

FLÁVIA DA RÉ GUERRA

"EFEITO DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE LASER DE BAIXA POTÊNCIA SOBRE A CICATRIZAÇÃO DO TENDÃO CALCANEAR DE RATOS APÓS TRANSECÇÃO PARCIAL"

"EFFECT OF DIFFERENT PROTOCOLS OF OW-POWER LASER ON THE HEALING OF RATS ACHILLES TENDON AFTER PARTIAL TRANSECTION"

.



iii



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS INSTITUTO DE BIOLOGIA

FLÁVIA DA RÉ GUERRA

"EFEITO DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE LASER DE BAIXA POTÊNCIA SOBRE A CICATRIZAÇÃO DO TENDÃO CALCANEAR DE RATOS APÓS TRANSECÇÃO PARCIAL"

Orientador: Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel

"EFFECT OF DIFFERENT PROTOCOLS OF OW-POWER LASER ON THE HEALING OF RATS ACHILLES TENDON AFTER PARTIAL TRANSECTION"

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutora em Biologia Celular e Estrutural, na área de Anatomia.

Doctorate thesis presented to the Cellular and Structural Biology Postgraduation Programme of the Institute of Biology of the University of Campinas to obtain the Ph.D. grade in Anatomy.

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida pela aluna *Flávia Da Sé Guerra* e orientada pelo Prof. Dr. Edson Rosa Pimerrez.

Assinatura do Orientador

Campinas, 2013

Ficha catalográfica Universidade Estadual de Campinas Biblioteca do Instituto de Biologia Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

Guerra, Flávia Da Ré, 1984-Efeito de diferentes protocolos de laser de baixa potência sobre a cicatrização do tendão calcanear de ratos após transecção parcial / Flávia Da Ré Guerra. – Campinas, SP : [s.n.], 2013. Orientador: Edson Rosa Pimentel. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Tendão de Aquiles - Ruptura. 2. Terapia a laser de baixa intensidade. 3. Colágeno. 4. Metaloproteases. I. Pimentel, Edson Rosa, 1949-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Effect of different protocols of low-power laser on the healing of rats Achilles tendon after partial transection Palavras-chave em inglês: Achilles tendon - Rupture Laser therapy, low-level Collagen Metalloproteases Área de concentração: Anatomia Titulação: Doutora em Biologia Celular e Estrutural Banca examinadora: Edson Rosa Pimentel [Orientador] Wagner José Fávaro Campinas, 26 de julho de 2013.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel (Orientador)

Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro

Prof. Dr. Wagner José Fávaro

Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior

Profa. Dra. Juliana Castro Monteiro

Profa. Dra. Cíntia Yuri Matsumura

Profa. Dra. Evanisi Teresa Palomari

Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Augusto Marretto Esquisatto

Assinatura Assinatura Assinatura Magner Jolo Armo Assinatura

Assinatura

Assinatura

Assinatura

AGRADECIMENTOS

A Deus, agradeço e peço...

"Senhor, ensina-nos:

A orar sem esquecer o trabalho;

A dar sem olhar a quem;

A sofrer sem magoar seja quem for;

A progredir sem perder a simplicidade;

A semear o bem sem pensar nos resultados;

A desculpar sem condições;

A marchar para frente sem contar os obstáculos;

A ver sem malícia;

A escutar sem corromper os assuntos;

A falar sem ferir;

A compreender o próximo sem exigir entendimento;

A respeitar os semelhantes, sem reclamar consideração;

A dar o melhor de nós, além da execução do próprio dever, sem cobrar taxa de reconhecimento.

Senhor, fortalece em nós a paciência para com as dificuldades dos outros, assim como precisamos da paciência dos outros para com as nossas próprias dificuldades.

Ajuda-nos para que a ninguém façamos aquilo que não desejamos para nós.

Auxilia-nos sobretudo, a reconhecer que a nossa felicidade mais alta será invariavelmente, aquela de cumprir-te os desígnios onde e como queiras, hoje, agora e sempre."

Oração Nossa – Emannuel (Chico Xavier)

Aos meus pais Cesar e Tânia, pelo apoio, compreensão, incentivo e amor. A distância só reforça os ensinamentos de vida e de caráter que vocês sempre me ensinaram. Amo vocês!

Ao meu irmão Bruno repito a frase usada na tese de mestrado que tão bem explica nossa relação, com a licença de uma pequena modificação:

"Te *amo* simplesmente porque você existe." (Charles Chaplin)

Ao meu amor Petrus, sou grata por cada gesto carinhoso, cada sorriso, cada puxão de orelha, cada anime novo, cada capuccino. Estou ansiosa por estar ao seu lado pelo resto da minha vida.

Aos meus eternos amigos Cintia, Ju, Milene, Mari e Marcus. Que mesmo longe se fazem presente em minha vida em todos os momentos.

Aos amigos que conheci ao longo do doutorado e que serão amigos para sempre... Cris, Juliano, Letícia, Anderson, Ricardo, Haline, Marcos, Andrea, Ana Carolina, Érica, Isabel, Neves.

> "Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra. Não nos deixa só, porue deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso". (Clarles Chaplin)

Ao meu eterno orientador Wagner, que despertou em mim a vontade de seguir carreira acadêmica. Obrigada pela orientação e por manter as portas sempre abertas para sua ex-aluna!

À minha orientadora de mestrado e eterna orientadora Evanisi. Obrigada pelos ensinamentos, dedicação, preocupação, confiança e amizade!

Ao meu orientador Prof. Edson pela amizade, paciência e incentivo a buscar respostas aos problemas que surgiam ocasionalmente no decorrer dos trabalhos.

Ao Francisco pela amizade ao longo desses anos e valoroso auxílio nas técnicas de laboratório.

Aos meus amigos do Departamento de Anatomia Toni, Érica, Nori, Marlene, Paulo e Gustavo, pelo companheirismo e amizade.

A todos do Laboratório de Bioquímica de Matriz Extracelular.

A todos os colaboradores que contribuíram com a realização deste trabalho, entre eles: Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira, Profa. Dr. Ione Salgado, Prof. Dr. Wágner José Fávaro, Elzira, Karine, Profa. Mary Anne Heidi Dolder.

À Liliam S. Panagio pela amizade, atenção e cuidado ao logo de todos esses anos! E pela paciência em explicar tudo nos mínimos detalhes!!! Obrigada por ser essa pessoa incrível sempre disposta a ajudar!

Aos departamentos de Anatomia e Biologia Celular, seus mestres, doutores e funcionários que me proporcionaram os conhecimentos necessários para minha titulação como doutora e pesquisadora.

À empresa IBRAMED pelo fornecimento do equipamento de Laser que possibilitou o tratamento dos animais.

Ao Programa de Pós-graduação de Biologia Celular e Estrutural por possibilitar a realização desta tese.

À FAPESP, CNPq e CAPES pelo apoio financeiro durante o desenvolvimento deste trabalho.

"... Mas se deixou levar por sua convicção de que os seres humanos não nascem para sempre no dia em que as mães os dão a luz, e sim que a vida os obriga outra vez e muitas vezes a se parirem a si mesmos." (Gabriel García Marquez)

SUMÁRIO

1.	RES	SUM	O	xiii
1	1.1.	ABS	STRACT	xiv
2.	INT	ROD	DUÇÃO	1
2	2.1.	ANA	ATOMIA DO TENDÃO CALCANEAR	2
2 T	2.2. FEND	CAF ÃO	RACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE COMPONENTES DA MEC DO	4
2	2.3.	LES	ÃO E CICATRIZAÇÃO DO TENDÃO	7
2	2.4.	LAS	SER	11
2	2.5.	TEF	RAPIA COM LASER DE BAIXA POTÊNCIA (LBP)	13
3.	JUS	STIFI	CATIVA	17
4.	OB	JETIV	VOS	18
2	4.1.	OB	JETIVO GERAL	18
2	1.2.	OB	JETIVOS ESPECÍFICOS	18
5.	MA	TERI	AIS E MÉTODOS	19
5	5.1.	ANI	MAIS	19
5	5.2.	GRI	UPOS EXPERIMENTAIS	19
5	5.3.	PRO	DCEDIMENTOS PARA A TRANSECÇÃO PARCIAL DO TENDÃO	20
5	5.4.	PRO	DCEDIMENTOS PARA A APLICAÇÃO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA	21
5	5.5.	ANÁ	ÁLISE BIOQUÍMICA	23
	5.5.	1.	Extração dos componentes da matriz extracelular do tendão	23
	5.5.	2.	Dosagens de proteínas não-colagênicas	23
	5.5.	3.	Eletroforese em gel de Agarose (0.5-1.0%)	24
5.5		4.	Dosagem de Glicosaminoglicanos	24
	5.5.	5.	Quantificação de hidroxiprolina	25
5.5 5.5 5.5		6.	Zimografia	25
		7.	Western Blot para colágeno tipo I e III	26
		8.	Densitometria	27
	5.5.	9.	Análise estatística	28
5	5.6.	ANÁ	ÁLISE MORFOLÓGICA	28
	5.6.	1.	Processamento para análise estrutural em microscopia de luz comum	. 28

	5.6.2.	Microscopia de Polarização: Birrefringência - Análise de imagem e medidas 29	
	5.6.3.	Processamento dos dados de birrefringência em análise estatística 2	9
5	.7. AN	IÁLISE FUNCIONAL 3	0
	5.7.1. partial (Avaliação da pressão exercida pela pata dos ratos submetidos à transecção 3 do tendão	, 0
	5.7.2.	Análise estatística3	1
6.	RESUL	TADOS	2
6	.1. FL	UXOGRAMAS	2
7.	REFEF	ÊNCIAS	4
8.	MANUS	SCRITO 1 4	4
9.	MANUS	SCRITO 2	1
10.	CON	CLUSÕES9	6
1	0.1.	CONCLUSÕES GERAIS9	6
1	0.2.	CONCLUSÕES ESPECÍFICAS:9	6
11.	ANE	XO 19	8

1. RESUMO

O tendão calcanear é o tendão mais acometido por ruptura, particularmente em atividades esportivas. O processo de cicatrização resulta em uma matriz extracelular (MEC) menos organizada o que reduz sua resistência à tensão e torna-o mais susceptível à recorrência de lesões. A terapia com o laser de baixa potência (LBP) tem se mostrado efetiva, porém existem resultados contraditórios com relação a seus protocolos. Nos propusemos a avaliar os efeitos de diferentes terapias com o LBP em tendão calcanear parcialmente seccionado. Para tal foram utilizados ratos Wistar machos adultos, distribuídos em 7 grupos experimentais: G1- Tendão intacto; G2-Tendão seccionado; G3- lesão + LBP (4J/cm²-contínuo); G4- lesão + LBP (4J/cm²-20 Hz); G5- Tendão seccionado; G6- lesão + LBP (4J/cm²-contínuo); G7- lesão + LBP (4J/cm²-20 Hz até o 7º dia e 2 KHz do 8º ao 14º dia). G2, G3 e G4 foram eutanaziados no 8º dia após lesão, e G5, G6 e G7 no 15º dia. Foram realizadas as dosagens de proteínas não-colagênicas (PNC), glicosaminoglicanos (GAG) e hidroxiprolina (HOPro), além de eletroforese em gel de agarose, zimografia para MMP-2 e -9 e western blotting (WB) para colágeno I e III. O estudo estrutural foi feito por meio de lâminas coradas em hematoxilinaeosina (HE) e azul de toluidina (AT) além de análise e medidas de birrefringência por meio de microscopia de polarização. A análise funcional foi realizada por meio do Catwalk. Com relação à HOPro houve um decréscimo significativo em todos os grupos guando comparados ao G1, exceto G7. A dosagem de GAG revelou um aumento em todos os grupos exceto G5 e o gel de agarose mostrou um aumento no conteúdo de dermatan sulfado em todos os grupos transeccionados, sendo menos expressivo em G4 e G7. Nos cortes corados com AT os grupos transeccionados apresentaram maior metacromasia, em especial os grupos tratados. WB para colágeno I mostrou um aumento em G4 e G7. Quanto ao colágeno III G4 apresentou valores maiores guando comparado a G2. A zimografia para MMP-2 indicou maiores valores em G4 e G7. A MMP-9 aumentou em G3 e G4. A análise de birrefringência revelou acentuada desorganização em todos os grupos, com melhora significativa em G7. Os resultados do catwalk apontaram que, após a cirurgia os grupos que receberam o laser pulsado conseguiram apoiar melhor a pata guando comparado aos demais grupos. Nossos resultados mostram que o LBP contínuo e pulsado tem efeitos diferentes sobre o processo de reparo do tendão. O LBP pulsado atuou sobre o processo inflamatório possibilitando que o animal apoiasse melhor a pata ao caminhar e promoveu a síntese e organização do colágeno. Desta maneira acreditamos que este protocolo de tratamento pode ser adaptado para o uso em clínicas de reabilitação de maneira a acelerar o reparo e melhorar as características morfológicas, bioquímicas e funcionais deste tendão.

Palavras-chave: Tendão calcanear, ruptura, LBP, colágeno, metaloproteinase

1.1. ABSTRACT

The Achilles tendon has a high incidence of rupture, particularly in sports activities. The healing process leads to a disorganized extracellular matrix (ECM) which reduces its tensile strength and lead to a high rate of injury recurrence. Low level laser therapy (LLLT) has been effective, but there are conflicting results regarding their protocols. Our purpose was to to evaluate the effects of different therapies with LLLT in partially tenotomized Achilles tendon. Adult male Wistar rats were divided into 7 groups: G1 - intact; G2 - injured; G3 - injured + LLL (4 J/cm²) continuous); G4 - injured + LLL (4 J/cm² - 20 Hz); G5 - injured; G6 - injured + LLL (4 J/cm² continuous); and G7 – injured + LLL (4 J/cm² – 20 Hz until the 7th day and 2 kHz from 8-14 days). G2, G3 and G4 were euthanized 8 days after injury, and G5, G6 and G7 were euthanized on the 15th day. Quantification of non-collagenous protein (NCP), glycosaminoglycans (GAG) and hydroxyproline (HOPro) was performed, in addition to electrophoresis on agarose gel, zymography for MMP-2 and -9, western blotting (WB) for collagen types I and III. The structural analysis was done by hematoxylin-eosin (HE) and toluidine blue (TB) staines with in addition to birefringence measurements and analysis by polarization microscopy. Functional analysis was performed using the gait assessment of the animals in the Catwalk. Regarding HOPro there was a significant decrease in all groups when compared to the G1, except G7. The dosage of GAG showed an increase in all groups except G5 and agarose gel showed an increase in the content of dermatan sulfat in all transected groups, being less expressive in G4 and G7. In sections stained with TB the tenotomized groups showed metachromasia, particularly the treated groups. WB for collagen I showed an increase in G4 and G7. In G4 collagen III showed higher values when compared to G2. The zymography for MMPs-2 showed higher values for G4 and G7. MMP-9 increased in G3 and G4. Analysis of birefringence showed marked disorganization in all groups, with an significant improvement in G7. The catwalk results showed that after surgery. G4 had better results when compared to other groups. Our results show that the continuous and pulsed LLLT has different effects on the process of tendon repair. Pulsed laser acted on the inflammatory process improving the gait and promoting collagen synthesis and organization. Thus we believe that this treatment protocol can be adapted for use in rehabilitation clinics in order to accelerate the repair and enhance the morphological, biochemical and functional characteristics of the tendon.

Key words: Achilles tendon, rupture, LLLT, collagen, matrix metalloproteinase.

2. INTRODUÇÃO

O tendão de calcanear é considerado o tendão mais resistente do corpo humano (JARVINEN et al., 2001, JARVINEN et al., 2005), porém é o tendão mais acometido por ruptura, seguido pelos flexores dos dedos (KANNUS, JÓSZSA, 1991; OLIVEIRA, et al., 2009; ALMEIDA, et al., 2012; ARO, et al., 2012), particularmente em atividades esportivas (CRIBB, SCOTT, 1995). A maior incidência de ruptura de tendão ocorre em homens entre 30 e 39 anos, visto que as mulheres parecem estar protegidas até a menopausa (MAFFULLI et al., 1995).

Com o envelhecimento e desuso, os feixes de colágeno I nos tendões sofrem transformações decorrentes do aumento de ligações cruzadas inter/intramoleculares, com o aumento da cristalinidade e da agregação ordenada deste tipo de colágeno (VIDAL, CARVALHO, 1990). Paralelamente, há decréscimo de proteoglicanos (PGs) e conteúdo de água. Em geral, a densidade e o conteúdo total de colágeno aumentam com a idade (SHADWICK, 1990), principalmente por causa do decréscimo do turnover de colágeno e da redução na síntese de enzimas colagenolíticas (O'BRIEN, 1997).

A ruptura do tendão calcanear tipicamente ocorre após uma dorsiflexão forçada. A lesão caracteriza um quadro inicial onde o indivíduo encontra-se impossibilitado de se apoiar nas pontas dos pés. Lesões desta natureza em geral demoram meses para cicatrizar completamente (ENWEMEKA, REDDY, 2000). Devido à lentidão do processo de cicatrização, a ruptura do tendão calcanear é considerada uma lesão grave e tem chamado a atenção de pesquisadores (STEHNO-BITEL, et al. 1998) que na tentativa de acelerar o processo de reparo fazem uso de alguns métodos como a aplicação de ultra-som, eletroacupuntura, estimulação elétrica, uso de plantas medicinais e laser de baixa potência (CHAN, FUNG, NG, 2007; OLIVEIRA, et al., 2009; CHEN, et al., 2009; ARO, et al., 2012; ALMEIDA, et al., 2012).

2.1. ANATOMIA DO TENDÃO CALCANEAR

Os tendões são estruturas anatômicas que geralmente promovem a inserção dos músculos em estruturas ósseas (LATARJET, LIARD, 1996; BENJAMIN, KAISER, MILZ, 2008). Basicamente cada músculo possui dois tendões, um proximal e um distal. O ponto de união do tendão com o músculo é denominado de junção miotendínea, enquanto o ponto de junção do tendão com o osso é denominado de junção osteotendínea (KANNUS, 2000).

Tendões saudáveis possuem coloração esbranquiçada, brilhante e nacarada. São uma forma especializada de tecido conjuntivo fibroso denso, consistindo de fibras colagências altamente orientadas que transmitem a força mecânica da contração muscular ao osso promovendo assim o movimento da articulação envolvida (LATARJET, LIARD, 1996; KANNUS, 2000).

