maturacionais.

Tendinopatias são complicações frequentes cujos componentes causais podem ser relacionadas ao processo de desenvolvimento e senescência. A redução da capacidade de reparação e resistência tecidual é verificada no fato da maioria das rupturas totais do tendão de Aquiles ocorrer em indivíduos acima de 35 anos de idade (Jarvinen et al., 2001; Nestorson *et al*, 2000). Essa lesão pode é relacionada à elementos que podem ser influenciados pela TLBI como suprimento sanguíneo, desequilíbrio redox, modulação da elementos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios, atividade fibroblástica e produção de colágeno (Teissl et al., 2000).

Enfatizamos que a definição de parâmetros ideais e a compreensão dos reais efeitos da TLBI sobre tecidos biológicos são essenciais para aumentar a eficácia na regeneração principalmente quando se trata do envelhecimento, cujas conseqüências de uma lesão tendem a se tornar progressivamente mais graves em relação ao aumento da idade.

3 OBJETIVOS

O objetivo principal deste estudo foi investigar os efeitos da idade sobre a Fotobiomodulação Laser de Baixa Intensidade, em doses previamente estabelecidas sobre o processo de regeneração após a tenotomia total do tendão calcâneo, visando correlacionar o envelhecimento à fotobiomodulação do processo regenerativo.

Para tal foram analisados:

- Retardo ótico por microscopia de polarização;
- Expressão de MMPs no tecido tendíneo;
- Produção de NO tecidual;
- Dosagem das citocinas IL-1 β e IL-10.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais Experimentais

Foram utilizados 112 animais (*Rattus norvegicus albinus*), da raça Wistar, machos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos, com idade e massa corpórea variando conforme a faixa etária de cada grupo.

Os animais permaneceram no Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos até a idade apropriada para o experimento, sendo então transferidos para o Biotério do Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, onde foram mantidos em gaiolas de polipropileno padrão, contendo cada uma quatro animais. Estes receberam água e ração balanceada granulada (PRÓ-BIOTÉRIO / MP-77) - *ad libitum* e foram mantidos em ambiente higienizado, com iluminação em ciclo claro/escuro de 12 horas.

4.2 Modelo Experimental

O modelo utilizado neste estudo foi baseado nos experimentos de CARRINHO et al. (2006) ao promoverem tenotomia radical na porção média do tendão calcâneo de roedores através de uma incisão transversal do tendão dissecado.

4.3 Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em 2 grupos, conforme a faixa etária correspondente a um grupo jovem (4 semanas, massa = $111,3 \pm 8,3$ g) e um grupo adulto (27 semanas, massa = $385,4 \pm 34,3$ g) constituído cada um de 56 animais, subdivididos em 4 subgrupos de 14 elementos cada, que receberam tratamento específico conforme a tabela a seguir:

	Subgrupos	Idade (semanas)	Dose	Potência
Grupo Jovem	J3J – 3 joules	4	$3\text{J}/\text{cm}^2$	15 mW
	J10J – 10 joules	4	$10\text{J}/\text{cm}^2$	15 mW
	JPL – placebo	4	$0\text{J}/\text{cm}^2$	0 mW
	JCL – controle lesado	4	-----	-----
Grupo Adulto	A3J – 3 joules	27	$3\text{J}/\text{cm}^2$	15 mW
	A10J – 10 joules	27	$10\text{J}/\text{cm}^2$	15 mW
	APL – placebo	27	$0\text{J}/\text{cm}^2$	15 mW
	ACL – controle lesado	27	-----	-----

4.4 Procedimento Experimental

4.4.1 Procedimento Cirúrgico

Os animais foram inicialmente pesados e submetidos a uma anestesia geral por via intraperitoneal utilizando-se uma combinação de anestésicos (KETAMINA - 95mg/kg e XILAZINA 2% -12mg/kg), previamente estabelecida, em doses correspondentes à massa corporal de cada animal.

A pele sobre a região posterior da tíbia do membro posterior direito na região correspondente ao tendão calcâneo foi tricotomizada com um barbeador elétrico. Após assepsia local (com álcool iodado), foi realizada uma incisão longitudinal de

aproximadamente 7,0mm de comprimento sobre a pele no local correspondente ao terço médio do tendão calcâneo, entre a inserção calcâneo e a junção miotendínea onde foi efetuada a tenotomia total por cisalhamento no sentido transversal ao maior eixo do tendão sem posterior tenorrafia.

A seguir a pele foi suturada com fio absorvível e submetida à limpeza local (álcool iodado), não havendo posteriormente nenhum tipo de imobilização do segmento.

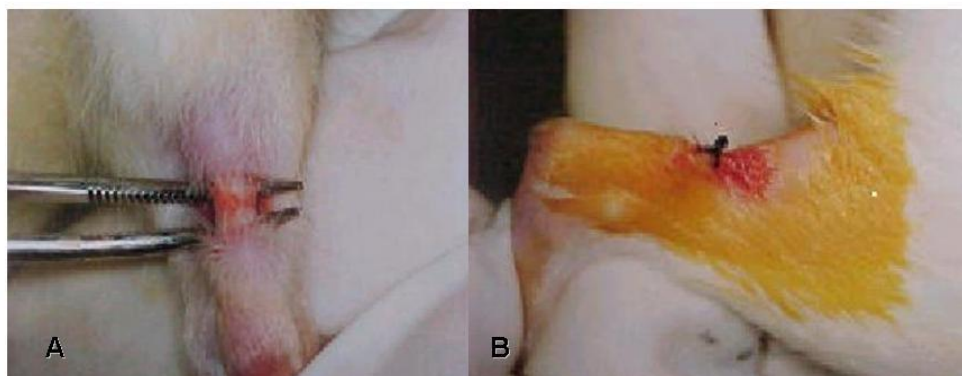


Fig.1 – “A” Exposição do tendão calcâneo para o procedimento de tenotomia radical e em “B” sutura do acesso cirúrgico.

4.4.2 Tratamento:

Para o tratamento dos animais foi utilizado um laser (DMC[®] - São Carlos, Brasil) classe 3B, diodo AsGaAl, com comprimento de onda 685nm, potência de saída de 15mW, área da fibra de 0.0028cm², diâmetro do feixe de 0,6mm, divergência de 1.5°, emissão contínua e densidade de potência de 5,4W/cm², em doses de 3J/cm² (5 segundos de exposição e 8,3mJ/sessão) e 10J/cm² (15 segundos de exposição e 28,5 mJ/sessão).



Fig. 2 – Equipamento emissor de radiação laser utilizado no estudo

Inicialmente o equipamento laser foi aferido no Grupo de Óptica da Universidade de São Paulo (USP) - Campus de São Carlos e foi verificada a potência de emissão do laser no início e fim de cada sessão através de um *Lasercheck (Hand held laser power meter – COHERENT®)*.

Para a realização das aplicações laser, os animais foram imobilizados através de preensão manual e irradiando-se por fotoestimulação transcutânea a região da lesão com a técnica de contato a um ângulo de 90° em relação à superfície da área lesada, sendo a primeira irradiação 24h após a lesão. O tratamento constituiu-se de 12 sessões consecutivas, intervaladas por 24h. No 13º dia após a tenotomia (24h pós a última sessão) os animais foram submetidos à eutanásia (overdose de ketamina e xilasina) e imediatamente seus tendões direitos foram retirados cirurgicamente por dissecação desde a inserção calcanear até a junção miotendínea, seguindo-se então o procedimento de preparação das lâminas histológicas.

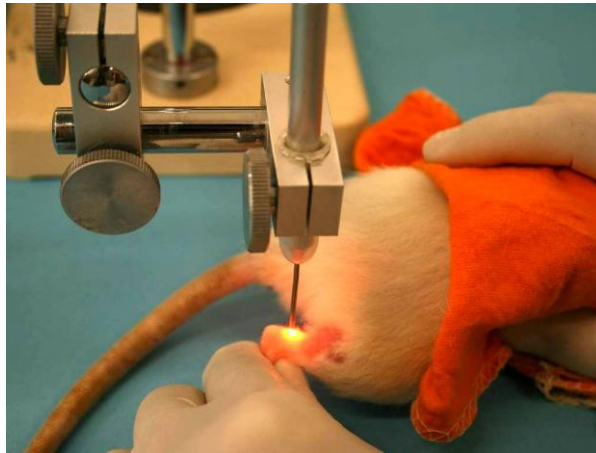


Fig. 3 – Procedimento de radiação laser de baixa intensidade transcutânea sobre o local da tenotomia do calcâneo direito.

4.4.3 Preparação das Amostras para análise de birrefringência

Para uma avaliação de birrefringência das fibras de colágeno, 10 tendões de cada subgrupo foram dissecados e lavados em soro fisiológico e fixados em formol a 10% por 24 horas, a fim de iniciar o preparo das lâminas histológicas.

Posteriormente os tendões foram lavados em água corrente por 24hs, em seguida desidratados em soluções crescentes de álcool etílico, a 70%, 90%, 95% por uma hora em cada solução e finalizando com 3 banhos de 1h de duração cada em solução de álcool 100%. Então os tendões foram diafanizados inicialmente em solução de álcool/xilol 1:1 por uma hora e a seguir em 3 banhos de xilol de 1 hora de duração cada à 100%, seguidos de 3 banhos de parafina líquida com duração de 1 hora para a inclusão em blocos de parafina.

Os tendões, inclusos nos blocos de parafina, foram cortados no sentido longitudinal de forma semi-seriada por meio de um micrótomo rotativo numérico (Ancap®, modelo 297) do Laboratório de Eletrotermofototerapia da UFSCar com espessura padronizada de 5,0 μ m.

Cada lâmina foi montada com uma série de 4 cortes consecutivos de cada tendão e cada grupo de animais foi representado por 10 lâminas histológicas. Após serem montadas, todas as lâminas foram desparafinizadas e novamente hidratadas.

4.4.4. Preparação das Amostras para análise de Zimografia, IL-1 β , IL-10 e NO.

Foram coletados 4 tendões de cada subgrupo no 14º dia após a lesão, em seguida, devidamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em *freezer* à - 86º C para posterior análise. A amostra do tendão (inteiro) foi lavada 3 a 4 vezes em solução salina e foi realizada a limpeza e remoção de qualquer tipo de tecido periférico, como tecido muscular e demais membranas visíveis. Os tendões foram utilizados para análise das Metaloproteinases 1 e 2 (MMP-1, MMP-2), citocinas (IL-1 β e IL-10) e quantificação de nitrato/nitrito (NOx-) para determinação dos níveis de óxido nítrico (NO).

4.5 Microscopia de Polarização

A caracterização estrutural das fibras de colágeno foi realizada utilizando, para isso, uma de suas propriedades anisotrópicas ópticas: a birrefringência total, medida por meio da microscopia de polarização. Segundo Vidal (2011), o aumento da birrefringência total está diretamente relacionado ao aumento das ligações cruzadas entre as fibras de colágeno, aumentando a cristalinidade e a agregação ordenada do colágeno tipo I e sua orientação.

As lâminas de cada grupo foram imersas em água destilada (índice de refração = 1,333) por cerca de 30 minutos, para análise através da birrefringência.

Após o período de imersão, as lâminas foram cobertas por lamínulas contendo água destilada nas interfaces. Foi utilizado um microscópio de luz polarizada (LEICA,

objetiva pol.10X/0,22, condensador 0.9, compensador de Sénarmont $\lambda/4$, luz monocromática $\lambda= 546\text{nm}$, obtida por meio de um filtro de interferência).

As medidas de retardo óptico foram obtidas com o eixo do tendão a 45° de inclinação em relação ao polarizador e o analisador, permitindo o maior brilho de birrefringência e portanto, uma análise de alinhamento das fibras colágenas ao longo do eixo do tendão.

4.6 Zimografia

Determinação da atividade de MMPs por Zimografia.

Foi utilizada a metodologia de Marquetti et al. (2008). Amostras de tendão extraídas foram devidamente congeladas com nitrogênio líquido e pesadas. A amostra do tendão foi lavada de 3 a 4 vezes em solução salina e foi feita a remoção de qualquer tipo de tecido periférico. As amostras foram manualmente homogeneizadas e incubadas em 0,3 ml de tampão de extração (10mM de ácido cacodílico, Ph5,0, 150mM de NaCl, 1 μ M de ZnCl_2 ; 20mM de CaCl_2 ; 1,5mM de NaN_3 e 0,01% de Triton X-100) à 4°C , com agitação contínua durante 24 horas. Após este tempo, o tampão de extração foi coletado por centrifugação (10min, 13.000 x g à 4°C). As amostras provenientes de 4 tendões por grupo foram concentradas de maneira que cada poço do gel de zimografia continha 20 μ g de proteína e 10 μ l de tampão, totalizando 30 μ l de solução por poço.