Os tendões além de transmitir forças de tensão do músculo ao osso, também absorvem parte do impacto da força de tração diminuindo o risco de dano ao músculo (BEST, GARRET, 1994). São tecidos viscoelásticos que exibem relaxamento após a tensão (CARISTEDT, NORDIN, FRANKEL, 1989; VIIDIK,

1996), têm resistência mecânica, boa flexibilidade e até uma certa elasticidade para executar suas funções (KIRKENDALL, GARRET, 1997; O'BRIEN, 1992, OXLUND, 1986).

Os músculos superficiais, o m. gastrocnêmio e o m. sóleo, em conjunto formam o tríceps sural, o qual determina a forma e o volume da panturrilha em seres humanos. Os ventres do m. gastrocnêmio convergem numa lâmina membranácea que se funde com o tendão do m. sóleo subjacente para formar o tendão do calcâneo, ou tendão de Achilles, que se prende à tuberosidade do calcâneo (GRAY, 1988; LATARJET, LIARD, 1996; DANGELO, FATTINI, 2007).

Tipicamente, tecidos adjacentes aos tendões, incluindo as bainhas que envolvem o mesmo, possuem um suprimento sanguíneo mais pronunciado que os tendões (BENJAMIN, KAISER, MILZ, 2008). Estudos indicam que o número de vasos sanguíneos varia ao longo de todo o comprimento do tendão e sua maior concentração ocorre na inserção no osso calcâneo (CARR, NORRIS, 1989). No caso de humanos apresenta uma zona hipovascular localizada entre 2-6 cm a partir da zona de inserção no osso calcâneo (LAGERGREN, LINDHOLM, 1959; SHARMA, MAFFULLI, 2005), onde as desordens e rupturas são mais freqüentes. Além disso, esta posição corresponde a uma região de máxima rotação das fibras de colágeno, comprometendo o suprimento sangüíneo (LESIC, BUMBASIREVIC, 2004).

Assim como a maioria dos tendões, o tendão calcanear é circundado por tecido conjuntivo frouxo, denominado paratendão, que possibilita ao tendão movimentarse sem atrito com estruturas vizinhas (KANNUS, 2000; HESS, et al., 1989). Abaixo do paratendão, todo o tendão é cercado por uma fina bainha de tecido conjuntivo denominada epitendão, que na sua superfície interna é contínua com o endotendão. O endotendão recobre cada fibra do tendão e liga essas fibras individuais, formando grandes unidades de feixes de fibras de colágeno (JÓZSA, 1991; KANNUS, 2000).

2.2. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE COMPONENTES DA MEC DO TENDÃO

Os tendões consistem basicamente de colágeno (especialmente tipo I), que corresponde entre 65 a 80%, e elastina (1-2%) da massa seca do tendão, embebidos numa matriz de proteoglicanas e água (O'BRIEN, 1997). Os elementos de MEC são produzidos pelos tenoblastos e tenócitos, que são como fibroblastos alongados, que situam-se entre as fibras de colágeno (KIRKENDALL, GARRETT, 1997, HESS, 1989).

Além do colágeno tipo I, também estão presentes o colágeno tipo II, III, IV (AHTIKOSKI, et al., 2003), V e VI (JÓZSA, et al., 1991; VIIDIK, 1969). O arranjo estrutural das fibrilas de colágeno e a associação dessas fibrilas com outros elementos de matriz são responsáveis pelas propriedades biomecânicas do tendão (BENEVIDES, et al., 2004).

A principal característica de uma molécula de colágeno típica é a estrutura longa de sua fita-tripla helicoidal, na qual três cadeias polipeptídicas α são enroladas, formando um tipo de corda supertorcida (JOZSA, et al., 1991; KANNUS, 2000). Cada cadeia contém repetições de uma seqüência característica de aminoácidos, formada por Gly-X-Y, onde X e Y podem ser qualquer aminoácido, mas cerca de um terço das posições X são ocupadas por prolina e um número semelhante de posições Y são 4-hidroxiprolinas, resultante de modificação pós-traducionais de prolina. A presença de prolina, hidroxiprolina e glicina, é fundamental na estabilização da tripla hélice de colágeno (PIEZ, REDDI, 1984; YOON, HALPER, 2005). No tendão calcanear, o colágeno possui altíssimo número de ligações cruzadas, formando uma estrutura reforçada que é essencial para suportar a força tensora.

Os feixes de colágeno apresentam um padrão ondulado conhecido como "crimp" (VIDAL, MELLO, 1984), que pode ser detectado também em outros tecidos. O "crimp" é uma característica das fibras de colágeno presentes em tecidos conjuntivos, que permite que parte da força de tração gerada pela contração muscular seja absorvida e não transmitida imediatamente ao osso (GATHERCOLE, KELLER, 1991). Variações na estrutura do "crimp" em diferentes regiões do mesmo tendão podem ser reveladas por microscopia de luz polarizada (VIDAL, 1995).

Os glicosaminoglicanos (GAGs) são polissacarídeos formados por unidades repetidas de dissacarídeos, sendo que um desses açúcares é um ácido urônico (exceção queratan sulfato) e o outro uma hexosamina sulfatada (com exceção do ácido hialurônico). Devido à alta densidade de cargas negativas tem a capacidade de atrair grande quantidade de água no tecido, o que é importante especialmente em regiões do tendão que sofrem forças de compressão, pois exercem uma pressão contrária que é contida pelas fibras de colágeno (KOOB, VOGEL, 1987). Os GAGs são importantes para as propriedades biomecânicas do tecido, oferecem resistência contra o fluxo de fluido no tecido até que o equilíbrio com a

força externa aplicada seja atingido (MUIR et al., 1969 apud PAEGLE et al., 2003; URBAN e MCMULLIN, 1985).

Os proteoglicanos diferenciam-se das demais glicoproteínas por possuir ao menos uma cadeia de glicosaminoglicano (HARDINGHAM e FOSANG, 1992). A presença característica de cargas negativas garante a essas moléculas grande parte de suas características funcionais, por se associarem a uma grande quantidade de cátions livres e com isso reterem água nos tecidos.

Em decorrência de sua estrutura molecular, os proteoglicanos possuem alta resistência às forças de compressão (TANAKA e VAN EIJDEN, 2003). Além de representarem o molde para a ligação dos GAGs e serem responsáveis pelo seu tráfego intracelular, pela via-biossintética secretora, apresentam domínios específicos na molécula que permitem sua interação com outros acucares, com membranas celulares, ou com proteínas, como o colágeno. A composição dissacarídica e o tipo de ligação glicosídica entre eles, além do número e localização dos radicais sulfato, são responsáveis pela classificação dos GAGs (COMPER, 1996). A concentração de proteoglicanos é baixa em regiões onde o tendão está apenas sob forcas de tensão, mas atinge valores altos em regiões sujeitas às forças de compressão e fricção em adição às forças de tensão. Na região de compressão tem sido observada a presença de proteoglicanos ricos em condroitin sulfato (CS) e de proteoglicanos de dermatan sulfato (DS), enquanto na região de tensão são encontrados proteoglicanos principalmente de DS (MERILEES, FLINT, 1980; VOGEL, KOOB, 1989).

2.3. LESÃO E CICATRIZAÇÃO DO TENDÃO

Os tendões são mais resistentes que os músculos (unidades/área) e sua capacidade de força tensora se iguala ao tecido ósseo, embora seja flexível e ligeiramente extensível. O arranjo paralelo das fibras de colágeno do tendão resistem à tensão, de modo que a energia contrátil não seja perdida durante sua transmissão do músculo para o osso. No entanto, a força gerada pelos músculos durante atividades intensas pode levar o tendão à degeneração e ruptura (JAMES et al., 2008).

Como já foi abordado, o tendão calcanear possui um baixo suprimento sanguíneo, e por este motivo o processo de cicatrização demora semanas ou mesmo meses (STEHNO-BITEL, et al., 1998; ENWEMEKA, REDDY, 2000).

A cicatrização do tendão ocorre em três fases distintas:

<u>Fase inicial ou inflamatória</u>: Em ratos esta fase estende-se do 1º ao 7º dia pós-lesão. Eritrócitos e células inflamatórias, particularmente neutrófilos entram no local da injúria. Nas primeiras 24 horas, monócitos e macrófagos predominam e são responsáveis pela fagocitose do material necrosado. Fatores quimiotáticos e vasoativos são liberados com o aumento da permeabilidade vascular, início da angiogênese, estimulação da proliferação de tenócitos e recrutamento de mais células inflamatórias. Tenócitos gradualmente migram para o ferimento, e a síntese de colágeno tipo III é iniciada (MURPHY et al., 1994).

<u>Fase proliferativa</u>: Inicia-se por volta do 8º dia e estende-se até o 14º dia pós-lesão. O pico de produção de colágeno tipo III ocorre neste período. O

conteúdo de água e glicosaminoglicanos (GAGs) permanece alto durante esta fase (OAKES, 2003).

<u>Fase de remodelamento</u>: Inicia-se por volta do 14º dia. Ocorre decréscimo da celularidade, da síntese de colágeno e GAGs. Esta fase de remodelamento pode ser dividida nas fases de consolidação e de maturação. No estágio de consolidação o reparo do tecido muda de celular para fibroso. O metabolismo dos tenócitos permanece alto neste período, e os tenócitos e as fibras de colágeno se tornam alinhadas na direção do estresse. Grande proporção de colágeno tipo I é sintetizada durante este estágio (ABRAHAMSSON, 1991). Posteriormente ocorre a fase de maturação, com mudança gradual de tecido fibroso para uma cicatriz no tendão. Durante a última metade deste estágio, o metabolismo de tenócitos e a vascularidade decaem (AMIEL, et al., 1983, SHARMA, MAFFULLI, 2005).

Como foi observado, a MEC não é estática, e mesmo o tecido normal é constantemente remodelado, o que implica na degradação de seus componentes por proteases, particularmente da família de metaloproteases (MMPs) (BOSMAN, STAMENKOVIC, 2003).

As metaloproteinases (MMPs) são uma família de pelo menos 23 endopeptidases zinco ou cálcio dependentes, que têm papel importante na homeostase da MEC de tendões em condições normais (CLUTTERBUCK et al, 2010). As principais são as colagenases e as gelatinases. Os níveis de MMPs são alterados durante a cicatrização, sendo essas enzimas importantes reguladoras do remodelamento da matriz nesse processo (VU and WERB, 2000; IRELAND et al, 2001). No processo inflamatório, a presença de MMP-2 e 9 caracterizam o intenso processo de remodelamento do tendão. A presença de MMP-9 no local da lesão é notável e, pelo fato desta MMP ser produzida pelas células inflamatórias, seu pico de produção dá-se na fase inflamatória da lesão. No final da fase inflamatória e fase proliferativa, ocorre um declínio na produção de MMP-9 e um aumento da produção de MMP-2 pelos fibroblastos (KAROUSOU, VIGETTI, MAFFULLI, 2008). A degradação do colágeno é iniciada na MEC principalmente por gelatinases (MMP-2 e -9) (KJÆR, 2004), que rapidamente degradam colágenos desnaturados e fragmentos de colágeno (COLLIER et al, 1988). As colagenases (MMP-1, -3, -8 e -13) por sua vez, degradam colágenos dos tipos I, II e III, além de outros componentes da matriz (CLUTTERBUCK et al, 2010).

Os inibidores teciduais de MMPs (TIMPs) são inibidores endógenos responsáveis pela modulação da homeostase dinâmica da MEC durante processos de degradação e reparo (KAROUSOU et al, 2008; YAMAGUCHI, et al. 2010). Assim como ocorre com as MMPs, a concentração dos TIMPs também é alterada durante o processo de cicatrização, visando o controle do catabolismo após lesão (CHAKRABORTI, et al., 2003; KAROUSOU et al, 2008). Vale ressaltar que os TIMPs-1, -2 e -3 são os principais inibidores de colagenases e gelatinases (KOSKINEN et al, 2004).

Apesar de todo o processo de remodelamento, as propriedades bioquímicas e biomecânicas do tendão cicatrizado nunca se igualam às características de um tendão íntegro (SHARMA, MAFFULLI, 2005).

Ainda não se sabe por que as moléculas de colágeno do tendão cicatrizado são incapazes de recuperar a densidade normal de "crosslinks", possivelmente isso se deva a uma alteração na proporção dos diferentes tipos de colágeno, proteoglicanos ou outros fatores desconhecidos no tecido em reparo (FRANK, et al., 1995).

Uma possível explicação pode ser dada pelo fato de que, num protocolo típico utilizado em clínicas de reabilitação, após uma lesão do tendão é realizada a imobilização, de maneira a se conferir proteção ao tecido lesado e prevenir outra possível ruptura. Deste modo, períodos prolongados de imobilização acabam por produzir outros danos como atrofia muscular, osteoartrite, adesão tendineocutânea e infecções (WREN et al, 2001, DEMIR et al, 2004).

Se a duração do processo de cicatrização do tendão pudesse ser diminuída, as complicações devido à prolongada imobilização poderiam ser minimizadas (DEMIR, et al, 2004). Poucos ou nenhum tratamento tem a ação comprovada de acelerar o processo de reparo ou melhora da qualidade de regeneração do tendão (ENWEMEKA, 1991; ELWAKIL, 2007).

Estudos vêm sendo realizados na busca de acelerar o reparo de tendões, com o uso de equipamentos de ultra-som, estimulação elétrica e laser de baixa potência. O laser de baixa potência (LBP) vem despertando considerável atenção por parte dos pesquisadores, devido suas ações em reparo de tecidos e seu amplo espectro de aplicações, porém há controvérsias quanto aos protocolos a serem utilizados (CUNHA, PARIZOTTO, VIDAL, 2001; PRADO, et al. 2006; CHAN, FUNG, NG, 2007).

2.4. LASER

A palavra laser tem sua origem na língua inglesa e vem da expressão *Light Amplification by Estimulated emission of Radiation* que significa amplificação de luz por emissão estimulada de radiação. Essa radiação constitui um tipo de fonte luminosa com características bastante específicas. A radiação a laser é monocromática, ou seja, emite radiações em um único comprimento de onda e apresenta coerência espacial e temporal. Sua direcionalidade permite a obtenção de alta densidade de energia concentrada em pequenos pontos. Com o auxílio de dispositivos ópticos, sua radiação pode ainda ser polarizada (LOPES, 2003).

A potência do laser é dada em watts (W). A densidade de potência é a potência de saída de luz por unidade de área medida, ou seja em watts por centímetro quadrado (W/cm²). A densidade de energia, também chamada de dose, é a grandeza que avalia a possibilidade de estímulo ou inibição dos efeitos do laser, ou seja, a quantidade de energia por unidade de área transferida ao tecido, geralmente expressa em joules por centímetro quadrado (J/cm²) (MISERENDINO e PICK, 1995).

A maioria dos equipamentos que utilizam lasers é composta pelos seguintes elementos segundo Miserendino e Pick, 1995; Zezell, 2001:

- Ressonador: tubo ou cavidade óptica com arranjo de espelhos que amplificam os efeitos do laser.
- Meio ativo: determina o comprimento de onda da luz emitida. Pode ser sólido como o neodímio, érbio

e os lasers semicondutores de arseneto de gálio e alumínio (GaAsAI) e arseneto de gálio (GaAs). Entre os meios ativos gasosos estão o argônio, hélioneônio (He-Ne), dióxido de carbono (CO₂), enquanto os lasers líquidos são compostos de corantes orgânicos.

Mecanismo de excitação ou bombeamento: Consiste de uma fonte de energia externa que excita os elétrons do meio ativo. Pode ser uma descarga elétrica, o disparo de um flash e até uma ativação por outro laser.

O laser pode chegar ao tecido alvo por diferentes sistemas de entrega, entre eles através de lentes, microscópios, braços articulados e fibras ópticas (ZEZELL, 2001 apud DAMANTE, 2003).

Quando a luz atinge um tecido biológico pode haver quatro tipos de interação (MISERENDINO e PICK, 1995; ZEZELL, 2001 apud DAMANTE, 2003):

- Absorção: a luz é absorvida por componentes do tecido como água, hemoglobina e melanina.
- Reflexão: parte da luz incidente é refletida e perdida.
- Espalhamento: parte da luz se espalha pelo tecido perdendo sua potência.
- Transmissão: A luz atravessa toda a espessura do tecido.

Os principais efeitos gerados pelo LBP nos tecidos têm natureza estimulatória, causando aumento do metabolismo celular, quimiotaxia, vascularização, entre outros. (DAMANTE, 2003)

2.5. TERAPIA COM LASER DE BAIXA POTÊNCIA (LBP)

As células possuem um limiar de sobrevivência, relacionado ao tecido o qual constituem e seu estado fisiológico. Quando se trabalha com *laser* respeitando esse limiar celular, lhes é oferecida uma baixa intensidade de energia e, portanto o *laser* é operado em baixa intensidade de potência. Por isso este *laser* é conhecido clinicamente como *"laser* de baixa potência" ou *"laser* de baixa intensidade de energia" (LOPES, 2003).

As terapias com *laser* de baixa intensidade usam porções do espectro visível e infravermelho de luz que não são absorvidas por muitos componentes do organismo e, por isso, possuem maior profundidade de penetração. Comprimentos de onda mais longos são mais resistentes ao espalhamento e penetram mais nos tecidos. A terapia a *laser* envolve usualmente exposições de 4J/cm², o que significa uma penetração de 0,5 a 2,5cm podendo atingir até nervos, músculos e articulações (BASFORD, 1955 apud DAMANTE, 2003; BASFORD, 1995).

Estudos realizados em cultura de células (FRIEDMAN et al., 1991) mostraram que baixos fluxos de energia do LBP desencadearam o processo de mitose e proliferação celular. Por outro lado, doses maiores de laser ocasionaram a liberação excessiva de cálcio devido a hiperatividade da ATPase e bombas de cálcio, esgotando a reserva de ATP na célula e como conseqüência reduzindo o metabolismo celular. Outros autores, porém acreditam que doses maiores de LBP proporcionem melhor reparo tecidual (SALATE, et al., 2005).