Os géis de zimografia consistiram de géis de poliacrilamida (10%) com gelatina (100mg/ml) na presença de SDS sob condições não reduzidas. A eletroforese (100V) foi realizada até o corante atingir a base do gel. Após a eletroforese, o gel foi lavado 2 vezes durante 30 minutos em solução 2,5% de Triton X-100 para remoção do SDS. Em seguida, o gel foi incubado em tampão de substrato (50mM de Tris-HCl, ph 8,0; 5mM de CaCl_2 e 0,02% NaN_3) à 37°C , durante 24 horas. Após este tempo, o gel foi corado

com Coomassie Blue por 90 minutos e descorado com ácido acético: metanol: água (1:4:5) para visualização das bandas de atividade. As bandas de atividade foram visualizadas como bandas claras contra o fundo azul, indicando a proteólise do substrato. A massa molecular das bandas de atividade gelatinolítica foi determinada por comparação com marcador de massa molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas Life Sciences, Burlington, ON).

Bandas de atividade foram identificadas seguindo descrição prévia de seus pesos moleculares 72 kDa: pro-MMP-2; 66 kDa: intermediary-MMP-2; 64 kDa: active-MMP-2; 52 kDa: latent-MMP-1; 42 kDa: active-MMP-1 sendo empregada para a análise quantitativa da densidade das bandas de proteína na Zimografia o programa GeneTools v3.06. (Syngene, Cambridge, UK).

4.7 Método ELISA: Quantificação da IL-1 β e IL-10

As citocinas IL-1 β e IL-10 foram dosadas a partir do homogenato tecidual. Aproximadamente 50 mg de tecido tendíneo foram pulverizados em nitrogênio líquido e homogeneizados em 1ml de solução de RIPA (100mM de Tris-HCl pH 7.5, 1% de desoxicolato de sódio, 1% de NP40, 150mM de NaCl, 0.1% de SDS). O material permaneceu em agitação, a 4°C por 1 hora. Em seguida, as amostras foram centrifugadas à 10.000 RPM por 20 minutos a 4°C. As medidas foram normalizadas pela concentração de proteínas na solução (Método de Bradford–Biorad). As dosagens foram feitas por ELISA, com kit da R&D Systems (Minneapolis, MN, USA).

Placas de 96 poços foram adsorvidas com anticorpo de captura monoclonal anti-citocina de rato, diluído em PBS por 12 horas. Em seguida, as placas foram lavadas com solução de PBS contendo 0,05% de Tween20.

Os sítios inespecíficos foram bloqueados com PBS contendo 1% de BSA (soro albumina bovina – Sigma) por 1 hora. A placa foi lavada para remoção da solução de bloqueio. Em seguida, as amostras e os padrões foram colocados nos respectivos poços e incubados por 2 horas. Ao final do período, as placas foram lavadas. O anticorpo de detecção foi adicionado, conjugado a peroxidase, e incubado por 2 horas. As placas foram lavadas novamente. Ao final das lavagens, foi adicionado o substrato da peroxidase, tetrametilbenzidina, deixando reagir por 15 a 20 minutos. Ao final da incubação, foi adicionada solução de parada ($H_2SO_4 - 2N$). As citocinas foram quantificadas pela leitura da absorbância (450 nm) e os resultados foram expressos em pico-grama de antígeno por miligrama de proteína.

4.8 Produtos de Óxido Nítrico: Nitrito/Nitrato

A quantificação dos níveis de Nitrito/Nitrato (NO_x^-) foi utilizada para avaliar a produção de Óxido Nítrico. Amostras de tendão (50mg de tecido) foram processadas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em solução de RIPA (100mM de Tris-HCl pH 7.5, 1% de desoxicolato de sódio, 1% de NP40, 150mM de NaCl, 0.1% de SDS), acrescido de inibidores de proteases. As amostras foram centrifugadas a 1400 RPM por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e a concentração de proteínas quantificada pelo método de Bradford.

O método de detecção foi baseado na reação do nitrito com reagente de Griess produzindo uma reação colorimétrica que foi detectada por absorbância com leitura em comprimento de onda de 595nm. O nitrato presente na amostra foi reduzido à nitrito utilizando-se as enzimas nitrato redutase e NADPH. A concentração de nitrito foi dividida pela quantidade de proteína presente nas amostras.

Para a reação de nitrato, reagiu-se 50ml da amostra ou padrão (ou de diluente, para o branco), com 25ml da solução de nitrato redutase (10 unidades dissolvidas em 16,4 mL de Tris 40 mM , pH 7,4) e 25ml da solução de NADPH (6,7 mg em 50 mL de Tris). As amostras foram incubadas por 2h a temperatura ambiente.

Para a reação de Griess adicionou-se 100 ml da solução de trabalho (solução A: 1% de sulfanilamida em ácido fosfórico a 5%; solução B: 0,1% de naftil-etilenodiamina em água destilada; misturadas em partes iguais das soluções A e B). Após a incubação de 10 minutos em temperatura ambiente foi feita a leitura em comprimento de onda 595 nm no leitor de placa Genius (Salzburg, Áustria). O mesmo protocolo, sem adição de nitrato redutase, foi utilizado para a dosagem de nitrito, fazendo-se a leitura à 595 nm.

4.9 Análise Estatística

O pacote SPSS (Statistical Package for Social Sciences) versão 17.0 foi utilizado para as análises estatísticas pela aplicação do teste de análise de variância multivariada MANOVA para determinação das diferenças nas variáveis do presente trabalho. Para determinar as diferenças entre os grupos e os subgrupos foi aplicado o teste de Tuckey adotando um nível de significância estatística de 5% ($P \leq 0.05$), intervalo de confiança de 95%.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAILEY, A.J. Molecular mechanisms of ageing in connective tissues. **Mechanisms of Ageing and Development**, v.122, p.735-755, 2001.
2. CARRINHO, P.M.; RENNÓ, A.C.M.; KOEKE, P.U.; SALATE, A.C.B.; PARIZOTTO, N.A.; VIDAL, B.C. Comparative Study Using 685nm and 830nm

- lasers in the tissue repair of tenotomized tendons in the mouse. **Photomedicine and Laser Surgery**. V.24, p.754-758, 2006.
7. COUPPÉ, C.; HANSEN, P.; KONGSGAARD, M.; KOVANEN, V.; SUETTA, C.; AAGAARD P, et al. Mechanical properties and collagen cross-linking of the patellar tendon in old and young men. **J Appl Physiol**, v.107, p.880-886, 2001.
 3. ENWEMEKA, C.S.; REDDY, K. The biological effects of laser therapy and other physical modalities on connective tissue repair processes. **Laser Therapy**. v.12, p.22-30, 2000.
 4. FENG YAO, et al. Age and Growth factors in porcine full thickness wound healing. **Wound Repair and Regeneration**. p.371-377, 2001.
 5. FULOP AM, DHIMMER S, DELUCA, JR, JOHANSON DD, LENZ RV, PATEL KB, DOURIS PC, ENWEMEKA CS. A meta-analysis of the efficacy of phototherapy in tissue repair. **Photomedicine and laser surgery**, v.27, p.695-702, 2009.
 8. HARMAN, D. Free radical theory of aging: An Update, increasing the functional life span. **Ann. N.Y. Acad. Sci**, v.1067, p.10-21, 2006.
 9. JARVINEN TAH, KANNUS P, PAAVOLA M, JARVINEN TLN, JOZSA L, JARVINEN M. Achilles tendon injuries. **Current Opinion in Rheumatology**, v.13, p.150-55, 2001.
 10. JAZWINSKI, S.M; Aging and longevity genes. **Acta Biochimica Polonica**, v.47, p.269-279, 2000.
 11. KARU, T. Mitochondrial Mechanisms of Photobiomodulation in context of new data about multiple roles of ATP. **Photomedicine and laser surgery**, v.28, p.159-160, 2010.

12. KLEBANOV, G.I.; POLTANOV, E.A.; CHICHUK, T.V. Changes in Superoxide Dismutase Activity and Peroxynitrite Content in Rat Peritoneal Macrophages Exposed to He-Ne Laser Radiation. **Biochemistry (Moscow)**, v.70, p.1335-1340, 2005.
13. LEEUWENBURGH, C. Role of Apoptosis in Sarcopenia. **Journal of Gerontology**, v.58, p.999-1001, 2003.
14. MARQUETI R.C., PARIZOTTO N.A., CHRIGUER R.S., PEREZ S.E.A., SELISTRE-ARAUJO H.S. Androgenic-anabolic steroids associated with mechanical loading inhibit matrix metalloproteinase activity and affect the remodeling of the Achilles tendon in rats. **Am J Sports Med**, v.34, p.1274-1280, 2006.
15. MERRY, B.J. Oxidative stress and mitochondrial function with aging – the effects of calorie restriction. **Aging cell**, v.3, p.7-12, 2004.
16. NESTORSON, J.; MOVIN, T.; MOLLER, M.; KARLSSON, J. Function after Achilles tendon rupture in the elderly. **Acta Orthop Scand**, v.71, p.64-68, 2000.
17. OLIVEIRA, F.S.; PINFILDI, C.E.; PARIZOTTO, N.A.; LIEBANO, R.E.; BOSSINI, P.S.; GARCIA, E.B.; FERREIRA, L.M. Effect of Low Level Laser Therapy (830nm) with different therapy regimes on the process of tissue repair in partial lesion calcaneus tendon. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.41, p.271-276, 2009.
18. POUSSON, M.; VALOUR, D. Compliance changes of the series elastic component of elbow flexor muscles with age in humans. **Eur. J. Physiol**, v.445, p.721-727, 2003.
19. RAHA, S.; ROBINSON, B.H. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. **Trends Biochem Sci**, v.25, p.502-508, 2000.

20. REDDY, G.K. Photobiological Basis and Clinical Role of Low-Intensity Lasers in Biology and Medicine. **Journal of clinical laser medicine & Surgery**, v.22, p.141-150, 2004.
21. SALATE, A.C.B.; BARBOSA, G.; GASPAR, P.; KOEKE, P.U.; PARIZOTTO, N.A. Effect of In-Ga-Al-P Diode Laser Irradiation on Angiogenesis in Partial Ruptures of Achilles Tendon in Rats **Photomedicine and Laser Surgery**, v.23, p.470-475, 2005.
22. TEISSEL, M.S.; BLASKO, I.; ZISTERER, K.; NEUMAN, B.; LANG, B.; LOEBENSTEIN, B.G. An imbalance between pro- and anti-inflammatory cytokines, a characteristic feature of old age. **Cytokine**, v.12, p.1160-1161, 2000.
23. TROEN, B.R. The biology of aging. **Mt Sinai J Med**, v.70, p.3-22, 2003.
24. VIDAL, B.C.; MELLO, M.L. Collagen type I amide I band infrared spectroscopy. **Micron**, v.42, p.283-289, 2011.
25. VLADIMIROV, Y.A.; OSIPOV, A.N.; KLEBANOV, G.I. Photobiological Principles of Therapeutic Applications of Laser Radiation. **Biochemistry (Moscow)**, v.69, p.81-90, 2004.
26. WANG, J.H.C. Mecanobiology of tendon. **Journal of Biomechanics**, v.39, p.1563-1582, 2006.

PARTE II

Manuscrito 1:

**INFLUÊNCIA DA IDADE NA ORGANIZAÇÃO DA MATRIZ
EXTRACELULAR DURANTE O PROCESSO DE REGENERAÇÃO DO
TECIDO TENDÍNEO SOB ESTIMULAÇÃO LASER DE BAIXA
INTENSIDADE.**

Manuscrito 2:

**INFLUÊNCIA DA IDADE SOBRE A FOTOESTIMULAÇÃO LASER DE
BAIXA INTENSIDADE NA REGENERAÇÃO TENDÍNEA NA
CONCENTRAÇÃO DE IL-1 β , IL-10 E ÓXIDO NÍTRICO.**

6.1 INFLUÊNCIA DA IDADE NA ORGANIZAÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR DURANTE O PROCESSO DE REGENERAÇÃO DO TECIDO TENDÍNEO SOB ESTIMULAÇÃO LASER DE BAIXA INTENSIDADE.

Charles Taciro; Livia Ribeiro Assis, Davilene Gigo Benato, Thiago Luiz de Russo, Nivaldo Antonio Parizotto.

RESUMO:

O processo de maturação e senescência celular é um importante fator relacionado aos processos degenerativos e patológicos do tecido tendíneo. Diversas modalidades terapêuticas são utilizadas para promover a aceleração e melhora do reparo tendíneo, dentre elas a terapia laser de baixa intensidade (TLBI). Porém são pouco conhecidos os reais efeitos desta terapia quando se associa um fator potencialmente decisivo na resposta celular como o envelhecimento. Este estudo avaliou os efeitos da TLBI, aplicado na reparação tendínea do tendão calcâneo pós tenotomia radical transversal em ratos em duas idades distintas. Um grupo de ratos jovens (4 semanas de idade, n=40), subdivididos aleatoriamente em 4 subgrupos contendo cada um 14 animais: J3J (dose 3J/cm²), J10J (10J/cm²), placebo - JPL (dose 0J/cm²), controle - JCL (nenhum tratamento); e um grupo adulto (27 semanas de idade, n=40), subdivididos aleatoriamente em 4 subgrupos: A3J (dose 3J/cm²), A10J (dose 10J/cm²), placebo - APL (dose 0J/cm²), controle - ACL (sem tratamento). O laser utilizado (685 nm, 5.4W/cm²) foi aplicado em 12 sessões consecutivas, uma vez ao dia, em um único ponto sobre a região da lesão. No 14º dia pós-operatório os animais foram eutanasiados e seus tendões dissecados, processados e analisados quantitativamente através de microscopia de polarização para medida da birrefringência e investigação da atividade da metaloproteinases (MMPs) pela técnica de Zimografia. A análise dos dados mostra significativa resposta idade-dependente e dose-dependente ($P \leq 0.05$) do tecido à irradiação laser nas medidas de birrefringência, porém não foi verificada diferenças significantes em relação à atividade de MMP-2. Os dados sugerem atenção à determinação dos parâmetros de irradiação, havendo a possibilidade de efeito inibitório da TLBI sob determinadas condições.

Palavras-chave: Laserterapia, envelhecimento, tendão.

INTRODUÇÃO

O colágeno é uma molécula presente em grande quantidade nos seres vivos superiores e representa um componente fundamental nas propriedades físicas de determinadas estruturas do organismo humano. Os conjuntos de fibrilas de colágeno formam feixes que se agrupam em uma grande variedade de estruturas encontradas nos tecidos conectivos. Essas fibrilas são eventualmente estabilizadas por ligações intermoleculares covalentes, cujo papel é chave na maturação e determinante nas suas propriedades mecânicas (Kadler et al., 2008).

Os tendões são compostos principalmente de fibrilas de colágeno predominantemente do tipo I orientadas paralelamente às linhas de tensão, formando 2 cadeias α_1 e uma cadeia α_2 , cuja função principal no organismo se traduz em resistir e transmitir cargas de tensão mecânica no sentido axial do eixo maior do tendão. Além disso, são encontrados nos tendões elastina (2% do peso seco), colágeno tipo III (0-10%), IV (cerca de 2%), e pequenas porções de colágeno tipo V e VI (Kannus, 2000; Ottani et al., 2001).

Outro componente fundamental do tendão é a água (55 a 70%) em sua maioria associada à proteoglicanos da matriz extracelular.

Nesse sentido, a composição e a forma como se organizam os feixes de colágeno no processo de regeneração é muito importante, pois são elas as grandes responsáveis pelas propriedades mecânicas deste tecido e determinando o nível de resistência máxima, carga de ruptura do tendão, elasticidade do tecido e deformação (Ansorge et al., 2011).

Durante o envelhecimento ocorrem modificações estruturais e composicionais dos tecidos conjuntivos, os quais podem alterar sua capacidade de adaptação ao ambiente. Aumentos na rigidez e fragilidade das fibras de colágeno são relacionados à redução da

eficácia do sistema locomotor, elasticidade do sistema vascular e propriedades de infiltração de membranas basais (Ansorge et al., 2011; Bailey, 2001).

As taxas de metabolismo do colágeno e *turnover* também variam substancialmente com o desenvolvimento e senescência, influenciando diretamente as interações célula-matriz. A síntese de colágeno diminui constantemente durante o envelhecimento podendo cair em até 10 vezes na maioria dos tecidos, além disso, ocorre aceleração da degradação do colágeno durante a maturação (Mays et al., 1991; Couppé et al., 2009).

A habilidade do tecido tendíneo para sustentar a carga aplicada é determinada em sua maioria pela orientação e dimensões das fibras de colágeno, os quais podem variar conforme o tipo de estímulos. Quanto maior a proporção de fibras de grande diâmetro, maior a resistência à tração. Uma das formas para se quantificar a orientação e o estado agregacional das fibras de colágeno é a microscopia de polarização para medidas de birrefringência (Mello et al., 1979).

A birrefringência do tendão é resultado do dicroísmo linear, que representa a média de todas as transições eletrônicas nas moléculas que compõem a fibra de colágeno (que define a birrefringência intrínseca), outra análise possível é a birrefringência de forma, que se relaciona à geometria da molécula de colágeno e representa a contribuição de todos os volumes parciais das partículas e do meio homogêneo dispersante do tecido tendíneo. A curva de birrefringência é determinada pela plotagem dos valores de retardo óptico das fibras de colágeno em função do índice de refração do meio fluido em imersão. O aumento do valor da birrefringência é relacionado ao aumento do número de pontes cruzadas entre as fibrilas de colágeno, o que significa aumento da cristalinidade e agregação ordenada do colágeno tipo I, o que significa melhor qualidade do tendão (Mello et al., 1979).

Outro fator importante para definição das características físicas da matriz é a expressão de enzimas proteolíticas como as metaloproteases (MMPs), essenciais no processo de remodelação do tendão. Em condições normais, a quantidade de MMPs é baixa, porém situações de estresse tecidual como lesões e atividade física intensa (Kjaer, 2004), eletroestimulação (Russo et al., 2008), laserterapia (Gavish et al., 2006) levam à modulação da expressão destes elementos, porém pouco se sabe sobre a relação dessas intervenções associadas ao envelhecimento na remodelação do tendão.

Em geral, o conteúdo total e a densidade do colágeno aumentam com a idade, principalmente devido à diminuição do *turnover* do colágeno. Em tendões de animais adultos de velhos, quanto comparados aos fetais, observa-se maior compactação e orientação (Tohno et al., 2010).

A manutenção do equilíbrio entre a síntese e degradação é fundamental para a integridade de componentes da matriz extracelular que inclui colágeno, glicoproteínas, GAGs e proteoglicanos. A expressão de enzimas proteolíticas como as MMPs é essencial para a manutenção do remodelamento tecidual. Diversos autores relatam desequilíbrio entre esses elementos durante o processo de envelhecimento, o que pode ser relacionado aos elevados índices de lesão em ligamentos e tendões na fase adulta e avançada (Bailey, 2001).

Considerando os mecanismos envolvidos na lesão tendínea e propriedades físicas do colágeno, a modalidade terapêutica do laser de baixa intensidade tem sido empregada no tratamento de lesões do tendão (Fillipin et al., 2005), pois é citada como uma terapia modulatória de diversos mecanismos do processo de regeneração tecidual, como vias proliferativas e energéticas (Vladimirov et al., 2004), transdução de sinais elétricos, bioquímicos (Karu et al., 2005) e ação sobre o sistema imunológico (Tuby et al., 2006). Esses efeitos da radiação laser dependem de vários parâmetros, entre eles,

comprimento de onda eletromagnética, intensidade, dose, especificidade tecidual, tempo e tipo de lesão.

Pouco se sabe sobre os efeitos da idade na regeneração tendínea induzida pela TLBI, pois componentes das diversas vias da biomodulação se encontram modificados no processo de maturação celular e senescência, dessa forma torna-se importante conhecer como a variável idade pode influenciar na organização tecidual durante a regeneração permitindo a prática clínica mais eficiente, e conseqüentemente, o retorno mais rápido do indivíduo lesado às suas funções normais.

No presente estudo, o objetivo foi verificar se a idade pode influenciar alterações estruturais do tendão durante o processo de regeneração estimulada pela TLBI e também a possibilidade de alterações na atividade de MMPs do tendão calcâneo.

MATERIAL E MÉTODOS:

Delineamento experimental

Foram utilizados 112 ratos (*Rattus norvegicus albinus*), da raça Wistar, machos, com idade e peso corporal variando conforme a faixa etária de cada grupo. Estes receberam água e ração balanceada peletizada (*ad libitum*) e foram mantidos em ambiente higienizado, com iluminação em ciclo claro/ escuro de 12 horas.

Os animais foram aleatoriamente divididos em 2 grupos:

Grupo Jovem contendo 56 animais (idade de 4 semanas), subdivididos aleatoriamente em 4 subgrupos contendo cada 14 animais: J3J (energia de 8,5mJ/sessão, 5 segundos de exposição/sessão, dose 3J/cm²), J10J (energia 28,3m J/sessão, 15 segundos de exposição/sessão, dose 10J/cm²), placebo - JPL (dose 0J/cm²) e JCL (lesado sem tratamento).

Grupo Adulto contendo 56 animais (idade 27 semanas), subdivididos aleatoriamente em 4 subgrupos: A3J (energia de 8,5mJ/sessão, 5 segundos de exposição/sessão, dose 3J/cm²), A10J (energia 28,3mJ/sessão, 15 segundos de exposição/sessão, dose 10J/cm²), placebo - APL (dose 0J/cm²) e ACL (lesado sem tratamento).

Todos os animais sofreram o procedimento de tenotomia transversal através da secção total do tendão calcâneo direito. Os subgrupos placebo (JPL e APL) receberam tratamento com o equipamento desligado (simulação por 15 segundos) e enquanto os subgrupos lesados sem tratamento (ACL e ACL) permaneceram durante o período experimental em suas gaiolas no biotério.

Protocolo de Tratamento

O equipamento utilizado foi um laser (DMC[®] - São Carlos, Brasil), classe 3B, diodo As-Ga-Al, comprimento de onda 685 nm, potência de saída de 15 mW, área da fibra de 0.0028 cm², diâmetro do feixe de 0.6 mm, divergência de 1.5°, emissão contínua e densidade de potência de 5,4W/cm², em doses de 3J/cm² e 10J/cm², sendo os parâmetros de emissão conferidos ao final de cada sessão através de um medidor de potência (Lasercheck - Coherent[®]).

A terapia laser iniciou-se 24hs após a tenotomia e consistiu de 12 sessões consecutivas intervaladas por 24hs, realizadas num mesmo período circadiano, através de radiação transcutânea pela técnica de contato a um ângulo de 90° em relação à superfície da área lesada. No 14º dia após a tenotomia (24 horas pós a última sessão) os animais sofreram eutanásia e seus tendões direitos foram retirados para a preparação das lâminas histológicas.

Preparação das amostras e análise dos dados.

Para avaliação quantitativa do retardo ótico, os tendões foram dissecados, lavados e submetidos à fixação em solução de formalina 10% durante 24 horas e desidratados em banhos sucessivos de álcool (70, 90, 95 e 100%) e imersão de xilol por 1 hora, seguidos de 3 banhos de parafina líquida com duração de 1 hora banho para a inclusão em blocos de parafina, para o procedimento do corte das peças.

Os tendões, inclusos nos blocos de parafina, foram cortados no sentido longitudinal dos tendões à uma espessura padronizada de 5,0 μ m. Cada lâmina foi montada com uma série de 4 cortes consecutivos de cada tendão e cada grupo de animais, sendo captadas 40 medidas de Retardo Ótico (OR) de cada subgrupo, totalizando 160 medidas por grupo. Após serem montadas, todas as lâminas foram desparafinizadas. Estes cortes não receberam nenhum tipo de coloração e ficaram descobertas para reidratação no momento da análise.

Análise de birrefringência

A análise das fibras de colágeno foi realizada utilizando a birrefringência total, medida por meio da microscopia de polarização.

As lâminas de cada grupo foram imersas em água destilada (índice de refração = 1,333) por cerca de 30 minutos, para análise da birrefringência.

Após o período de imersão, as lâminas foram cobertas por lamínulas contendo água destilada nas interfaces. Foi utilizado um microscópio de luz polarizada (LEICA, objetiva pol.10x/0,22, condensador 0.9, compensador de Sénarmont $\lambda/4$, luz monocromática $\lambda= 546\text{nm}$, obtida por meio de um filtro de interferência).

As medidas de retardo ótico foram obtidas com o eixo do tendão a 45° de inclinação em relação eixo do polarizador e do analisador, permitindo o maior brilho de

birrefringência e, portanto, uma análise do arranjo das fibras colágenas ao longo do maior eixo do tendão.

Zimografia

Foi utilizada a metodologia de Marqueti et al. (2008). O tecido foi congelado e incubado com tampão de extração (10mM de ácido cacodílico, Ph5,0, 150mM de NaCl, 1µM de ZnCl₂; 20mM de CaCl₂; 1,5mM de NaN₃ e 0,01% de Triton X-100) à 4°C, com agitação contínua durante 24 horas. Após este tempo, o tampão de extração foi coletado por centrifugação (10min, 13.000 x g à 4°C). As amostras provenientes de 4 tendões por grupo foram concentradas de maneira que cada poço do gel de zimografia continha 20µg de proteína e 10µl de tampão, totalizando 30µl de solução por poço.

Os géis de zimografia consistiram de géis de poliacrilamida (10%) com gelatina (100mg/ml) na presença de SDS sob condições não reduzidas. A eletroforese (100V) foi realizada até o corante atingir a base do gel. Após a eletroforese, o gel foi lavado 2 vezes durante 30 minutos em solução 2,5% de Triton X-100 para remoção do SDS. Em seguida, o gel foi incubado em tampão de substrato (50mM de Tris-HCl, ph 8,0; 5mM de CaCl₂ e 0,02% NaN₃) à 37°C, durante 24 horas. Após este tempo, o gel foi corado com Coomassie Blue por 90 minutos e descorado com ácido acético: metanol: água (1:4:5) para visualização das bandas de atividade. As bandas de atividade foram visualizadas como bandas claras contra o fundo azul, indicando a proteólise do substrato. A massa molecular das bandas de atividade gelatinolítica foi determinada por comparação com marcador de massa molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas Life Sciences, Burlington, ON), seguindo descrição prévia de seus pesos moleculares; 72 kDa: pro-MMP-2; 66 kDa: intermediary-MMP-2; 64 kDa: active-

MMP-2; sendo empregada para a análise quantitativa da densidade das bandas de proteína na zimografia o programa GeneTools v3.06. (Syngene, Cambridge, UK).