Em outro trabalho com cultura de células de fibroblastos humanos submetidos a tratamento com laser de 660 nm, usando doses de 2,4 e 4 J/cm², foi observado um significante aumento no número de células em ambos os grupos tratados, em especial o grupo de 4 J/cm2 (WEBB, DYSON E LEWIS, 1998). Em 2008, Chen e colaboradores ao tratarem culturas de fibroblastos do tendão calcanear de porcos com diferentes dosagens de LBP (1, 2 e 3 J/cm²) observaram que houve também significativa proliferação celular e expressão de mRNA, em especial no grupo tratado com 2 J/cm².

Entre os benefícios descritos em estudos com o LBP estão: diminuição da dor e de processos inflamatórios, proliferação celular e síntese de componentes de MEC, além de estimular reações bioquímicas (CHEN, et al., 2008; GAVISH, et al., 2006). Estudos prévios indicam que a aplicação de LBP aumenta a síntese de ATP e proliferação celular (ENWEMEKA, 2000; BARANAUSKAS, et al., 1998). Além disso, trabalhos relacionam irradiação com LBP com a produção de NO (MORIYAMA et al., 2009; HOULRED et al., 2010,), através de uma superexpressão da iNOS, que pode agir modulando o reparo de lesões.

Estudos realizados em ligamento transeccionado (CHAN, FUNG, NG, 2007) e sobre ferimentos cutâneos em ratos (PUGLIESE et al., 2003), mostraram que o LBP proporciona aumento de fibras colágenas durante o processo cicatricial.

No caso de reparo de lesões em tendão, o LBP tem revelado resultados positivos no que diz respeito à proliferação de fibroblastos, síntese de colágeno e

14

reparo tecidual (PINFILD, et al., 2005; CHEN, et al., 2008). Porém também foram relatados redução do alongamento e aumento da rigidez (NG, FUNG, 2008).

Em 1998 Reddy e colaboradores avaliaram por meio da análise de hidroxiprolina os efeitos da irradiação por LBP de He-Ne (632,8 nm), durante 14 dias com doses diárias de 1J/cm² em coelhos com tenotomia total do tendão calcanear, e observaram que a terapia promoveu a síntese de colágeno.

Demir e colaboradores em 2004 realizaram um estudo comparativo entre o LBP de Ga-As (904 nm, dose de 1J/ cm²) e o ultra-som para avaliar a regeneração de tendão calcanear de camundongos, e concluíram que houve aumento do conteúdo de colágeno nos grupos que utilizaram tanto a terapia com o laser como o que utilizou a terapia com ultra-som. Já estudos usando o laser de AsGa na reabilitação do tendão flexor digital em humanos (OZKAN et al., 2004) não mostraram respostas positivamente significativas dos grupos tratados.

O laser de AsGaAl foi utilizado em tratamento de lesão por esmagamento do tendão calcanear de ratos, numa dose diária de 4 J/cm² e os resultados analisados por microscopia de polarização, mostraram maior organização das fibras de colágeno no grupo tratado (OLIVEIRA et al., 2009).

Sabe-se que dosagens entre 1 e 4J/cm² são recomendadas por seus efeitos anti-inflamatórios e por estimular a regeneração celular, sendo portanto indicadas na fase inicial do processo de cicatrização (WEBB, DYSON, LEWIS, 1998).

Carrinho e colaboradores (2006) avaliaram os efeitos de diferentes lasers (685 e 830 nm) no processo de cicatrização do tendão calcanear de ratos após tenotomia parcial. Os resultados demonstraram que a terapia com LBP proporcionou um efeito benéfico no processo de reparo e, apesar de ambos os protocolos revelarem este benefício, o tendão respondeu de forma diferente às duas terapias.

Os vários estudos aqui relatados utilizaram diferentes dosagens e parâmetros de LBP, que levaram a resultados muitas vezes discrepantes, revelando que existe uma dependência do tecido irradiado pela dose e demais parâmetros utilizados. Nosso propósito nesse trabalho foi fazer uma avaliação exata do efeito de diferentes protocolos de LBP, em que serão fixados os parâmetros de dose e tempo de terapia alterando-se a freqüência, ou seja a maneira de entrega, na dose de energia estabelecida, no tecido. Também serão avaliados o efeito do tratamento com LBP em proteínas não colagênicas, GAGs e também na ação de metaloproteases durante processo de cicatrização de um tecido fibroso.

3. JUSTIFICATIVA

A alta incidência de lesões em tendão calcanear, e a falta de tratamentos com métodos bem definidos para acelerar o processo de reparo em tendões lesados além do elevado tempo de imobilização e seus conseqüentes danos são as principais razões para realizar esse trabalho.

Além disso, diversos estudos comprovam que após lesão as propriedades bioquímicas, morfológicas e mecânicas do tendão jamais se igualam ao tecido normal (SHARMA e MAFFULLI, 2006).

A terapia com o laser de baixa potência tem se mostrado um importante método de indução ao reparo tecidual, e diversos estudos têm buscado um melhor entendimento das possibilidades terapêuticas desta modalidade. Entretanto várias questões permanecem sem resposta e pesquisas sobre seus mecanismos de ação bioquímica e morfológica, além da definição de parâmetros adequados para seu uso nas diferentes fases de reparo, se fazem necessários.

É preciso conhecer melhor as alterações bioquímicas e morfológicas que ocorrem na matriz extracelular de um tecido em processo de reparo submetido à terapia, deste modo, este estudo teve por finalidade determinar o protocolo mais indicado da terapia com o LBP na fase inicial de lesões de ruptura parcial do tendão calcanear, de maneira que, os resultados possam permitir a elaboração de técnicas e adequação de protocolos para reparos em tendões.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar através de métodos bioquímicos, funcionais e morfológicos os efeitos dos diferentes protocolos de LBP sobre a cicatrização do tendão calcanear de ratos ao final das fases inflamatória e proliferativa.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar por meio de microscopia de luz comum e de luz polarizada, a organização estrutural de tendões parcialmente transeccionados em resposta a diferentes protocolos de aplicação de LBP.
- 2- Quantificar proteínas, glicosaminoglicanos e hidroxiprolina dos grupos experimentais submetidos aos diferentes protocolos de aplicação do LBP.
- 3- Analisar em gel de agarose a presença dos glicosaminoglicanos condroitin sulfato e dermatan sulfato, nos tendões de todos os grupos experimentais.
- 4- Detectar a presença e a atividade das metaloproteases (MMPs) -2 e -9 (gelatinases).
- 5- Avaliar por meio de Western Blotting a presença de colágeno I e III no tendão de animais dos diferentes grupos.
- 6- Avaliar por meio do Catwalk a pressão exercida pela pata dos ratos submetidos à transecção parcial do tendão.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. ANIMAIS

O presente trabalho obteve aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Estadual de Campinas, protocolado sob o nº 1921-2 (Anexo 1). Foram utilizados ratos Wistar machos, adultos jovens, pesando em média 300 gramas. Os animais foram agrupados e mantidos em gaiolas plásticas padrão, com livre acesso à água e ração.

5.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados 245 animais distribuídos nos seguintes grupos:

Grupo 1→ Animais com o tendão intacto.

Grupo 2 \rightarrow Animais com tendão calcanear da pata direita parcialmente transeccionado, sacrificados 8 dias após lesão.

Grupo 3 \rightarrow Animais com tendão calcanear da pata direita parcialmente transeccionado, tratado com dose de LBP de 4J/cm² com freqüência contínua, sacrificados 8 dias após lesão.

Grupo 4 \rightarrow Animais com tendão calcanear da pata direita parcialmente transeccionado, tratado com dose de LBP de 4J/cm² com freqüência de 20 Hz, sacrificados 8 dias após lesão.

Grupo 5 \rightarrow Animais com tendão calcanear da pata direita parcialmente transeccionado, sacrificados 15 dias após lesão.

Grupo 6 \rightarrow Animais com tendão calcanear da pata direita parcialmente transeccionado, tratado com dose de LBP de 4J/cm² com freqüência contínua, sacrificados 15 dias após lesão.

Grupo 7→ Animais com tendão calcanear da pata direita parcialmente transeccionado, tratado com dose de LBP de 4J/cm² com freqüência de 20 Hz no período inflamatório, e de 2KHz no período proliferativo, sacrificados 15 dias após lesão.

5.3. PROCEDIMENTOS PARA A TRANSECÇÃO PARCIAL DO TENDÃO

Os animais foram anestesiados com injeção intra-peritoneal de Ketamina (92 mg/Kg) e Xylazina (12 mg/Kg). Após remoção da pele, o tendão calcanear foi exposto e submetido a uma incisão parcial transversal a uma distância de 3 mm de sua inserção no calcâneo (SEIBERT, 1994) (Figura 1A). Posteriormente, os tecidos foram reposicionados e foi realizada a sutura da região (Figura 1B).



Figura 1: Em 1A observa-se a pata do rato dissecada onde o tendão calcanear é evidenciado. Seta indica região onde foi realizada a incisão parcial transversal a uma distância de 3 mm de sua inserção no calcâneo. Em 1B a pata do animal após procedimento com a sutura.

5.4. PROCEDIMENTOS PARA A APLICAÇÃO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA

O equipamento utilizado foi um laser de GaAlAs com comprimento de onda de 830 nm, programado segundo os padrões brasileiros de equipamentos médicos (NBR 60601-1, NBR IEC 6061-2-22 e IEC 825-1) para atuar com uma potência de 40 mW.

Os animais foram imobilizados por meio de um equipamento contensor (ARO, PIMENTEL, 2010) e receberam uma aplicação pontual de 4J/cm², uma vez ao dia, sendo a freqüência modulada de acordo com o grupo tratado. O tratamento com o LBP iniciou-se no dia seguinte à cirurgia de transecção parcial do tendão e

estendeu-se por 6 dias nos grupos que foram eutanasiados aos 8 dias e por 13 dias nos grupos que foram eutanasiados aos 15 dias após lesão. Cada sessão do grupo contínuo teve duração de 16 segundos e intensidade de luz de 0,25 W/cm², e do grupo pulsado teve duração de 32 segundos e intensidade de luz de 0,125 W/cm².

Após a última sessão, os animais foram eutanasiados com aprofundamento de anestesia, para a remoção do tendão calcanear. Os tecidos subcutâneos foram cuidadosamente afastados para exposição e retirada do tendão.



Figura 2: Em 2A observa-se o a base do aparelho de laser de baixa potência. Em 2B podemos observar a caneta de 830 nm posicionada perpendicularmente em relação ao maior eixo do tendão calcanear do animal. Em 2C detalhe da caneta.
5.5. ANÁLISE BIOQUÍMICA

5.5.1. Extração dos componentes da matriz extracelular do tendão

Os feixes de colágeno da região de transecção foram devidamente dissociados em uma placa de petri mantida em torno de 4°C para diminuir o risco de proteólise. Após rápida lavagem em PBS (NaCl 0,15 M em tampão fosfato de sódio 5 mM pH 7,4 com EDTA 50 mM), o material foi seco com papel de filtro e pesado. A extração foi feita com 50 volumes de cloreto de guanidina (GuHCl) 4 M contendo 0,05 M EDTA, 1mM de PMSF em tampão Acetato 0,05M pH 5.8 (HEINEGARD & SOMMARIN, 1987). A extração ocorreu durante 24 horas, à temperatura de 4º C em constante agitação. Após este tempo, o material foi centrifugado em 20.000 r.p.m., durante 60 minutos, a 4º C em centrífuga Beckman J2-21 (Rotor JA-20). O sobrenadante contendo o material extraído em GuHCl, foi utilizado para dosagem de proteínas não-colagênicas e procedimentos de western blotting para colágeno I e III.

5.5.2. Dosagens de proteínas não-colagênicas

As dosagens de proteínas foram realizadas pelo método de Bradford (1976), utilizando Coomassie Brilliant Blue G 250. Como padrão foram empregadas diferentes soluções de albumina bovina (BSA), nas concentrações: 10; 20; 40; 80; 100; μg/ml. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro 8452 A Diode Array da HP em 595 nm.

5.5.3. Eletroforese em gel de Agarose (0.5-1.0%)

Para análise dos tipos de GAGs presentes foi realizada eletroforese em gel de agarose (0.5-1.0%) em tampão 0.05 M de propileno diamino (PDA) preparado conforme Dietrich e Dietrich (1976). Amostras do tecido da região de transecção foram desidratadas em acetona e posteriormente digeridas com papaína (40 mg/g de tecido) em tampão fosfato de sódio 100mM, pH 6,5 contendo 0,04M EDTA, 0,08M 2-mercaptoetanol. A mistura foi incubada por 24 horas à 50°C. Após este tempo o material foi submetido a precipitação com ácido tricloroacético 90% (TCA) em banho de gelo por 10 minutos seguindo para centrifugação em microcentrífuga Fischer, em 5000 r.p.m. durante 15 minutos. O sobrenandante foi precipitado em metanol overnight. As amostras foram novamente centrifugadas a 5000 r.p.m. por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco e ressuspendido em DNAse a 37°C por 30 minutos para remoção dos ácidos nucléicos da amostra. O material foi secado e ressuspendido em água.

5.5.4. Dosagem de Glicosaminoglicanos

A dosagem de GAGs foi realizada através de uma adaptação do método DMMB (dimetil metileno Blue) (FARNDALE, BUTTLE, BARRETT, 1986) a partir do material que sofreu a digestão com papaína. A leitura foi realizada em microplaca a um comprimento de onda de 526nm.

5.5.5. Quantificação de hidroxiprolina

Fragmentos dos tendões foram hidrolisados em HCl 6N (1mL/10mg de tecido) por 16 horas a 110°C. A 5 μ L do material hidrolisado foi acrescentado 1 mL de cloramina T (1,41 g de cloramina T, 10 mL de água, 10 mL de n-propanol e 80 mL de tampão pH 6,0), e após 20 minutos foi adicionado 1 mL de solução de aldeído perclórico (15 g de dimetilaminobenzaldeído, 60 mL de n-propanol, 26 mL de ácido perclórico a 60% e n-propanol para completar o volume para 100 mL). O material foi incubado por 15 minutos a 60°C e a leitura realizada em 550nm em espectrofotômetro HP 8452 A (STEGEMAN, STALDER, 1967).

5.5.6. Zimografia

O tecido foi homogeneizado com tampão de extração (Tris-HCl 50mM pH 7.4, Na Cl 0,2 M, Triton X-100 0,1%, Ca Cl₂ 10mM e inibidor de protease 100µl /10mL), na proporção de 30mg de tecido/100µl de tampão de extração. A extração foi realizada sob agitação por 2 horas em banho de gelo. Após a extração, a amostra foi centrifugada a 4000 rpm (4°C) por 20 minutos. O sobrenadante foi coletado e armazenado. O precipitado foi ressuspendido com 1/3 do volume do tampão utilizado na primeira extração, e posteriormente aquecido por 5 minutos a 60°C. Novamente foi feita uma centrifugação a 4000 rpm (4°C) por 20 minutos e o sobrenadante coletado. Os produtos das duas extrações foram então misturados (MARQUETTI, et al., 2006; SNOEK-VAN, 2005).

Para MMP-2 foi aplicado 1 µg de proteína e para a MMP-9 30 µg de proteína em gel de poliacrilamida 10% preparado com 2 mg/mL de gelatina. Após corrida eletroforética o gel foi incubado em tampão de incubação (Tris-HCI 50mM pH 8.4, 5mM de CaCl2 e 1µM de ZnCl2) por 24 horas a 37°C. Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-250 e descorados (solução de metanol 30% e ácido acético 10% em água). Finalmente o gel foi transferido para uma solução encolhedora (metanol 30% e glicerol 3%).

5.5.7. Western Blot para colágeno tipo I e III

As proteínas do tendão foram submetidas à eletroforese em gel de SDSpoliacrilamida (6%) (ZINGALES, 1984; KLAUS and OSBORN, 1969) e transferidas para membrana de nitrocelulose, como descrito por Towbin et al (1979).Para detecção de colágeno I e III foram precipitadas respectivamente 50 µg e 100 µg de proteínas totais, provenientes do extrato em guanidina, utilizando uma solução contendo tampão acetato de sódio 1M pH 7,4 (100 µL) e 9 volumes de etanol (1350 µL), durante 24 horas à 4°C, e lavado em mesma solução por três vezes. Posteriormente o precipitado obtido foi seco à 37°C e ressuspendido em tampão de amostra redutor contendo β -mercaptoetanol 5% (0,5M Tris-HCl pH 6.8, Glicerol 26%, SDS 20%, Azul de Bromofenol 0,1%). Em seguida, as membranas foram transferidas para o aparelho de western blot Millipore SNAP i.d. O bloqueio foi realizado utilizando-se solução de bloqueio (Millipore Chemiluminescent Blocker) por 15 segundos, conforme instrução do fabricante à temperatura ambiente. A incubação com anticorpo primário (C2456 – Sigma Aldrich e C7805 – Sigma Aldrich) foi realizada durante 10 minutos a temperatura ambiente, diluído (1:500) em solução basal (trisma base 1M, NaCl 5M, Twen 20, água destilada), (CHEN et al., 2008).

As lavagens das membranas foram feitas em solução basal (3x). A incubação com anticorpo secundário (A8786 – anti-mouse Sigma Aldrich), foi realizada durante 10 minutos a temperatura ambiente, diluído (1:500) em solução basal. Posteriormente, as membranas foram reveladas com DAB (dimetilaminobenzeno), e depois a membrana foi lavada em água corrente. Para o controle endógeno foi utilizado o GAPDH (sc-25778, rabbit polyclonal antibody e goat anti-rabbit IgG, A0545, Sigma Aldrich).

5.5.8. Densitometria

A densitometria das bandas referentes às isoformas das MMP-2 e 9, e das membranas de western blot foram realizadas através do programa Scion Image software Alpha 4.0.3.2 (Scion Corporation USA).

5.5.9. Análise estatística

Todos os resultados foram expressos através da média ± desvio padrão. Os resultados foram analisados por meio do análise de variância (ANOVA one-way) seguido do teste de Tukey. O nível de significância foi de p<0,05. Os testes foram realizados através do software Graph-Pad Prism (Graph-Pad Software, La Jolla, CA, USA), versão 3.0.

5.6. ANÁLISE MORFOLÓGICA

5.6.1. Processamento para análise estrutural em microscopia de luz comum

Após a dissecção, os tendões calcaneares foram fixados em solução de formol 4% em tampão Millonig pH 7,4 durante 18 h em temperatura ambiente. Em seguida as peças foram lavadas em tampão, desidratadas em banhos de álcool, seguido de diafanização com banhos de xilol e incluídas em parafina (Histosec). Foram realizados cortes de 7 μm. Para uma visualização geral do tecido alguns cortes foram corados com Hematoxilina-eosina (HE). Para detecção de proteoglicanos, foi utilizada a coloração com Azul de Toluidina (AT) (0,025 % em tampão Mc Ilvaine pH 4.0). As lâminas foram deixadas no corante por 10 minutos, lavadas rapidamente em água, colocadas para secar ao ar. Em seguida, foram mergulhadas rapidamente em xilol e montadas em bálsamo do Canadá. As observações e documentação foram feitas em microscópio Olympus BX 60 equipado com câmera fotográfica.

5.6.2. Microscopia de Polarização: Birrefringência - Análise de imagem e medidas

Cortes longitudinais de 7 µm de espessura foram foram lavados em água, desidratados em etanol, diafanizados com xilol e embebidos em parafina. Cortes seriados longitudinais de 7 µm de espessura foram desparafinizados e seguiram para a análise sob microscopia de polarização em microscópio Olympus BX 60 equipados com polarizador e analizador. Os cortes, considerando o maior eixo do tendão, foram posicionados a 45° entre o polarizador e analisador cruzados, após montagem somente em água (VIDAL, 1980; VIDAL, 1986; VIDAL e MELLO, 2010). Medidas de birrefringência das fibras de colágeno foram realizadas e expressas em "Gray Average (GA)" em pixels (8 bits = 1 pixel) após calibração. As médias de GA foram representados em tabelas.

5.6.3. Processamento dos dados de birrefringência em análise estatística

As medidas obtidas por meio da análise de birrefringência foram submetidas à análise estatística pelo teste de Mann-Whitney (p<0,05) através do software Graph-Pad Prism (Graph-Pad Software, La Jolla, CA, USA), versão 3.0.

5.7. ANÁLISE FUNCIONAL

5.7.1. Avaliação da pressão exercida pela pata dos ratos submetidos à transecção partial do tendão

O sistema de Catwalk (Noldus Inc., Holanda) foi usado para analisar a recuperação da marcha dos animais após a transecção do tendão.

Inicialmente foi realizada uma avaliação da pressão da pata direita de cada animal através do "Walking Track Test" (*CatWalk*), (<u>http://www.noldus.com/animalbehavior-research/products/catwalk</u>), com o intuito de obter um padrão normal da pressão exercida pela pata antes da lesão. Os ratos foram submetidos à avaliações funcionais, sendo realizadas em dias alternados no período de 8 e 15 dias após a lesão. As pegadas foram obtidas durante os 3 dias antes da transecção parcial dos tendões, para avaliar o padrão de marcha normal dos animais, e coletadas novamente após as lesões. As medições pós-operatórias foram coletadas no 2 º, 4 º e 6 º dias após a lesão, para os grupos que foram sacrificados 8 dias após a cirurgia; e no 2º, 4º, 6º, 8º, 10º, 12º e 14º dias, para os grupos que foram sacrificados 15 dias após a lesão.

O "*Walking Track Test*" consta de uma passarela com assoalho de vidro (100cm comprimento x 15cm largura x 0,6cm espessura) instalado em uma sala escura onde os ratos foram habituados a andar ao longo do percurso. Uma lâmpada fluorescente marcou somente onde houve pressão das patas dos ratos caminhando. O assoalho desse corredor é monitorado por uma câmera Pulnix TM-765E CCD equipada com uma objetiva (Cosimar 8,5 mm) que detecta a média de intensidade em pixels. A intensidade do sinal variou de acordo com a pressão aplicada pela pata do animal. Os sinais adquiridos foram digitalizados pelo PCImage-SG quadro à quadro (Matrix vision GmH, Oppenheimer,. Alemanha). O programa *CatWalk* adquire, armazena e posteriormente analisa os vídeos dos ratos caminhando, fornecendo parâmetros para posterior quantificação e análise em planilhas específicas. Os parâmetros utilizados foram "Max Contact Intensity", correspondente à pressão exercida pela pata na plataforma durante a marcha. A intensidade de ampliação variou de 0 a 255 pixels.

5.7.2. Análise estatística

Os resultados foram analisados por meio do análise de variância (ANOVA two-way) seguido do teste de Tukey. O nível de significância foi de p<0,05. Os testes foram realizados através do software Graph-Pad Prism (Graph-Pad Software, La Jolla, CA, USA), versão 3.0.

6. RESULTADOS

Os resultados do presente estudo foram organizados em dois manuscritos apresentados a seguir. Para visualização geral do desenho experimental dos manuscritos, individualmente, observe os fluxogramas abaixo (Figuras 3 e 4).

6.1. FLUXOGRAMAS



Figura 3: Fluxograma do desenho experimental utilizado no manuscrito 1, intitulado "*LLLT improves tendon healing through increase of MMPs activity and collagen synthesis*".



Figura 4: Fluxograma do desenho experimental utilizado no manuscrito 2, intitulado "Pulsed LLLT improves tendon healing in rats: a biochemical, organizational and functional evaluation."

7. REFERÊNCIAS

ABRAHAMSSON, S.O. Matrix metabolism and healing in the flexor tendon. Experimental studies on rabbit tendon. Scand J Plast Reconstr Hand Surg Suppl. v.23, p.1-51, 1991.

AHTIKOSKI, A.M., KOSKINEN, S.O., VIRTANEN, P., KOVANEN, V., RISTELI, J., TAKALA, T.E. Synthesis and degradation of type IV collagen in rat skeletal muscle during immobilization in shortened and lengthened positions. **Acta Physiol Scand.** v. 177, n. 4, p.:473-81, 2003.

ALMEIDA, M.S.; ARO, A.A; GUERRA, F. D.; VIEIRA, C. P.VIEIRA, CP; VIDAL, B. C.; PIMENTEL, E.R. Electroacupuncture Increases the Concentration and Organization of Collagen in a Tendon Healing Model in Rats. **Connective Tissue Research** (Print). v. 53, n. 6:542-547, 2012.

AMIEL, D., AKESON, W., HARWOOD, F.L., et al. Stress deprivation effect on metabolic turnover of medial collateral ligament collagen: a comparison between nine- and 12-week immobilization. **Clin Orthop**. v.172, p.265-70, 1983.

ARO, A.A. E PIMENTEL, E.R. Pedido de Patente Privilégio de Modelo de Utilidade intitulado: **Contensor de ratos para aplicação de biocompostos e raios laser**, depositado no INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL-INPI, em 16.04.10, sob nº MU9000622-4, 2010.

ARO A.A., SIMÕES G.F., ESQUISATO M.A.M., FOGLIO M.A., CARVALHO J.E., OLIVEIRA A.L.R., GOMES L., PIMENTEL E.R. Arrabidaea chica extract improves gait recovery and changes collagen content during healing of the Achilles tendon. **Injury.** doi: 10.1016/j.injury.2012.08.055. 2012.

BARANAUSKAS, V., VIDAL, B.C., PARIZOTTO, N.A. Observation of geometric structure of collagen molecules by atomic force microscopy. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v.69, n.2, p.91-97, 1998.

BASFORD, J.R. Low intensity laser therapy: Still not an established clinical tool. Lasers Surg. Med., v.16, p.331-342, 1955, apud DAMANTE, C.A. Avaliação clínica e histological dos efeitos do laser em baixa intensidade (GaAlAs) na cicatrização de gengivoplastia em humanos. Bauru: Ed. USP, 2003. 92p.

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

BRADFORD, M.M. A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BENEVIDES, G.P., PIMENTEL, E.R., TOYAMA, M.H., et al. Biochemical and biomechanical analysis of tendons of caged and penned chickens. **Connective Tissue Research**. v.45, p.206-15, 2004.

BENJAMIN, M., KAISER, E., MILZ, S. Structure-function relationships in tendons : a review. **J. Anat**. v.212, p.211-228, 2008.

BEST, T.M., GARRET, W.E. Basic science of soft tissue: muscle and tendon. In: DeLee JC, Drez D Jr, editors. **Orthopaedic Sports Medicine: principles and practice**. Philadelphia: WB Saunders. p.1, 1994.

BOSMAN, F., STAMENKOVIC, I. Functional structure and composition of the extracellular Matrix. **J. of Pathology**. v.200, p.423-428, 2003.

CARISTEDT, C.A., NORDIN, M., FRANKEL, V.H., editors. **Basic biomechanics** of the musculoskeletal system. 2nd ed. Philadelphia: Lea and Felviger. p.59-74, 1989.

CARR AJ, NORRIS, S.H. The blood supply of the calcaneal tendon. **J Bone Joint Surg [BR].** v.71-B, p.100–101, 1989.

CARRINHO, P.M., RENNO, A.C.M., KOEKE, P., et al. Comparative Study Using 685-nm and 830-nm Lasers in the Tissue Repair of Tenotomized Tendons in the Mouse. **Photomedicine and Laser Surgery.** v. 24, n.6, p. 754-758, 2009.

CHAKRABORTI, S., MANDAL, M., DAS, S., MANDAL, A., CHAKRABORTI, T. Regulation of matrix metalloproteinases: An overview. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.253, p.269-285, 2003.

CHAN, H.K.F., FUNG, D.T., NG, G.Y. Effects of low-voltage microamperage stimulation on tendon healing in rats. **J Orthop Sports Phys Ther**. v.37, n.7, p.399–403, 2007.

CHEN, M., CHUN, C., MEIJUAN, Y., et al. Involvement of CAPON and Nitric Oxide Synthases in rat muscle regeneration after peripheral nerve injury. **J. Mol. Neurosci**.v.34, p.89-100, 2008.

CHEN, C.H., TSAI, L.L., WANG, Y.H., et al. Low-level laser irradiation promotes cell proliferation and mRNA expression of type I collagen and decorin in porcine Achilles tendon fibroblasts *in vitro.* **J. of Orthopaedic Research**. v. 27, p.646-650, 2009.

CLUTTERBUCK, A.L., HARRIS, P., ALLAWAY, D.,et al. Matrix metalloproteinases in inflammatory pathologies of the horse. **The Veterinary Journal**. v.183, p.27-38, 2010.

COLLIER IE, WILHELM SM, EISEN AZ, MARMER BL, GRANT GA, SELTZER JL, KRONBERGER A, HE CS, BAUER EA AND GOLDBERG GI. H-ras oncogenetransformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloprotease capable of degrading basement membrane collagen. J. Biol. Chem. v. 263, p.6579-6587. 1988.

COMPER, W.D. Extracellular Matrix: Molecular Components and Interactions. 1ed. Harwood Academic Publishers, v.2, p. 200-229, 1996.

CRIBB, A.M., SCOTT, J.E. Tendon response to tensile stress: an ultrastructural investigation of collageproteoglycan interactions in stressed tendon. **J Anat**. v.187, p.423-8, 1995.

CUNHA, A., PARIZOTTO, N.A., VIDAL, B.C. The effect of therapeuticultrasound on repair of the Achilles tendon (tendon calcaneous) of the rat. **Ultrasound Med Biol.** v.27, p.1691–1696, 2001.

DAMANTE, C.A. Avaliação clínica e histological dos efeitos do laser em baixa intensidade (GaAlAs) na cicatrização de gengivoplastia em humanos.Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo (Faculdade de Odontologia de Bauru), Bauru, SP, 2003.

DANGELO, J.G.; FATTINI, C.A. **Anatomia Humana Sistêmica e Segmentar.** 3^a Ed. Editora Atheneu, p.219-305, 2007.

DEMIR, H., MENKU, P., KIRNAP, M. Comparison of the Effects of Laser, Ultrasound, and Combined Laser + Ultrasound Treatments in Experimental Tendon Healing. **Lasers in Surgery and Medicine.** v.35, p.84–89, 2004.

DIETRICH, C.P., DIETRICH, S.M.C. Eletrophoretic behavior of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. **Anal Biochem**. v.70, p.645-647, 1976.

ELWAKIL, T.F. An in-vivo experimental evaluation of He–Ne laser photostimulation in healing Achilles tendons. **Lasers Med Sci**. v.22, p.53–59, 2007.

ENWEMEKA, C.S. Connective tissue plasticity: Ultrastructural, biomechanica, and morphometric effects of physical factors on intact and regenerating tendons. J. Orthop.Sports Phys Ther. v. 14, p.198-212, 1991.

ENWEMEKA, C.S., REDDY, G.K. The biological effects of laser therapy and other modalities on connective tissue repair processes. **Laser Therapy.** v.12, p.22–30, 2000.

FARNDALE, R.W., BUTTLE, D.J., BARRETT, A.J. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. **Biochimica ET Biophysica Acta** v.883, p.173-177, 1986.

FRANK, C., MCDOANLD, D., WILSON, J., et al. Rabbit medial collateral ligament scar weakness is associated with decreasid collagen pyridinoline crosslink density. **J Orthop Res**. v.13, p.157-165, 1995.

FRIEDMAN, H., LUBART, R., LAULICHT, I., et al. A possible explanation of laserinduced stimulation and damage of cell cultures. **Photochem Photobiol.** v.11, p.87–91, 1991.

GATHERCOLE, L.J., KELLER, A. Crimp morphology in the fibre-forming collagens. **Matrix**. v.1, p.1214-34, 1991.

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, n.8, p.779-786, 2006.

GRAY, H.F.R.S. Gray Anatomia. 29ed. Editora Guanabara Koogan S.A., p.242-243, 1988.

HARDINGHAM, T.E.; FOSANG, A.J. Proteoglycans: Many forms and many functions. **The Faseb Journal**, v.6, p.861-870, 1992.

HESS, G.P., CAPPIELLO, W.L., POOLE, R.M., HUNTER, S.C. Prevention and treatment of overuse tendon injuries. **Sport med.** v.8, p.371-84, 1989.

HEINEGARD, D., SOMMARIN, Y. Isolation and characterization of proteoglycans. **Methods Enzymol**. v. 144, p.:319-372, 1987.

HOULRED, N.N., SEKHEJANE, P.R., ABRAHAMSE, H. Irradiation at 830nm Stimulates Nitric Oxide Production and Inhibits Pro-Inflammatory Cytokines in Diabetic Wounded Fibroblast Cells. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 42, p.494–502, 2010.

IRELAND D, HARRALL R, CURRY V, HOLLOWAY G, HACKNEY R, HAZLEMAN B, RILEY G. Multiple changes in gene expression in chronic human Achilles tendinopathy. **Matrix Biol**. v. 20, p.159-169, 2001.

JAMES, R., KESTURU, G., BALIAN, G., CHHABRA, A.B. Tendon: Biology, Biomechanics, Repair, Growth Factors, and Evolving Treatment Options.**JHS.** v.33A, p.102-112, 2008.

JARVINEN, T.A., KANNUS, P., MAFULLI, N. et al. Achilles tendon disorders: etiology and epidemiology. **Foot Ankle Clin**. v. 10, n.2, p.255-266, 2005.

JARVINEN, T.A., KANNUS, P., PAAVOLA, M. et al. Achilles tendon injuries. **Curr Opin Rheumatol**. v. 13, n.2, p.150-155, 2001.

JÓZSA, L., KANNUS, P., BALINT, B.J., et al. Three-dimensional ultrastructure of human tendons. **Acta Anat**. v.142, p.306-12, 1991a.

KJÆR M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to Mechanical loading. **Physiol Rev**. v. 84, p.649-698, 2004.

KANNUS, P. Structure of the tendon connective tissue. **Scand. J. Med. Sci. Sports.** v. 10, p.312-320, 2000.

KANNUS, P., JÓZSA, L. Histopathological changes preceding spontaneous ruptures of a tendon. **Journal of Bone and Joint Surgery**. v.73A, p.1507-25, 1991.

KAROUSOU, E., VIGETTI, D., MAFFULLI, N. Collagens, Proteoglycans, MMP-2, MMP-9 and TIMPs in Human Achilles Tendon Rupture. **Clin Orthop Relat Res**. v.466, p.1577–1582, 2008.

KIRKENDALL, D.T., GARRET, W.E. Function and biomechanics of tendons. **Scand J Med Sci Sports**. v.7, p. 62-6, 1997.

KLAUS, W., OSBORN, M. The reliability of molecular weight determinations by dodecil sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. **J Biol Chem**. v. 244, p.4406-4412, 1969.

KOOB, T.J., VOGEL, K.G. Site- related variations in glycosaminoglycan content and swelling properties of bovine flexor tendon. **J Orthop Res**. v.5, p.414-24, 1987.

KOSKINEN S.O.A., HEINEMEIER K.M., PLESEN J.L., LANGBERG H., KJAER M. Physical exercise can influence local levels of matrix metalloproteinases and their inhibitors in tendon-related connective tissue. **J Appl Physiol**. v. 96, p. 861-864, 2004.

LAGERGREN, C., LINDHOLM, A. Vascular distribution in the Achilles tenon: an angiographic and microangiographic study. **Acta Chir cand.**, v.116, p.491-95, 1958-1959.

LATARJET, M., LIARD, A.R. Anatomia Humana. 2ed. Editora Panamericana, p.837-880, 1996.

LESIC, A., BUMBASIREVIC, M. Disorders of the Achilles tendon. **Current Orthopaedics.** v.18, p.63-75, 2004.

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.

LOPES, L.A. Análise in vitro da proliferação celular de fibroblastos de gengiva humana tratados com laser de baixa intensidade utilizando diferentes parâmetros de irradiação. **Dissertação de doutorado** – Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, 2003.

MAFFULLI N, WATERSTON, W., SQUAIR, J., REAPER, J., DOUGLAS, H. Changing incidence of Achilles tendon rupture in Scotland: a 15 year study. **Clinical Journal of Sports Medicine.** v.9, n.3, p.157-60, 1995.

MARQUETTI RC, PARIZOTTO NA, CHRIGUER RS, PEREZ SEA, SELISTRE-DE-ARAUJO HS. Androgenic-anabolic steroids associated with mechanical loading inhibit matrix metallopeptidase activity and affest the remodeling of the Achilles tendon in rats. **Am J Sports Med** v. 34, n. 8, p: 1274-1280, 2006.