Análise estatística

O pacote SPSS (Statistical Package for Social Sciences) versão 17.0 foi utilizado para as análises estatísticas pela aplicação do teste de análise de variância multivariada MANOVA para determinação das diferenças nas variáveis do presente trabalho. Para determinar as diferenças entre os grupos e os subgrupos foi aplicado o teste de Tuckey considerando um nível significância estatística de 5% ($P \leq 0.05$), intervalo de confiança de 95%.

RESULTADOS

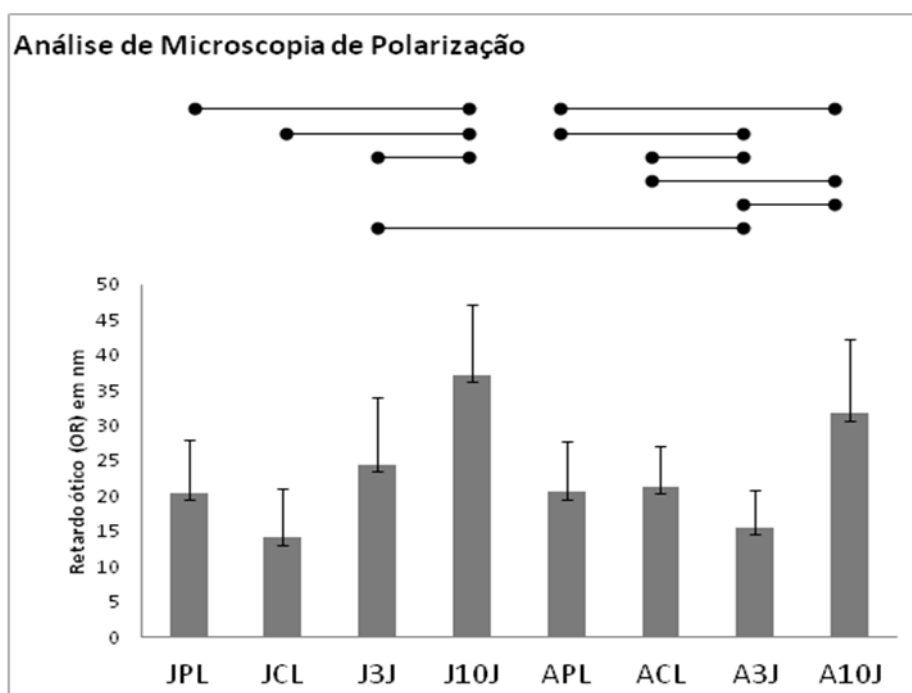


Figura 1: Distribuição das medidas de Retardo Óptico (nm) obtidas através da análise por microscopia de polarização subgrupos JCL (jovem controle lesado), JPL (jovem placebo), J3J (jovem 3J/cm²), J10J (jovem 10J/cm²), ACL (adulto controle lesado), APL (adulto placebo), A3J (adulto 3J/cm²) e A10J (adulto 10J/cm²). As barras horizontais na

porção superior do gráfico indicam as comparações entre os subgrupos que apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

Na comparação intergrupos, não foram verificadas diferenças significativas entre os pares jovem e adulto dos subgrupos placebo, controle lesado e 10 J/cm^2 , com exceção do subgrupo J3J que apresentou aumento significativo do OR em relação ao A3J.

A análise intragrupo, o grupo jovem apresentou diferenças estatisticamente significativas nas comparações do subgrupo J10J em relação aos JPL, JCL e J3J. As outras comparações não mostraram diferenças relevantes.

Na análise intragrupo dos animais adultos, o subgrupo A10J apresentou-se com índice de OR significativamente maior que o APL, ACL e A3J. Observamos que o subgrupo A3J se comportou de modo inverso ao J3J, apresentando índice de OR significativamente menor quando comparado aos outros animais do grupo adulto.

Um comportamento semelhante foi observado quando analisados o Grupo Adulto e Jovem separadamente, demonstrando que no caso da variável observada, há uma resposta similar, com exceção do J3J e A3J (figura 1).

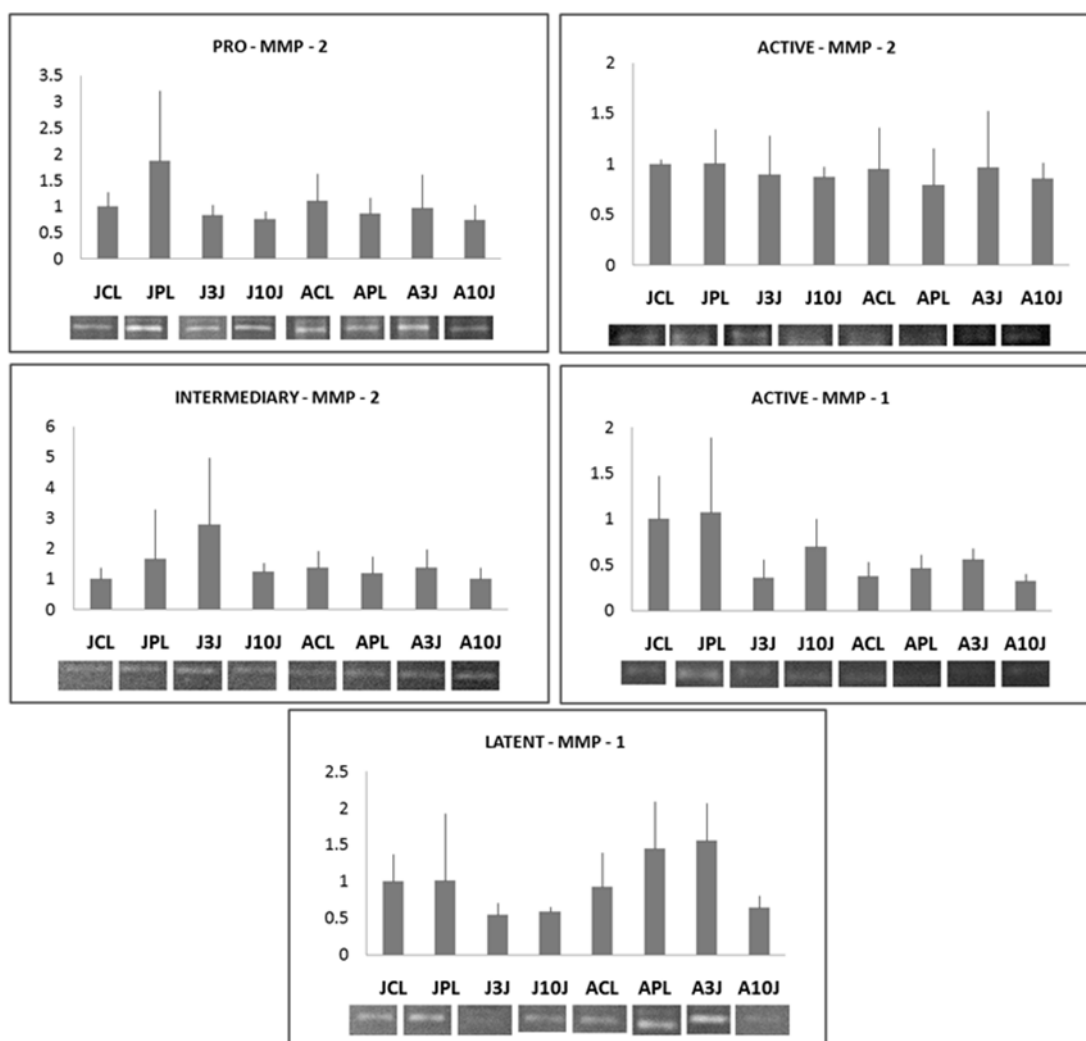


Figura 2: Distribuição dos valores da pro-MMP-2, intermediary-MMP-2, active-MMP-2, latent-MMP-1, active-MMP-1 observada nos diferentes grupos experimentais. Não foi verificada diferença estatisticamente significativa, considerando $P \leq 0.05$.

A análise de zimografia não mostrou diferenças estatisticamente significativas para os valores quantificados de MMPs tanto em relação à variação intergrupos como intragrupos .

DISCUSSÃO

Diversos estudos relatam como um dos principais efeitos da radiação laser a proliferação, quimiotaxia de fibroblastos, aumento da deposição de colágeno e estímulo

à sua organização no tendão, observados através do nível de organização do colágeno no eixo longitudinal do tendão (Gigo-Benato et al., 2010; Enwemeka et al., 2004; Carrinho et al., 2006).

Os dados do presente trabalho indicam aumento do retardo ótico nos animais tratados com 10 J/cm^2 tanto no grupo de ratos com 4 semanas de idade, bem como naqueles com 27 semanas. Estes resultados corroboram com outros achados da literatura (Enwemeka et al., 2004; Carrinho et al., 2006., Arruda et al., 2007), que encontraram resultados semelhantes na organização do tendão após a TLBI, porém, observamos que no subgrupo A3J, houve diminuição do OR quando comparado aos outros animais do grupo adulto e o subgrupo A3J apresentou comportamento inverso quando comparado ao J3J.

Enwemeka et al. (2004) utilizando laser He-Ne ($\lambda = 632.8 \text{ nm}$) encontraram aumento da produção de colágeno em ratos tenotomizados nas doses de 4.0 mJ/cm^2 e 5.0 mJ/cm^2 , enquanto que Gum et al. (1997) encontraram dose de 1.0 J/cm^2 sendo mais efetiva na reparação tendínea após período equivante de tratamento ao utilizado neste trabalho. Arruda et al. (2007) encontraram em ratos Wistar de 5 semanas de idade, através da avaliação por birrefringência aumento da organização tecidual nas doses de 3 J/cm^2 utilizando laser AsGa (904nm) associado ao AsGaInP (670nm) após 12 sessões de tratamento, resultados semelhantes foram encontrados por Carrinho et al.(2006), após 10 sessões tratamento no mesmo modelo de lesão, verificando aumento do valor de retardo ótico e melhor arranjo do colágeno nos ratos Wistar (12 semanas de idade) tratados com laser AsGaAl 685nm e 830nm nas doses de 3 J/cm^2 e 10 J/cm^2 , principalmente sob os parâmetros de 3 J/cm^2 e laser 685nm.

A diminuição no OR observado no grupo adulto tratado com dose de 3 J/cm^2 do presente estudo representa uma possibilidade janela inibitória da TLBI sobre o processo

de reparação tecidual dependente da idade. A diminuição do OR pode significar um tecido menos organizado e, conseqüentemente mais frágil, predispondo-o à rupturas ou formação de aderências (Ansorge et al., 2011).

Nossos estudos corroboram com a teoria que a TLBI pode estimular diversos processos celulares, mas somente sob uma combinação correta de seus parâmetros de exposição, como energia, potência, tempo de exposição período de lesão e tratamento, tipo de tecido afetado e a idade do animal (Pereira et al., 2002).

Uma das principais teorias da laserterapia relaciona o citocromo C oxidase como o principal fotoreceptor, estimulando a atividade eletroquímica mitocondrial, acelerando a transferência de elétrons na membrana mitocondrial, produzindo maiores quantidades de ATP (Karu et al., 2005), desencadeando cascata de sinalização celular, promoção de proliferação celular e produção e organização de colágeno (Wood et al., 2010).

Estudos relatam a queda expressiva da citocromo c oxidase com o avanço da idade (Silveira et al., 2007). Verificamos nos resultados deste estudo que somente na dose de $10\text{J}/\text{cm}^2$ houve melhora na orientação do colágeno do grupo de animais adultos. É possível que, devido à redução das concentrações de fotorreceptores, maiores doses sejam necessárias para produzir algum efeito significativo na orientação das fibras de colágeno.

Eventos bioquímicos e funções celulares envolvidos na fotobiomodulação laser podem estar modificados com o processo de maturação e senescência celular e tecidual (Oshima, 2006) conseqüentemente, modificando o modo como o tecido se comporta quando submetido à determinadas intervenções terapêuticas.

Na literatura há controvérsias sobre o efeito da TLBI sobre o metabolismo do colágeno, alguns estudos sugerem que o laser pode aumentar a síntese do colágeno (Almeira-Lopes et al., 2001; Reddy et al., 1998; Marques et al., 2004; Medrado., 2003)

por outro lado outros autores sugerem a diminuição da síntese associada à um aumento da proliferação celular (van Breugel e Bar, 1992). No presente estudo, a atividade de MMP-2 e MMP-1 não foi afetada pela ação da laserterapia e nem foram detectadas diferenças entre as idades.

Diversos estudos demonstram que o laser é capaz de modular a expressão e atividade da MMP-2 (Russo et al., 2008; Gavish et al., 2006; Gigo-Benato et al., 2010; Marques et al., 2004) e seus componentes da matriz extracelular, contudo, não foi verificado no presente estudo tais alterações da atividade da MMP-2 e MMP-1. É provável que este efeito seja observado nos primeiros dias subseqüentes à lesão, ou as doses foram insuficientes para produzir alguma alteração expressiva. O período relativamente extenso de tratamento pode ter comprometido a observação de alguma diferença significativa.

Por fim, considerando os resultados obtidos nesse estudo, concluímos que os efeitos biológicos laserterapia podem ser influenciados significativamente pela idade e também pela dose aplicada.

Devido às divergências encontradas na literatura e escassez de pesquisa, ainda há necessidade de estudos mais detalhados para elucidar os mecanismos de ação da TLBI relacionados não somente à padronização de parâmetros seguros para o seu uso em prática clínica, mas devem ser considerados os efeitos do desenvolvimento e envelhecimento.

REFERÊNCIAS

1. ALMEIDA-LOPES, L.; RIGAU, J.; ZÂNGARO, R.A.; GUIDUGLI-NETO, J.; JAEGER, M.M. Comparizon of the Low Level Laser Therapy Effects on Cultures

- Human Gingival Fibroblasts Proliferation Using Different Irradiance and Same Fluence. **Lasers in Surg and Med**, v29, p.179-184, 2001.
2. ANSORGE, H.L.; ADAMS, S.; BIRK D.E.; SOSLOWSKY, L.J. Mechanical, Compositional, and Structural Properties of the Post-natal Mouse Achilles Tendon. **Ann Biomed Eng**, v.39, p. 1904-1913, 2011.
 3. ARRUDA, E.R.B.; RODRIGUES, N.C.; TACIRO, C.; PARIZOTTO, N.A. Influence of different low-intensity laser therapy wavelengths for rat tendon regeneration following tenotomy. **Rev Bras Fisiot**, v.11, p.283-288, 2007.
 4. BAILEY, A.J. Molecular mechanisms of ageing in connective tissues. **Mech Ageing Dev**, v.122, p.734-755, 2001.
 5. CARRINHO, P.M.; RENNO, A.C.; KOEKE, P.; SALATE, A.C.; PARIZOTTO N.A.; VIDAL, B.C. Comparative study using 685-nm and 830-nm lasers in the tissue repair of tenotomized tendons in the mouse. **Photomed Laser Surg**, v.24, p.754-758, 2006.
 6. COUPPÉ, C.; HANSEN, P.; KONGSGAARD, M.; KOVANEN, V.; SUETTA, C.; AAGAARD, P.; KJAER, M.; MAGNUSSON, S.P. Mechanical properties and collagen cross-linking of the patellar tendon in old and young men. **J Appl Physiol**, v.107, p.880-886, 2009.
 7. ENWEMEKA, C.S.; PARKER, J.C.; DOWDY, D.S.; HARKNESS, E.E.; SANFORD, L.E.; WOODRUFF, L.D. The efficacy of low-power lasers in tissue repair and pain control: a meta-analysis study. **Photomed Laser Surg**, v.22, p.323-329, 2004.
 8. FILLIPIN, L.I.; MAURIZ, J.L.; VEDOVELLI, K.; MOREIRA, A.J.; ZETTLER, C.G.; LECH, O.; MARRONI, N.P.; GALEGO, J.G.; Low Level Laser Therapy

- (LLLT) Prevents Oxidative Stress and Reduces fibrosis in rat traumatizes achilles tendon. **Lasers in Surg Med**, v.37, p.293-300, 2005.
9. GAVISH, L.; PEREZ, L.; GERTZ, S.D. Low-level laser irradiation modulates matrix metalloproteinase activity and gene expression in porcine aortic smooth muscle cells. **Lasers Surg Med**, v.38, p.779-786, 2006.
 10. GIGO-BENATO, D.; RUSSO, T.L.; TANAKA, E.H.; ASSIS, L.; SALVINI, T.F.; PARIZOTTO, N.A. Effects of 660 and 780 nm low-level laser therapy on neuromuscular recovery after crush injury in rat sciatic nerve. **Lasers Surg Med**, v.42, p.673-82, 2010.
 11. GUM, S.L.; REDDY, G.K.; STEHNO-BITTEL, L.; ENWEMEKA, C.S. Combined ultrasound, electrical stimulation, and laser promote collagen synthesis with moderate changes in tendon biomechanics. **Am J Phys Med Rehabil**, v.76, p288-296, 1997.
 12. KADLER, K.E.; HILL, A; CANTY-LAIRD, E.G. Collagen fibrillogenesis: fibronectin, integrins, and minor collagens as organizers and nucleators. **Curr Opin Cell Biol**, v.20, p.495-501, 2008.
 13. KANNUS, P. Structure of the tendon connective tissue. **Scand J Med Sci Sports**, v.10, p. 312-320, 2000.
 14. KARU, T.I.; PYATIBRAT, L.V.; AFANASYEVA, N.I. Cellular effects of low power laser therapy can be mediated by nitric oxide. **Lasers Surg Med**, v.36, p.307–314, 2005.
 15. KJAER, M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. **Physiol Rev**, v.84, p.649-698, 2004.
 16. MARQUES, M.M.; PEREIRA, A.N.; FUJIHARA, N.A.; NOGUEIRA, F.N.; EDUARDO, C.P. Effect of Low-Power Laser Irradiation on Protein Synthesis and

- Ultrastructure of Human Gingival Fibroblast. **Lasers in Surg and Med**, v.34, p.260-265, 2004.
17. MARQUETI, R.C.; PRESTES, J.; PASCHOAL, M.; RAMOS, O.H.; PEREZ, S.E.; CARVALHO, H.F.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S. Matrix metalloproteinase 2 activity in tendon regions: effects of mechanical loading exercise associated to anabolic-androgenic steroids. **Eur J Appl Physiol**, v.104, p.1087-1093, 2008.
18. MAYS, P.K.; MCANULTY, R.J.; LAURENT, G.J. Age-related changes in rates of protein synthesis and degradation in rat tissues. **Mech Ageing Dev**, v. 59, p.229-241, 1991.
19. MEDRADO, A.R.A.P.; PUGLIESE, L.S.; REIS, S.R.A.; ANDRADE, Z.A. Influence of Low Level Laser Therapy on Wound Healing and Its Biological Action Upon Myofibroblasts. **Lasers in Surg and Med**, v.32, p.239-244, 2003.
20. MELLO, M.L.; VIDAL, B.C.; DE CARVALHO, A.C.; CASEIRO-FILHO A.C. Change with age of anisotropic properties of collagen bundles. **Gerontol**, v.25, p.2-8, 1979.
21. OSHIMA, S. Apoptosis and Necrosis in Senescent Human Fibroblasts. **Ann NY Acad Sci**, v.1067, p. 228–234, 2006.
22. OTTANI, V.; RASPANTI, M.; RUGGERI, A. Collagen structure and functional implications. **Micron**, v.32, p. 251-260, 2001.
23. PEREIRA, A.N.; EDUARDO, C.P.; MATSON, E.; MARQUES, M.M. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. **Lasers Surg Med**, v.31, p.263-267, 2002.
24. REDDY GK, STEHNO-BITTEL L, ENWEMEKA CS. Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit Achilles tendons. **Lasers Surg Med**, v.22, p.187–281, 1998.

25. RUSSO, T.L.; PEVIANI, S.M.; DURIGAN, J.L.; SALVINI, T.F. Electrical stimulation increases matrix metalloproteinase-2 gene expression but does not change its activity in denervated rat muscle. **Muscle Nerve**, v.37, p.593-600, 2008.
26. SILVEIRA, P.C.; STRECK, E.L.; PINHO, R.A. Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in wound healing by low-level laser therapy. **J Photochem Photobiol B**, v.86, p.279-282, 2007.
27. TOHNO, Y.; SUWANAHROY, P.; TOHNO, S.; SINTHUBUA, A.; AZUMA, C.; NISHIWAKI, F.; MORIWAKE, Y.; KUMAI, T.; MINAMI, T.; LAOWATTHANAPHONG, S.; MAHAKKANUKRAUH, P.; OISHI T.; HAYASHI, M. Age-related changes of elements in the tendons of the peroneus longus muscles in Thai, Japanese, and monkeys. **Biol Trace Elem Res**, v.133, p.291-303, 2010.
28. TUBY, H.; MALTZ, L.; ORON, U. Modulations of VEGF and iNOS in the rat heart by low level laser therapy are associated with cardioprotection and enhanced angiogenesis. **Lasers Surg Med**. v.38, p.682-688, 2006.
29. van BREUGEL, H.H.; BAR, P.R. Power density and exposure time of He-Ne laser irradiation are more important than total energy dose in photo-biomodulation of human fibroblasts in vitro. **Lasers Surg Med**, v.12, p.528-537, 1992.
30. VLADIMIROV, Y.A.; OSIPOV, A.N.; KLEBANOV, G.I. Photobiological Principles of Therapeutic Applications of Laser Radiation. **Bioch (Moscow)** v.69, p.81-90, 2004.
31. WOOD, V.T.; PINFILDI, C.E.; NEVES, M.A.; PARIZOTTO, N.A.; HOCHMAN, B.; FERREIRA, L.M. Collagen changes and realignment induced by low-level laser therapy and low-intensity ultrasound in the calcaneal tendon. **Lasers Surg Med**, v.42, p.559-565, 2010.

6.2 INFLUÊNCIA DA IDADE SOBRE A FOTOESTIMULAÇÃO LASER DE BAIXA INTENSIDADE NA REGENERAÇÃO TENDÍNEA NOS NÍVEIS DE IL-1 β , IL-10 E NITRITOS E NITRATOS.

Charles Taciro, Livia R de Assis, Vivian Cury, Thiago L. de Russo, Nivaldo A. Parizotto

RESUMO

O processo de maturação e senescência celular é um importante fator relacionado aos processos degenerativos e patológicos do tecido tendíneo. Diversas modalidades terapêuticas são utilizadas para promover a aceleração e melhora do reparo tendíneo, dentre elas a terapia laser de baixa intensidade (TLBI). Porém são pouco conhecidos os reais efeitos desta terapia quando se associa um fator potencialmente decisivo na resposta celular como o envelhecimento e regeneração. Este estudo avaliou os efeitos da TLBI, aplicado na reparação tendínea do tendão calcâneo pós tenotomia radical em ratos em duas idades distintas. Um grupo de ratos jovens (4 semanas de idade, n=16), subdivididos aleatoriamente em 4 subgrupos contendo cada um 4 animais: J3J (dose 3J/cm²), J10J (10J/cm²), placebo - JPL (dose 0J/cm²), controle - JCL (nenhum tratamento); e um grupo adulto (27 semanas de idade, n=16), subdivididos aleatoriamente em 4 subgrupos: A3J (dose 3J/cm²), A10J (dose 10J/cm²), placebo - APL (dose 0J/cm²), controle - ACL (sem tratamento). O laser utilizado (685 nm, 5.4W/cm²) aplicado em 12 sessões consecutivas, uma vez ao dia, em um único ponto sobre a região da lesão. No 14º dia pós-operatório os animais foram eutanasiados e amostras de tendão foram coletadas para análise de citocinas IL-1 β e IL-10 pelo método ELISA e quantificação de nitrato/nitrito (NO_x-) plasmático através de amostras no sangue pelo método Bradford. A análise dos dados mostra significativa resposta idade-dependente e dose-dependente ($P \leq 0.05$) do tendão à irradiação laser. O subgrupo A3J apresentou aumento significativo dos níveis de IL-1 β e IL-10. Também foi observada diminuição dos níveis de IL-10 nos outros grupos em comparação com o grupo controle de ambas as idades, porém não foram verificadas diferenças significantes na quantificação de NO na avaliação intragrupo, somente entre as idades. Os dados sugerem atenção à determinação dos parâmetros de irradiação, havendo a possibilidade de efeito diferencial da TLBI dependente da idade.

Palavras-chave: Laserterapia, envelhecimento, citocinas

INTRODUÇÃO:

O processo de reparação tecidual é multifatorial, dependente de diversos componentes como fatores de crescimento, proliferação de fibroblastos, ação angiogênica, aporte sanguíneo, estímulo mecânico, atividade da matriz extracelular e quimiotaxia. Esses componentes podem ser influenciados pelo processo de desenvolvimento e envelhecimento, portanto, é compreensível que o impacto da inflamação e a velocidade de regeneração tecidual sejam divergentes nas diferentes faixas etárias (Swift et al., 2001; Krabbe et al., 2004).

Alterações decorrentes do desenvolvimento e envelhecimento no metabolismo e atividade celular do tecido tendíneo e o nível de estresse mecânico são relacionados aos maiores índices de tendinopatias em adultos, nos quais são identificados como fatores causais a redução de densidade vascular e da expressão de fator de crescimento fibroblástico (FGFs), aumento da expressão do óxido nítrico sintase indutível (iNOS, responsável pela síntese de óxido nítrico) associado à redução da atividade da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (Cernadas et al., 1998), diminuição da resposta celular ao PDGFs (fator de crescimento derivado de plaquetas), declínio na produção de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e redução de densidade vascular (Feng et al., 2001).

Verifica-se no envelhecimento aumento da resposta à interleucinas pró-inflamatórias como a IL-1 β , IL-6 e TNF- α (Bruunsgaard et al., 2001), aumento dos níveis circulantes de fator de crescimento transformante-beta 1 e alfa (TGF- β 1), modulação da resposta imunológica (Mahbub et al., 2011), enzimática e componentes colagenosos e estruturais do tendão (Blain et al., 2004).

Durante o processo de reparo tendíneo, citocinas tais como IL-1 β , IL-6 e TNF- α , conhecidas como moléculas pró-inflamatórias, tem como uma de suas funções iniciar e

perpetuar a fase inflamatória da regeneração. Neste período ocorre um desequilíbrio redox devido ao aumento da geração de radicais livres de oxigênio e nitrogênio. Estes radicais atuam como mensageiros moleculares de sinalização celular, que dependendo da concentração no organismo podem ser benéficos ou não ao tecido lesado (Dinarello, 2011).

Foi evidenciado que a IL-1 β acelera a degradação da matriz extracelular através da indução de enzimas proteolíticas, interferindo na atividade de fatores de crescimento ou reduzindo a síntese de componentes fundamentais da matriz celular. Além disso, a IL-1 β pode aumentar a sedimentação de eritrócitos e outros marcadores da resposta inflamatória aguda (Schulze-Tanzil et al., 2011).

A Interleucina-10 (IL-10), considerada como uma citocina multifuncional exerce diversos efeitos na maioria das células hematopoiéticas, capaz de inibir a atividade e função das células T, monócitos e macrófagos. A principal função atribuída à IL-10 é encerrar a resposta inflamatória, além disso, regula o crescimento e/ou diferenciação de células B, NK, T, mastócitos, granulócitos, células dendríticas, queratinócitos e células endoteliais (Perenteau et al., 2008; Pestka et al., 2004).

O óxido nítrico é um dos mensageiros moleculares de vias celulares de receptores de citocinas da inflamação e contribui diretamente para a inibição de síntese de proteoglicanos, aumentando a produção de MMP ou aumentando a susceptibilidade ao estresse oxidativo (Dozin et al., 2002).

No processo de maturação e envelhecimento do tecido conjuntivo, variações na expressão e atividade de mediadores inflamatórios como a IL-1 β , IL-10 e NO podem definir a direção do processo regenerativo, sua resolução ou perpetuação (Moore et al., 2001). Classicamente é descrito na literatura, aumento na expressão da IL-1 β e redução na expressão de IL-10 (Hacham et al., 2004; Guzik et al., 2003).

Além disso, alterações decorrentes do desenvolvimento e envelhecimento afetam a expressão de outros elementos-chave do processo inflamatório e conseqüentemente da regeneração tecidual. São verificadas modificações no metabolismo e atividade celular do tecido tendíneo relacionados à densidade vascular, FGFs, iNOS, PDGFS, VEGF, TGF- β 1, capacidade imunológica (Swift et al., 2001; Krabbe et al., 2004; Feng et al., 2001), alteração enzimática e componentes estruturais do tecido (Couppé et al., 2009).

Autores (Peplow et al., 2011, Safavi et al., 2008; Gao e Xing, 2009; Gavish et al., 2008) sugerem que a TLBI pode atuar modificando os níveis de expressão diversos mediadores inflamatórios, porém ainda são desconhecidas as influências das alterações decorrentes do processo de desenvolvimento e maturação sobre a modulação laser, pois diversos elementos envolvidos na fotobiomodulação laser (como cromóforos e atividade mitocondrial) podem ser modificados com no processo envelhecimento, conseqüentemente, modificando o modo como o tecido se comporta quando submetido à determinadas intervenções terapêuticas.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da laserterapia sobre os níveis de IL-1 β , IL-10 e NO e verificar a existência de uma relação idade-dependente e dose-dependente da fototerapia.

MATERIAIS E MÉTODOS

Delineamento experimental

Foram utilizados 32 ratos (*Rattus norvegicus albinus*), da raça Wistar, machos, com idade e peso corporal variando conforme a faixa etária de cada grupo. Estes receberam água e ração balanceada peletizada (*ad libitum*) e foram mantidos em ambiente higienizado, com iluminação em ciclo claro/ escuro de 12 horas.

Os animais foram aleatoriamente divididos em 2 grupos:

Grupo Jovem contendo 16 animais (idade de 4 semanas), subdivididos aleatoriamente em 4 subgrupos contendo cada 4 animais: J3J (dose $3\text{J}/\text{cm}^2$, $8,5\text{mJ}/\text{ponto}$, $5,4\text{W}/\text{cm}^2$), J10J (dose $10\text{J}/\text{cm}^2$, $28,3\text{mJ}/\text{ponto}$, $5,4\text{W}/\text{cm}^2$), placebo - JPL (dose $0\text{J}/\text{cm}^2$), e JCL (lesado sem tratamento).

Grupo Adulto contendo 16 animais (idade 27 semanas), subdivididos aleatoriamente em 4 subgrupos: A3J (dose $3\text{J}/\text{cm}^2$, $8,5\text{mJ}/\text{ponto}$, $5,4\text{W}/\text{cm}^2$), A10J (dose $10\text{J}/\text{cm}^2$, $28,3\text{mJ}/\text{ponto}$, $5,4\text{W}/\text{cm}^2$), placebo - APL (dose $0\text{J}/\text{cm}^2$), ACL (lesado sem tratamento).

Procedimento cirúrgico: tenotomia

Todos os animais sofreram o procedimento de tenotomia, a pele sobre a região posterior da tíbia do membro posterior direito na região correspondente ao tendão calcâneo foi tricotomizada com um barbeador elétrico. Após assepsia local (com álcool iodado), foi realizada uma incisão longitudinal de aproximadamente $7,0\text{mm}$ de comprimento sobre a pele no local correspondente ao terço médio do tendão calcâneo, entre a inserção calcâneo e a junção miotendínea onde foi efetuada a tenotomia no sentido transversal do eixo do tendão sem posterior tenorrafia (figura 1).

Os subgrupos placebo (JPL e APL) receberam tratamento com o equipamento desligado e enquanto os subgrupos lesados sem tratamento (ACL e ACL) permaneceram durante o experimental em suas gaiolas no biotério.

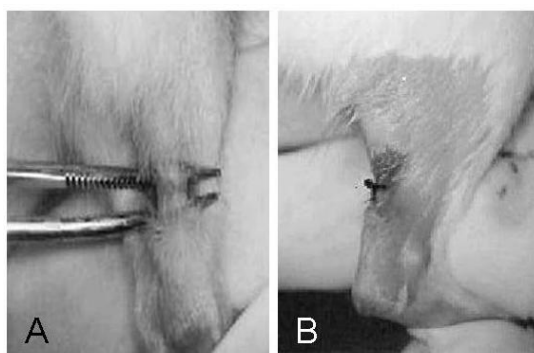


Figure 1. Procedimento cirúrgico - “A” Exposição do tendão antes do procedimento de tenotomia; “B” Sutura da pele após a cirurgia.

Protocolo de Tratamento:

O equipamento utilizado foi um laser (DMC[®] - São Carlos, Brasil), classe 3B, diodo As-Ga-Al, comprimento de onda 685nm, potência de saída de 15mW, área da fibra de 0.0028cm², diâmetro do feixe de 0.6mm, divergência de 1.5°, emissão contínua e densidade de potência de 5,4W/cm², em doses de 3J/cm² (8,5mJ por ponto) e 10J/cm² (28,3mJ por ponto), sendo os parâmetros de emissão conferidos ao final de cada sessão através de um medidor de potência (Lasercheck - Coherent[®])

A terapia laser iniciou-se 24hs após a tenotomia e comendo-se de 12 sessões consecutivas intervaladas por 24hs, realizadas num mesmo período circadiano, através de radiação transcutânea pela técnica de contato a um ângulo de 90° em relação à superfície da área lesada. No 14º dia após a tenotomia (24 horas pós a última sessão) os animais sofreram eutanásia e seus tendões esquerdos foram removidos.



Figura 2 – Procedimento de irradiação laser de baixa intensidade transcutânea sobre o local da tenotomia do calcâneo esquerdo

Preparação das amostras

As amostras foram coletadas no 14º dia após a lesão e em seguida, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -86° C para posterior análise. Os tendões foram utilizados para análise de citocinas (IL-1 β e IL-10) e quantificação de nitrato/nitrito (NO_x-).

Produtos de óxido nítrico

A quantificação dos níveis de Nitrito/Nitrato (NO_x-) foi utilizada para avaliar a produção de Óxido Nítrico. Amostras de tendão (50mg de tecido) foram processadas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em solução de RIPA (100mM de Tris-HCl pH 7.5, 1% de desoxicolato de sódio, 1% de NP40, 150mM de NaCl, 0.1% de SDS), acrescido de inibidores de proteases. As amostras foram centrifugadas a 1400 RPM por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e a concentração de proteínas quantificada pelo método de Bradford. O método de detecção foi baseado na reação do nitrito com reagente de Griess produzindo uma reação colorimétrica que foi detectada por absorvância com leitura em comprimento de onda de 595nm. O nitrato presente na amostra foi reduzido à nitrito utilizando-se as enzimas nitrato redutase e NADPH. A concentração de nitrito foi dividida pela quantidade de proteína presente nas amostras. Para a reação de nitrato, reagiu-se 50ml da amostra ou padrão (ou de diluente, para o branco), com 25ml da solução de nitrato redutase (10 unidades dissolvidas em 16,4 mL de Tris 40 mM , pH 7,4) e 25ml da solução de NADPH (6,7 mg em 50 mL de Tris). As amostras foram incubadas por 2h a temperatura ambiente. Para a reação de Griess adicionou-se 100 ml da solução de trabalho (solução A: 1% de sulfanilamida em ácido fosfórico a 5%; solução B: 0,1% de naftil-etilenodiamina em água destilada; misturadas em partes iguais das soluções A e B). Após a incubação de 10 minutos em temperatura

ambiente foi feita a leitura em comprimento de onda 595 nm em leitor de placa Genius (Salzburg, Áustria). O mesmo protocolo, sem adição de nitrato redutase, foi utilizado para a dosagem de nitrito, fazendo-se a leitura à 595 nm.

Quantificação de Citocinas - ELISA

As citocinas IL-1 β e IL-10 foram dosadas a partir do homogenato tecidual. Aproximadamente 50mg de tecido tendíneo foram pulverizados em nitrogênio líquido e homogeneizados em 1ml de solução de RIPA (100mM de Tris-HCl pH 7.5, 1% de desoxicolato de sódio, 1% de NP40, 150mM de NaCl, 0.1% de SDS). O material permaneceu em agitação, a 4° C por 1 hora. Em seguida, as amostras foram centrifugadas à 10000 RPM por 20 minutos a 4°C. As medidas foram normalizadas pela concentração de proteínas na solução (Método de Bradford–Biorad). As dosagens foram feitas por ELISA, com kit da R&D Systems (Minneapolis, MN, USA).

Placas de 96 poços foram adsorvidas com anticorpo de captura monoclonal anti-citocina de rato, diluído em PBS por 12 horas. Em seguida, as placas foram lavadas com solução de PBS contendo 0,05% de Tween 20.

Os sítios inespecíficos foram bloqueados com PBS contendo 1% de BSA (soro albumina bovina – Sigma) por 1 hora. A placa foi lavada para remoção da solução de bloqueio. Em seguida, as amostras e os padrões foram colocados nos respectivos poços e incubados por 2 horas. Ao final do período, as placas foram lavadas. O anticorpo de detecção foi adicionado, conjugado a peroxidase, e incubado por 2 horas. As placas foram lavadas novamente. Ao final das lavagens, foi adicionado o substrato da peroxidase, tetrametilbenzidina, deixando reagir por 15 a 20 minutos. Ao final da incubação, foi adicionada solução de parada (H₂SO₄ -2N). As citocinas foram quantificadas pela leitura da absorbância (450 nm) em leitor de placa Tecan Genius

(Salzburg, Áustria) e os resultados foram expressos em pico gramas de antígeno por miligrama de proteína.

Análise estatística

O pacote SPSS (Statistical Package for Social Sciences) versão 17.0 foi utilizado para as análises estatísticas pela aplicação do teste de análise de variância multivariada MANOVA para determinação das diferenças nas variáveis do presente trabalho. Para determinar as diferenças entre os grupos e os subgrupos do presente estudo foi utilizado o teste de Tuckey, com uma significância de 5% ($P \leq 0.05$), intervalo de confiança de 95%.

RESULTADOS

Tabela 1. Valores de Média \pm Desvio-Padrão da análise de IL-1 β e IL-10 (pg/ μ g $\times 10^{-3}$) e NO_x- (μ M/ μ g $\times 10^{-3}$)

Subgrupo	IL-1 β	IL-10	NO _x -
JPL	64,59 (12,6)	†15,48 (2,0)	*15,66 (2,0)
JCL	72,36 (8,2)	†30,11 (3,8)	*12,34 (1,5)
J3J	†*88,02 (10,5)	†*19,79 (4,6)	*13,85 (4,6)
J10J	†62,49 (14,0)	†19,91 (2,9)	*14,20 (3,4)
APL	†63,30 (9,8)	†19,60 (5,0)	*39,32 (8,9)
ACL	†74,43 (10,5)	†29,87 (3,9)	*37,63 (5,4)
A3J	†*116,72 (15,0)	†*38,43 (3,9)	*39,78 (6,5)
A10J	†55,95 (7,2)	†20,78 (1,99)	*38,89 (7,3)

*Diferença estatisticamente significativa intergrupo ($P \leq 0.05$), †Diferença estatisticamente significativa intragrupo ($P \leq 0.05$)

Quantificação de Interleucina-1Beta (IL-1 β)

Os resultados da quantificação de IL-1 β mostraram aumento significativo na concentração, de forma idade-dependente e dose-dependente.

Na dose de 3J/cm² aplicado nos animais adultos a concentração de IL-1 β foi significativamente maior ($p < 0.05$) quando comparado aos outros subgrupos adulto e jovem. Os animais jovens tratados com a dose de 3J/cm² também apresentaram aumento, porém somente significativo em relação aos animais do subgrupo J10J, os quais apresentaram uma leve redução não significativa nos níveis desta interleucina, quando comparado ao grupo controle e placebo jovem. Claramente se observa um comportamento dose-dependente como observado na figura 3.

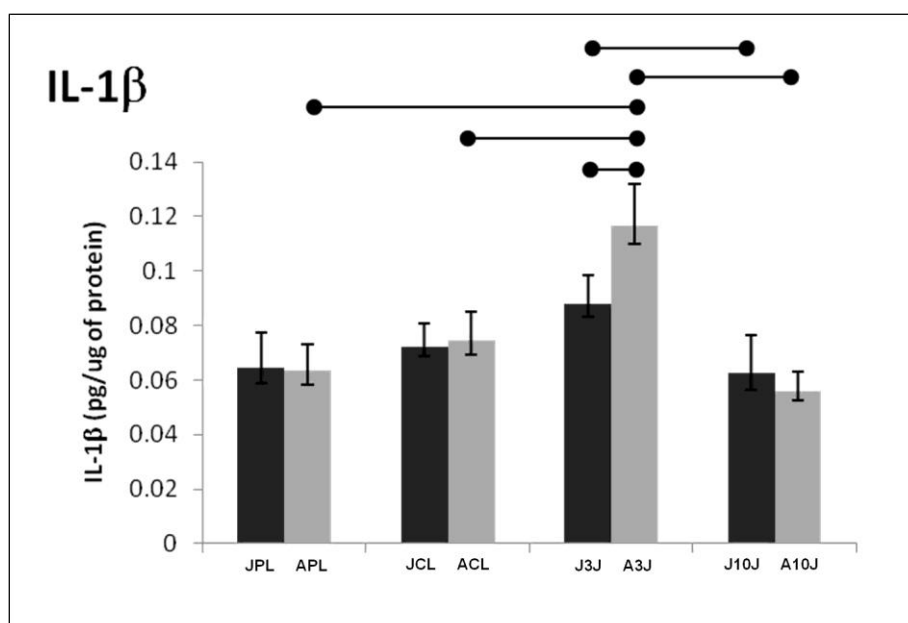


Figura 3 – Efeito da TLBI 685nm sobre os níveis de IL-1 β na lesão tendínea em ratos jovens (4 semanas de idade) e ratos adultos (27 semanas). CL (controle lesado), PL (placebo), 3J (3J/cm², 5,4W/cm², 8,5mJ/sessão), 10J (10 J/cm², 5,4W/cm², 28,3mJ/sessão), CL (controle lesado). As barras horizontais na porção superior do gráfico indicam as comparações entre os subgrupos que apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

Quantificação de Interleucina-10 (IL-10)

Observa-se que houve redução significativa da IL-10 em todos os grupos que sofreram intervenção terapêutica em relação ao respectivo controle lesado, exceto o subgrupo A3J que apresentou significativo aumento da concentração de IL-10 em comparação à todos os outros subgrupos com exceção do ACL ($P=0.057$).

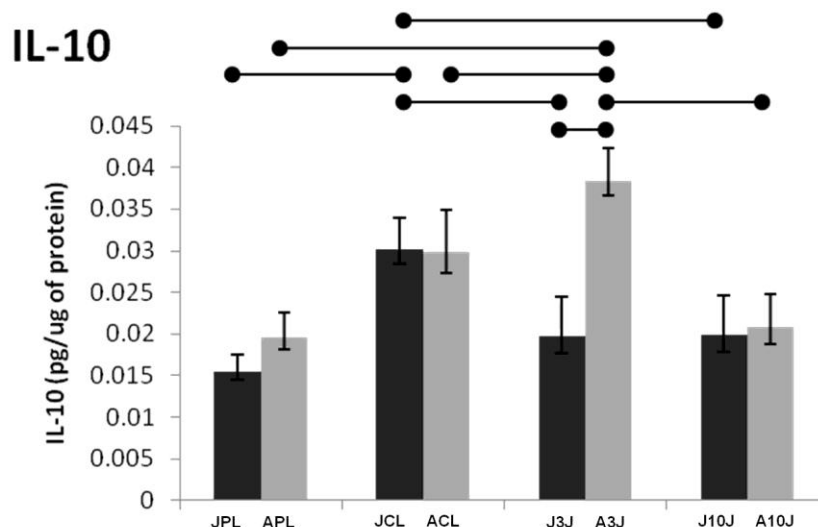


Figura 4 – Efeito da TLBI 685nm sobre tenotomia calcanear radical nos níveis de IL-10 em ratos jovens (4 semanas de idade) e ratos adultos (27 semanas). CL (controle lesado), PL (placebo), 3J ($3\text{J}/\text{cm}^2$, $5,4\text{W}/\text{cm}^2$, $8,5\text{mJ}/\text{sessão}$), 10J ($10\text{J}/\text{cm}^2$, $5,4\text{W}/\text{cm}^2$, $28,3\text{mJ}/\text{sessão}$), CL (controle lesado). As barras horizontais na porção superior do gráfico indicam as comparações entre os subgrupos que apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($P<0,05$).

Produção de Óxido Nítrico

Observou-se maiores níveis plasmáticos de NO em todos os animais do grupo adulto quando comparados aos animais jovens ($p<0,05$), porém a TLBI não alterou os níveis plasmáticos de NO em nenhum dos grupos avaliados.

NOx-

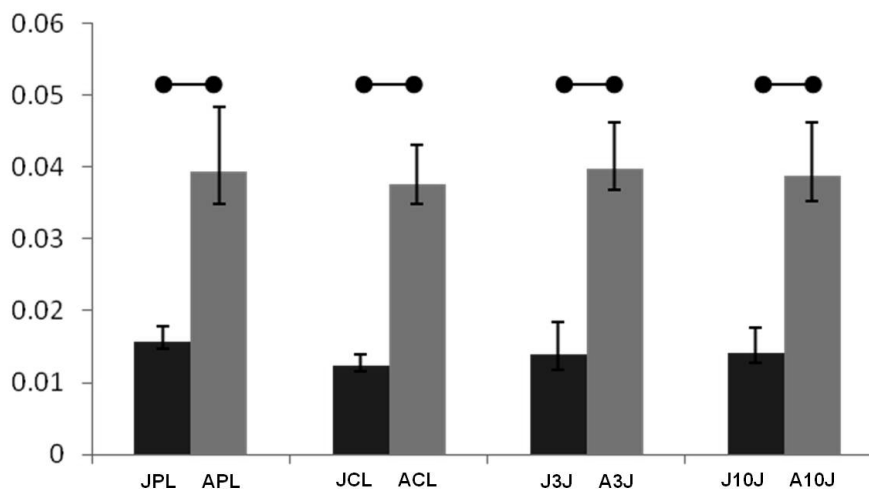


Figura 5 – Influência da TLBI 685nm sobre tenotomia calcanear radical sobre os níveis NO em ratos jovens (4 semanas de idade) e ratos adultos (27 semanas). CL (controle lesado), PL (placebo), 3J (3J/cm², 5,4W/cm², 8,5mJ/sessão), 10J (10J/cm², 5,4W/cm², 28,3mJ/sessão), CL (controle lesado). As barras horizontais na porção superior do gráfico indicam as comparações entre os subgrupos que apresentaram diferenças estatisticamente significativas (P<0,05).

DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou a influência da LTBI nos níveis de IL-1 β , IL-10 e produção de NO em ratos jovens (4 semanas de idade) e ratos adultos (27 semanas de idade) após tenotomia radical no calcâneo.

Os nossos resultados mostram que a terapia laser aumentou significativamente a expressão de IL-1 β na dose de 3J/cm² no grupo de animais adultos. A IL-1 β é uma citocina que dispara e perpetua a reação da cascata da reação inflamatória (Schulze-Tanzil et al., 2011), sugerindo que sob determinadas condições, o laser pode aumentar a resposta inflamatória. Esse resultado é contraditório à outros estudos, que observaram

diminuição da expressão de RNAm para diversas citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β , TNF- α , IL-6 no tratamento da inflamação com TLBI (Peplow et al., 2011, Safavi et al., 2008; Gao e Xing, 2009; Gavish et al., 2008).

Há possibilidade de outros elementos pró-inflamatórios não avaliados no presente estudo tenham seus níveis alterados, como verificado por Pires et al.²⁶, que utilizando laser 780nm, 22mW, 7,7J/cm², encontrou modulação diferenciada de mediadores pró- e antiinflamatórios após indução de tendinite calcâneo por injeção de colagenase, encontrou diminuição da expressão do TNF- α , IL-6, TGF- β e COX-2, porém sem diferenças significativas na expressão da IL-1 β .

Observamos que no subgrupo A3J houve aumento da expressão da IL-1 β concomitante ao aumento da IL-10, cujo efeito é inibitório para a produção de IL-1 β e outros fatores pró-inflamatórios (Peranteau et al., 2008; Pestka et al., 2004).

Normalmente o aumento da produção de IL-10 é relativamente tardio, quando comparado à outras citocinas inflamatórias, que podem ser um importante aspecto da habilidade da IL-10 para inibir a ativação de células T e macrófagos, controlando a inflamação.

Segundo Foey et al.(1998), há a possibilidade de regulação da síntese de IL-10 através de IL-1 e TNF- α , ou seja, esses três elementos formam um ciclo de *feedback* auto-regulador, sugerindo que a produção de citocinas por monócitos seja regulada por uma rede autócrina/ parácrina de citocinas pró- e antiinflamatórias como IL-1, IL-10, TNF- α , o que implica na presença de ambos no início e no final de eventos de transdução de um sinal específico. Então o aumento dos níveis de IL-10 observado no grupo de animais adultos tratados com 3J/cm² pode ser resultado do aumento dos níveis de IL-1 β observado no presente estudo.

Outra possibilidade pode estar relacionada a IGF-1, segundo Kooijman e Coopens (2004), este fator de crescimento sob determinadas condições estimula atividade de células T aumentando a secreção de IL-10. Por sua vez, Hakki e Bozkurt (2011) relatam o aumento dos níveis de IGF-1 através da LTBI, o que pode, no presente estudo, ter elevado os níveis de IL-10 de maneira dose-dependente e idade-dependente.

Citocinas pró-inflamatórias como a IL-6, TNF- α e IL-1 β são descritas na literatura como relacionadas à tendinopatias crônicas e lesões em diversos tecidos caracterizadas pela difícil resolução (Fredberg e Stengaard-Pedersen, 2008). Elevados níveis destas citocinas contribuem para um meio catabólico, que, ao longo do tempo, pode reduzir gradualmente as funções do tecido tendíneo, além disso, níveis de expressão da IL-1 β , IL-6 e TNF- α são aumentados durante o envelhecimento, tornando a resposta inflamatória maior e mais prolongada nestas populações (Meador et al., 2008).

Em relação à IL-1 β a literatura cita a capacidade de induzir o aumento da expressão de outras citocinas como a IL-2 e IL-6, aumentar a apoptose induzida por TNF- α , por ativação da cascata de caspases, além de aumentar a expressão de óxido nítrico sintetase indutível (iNOS) modulando a produção de NO (Meador., 2008).

Uma das hipóteses relacionadas a este aumento nos níveis das citocinas pró-inflamatórias no envelhecimento são os níveis reduzidos de IL-10, citocina pleiotrópica considerada como supressora da síntese de citocinas pró-inflamatórias por células do sistema imune (Moore et al., 2001). Os níveis de base de expressão de IL-10 são reduzidos em ratos velhos (Hacham et al., 2001). Zhong et al (2006) encontraram a expressão de TNF- α e IL-1 β por inflamação induzida pela LPS significativamente maior no plasma de animais *knockout* para IL-10, sugerindo o conceito que a IL-10 seja um importante regulador da resposta inflamatória e que reduzidos níveis de expressão

desta interleucina podem contribuir para aumentar a resposta da inflamação no envelhecimento.

O uso terapêutico da TLBI no tratamento para inflamação aguda com o objetivo antiinflamatório pode ser relacionado à redução dos níveis de PGE-2, inibição da ciclooxigenase-2 (COX-2), modulação do metabolismo de fibroblastos, deposição do colágeno e redução da atividade de migração de células inflamatórias (Lopes-Martins et al., 2005). Aimbire et al. (2006) demonstram efeito sobre a expressão gênica de IL-1 β , dependendo dos parâmetros de onda, tempo, dose e energia total selecionados.

A mensuração da produção do NO tecidual neste estudo foi realizada por meio da determinação da concentração de seus derivados, ou seja, nitrito e nitrato (NO_x), pois a demonstração da produção de NO é ainda difícil devido sua evanescência, sendo feita na maioria das vezes de maneira indireta. Diversos estudos envolvendo regeneração tendínea estimulada por TLBI citam modulação dos níveis de óxido nítrico após a irradiação laser de baixa intensidade (Vladimirov et al., 2004; Tuby et al., 2006; Fujimaki et al., 2003), porém no nosso estudo não foi encontrada diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos.

Na fase inflamatória o óxido nítrico é sintetizada a partir da L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), descrito como um possível modulador. Atualmente são conhecidas pelo menos três isoformas principais da NOS, codificadas por genes diferentes, a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e a indutiva (iNOS). Na lesão do tendão calcâneo, o nível plasmático de iNOS tem seu pico por volta do 7 dia pós operatório e retorna aos níveis de normalidade no 14º dia pós operatório (Lin et al., 2001), no presente estudo não observamos diferenças significativas para a avaliação intragrupo dos animais jovens e adultos nos níveis

plasmáticos de nitrito e nitrato, avaliados no 14^oP.O, o que pode ter uma relação temporal com a expressão das isoformas da oxido nítrico sintase.

Observou-se no presente estudo que os animais adultos tem maior capacidade de produção deste radical livre, corroborando outros resultados da literatura (Lin et al., 2001; Chorinchath et al., 1996) que encontraram maiores níveis de iNOs e IL-1 β em ratos senescentes quando comparados aos animais mais novos, os quais podem ser relacionados às maiores conseqüências de processos inflamatórios observados nos envelhecimento.

Concluimos que é fundamental considerar o processo de envelhecimento como uma variável determinante para a resposta à TLBI em relação aos níveis de IL-1 β , IL-10 e Oxido Nítrico.

Sugerimos que novas pesquisas devam ser realizadas analisando em períodos distintos de lesão os níveis das citocinas avaliadas neste estudo, determinado curvas-resposta temporal e dosimétrica à TLBI.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AIMBIRE, F.; ALBERTINI, R.; PACHECO, M.T.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C.; LEONARDO, P.S.; IVERSEN, V.V.; LOPES-MARTINS, R.A.B.; BJORDAL, J.M. Low-level laser therapy induces dose-dependent reduction of TNFalpha levels in acute inflammation. **Photomed Laser Surg**, v24, p.33-37, 2006.
2. BLAIN, E.; ZHANG, Y.; AESCHLIMANN, D.; CATERSON, B.; DUANCE, V.; Changes in tendon extracellular matrix composition with age. **Int Journ Exp Pathol**, v.85, p.33-34, 2004.

3. BRUUNSGAARD, H.; PEDERSEN, M.; PEDERSEN, B.K. Aging and proinflammatory cytokines. **Current Opinion in Hematology**, v.8, p.131-136, 2001
4. CERNADAS, M.R.; MIGUEL, L.S.; GARCIA-DURAN, M.; FERNANDEZ, F.G.; MILLÁS, I.; MONTÓN, M.; RODRIGO, J; RICO, L.; FERNÁNDEZ, P.; FRUTOS, T.; RODRÍGUEZ-FEO J.A.; GUERRA, J.; CARAMELO, C.; CASADO, S.; LOPEZ-FARRÉ, A. Expression of Constitutive and Inducible Nitric Oxide Synthases in the Vascular Wall of Young and Aging Rats. **Circulation Research**, v.83, p.279-286, 1998.
5. CHANG, C.K.; LoCICERO, J. Overexpressed nuclear factor kappaB correlates with enhanced expression of interleukin-1beta and inducible nitric oxide synthase in aged murine lungs to endotoxic stress. **Ann Thorac Surg**, v.77, p.1222-1227, 2004.
6. CHORINCHATH, B.B.; KONG, L.Y.; MAO, L.; MCCALLUM, R.E. Age-associated differences in TNF-alpha and nitric oxide production in endotoxic mice. **J Immunol**, v.156, p.1525-1530, 1996.
7. COUPPÉ, C.; HANSEN, P.; KONGSGAARD, M.; KOVANEN, V.; SUETTA, C.; AAGAARD, P.; KJAER, M.; MAGNUSSON, S.P. Mechanical properties and collagen cross-linking of the patellar tendon in old and young men. **J Appl Physiol**, v.107, p.880-886, 2009.
8. DINARELLO, C.A. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. **Blood**, v.117, p.3720-3732, 2011.
9. DOZIN, B.; MALPELI, M.; CAMARDELLA, L.; CANCEDDA, R.; PIETRANGELO, A. Response of young, aged and osteoarthritic human articular

- chondrocytes to inflammatory cytokines: molecular and cellular aspects. **Matrix Biol**, v.21, p.449-459, 2002.
10. FENG, Y.; VISOVATTI, S.; JOHNSON, C.S.; CHEN, M.; SLAMA, J.; WENGER, A.; ERIKSSON, E. Age and Growth factors in porcine full thickness wound healing. **Wound Rep Reg**, v.9, p.371-77, 2001.
 11. FOEY, A.D.; PARRY, S.L.; WILLIAMS, L.M.; FELDMANN, M.; FOXWELL, B.M.J.; BRENNAN, F.M. Regulation of Monocyte IL-10 Synthesis by Endogenous IL-1 and TNF- α : Role of the p38 and p42/44 Mitogen-Activated Protein Kinases1. **J Immunol**, v.160, p.920-928, 1998.
 12. 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, p.3-15, 2008.
 13. FUJIMAKI, Y.; SHIMOYAMA, T.; LIU, Q.; UMEDA, T.; NAKAJI, S.; SUGAWARA, K. Low-level laser irradiation attenuates production of reactive oxygen species by human neutrophils. **J Clin Laser Med Surg**, v.21, p.165-170, 2003.
 14. GAO, X.; XING, D. Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. **J Biomed Sci**, v.16, p.4, 2009.
 15. GAVISH, L.; PEREZ, L.S.; REISSMAN, P.; GERTZ, S.D. Irradiation with 780 nm diode laser attenuates inflammatory cytokines but upregulates nitric oxide in lipopolysaccharide-stimulated macrophages: implications for the prevention of aneurysm progression. **Lasers Surg Med**, v.40, p.371-378, 2008.
 16. GUZIK, T.J.; KORBUT, R.; ADAMEK-GUZIK, T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. **J Physiol Pharmacol**, v.54, p.469-487, 2003.

17. HACHAM, M.; WHITE, R.M.; ARGOV, S.; SEGAL, S.; APTE, R.N. Interleukin-6 and interleukin-p10 are expressed in organs of normal young and old mice. **Eur Cytokine Netw**, v.15, p.37-46, 2004.
18. HAKKI, S.S.; BOZKURT, S.B. Effects of different setting of diode laser on the mRNA expression of growth factors and type I collagen of human gingival fibroblasts. **Lasers Med Sci**, *article in press*, 2011.
19. KOOIJMAN, R.; COPPENS, A. Insulin-like growth factor-I stimulates IL-10 production in human T cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v.76, p.862-867, 2004.
20. KRABBE, K.S.; PEDERSEN, M. BRUNNSGAARD, H. Inflammatory mediators in the elderly. **Experimental Gerontology**, v.39, p.687-699, 2004.
21. LIN, J.H.; WANG, M.X.; WEI, A.; ZHU, W.; DIWAN, A.D.; MURRELL, G.A.C. Temporal expression of nitric oxide synthase isoforms in healing Achilles tendon. **Journal of Orthopaedic Research**, v.19, p.136-142, 2001.
22. LOPES-MARTINS, R.A.B; 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, p.377-381, 2005.
23. MAHBUB, S.; BRUBAKER, A.L.; KOVACS, E.J. Aging of the Innate Immune System: An Update. **Curr Immunol Rev**, v.7, p.104-115, 2011.
24. MEADOR, B.M.; KRZYSZTON, C.P.; JOHNSON, R.W.; HUEY, K.A. Effects of IL-10 and age on IL-6, IL-1beta, and TNF-alpha responses in mouse skeletal and cardiac muscle to an acute inflammatory insult. **J Appl Physiol**, v.104, p.991-997, 2008.

25. MOORE, K.W.; de WAAL-MALEFYT, R.; COFFMAN, R.L.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu Rev Immunol**, v.19, p.683–765, 2001
26. PELOW, P.V.; CHUNG, T.Y.; RYAN, B.; BAXTER, G.D. Laser photobiomodulation of gene expression and release of growth factors and cytokines from cells in culture: a review of human and animal studies. **Photomed Laser Surg**, v.29, p.285-304, 2011.
27. PERANTEAU, W.H.; ZHANG, L.; MUVARAK, N.; BADILLO, A.T.; RADU, A.; ZOLTICK, P.W.; LIECHTY, K.W. IL-10 overexpression decreases inflammatory mediators and promotes regenerative healing in an adult model of scar formation. **J Invest Dermatol**, v.128, p.1852-1860, 2008.
28. PESTKA, S.; KRAUSE, C.D.; SARKAR, D.; WALTER, M.R.; SHI, Y.; FISHER, P.B. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. **Annu Rev Immunol**, v.22, p.929–979, 2004.
29. PIRES, D.; XAVIER, M.; ARAÚJO, T.; JUNIOR, J.A.S.; AIMBIRE, F.; ALBERTINI, R. Low-level laser therapy (LLLT; 780 nm) acts differently on mRNA expression of anti- and pro-inflammatory mediators in an experimental model of collagenase-induced tendinitis in rat. **Lasers Med Sci**, v.26, p.85-94, 2011.
30. SAFAVI, S.M.; KAZEMI, B.; ESMAEILI, M.; FALLAH, A.; MODARRESI, A.; MIR, M. Effects of low-level He-Ne laser irradiation on the gene expression of IL-1beta, TNF-alpha, IFN-gamma, TGF-beta, bFGF, and PDGF in rat's gingiva. **Lasers Med Sci**, v.23, p.331-335, 2008.
31. SCHULZE-TANZIL, G.; AL-SADI, O.; WIEGAND, E.; ERTEL, W.; BUSCH, C.; KOHL, B.; PUFER, T. The role of pro-inflammatory and immunoregulatory

- cytokines in tendon healing and rupture: new insights. **Scand J Med Sci Sports**, v.21, p.337-351, 2011.
32. SWIFT, M.E.; BURNS, A.L.; GRAY, K.L.; DIPIETRO, L.A. Age-related alterations in the inflammatory response to dermal injury. **J Invest Dermatol**, v.117, p.1027-1035, 2001.
33. TUBY, H.; MALTZ, L.; ORON, U. Modulations of VEGF and iNOS in the rat heart by low level laser therapy are associated with cardioprotection and enhanced angiogenesis. **Lasers Surg Med**, v.38, p.682-688, 2006.
34. VLADIMIROV, Y.A.; OSIPOV, A.N.; KLEBANOV, G.I. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. **Biochemistry (Mosc)**, v.69, p.81-90, 2004.
35. ZHONG, J.; DEACIUC, I.V.; BURIKHANOV, R.; de VILLIERS, W.J. Lipopolysaccharide-induced liver apoptosis is increased in interleukin-10 knockout mice. **Biochim Biophys Acta**, v.1762, p.468-77, 2006.

PARTE III

Conclusões gerais
Considerações finais
Referências Bibliográficas

7. CONCLUSÕES GERAIS

Este estudo verificou a relevância na hipótese da relação idade-dependente da fotobioestimulação laser, o qual justificaria mais investigações considerando a idade como uma variável clínica para a parametrização da laserterapia.

Pontualmente, concluímos a partir dos nossos resultados:

1. Existe uma resposta dose-dependente e idade-dependente no modelo experimental adotado, o qual se pôde observar uma janela inibitória e uma janela estimulatória;
2. Para uma mesma dose, os níveis de IL-10, IL-1 β e o Retardo ótico, foram diferentes entre a idade de 4 semanas e a idade de 27 semanas;
3. Provavelmente o período de análise para óxido nítrico não foi adequado para detectar variação nos níveis presentes no plasma;
4. As alterações observadas podem ter uma importante relação com a função tecidual, pois representam modificações estruturais e celulares que definem algumas propriedades mecânicas do tendão.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar dos resultados obtidos neste estudo, podemos apresentar algumas limitações em decorrência do modelo adotado. Talvez o uso de animais com idade mais avançada (1 a 2 anos) poderia trazer dados mais significativos para relacionarmos ao envelhecimento. Aumentar o número de amostras nas avaliações de IL- β , IL-10 e NO poderiam trazer resultados mais conclusivos. Enfatizamos que existem outros

mediadores da inflamação de interesse como a IL-6, TNF- α , que poderiam ser avaliados no futuro.

Neste estudo, verificamos que há a influência da idade sobre a resposta da laserterapia no reparo tendíneo, porém parâmetros precisos de radiação devem ser pesquisados visando melhores resultados na regeneração.

Assim como verificado neste estudo, é possível que outras modalidades terapêuticas como a termoterapia, eletroestimulação, técnicas manuais de mobilização e manipulação, treinamento para fortalecimento muscular e propriocepção possam também sofrer influência da idade. Sendo assim, sugerimos que investigações a respeito devam ser realizadas com o objetivo de buscar mais respostas para essa questão.