MERILEES, M.J., FLINT, M.H. Ultrastructural study of tension and pressure zones in a rabbit lexor tendon. **Am J Anat**. v.157, p.87-106, 1980.

MICHELACCI, M.J.; HORTON, D.S.P.Q. Proteoglycans from thwe cartilage of young hammerhead shark Sphyrna lewini. **Comp. Biochem. Phisiol**. v.92B, n.4, p.651-658, 1989.

MISERENDINO, L.J.; PICK, R. Lasers in dentistry. Carol Strem, Quintessense Publishing, 1995c. 341p. apud DAMANTE, C.A. Avaliação clínica e histological dos efeitos do laser em baixa intensidade (GaAIAs) na cicatrização de gengivoplastia em humanos.Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo (Faculdade de Odontologia de Bauru), Bauru, SP, 2003.

MORIYAMA, Y., AKENS, J.N.M., MORIYAMA, E.H., LILGE, L. In Vivo Effects of Low Level Laser Therapy on Inducible Nitric Oxide Synthase. Lasers in Surgery and Medicine, v. 41, p. 227–231, 2009.

MUIR, H.; MAROUDAS, A.; WIGHAM, J. The correlation of fixed negative charge with glycosaminoglycan content of human articular cartilage. Biochem Biophys Acta, v.177, p.492-500, 1969; apud PAEGLE, D.I.; HOLMLUND, A.B.; HJERPE, A. Matrix glycosaminoglycans in the temporomandibular joint in pacients with painful clicking and chronic closed lock. Int. J. Oral Maxillofac Surg, v.32, p.397-400, 2003.

MURPHY, P.G., LOLTZ, B.J., FRANK, C.B., HART, D.A. Influence od exogenous growth factors on the synthesis and secretion of collagen types I and III by explants or normal and healing rabbit ligaments. **Biochem Cell Biol**. v.72, p.403-9, 1994.

NG, G.Y.F., FUNG, D.T.C., LEUNG, M.C.P., et al. Ultrastructural comparison of medial collateral ligament repair after single or multiple applications of GaAlAs laser in rats. **Lasers Surg Med.** v.35, p.317–323, 2004.

NOLDUS INFORMATION TECHNOLOGY. CatWalk TM XT: **Advanced Gait Analysis.** Disponível em: <u>http://www.noldus.com/animal-behavior-</u> <u>research/products/catwalk</u>. Acesso em: 25 de set. 2012.

O'BRIEN, M. Functional anatomy and physiology of tendons. **Clin Sports Med**. v.11, p.505-20, 1992.

O'BRIEN, M. Stucture and metabolism of tendons. **Scand J Med Sci Sport**. v.7, p.55-61, 1997.

OAKES, B.W. Tissue healing and repairs: tendons and ligaments. In: Frontera WR, editor. **Rehabilitation of Sports Injuries: Scientific basis.** Boston: Blackwell Science. p.56-98, 2003.

OLIVEIRA, F.S.; PINFILD, C.E., PARIZOTO, N.A., et al. Effect of low level laser therapy (830 nm) with different therapy regimes on the processo f tissue repair in partial lesion calcaneous tendon. **Lasers in Surgery and Medicine**. v. 41, p.271-276, 2009.

OXLUND, H. Relationships between the biomechanical properties, composition and molecular structure of connective tissues. **Connect Tissue res**. v.15, p.65-72, 1986.

OZKAN, N., ALTAN, L., BINGOL, U., AKLN, S., YURTKURAN, M. Investigation of the supplementary effect of GaAs laser therapy on the rehabilitation of human digital flexor tendons. **J. Clin. Laser Med. Surg**. v. 22, n. 2, p.105-110, 2004.

PAEGLE, D.I.; HOLMLUND, A.B.; HJERPE, A. Matrix glycosaminoglycans in the temporomandibular joint in pacients with painful clicking and chronic closed lock. **Int. J. Oral Maxillofac Surg,** v.32, p.397-400, 2003.

PIEZ KA, REDDI AH. Extracellular matrix biochemistry. New York: Elsevier, 1984.

PINFILDI, C.E., LIEBANO, R.E., HOCHMAN, B.S., FERREIRA, L.M. Heliumneon laser in viability of random skin flap in rats. **Lasers Surg Med**. v.37, p.89–91, 2005.

PRADO, R.P., LIEBANO, R.E., HOCHMAN, B., et al. Experimental model for low level laser therapy on ischemic random skin flap in rats. **Acta Cir Bras**. v.21, n.4, p.258–262, 2006.

PUGLIESE, L.S., MEDRADO, A.P., REIS, S.R., ANDRADE, Z.A. The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. **Pesqui. Odontol. Bras.**, v.17, n.4, p.307-313, 2003.

REDDY, G.K., STEHNO-BITTEL, L., ENWEMEKA, C.S. Laser Photostimulation of Collagen Production in Healing Rabbit Achilles Tendons. Lasers in Surgery and Medicine. v.22, p.281–287, 1998.

SALATE, A.C.B., BARBOSA, G., GASPAR, P., et al. Ef fect of In-Ga-AI-P diode laser irradiation on angiogenesis in partial ruptures of Achilles tendon in rats. **Photmed Laser Surg.** v.23, n.5, p.470–475, 2005.

SEIBERT K, ZHANG, Y., LEAHY, K., et al. Pharmaco-logical and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 91, p.:12013–7, 1994.

SHADWICK, R.E. Elastic energy storage in tendons: mechanical differences related to function and age. **J Appl Physiol.** v.68, p.1033-1040, 1990.

SHARMA, P., MAFFULLI, N. Biology of tendon injury: healing, modeling and remodeling. **J. Musculoskelet. Neuronal Interact**., v.6, n.2, p.181-190, 2006.

SHARMA, P., MAFFULLI, N. Basic Biology of tendon injury and healing. **Surgeon**. p.309-316, 2005.

SNOEK-VAN BEURDEN, P.A.M., VON DEN HOFF, J.W. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. **BioTechniques**, v.38, p.73-83, 2005.

STEGEMAN, H., STALDER, K. Determination of hydroxyproline. **Clin Chim Acta**, v.18, p.267-273, 1967.

STEHNO-BITEL, L., REDDY, G.K., GUM ,S., et al. Biochemistry and biomechanics of healing tendon: Part I. Effects of rigid plaster casts and functional casts. **Med Sci Sports Exerc.** v.30, n.6, p.788–793, 1998.

TANAKA, E.; EIJDEN, T.V. Biomechanical behavior of the temporomandibular joint disc. **Crit Rev Oral Biol Med**, v.14, n.2, p.138-150, 2003.

TOWBIN, H., STAEHELIN, T., GORDON, J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.76, n.9, p.4350-4354, 1979.

URBAN, J.P.; MCMULLIN, J.F. Swelling pressure of the inervertebral disc: Influence of proteoglycan and collagen contents. **Bioheology**, v.22, n.2, p.145-157, 1985.

VIDAL, B.C., MELLO, M.L.S. Optical anisotropy of collagen fibers of rat calcaneal tendons: an approach to spatially resolved supramolecular organization. **Acta Histochem.** v. 112, p.53–61, 2010.

VIDAL, B.C. Crimp as part of a helice structure. **C R Acad Sci Paris, Sci la Vie/Life Sci.** v.318, p.173-178, 1995.

VIDAL, B.C., CARVALHO, H.F. Aggregational state a molecular order of tendons as a function of age. **Matrix**. v.10, p.48–57, 1990.

VIDAL, B.C., MELLO, M.L. Proteoglycan arrangement in tendon collagen bundles. **Cellular Mol Biol.** v. 30, p.195-204, 1984.

VIDAL B.C. The part played by proteoglycans and structural lycoproteins in the macromolecular orientation of collagen bundles. **Cell Mol. Biol.** v. 26, p.415–21, 1980.

VIIDIK, K.A. Tendons and ligaments. In: Comper W, editor. **Extracellular matrix**. Amsterdam: Harwood Academic Publishers. v.1, p.303-27, 1996.

VOGEL, K.G., KOOB, T.J. Structural specialization in tendons under compression. **Int Rev Cytol**. v.115, p.267-93, 1989.

WEBB, C., DYSON, M., LEWIS, W.H. Stimulatory effect of 660 nm low level laser energy on hypertrophic scar-derived fibroblasts: possible mechanisms for increase in cell counts. **Lasers in Surgery and Medicine**. v. 22, n.5, p.294-301, 1998.

WREN, T.A.L., YERBY, S.A., BEAUPRE, G.S., et al. Mechanical properties of human Achilles tendon. **Clin Biomech**. v.16, p.245–251, 2001.

VU TH, WERB Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. **Genes Dev**. v.14, p.2123-2133, 2000.

YAMAGUCHI, M., HAYASHI, M., FUJITA, S., YOSHIDA, T., UTSUNOMIYA, T., YAMAMOTO, H. Low-energy laser irradiation facilitates de velocity of tooth movement and the expressions of matrix metalloproteinase-9, cathepsin k and alpha (v), beta (3) integrin in rats. **European Journal of Orthodontics**. v.32, p.131-139, 2010.

YOON , J.H., HALPER, J. Tendon proteoglycans: biochemistry and function. **J. Musculoskelet. Neuronal Interact**. v.5, n.1, p.22-34, 2005.

ZEZELL, D.M. Curso clínico de laser em odontologia. **Apostila de curso FUNDECTO-USP**, São Paulo, 2001. apud DAMANTE, C.A. Avaliação clínica e histological dos efeitos do laser em baixa intensidade (GaAIAs) na cicatrização de gengivoplastia em humanos.**Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo (Faculdade de Odontologia de Bauru)**, Bauru, SP, 2003.

ZINGALES, B. Analysis of protein sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. In: **Genes and Antigens of Parasites**. Rio de Janeiro - Fiocruz, p.357-363, 1984.

8. MANUSCRITO 1

Publicado na LASERS IN MEDICAL SCIENCE

LLLT IMPROVES TENDON HEALING THROUGH INCREASE OF MMPS

ACTIVITY AND COLLAGEN SYNTHESIS

Flávia Da Ré Guerra¹; Cristiano Pedrozo Vieira¹; Marcos Santos Almeida¹; Letícia

Prado Oliveira¹; Andrea Aparecida de Aro¹; Edson Rosa Pimentel¹.

¹ Department of Anatomy, Cell Biology and Physiology and Biophysics Institute of Biology, CP 6109, University of Campinas – UNICAMP 13083-970, Campinas, SP, Brazil.

ABSTRACT

The Achilles tendon has a high incidence of rupture, and healing process leads to a disorganized extracellular matrix (ECM) with a high rate of injury recurrence. To evaluate the effects of different conditions of low level laser (LLL) application on partially tenotomized tendons, adult male rats were divided into the following groups: G1 - intact; G2 - injured; G3 - injured + LLL (4 J/cm²) continuous); G4 – injured + LLL (4 J/cm² – 20 Hz); G5 – injured; G6 – injured + LLL (4 J/cm² continuous); and G7 – injured + LLL (4 J/cm² – 20 Hz until the 7th day and 2 kHz from 8-14 days). G2, G3 and G4 were euthanized 8 days after injury, and G5, G6 and G7 were euthanized on the 15th day. The guantification of hydroxyproline (HOPro) and non-collagenous protein (NCP), zymography for MMP-2 and -9, western blotting (WB) for collagen types I and III. HOPro levels showed a significant decrease in all groups (except G7) when compared with G1. The NCP level increased in all transected groups. WB for collagen type I showed an increase in G4 and G7. For collagen type III, G4 presented a higher value than G2. Zymography for MMP-2 indicated high values in G4 and G7. MMP-9 increased in both treatment groups euthanized at 8 days, especially in G4. Our results indicate that the pulsed LLL therapy improved the remodeling of the ECM during the healing process in tendons through activation of MMP-2 and stimulation of collagen synthesis.

Key words: Achilles tendon, rupture, LLLT, collagen, matrix metalloproteinase 9,

matrix metalloproteinase 2

INTRODUCTION

Tendons are stronger than muscles (units /area), and while the tensile strenath of tendons is equal to bone tissue. tendons are slightly flexible and extensible [1, 2]. The parallel arrangement of collagen fibers, considering the longest axis of tendons, is responsible for the tension tendon resists tension resistance in the forces [3. 41. However. the force generated by the muscles during intense activity as well as prolonged lowintensity activity can both lead to tendon degeneration and rupture [5]. With the increase in recreational and athletic activities over the past two decades, the incidence of Achilles tendon injuries has increased dramatically; these lesions have been divided into overuse injuries (chronic injury) and spontaneous ruptures [6, 7].

The rupture of the Achilles tendon can take weeks or even months to fully heal [8]; one reason for this is the low blood supply to this tendon [9, 10]. Due to the slow healing process, the rupture of the Achilles tendon is considered a serious injury and has drawn the attention of researchers, who have utilized a variety of methods, including the application of ultrasound, electrical stimulation, and lowlevel laser (LLLT), to accelerate the repair process [11, 12, 13].

In tendon healing process of rats there are several events that can be divided in three distinct phases, although there is a overlapping of them: the inflammatory phase, which extends from 1–7 days after injury; the proliferative phase, which begins around day 8 and extends up to 14 days after injury; and

46

the remodeling phase, which begins around day 14 and reach its peak around 21th day [10].

protocol used in rehabilitation after a tendon In a typical injury, immobilization is performed to provide protection to the injured tissue and prevent another possible rupture. periods However, prolonged eventually produce other damage, of immobilization can such as muscular atrophy, osteoarthritis, tendinocutaneous adhesion and infections [13, 14, 15]. If the healing process of the the duration of tendon could be decreased. complications due to prolonged immobilization could be minimized [11]. Few treatments have been shown to accelerate the process of repair or improve the quality of tendon regeneration [16, 17].

For the repair of tendon injuries, LLL therapy (LLLT) has shown promising results with respect fibroblast proliferation, collagen to synthesis and tissue repair [18, 19, 20]. However, LLLT has also been reported to reduce elongation and increase stiffness in tendons [20]. LLLT has attracted considerable attention because of its success in tissue repair and its broad spectrum of applications, but there is controversy about the protocols for the use of LLLT [11, 12]. Therefore, this study aimed to determine the most initial lesions of a partial appropriate protocol for LLLT for the rupture of the Achilles tendon; the results may permit the development of appropriate techniques and suitable protocols for the repair of tendons.

METHODS

Animal care was in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes and is consistent with the ethical principles of animal experimentation adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA); the protocol was approved by the Ethics Committee on Animal Experiments of the State University of Campinas, SP, Brazil and filed under No. 1921-2.

In this study, 140 male Wistar/Uni rats with a mean age of 60 days and weight ranging from 300–350 g were used. The rats were housed two per cage in a 12 h light:dark cycle at 23°C, with free access to standard rat chow and water. The animals were divided into seven groups: G1 – intact; G2 – injured; G3 – injured + LLLT (4 J/cm² continuous); G4 – injured + LLLT (4 J/cm² – 20 Hz); G5 – injured; G6 – injured + LLLT (4 J/cm² continuous); and G7 – injured + LLLT (4 J/cm² – 20 Hz) Hz until the 7th day and 2 kHz from 8–14 days). G2, G3 and G4 were euthanized on day 8 after injury, and G5, G6 and G7 were euthanized on day 15.

Procedures for the partial transection of the tendon

The animals were anesthetized with intraperitoneal injection of Ketamine (90 mg/kg) and xylazine (12 mg/kg). After removing the skin, the calcaneal tendon was exposed and an transverse partial transection was performed in the

tension region of the tendon that is located at an approximate distance of 3 mm from the tendon insertion into the calcaneous bone.

Laser Therapy

The laser equipment used was a GaAlAs laser with 830 nm wavelength and was programmed according to Brazilian medical equipment standards (NBR 60601-1, NBR IEC 60601-2-22 e IEC 825-1) at 40 mW of power. The animals were immobilized with containment equipment [21] and received a punctual application of 4 J/cm², once a day, with a frequency that varied according to the experimental group. Treatment with LLLT began the day after surgery and lasted until the day before euthanasia, that way, the groups euthanized 15 days after surgery received 13 applications, and the groups euthanized 8 days after surgery received 6 applications. The time of irradiation also varied according to the experimental group. Each session of the continuous group last 16 seconds, and in the pulsed group 32 seconds. After the last session, the animals were euthanized with deepening of anesthesia for the removal of the calcaneal tendon.

Biochemical analysis

Extraction procedures

The calcaneal tendon was removed and treated with 25 volumes of 4 M guanidine hydrochloride (GuHCl) containing 20 mM EDTA, 1 mM PMSF in 50 mM sodium acetate buffer pH 5.8 [22] for 24 h at 4°C with stirring. Afterward, the material was centrifuged (13,000 ×g, 25 min, 4°C), and the supernatant was used for non-collagenous protein dosage and western blotting for collagen I and III.

Quantification of Proteins

Samples of the extracts of each experimental group were used. Noncollagenous proteins (NCPs) were quantified according to the Bradford method [23] using bovine serum albumin as standard. The absorbance was measured at 595 nm.

Western blotting for collagen I and III

For western blots, 50 μ g and 100 μ g of total protein were precipitated from the guanidine extract for collagen I and III, respectively, using a solution containing 1 M sodium acetate buffer pH 7.4 (100 mL) and 9 volumes of ethanol (1350 mL) for 24 hours at 4 ° C. After three washes with 150 mL 1 M sodium acetate buffer pH 7.4 and 1350 mL of ethanol, the precipitate obtained was dried at 37 °C and resuspended in reducing sample buffer (0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 26% glycerol, 20% SDS and 0.1% bromophenol blue). For collagen III, the same procedure was performed, but the precipitate obtained was resuspended in reducing sample buffer containing 5% β -mercaptoethanol.

Proteins from tendon subjected to electrophoresis on SDSthe polyacrylamide (6%) gels were transferred to nitrocellulose membranes, as described by Towbin [24]. The membranes were transferred with the Snap i.d. system (Millipore). blocked with BlØk-CH reagent for 15 seconds and incubated with primary antibody (C2456, collagen I, Sigma Aldrich and C7805, collagen III, Sigma Aldrich) at а dilution of 1:1000 for 10 minutes. The membranes were washed three times in TBS, incubated with secondary antibody (A8786, anti-mouse, Sigma Aldrich and A2306, anti-rabbit, Sigma Aldrich) for 10 minutes and washed again. Finally, the western blot signal was developed with DAB (dimethylaminobenzaldehyde). For the endogenous control, GAPDH was used (sc-25778, rabbit polyclonal antibody and goat anti-rabbit IgG, A0545, Sigma Aldrich). The band densitometry was performed with the Scion Image software Alpha 4.0.3.2 (Scion Corporation), and the results were expressed as the mean ratio in relation to the GAPDH band intensity.

Zymography

Metalloproteinase analyses were performed according to the methods of Marquetti et al. [25]. The samples were incubated in extraction buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.2 M NaCl, 0.1% Triton X-100, 10 mM CaCl₂ and protease inhibitor

100 μ I/10 mL) at 4°C for 24 hours. In total, 30 μ g of protein for MMP-9 analysis and 1 μ g of protein for MMP-2 analysis was loaded in each lane of sodium dodecyl sulfate (SDS) 10% polyacrylamide gels prepared with 2 mg/mL gelatin. Then, the gel was incubated in incubation buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.4, 5 mM CaCl₂ and 1 μ M ZnCl₂) overnight at 37°C. Gels were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 and bleached (30% methanol and 10% acetic acid in water). Finally, the gel was placed in shrinking solution (30% methanol and 3% glycerol). The band densitometry was performed with the Scion Image software Alpha 4.0.3.2 (Scion Corporation).

Hydroxyproline quantification

Fragments of the tendon were hydrolyzed in 6 N HCl (1 mL/10 mg tissue) for 4 hr at 130°C. Then, the lysate was treated with 1.41% chloramine T solution and 15% p-dimethylaminobenzaldehyde, as described by Stegemann and Stalder [26]. After incubation for 15 min at 60°C, the hydroxyproline solution was cooled and the absorbance was measured at 550 nm in an Ultrospec 2100 (Pro Amersham Biosciences, England) spectrophotometer.

Statistical analysis

All results were expressed as the mean ± standard deviation. The results were analyzed by an analysis of variance (one-way ANOVA) followed by the Tukey

test. The level of significance was p <0.05. The analysis was carried out in GraphPad Prism 3.0 program.

RESULTS

The quantification of hydroxyproline (Fig. 1A) revealed that there was a significant decrease in the concentration of hydroxyproline in all groups, except the G7 (144,90±8,76), when compared to G1 (153,01±14,67). There were no significant differences between the various tenotomized groups that received LLLT; however, it is important to note that there is a tendency for an increased concentration of HOPro in animals that were treated with pulsed laser for 15 days (G7) compared to the animals that were simply tenotomized (G5) (124,33±14,65).

The examination of the levels of noncollagenous proteins (Figure 1B) revealed that all transected groups showed an increased content of non-collagen proteins compared to the control group (20,20±4,20). The analysis of zymography gels for MMP-2 (Figure 2) showed that the groups did not show the latent isoform of MMP-2 (72 kDa) 8 days after injury. After analysis by densitometry, statistically higher values of the intermediate (68 kDa) (43932,59±2300,18) active and bands (62 kDa) (109940,63±13099,99) were observed in the G4 compared with the G2 (active 29085,09±2469,84) and G3 82053,42±3308,56; intermediate (intermediate 32209,43±794,66; active 93664,18±2913,22) (Figure 2). At 15 days after

injury (Figure 2), the latent isoform of MMP-2 was not significantly different between the groups. With respect to the intermediate and active isoforms, the with the pulsed laser frequency (G7) group treated (intermediate 53494,16±1408,75; active 37327,06±6269,063) had statistically higher values compared G5 (intermediate 40932,52±5489,257; when to active G6 (intermediate 27997,93±2420,67) and 41992,06±7098,337; active 25908,17±3621,04).

The zymography for MMP-9 (Figure 3) revealed that the groups euthanized 15 davs after the injury did not show the band corresponding at to this metalloprotease, whereas groups euthanized at 8 days showed both bands (latent 92 kDa and active 83 kDa). The results of densitometry (Figure 3) revealed that both treatment groups showed an increase in the bands corresponding to the isoforms of MMP-9, but only in the group treated with pulsed laser (G4) (latent 12644,99±3012,082; active 24055,17±7531,34) was this increase statistically significant compared to G2 (latent 5873,07±1991,13; active 11266,68±2987,23).

Western blotting for collagen I (Figure 4) showed that in groups treated with the pulsed laser frequency, collagen I was higher than in the other groups euthanized on the same date. The G2 ($4,53\pm1,08$) values were statistically lower when compared with G1 ($12,08\pm3,19$). It was also observed that the treated groups tended to have an increased content of collagen, for example, in G4 ($12,50\pm3,15$) relative to G2 and G7 ($15,92\pm2,35$) relative to G5 ($6,38\pm0,97$).

Western blotting for the detection of type III collagen was also performed (Figure 4) for the groups euthanized at 8 days after transection of the calcaneal tendon. We observed that the transected groups showed an increase in the content of collagen III compared to the G1 ($0,41\pm0,04$); the group treated with the pulsed laser frequency (G4) ($2,19\pm0,39$) presented a high content of this type of collagen. At 15 days, groups G5 ($1,92\pm0,37$) and G6 ($1,51\pm0,39$) showed a high content of collagen III, but G7 ($0,05\pm0,01$) lysates showed a drastic reduction of this extracellular matrix component.

DISCUSSION

In the present study, animals with partial tenotomy of the calcaneal tendon was exposed to different protocols of low-power laser, with fixed dose and duration of therapy and variations in the frequency; thus, one group was treated with LLL with a continuous frequency and another with a pulsed frequency. The dose used (4 J/cm²) and the wavelength (830 nm) were chosen based on promising results presented previously in the literature [12, 20, 36, 39]. Besides, the chosen wavelength allowed altering the frequency parameters, thereby modulating the energy that is transmitted to the tissue.

The effects of LLLT described in the literature include the reduction of pain and inflammation, increased cell proliferation and synthesis of ECM components, stimulated biochemical reactions [23] and increased synthesis of ATP [27, 28]; therefore, the animals were evaluated at 8 and 15 days after injury to analyze the effects of laser treatment on the inflammatory and proliferative phases.

At observed a significant 8 davs after iniurv. we decrease in the concentration of hydroxyproline in all groups when compared with the normal group (G1). These results were expected because in this phase of the injury. decreased collagen content has been observed. while monocytes and macrophages predominate at site the of injury and are responsible for phagocytosis of necrotic material, such as collagen degradation. In addition, this phase is just the beginning of collagen type III synthesis [29]. The decrease in the concentration of HOPro in groups G2, G3 and G4 compared to G1 is related to the activity of MMP-2, which is the main enzyme that functions during the tendon remodeling process and that acts after the action of the collagenases, to degrade elements of the extracellular matrix, as discussed below [30].

blotting for collagen III showed that The western the groups treated with LLLT showed an increase in this component of the matrix, when compared to the group that undergoing treatment. It is known that in tendon regeneration processes, there is the formation of granulation tissue with is rich in thin fibrils of collagen III that serves as a scaffold for the subsequent formation of bundles of collagen type I [5, 6]. After in this study, the low-power laser stimulated the production of collagen I and III in both treatment protocols, which confirmed the hypothesis that collagen III supports the formation of collagen I; the western blotting for collagen I showed an increased content in the groups treated with low-power laser, particularly in the group (G4) treated with the laser pulsed frequency.

The metalloprotease enzymes are secreted as latent or inactive isoforms and are called pro-MMPs. To become activated, their latent pro-domain must be cleaved by the action of other proteases. This cleavage causes a reduction in the molecular mass of this enzyme, and through zymography we can identify At the corresponding isoforms [31]. 8 days after injury, the analysis of zymography for MMP-2 did not show the latent isoform (72 kDa), but did show a strong presence of intermediate and active isoforms, especially in G2, G3 and G4. The group treated with pulsed LLL (G4) showed statistically higher values of the intermediate (68 kDa) and active (62 kDa) bands when compared with G2 and G3, indicating that these laser conditions stimulated the activation of this MMP. Previous studies have shown that after the exposure of the smooth muscle cells of pigs to a low level laser, there was an increase in the expression of MMP-2, which is consistent with our results [32].

In the analysis of MMP-9, we observed that all groups euthanized at 8 days after injury showed both the latent (92 kDa) and active (83 kDa) isoforms. Densitometry results showed that both groups treated with LLLT showed an increase in the bands corresponding to isoforms of MMP-9. However, only the group treated with pulsed laser (G4) showed a statistically significant increase when compared to G2, indicating that the pulsed laser was responsible for promoting the increased activity of this metalloprotease. MMP-9 is activated by a number of inflammatory factors and cells and also by MMP-2 [33, 34, 35], which is with our that showed a statistically consistent results significant increase in these MMPs in the LLLT pulsed group. Yamaguchi and colleagues [36] observed that irradiation of with a the rats low-power laser promoted tooth movement by increasing MMP-9 in these animals. These

57

results are consistent with our findings for the group treated with the laser pulse frequency.

The results of zymography and hydroxyproline concentration proved to be complementary. In the inflammatory phase of injury, there is an intense process of degradation of the tendon and the presence of MMP-2 and 9 are characteristic of this phase. Previous studies found that there is a marked presence of MMP-9 in the injured area; because MMP is produced by fibroblasts [37] and inflammatory cells, its peak production takes place in the inflammatory phase of injury [38].

The experimental groups were also assessed in the proliferative phase, i.e., 15 days after injury. Hydroxyproline dosages showed no significant differences between tenotomized groups; however, there was a noticeable trend for increased HOPro levels in the rats euthanized after 15 days in all LLLT groups. The determination of hydroxyproline showed that the groups that suffered the injury did not recover their normal content of collagen; in contrast, the group treated with pulsed LLLT (G7) had HOPro values that were not significantly different from the normal group (G1).

Previous studies have shown that after laser therapy the collagen content was higher in those receiving laser therapy than those who received no treatment [11, 13, 15, 19, 34, 39], which is consistent with our findings in relation to the group treated with the pulsed frequency. Moreover, in agreement with the hydroxyproline results, collagen I western blotting showed that the groups treated with LLLT, in particular the pulsed frequency, exhibited an increased expression of this extracellular matrix component. Therefore, our results
suggest that the low-power laser stimulates the synthesis of collagen I and can act to modulate fibrillogenesis of collagen type I.

The proliferative phase is characterized by the peak production of collagen type III [39, 40, 41]; this observation is consistent with our results, except for G7, which showed a decrease in collagen III content. Because the collagen I content in G7 was higher than all the other treated groups and because collagen III was higher in G4, we believe that pulsed LLLT caused the peak of collagen III and promoted a fast recovery of collagen fibrils of the damage tissue.

The zymography for MMP-2 in the group euthanized 15 days after injury showed that all of the groups had the latent isoform, which was not significantly different between the groups. With respect to the intermediate and active isoforms, the group treated with the pulsed laser frequency (G7) showed significantly higher values than G5 and G6.

The groups euthanized at 15 days did not present the band corresponding to MMP-9; this was an expected result because when the end of the inflammatory phase occurs, there is a decline in the production of MMP-9 and an increased production of MMP-2 by fibroblasts, as observed in this study, corroborating with previous studies [30]. Zymography for the groups analyzed at 8 and 15 days after injury showed that MMP-9 appeared in the inflammatory phase of injury. In contrast, MMP-2 acted both in the inflammatory and proliferative phases, indicating that the action of MMP-2 was also during the process of matrix remodeling. Previous studies realized in our laboratory have shown that tha presence of MMP-2 indicates a higher remodeling of the extracellular matrix of tendons [41, 42].

59

Our results show that the continuous and pulsed LLLT have different effects on the process of tendon repair. In the inflammatory phase, there was a more marked presence of active MMP-2 and MMP-9 in animals treated with the pulsed laser compared to the continuous laser, suggesting that pulsed LLLT has a more potent effect in the process of remodeling of the tendon.

studies have shown that after Several injury, the morphological, biochemical and mechanical properties of the tendon are never equal to normal, uninjured tissue [43, 44, 45]. Possible causes are the long-term immobilization afer lesion, which results in the absence of mechanical load on the tendon and an inefficient blood irrigation. Our results suggest that during the application of laser energy, density should not be the only parameter taken into consideration. By altering frequency parameters, thereby modulating the the energy that is transmitted to the tissue, we obtained different results for the treated groups.

Based on our results, we believe that the LLLT with a pulsed frequency accelerated the tissue repair by promoting the synthesis of the main component of the tendon, collagen, which is responsible for the mechanical properties of the tissue, and by modulating the activities of MMP-2 and 9. Thus, we believe that this treatment protocol can be adapted for use in the clinical rehabilitation of individuals who suffered Achilles tendon rupture to accelerate the repair of this injury. Further studies will be realized in our laboratory in order to detect the effect of different laser intensities on the organization of the collagen bundles during tendon healing.



Figure 1: A: Concentration of hydroxyproline (mg/g dry tissue) in the different groups. Observe the significant difference between all the groups in relation to G1 (*), except in the group G7 where the values were similar to G1. B: Concentration of non-collagenous-protein (mg/g wet tissue) in the different groups. Observe the significant difference between all the groups in relation to G1 (*).



Figure 2: Zymography for MMP-2 of extracts of tendon from rats submitted to different laser protocols. Observe the presence of the latent (72kDa) form only in groups G5, G6 and G7. Densitometry of bands detect differences between the treated groups for the intermediary and active isoforms. The group G4 showed more intense band (pixels x 10^5) compared to the G2 and G3 (*) groups.G7 showed more intense band (pixels x 10^5) compared to the G5 and G6 (#) in intermediate and active isoforms.



Figure 3: Zymography for MMP-9 of extracts of tendon from rats submitted to different laser protocols. Note the presence of the latent form (92kDa) in all groups euthanized 8 days after injury. The groups euthanized 15 days after injury did not present this metalloproteinase. In G4 the active isoform (arrow) is apparently more evident than in G2 and G3.



Figure 4: B: Densitometry of collagen I bands. Note that G4 and G7 (pulsed groups) have more of this component when compared to their control (G2 and G5 respectively), and also compared to continuous groups (G3 and G6 respectively). B: Densitometry of collagen III bands. We can observe that all transected groups have large amount of this content, specially G4, on the other hand, G7 showed a small content of collagen III. C: Western Blotting for collagen I and III and endogen control, GAPDH.

REFERENCES

- O'Brien M (1997) Structure and metabolism of tendons. Scand J Med Sci Sport. 7:55-61.
- Ahtikoski AM, Koskinen SO, Virtanen P, Kovanen V, Risteli J, Takala TE (2003) Synthesis and degradation of type IV collagen in rat skeletal muscle during immobilization in shortened and lengthened positions. Acta Physiol Scand. 177(4):473-81.
- Benevides GP, Pimentel ER, Toyama MH, et al. (2004) Biochemical and biomechanical analysis of tendons of caged and penned chickens. Connective Tissue Research 45:206-15.
- Yoon JH, Halper J (2005) Tendon proteoglycans: biochemistry and function.
 J. Musculoskelet. Neuronal Interact 5 (1):22-34.
- James R, kesturu G, Balian G, Chhabra AB (2008) Tendon: Biology, Biomechanics, Repair, Growth Factors, and Evolving Treatment Options.JHS 33:102-112.
- Kannus P, Natri A (1997) Etiology and pathophysiology of tendon ruptures in sports. Scand J Med Sci Sports 7(2): 107-12.
- 7. Järvinen T et al. (2005) Achilles tendon disorders: etiology and epidemiology. Foot Ankle Clin 10(2): 255-266.

- Enwemeka CS, Reddy GK (2000) The biological effects of laser therapy and other modalities on connective tissue repair processes. Laser Therapy 12:22–30.
- Lesic A, Bumbasirevic M (2004) Disorders of the Achilles tendon. Current Orthopaedics 18:63-75.
- 10.Sharma P, Maffuli N (2005) Basic Biology of tendon injury and healing. Surgeon 309-316.
- 11.Chan HKF, Fung DT, Ng GY (2007) Effects of low-voltage microamperage stimulation on tendon healing in rats. J Orthop Sports Phys Ther. 37(7):399–403.
- 12.Oliveira FS, Pinfild CE, Parizoto NA, et al. (2009) Effect of low level laser therapy (830 nm) with different therapy regimes on the processo f tissue repair in partial lesion calcaneous tendon. Lasers in Surgery and Medicine 41:271-276.
- 13.Chen CH, Tsai LL, Wang YH, et al. (2009) Low-level laser irradiation promotes cell proliferation and mRNA expression of type I collagen and decorin in porcine Achilles tendon fibroblasts *in vitro.* J. of Orthopaedic Research 27:646-650.
- 14.Wren TA, Yerby SA, Beaupré GS, Carter DR (2001) Mechanical properties of the human Achilles tendon. Clin. Biomech. (Bristol. Avon.) 16 (3):245-251.

- 15.Demir H, Menku P, Kirnap M (2004) Comparison of the Effects of Laser, Ultrasound, and Combined Laser + Ultrasound Treatments in Experimental Tendon Healing. Lasers in Surgery and Medicine 35:84–89.
- 16.Aro AA, Vidal BC, Tomiosso TC, Gomes L, Martiello-Rosa SMG, Pimentel ER (2008) Structural and Biomechanical Analysis of the effect of immobilization followed by stretching on the calcaneal tendon of rats. Connective Tissue Research 49:443-454.
- 17.Enwemeka CS (1991) Connective tissue plasticity: Ultrastructural, biomechanica, and morphometric effects of physical factors on intact and regenerating tendons. J. Orthop.Sports Phys Ther. 14:198-212.
- 18.Elwakil TF (2007) An in-vivo experimental evaluation of He–Ne laser photostimulation in healing Achilles tendons. Lasers Med Sci. 22:53–59.
- 19. Pinfild CE, Liebano RE, Hochman BS, Ferreira LM. Heliumneon laser in viability of random skin flap in rats. Lasers Surg Med. 37:89–91.
- 20.Ng GYF, Fung DTC, Leung MCP, et al. (2004) Ultrastructural comparison of medial collateral ligament repair after single or multiple applications of GaAlAs laser in rats. Lasers Surg Med. 35:317–323.
- 21.Request Privilege of Utility Model in Brazil, titled: RETAINER OF RATS FOR LASER BEAM AND BIOCOMPOUNDS APPLICATION, deposited in NATIONAL INSTITUTE OF INDUSTRIAL PROPERTY – INPI, on 04.16.10,

under n° MU9000622-4, authored by researchers ANDREA APARECIDA DE ARO and EDSON ROSA PIMENTEL, from Institute of Biology, UNICAMP.

- 22. Heinegard D, Sommarin Y (1987) Isolation and characterization of proteoglycans. Methods Enzymol. 144:319-372.
- 23.Bradford MM (1976) A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72:248-254.
- 24. Towbin H, Staehelin T, GORDON J (1979) Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. 76 (9):4350-4354.
- 25.Marquetti RC, Parizotto NA, Chriguer RS, Perez SEA, Selistre-De-Araujo HS (2006) Androgenic-anabolic steroids associated with mechanical loading inhibit matrix metallopeptidase activity and affest the remodeling of the Achilles tendon in rats. Am J Sports Med 34 (8):1274-1280.
- 26.Stegeman H, Stalder K (1967) Determination of hydroxyproline. Clin Chim Acta 18:267-273.
- 27.Baranauskas V, Vidal BC, Parizoto NA (1998) Observation of geometric structure of collagen molecules by atomic force microscopy. Appl. Biochem. Biotechnol. 69 (2):91-97.

- 28. Enwemeka CS, Reddy GK (2000) The biological effects of laser therapy and other modalities on connective tissue repair processes. Laser Therapy 12:22–30.
- 29.Murphy PG, Loltz BJ, Frank CB, Hart DA (1994) Influence of exogenous growth factors on the synthesis and secretion of collagen types I and III by explants or normal and healing rabbit ligaments. Biochem Cell Biol 72:403-409.
- 30.Oshiro W, Lou J, Xing X, Tu Y, Manske PR (2003) Flexor tendon healing in the rat: a histologic and gene expression study. J Hand Surg (Am) 28:814-823.
- 31.Snoek-Van BP, Von Den Hoff JW (2005) Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. BioTechniques 38:73-83.
- 32.Gavish L, Perez L, Gertz SD (2006) Low-level laser irradiation modulates matrix metalloproteinase activity and gene expression in porcine aortic smooth muscle cells. Lasers Surg. Med 38(8):779-786.
- 33.Bosman, F, Stamenkovic, I (2003) Functional structure and composition of the extracellular Matrix. J. of Pathology 200:423-428.
- 34. Clutterbuck, AL, Harris, P, Allaway, D, et al. (2010) Matrix metalloproteinases in inflammatory pathologies of the horse. The Veterinary Journal 183:27-38.

- 35. Abrahamsson, SO (1991) Matrix metabolism and healing in the flexor tendon. Experimental studies on rabbit tendon. Scand J Plast Reconstr Hand Surg Suppl. 23:1-51.
- 36. Yamaguchi M, Hayashi M, Fujita S, Yoshida T, Utsunomiya T, Yamamoto H
 (2010) Low-energy laser irradiation facilitates de velocity of tooth movement and the expressions of matrix metalloproteinase-9, cathepsin k and alpha
 (v), beta (3) integrin in rats. European Journal of Orthodontics 32:131-139.
- 37.Gillard JA, Reed MW, Buttle D, Cross SS, Brown NJ (2004)Matrix Metalloproteinases activity and immunohistochemical profile of matrix metalloproteinase – 2 and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 during human dermal wound healing. Wound Repair and Regeneration 12: 295-304.
- 38.Karousou E, Vigetti D, Maffulli N (2008) Collagens, Proteoglycans, MMP-2, MMP-9 and TIMPs in Human Achilles Tendon Rupture. Clin Orthop Relat Res. 466:1577–1582.
- 39.Pugliese LS, Medrado AP, Reis SR, Andrade ZA (2003) The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. Pesqui. Odontol. Bras.17(4):307-313.
- 40. Amiel D, Akeson W, Harwood FL, et al. (1983) Stress deprivation effect on metabolic turnover of medial collateral ligament collagen: a comparison between nine- and 12-week immobilization. Clin Orthop. 172:265-270.

- 41.Aro AA, Vidal BC, Biancalana A, Tolentino FT, Gomes L, Mattiello SM, Pimentel ER (2012) Analysis of the deep digital flexor tendon in rats submitted to stretching after immobilization. Connective Tissue Research 53(1):29-38 A.
- 42. Vieira CP, de Aro AA, de Almeida Mdos S, de Mello GC, Antunes E, Rosa Pimentel E (2012) Effects of Acute Inflammation Induced in the Rat Paw on the Deep Digital Flexor Tendon. Connect Tissue Res. 53(2):160-8.
- 43.Oakes BW (2003) Tissue healing and repairs: tendons and ligaments. In: Frontera WR, editor. Rehabilitation of Sports Injuries: Scientific basis. Boston: Blackwell Science 56-98, 2003.
- 44.Sharma P, Maffulli N (2006) Biology of tendon injury: healing, modeling and remodeling. J. Musculoskelet. Neuronal Interact. 6(2):181-190.
- 45. Salate, ACB, Barbosa, G, Gaspar, P, et al. (2005) Effect of In-Ga-Al-P diode laser irradiation on angiogenesis in partial ruptures of Achilles tendon in rats. Photmed Laser Surg. 23 (5):470–475.

9. MANUSCRITO 2

Publicado na

LASERS IN MEDICAL SCIENCE

PULSED LLLT IMPROVES TENDON HEALING IN RATS: A BIOCHEMICAL, ORGANIZATIONAL AND FUNCTIONAL EVALUATION.

Flávia Da Ré Guerra¹; Cristiano Pedrozo Vieira¹; Marcos Santos Almeida¹; Letícia

Prado Oliveira¹; Ana Carolina Ferreira Claro¹, Gustavo Ferreira Simões, Alexandre

Leite Rodriguez de Oliveira; Edson Rosa Pimentel¹.

¹ Department of Anatomy, Cell Biology and Physiology and Biophysics Institute of Biology, CP 6109, University of Campinas – UNICAMP 13083-970, Campinas, SP, Brazil.

ABSTRACT

In last decades the tendon injuries have increased substantially. Previous results suggested that low-level laser treatment (LLLT) promote synthesis of extracellular matrix and improve the functional properties of the tendon. The aim of this study was to evaluate the effects of different protocols of LLLT on partially tenotomized tendons. Adult male rats were divided into: G1 - intact; G2 - injured; G3 - injured + LLLT (4 J/cm² continuous); G4 - injured + LLLT (4 J/cm² at 20 Hz). G2, G3 and G4 were euthanized 8 days after injury. G5 – injured; G6 – injured + LLLT (4 J/cm²) continuous); and G7 - injured + LLL (4 J/cm² at 20 Hz until the 7th day, and 2 kHz from 8-14 days). G5, G6 and G7 were euthanized on the 15th day. Glycosaminoglycan (GAG) was guantified by dimethylmethylene blue method and analyzed on agarose gel. Toluidine blue (TB) stain was used to observe metachromasy. Collagen organization was analyzed by polarization microscopy. CatWalk system was used to evaluate gait recovery. The GAG level increased in all transected groups, except G5. In G6 and G7 there was a significant increase in GAG in relation to G5. In G3 and G4 the presence of dermatan sulfate band was more prominent than G2. TB stains showed intense metachromasy in the treated groups. Birefringence analysis showed improvement in collagen organization in G7. The gait was significantly improved in G7. In conclusion, pulsed LLLT leads to increased organization of collagen bundles and improved gait recovery.

Key words: Achilles tendon, gait analysis, rehabilitation programs, soft tissue injuries.

INTRODUCTION

Among tendons in the lower extremities, the Achilles tendon is most commonly injured by athletes, and it has been described as the tendon most likely to rupture spontaneously. [1] This tendon is subjected to extensive static and dynamic loads, and it can be subjected to loads up to 10 times body weight in certain athletic activities. [2, 3, 4] Studies have shown that 44% of ruptures occurred during athletic activities. [5] In the general population, factors such as age, sex, obesity or the presence of diseases such as diabetes and rheumatoid arthritis appear to be involved in injuries of the Achilles tendon. [6]

Tendon healing is a slow and complex process because of the high level of organization of the components in its extracellular matrix (ECM), and it is aggravated by poor vascularization.[3,4] Collagen is the most abundant protein in tendons. Type I collagen provides tensile stiffness to the tissue, and type III is distributed among collagen I bundles. Both are fibril-forming collagens with the ability to assemble into highly orientated supramolecular aggregates that are responsible for the properties of the tissue. [7, 8, 9]

In the tendon-healing process of rats, there are several events that can be divided into distinct but overlapping phases: an inflammatory phase, which extends from 1–7 days after injury; a proliferative phase, which begins around day 8 and extends up to 14 days; and a remodeling phase, which begins around day 14 and reaches its peak around day 21. [3,4,10] Tendon lesions remain a clinical issue because the injury site becomes a region with a high incidence of recurrent rupture and have drawn the attention of researchers. [10, 11]

In a typical rehabilitation protocol after a tendon injury, immobilization is performed to protect the injured tissue and prevent another possible rupture. However, prolonged periods of immobilization can cause damage, such as muscular atrophy, osteoarthritis, tendinocutaneous adhesion and infections. [9, 12, 13] Thus, if the duration of healing process could be decreased, complications could be reduced. [14]

Low-level laser therapy (LLLT) has attracted considerable attention because of its success in tissue repair and its broad spectrum of applications, but there is controversy about specific protocols. [12, 14, 15, 16, 17] Previous studies in our laboratory exposed rats with partial tenotomy of the Achilles tendon to different LLLT protocols. The results showed for the first time that the pulsed frequency accelerated the repair process through the increased activation of MMP-2 and -9 which were responsible for the replacement of degraded collagen for intact collagen I that only 15 days after injury equaled the normal tendon. [18]

Several studies have shown that after injury, the morphological, biochemical and functional properties of the tendon are never again identical to normal tissue. [19, 20, 21] Knowing that collagen I is the main responsible for the mechanical properties of the tissue, our previous results were promising and suggested that LLLT may improve the collagen organization and the functional properties of the tendon. Therefore, this study aimed to analyze the effects of different LLLT protocols in the early phases of wound healing after tendon transection to determine the most appropriate postoperative protocol for tendon repair.

MATERIALS AND METHODS

Animal care was in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes and is consistent with the ethical principles of animal experimentation adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA); the protocol was approved by the Ethics Committee on Animal Experiments of the State University of Campinas, SP, Brazil (nº 1921-2).

Experimental Groups

In this study, 105 male Wistar/Uni rats with a mean age of 60 days and weight ranging from 300–350 g were used. The rats were housed two per cage in a 12 h light:dark cycle at 23°C, with free access to standard rat chow and water. The animals were analyzed in the inflammatory and proliferative phases and were divided into seven groups: G1 – intact; G2 – injured; G3 – injured + LLLT (4 J/cm² continuous); G4 – injured + LLLT (4 J/cm² – 20 Hz); G5 – injured; G6 – injured + LLLT (4 J/cm² continuous); and G7 – injured + LLLT (4 J/cm² – 20 Hz until the 7th day and 2 kHz from 8–14 days). G2, G3 and G4 were euthanized on day 8 after injury, and G5, G6 and G7 were euthanized on day 15.

Procedures for partial transection of the tendon

The animals were anesthetized with intraperitoneal injection of ketamine (90 mg/kg) and xylazine (12 mg/kg). After removing the skin, a transverse partial transection was performed in the tension region of the Achilles tendon, located at an approximate distance of 3 mm from the tendon insertion into the calcaneous bone. [18, 22, 23]

Laser Therapy

The laser equipment used was a low intensity GaAlAs laser (830 nm wavelength), programmed according to Brazilian medical equipment standards (NBR 60601-1, NBR IEC 60601-2-22 e IEC 825-1) at 40 mW of power. The animals were immobilized with containment equipment, [24] and received a punctual application of 4 J/cm², once a day. The frequency and intensity of light varied according to the experimental group. Treatment with LLLT began the day after surgery and lasted until the day before euthanasia, that way, the groups euthanized 15 days after surgery received 13 applications, and the groups euthanized 8 days after surgery received 6 applications. Each session of the continuous group last 16 seconds with a light intensity of 0.25 W/cm²; and in the pulsed group 32 seconds with a light intensity

of 0.125 W/cm². After the last session, the animals were euthanized with deepening of anesthesia for the removal of the Achilles tendon. [18]

Agarose Gel Electrophoresis

The fragments of the tendons were dehydrated, and sulfated glycosaminoglycans (GAGs) were released from proteoglycans by digestion with a papain solution (Merck) (40 mg/g of dry tissue) containing 100 mM sodium phosphate buffer, pH 6.5, 40 mM EDTA, and 80 mM β -mercaptoethanol (Sigma). The GAGs were separated by agarose gel electrophoresis (0.6%) in 0.05 M propylenediamine (PDA) (Sigma). [25]

Quantification of Sulfated Glycosaminoglycans

The content of GAGs was determined by the dimethylmethylene blue method, [26] using chondroitin sulfate as standard. The absorbance was measured at and 540 nm.

Morphological and Birefringence analysis and measurements

The tendons were fixed using a 4% formaldehyde solution in Millonig's buffer (0.13 M sodium phosphate, 0.1 M NaOH–pH 7.4) for 24 h at 4° C and washed in water, ethanol dehydrated, diaphanized with xylene and paraffinembedded. Longitudinal serial sections of 7 μ m were stained with hematoxylin–eosin (HE) and toluidine blue (TB) and analyzed under an Olympus BX 60 light microscope.

Birefringence properties were studied using an Olympus BX51-P BX2 polarizing microscope and an image analyzer (Image-Pro Plus 6.3, Media Cybernetics, Inc.—Silver Spring, MD, USA.

Since birefringence appears visually as brilliance, this phenomenon was measured with the image analyzer and expressed as gray average (GA) values in pixels, after its calibration (8 bits=1 pixel). The major tendon axis was positioned at 45° to the crossed analyzer and polarizer during the measurements. Considering that collagen bundles exhibit two kinds of birefringences: intrinsic birefringence (Bi) and form or textural birefringence (Bf), [27, 28] total birefringence (sum of Bi and Bf) was used in this study. The measurements of the transected region of the tendons in each experimental group were made after immersing the sections in water. [27, 28]

Evaluation of the maximum contact intensity of the rat paw after partial transection

The CatWalk system (Noldus Inc., The Netherlands) was used to analyze the gait recovery of the animals. In this protocol, the rats crossed a walkway (100 cm length _ 15 cm width _ 0.6 cm thickness) with a glass floor illuminated from the long edge in a dark room. Data acquisition was performed with a high-speed camera (Pulnix TM-765E CCD), and the paw prints were automatically classified by the software. The paw prints were obtained during the 2 days before the partial transection of the tendons to assess the normal standard gait of the animals, and they were collected again after the lesions. [22]

Post-operative data were assessed on the 2nd, 4th and 6th days following surgical lesion for the groups that were sacrificed 8 days after surgery; and on the 2nd, 4th, 6th, 8th, 10th, 12th and 14th days following surgical lesion for the groups that were sacrificed 15 days after surgery. The parameters used were "Max Contact Intensity", corresponding to the pressure exerted by the paw on the glass floor during gait. The intensity of magnification can vary from 0 to 255 pixels.

Statistical analyses

All results were expressed as the mean \pm standard deviation. For biochemical analysis, data from different experimental groups were analyzed by analysis of variance (one-way ANOVA) followed by the Tukey test. For the max contact intensity of the rat paw the Two-way ANOVA was performed. The level of significance was p <0.05. The Mann–Whitney test was used only for analysis of the birefringence measurements.

The analysis was carried out in GraphPad Prism® 3.0 program (Graph-Pad Software, La Jolla, CA,USA), version 3.0.

RESULTS

The GAG levels (Figure 1) in all groups except G5 (4.12 \pm 0.99) were increased over the G1 levels (1.94 \pm 0.58). Groups G6 (8.98 \pm 1.46) and G7 (6.663 \pm 0.89) showed higher GAG values than G1 and G5.

Analysis of GAG by agarose gel electrophoresis (Figure 2A and B) showed only the presence of dermatan sulfate (DS), which is characteristic of the tension region of the tendon. The tenotomized groups showed a higher DS content than the control group G1. However, G4 and G7 showed an apparent decrease in DS content when compared to G3 and G6.

Overall, the hematoxylin and eosin (HE)-stained sections showed marked differences between the different time periods analyzed (data not shown). We observed high cellularity in the repair region of the transected tendons, with total disorganization of the matrix in all groups. In the 14-day groups, cellularity was also high, and the ECM was in the process of remodeling; it showed greater matrix orientation than at 7 days post-injury, although there were no differences between the groups, which is consistent with data reported in the literature.

TB staining (Figure 3) was observed in all tenotomized groups but especially in the groups euthanized 15 days after transection, which showed an intense metachromasy indicating a high level of glycosaminoglycans.

When tendons are observed in a polarizing microscope, a normal tendon displays high gloss, a characteristic of a highly organized tissue. With transection, the fibers lose their organization and appear darker when observed under a polarizing microscope. The groups euthanized 8 days after transection (G2, G3 and G4) were highly disorganized. It was observed that G7 displayed greater organization than the other groups euthanized after the same period (Figure 4).

From the images captured of the groups euthanized at 15 days after transection, birefringence measurements were performed as a way to evaluate the organization of the tissue compared to healthy tissue (Figure 4). Table 1 shows the results of these measurements.

All groups were significantly different when compared with each other. G6 showed lower values than G5, indicating that its fibers were highly disorganized. In contrast, G7 was more organized than G5 and G6, but none of the injured groups reached a value approximating that of the normal group (G1).

Our results obtained with the CatWalk system showed a positive functional response to pulsed LLLT. G4 and G7 showed higher values, corresponding to the maximum intensity of paw contact (pixels) on the platform during walking, than G2,

G3, G5 and G6; moreover, G4 and G7 showed values close to the tendons without transection. In contrast, G3 and G6 showed significantly lower values when compared to other groups (Figure 5A and B). Among the 15-day groups, G7 displayed better results, especially in the first (inflammatory) phase of the injury. However, in the second (proliferative) phase, the results in all groups were similar to samples collected prior to surgery (Figure 5B).

DISCUSSION

Based on promising results reported in the literature, including less pain and inflammation, increased cell proliferation and synthesis of ECM components, stimulated biochemical reactions, [12, 13, 14, 16] increased MMP activity and collagen synthesis, [18, 29] we subjected animals with partial tenotomy of the Achilles tendon to different LLLT protocols. The animals were then evaluated 8 and 15 days after injury to analyze the effects of laser treatment on the inflammatory and proliferative phases of injury.

GAG analysis revealed that all groups euthanized 8 days after injury had a significant increase in GAG content when compared to G1. These results corroborate previous studies [30, 31] reporting increased GAG content after tendon injury. Increased GAG is observed in tissues that are undergoing a healing process. It was also observed, though not with statistical significance, that the GAG values of the continuous group were higher than in G2 and G4. These results were also confirmed by TB stain analysis.

At 15 days, GAG analysis revealed that G5 had similar GAG values to G1, while GAG levels in G6 and G7 were significantly higher than in G1 and G5. These results suggest that LLLT increased synthesis of this component of the tendon.

Analysis of GAG by agarose gel electrophoresis showed only the presence of DS, which is characteristic of the tension region. [32, 33] The tenotomized groups clearly had a higher DS content than the control group G1. Previous studies [30, 34] have demonstrated that DS content increases after tendon injury, especially in the inflammatory phase, indicating the involvement of sulfated glycosaminoglycan in deposition and fibrillogenesis of collagen in tendon repair. [35] G3 showed a more pronounced band than the other groups, indicating that in this case, the laser promoted increased DS content.

The strongest DS bands in comparison to G1 were observed in the 15-day tenotomized groups. G7 showed an apparent reduction in DS when compared to G5 and G6, indicating that at 15 days the synthesis of GAG is no longer occurring in this group.

Unlike collagen, GAG represents a small portion of the ECM of tendons, but it is essential for the regeneration of this tissue. GAGs are attached to a protein core to form proteoglycans, which play an important role in cell migration and differentiation in addition to their regulatory role in collagen fibrillogenesis. [36, 37]

Previous studies from our laboratory demonstrated that LLLT stimulates the synthesis of collagen I. We also showed that, in the inflammatory phase, there were high levels of active MMP-9 and MMP-2; these levels were higher during the proliferative phase in animals treated with pulsed LLLT than in animals that

received continuous LLLT [18], suggesting that pulsed LLLT has a more potent effect on the process of tendon remodeling. [18, 22]

Birefringence analysis revealed that the groups analyzed 8 days after injury had highly disorganized tissue. This result is consistent with expectations, as it marks the end of the inflammatory phase and the beginning of angiogenesis, stimulation of tenocite proliferation and recruitment of inflammatory cells. At this time, type III collagen synthesis is initiated, but neither collagen I synthesis nor collagen organization has yet occurred. [11, 38] At 15 days, the birefringence measurements revealed that the groups had not recovered their organization. However, G7 proved to be significantly more organized than G5 and G6. These results are in agreement with our preliminary findings with respect to collagen I and III and the high activity of MMP-2 and -9, [18] and are consistent with the higher GAG concentration observed in this group.

The results of functional analysis showed that, after surgery, G4 had a higher value (corresponding to the maximum intensity of paw contact on the platform) than other groups. This result indicates greater pressure from the paw of the animal during walking, and G4 displayed values close to non-transected animals. In contrast, G3 showed the lowest value. The groups treated for 15 days were also subjected to the CatWalk analysis during walking. Again, the results of the first phase of the lesion were more dramatic, showing that G7 was significantly better than the other groups. After the inflammatory phase of injury, animals showed a slight improvement; on the last day of data collection, the results were very similar to results obtained before surgery. This result suggests that the pulsed

LLLT was effective, especially in the acute phase of healing, in recovering the animals' gait after tendon injury.

Increased production of inflammatory mediators leads to pain and swelling, [39] hindering talocrural articulation and paw support during gait after injury. We believe that the functional result for the pulsed LLLT group, in which animals more strongly supported the injured paw during gait, may indicate that pain severity was decreased through modulation of the inflammatory process [40,41]. Recent studies show that the laser in pulsed frequency is capable of inducing metabolic processes through a mechanism called light-cell pump. [42] Through this mechanism, there is an increase in the pumping of water and other molecules from the intracellular space to the outside. Among these molecules it is possible that some proteins of the ECM and anti-inflammatory cytokines are present. This may be especially true in the acute healing phase, in which there is a high level of inflammation. In contrast, the continuous LLLT was not able to modulate the inflammatory response in tissue, with consequent persistence of possible adverse effects such as pain and edema.

Several studies have shown that the morphological and functional properties of a tendon after injury will never reach to those of normal tissue. This loss may be caused by long-term immobilization [11, 20] resulting in the absence of mechanical load. [9, 12, 13] With reduced pain and discomfort, the animals could move the injured joint and support the paw during gait, [22] which may have aided collagen organization and enabled faster recovery, thereby reducing the effects of long-term immobilization. Furthermore, our results suggest that during the application of LLLT, energy density should not be the only parameter taken into consideration. By altering the frequency parameters and thereby modulating the energy that is transmitted to the tissue, we obtained different results for different treatment groups, as previously demonstrated for other parameters. [18]

In conclusion, we believe that this protocol can be adapted for use in rehabilitation as a way to reduce the immobilization period, accelerate repair and enhance the functional characteristics of the tendon, allowing better recovery and healing for patients who have suffered tendon rupture and reducing the recurrence of injury.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank FAPESP for the financial support (2010/52383-2). F.D. Guerra was the recipient of a CNPq fellowship. We also thank Francisco A. Malatesta for his expert technical assistance and IBRAMED for the LLL equipment.

DECLARATION OF INTEREST

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

- 1 Kongsgaard M, Aagaard P, Kjaer M, et al. (2005) Structural Achilles tendon properties in athletes subjected to different exercise modes and in Achilles tendon ruptures. J Appl Physiol 99:1965-71.
- 2 Thompson J, Baravarian B (2011) Acute and chronic Achilles tendon ruptures in athletes. Clin Podiatr Med Surg 28:117-135.
- 3 Maffulli N, Wong J, Almekinders LC (2003) Types and epidemiology of tendinopathy. Clin Sports Med 22:675–92.
- 4 Mafulli N (1999) Current concepts review: rupture of the Achilles tendon. J Bone Joint Surg Am 81(7):1019–36.
- 5 Postacchini F, Puddu G (1976) Subcutaneous ruptures of the achilles tendon. Int Surg 4:145-50
- 6 Szaro P, Witkowski G, Smigielski R, et al. (2009) Fascicles of the adult human Achilles tendon An anatomical study. Ann Anat 191: 586-593.
- 7 Silver FH, Horvath I, Foran DJ (2002) Mechanical implications of the domain structure of fibril forming collagens: comparison of the molecular and fibrillar flexibilities of the a-chains found in types I, II, and III collagen. Journal of Theoretical Biology 216:243–54. 9.
- 8 Gelse K, Poschl E, Aigner T (2003) Collagens—structure, function, and biosynthesis. Advanced Drug Delivery Reviews 55:1531–46.
- 9 Wren TA, Yerby SA, Beaupré GS et al. (2001) Mechanical properties of the human Achilles tendon. Clin Biomech (Bristol. Avon.) 16 (3):245-251.
- 10 Murphy PG, Loitz BJ, Frank CB et al. (1994) Influence of exogenous growth factors on the synthesis and secretion of collagen types I and III by explants of normal and healing rabbit ligaments. Biochemistry and Cell Biology 72:403–9.
- 11 Sharma P, Maffulli N (2005) Tendon injury and tendinopathy: healing and repair. The Journal of Bone and Joint Surgery 87:187–202.
- 12 Chen CH, Tsai LL, Wang YH, et al. (2009) Low-level laser irradiation promotes cell proliferation and mRNA expression of type I collagen and decorin in porcine Achilles tendon fibroblasts *in vitro*. J of Orthopaedic Research 27:646-650.

- 13 Demir H, Menku P, Kirnap M (2004) Comparison of the Effects of Laser, Ultrasound, and Combined Laser + Ultrasound Treatments in Experimental Tendon Healing. Lasers in Surgery and Medicine 35:84–89.
- 14 Chan HKF, Fung DT, Ng GY (2007) Effects of low-voltage microamperage stimulation on tendon healing in rats. J Orthop Sports Phys Ther 37(7):399–403.
- 15 Oliveira FS, Pinfild CE, Parizoto NA, et al. (2009) Effect of low level laser therapy (830 nm) with different therapy regimes on the processo f tissue repair in partial lesion calcaneous tendon. Lasers in Surgery and Medicine 41:271-276.
- 16 Salate ACB, Barbosa G, Gaspar P, et al. (2005) Effect of In-Ga-Al-P diode laser irradiation on angiogenesis in partial ruptures of Achilles tendon in rats. Photmed Laser Surg 23 (5):470–475.
- 17 Pugliese LS, Medrado AP, Reis SR et al. (2003) The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. Pesqui Odontol Bras 17(4):307-313.
- 18 Guerra FD, Vieira CP, Almeida MS, et al. (2012) LLLT improves tendon healing through increase of MMP activity and collagen synthesis. Lasers in Medical Science. doi: 10.1007/s10103-012-1236-7
- 19 Jarvinen TA, Kannus P, Mafulli N et al. (2005) Achilles tendon disorders: etiology and epidemiology. Foot Ankle Clin 10(2):255-266.
- 20 Sharma P, Maffulli N (2006) Biology of tendon injury: healing, modeling and remodeling. J. Musculoskelet. Neuronal Interact 6(2):181-190.
- 21 Salate ACB, Barbosa G, Gaspar P, et al. (2005) Effect of In-Ga-Al-P diode laser irradiation on angiogenesis in partial ruptures of Achilles tendon in rats. Photmed Laser Surg 23 (5):470–475.
- 22 Aro AA, Simões GF, Esquisato MAM, et al. (2012) Arrabidaea chica extract improves gait recovery and changes collagen content during healing of the Achilles tendon. Injury. doi: 10.1016/j.injury.2012.08.055.
- 23 Almeida MS, Aro AA, Guerra FD, et al. (2012) Electroacupuncture Increases the Concentration and Organization of Collagen in a Tendon Healing Model in Rats. Connective Tissue Research (Print) 53 (6):542-547.

- 24 Request Privilege of Utility Model in Brazil, titled: Retainer of Rats For Laser Beam And Biocompounds Application, deposited in National Institute Of Industrial Property – INPI, on 04.16.10, under n° MU9000622-4, authored by researchers Andrea Aparecida de Aro and Edson Rosa Pimentel, from Institute of Biology, UNICAMP.
- 25 Dietrich CP, Dietrich SMC (1976) Eletrophoretic behavior of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. Anal Biochem 70:645-647.
- 26 Farndale RW, Buttle DJ, Barrett AJ (1986) Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. Biochimica ET Biophysica Acta 883:173-177.
- 27 Vidal BC, Mello MLS (2010) Optical anisotropy of collagen fibers of rat calcaneal tendons: an approach to spatially resolved supramolecular organization. Acta Histochem 112:53–61.
- 28 Vidal BC, Volpe PLO (2005) Differental scanning calorimetry and optical properties of collagen-dichroic azo Ponceau SS Complexes. Braz J Morphol Sci 22(3):49-153.
- 29 Yamaguchi M, Hayashi M, Fujita S, et al. (2010) Low-energy laser irradiation facilitates de velocity of tooth movement and the expressions of matrix metalloproteinase-9, cathepsin k and alpha (v), beta (3) integrin in rats. European Journal of Orthodontics 32:131-139.
- 30 Reid T, Flint H (1974) Changes in glycosaminoglycans content of healing rabbit tendon. J. Embryol. Exp. Morph. 1974;31(2):489-495.
- 31 Oakes BW (2003) Tissue healing and repairs: tendons and ligaments. In: Frontera WR, editor. Rehabilitation of Sports Injuries: Scientific basis. Boston: Blackwell Science 56-98.
- 32 Vogel KG, Koob TJ 1989 Structural specialization in tendons under compression. Int Rev Cytol 115:267-93.
- 33 Bosman F, Stamenkovic I (2003) Functional structure and composition of the extracellular Matrix. J. of Pathology 200:423-428.
- 34 Bosch U, Gassler N, Decker B (1998) Alterations on glycosaminoglycans during patellar tendon autograft healing after posterior cruciate ligament replacement. The American Journal of Sports Medicine 26(1):103-108.

- 35 Karousou E, Vigetti D, Maffulli N (2008) Collagens, Proteoglycans, MMP-2, MMP-9 and TIMPs in Human Achilles Tendon Rupture. Clin Orthop Relat Res 466:1577–1582.
- 36 Tanaka E, Eijden TV (2003) Biomechanical behavior of the temporomandibular joint disc. Crit Rev Oral Biol Med 14(2):138-150.
- 37 Comper WD (1996) Extracellular Matrix: Molecular Components and Interactions. 1ed. Harwood Academic Publishers 2:200-229.
- 38 Enwemeka CS (1991) Connective tissue plasticity: Ultrastructural, biomechanica, and morphometric effects of physical factors on intact and regenerating tendons. J Orthop Sports Phys Ther 14:198-212.
- 39 Seibert K, Zhang Y, Leahy K, et al. (1994) Pharmaco-logical and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 91:12013–7.
- 40 Chen M, Chun C, Meijuan Y, et al. (2008) Involvement of CAPON and Nitric Oxide Synthases in rat muscle regeneration after peripheral nerve injury. J. Mol. Neurosci 34:89-100.
- 41 Enwemeka CS, Reddy GK (2000) The biological effects of laser therapy and other modalities on connective tissue repair processes. Laser Therapy 12:22–30.
- 42 Sommer AP, Zhu D, Mester AR, Försterling HD (2011) Pulsed Laser Light Forces Cancer Cells to Absorb Anticancer Drugs – The Role of Water in Nanomedicine. Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology 39:169-173.

FIGURES AND TABLES



Figure 1: A: Concentration of sulfated glycosaminoglycans (mg/g of dry tissue) in the different groups. (*) indicates significant difference in relation to G1; and (#) indicates significant difference in relation to G5.



Figure 2: Agarose gel electrophoresis. Standarts are in the right: Heparan sulfate (HS), Dermatan sulfate (DS) e Chondroitin sulfate (CS). A: groups euthanized at 8 days after lesion. B: groups euthanized at 15 days after lesion. Observe the presence of DS in all analized groups, which showed a more intense band in the transected groups. Pulsed groups (G4 and G7) presents a less marked band when compared to the other transected groups. Arrow indicates the direction of electrophoretic race.



Figure 3: Toluidine blue (TB) stained sections. Where: A: G1, B:G2, C:G3, D:G4, E:G5, F:G6, G:G7. Observe the bigger number of cells and intense metachromasy in the transected groups., specially in the groups euthanazied on 15 th day after lesion.Bar: 20 μ m.



Figure 4: Longitudinal sections of the tendons from the different groups observed by polarization microscopy. Analysis of birefringence where the longest tendon axis are positioned 45° in relation to the polarizators. Where: A: G1, B:G2, C:G3, D:G4, E:G5, F:G6, G:G7. Observe the biggest glow in G1 when compared to the other groups. In 4C, arrow indicates the portion of tissue around the transected region. (*) indicates the presence of crimps. Observe in 15 G that the area is apperently more organized when compared to the other transected groups. Bar: 40 μ m.



Figure 5: Maximum Contact Intensity during gait of the rats obtained by the catwalk system. (A) Measurements performed on animals 8 days after injury. Observe the higher values (p< 0.05) of paw pressure during the gate of the animals in group G4 when compared to G2 and in special G3 (*). Measurements were made on the 2nd, 4th and 6th days after injury. (B) Measurements performed on animals 15 days after injury. The G7 group had a higher values when compared to G5 and in special G6 (*). Observe that the differences between the groups are concentrated in the first phase of treatment, in agreement with the analysis of the groups euthanized at 8 days after transection. With the end of the inflammatory phase the results become more similar. Measurements were made on the 2nd, 4th, 6th, 8th, 10th and 12th days after injury.
Table 1

The largest axis of the tendon was positioned at 45^o with respect to the crossed polarizers. The number of measurements (100) chosen at random in 12 sections from four tendons of each group.

Groups	TR	Comparisons	Mann-Whitney Test
	(GA Median)		(p)
G1	210,10	*	
G5	68,37	G5 x G6*	0,0001
G6	14,39	G5 x G7*	0,0001
G7	72,55	G6 x G7*	0,0001

TR: Transection Region. GA: Gray Average.

10. CONCLUSÕES

10.1. CONCLUSÕES GERAIS

Primeiramente concluímos que a densidade de energia não deve ser o único parâmetro levado em consideração. O LBP na frequência pulsada apresentou os melhores resultados dentre os grupos comparados. Em comparação, o LBP contínuo apresentou os piores resultados em alguns parâmetros avaliados, mesmo comparado ao grupo que não passou por tratamento. Deve-se ter cautela ao escolher os parâmetros de regulação durante a terapia com o LBP, visto que ao modularmos a maneira de entrega de energia ao tecido obtivemos resultados muito diferentes entre os protocolos utilizados.

Acreditamos que o protocolo de tratamento com o laser pulsado deve ser o escolhido para o uso em clínicas de reabilitação de maneira a acelerar o reparo e melhorar as características funcionais deste tendão.

10.2. CONCLUSÕES ESPECÍFICAS:

 O LBP contínuo e pulsado tem efeitos diferentes sobre o processo de reparo do tendão. O laser pulsado foi capaz de modular o processo inflamatório por meio das MMPs, melhorar o apoio da pata, aumentar a Além disso, observou-se que o LBP, em especial o contínuo estimulou a síntese de glicosaminoglicanos não sulfatados.

11. ANEXO 1

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha Tese de Doutorado intitulada "Efeito De Diferentes Protocolos De Laser De Baixa Potência Sobre A Cicatrização Do Tendão Calcanear De Ratos Após Transecção Parcial":

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

CIBio - Comissão Interna de Biossegurança , projeto nº ______, Instituição:

(X) CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto nº __1921-2____, Instituição: Universidade Estadual de Campinas_____

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo nº _____, Instituição:

* Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.

Aluna: Flávia Da Ré Guerra Opentador: Edson Rosa Pimentel

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente: (X) Deferido () Indeferido

anceld

Carimbo e assinatura

Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO Presidente da CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente: () Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura