

MICHELINE OZANA DA SILVA

**EFEITOS DA LASERTERAPIA DE BAIXA POTÊNCIA
ASSOCIADA OU NÃO A EXERCÍCIO EXCÊNTRICO NO
TRATAMENTO DE TENDINOPATIA INDUZIDA DO TENDÃO
CALCANEAR COMUM DE RATOS
(*RATTUS NORVEGICUS*)**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-graduação em
Medicina Veterinária, para obtenção
do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL

2013

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S586e
2013
Silva, Micheline Ozana da, 1975-
Efeitos da laserterapia de baixa potência associada ou não a
exercício excêntrico no tratamento de tendinopatia induzida do
tendão calcâneo comum de ratos (*Rattus Norvegicus*) /
Micheline Ozana da Silva. – Viçosa, MG, 2013.
xiii, 128f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Maria Verônica de Souza.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Exercícios físicos. 2. Tendinopatia. 3. Terapia a laser. 4.
Rattus Norvegicus. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Veterinária. Programa de Pós-graduação em
Medicina Veterinária. II. Título.

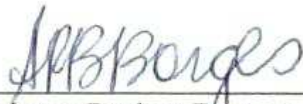
CDD 22. ed. 612.76

MICHELINE OZANA DA SILVA

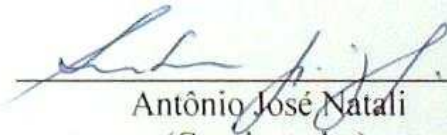
**EFEITOS DA LASERTERAPIA DE BAIXA POTÊNCIA ASSOCIADA OU NÃO
A EXERCÍCIO EXCÊNTRICO NO TRATAMENTO DE TENDINOPATIA
INDUZIDA DO TENDÃO CALCANEAR COMUM DE
RATOS (*RATTUS NORVEGICUS*)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

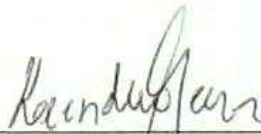
APROVADA: 28 de novembro de 2013.




Andrea Pacheco Batista Borges
(Coorientadora)



Antônio José Natali
(Coorientador)



Leandro Maia



Maria Verônica de Souza
(Orientadora)

MICHELINE OZANA DA SILVA

**EFEITOS DA LASERTERAPIA DE BAIXA POTÊNCIA
ASSOCIADA OU NÃO A EXERCÍCIO EXCÊNTRICO NO
TRATAMENTO DE TENDINOPATIA INDUZIDA DO TENDÃO
CALCANEAR COMUM DE RATOS
(*RATTUS NORVEGICUS*)**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-graduação em
Medicina Veterinária, para obtenção
do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2013

À minha família, especialmente minhas filhas e meu marido, pela confiança, paciência e amor, em mais essa etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas.

À minha orientadora, professora *Maria Verônica de Souza*, pela paciência, dedicação, compreensão e ensinamento.

A Ricardo, Maria Julia e Maria Cecilia por acreditar em mim em todos os momentos.

A Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade em ampliar meus conhecimentos.

Aos professores do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, que contribuíram para minha formação acadêmico-profissional e me auxiliaram, direta ou indiretamente, durante a realização da pesquisa.

Aos professores (a) *Antonio José Natali, Andréa Pacheco Batista Borges e Leandro Maia* pela colaboração.

Ao colega da Pós-graduação *Raul Felipe Dornas*, a bolsista, *Marcela M. Bueno da Costa* e aos estagiários *Alexandre D. Costa, Weberson Viana de Paula e Erika H. Takahashi*, pela ajuda durante as atividades relacionadas com o experimento.

Aos funcionários do Departamento de Veterinária pela ajuda e atenção.

Aos Laboratórios de Embalagens, de Associações Micorrízicas e de Biologia do Exercício (Bioex) da Universidade Federal de Viçosa, pela colaboração durante a realização do experimento.

Ao *Dr. José do Carmo*, pelo ensinamento e disponibilização do laboratório Prevent para a realização dos procedimentos histológicos.

Ao *Adão* técnico do Biotério Central da UFV, pela disponibilização dos animais.

A *Silvana Lage Ribeiro Garcia* pela ajuda e amizade durante essa etapa.

A Capes, pela concessão de bolsa de mestrado, e ao Cnpq pelo financiamento do projeto de pesquisa.

Sem a ajuda de vocês eu não conseguiria chegar até aqui! Muito obrigada a todos!

BIOGRAFIA

MICHELINE OZANA DA SILVA, filha de Agenor José da Silva e Senhorinha Ozana da Silva, nasceu em 01 de novembro de 1975, em Recife, PE.

Em Julho de 2010, graduou-se em Fisioterapia pela Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde – Univiçosa, em Viçosa, MG. Em agosto de 2011, ingressou no Mestrado em Medicina Veterinária, concentrando seus estudos na Área de Clínica Médica e Cirurgia de Equídeos, incluída na linha de pesquisa intitulada Biotecnologia, Diagnóstico e Controle de Doenças dos Animais.

SUMÁRIO

RESUMO	xiii
ABSTRACT	xi
INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO I. Laserterapia em problemas locomotores: revisão sistemática	3
Resumo	3
Abstract	4
Introdução	5
Metodologia	7
Resultados	8
Discussão	13
Laserterapia em lesão tendínea	13
Laserterapia em lesão muscular	15
Laserterapia em lesão óssea e/ou articular	19
Dose de energia e comprimento de onda	19
Considerações finais	20
Conflitos de interesse	21
Referências	21
Resumo das normas para publicação no periódico Revista de Saúde Pública	29
CAPÍTULO II. Indução de tendinopatia aguda em ratos Wistar: modelo experimental	33
Resumo	33
Abstract	34
Introdução	35
Materiais e métodos	36
Resultados	38
Discussão	40
Conclusão	42
Agradecimentos	42
Referências	42

Resumo das normas para publicação no periódico Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais	47
--	----

CAPÍTULO III. Análise clínica e biomecânica do tendão calcâneo comum de ratos Wistar submetido à laserterapia associada ou não a exercício excêntrico	51
Resumo	51
Abstract	53
Introdução	55
Material e método	56
Indução de tendinopatia	58
Tratamentos	59
Avaliação física	60
Avaliação biomecânica	61
Análise estatística	63
Resultados	64
Discussão	66
Conclusão	74
Agradecimentos	74
Referências	75
CAPÍTULO IV. Análise histomorfométrica do tendão calcâneo comum de ratos Wistar tratado com laserterapia e exercício excêntrico	83
Resumo	83
Abstract	85
Introdução	87
Material e método	88
Indução de tendinopatia	90
Tratamentos	91
Avaliação física	92
Avaliações histológica e morfométrica	92
Análise estatística	94
Resultados	96
Discussão	107

Conclusão	116
Agradecimentos	116
Referências	116
Resumo das normas para publicação no periódico Laser Medical Science	125
CONCLUSÃO GERAL	128

RESUMO

SILVA, Micheline Ozana da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2013. **Efeitos da laserterapia de baixa potência associada ou não a exercício excêntrico no tratamento de tendinopatia induzida do tendão calcâneo comum de Ratos (*Rattus norvegicus*)**. Orientadora: Maria Verônica de Souza. Coorientadores: Antônio José Natali e Andréa Pacheco Batista Borges.

A dissertação foi desenvolvida em dois subprojetos, sendo o primeiro intitulado “Análises clínica e biomecânica do tendão calcâneo comuns de ratos Wistar submetido à laserterapia associada ou não a exercício excêntrico”, e o segundo “Análise histomorfométrica do tendão calcâneo comum de ratos Wistar tratado com laserterapia e exercício excêntrico”. O primeiro subprojeto teve como objetivo avaliar o efeito da terapia com laser de baixa potência associada a exercício excêntrico (caminhada em declive) na tendinopatia do tendão calcâneo comum de ratos Wistar, mediante análises clínica e biomecânica, enquanto no segundo por meio de análises histopatológica e morfométrica. Foram utilizados 63 ratos machos, adultos, que foram distribuídos aleatoriamente nos grupos L (laser), E (exercício excêntrico), LE (laser e exercício excêntrico), R (repouso), CL (tendão contralateral) e S (tendão sadio). Os últimos dois grupos existiram apenas no primeiro subprojeto. Tendinopatia unilateral com lesão induzida foi realizada mediante compressão transversal seguida por escarificações das fibras dos tendões, exceto nos animais do grupo S. Os tratamentos laserterapia (904 nm/3 J/cm²) e/ou exercício excêntrico (caminhada em declive; 12 m/min; 50 min/dia; esteira com 15° de inclinação) iniciaram 24 h após cirurgia e permaneceram por 20 dias. Os animais foram submetidos à avaliação física (sensibilidade dolorosa e exame da capacidade motora) a cada três dias, com eutanásia sendo realizadas 3, 7, 14 e 21 dias após indução de tendinopatia, exceto nos animais submetidos às análises clínica e biomecânica, cujo procedimento foi realizado apenas aos 21 dias. Durante a eutanásia foi realizada avaliação macroscópica do local da lesão e o diâmetro transversal do tendão foi mensurado (analisado apenas no primeiro subprojeto). Na sequência, 18 tendões (provenientes de 15 ratos) foram obtidos e congelados a -20°C até o momento do teste biomecânico, onde foram analisadas as características carga máxima (N), tensão na carga (MPa) e extensão máxima (mm). Para a análise histomorfométrica as seguintes características foram estudadas: hemorragia, aderência tecidual fibrinosa, espessamento do epitendão, organização e quantidade das fibras colágenas e dos vasos sanguíneos, infiltrado inflamatório e fibroblastos, assim como colágenos (tipo I e III) e

organização do tecido conjuntivo. Edema local foi observado nas primeiras 72 h do pós-operatório, mas não foi constatado dor durante exame físico. Não houve aumento no diâmetro transversal dos tendões nem presença de aderência fibrosa na avaliação macroscópica realizada nos ratos do primeiro subprojeto. Entretanto, essa última característica foi observada em um animal deixado em repouso e outro submetido à laserterapia na avaliação realizada com uma semana no segundo subprojeto. Nas análises clínica e biomecânica, o grupo submetido a exercício excêntrico apresentou menor ($p=0,0000$) capacidade de locomoção entre os animais lesionados (incluindo os do grupo em repouso), já no segundo subprojeto foram os ratos mantidos em repouso ($p=0,0008$). Não houve diferença entre grupos, inclusive considerando-se os tendões sadios e contralaterais, nas características biomecânicas carga máxima ($p=0,4379$), tensão na carga ($p=0,4605$) e extensão máxima ($p=0,3820$) avaliadas. Entretanto, foi observado entre os tendões lesionados, que os do grupo LE necessitaram maior carga e tensão para se romperem. Não houve diferença entre grupos nem entre tempos nas características hemorragia, formação de aderência fibrinosa, organização das fibras colágenas e organização do tecido conjuntivo. Considerando os grupos, independentemente do tempo, foi observado que o exercício excêntrico acarretou espessamento do epitendão ($p=0,0204$), que foi menor no grupo submetido à laserterapia. A análise histológica apresentou diferença ($p=0,0032$) na quantidade de células inflamatórias ao longo do tempo, sendo observado em maior quantidade no grupo apenas exercitado. Esse resultado foi confirmado pela análise morfométrica, que demonstrou haver interação significativa (grupos x tempo) nessa característica, onde o exercício excêntrico aumentou ($p=0,0014$) o infiltrado inflamatório ao longo do tempo (3 e 21 dias), porém, quando associado à laserterapia, ocorreu redução da reação inflamatória. Por outro lado, a associação dos tratamentos ocasionou maior angiogênese, nas análises morfométrica ($p=0,0000$) e histológica ($p=0,0006$), quando comparado com os demais grupos, enquanto a aplicação isolada do laser de baixa potência reduziu essa característica ao longo do tempo. Os animais mantidos em repouso foram os que apresentaram menor ($p=0,0000$) quantidade de fibroblastos na análise morfométrica. Já na avaliação histológica, houve interação significativa (grupo x tempo) ($p=0,0024$). Maior quantidade de fibroblastos foi observada nos grupos E, L e LE, nos 7^o, 14^o e 21^o dias, respectivamente. Os animais que receberam laser e foram exercitados apresentaram maior ($p=0,0000$) quantidade de fibras colágenas ao longo do tempo. A utilização do laser de baixa potência na dose de 3 J e comprimento de onda de

904 nm, associada ao exercício excêntrico caminhada em esteira, iniciados 24 h após tendinopatia induzida cirurgicamente em ratos Wistar não resulta em um tendão biomecanicamente tão resistente ou elástico quanto o tendão saudável. Por outro lado, a combinação dos tratamentos possui a vantagem de aumentar a quantidade de fibras colágenas, reduz a aderência fibrinosa e infiltrado inflamatório. Já a aplicação isolada da laserterapia é adequada para angiogênese e para evitar o espessamento do tendão.

Palavras-chave: tendão de Aquiles; análise histomorfometria e biomecânica do tendão, atividade física, terapia a laser.

ABSTRACT

SILVA, Micheline Ozana da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, november 2013. **Effects of low level laser therapy associated or not to eccentric exercise on tendinopathy of the common calcaneal tendon of rats (*Rattus norvegicus*)**. Adviser: Maria Verônica de Souza. Co-advisers: Antônio José Natali and Andréa Pacheco Batista Borges.

This dissertation was carried out in two subprojects, with the first being entitled “Clinical and biomechanical analyzes of the common calcaneal tendon of Wistar rats underwent laser therapy associate or not to eccentric exercise”, and the second “Histomorphometric analysis of the common calcaneal tendon of Wistar rats treated with laser therapy and eccentric exercise”. The first subproject aimed to evaluate the effect of low-level laser therapy associated to eccentric exercise (downhill walking) on tendinopathy of the common calcaneal tendon of Wistar rats, by clinical and biomechanical analyzes, while the second subproject, by means of histopathological and morphometrical analyzes. Sixty-three adult male rats were randomly distributed into the following groups: L (laser), E (eccentric exercise), LE (laser and eccentric exercise), R (rest), CT (contralateral tendon) and H (healthy tendon). The last two groups were present only in the first subproject. Unilateral tendinopathy with induced lesion was done by transversal compression followed by scarification of the tendon fibers, except in animals of group H. The treatments laser therapy (904 nm/3 J/cm²) and, or eccentric exercise (downhill walking; 12 m/min; 50 min/day; 15° inclination treadmill) began 24 h after surgery and remained for 20 days. The animals were submitted to physical evaluation (painful sensitivity and locomotion capacity examination) every three days, with euthanasia performed 3, 7, 14, and 21 days after lesion induction, except in the animals submitted to clinical and biomechanical analyzes, with this procedure being conducted only on day 21. During euthanasia, a macroscopic evaluation of the lesion site was carried out and the transversal diameter of the tendon was measured (analyzed only the first subproject). Sequentially, 18 tendons (from 15 rats) were collected and frozen at -20°C until biomechanical test, on which the characteristics maximum load (N), stress at ultimate tension (MPa) and maximum extension (mm) were analyzed. For the histomorphometric analysis, the following characteristics were studied: hemorrhage, fibrinous tissue adhesions, epitendon thickening, organization and amount of collagen fibers and blood vessels, inflammatory infiltrate and fibroblasts, as well as collagens (type I and III) and connective tissue organization. Local edema was observed on the

first 72 h postoperative, but no pain was detected under physical examination. The macroscopic evaluation performed in the first subproject rats showed no increase in the transversal diameter of the tendons, and no presence of fibrous adhesions. However, this last characteristic was observed in an animal in the rest group, and in another in the laser therapy group, during the one week evaluation in the second subproject. In clinical and biomechanical analyzes, the group submitted to the eccentric exercise presented the lowest ($p=0.0000$) locomotion capacity among the injured animals (including those in the rest group), while in second subproject, such result was presented by the group underwent to rest ($p=0.0008$). No difference occurred between groups, even when considering healthy and collateral tendons, in the evaluated biomechanical characteristics maximum load ($p=0.4379$), stress at ultimate tension ($p=0.4605$) and maximum extension ($p=0.3820$). However, it was observed among injured tendon, that the LE group required greater load and strain to rupture. No difference was found among groups, or between times in the characteristics hemorrhage, formation of fibrinous adhesion, organization of collagen fibers and connective tissue organization. Considering the groups, regardless of time, it was observed that eccentric exercise caused epitendon thickening ($p=0.0204$), which was lower in the group submitted to laser therapy. Histological analysis showed difference ($p=0.0032$) in the number of inflammatory cells along time, being observed in greater amount only in exercised group. This result was confirmed by morphometric analysis, which demonstrated that there was significant interaction (group x time) in this characteristic, where the eccentric exercise increased ($p=0.0014$) the inflammatory infiltrate over time (3 and 21 days), however, when associated with laser therapy, there was reduction the inflammatory reaction. On the other hand, the combination of the treatments led to a greater angiogenesis in morphometric ($p=0.0000$) and histological ($p=0.0006$) analyzes, compared to the other groups, while the application of low-level laser alone reduced this characteristic along time. Animals kept at rest presented the lowest ($p=0.0000$) amount of fibroblasts in morphometric analysis. However, in the histological evaluation significant interaction (group x time) ($p=0.0024$) was observed. Greater amount fibroblast was observed in groups E, L and LE, the 7th, 14th and 21st days, respectively. The animals who received laser and were exercised showed higher ($p=0.0000$) amount of collagen fibers along time. The use of low-level laser at the dose of 3 J and wavelength of 904 nm, associated to walking treadmill eccentric exercise began 24 h after surgically-induced tendinopathy in Wistar rats does not result in biomechanically

tendon as resistant or elastic as a healthy tendon. On the other hand, the combination of treatments shows the advantage of increasing the amount of collagen fibers, reduce fibrinous adhesion and inflammatory infiltrate. However, the application of laser therapy alone is adequate for angiogenesis and tendon thickening prevention.

Keywords: Achilles tendon; histomorphometrical and biomechanical analyzes of tendon, physical activity, therapy with laser.

INTRODUÇÃO GERAL

A tendinopatia é um grave problema de saúde que afeta a população humana, já que algumas profissões oferecem condições para o surgimento da afecção, o que prejudica a realização das atividades relacionadas com a ocupação do indivíduo. Muitas são as publicações que discutem a etiologia, diagnóstico e o tratamento das lesões tendíneas nos humanos e animais, mas poucas são baseadas em evidências científicas. Existe uma ampla quantidade de fármacos utilizados para tratar as diferentes fases do processo de reparação do tendão, mas tradicionalmente são utilizados corticóides ou anti-inflamatórios não esteroidais, com a finalidade de controlar a dor e o processo inflamatório presente na fase aguda. Entretanto, os resultados nem sempre são efetivos ou conclusivos com respeito à eficácia dos diferentes tratamentos disponíveis.

A fisioterapia vem contribuindo ao longo dos anos no tratamento das lesões tendíneas mediante a utilização de técnicas cinésioterapêuticas, como o exercício excêntrico, e de recursos eletrofototerapêutico, como a laserterapia. A terapia com laser de baixa potência vem sendo utilizada na medicina humana e veterinária devido ao seu efeito analgésico e anti-inflamatório, assim como por estimular a angiogênese, a síntese do colágeno e de fatores de crescimento. Entretanto, apesar dos avanços científicos, os resultados com a utilização da laserterapia são contraditórios. Enquanto alguns estudos demonstraram melhora no controle da dor e na reparação tecidual, outros não apresentaram resultados satisfatórios. As possíveis causas dessa variabilidade nos resultados podem estar relacionadas com a dose inadequada da radiação, o número de pontos de aplicação, assim como o intervalo entre as aplicações do laser. A dosagem correta depende do tamanho da área a ser tratada, e da estrutura anatômica, de modo que, ao se calcular a dose de aplicação deve-se considerar a distância entre a pele e o tecido biológico.

O exercício excêntrico vem sendo utilizado desde a década de 80, promovendo importantes alterações na força e massa muscular, atuando no aumento da produção de colágenos, além de promover benefícios na estrutura e resistência do tendão. Nessa modalidade terapêutica, enquanto o músculo é contraído, ocorrem alterações no comprimento e força decorrente da velocidade e carga imposta ao tendão. De acordo com alguns estudos, a utilização concomitante do laser com exercício excêntrico controlado pode resultar em uma melhor resposta à terapia, já que pode favorecer a atividade fibroblástica, conduzindo realinhamento das fibras colágenas e reduzindo a

possibilidade das aderências teciduais, além de promover uma reparação em menor período de tempo. Entretanto, apesar dessa assertiva, poucas pesquisas fazem esse tipo de associação. Nesse sentido, o presente estudo visou contribuir para o melhor entendimento dos efeitos do laser a base de arseneto de gálio (GaAs) sobre o tendão calcâneo comum de ratos Wistar, durante diferentes fases do processo de reparação tendínea, assim como estabelecer parâmetros clínicos que possam ser utilizados tanto no tratamento quanto nos estudos de tendinopatia em humanos e animais. A hipótese é de que a associação de laserterapia com exercício excêntrico resulte em um processo de reparação mais organizado e de melhor qualidade, e de um tendão biomecânicamente mais próximo do normal.

CAPÍTULO I

Laserterapia em afecções locomotoras: revisão sistemática

RESUMO

SILVA, Micheline Ozana da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2013. **Efeitos da laserterapia de baixa potência associada ou não a exercício excêntrico no tratamento de tendinopatia induzida do tendão calcâneo comum de Ratos (*Rattus norvegicus*)**. Orientadora: Maria Verônica de Souza. Coorientadores: Antônio José Natali e Andréa Pacheco Batista Borges.

Ao longo dos anos a fisioterapia tem contribuído para o tratamento das lesões musculotendíneas e osteo-articulares pela utilização de diversos recursos eletrotermofototerapêutico como, por exemplo, o laser de baixa potência. O objetivo desse estudo foi identificar mediante levantamento bibliográfico, o efeito da laserterapia de baixa intensidade em afecções do sistema locomotor de ratos, com destaque para a dose de energia e o comprimento de onda utilizado, assim como para a resposta ao tratamento. Para isso foram consultadas as bases de dados online *PubMed/Medline*, *Lilacs*, *PEDEro* e *Scielo*, entre janeiro de 2005 a maio de 2013, utilizando os termos “tendinopathy”, “laser therapy”, “rats”, “tendon”, “muscle”, “bone”, “low-level laser therapy”, assim como “tendinopatia”, “laserterapia”, “ratos”, “tendão”, “músculo”, “osso” e “laser de baixa potência”. Apenas foram incluídos estudos experimentais publicados nos idiomas português e inglês, que induziram lesão em tendões, músculos, ossos e/ou articulação, tratada com laserterapia, associada ou não a outros tratamentos. Foram encontrados um total de 30 estudos experimentais nas bases de dados consultadas, dos quais 15 (50%) foram realizados em tendão, 10 (33,33%) em músculo e 5 (16,66%) em osso e/ou articulação. As doses de energia mais comumente utilizadas foram de 3 J (26,66%) e 1 J (16,66%). Já os comprimentos de onda foram de 904 nm (21,21%) e 830 nm (21,21%). O resultado mais expressivo obtido com a terapia foi a diminuição da resposta inflamatória (36,66%) em lesões ortopédicas agudas.

Palavras-chave: laser, tendinopatia; miopatia, artropatia, defeito ósseo.

Laser therapy on locomotor disorders: a systematic review

ABSTRACT

SILVA, Micheline Ozana da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, november 2013. **Effects of low level laser therapy associated or not eccentric exercise on tendinopathy of the common calcaneal tendon of rats (*Rattus norvegicus*)**. Adviser: Maria Verônica de Souza. Co-advisers: Antônio José Natali and Andréa Pacheco Batista Borges.

Physiotherapy has long been contributing for the treatment of musculotendinous and osteoarticular lesions by using several electro-thermal-phototherapy resources such as low-level laser. The objective of this study was to identify through a literature search, the effect of low intensity laser therapy on locomotor system diseases in rats, mainly the energy dose and wavelength applied, as well as the response to the treatment. Thus, the online data bases *PubMed/Medline*, *Lilacs*, *PEDro* and *Scielo* were consulted from January 2005 to May 2013, utilizing the terms “tendinopathy”, “laser therapy”, “rats”, “tendon”, “ muscle”, “bone”, “low-level laser therapy”, as well as “tendinopatia”, “laserterapia”, “ratos”, “tendão”, “ músculo”, “osso” and “laser de baixa potência”. Only experimental studies published in Portuguese and English and that induced lesion in tendons, muscles, bones and/ or joints, treated with laser therapy, were included, combined or not with other treatments. A total of 30 experimental studies were found in the data bases consulted, out of which 15 (50.00%) were carried out on tendon, 10 (33.33%) muscle, and 5 (16.66%) in bone and/or joint. The energy doses most frequently used were 3 J (26.66%) and 1 J (16.66%), while the most frequent wavelengths were 904 nm (21.21%) and 830 nm (21.21%). The most expressive result obtained with this therapy was the decrease in inflammatory response (36.66%) in acute orthopedic lesions.

Keywords: laser, tendinopathy; myopathy, arthropathy, bone defect.

INTRODUÇÃO

Existe uma busca incessante por modalidades terapêuticas que promovam uma recuperação mais rápida de lesões musculoesqueléticas e osteo-articulares tanto na espécie humana, quanto animal. Os tratamentos convencionais objetivam inicialmente o alívio da dor e a resolução do processo inflamatório, porém os resultados nem sempre são satisfatórios. As opções de tratamento comumente utilizadas são a administração de corticosteróide ou drogas anti-inflamatórias não esteroidais (AINEs), modalidades de calor como a fonoforese, iontoforese e ultrassom terapêutico, massagem de fricção transversal, ondas de choque, atividade física controlada, laserterapia, entre outras.^{1,2,3,4} Os esteróides e AINEs são benéficos apenas na fase aguda das lesões,⁵ entretanto, para que uma terapia seja considerada eficiente, deve reduzir não apenas a inflamação aguda, mas também proporcionar reparação tecidual em curto período de tempo,⁶ e promover uma recuperação do tendão o mais próxima da sua funcionalidade fisiológica.

O laser, amplificação da luz mediante emissão estimulada de radiação, é uma terapia que vem sendo empregada mundialmente para o tratamento de diversas afecções. Desde 1960, pesquisas são realizadas para investigar a ação terapêutica do laser de baixa potência ou intensidade,² também denominado de “laser frio”, “*soft laser*”, “fotoestimulação ou bioestimulação”.⁷ Os aparelhos existentes podem ser classificados segundo o tipo do seu meio ativo (um amplificador óptico), que pode ser sólido, líquido e semicondutor de gás.⁸ O laser de baixa potência pode emitir uma radiação visível ou invisível (infravermelho), com comprimentos de onda que variam entre 600 nm a 1.000 nm,^{7,9} sendo atérmico e não invasivo. O tipo de radiação está relacionado com a via de ação pretendida com a aplicação do laser.¹⁰ Para as afecções musculoesqueléticas são disponibilizados os lasers à base de arseneto de gálio (Ga-As) e hélio-neônio (He-Ne).^{6,11} Também existem estudos utilizando o laser à base de arseneto de gálio associado a alumínio (GaAlAs).^{12,13,14} Existem outras modalidades de laser que são utilizadas em procedimentos estéticos, cirúrgicos, oftalmológicos e odontológicos,^{15,16} com laser de alta potência, porém o de baixa potência também pode ser utilizado na odontologia.¹⁷ Entre os benefícios resultantes da laserterapia podem ser citados o efeito analgésico em lesões ósseas, musculares e tendíneas agudas ou crônicas,¹⁸ vasodilatação e proliferação de microvasos, com possível aumento da quantidade de oxigênio no tecido,¹⁹ proliferação epitelial, endotelial e fibroblástica, aumento da síntese de colágeno (COL) e da atividade fagocitária, o que resultará na

aceleração do processo de reparação,²⁰ além da liberação de citocinas que irão reduzir a reação inflamatória.²¹

O laser de baixa potência difere da luz comum por suas propriedades de monocromaticidade (único comprimento de onda), coerência (ondas em fase) e colimação (ondas em paralelo).⁸ A radiação emitida é não ionizante,²² ou seja, tem a frequência igual ou menor do que a luz comum e não causa problemas a saúde, desde que utilizado de forma correta. A emissão de luz começa com a ativação de elétrons em um componente do laser (He-Ne, GaAs ou GaAlAs) para seu estado ativado.¹⁸ Quando esses componentes são estimulados por uma fonte de energia, ocorre a emissão de fótons, formando um feixe de luz (“raio laser”). Depois de absorvida, a energia promove efeitos fotoquímicos, fotofísicos e fotobiológicos nas células,²⁰ como, por exemplo, aumento da síntese de ATP. Esses fótons agem na mitocôndria e/ou membranas celulares, onde a energia absorvida é convertida em energia cinética. Efeitos metabólicos decorrentes das primeiras reações resultam em alterações fisiológicas como mudanças na permeabilidade da membrana.¹⁸

Na programação do aparelho de laser são utilizados valores que podem variar de acordo com o equipamento utilizado. Aspectos como comprimento de onda, densidade e emissão de energia, tempo de radiação, potência média e de pico, assim como densidade de potência, devem ser considerados durante a aplicação da laserterapia.²³ A resposta à bioestimulação depende diretamente do comprimento de onda, da densidade de energia [Joules por cm² (J/cm²)], e de potência, além do tempo de aplicação.^{18,24,25} De acordo com Hawkins & Abrahamse,¹⁸ a penetração da radiação depende do comprimento de onda, de forma que, quanto menor o comprimento de onda maior será a sua ação. Existe uma dose ideal de aplicação da luz, de modo que, doses mais baixas ou mais altas do que a ideal, podem ocasionar um resultado indesejado.⁷

Baseado em pesquisas, a Associação Mundial para Terapia com Laser padronizou algumas dosagens para humanos, de forma que, para cada tipo de tecido a ser tratado, existe uma dose e um comprimento de onda indicado.²⁶ As propriedades do laser permitem que a luz penetre na superfície da pele, e a energia gerada transferida diretamente à célula-alvo, sem causar dano ao tecido.¹⁸ Os mecanismos de ação do laser, em nível molecular e celular, ainda não estão bem esclarecidos.¹⁴ Sabe-se que a radiação visível atua pela via mitocondrial, já a invisível tem uma ação sobre cromóforos da membrana celular.²⁷ Um provável mecanismo de ação da terapia no

processo inflamatório é a modulação na síntese de citocinas, como as interleucinas (IL) 1 β , 6 e 10.^{4,17}

Modelos animais são utilizados experimentalmente para obtenção de resultados que demonstrem a eficácia da terapia, e que possam ser extrapolados para os seres humanos.^{17,28,29,30} Para isso devem permitir a reprodução de lesões semelhantes às observadas no homem, que possam ser observadas, diagnosticadas e tratadas.³¹ Os ratos são considerados excelentes modelos experimentais para a espécie humana, devido a sua semelhança anatômica e fisiológica. Como exemplo são destacados os tendões.³² Essa similaridade possibilita que as informações obtidas em pesquisas envolvendo diferentes tecidos e órgãos possam ser utilizadas para o tratamento de afecções que afetam o homem. Adicionalmente, a resistência desses animais em comparação com outras espécies³³ é um aspecto positivo a ser considerado em estudos dessa natureza.

O objetivo do presente estudo foi identificar, por meio dos artigos científicos, o efeito da laserterapia de baixa potência, em problemas ortopédicos de ratos, considerado modelo experimental para seres humanos, com destaque para a dose de energia e o comprimento de onda utilizado, assim como para a resposta ao tratamento.

METODOLOGIA

Foi realizado um levantamento de dados no período compreendido entre janeiro de 2005 a maio de 2013, para realização de uma revisão sistemática sobre experimentos que utilizaram laserterapia no tratamento de afecções locomotoras em ratos. Para isso, foram consultadas as bases de dados online e *PubMed/Medline*, *Lilacs*, *PEDro* e *SciELO*. Os termos utilizados para a busca dos estudos foram “tendinopathy”, “laser therapy”, “rats”, “tendon”, “muscle”, “bone”, “low-level laser therapy”, assim como “tendinopatia”, “laserterapia”, “ratos”, “tendão”, “músculo”, “osso” e “laser de baixa potência”. Como critério de inclusão foram considerados estudos experimentais, publicados na língua portuguesa e inglesa, que realizaram indução de lesões tendínea, muscular, óssea e/ou articular, que foram tratadas com laser de baixa potência, associadas ou não a outros tratamentos. Foram excluídas do estudo pesquisas que não utilizaram a laserterapia; experimentos realizados com lesões odontológica, oftalmológica, dermatológica e musculatura lisa; artigos de revisão com seres humanos ou outras espécies animais, e aqueles publicados fora do período preconizado na presente revisão. Nos artigos selecionados foram avaliados os seguintes itens: local da

lesão, a dose de energia e o comprimento de onda empregado e principais resultados obtidos.

RESULTADOS

Considerando os critérios de inclusão adotados, foram encontrados um total de 30 estudos nas bases de dados consultadas, dos quais quinze (50%) foram realizados em tendão,^{3,4,6,9,17,27,28,34,35,36,37,38,39,40,41} dez (33,33%) em músculos,^{12,14,30,42,43,44,45,46,47,48} e cinco (16,66%) em osso e/ou articulação.^{13,29,49,50,51} A Tabela 1 apresenta detalhes sobre esses estudos.

Foram utilizados diferentes tipos de laser de baixa potência, com diferentes ajustes. As doses de energia mais comumente utilizadas foram de 3 J (26,66%) e 1 J (16,66%). Já os comprimentos de onda foram 904 nm (21,21%), 830 nm (21,21%), 810 nm (12,12%), 780 nm (12,12%) e 660 nm (9,09%). Três estudos (9,09%) associaram diferentes comprimentos de onda (670 e 904 nm, 830 e 904 nm e 660 e 830 nm).

Os resultados mais expressivos obtidos com a terapia foram diminuição da resposta inflamatória mediante redução de células inflamatórias e modulação de mediadores da inflamação (36,66%), e o aumento da síntese de colágeno (13,33%). Alguns dos demais resultados (50,01%) mencionados foram angiogênese; redução do estresse oxidativo, do colágeno e da fibrose; aumento do tecido de granulação, da remodelação e síntese óssea, assim como da expressão da proteína da diferenciação miogênica (MyoD) e do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Também foi relatada a redução do fator de crescimento transformante beta (TGF- β) e da concentração da creatina quinase (CK) e do lactato sanguíneo, com aumento da força muscular; melhora das propriedades biomecânicas do tendão e da função locomotora como um todo.

Tabela 1 - Estudos publicados no período de janeiro de 2005 a maio de 2013, em lesões induzidas experimentalmente em ratos, tratadas com laserterapia

Autor (Referência)	Estrutura Lesionada	Comprimento de onda (nm)	Dose (J)	Resumo dos resultados obtidos
Fillipin et al ⁶	Tendão calcanear comum	904	5	Redução do processo inflamatório, da concentração de colágeno e da fibrose. Aumento da atividade da superóxido dismutase.
Salate et al ³⁴	Tendão calcanear comum	660	2,5 e 10	Angiogênese.
Lopes-Martins et al ¹²	Músculo tibial anterior	655	0,5; 1 e 2,5	Redução dos níveis de CK e aumento da força muscular.
Rizzi et al ⁴²	Músculo gastrocnêmio	904	5	Redução da resposta inflamatória e do colágeno; bloqueio da ativação do NF-kB, e da expressão de iNOS.
Arruda et al ²⁷	Tendão calcanear comum	670 e 904	3	Organização das fibras de colágeno.
Pretel et al ¹³	Defeito ósseo na mandíbula	780	1,4	Aceleração da remodelação e da síntese óssea.
Leal Junior et al ⁴³	Músculo tibial anterior	904	0,1; 0,3; 1 e 3	Redução dos níveis de CK e lactato no sangue.

CK: creatina quinase; NF-kB: fator de transcrição nuclear Kappa-B; iNOS: enzima óxido nítrico síntase induzida.

Tabela 1 - Estudos publicados no período de janeiro de 2005 a maio de 2013, em lesões induzidas experimentalmente em ratos, tratadas com laserterapia (continuação)

Autor (Referência)	Estrutura Lesionada	Comprimento de onda (nm)	Dose (J)	Resumo dos resultados obtidos
Laraia et al ¹⁷	Tendão calcanear comum	660	6	Redução das IL-1 β e IL-6, e aumento da IL-10.
Moreira et al ⁴⁵	Músculo gastrocnêmio	830 e 904	5	Aumento da síntese de COL, sete dias após lesão, e redução aos 14 dias.
Oliveira et al ³⁵	Tendão calcanear comum	830	4	Organização das fibras de colágeno.
Falcai et al ⁴⁴	Músculo gastrocnêmio	960	2	Angiogênese e melhor organização tecidual.
Xavier et al ⁴	Tendão calcanear comum	880 \pm 10	7,5	Redução na expressão de IL-1 β , IL-6, COX-2 e do TNF.
Wood et al ³	Tendão calcanear comum	830	0,12	Aumento da síntese de COL I, quando associada ao ultrassom terapêutico.
Fangel et al ⁴⁹	Indução de osteopenia e falha óssea na tíbia	830	1,7	Aumento do tecido de granulação e neoformação óssea.
Joensen et al ³⁹	Tendão calcanear comum	904	3	Sem resposta ao tratamento
Lima et al ⁴⁰	Tendão calcanear comum	658	3 e 6	Redução na deposição de fibras colágenas.

IL: interleucinas; COL: colágeno; COX: ciclooxigenases; TNF: fator de necrose tumoral.

Tabela 1 - Estudos publicados no período de janeiro de 2005 a maio de 2013, em lesões induzidas experimentalmente em ratos, tratadas com laserterapia (continuação)

Autor (Referência)	Estrutura Lesionada	Comprimento de onda (nm)	Dose (J)	Resumo dos resultados obtidos
Marcos et al ³⁶	Tendão calcanear comum	810	1 e 3	Diminuição da resposta inflamatória, por redução das MMPs-3, 9 e 13.
Silveira et al ⁴⁶	Músculo gastrocnêmio	904	5	Redução do estresse oxidativo, mediante redução da superóxido dismutase, ânion superóxido e dos níveis de ácido tiobarbitúrico.
Pires et al ⁹	Tendão calcanear comum	780	7,7	Redução na expressão de mediadores IL-6, COX-2 e TGF- β .
Alves et al ⁵⁰	Artrite da articulação femorotibiopatelar	780	7,7	Redução das células inflamatórias mononucleares, e aumento dos condroblastos e osteoblastos.
Casalechi et al ³⁷	Tendão calcanear comum	780	7,5	Redução da resposta inflamatória pela modulação da IL-10, VEGF e MMP-1 e 13.

MMPs: metaloproteinases; IL: interleucinas; COX: ciclooxigenases; TGF- β : fator de crescimento transformante beta; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular.

Tabela 1 - Estudos publicados no período de janeiro de 2005 a maio de 2013, em lesões induzidas experimentalmente em ratos, tratadas com laserterapia (continuação)

Autor (Referência)	Estrutura Lesionada	Comprimento de onda (nm)	Dose (J)	Resumo dos resultados obtidos
Nouruzian et al ²⁸	Tendão calcanear comum	632.8	2,9; 11,5 4,3	Melhora nas propriedades biomecânicas do tendão (carga e tensão máximas).
Pallotta et al ²⁹	Artrite da articulação femoropatelar	810	1, 3, 6 e 10	Redução de polimorfonucleares, IL-1 e 6, e da prostaglandina (PG) E ₂ ; aumento da COX-1 e 2.
Ramos et al ³⁰	Músculo tibial anterior	810	1, 3, 6 e 9	Melhora da função locomotora, mediante avaliação de apoio.
Barbosa et al ⁴¹	Tendão calcanear comum	660 e 830	7,0	Aumento na deposição de COL I, quando associada a plasma rico em plaquetas.
Assis et al ¹⁴	Músculo tibial anterior	808	1,4	Aumento da expressão da MyoD e do VEGF. Redução do TGF-β e da fibrose.

IL: interleucinas; PG: prostaglandina; COX: ciclooxigenases; COL: colágeno; MyoD: diferenciação miogênica; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular; TGF-β: fator de crescimento transformante beta.

Tabela 1 - Estudos publicados no período de janeiro de 2005 a maio de 2013, em lesões induzidas experimentalmente em ratos, tratadas com laserterapia (continuação)

Autor (Referência)	Estrutura Lesionada	Comprimento de onda (nm)	Dose (J)	Resumo dos resultados obtidos
Carvalho et al ⁴⁷	Músculo tibial anterior	810	3	Redução na expressão da COX-1 e 2 e da PGE ₂ .
Fernandes et al ⁵¹	Terço proximal da tíbia	830	2,8	Redução da resposta inflamatória; angiogênese; melhor organização tecidual e osteogênese.
Rodrigues et al ⁴⁸	Músculo tibial anterior	660	10 e 50	Redução do infiltrado inflamatório e aumento da expressão da MyoD e VEGF.
Guerra et al ³⁸	Tendão calcâneo comum	830	4	Aumento da síntese de COL I e III e ativação da MMPs-2.

COX: ciclooxigenases; PG: prostaglandina; MyoD: diferenciação miogênica; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular; COL: colágeno; MMPs: metaloproteinases.

DISCUSSÃO

Laserterapia em lesão tendínea

Vários estudos foram realizados com a finalidade de se obter uma melhor compreensão dos efeitos da terapia com laser. De acordo com Carvalho et al⁴⁷ (2013) não há relatos de efeitos colaterais na laserterapia. Estudo realizado por Salate et al³⁴ (2005) na fase inflamatória e proliferativa da lesão parcial do tendão calcâneo comum de ratos, revelou que a laserterapia induz a angiogênese *in vitro* e *in vivo*. Já Fillipin et al⁶ (2005) observaram em lesão induzida por trauma no tendão calcâneo comum,

redução na resposta inflamatória e da fibrose em avaliação histopatológica realizada sete dias da indução da lesão, assim como do estresse oxidativo, pelo teste das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, onde foi observado o aumento da atividade da superóxido dismutase aos 14 e 21 dias. Além da diminuição da fase inflamatória, os resultados da pesquisa de Laraia et al¹⁷ (2012) demonstraram redução das citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e IL-6) e aumento da anti-inflamatória (IL-10), durante a recuperação do tendão calcâneo de ratos submetidos à ruptura parcial. Outros estudos também demonstraram modulação de citocinas pró e anti-inflamatórias, o que resultou em diminuição da resposta inflamatória.^{4,9,17,36,37,50} De acordo com Pires et al⁹ (2011) as tendinopatias estão relacionadas com um desequilíbrio entre citocinas inflamatórias.

A angiogênese citada como resultante da laserterapia é importante para nutrição e oxigenação tecidual. Em tendões bem vascularizados, o tecido pode se recuperar rapidamente, mas naqueles que são hipo ou avasculares, o processo de reparação é mais demorado, aumentando as chances de recidiva, caso o animal seja exposto a uma força prejudicial.⁵² A elevação da superóxido dismutase descrita por Fillipin et al⁶ (2005) em tendão calcâneo comum após tratamento com laser de baixa potência também é uma resposta desejável, devido ao efeito anti-oxidante dessa enzima. Sabe-se que o estresse oxidativo é um potente fator patogênico que acarreta alterações degenerativas, incluindo fibrose.⁴²

A diminuição das citocinas pró-inflamatórias ocasiona redução da lesão tecidual, já o aumento da IL-10 está associado à melhora na vascularização, já que a sua indução é dependente da reperfusão.^{53,54} Por outro lado, ainda que a IL-6 atue na migração de células fagocitárias e inflamatórias na fase inicial da lesão, o excesso de concentração desta citocina pode comprometer a reparação tecidual. Adicionalmente, a presença de IL-1 e 6 está associada à persistência da tendinopatia.⁵⁵

Guerra et al³⁸ (2013) observaram que a radiação do laser de baixa potência promove aumento da MMP-2 em animais com o tendão calcâneo comum parcialmente rompido. Já Marcos et al³⁶ demonstraram haver redução das MMPs-3, 9 e 13 nesse mesmo tendão submetido a ação de colagenase. Segundo os autores, a expressão das MMPs-1 e 13 está associada à tendinopatias, enquanto que a MMP-3, assim como a MMP-13, quando em altas concentrações, ocasionam a decomposição do COL I, podendo causar danos ao tendão. A MMP-1, que é uma colagenase, é a mais importante e atua decompondo o colágeno, assim como a MMP-13, já a MMP-3 atua degradando substratos de proteínas da matriz extracelular.^{36,56} Sabe-se que, para a ocorrência de uma

remodelação da matriz tendínea é necessário que haja equilíbrio entre as metaloproteinases e seus inibidores (TIMPs).³⁷ visto que essas enzimas são essenciais à migração de células para a matriz extracelular, além de remover o colágeno e os componentes da matriz que foram desnaturados durante o processo lesivo. Caso esse colágeno não seja removido, será formado um tecido desorganizado, com uma matriz extracelular inadequada.⁵⁶

Na realidade, as metaloproteinases são enzimas proteolíticas capazes de degradar não apenas diferentes tipos de colágeno, mas também outros componentes da matriz extracelular responsáveis pela função tendínea. O aumento das gelatinases, ou seja, MMP-2 e 9 é importante para a degradação do colágeno desnaturado.⁵⁶ Por outro lado, a elevação excessiva pode agravar a lesão, já que ambas estimulam a produção do FNT- α e IL-1 β . Portanto, a redução da gelatinase MMP-9 no tendão calcâneo comum lesionado pela ação da colagenase, observada por Marcos et al³⁶ (2011) revela um efeito positivo da laserterapia.

Ainda com relação ao efeito terapêutico do laser em estrutura tendínea, foi observada maior organização das fibras colágenas ao longo do eixo longitudinal do tendão calcâneo comum, após lesão parcial.³⁵ Adicionalmente, também foi observado que a terapia com laser promove aumento na resistência do tendão.²⁸ Por outro lado, Joensen et al.³⁹ após lesionar o tendão calcâneo comum, mediante utilização de guilhotina, não observaram resposta desse tendão à laserterapia, já que os pesquisadores identificaram aumento do edema na avaliação ultrassonográfica realizada 23 horas após o tratamento. Os autores discutem a possibilidade da lesão não ter sido eficiente em promover alterações na resistência do tendão.

A melhor organização das fibras colágenas observada por Oliveira et al³⁵ (2009) é fundamental para a resistência do tendão à tração, e permite a transmissão da força gerada pela contração muscular.⁵⁷ Entretanto, apesar de ter observado resposta satisfatória após aplicação do laser, como, por exemplo, a redução do estresse oxidativo, Phillipin et al.⁶ observaram que a laserterapia reduz a concentração de colágeno 21 dias após lesão traumática no tendão calcâneo comum. De acordo com os autores, é possível que esse achado se deva a redução do processo inflamatório.

Laserterapia em lesão muscular

Quando utilizado em lesão muscular, ficou demonstrado que a terapia promove redução da fadiga muscular pela diminuição da concentração do lactato sanguíneo.⁴³

Esse efeito pode está relacionado com a ação vasodilatadora do laser de baixa potência, o que permite aumentar a disponibilidade de oxigênio no tecido.¹⁹ e, conseqüentemente, a conversão do excesso de lactato em piruvato, que por sua vez é metabolizado no ciclo de Krebs.

Rizzi et al⁴² (2006) avaliaram o efeito do laser no músculo gastrocnêmio submetido a trauma pelo método guilhotina. Os autores encontraram redução da expressão de iNOS, e bloqueio da ativação do NF-κB. A iNOS é produzida a partir de estímulos provenientes de várias células do organismo, como por exemplo, macrófagos e neutrófilos. Essa isoenzima libera óxido nítrico, que quando em altas concentrações pode gerar processos patológicos.⁵⁸ Nesse contexto, a sua redução pela laserterapia após lesão traumática é um achado satisfatório. Já o NF-κB, que é um fator de transcrição nuclear que regula a expressão de genes que estão relacionados com a inflamação. A IL-1β, o TNF-α, e os produtos de degradação de matrix extracelular desencadeiam sinais a esse fator, que normalmente se encontra em estado inativo no citoplasma da célula. Entretanto, de acordo com Marcu et al⁵⁹ (2010), uma vez ativado, controla a expressão de várias citocinas reguladoras da inflamação, como, por exemplo, as IL-6, 8 e 10, o fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos e a proteína quimiotativa para monócitos que, por sua vez, desencadeiam a degradação enzimática da matrix pelas MMPs-1, 3 e 13, e agreganases. Nesse contexto, a redução da sinalização ao NF-κB revela eficácia da laserterapia.

Redução da resposta inflamatória e dos níveis de COX-2, com aumento da expressão da MyoD foram obtidos após laserterapia em lesão realizada no músculo tibial anterior.⁴⁸ Embora Moreira et al⁴⁵ (2011) tenham observado uma tendência a uma maior deposição de COL I no músculo gastrocnêmio lesionado cirurgicamente mediante incisão longitudinal, após 14 dias de tratamento com laser de baixa potência não houve diferença entre grupos tratado com GaAs (p=0,15) e GaAlAs (p=0,19), em relação ao grupo controle (não submetido a radiação).

Como a MyoD participa na regulação muscular,⁶⁰ o aumento da expressão dessa proteína é importante para o reparo tecidual. Aumento da expressão da MyoD também foi relatado por Assis et al¹⁴ (2013) em músculo tibial anterior criolesionado com nitrogênio líquido. Os autores também encontraram aumento da expressão do VEGF, que é um importante fator de crescimento que atua na proliferação e migração de células endoteliais e angiogênese.⁶¹

Com relação à maior deposição de colágeno tipo I no músculo gastrocnêmio tratado com laserterapia,³⁶ sabe-se que este deve ser o predominante no músculo de ratos. Essa predominância é fundamental devido à sua elasticidade, mas também pela sua ação na estabilização da arquitetura tecidual. De acordo com Pavesi,⁶² esse colágeno é denominado intersticial, uma vez que forma estrutura fibrilares no espaço intercelular. Entretanto, conforme mencionado anteriormente, não houve diferença significativa quando comparado grupos tratado e controle. Na realidade, segundo Fillipin et al⁶ (2005) existe controvérsia sobre o efeito do laser sobre o metabolismo do colágeno. Rizzi et al⁴² (2006) observaram, inclusive, diminuição do colágeno sete a 14 dias após a sua elevação ocasionada por trauma no músculo gastrocnêmio. O mesmo foi relatado 21 dias após lesão traumática em tendão calcâneo comum.⁶

As ciclo-oxigenases são enzimas responsáveis pela clivação do ácido araquidônico. A COX-1 é expressa em vários tecidos e resulta na síntese de prostaglandinas relacionadas com reações fisiológicas em diferentes tecidos. Por outro lado, os produtos resultantes da quebra do ácido araquidônico pela COX-2 desencadearão uma resposta inflamatória a partir das citocinas e mediadores da inflamação. De acordo com Ribeiro et al⁶³ (2009), essa isoforma (COX-2) está envolvida em diversos mecanismos celulares, como angiogênese, proliferação e prevenção de apoptose. A redução da COX-2 relatada por Rodrigues et al⁴⁸ (2012) em músculo tibial anterior tratado com laserterapia é um achado favorável, já que, apesar da resposta inflamatória fazer parte do processo de reparação fisiológico das estruturas musculotendíneas, sabe-se que quando persistente pode estimular a expressão de genes pró-fibróticos, o que é indesejável.

Ramos et al³⁰ (2012) demonstraram melhora na função locomotora de animais submetidos a fadiga do músculo tibial anterior, mediante estimulação elétrica. Entretanto, os autores não esclarecem os mecanismos pelos quais a laserterapia favorece a recuperação da força muscular. Lopes-Martins et al¹² (2006) também realizaram estimulação elétrica para lesão muscular. De acordo com esses autores, a redução da concentração sanguínea de CK foi a responsável pela melhora da força muscular. Essa é uma enzima marcadora muscular, e a sua diminuição indica redução da lesão tecidual.⁶⁴

Laserterapia em lesão óssea e/ou articular

Estudo recentemente publicado em artrite da articulação femoropatelar²⁹ revelou que o laser aumenta a expressão gênica de COX-1 e 2, o que é um efeito indesejável.

Entretanto outros marcadores inflamatórios como infiltrados inflamatório polimorfonuclear, IL-1 e 6 e, particularmente, PGE₂ foram inibidos. Na opinião dos autores, pesquisas são necessárias para investigar a produção de mediadores anti-inflamatórios resultantes das ciclo-oxigenases induzidas no tratamento articular com laser de baixa potência.

Conforme já mencionado anteriormente, o equilíbrio entre as citocinas pró e anti-inflamatórias, bem como a redução dessas células é importante para diminuição mais rápida do processo inflamatório. Da mesma forma, a redução da PGE₂ promove o controle da inflamação e principalmente da dor, em enfermidades como, por exemplo, artrite reumatóide.⁶⁵ Já o aumento da concentração desse mediador químico é indicativo de afecções inflamatórias.

Alves et al⁵⁰ (2012) também observaram redução das células inflamatórias, mas também aumento da quantidade de condroblastos e osteoblastos em animais com artrite reumatóide da articulação femorotibiopatelar. Os condroblastos são células que secretam componentes da matriz extracelular para a formação da estrutura cartilaginosa,⁶⁶ enquanto os osteoblastos participam da síntese dos componentes da matriz óssea, expressam fosfatase alcalina, enzima que permite a mineralização da matriz,⁶⁷ e inclusive secretam fatores de crescimento.⁶⁸ Fangel et al⁴⁹ (2011) e Fernandes et al⁵¹ (2013) também descreveram aumento da síntese óssea após tratamento com laserterapia na tíbia de ratos. Os autores observaram, mediante avaliação histopatológica, neoformação óssea particularmente na análise realizada cinco dias após lesão traumática e tratamento. Ocorreu aumento da expressão do RNAm dos genes da fosfatase alcalina, da osteocalcina, e do Runex (fator de transcrição associado com a diferenciação osteoblástica). A fosfatase alcalina e osteocalcina são marcadores de formação óssea, e sua elevação representa melhora na constituição óssea.

As células osteoprogenitoras se diferenciam em osteoblastos, que são responsáveis pela síntese de componentes da matriz óssea, como por exemplo, o colágeno. De acordo com Oasser et al⁶⁹ (1999) o colágeno é a principal proteína óssea, sendo as suas fibras parcialmente responsáveis pelas propriedades biomecânicas do osso, o que as torna fundamentais para o processo de reparação do sistema locomotor. Fernandes et al⁵¹ (2013) também relataram como efeito positivo da laserterapia em lesão óssea, a modulação da resposta inflamatória (por recrutamento de células inflamatórias), assim como o aumento do número de fibroblastos e de capilares sanguíneos. Ocorreu melhor organização tecidual, pela presença de tecido de granulação. Resultados

semelhantes, no que se refere ao aumento da síntese óssea e modulação da resposta inflamatória, também foram observados após laserterapia em defeito realizado na mandíbula.¹³

Dose de energia e comprimento de onda

Não há um consenso de qual dose e comprimento de onda seriam mais adequados no tratamento das afecções musculotendíneas e osteo-articulares. Conforme apresentado na Tabela 1, doses acima de 4 J estão associadas à redução do processo inflamatório. Utilizando doses de 1, 3, 6 e 9 J no tratamento de lesão muscular, Ramos et al.³⁰ demonstraram que os ratos tratados com a dose de 3 J apresentaram melhora na funcionalidade do músculo tibial anterior. Lima et al.⁴⁰ (2012) não observaram diferença significativa na quantidade de colágeno em animais com lesão no tendão calcâneo comum e tratados com 3 e 6 J. Pallotta et al.²⁹ (2012) também utilizaram diferentes doses de energia (1, 3, 6 e 10 J), entretanto o estudo demonstrou que para cada dose utilizada em um determinado tempo da lesão experimental (artrite na articulação femoropatelar), existe uma resposta satisfatória. De acordo com os autores, os grupos que utilizaram doses de 6 e 10 J apresentaram redução do número de leucócitos e inibição da atividade das MMPs articulares. Também ocorreu redução do infiltrado de neutrófilos nos grupos que utilizaram laserterapia nas doses de 3, 6 e 10 J, e aumento das COX-1 e 2 nos tratados com 3 e 10 J.

Rodrigues et al.⁴⁸ (2012) utilizaram 10 e 50 J de laser no tratamento do músculo tibial anterior após criolesão por nitrogênio líquido. Os pesquisadores observaram maior expressão de diferenciação miogênica no grupo tratado com 10 J. Os resultados obtidos por esses autores corroboram a afirmação de Salate et al.³⁴ (2005) de que a terapia com laser é dose-dependente.

O comprimento de onda é uma variável que deve ser utilizada de acordo com o tecido biológico que receberá a radiação, pois está diretamente relacionado com a característica do tecido e a profundidade em que se encontra. Barbosa et al.⁴¹ (2013) não observaram diferença nos resultados obtidos comparando grupos tratados com diferentes comprimentos de onda (660 ou 830 nm). Da mesma forma, Moreira et al.⁴⁵ (2011) também não demonstraram diferenças no comprimento de onda utilizado (830 ou 904 nm) para tratar lesão do músculo gastrocnêmio. De acordo com os autores, a deposição do colágeno foi semelhante em ambos os grupos. Da mesma forma que mencionado para a dose de energia utilizada, o comprimento de onda é dose-dependente

para o tratamento de tendinopatia do tendão calcâneo comum.²⁷ Hamblin & Demidova,⁷ relatam que diferentes comprimentos de onda agem por mecanismos distintos, e influenciam a absorção e difusão da radiação. Comprimentos de onda na faixa de 600 a 700 nm são indicados para o tratamento de tecidos localizados mais superficialmente, enquanto os entre 780 a 950 nm são mais indicados nas lesões que atingem estruturas mais profundas, devido ao maior poder de penetração. Por outro lado, comprimentos entre 700 e 770 nm não possuem uma atividade adequada.

No presente levantamento, não foram encontrados experimentos que utilizaram comprimentos de onda entre 700 e 770 nm que se enquadrassem dentro dos critérios de inclusão adotados. Entretanto, nove (30%) estudos utilizaram comprimentos de onda entre 632,8 e 670 nm em tendão calcâneo comum^{17,27,28,34,40,41} e tibial anterior.^{12,48}

Em estudo realizado por Silva et al⁷⁰ (2013) em tendão calcâneo comum de ratos Wistar, utilizando 3 J de energia e 904 nm de comprimento de onda, os autores revelaram que a laserterapia apresenta melhor resposta (menor reação inflamatória e aderência fibrinosa, e maior quantidade de fibras colágenas) se associada à caminhada em esteira, que é um exercício excêntrico. Nesse tipo de exercício, o músculo contraído é alongado enquanto produz força gerada durante a contração. Essa força não é suficiente para vencer a carga imposta, ocorrendo o alongamento das fibras,⁷¹ o que resulta em importantes alterações na capacidade e massa muscular.

CONCLUSÕES

Mesmo havendo uma recomendação da Associação Mundial para Terapia com Laser sobre a dose de energia adequada para cada comprimento de onda, respeitando um determinado período de tempo e a afecção a ser tratada, nota-se uma importante variabilidade nas doses utilizadas nos estudos apresentados nesse levantamento. Independentemente dessa variabilidade, a maioria das pesquisas sinalizam efeitos positivos da terapia, principalmente na modulação da resposta inflamatória em lesões agudas, associadas ou não a outros tratamentos. Por outro lado, o ideal é que pesquisas de qualidade, realizadas de forma randomizada, continuem sendo conduzidas para que a dose e o comprimento de onda sejam mais bem definidos para cada afecção ortopédica. Nesse contexto seria importante que outras modalidades fisioterapêuticas pudessem ser associadas à laserterapia, como, por exemplo, o exercício excêntrico controlado, que sabidamente é fundamental para o retorno à funcionalidade dos diversos problemas relacionados com o aparelho locomotor.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não possuir conflitos de interesses.

REFERÊNCIAS

1. Andres BM, Murrell GAC, Treatment of tendinopathy: what works, what does not and what is on horizon. *Clin Orthop Relates Res.* 2008;466(7):1539-54. DOI: 10.1007/s11999-008-0260-1
2. Baroni BM, Leal Junior ECP, Marchi T, Lopes AL, Salvador M, Vaz MA. Low level laser therapy before eccentric exercise reduces muscle damage markers in humans. *Eur J Appl Physiol.* 2010;110(4):789-96. DOI: 10.1007/s00421-010-1562-z
3. Wood VT, Pinfildi CE, Neves MA, Parizoto MA, Hochman B, Ferreira LM. Collagen changes and realignment induced by low-level laser therapy and low-intensity ultrasound in the calcaneal tendon. *Lasers Surg Med.* 2010;42(6):559-65. DOI: 10.1002/lsm.20932
4. Xavier M, David DR, Souza RA, Arrieiro NA, Miranda H, Santana ET, et al. Anti-inflammatory effects of low-level light emitting diode therapy on Achilles tendinitis in rats. *Lasers Surg Med.* 2010;42(6):553-8. DOI: 10.1002/lsm.20896
5. Abate M, Gravare-Silbernagel K, Siljeholm C, Di Lori A, De Amicis D, Salini V, et al. Pathogenesis of tendinopathies: inflammation or degeneration? Review. *Arthritis Res Ther.* 2009;11(3):1-15. DOI: 10.1186/ar2723
6. Fillipin LI, Mauriz JL, Vedovelli K, Moreira AJ, Zettler CG, Lech O, Marroni NP, et al. Low-level laser therapy (LLLT) prevents oxidative stress and reduces fibrosis in rat traumatized Achilles tendon. *Lasers Surg Med.* 2005;37(4):293-0. DOI: 10.1002/lsm.20225
7. Hamblin MR, Demidova TN. Mechanisms of low level light therapy. *SPIE Digital Library Proceedings.* 2006;6140:1-12. DOI: 10.1117/12.646294
8. Matić M, Lazetić B, Poljacki M, Duran V, Ivkov-Simić V. Low level laser irradiation and its effect on repair processes in the skin. *Med Pregl.* 2003;56(3-4):137-41.
9. Pires D, Xavier M, Araújo T, Silva Júnior JA, Aimbre F, Albertini R. Low-level laser therapy (LLLT; 780 nm) acts differently on mRNA expression of anti- and pro-inflammatory mediators in an experimental model of collagenase-induced

- tendinitis in rat. *Lasers Med Sci.* 2011;26(1):85-4. DOI: 10.1007/s10103-010-0811-z
10. Vladimirov YA, Osipov AN, Klebanov GI. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. *Biochemistry.* 2004;69(1):81-90.
 11. Gur A, Sarac AJ, Cevik R, Altindag O, Sarac S. Efficacy of 904 nm gallium arsenide low level laser therapy in the management of cronic myofascial pain in the neck: a Double-blind and randomized-controlled Trial. *Lasers Surg Med.* 2004;35(3):229-35. DOI 10.1002/lsm.20082
 12. Lopes-Martins RAB, Marcos RL, Leonardo PS, Prianti Júnior AC, Muscará MN, Aimbire F, et al. Effect of low-level laser (Ga-Al-As 655 nm) on skeletal muscle fatigue induced by electrical stimulation in rats. *J Appl Physiol.* 2006;101:283-8. DOI: 10.1152/jappphysiol.01318
 13. Pretel H, Lizarelli RFZ, Ramalho LTO. Effect of low-level laser therapy on bone repair: histological study in rats. *Lasers Surg Med.* 2007;39(10):788-96. DOI: 10.1002/lsm.20585
 14. Assis L, Moretti AIS, Abrahão TB, Souza HP, Hamblin MR. Low-level laser therapy (808 nm) contributes to muscle regeneration and prevents fibrosis in rat tibialis anterior muscle after cryolesion. *Lasers Med Sci.* 2013;28(3):947-55. DOI: 10.1007/s10103-012-1183-3
 15. Ayala M, Chen E. Comparison of selective laser trabeculoplasty (SLT) in primary open angle glaucoma and pseudoexfoliation glaucoma. *Clin Ophthalmol.* 2011;5:1467-73. DOI: doi.org/10.2147/OPHTH.S25636
 16. Catão MHCV. Os beneficios do laser de baixa intensidade na clínica odontológica na estomatologia. *Rev Bras Patol Oral.* 2004;3(4):214-8.
 17. Laraia SEM, Silva IS, Pereira DM, Reis FA, Almeida P, Leal Júnior ECP, et al. Effect of low-level laser therapy (660 nm) on acute inflammation induced by tenotomy of Achilles tendon in rats. *Photoch Photobiol.* 2012;88(6):1546-50. DOI: 10.1111/j.1751-1097.2012.01179.x
 18. Hawkins D, Abrahamse H. Phototherapy – a treatment modality for wound healing and pain relief. Review. *African J Biomed Res.* 2007;10(2):99-9.
 19. Ihsan FRM. Low-level laser therapy accelerates collateral circulation and enhances microcirculation. *Photomed Laser Surg.* 2005;23(3):289-94. DOI: 10.1089/pho.2005.23.289

20. Lins RDAU, Dantas EM, Lucena KCR, Catão MHCV, Granville-Garcia AF, Carvalho Neto LG. Efeitos bioestimulantes do laser de baixa potência no processo de reparo. *An Bras Dermatol.* 2010;85(6):849-55.
21. Medrado ARAP, Pugliese LS, Reis SRA, Andrade ZA. Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. *Lasers Surg Med.* 2003;32(3):239-44. DOI: 10.1002/lsm.10126
22. Dogan SK, Saime AY, Evcik D. The effectiveness of low laser therapy in subacromial impingement syndrome: a randomized placebo controlled double-blind prospective study. *Clinics.* 2010;65(10):1019-22. DOI:10.1590/S1807-59322010001000016
23. Fukuda TY, Malfatti CA. Análise da dose do laser de baixa potência em equipamentos nacionais. *Rev Bras Fisioter.* 2008;12(1):70-4.
24. Pereira AN, Eduardo CP, Matson E, Marques MM. Effect of low-power irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers Surg Med.* 2002;31(4):263-7. DOI: 10.1002/lsm.10107
25. Woodruff PT, Bounkeo JM, Brannon WM, Dawes K, Barham CD, Waddell D, et al. The efficacy of laser therapy in wound repair: a meta-analysis of the literature. *Photom Laser Surg.* 2004;22(3):241-7. DOI: 10.1089/1549541041438623
26. Bjordal JM, Lopes-Marnis RAB, Joensen J, Couppe C, Ljunggren AE, Stergioulas A, et al. A systematic review with procedural assessments and meta-analysis of low level laser therapy in lateral elbow tendinopathy (tennis elbow). *BMC Musculoskelet Disord.* 2008;9(75):1-15. DOI: 10.1186/1471-2474-9-75
27. Arruda ERB, Rodrigues NC, Taciro C, Parizotto NA. Influência de diferentes comprimentos de onda da laserterapia de baixa intensidade na regeneração tendínea de rato após tenotomia. *Rev Bras Fisioter.* 2007;11(4):283-8. DOI: org/10.1590/S1413-35552007000400007
28. Nouruzian M, Alidoust M, Bayat M, Bayat M, Akbari M. Effect of low-level laser therapy on healing of tenotomized Achilles tendon in streptozotocin-induced diabetic rats. *Lasers Surg Med.* 2012;28(2):399-05. DOI: 10.1007/s10103-012-1074-7
29. Pallota RC, Bjordal JM, Frigo L, Leal-Junior ECP, Teixeira S, Marcos RL, et al. Infrared (810-nm) low-level laser therapy on rat experimental knee inflammation. *Lasers Med Sci* 2012;27(1):71-8. DOI: 10.1007/s10103-011-0906-1

30. Ramos L, Leal Júnior ECP, Pallotta RC, Frigo L, Marcos RL, Carvalho MHC, et al. Infrared (810 nm) low-level laser therapy in experimental model of strain-induced skeletal muscle injury in rats: effects on functional Outcomes. *Photochem Photobiol.* 2012;88(1):154-60. DOI: 10.1111/j.1751-1097.2011.01030.x
31. Lake SP, Ansorge HL, Soslowsky KL. Animal models of tendinopathy. *Disabil Rehabil* 2008;30(20-22):1530-41. DOI: 10.1080/09638280701785460
32. Warden SJ. Animal models for the study of tendinopathy. Review. *Br J Sports Med.* 2007;41(4):232-40. DOI: 10.1136/bjism.2006.032342
33. Lui PPY, Maffulli N, Smith RKW. What are the validated animal models for tendinopathy? Review. *Scand J Med Sci Sports.* 2011;21(1):3-17. DOI: 10.1111/j.1600-0838.2010.01164.x
34. Salate ACB, Barbosa G, Gaspar P, Koeke PU, Parizotto NA, Benze BG, et al. Effect of In-Ga-Al-P Diode laser irradiation on angiogenesis in partial ruptures of Achilles tendon in rats. *Photomed Laser Surg.* 2005;23(5):470-5. DOI: 10.1089/pho.2005.23.470
35. Oliveira FS, Pinfildi CE, Parizoto NA, Liebano RE, Bossini PS, Garcia IB, et al. Effect of low level laser therapy (830 nm) with different therapy regimes on the process of tissue repair in partial lesion calcaneus tendon. *Lasers Surg Med.* 2009;41(4):271-6. DOI: 10.1002/lsm.20760
36. Marcos RL, Leal-Junior ECP, Arnold G, Magnenet V, Rahouadj R, Wang X, et al. Low-level laser therapy in collagenase-induced Achilles tendinitis in rats: analyses of biochemical and biomechanical aspects. *J Orthop Res.* 2011;30(12):1945-51. DOI: 10.1002/jor.22156
37. Casalechi HL, Leal-Junior ECP, Xavier M, Silva Junior JA, Carvalho PTC, Aimbire F, et al. Low-level laser therapy in experimental model of collagenase-induced tendinitis in rats: effects in acute and chronic inflammatory phases. *Lasers Med Sci.* 2012;28(3):989-95. DOI: 10.1007/s10103-012-1189-x
38. Guerra FR, Vieira CP, Almeida MS, Oliveira LP, Aro AA, Pimentel ER. LLLT improves tendon healing through increase of MMP activity and collagen synthesis. *Lasers Med Sci.* 2013 Sep:1281-8. DOI: 10.1007/s10103-012-1189-x
39. Joensen J, Gjerdet NR, Hummelsund S, Iversen V, Lopes-Martins RAB, Bjordal JM. An experimental study of low-level laser therapy in rat Achilles tendon injury. *Lasers Med Sci.* 2012;27(1):103-11. DOI: 10.1007/s10103-011-0925-y

40. Lima JGM, Filho Oliveira GR, Lima MTBR, Ferreira AS, Silva JG. Influence of low intensity laser therapy (AsGa) on the cicatrization process of mechanic tendon injury in Wistar rats. *Laser Physics*. 2012;22(9):1445-8. DOI: 10.1134/S1054660X12090083
41. Barbosa D, Souza RA, Carvalho WRG, Xavier M, Carvalho PK, Cunha TCR, et al. Low-level laser therapy combined with platelet-rich plasma on the healing calcaneal tendon: a histological study in a rat model. *Lasers Med Sci*. 2013; 28(6):1489-94. DOI: 10.1007/s10103-012-1241-x
42. Rizzi CF, Mauriz JL, Corrêa DSF, Moreira AJ, Zettler CG, Filippin LI, et al. Effects of low-level laser therapy (LLLT) on the nuclear factor (NF)- κ B signaling pathway in traumatized muscle. *Lasers Surg Med*. 2006;38(7):704-13. DOI: 10.1002/lsm.20371
43. Leal Júnior ECP, Lopes-Martins RAB, Almeida P, Ramos L, Iversen VV, Bjordal JM. Effect of low-level laser therapy (GaAs 904 nm) in skeletal muscle fatigue and biochemical markers of muscle damage in rats. *Eur J Appl Physiol*. 2010;108(6):1083-8. DOI: 10.1007/s00421-009-1321-1
44. Falcai MJ, Monte-Raso VV, Okubo R, Zamarioli A, Carvalho LC, Shiamano AC. Análise biomecânica e histológica de músculos gastrocnêmio de ratas submetidas à lesão muscular e tratadas com laserterapia de baixa intensidade. *Rev Bras Ortop*. 2010;45(4):444-8. DOI: org/10.1590/S0102-3616201000040001
45. Moreira FF, Oliveira ELP, Barbosa FS, Silva JG. Laserterapia de baixa intensidade na expressão de colágeno após lesão muscular cirúrgica. *Fisioter Pesqui*. 2011;18(1):37-2. DOI: org/10.1590/S1809-29502011000100007
46. Silveira PCL, Silva LA, Pinho CA, Souza PS, Ronsani MM, Scheffer DL, et al. Effects of low-level laser therapy (GaAs) in an animal model of muscular damage induced by trauma. *Lasers Surg Med*. 2012;28(2):431-6. DOI: 10.1007/s10103-012-1075-6
47. Carvalho RLP, Leal Junior ECP, Petrellis MC, Marcos RL, Carvalho MHC, De Nucci G, et al. Effects of low-level laser therapy (LLLT) and diclofenac (topical and intramuscular) as single and combined therapy in experimental model of controlled muscle strain in rats. *Photochem Photobiol*. 2013;89(2):508-12.
48. Rodrigues NC, Brunelli R, Araújo HSS, Parizotto NA, Renno ACM. Low-level laser therapy (LLLT) (660 nm) alters gene expression during muscle healing in rats.

49. Fangel R, Bossini PS, Renno AC, Ribeiro DA, Wang CC, Toma RL, et al. Low-level laser therapy, at 60 J/cm² associated with a Biosilicate® increase in bone deposition and indentation biomechanical properties of callus in osteopenic rats. *J Biomed Opt.* 2011;16(7):1-6. DOI: 10.1117/1.3598847
50. Alves ACA, Carvalho PTC, Parente M, Xavier M, Frigo L, Aimbre F, et al. Low-level laser therapy in different stages of rheumatoid arthritis: a histological study. *Lasers Med Sci.* 2012;28(2):529-36. DOI: 10.1007/s10103-012-1102-7
51. Fernandes KR, Ribeiro DA, Rodrigues NC, Tim C, Santos AA, Parizzoto NA, et al. Effects of low-level laser therapy on the expression of osteogenic genes related in the initial stage of bone defects in rats. *J Biomed Opt.* 2013;18(3):1-7. DOI: 10.1117/1.JBO.18.3.038002
52. Pufe T, Petersen WJ, Mentlein R, Tillmann BN. The role of vasculature and angiogenesis of degenerative tendons disease. *Scand J Med Sci Sports.* 2005;15(4):211-22. DOI: 10.1111/j.1600-0838.2005.00465.x
53. Chenoweth DE, Cooper SW, Hugli TE, Stewart RW, Blackstone EH, Kirklin JW. Complement activation during cardiopulmonary bypass: evidence for generation of C3a and C5a anaphylatoxins. *N Engl J Med.* 1981;304(9):497-03. DOI: 10.1056/NEJM198102263040901
54. Frangogiannis NG, Youker KA, Rossen RD, Gwechenberger M, Lindsey MH, Mendoza LH, et al. Cytokines and the microcirculation in ischemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 1998;30(12):2567-76.
55. Hayer S, Redlich K, Hermann S, Smolen J, Schett G. Tenosynovitis and osteoclast formation as the initial preclinical changes in a murine model of inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* 2007;56(1):79-8. DOI: 10.1002/art.22313
56. Schultz GS, Laswig G, Wysocki A. Extracellular matrix: review of its roles in acute and chronic wounds. *World wide wounds.* 2005. Available from <http://www.worldwidewounds.com/2005/august/Schultz/Extrace-Matric-Acute-Chronic-wounds.html>. [Accessed in July 3, 2013].
57. James R, Kesturu G, Balian G, Chhabra AB. Tendon: biology, biomechanics, repair, growth, factors and evolving treatment options. Review. *J Hand Sur.* 2008;33A(1):102-12. DOI: 10.1016/j.jhsa.2007.09.007

58. Flora Filho R, Zilberstein B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. *Metabolismo, síntese e funções. Rev Assoc Med Bras.* 2000;46(3):265-1. DOI: org/10.1590/S0104-42302000000300012
59. Marcu KB, Otero M, Olivotto E, Borzi RM, Goldring MB. NF-KAPPAB signaling: multiple angles to target OA. *Curr Drug Targets.* 2010;11(15):599-13. DOI: 10.2174/138945010791011938
60. Kuang S, Kuroda K, LE Grand F, Rudnicki MA. Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. *Cell.* 2007;129(5)999-10. DOI:10.1016/j.cell.2007.03.044
61. Bir SC, Esaki J, Marui A, Yamahara K, Tsubota H, Ikepa T, et al. Angiogenic properties of sustained release platelet-rich plasma: characterization *in-vitro* and in the ischemic hind limb of the mouse. *J Vasc Surg.* 2009;50(4):870-9. DOI: 10.1016/j.jvs.2009.06.016
62. Pavesi VCS. Efeito da criolesão no remodelamento da matriz extracelular em músculo esquelético de ratos. Dissertação, 2009. Universidade Nove de Julho. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação. 76p. São Paulo
63. Ribeiro DA, Buttros JB, Oshima CT, Bergamaschi CT, Campos RR. Ascorbic acid prevents acute myocardial infarction induced by isoproterenol in rats: role of inducible nitric oxide synthase production. *J Mol Histol.* 2009;40(2)99-05. DOI: 10.1007/s10735-009-9218-1
64. Nosaka K, Newton M. Concentric or eccentric training effect on eccentric exercise-induced muscle damage. *Med Sci Sport Exerc.* 2002;34(1):63-9.
65. Trebino CE, Stock JL, Gibbons CP, Naiman BM, Wachtmann TS, Umland JP, et al. Impaired inflammatory and pain responses in mice lacking an inducible prostaglandin E synthase. *Proceed Natl Acad Sci USA.* 2003;100(15):9044-9.
66. Wang EA, Rosen V, Cordes P. Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988;85(24):9484-8.
67. Fernandez AJF, Martinez JB, Diago MP, Bagán JV. Biophosphonates and dental implants: Current problems. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2009;14(7)355-60.
68. Forell EB, Straw RC. Bone morphogenetic proteins and bone derived growth factors. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 1993;6(3):166-71.
69. Oesser S, Adam M, Babel W, Seifert J. Oral administration of ¹⁴C-labeled gelatin hydrolysate leads to an accumulation of radioactivity in cartilage of mice (C57/BL). *J Nut.r* 1999;129(10):1891-5.

70. Silva MO, Costa MBM, Borges APB, Dornas RF, Moreira JCL, Souza MV
Indução de tendinopatia em ratos Wistar: modelo experimental. *Rev Acad Ciênc Agrár Ambient.* 2013;11(3):1-12.
71. Frick A. Stretching exercise for horses: are they effective? *J Equine Vet Sci.*)
2010;30(1):50-9. DOI: 10.1016/j.jevs.2009.12.001

Resumo das normas para publicação no periódico

Revista de Saúde Pública

Disponível em: <http://www.rsp.fsp.usp.br/mensagem/pub/mensagem.php>. Acessado em 03 de fevereiro de 2014.

O número de palavras excedeu o exigido pelo periódico, entretanto, serão realizados os ajustes necessários para adequação das normas da revista, antes do envio.

1. *Revista de Saúde Pública*: tem por finalidade publicar contribuições científicas originais sobre temas relevantes para a saúde pública em geral. Está disponível na SCIELO desde seu primeiro número publicado em 1967, com texto completo.
2. *Instruções aos Autores*: São aceitos manuscritos nos idiomas: português, espanhol e inglês. O texto submetido deve ter páginas e linhas numeradas para fins de revisão. O uso de siglas deve ser evitado. O texto de manuscritos de pesquisa original deve seguir a estrutura conhecida como IMRD: Introdução, Métodos, Resultados e Discussão. Em cada uma das partes não se deve dividir o texto em subtítulos, exceto nos casos que requerem maior detalhe, sobretudo em Resultados e Discussão. Manuscritos baseados em pesquisa qualitativa podem ter outros formatos, admitindo-se Resultados e Discussão em uma mesma seção e Considerações Finais/Conclusões. Outras categorias de manuscrito (revisões, comentários, etc.) seguem os formatos de texto a elas apropriados.
3. *Categoria dos artigos*: *Artigos Originais*: Incluem estudos observacionais, estudos experimentais ou quase-experimentais, avaliação de programas, análises de custo-efetividade, análises de decisão e estudos sobre avaliação de desempenho de testes diagnósticos para triagem populacional. Cada artigo deve conter objetivos e hipóteses claras, desenho e métodos utilizados, resultados, discussão e conclusões; *Instrumentos de aferição em pesquisas populacionais*: Manuscritos abordando instrumentos de aferição podem incluir aspectos relativos ao desenvolvimento, à avaliação e à adaptação transcultural para uso em estudos populacionais, excluindo-se aqueles de aplicação clínica, que não se incluem no escopo da RSP; *Revisão sistemática e meta-análise* - Por meio da síntese de resultados de estudos originais,

quantitativos ou qualitativos, objetiva responder à pergunta específica e de relevância para a saúde pública. Descreve com pormenores o processo de busca dos estudos originais, os critérios utilizados para seleção daqueles que foram incluídos na revisão e os procedimentos empregados na síntese dos resultados obtidos pelos estudos revisados (que poderão ou não ser procedimentos de meta-análise); Revisão narrativa/crítica - A revisão narrativa ou revisão crítica apresenta caráter descritivo-discursivo, dedicando-se à apresentação compreensiva e à discussão de temas de interesse científico no campo da Saúde Pública. Deve apresentar formulação clara de um objeto científico de interesse, argumentação lógica, crítica teórico-metodológica dos trabalhos consultados e síntese conclusiva. Sua extensão é de até 4.000 palavras, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências. O formato dos resumos, a critério dos autores, será narrativo, com até 150 palavras. Ou estruturado, com até 300 palavras. Não há limite de referências; Comentários: Visam a estimular a discussão, introduzir o debate e "oxigenar" controvérsias sobre aspectos relevantes da saúde pública. O texto deve ser organizado em tópicos ou subitens destacando na Introdução o assunto e sua importância. As referências citadas devem dar sustentação aos principais aspectos abordados no artigo; Comunicações Breves – São relatos curtos de achados que apresentam interesse para a saúde pública, mas que não comportam uma análise mais abrangente e uma discussão de maior fôlego; Publicam-se também Cartas Ao Editor com até 600 palavras e 5 referências.

4. Checklist: Consort - checklist e fluxograma para ensaios controlados e randomizados; Stard - checklist e fluxograma para estudos de acurácia diagnóstica; Moose: checklist e fluxograma para meta-análise; Prisma - checklist e fluxograma para revisões sistemáticas; Strobe - checklist para estudos observacionais em epidemiologia; Rats - checklist para estudos qualitativos.
5. Resumo: São publicados resumos em português, espanhol e inglês. Para fins de cadastro do manuscrito, deve-se apresentar dois resumos, um na língua original do manuscrito e outro em inglês (ou em português, em caso de manuscrito apresentado em inglês). Como regra geral, o resumo deve incluir: objetivos do estudo, principais procedimentos metodológicos (população em estudo, local e ano de realização, métodos observacionais e analíticos), principais resultados e conclusões.

6. Estrutura do texto: Introdução, métodos, resultados, discussão, conclusões e referências. As referências devem ser normalizadas de acordo com o estilo Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication, ordenadas alfabeticamente e numeradas. Os títulos de periódicos devem ser referidos de forma abreviada, de acordo com o Medline, e grafados no formato itálico. No caso de publicações com até seis autores, citam-se todos; acima de seis, citam-se os seis primeiros, seguidos da expressão latina “et al”. Referências de um mesmo autor devem ser organizadas em ordem cronológica crescente. Sempre que possível incluir o DOI do documentado citado, de acordo com os exemplos abaixo.

7. Artigos de periódicos: Narvai PC. Cárie dentária e flúor: uma relação do século XX. *Cienc Saude Coletiva*. 2000;5(2):381-92. DOI:10.1590/S1413-81232000000200011; Zinn-Souza LC, Nagai R, Teixeira LR, Latorre MRDO, Roberts R, Cooper SP, et al. Fatores associados a sintomas depressivos em estudantes do ensino médio de São Paulo, Brasil. *Rev Saude Publica*. 2008;42(1):34-40. DOI:10.1590/S0034-89102008000100005; Hennington EA. Acolhimento como prática interdisciplinar num programa de extensão. *Cad Saude Coletiva* [Internet]. 2005;21(1):256-65. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/csp/v21n1/28.pdf>. DOI:10.1590/S0102-311X2005000100028

8. Livros: Nunes ED. *Sobre a sociologia em saúde*. São Paulo; Hucitec; 1999. Wunsch Filho V, Koifman S. Tumores malignos relacionados com o trabalho. In: Mendes R, coordenador. *Patologia do trabalho*. 2. ed. São Paulo: Atheneu; 2003. v.2, p. 990-1040. Para outros exemplos recomendamos consultar as normas (“Citing Medicine”) da National Library of Medicine (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=citmed>). Referências a documentos não indexados na literatura científica mundial, em geral de divulgação circunscrita a uma instituição ou a um evento (teses, relatórios de pesquisa, comunicações em eventos, dentre outros) e informações extraídas de documentos eletrônicos, não mantidos permanentemente em sites, se relevantes, devem figurar no rodapé das páginas do texto onde foram citadas.

9. Citação no texto: A referência deve ser indicada pelo seu número na listagem, na forma de expoente após a pontuação no texto, sem uso de parênteses, colchetes e similares. Nos casos em que a citação do nome do autor e ano for relevante, o número da referência deve ser colocado a seguir do nome do autor. Trabalhos com dois autores devem fazer referência aos dois autores ligados por &. Nos outros casos apresentar apenas o primeiro autor (seguido de et al. em caso de autoria múltipla); A promoção da saúde da população tem como referência o artigo de Evans & Stoddart,⁹ que considera a distribuição de renda, desenvolvimento social e reação individual na determinação dos processos de saúde-doença; Segundo Lima et al⁹ (2006), a prevalência de transtornos mentais em estudantes de medicina é maior do que na população em geral. Parece evidente o fracasso do movimento de saúde comunitária, artificial e distanciado do sistema de saúde predominante.^{12,15}
10. Tabelas: Devem ser apresentadas depois do texto, numeradas consecutivamente com algarismos arábicos, na ordem em que foram citadas no texto. A cada uma deve-se atribuir um título breve, não se utilizando traços internos horizontais ou verticais. As notas explicativas devem ser colocadas no rodapé das tabelas e não no cabeçalho ou título. Se houver tabela extraída de outro trabalho, previamente publicado, os autores devem solicitar formalmente autorização da revista que a publicou, para sua reprodução. Para composição de uma tabela legível, o número máximo é de 12 colunas, dependendo da quantidade do conteúdo de cada casela. Tabelas que não se enquadram no nosso limite de espaço gráfico podem ser publicadas na versão eletrônica. Notas em tabelas devem ser indicadas por letras, em sobrescrito e negrito.
11. Figuras: As ilustrações (fotografias, desenhos, gráficos, etc.) devem ser citadas como Figuras e numeradas consecutivamente com algarismos arábicos, na ordem em que foram citadas no texto e apresentadas após as tabelas. Devem conter título e legenda apresentados na parte inferior da figura.

CAPÍTULO II

Indução de tendinopatia aguda em ratos Wistar: modelo experimental

RESUMO

SILVA, Micheline Ozana da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2013. **Efeitos da laserterapia de baixa potência associada ou não a exercício excêntrico no tratamento de tendinopatia induzida do tendão calcâneo comum de Ratos (*Rattus norvegicus*)**. Orientadora: Maria Verônica de Souza. Coorientadores: Antônio José Natali e Andréa Pacheco Batista Borges.

O objetivo desse estudo foi apresentar e avaliar um novo modelo de indução experimental de tendinopatia do tendão calcâneo comum de ratos. Para isso foram utilizados oito ratos machos da linhagem Wistar, com quatro meses de idade, pesando $345,5 \pm 45,74$ g. A lesão foi realizada de forma aleatória em um dos tendões, e o membro contralateral foi utilizado como controle. Após tricotomia e antissepsia local, os animais foram anestesiados com isoflurano. Após exposição do tendão, foi realizada compressão transversal durante 10 segundos com pinça *Halsted*, que foi seguida por 10 escarificações das fibras do tendão, em sentido próximo-distal, utilizando lâmina de bisturi. Os ratos foram submetidos à eutanásia com tiopental sódico (100 mg/kg, via intraperitoneal). Em quatro animais a eutanásia foi realizada 12 h após o procedimento cirúrgico, e em outros quatro após 24 h. Na sequência foram obtidos fragmentos de ambos os tendões que foram processados e corados com hematoxilina-eosina para histopatologia. Diferentemente dos membros utilizados como controle, avaliação microscópica realizada nos dois momentos avaliados revelou perda do paralelismo e da organização das fibras colágenas, intenso infiltrado de neutrófilos, espessamento do endotélio vascular e presença de hemácias e fibrina. As amostras obtidas 24 h apresentaram maior quantidade de neutrófilos degenerados. O método de indução de tendinopatia descrito no presente estudo foi eficiente em promover a lesão aguda em ratos. Esse projeto foi aprovado por Comissão de Ética.

Palavras-chave: Lesão. Roedores. Tendão calcâneo comum.

Acute tendinopathy induction in Wistar rats: an experimental model

ABSTRACT

SILVA, Micheline Ozana da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, november 2013. **Effects of low level laser therapy associated or not eccentric exercise on tendinopathy of the common calcaneal tendon of rats (*Rattus norvegicus*)**. Adviser: Maria Verônica de Souza. Co-advisers: Antonio José Natali and Andréa Pacheco Batista Borges.

The objective of this study was to present and evaluate a new model of experimental induction of tendinopathy in rat's common calcaneal tendon. Thus, eight 4-month-old Wistar male rats, weighing 345.5 ± 45.74 g were used. A lesion was randomly promoted on one of the tendons, and the contralateral limb was used as control. After local trichotomy and antisepsis, the animals were anesthetized with isoflurane. Following tendon exposure, a transversal compression was carried out during 10 seconds with Halsted forceps, followed by 10 proximal-distal ward scarifications of the tendon fibers, using a scalpel blade. The rats were submitted to euthanasia with sodium thiopental (100 mg/kg, intraperitoneal injection). Euthanasia was carried out in four of the animals 12 hours after the surgical procedure and in the others, 24 hours after. Following this sequence, fragments of both the tendons were obtained, processed and stained with hematoxylin-eosin (HE) for histopathological analysis. Differently from the limbs used as control, the microscopic evaluation carried out during the two time periods evaluated revealed loss of parallelism and organization of the collagen fibers, intense infiltrate of neutrophils, thickness of the vascular endothelium, and presence of erythrocytes and fibrin. The samples obtained after 24 hours presented a greater number of degenerated neutrophils. The method of induced tendinopathy described in this study was efficient in promoting acute lesion in rats. This project was approved by Ethic Committee.

Keywords: Lesion. Rodents. Common calcaneal tendon.

Introdução

O termo tendinite era frequentemente utilizado para as alterações tendíneas, indicando a presença de processo inflamatório (ALFREDSON, 2003; MAFFULLI et al., 2003). Entretanto, enquanto pesquisa revelou a coexistência de quadro inflamatório e alterações degenerativas (ALFREDSON et al., 2000), outras demonstraram pouco ou nenhum processo inflamatório (LJUNG et al., 1999; SOSLOWSKY et al., 2000). Adicionalmente, estudos histopatológicos também revelaram degeneração, de forma que, a terminologia tendinopatia passou a ser utilizada por pesquisadores para definir diversas condições dolorosas que afetam os tendões (tendinites, tendinoses), e que são acompanhadas por dor, edema e redução da função (ALFREDSON, 2003; MAFFULLI et al., 2003; WANG et al., 2006). Portanto, o termo tendinopatia deve ser utilizado para descrever lesões que afetam os tendões (LAKE et al., 2008) e que se caracteriza pela presença de inflamação e degeneração tecidual, estando normalmente associada à sobrecarga mecânica e movimentos repetitivos (CHO et al., 2011, DIRKS; WARDEN, 2011).

Acomete igualmente, tanto indivíduos fisicamente ativos quanto sedentários (WEARING et al., 2011), e pode estar relacionada com diversos fatores intrínsecos e extrínsecos ao tendão (RILEY, 2004; REES et al., 2006) como idade, genética, suprimento vascular, adaptação do tendão a cargas mecânicas e, inclusive, a utilização de fármacos (FU et al., 2010; ABATE et al., 2013) como, por exemplo, os corticosteróides (VAN DER LINDEN et al., 2003) e antibióticos (CHHAJED et al., 2002).

Os modelos animais utilizados experimentalmente para subsidiar a compreensão da tendinopatia nos humanos, devem permitir a reprodução de lesões que podem ser observadas, diagnosticados e tratadas por um período determinado de tempo (LAKE et al., 2008). Esses modelos possuem como finalidade estudar a resposta do tendão a vários fatores etiológicos (NEVIASER et al., 2012), determinar a eficácia de procedimentos clínicos ou cirúrgicos (JAMES et al., 2008), assim como o desenvolvimento de novas terapias (CHO et al., 2011).

Para ser considerado como um modelo experimental para tendinopatia, o animal necessita reproduzir características clínicas, funcionais e histopatológicas da afecção em seres humanos (LUI et al., 2011). Os ratos são considerados excelentes modelos devido à semelhança anatômica e fisiológica com a espécie humana (WARDEN, 2007; LUI et al., 2011). Existem vários métodos de indução de tendinopatia em ratos, sendo o

procedimento cirúrgico por tenotomia (LARAIA et al., 2012; BARBOSA et al., 2013) ou tenectomia (ELIASSON et al., 2012) e a administração de colagenase (MARSOLAIS et al., 2001; PIRES et al., 2011) os mais utilizados. Compressão com guilhotina (SALATE et al., 2005; JOENSEN et al., 2012), esmagamento com pinça (CARVALHO et al., 2006), trauma com carga (FILLIPIN et al., 2005), estimulação elétrica (CHO et al., 2011), sobrecarga mecânica com exercício (GLAZEBROOK et al., 2008) e o uso de substâncias como citocinas, antibióticos e prostaglandinas, também são mencionados (LUI et al., 2011).

O método ideal para indução de lesão tendínea deve ser eficiente e ter a sua eficácia comprovada. O objetivo desse estudo foi avaliar um novo modelo de indução de tendinopatia no tendão calcâneo comum de ratos, utilizando a análise histopatológica como a forma de comprovação da lesão.

Materiais e métodos

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Departamento de Veterinária (DVT) da Universidade Federal de Viçosa (Processo 108/2011). Os procedimentos foram realizados de acordo com as Normas de Conduta para o uso de animais no ensino, pesquisa e extensão do DVT/UFV.

Foram incluídos no estudo oito ratos machos da linhagem Wistar, com 4 meses de idade, pesando $345,5 \pm 45,74$ g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Uma semana antes de iniciar o experimento propriamente dito, os animais foram alojados em gaioleiros individuais, para se adaptarem às condições de temperatura (aproximadamente 26°C), e aos fotoperíodos de 12 h diárias. Os ratos foram alimentados com ração industrial própria para ratos¹ e receberam água *ad libitum*.

Todos os animais foram submetidos à tendinopatia induzida cirurgicamente, em um dos membros pélvico. A escolha foi aleatória, e o membro contralateral foi utilizado como controle. Após tricotomia da região a ser lesionada, os animais foram colocados em câmara de indução anestésica, com isoflurano a 5%² com 2 L de oxigênio por um período de aproximadamente dois min. Em seguida foram retirados da câmara e posicionados na mesa cirúrgica, onde receberam durante todo o procedimento cirúrgico isoflurano a uma menor concentração (3%), associado a 1,5 L de oxigênio. Os ratos

¹ VETCOM, Comercial Agroveterinária Ltda, Belo Horizonte, MG.

² Isoflurano, Cristália produtos químicos e farmacêuticos Ltda, Itapira, SP.

foram posicionados em decúbito ventral, sendo então realizada incisão cutânea de aproximadamente 1,5 cm na região plantar da tíbia (BRING et al., 2007). Na sequência foi realizada divulsão roma do tecido subcutâneo e exposição do tendão (Figura 1a).

A tendinopatia foi realizada no ponto médio situado entre a junção miotendínea e a inserção do tendão calcâneo comum no osso calcâneo, mediante o uso de compressão transversal (Figura 1b), durante 10 seg com pinça Halsted na segunda cremalheira, assim como 10 escarificações (Figura 1c) no sentido próximo-distal, utilizando lâmina de bisturi nº 11 (BARBOSA et al., 2013). A pele foi aproximada em padrão de sutura de Wolf, com fio de náilon 3-0³. Ainda sob efeito anestésico, foi administrada dose única de enrofloxacin, na dose de 40 mg/kg, por via intramuscular⁴, assim como de morfina⁵, na dose de 3 mg/kg, por via subcutânea, a cada 6 h, por um período máximo de 12 h. Após cirurgia, os ratos foram acomodados em local aquecido, onde permaneceram até completa recuperação do procedimento anestésico, o que ocorreu no máximo em sete min.

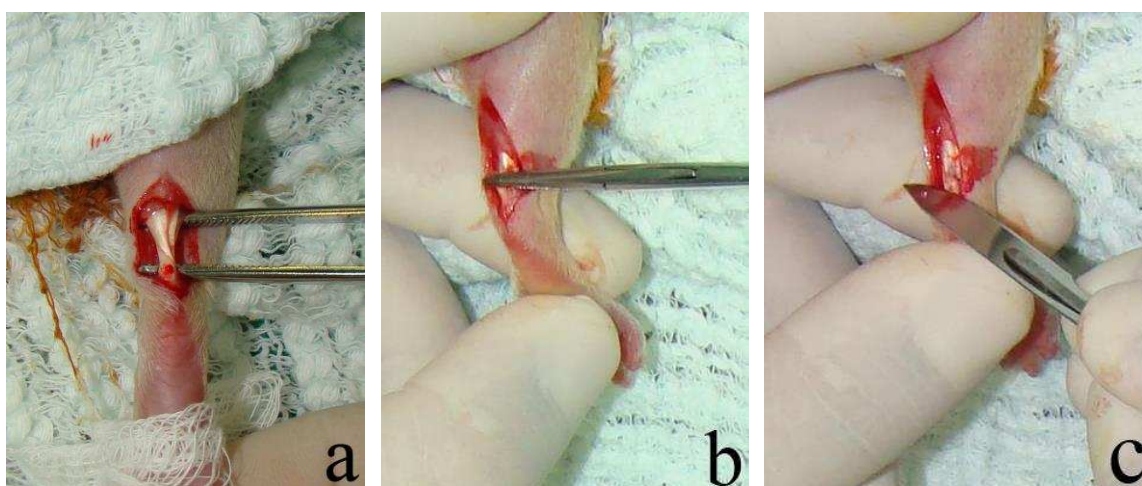


Figura 1 – Ratos Wistar, machos, 4 meses de idade; procedimento cirúrgico em tendão: (a) exposição do tendão calcâneo comum; (b) compressão transversal com pinça Halsted e, (c) escarificações com lâmina de bisturi.

A comprovação da lesão foi realizada mediante avaliação histopatológica dos tendões. Para tanto, quatro ratos foram eutanasiados com tiopental sódico⁶, por via

³ Shalon Fios Cirúrgicos Ltda, São Luiz de Montes Belos, GO.

⁴ Enrofloxacin®, Laboratórios Vencofarma do Brasil Ltda. Londrina, PR.

⁵ Dimorf®, Cristália produtos químicos e farmacêuticos Ltda, Itapira, SP.

⁶ Tiopental Sódico®, Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP.

intraperitoneal, na dose de 100 mg/kg, 12 h após indução da lesão, e os outros quatro ratos, após 24 h. As amostras do tendão obtidas desde a junção musculotendínea até a inserção no osso calcâneo foram fixadas em formol neutro e tamponado com fosfato a 10%, e processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina. As secções histológicas de 4 µm foram coradas pelas técnicas de hematoxilina-eosina (HE) (LUNA, 1968).

Os achados microscópicos foram analisados por três avaliadores sem o prévio conhecimento aos quais grupos as amostras pertenciam. Foram verificados o grau de sangramento do tendão, mediante a presença de hemácias, a existência de vasodilatação, edema, fibrina e leucócitos, aumento do número de capilares, assim como a desorganização das fibras colágenas (ORHAN et al., 2004; CARVALHO et al., 2006; ELIASSON et al., 2012). Cada variável histológica foi classificada como ausente (0), discreta (1), moderada (2), moderada a intensa (3) e intensa (4) (modificado a partir de ORHAN et al., 2004).

Resultados

O período de tempo compreendido desde o início da indução anestésica até a aplicação do antibiótico e opióide variou de 15 a 20 min. Não ocorreu nenhuma complicação cirúrgica durante os procedimentos. Durante o procedimento de obtenção das amostras para histopatologia foi observado que os tendões submetidos à indução de tendinopatia apresentaram um discreto edema quando comparado com o contralateral.

O exame histológico dos tendões utilizados como controle revelou organização e paralelismo das fibras colágenas, com fibrócitos dispersos e ausência de células inflamatórias. Os tendões submetidos à tendinopatia apresentaram alterações morfológicas características da fase inflamatória da tendinopatia aguda, com perda do paralelismo e moderada a intensa desorganização das fibras colágenas, intenso infiltrado de neutrófilos (Figura 2a), espessamento do endotélio vascular, com discreto aumento no número de capilares, discreta a moderada presença de hemácias e fibrina, assim como edema e vasodilatação em grau moderado ou de moderado a intenso. As amostras obtidas 24 h após o procedimento cirúrgico apresentaram maior quantidade de neutrófilos degenerados (Figura 2b), além de discreto infiltrado de células mononucleares, particularmente macrófagos. Por outro lado, mostraram menor quantidade de edema e vasodilatação quando comparadas com as obtidas com 12 h. A

Tabela 1 apresenta os escores verificados para cada característica histopatológica avaliada, em cada um desses tempos.

Tabela 1 - Escores obtidos durante avaliação das características histopatológicas, nas amostras de tendão analisadas 12 h e 24 h após indução cirúrgica de tendinopatia

Características histopatológicas	12 h	24 h
Hemácias	1	2
Vasodilatação	3	2
Edema	3	2
Aumento dos capilares	1	1
Leucócitos	4	4*
Fibrina	1	2
Desorganização das fibras colágenas	3	3

*: maior quantidade de neutrófilos degenerados

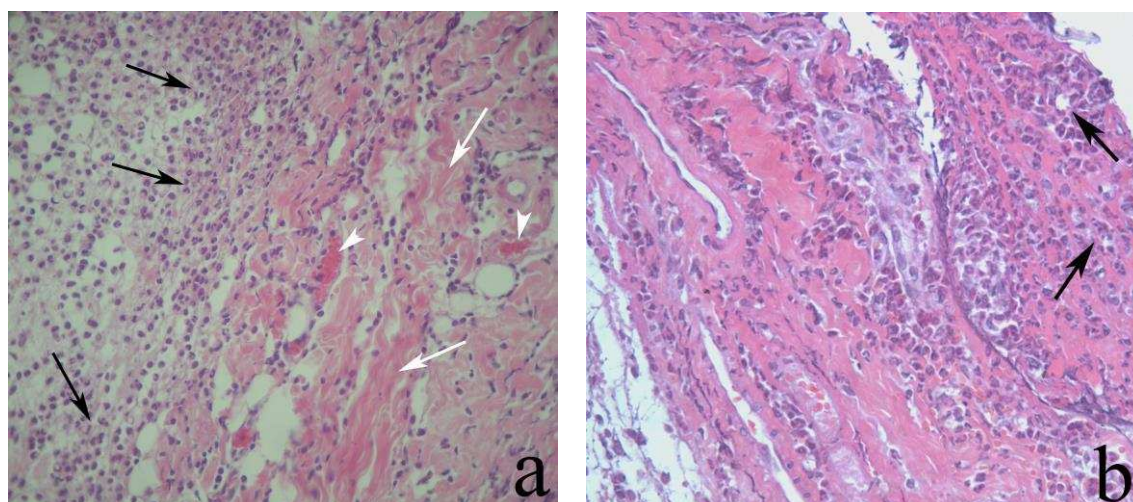


Figura 2 – Ratos Wistar, machos, 4 meses de idade, fotomicrografia do tendão submetido à tendinopatia, histopatologia: (a) intenso infiltrado inflamatório do tipo neutrofílico (setas pretas), vasos dilatados, repletos de hemácias (cabeças de setas), e colágeno desorganizado (setas brancas) em amostra avaliada 12 h, e (b) área com neutrófilos degenerados (setas pretas) 24 h após indução da lesão. Aumento de 400x (a) e 419x (b). HE.

Discussão

Apesar das pesquisas realizadas utilizando ratos como modelo experimental de tendinopatia para humanos são raras as que confirmaram a fase aguda da lesão. Normalmente os experimentos enfatizam a resposta ao tratamento realizado, não discutindo a eficácia do procedimento de indução utilizado. Adicionalmente, os escassos estudos que discutem a eficácia do procedimento de indução foram realizados para identificação de tendinopatia crônica, utilizando sobrecarga mecânica (HUANG et al., 2004; GLAZEBROOK et al., 2008). Huang et al. (2004) avaliaram o efeito da corrida em esteira durante 2, 8 e 16 semanas na lesão do tendão calcanear comum, secundária a sobrecarga do tendão do músculo supraespinhoso. Entretanto, os autores não comprovaram a eficácia do protocolo utilizado pela avaliação macroscópica, mensuração geométrica e análise biomecânica. Por outro lado, Glazebrook et al. (2008) confirmaram a eficácia dessa atividade física sobre o tendão calcanear comum mediante análises histopatológica e imunoistoquímica. De acordo com os autores, a metodologia foi efetiva já que foram encontradas alterações consistentes com aquelas descritas para o tendinopatia em seres humanos, como a diminuição da organização das fibras colágenas e o aumento de celularidade.

A confirmação de tendinopatia em um modelo animal deve ser acompanhada de aumento no número de células inflamatórias e de vasos sanguíneos, assim como desorganização da matriz tendínea (LUI et al., 2011). Como já amplamente mencionada na literatura científica, imediatamente após ocorrência de uma lesão é iniciada uma cascata de eventos celulares e bioquímicos, objetivando restaurar a função normal do tendão (JAMES et al., 2008), com a migração de plaquetas, hemácias e células inflamatórias, onde será realizada a fagocitose (WANG, 2006; ABATE et al., 2009; ROSENBAUM et al., 2010). Os neutrófilos são as primeiras células a chegar ao local da lesão (BUTTERFIELD et al., 2006), o que ocorre nas primeiras 24 h (MARSOLAIS et al., 2001), sendo responsável por iniciar o processo de reparação realizado pelos macrófagos (BUTTERFIELD et al., 2006).

O modelo de indução apresentado no presente estudo comprovou elevado incremento de neutrófilos nas amostras de tendões coletadas tanto 12 h como 24 h após o procedimento cirúrgico. A presença de neutrófilos degenerados observados particularmente nos fragmentos obtidos após 24 h de indução da tendinopatia sinaliza a ocorrência de necrose liquefativa. Eliasson et al. (2012) também relataram o aumento de hemácias após tendinopatia induzida no tendão calcanear comum de ratos por

transecção. Em outros estudos utilizando ratos como modelo experimental mediante a realização de lesão total ou parcial do tendão calcâneo comum, também foram observados desorganização das fibras colágenas (CHO et al., 2011), aumento das células inflamatórias (FILLIPIN et al., 2005; SALATE et al., 2005; CARVALHO et al., 2006; LARAIA et al., 2012), e de hemácias (ELIASSON et al., 2012; LARAIA et al., 2012), assim como neovascularização (FILLIPIN et al., 2005; LARAIA et al., 2012). Todos esses achados relatados nessas pesquisas foram encontrados no presente estudo.

A maior quantidade de vasos dilatados e de edema após 12 h da indução cirúrgica da tendinopatia revela um processo mais vascular nessas primeiras horas após a lesão, enquanto a maior quantidade de fibrina e de neutrófilos degenerados, um processo mais necrosante. A fibrina faz parte do fenômeno de inflamação aguda, e se deve ao aumento da permeabilidade vascular com extravasamento de plasma e migração de células inflamatórias.

Fillipin et al. (2005) observaram fibrose sete dias após a indução de tendinopatia do tendão calcâneo comum de ratos, que é uma característica importante na regeneração do tendão. Entretanto, quando em excesso, pode comprometer a capacidade funcional do mesmo. No presente estudo, a fibrose tecidual não foi observada, já que o período de tempo utilizado para detecção da lesão não foi suficiente para a sua formação.

É importante ressaltar que essas pesquisas objetivaram avaliar a eficácia do tratamento e não do procedimento de indução da lesão, que variou desde não invasivo (FILLIPIN et al., 2005; SALATE et al., 2005; CHO et al., 2011) até cirúrgico, por lesão parcial (LARAIA et al., 2012), total (ELIASSON et al., 2012), ou apenas por esmagamento do tendão (CARVALHO et al., 2006). No presente estudo foi realizada lesão por compressão e escarificação sendo, portanto, inédito. Tendo em vista que a lesão cirúrgica pode ser considerada como mais eficaz na indução de tendinopatia aguda, e pelo fato da casuísta em humanos ser frequentemente associada a efeitos repetitivos, a idealização de um modelo cirúrgico comprovadamente eficiente, e que não acarrete lesão tendínea demasiadamente grave é desejável para estudo da afecção.

Conclusão

O modelo de indução cirúrgica do tendão calcâneo comum de ratos Wistar por compressão transversal seguida por escarificações é comprovadamente eficiente em

ocasionar tendinopatia aguda, já que resulta em alterações histopatológicas compatíveis com a fase inflamatória da afecção.

Agradecimentos

Os autores agradecem a CAPES pela concessão da bolsa de mestrado a primeira autora do trabalho, assim como ao CNPq pelo suporte financeiro (processo nº 472832/2012-3).

Referências

ABATE, M. et al. Pathogenesis of tendinopathies: inflammation or degeneration? Review. **Arthritis Research & Therapy**, v. 11, n. 3, p. 1-15, 2009.

ABATE, M. et al. Occurrence of tendon pathologies in metabolic disorders. Review. **Rheumatology**, v.52, n.4, p. 599-608, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/htm>>. Acesso em: 20 jan 2013.

ALFREDSON, H. Chronic midportion Achilles tendinopathy: an update on research and treatment. **Clinics in Sports Medicine**, v. 22, n. 4, p. 727-741, 2003.

ALFREDSON, H. et al. *In vivo* investigation of ECRB tendons with microdialysis technique - no signs of inflammation but high amounts of glutamate in tennis elbow. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, v. 71, n. 5, p. 475-479, 2000.

BARBOSA, D. et al. Low-level laser therapy combined with platelet-rich plasma on the healing calcaneal tendon: a histological study in a rat model. **Laser in Medical Science**, v.28, p. 1489-1494, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/htm>>. Acesso em: 15 jan 2013.

BRING, D. K-I. et al. Physical activity modulates nerve plasticity and stimulates repair after Achilles tendon rupture. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 25, n. 2, p. 164-172, 2007.

BUTTERFIELD, T. A.; BEST, T. M.; MERRICK, M. A. The dual roles of neutrophils and macrophages in inflammation: a critical balance between tissue damage and repair. **Journal of Athletic Training**, v. 41, n. 4, p. 457-465, 2006.

CARVALHO, P. T. C. et al. Histological study in malnourished Wistar rats treated with ultrasound therapy. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 21, suppl. 4, p. 13-17, 2006.

CHHAJED et al. Achilles tendon disease in lung transplant recipients: association with ciprofloxacin. **European Respiratory Journal**, v. 19, n. 3, p. 469-471, 2002.

CHO, N. S. et al. Tendinosis-like histologic and molecular changes of the Achilles tendon to repetitive stress. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 469, n. 11, p. 3172-3180, 2011.

DIRKS, R. C.; WARDEN, S. J. Models for the study of tendinopathy. **Journal of Musculoskelet & Neuronal Interaction**, v. 11, n. 2, p. 141-149, 2011

ELIASSON, P.; ANDERSSON, T; ASPENBERG, P. Achilles tendon healing in rats is improved by intermittent mechanical loading during the inflammatory phase. **Journal of Orthopaedic Research**. v. 30, n. 2, p. 274-279, 2012.

FILLIPIN, L. I. et al. Low-level laser therapy (LLLT) prevents oxidative stress and reduces fibrosis in rat traumatized Achilles tendon. **Laser in Surgery and Medicine**, v. 37, n. 4, p. 293-300, 2005.

FU, S-C. et al. Deciphering the pathogenesis of tendinopathy: a three-stages process. **Sports Medicine, Arthroscopy, Rehabilitation, Therapy & Technology**, v. 2, n. 30, p. 1-12, 2010.

GLAZEBROOK, M. A. et al. Histological analysis of Achilles tendons in an overuse rat model. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 26, n. 6, p. 840-846, 2008.

HUANG, T-F. et al. The effect of overuse activity on Achilles tendon in a animal model: a biomechanical study. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 32, n. 3, p. 336-341, 2004.

JAMES, R. et al. Tendon: biology, biomechanics, repair, growth, factors and envolving treatment options. Review. **The Journal of Hand Surgery**, v. 33A, n. 1, p. 102-112, 2008.

JOENSEN, J. et al. An experimental study of low-level laser therapy in rat Achilles tendon injury. **Laser in Medical Science**, v. 27, n. 1 p. 103-111, 2012.

LAKE, S. P.; ANSORGE, H. L.; SOSLOWSKY, L. J. Animal models for tendinopathy. **Disability and Rheabilitation**, v. 30, n. 20-22, p. 1530-1541, 2008.

LARAIA, E. M. S. et al. Effect of low-level laser therapy (660 nm) on acute Inflammation induced by tenotomy of Achilles tendon in rats. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, n. 6, p. 1546-1550, 2012.

LJUNG, B. O.; FORSGREN S.; FRIDEN, J. Sympathetic and sensory innervations are heterogeneously distributed in relation to the blood verssels at the extensor carpiradialis brevis muscle origin of man. **Cells Tissues Organs**, v. 165, n. 1, p. 45-54, 1999.

LUI, P. P. Y.; MAFFULLI, N.; SMITH, R. K. W. What are the validated animal models for tendinopathy? Review. **Sandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 21, n. 1, p. 3-17, 2011.

LUNA, G. L. **Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology**. 3rd ed. New York: McGraw-Hill, 1968.

MAFFULLI, N.; WONG, J.; ALMEKINDERS, L. C. Types and epidemiology of tendinopathy. **Clinics in Sports Medicine**. v. 22, n. 4, p. 675-692, 2003.

MARSOLAIS, D.; CÔTÉ, C. H.; FRENETTE, J. Neutrophils and macrophages accumulate sequentially following Achilles tendon injury. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 19, n. 6, p. 1203-1209, 2001.

NEVIASER, A.; ANDARAWIS-PURI, N.; FLATOW, E. Basic mechanisms of tendon fatigue damage. **Journal of Shoulder and Elbow Surgery**, v. 21, n. 2, p. 158-163, 2012.

ORHAN, Z. et al. The effect of extracorporeal shock waves on a rat model of injury to tendo Achillis: a histological and biomechanical study. **The journal of Bone & Joint Surgery (Br)**, v. 86-B, n. 4, p. 613-618, 2004.

PIRES, D. et al. Low-level laser therapy (LLLT; 780 nm) acts differently on mRNA expression of anti- and pro-inflammatory mediators in an experimental model of collagenase-induced tendinitis in rat. **Laser in Medical Science**, v. 26, n. 1, p. 85-94, 2011.

RESS, J. D.; WILSON, A. M.; WOLMAN, R. L. Current concepts in the management of the discorders. **Rheumatology**, v. 45, n. 5, p. 508-521, 2006.

RILEY, G. The pathogenesis of tendinopathy. A molecular perspective. Review. **Rheumatology Research**, v. 43, n. 2, p. 131-142, 2004.

ROSENBAUM, A. J. et al. Histologic stages of healing correlate with restoration of tensile strength in a model of experimental tendon repair. **The Musculoskeletal Journal of Hospital for Special Surgery**, v. 6, n. 2, p. 164-170, 2010.

SALATE, A. C. B. et al. Effect of In-Ga-Al-P Diode laser irradiation on angiogenesis in partial ruptures of Achilles tendon in rats. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 23, n. 5, p. 470-475, 2005.

SOSLOWSKY, L. J. et al. Overuse activity injures the supraspinatus tendon in an animal model: a histologic and biomechanical study. **Journal of Shoulder Elbow Surgery**, v. 9, n. 2, p. 79-84, 2000.

VAN DER LINDEN et al. Increased risk of Achilles tendon rupture with quinolone antibacterial use especially in elderly patients taking oral corticosteroids. **Archives of Internal Medicine**, v. 163, n. 15, p. 1801-1807, 2003.

WANG, J. H-C. Mechanobiology of tendon. Review. **Journal of Biomechanics**, v. 39, n. 9, p. 1563-1582, 2006.

WARDEN, S. J. Animal models for the study of tendinopathy. Review. **British Journal Sports Medicine**, v. 41, n. 4, p. 232–240, 2007.

WEARING, S. C. et al. The acute response of tendon to loading: implications for rehabilitation. **Journal of Foot and Ankle Research**, v. 4, suppl. 1, p. 13, 2011.

Resumo das normas para publicação no periódico
Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais

Disponível em: <http://www2.pucpr.br/reol/index.php/ACADEMICA?dd99=contact>.
Acessado em 05 março de 2013.

1. A Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais é uma publicação trimestral da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), vinculada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGCA), que tem como objetivo publicar trabalhos originais de pesquisa, destinados à área de Ciência Animal (Medicina Veterinária, Zootecnia, Ciência e Tecnologia de Alimentos de Origem Animal) na forma de artigos, temas contemporâneos e notas técnicas, destinados aos profissionais de áreas afins.
2. Normas editoriais: Todos os artigos devem ser inéditos e serão submetidos à avaliação dos pares, não podendo ser encaminhados para apreciação simultânea em outros periódicos. A seleção levará em consideração a qualidade do trabalho. A análise dos trabalhos recebidos pela Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais tem como base o sistema peer review. Os trabalhos recebidos são inicialmente apreciados pelos editores e, estando de acordo com as normas para publicação e considerados como potencialmente publicáveis, são encaminhados para os consultores ad hoc que serão escolhidos pelo Editor.
3. Tipos de trabalhos aceitos: Artigos de revisão: sob convite do Conselho Editorial; Artigo: oriundos de resultado de pesquisa de natureza empírica, experimental ou conceitual, sua estrutura deve conter: Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusão e Referências. O texto deve ser elaborado entre 10 e 15 páginas e conter até 5 ilustrações. Temas contemporâneos: Devem apresentar a mesma estrutura do artigo; Notas Técnicas: oriundas de revisão de literatura, contendo introdução, Metodologia, Resultados, Discussão e Referências. O texto deve ser elaborado entre 5 e 7 páginas e conter até três ilustrações.
4. Cabeçalho: a) O título do artigo será em português (Letra inicial maiúscula, em negrito, fonte Times New Roman, tamanho 14, parágrafo centralizado) e em inglês

(Letra inicial maiúscula, fonte Times New Roman, tamanho 12, parágrafo centralizado). O título deve conter no máximo 12 palavras, sendo suficientemente específico e descritivo.

5. Resumo e abstract: a) Os conteúdos do Resumo e do Abstract não devem diferir um do outro e a apresentação deles deve ser sintetizada com os pontos principais do texto, destacando as considerações emitidas pelo autor. Para elaboração do resumo, observar a NBR 6028 da ABNT (entre 100 e 250 palavras); b) Palavras-chave e Keywords são descritores que identificam o conteúdo do artigo. Para padronizar as palavras-chave utilizar os Thesaurus da área de atuação correspondente. O número de descritores é de no mínimo três e no máximo cinco. Trabalhos em fase de elaboração devem ser citados acompanhados da expressão “no prelo”, dados não publicados não serão aceitos.

6. Outras considerações: As ilustrações (figuras, gráficos, quadros e tabelas) devem ser limitadas ao número máximo de cinco (5), inseridas no corpo do texto, identificadas e numeradas consecutivamente em algarismos arábicos. Os trabalhos podem ser encaminhados em português ou inglês; Abreviações oficiais poderão ser empregadas somente após uma primeira menção completa. Deve ser priorizada a linguagem científica para os manuscritos científicos; Afirmações, opiniões e conceitos expressados nos artigos são de responsabilidade dos autores; Agradecimentos devem ser sintéticos e concisos; Não serão publicadas fotos coloridas, a não ser em caso de absoluta necessidade e a critério da Comissão Editorial. Nesse caso, haverá necessidade de o autor enviar, em anexo, uma carta de solicitação de imagens coloridas. Trabalhos em fase de elaboração devem ser citados acompanhados da expressão “no prelo”, dados não publicados não serão aceitos.

7. As referências: No final do trabalho devem ser organizadas e apresentadas em ordem alfabética de acordo com o sobrenome do primeiro autor. Para elaboração das referências deve ser observada a norma NBR 6023 da ABNT, 2002.
 - 7.1. Livro de um só autor: JORDAN, C. F. Nutrient cycling in tropical forest ecosystems. New York: John Wiley, 1985.

- 7.2. Livro com dois autores: FELDMAN, E. C.; NELSON, R. W. Canine and feline endocrinology and reproduction. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1996.
- 7.3. Livro com três ou mais autores: SOARES, C. P. B. et al. Dendrometria e inventário florestal. Viçosa: UFV, 2006.
- 7.4. Capítulos de livros: ROCA, W. M. et al. Métodos de conservación in vitro del germoplasma. In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. (Ed.). Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1991. p. 697- 712.
- 7.5. Dissertações ou teses: SOCHER, L. G. Dinâmica e biomassa aérea de um trecho de Floresta Ombrófila Mista Aluvial no município de Araucária, Paraná. 2004. 87 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, 2004.
- 7.6. Artigos científico de um autor: BURT, S. A. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. International Journal of Food Microbiology, v. 94, n. 2, p. 223-253, 2004.
- 7.7. Artigos científicos de dois autores: SCHAUBER, J.; GALLO, R. L. Antimicrobial peptides and the skin immune defense system. Journal of Allergy and Clinical Immunology, v. 122, n. 2, p. 261-266, 2008.
- 7.8. Artigos científicos de três ou mais autores: MURRAY, R. C. et al. Subchondral bone thickness, hardness and remodeling are influenced by short-term exercise in a site-specific manner. Journal of Orthopaedic Research, v. 19, p. 1035-1042, 2001.
- 7.9. Citações: Citações dos autores no texto devem seguir as orientações da ABNT 10520 (2002); Citação indireta: Texto baseado na obra do autor consultado; Citação de citação: Para citação direta ou indireta de um texto em que não se teve acesso ao original, deve ser usada a expressão apud. Exemplo: No modelo serial de Gough (1972 apud NARDI, 1993), o ato de ler envolve um processamento serial que começa com uma fixação ocular sobre o texto, prosseguindo da esquerda para a direita de forma linear. Um autor: De acordo com Jordan (1985), a ciclagem do K na relação solo-planta é mais rápida do que a de outros nutrientes, por se tratar de um cátion monovalente; A ciclagem do K na relação solo-planta é mais rápida do que a de outros nutrientes, por se tratar de um cátion monovalente (JORDAN, 1985). Dois autores: Segundo Magalhães e Blum (1999), qualquer que seja o motivo que tenha provocado as diferenças na serapilheira acumulada entre as UAPs, os processos de

queda de folhas melhoram a fertilidade da camada superficial do solo, estabelecendo uma relação C/N e um pH mais favorável ao desenvolvimento biótico. Três ou mais autores: Conforme Floss et al. (1999), os estudos sobre a produção de serapilheira têm sido realizados por prover informações sobre a taxa de decomposição, quando combinada com a quantificação de serapilheira acumulada no piso florestal; Os estudos sobre a produção de serapilheira têm sido realizados por prover informações sobre a taxa de decomposição, quando combinada com a quantificação de serapilheira acumulada no piso florestal (FLOSS et al., 1999).

CAPÍTULO III

Análises clínica e biomecânica do tendão calcâneo comum de ratos Wistar submetido à laserterapia associada ou não a exercício excêntrico

Resumo

SILVA, Micheline Ozana da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2013. **Efeitos da laserterapia de baixa potência associada ou não a exercício excêntrico no tratamento de tendinopatia induzida do tendão calcâneo comum de Ratos (*Rattus norvegicus*)**. Orientadora: Maria Verônica de Souza. Coorientadores: Antônio José Natali e Andréa Pacheco Batista Borges.

Tanto a laserterapia como os exercícios excêntricos são utilizados em lesões tendíneas, mas a associação dessas modalidades fisioterapêuticas ainda é pouco investigada. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da terapia com laser de baixa potência associada a exercício excêntrico (caminhada em declive) na tendinopatia do tendão calcâneo comum (TCC) de ratos Wistar, mediante análises clínica e biomecânica. Foram utilizados 18 tendões calcâneo comum, provenientes de 15 ratos machos adultos, com $13 \pm 1,4$ semanas de idade. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos (L=laser; E=exercício excêntrico; LE=laser e exercício excêntrico; R=repouso; CL= tendão contralateral e S=tendão sadio), contendo três ratos em cada um deles. Tendinopatia unilateral com lesão induzida foi realizada mediante compressão transversal seguida por escarificações das fibras dos tendões. Os tratamentos laserterapia ($904 \text{ nm}/3 \text{ J/cm}^2$) e/ou exercício excêntrico (caminhada em declive; 12 m/min ; 50 min/dia ; esteira com 15° de inclinação) iniciaram 24 h após cirurgia e permaneceram por 20 dias. Todos os animais foram submetidos à avaliação física a cada três dias, com a eutanásia realizada 21 dias após indução de tendinopatia. O TCC e região adjacente foram avaliados macroscopicamente, e o diâmetro tendíneo transversal mensurado. Na sequência os tendões de ambos os membros foram obtidos e congelados a -20°C até o momento da análise biomecânica, onde foram analisadas as características carga (N), tensão na carga (MPa) e extensão (mm) máximas. Edema local foi observado nas primeiras 72 h do pós-operatório, mas não foi constatado dor durante exame físico. Não houve a formação de aderência fibrosa e nem aumento no diâmetro transversal dos tendões. O grupo submetido a exercício excêntrico apresentou menor ($p=0,0000$) capacidade de locomoção entre os animais lesionados. Não houve diferença entre os grupos nas características biomecânicas carga máxima ($p=0,4379$), tensão na

carga ($p=0,4605$) e extensão máxima ($p=0,3820$) avaliadas, inclusive considerando-se os tendões sadios e contralaterais. Entretanto, foi observado entre os tendões lesionados, que os do grupo LE necessitaram maior carga e tensão para se romperem. A ausência de diferenças significativas entre grupos pode estar relacionada com o período de 21 dias adotado para a avaliação biomecânica. Provavelmente esse tempo foi suficiente para a reparação fisiológica dos tendões de ratos Wistar. A utilização concomitante de laser de baixa potência e o exercício excêntrico caminhada, iniciados 24 h após tendinopatia induzida cirurgicamente, não resultou em um tendão biomecanicamente tão resistente ou elástico quanto um tendão saudável. Por outro lado, também não influenciou negativamente na estrutura e função do TCC.

Palavras-chave: laser de baixa potência, atividade física, resistência mecânica a tração, tendinopatia, caminhada em esteira.

Clinical and biomechanical analyzes of the common calcaneal tendon of Wistar rats
underwent laser therapy associate or not eccentric exercise

Abstract

SILVA, Micheline Ozana da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, november 2013. **Effects of low level laser therapy associated or not eccentric exercise on tendinopathy of the common calcaneal tendon of rats (*Rattus norvegicus*)**. Adviser: Maria Verônica de Souza. Co-advisers: Antônio José Natali and Andréa Pacheco Batista Borges.

Both laser therapy and eccentric exercise are used in tendon injuries; however, the association of these physiotherapeutic modalities is yet little investigated. The objective of the present study was to evaluate the effect of low-level laser therapy associated to eccentric exercise (downhill walking) on tendinopathy of the common calcaneal tendon (CCT) of Wistar rats, by clinical and biomechanical analyzes. Eighteen common calcaneal tendons were used obtained from 15 male adult rats, 13 ± 1.4 weeks old. Animals were randomly distributed in six groups (L=laser; E=eccentric exercise; LE=laser and eccentric exercise; R=rest; CL= contralateral tendon; and H=healthy tendon), with three rats each of them. Unilateral tendinopathy with induced lesion was done by transversal compression followed by scarification of tendon fibers. The treatments laser therapy (904 nm/3 J/cm²) and/or eccentric exercise (downhill walking; 12 m/min; 50 min/day; 15° inclination treadmill) began 24 hours after surgery and remained for 20 days. All animals were submitted to physical evaluation every three days, with euthanasia performed 21 days after lesion induction. CCT and adjacent area were macroscopically evaluated and the transversal tendon diameter was measured. Following, tendons of both limbs were collected and frozen at -20°C until biomechanical analysis, on which the characteristic of maximum load (N), stress at ultimate (MPa) and maximum extension (mm) were analyzed. Local edema was observed on the first 72 h postoperative, but no pain was detected under physical examination. No fibrous adhesions were observed nor an increase in transversal diameter of the tendons. The group submitted to eccentric exercise presented the lower ($p=0.0000$) locomotion capacity among injured animals. No difference occurred between groups for the evaluated biomechanical characteristics maximum load ($p=0.4379$), stress at ultimate ($p=0.4605$) and maximum extension ($p=0.3820$), even considering healthy and contralateral tendons. However, it was observed among injured

tendons, that the LE group required greater load and strain to rupture. The absence of significant difference between groups may be related to the 21 days-period used for biomechanical evaluation. Probably this time was enough for physiological repair of Wistar rats tendon. The concomitant use of low-level laser and the eccentric exercise walking, beginning at 24 h after surgically induced tendinopathy, does not result in a tendon biomechanically as resistant or elastic as a healthy tendon. On the other hand, it also does not influence negatively the structure and function of the CCT.

Keywords: low-level laser therapy, physical activity, tensile strength, tendinopathy, treadmill walking.

Introdução

A terminologia tendinopatia é utilizada para definir diversas condições dolorosas que afetam os tendões, e que são acompanhadas por dor, edema, perda de função (Alfredson, 2003; Maffulli et al., 2003; Wang et al., 2006; Kaux et al., 2011), assim como alterações nos tecidos adjacentes às articulações por onde a estrutura tendínea realiza o seu trajeto anatômico (Wang et al., 2012).

Os tendões possuem a função de transmitir força muscular (James et al., 2008, Wang et al., 2012), estabilizar a articulação e, portanto, permitem adequada movimentação dos membros (Wang et al., 2012). Sua organização paralela com fibras dispostas de forma helicoidal possibilita sua resistência à tração (James et al., 2008). Também possuem a capacidade de alterar seu metabolismo, sua estrutura e propriedades biomecânicas e, possivelmente, sofrer adaptações em resposta às cargas a que são submetidos (Wang, 2006). Por outro lado, uma adaptação anormal a essas cargas pode levar ao surgimento de tendinopatia (Tardioli et al., 2012), que pode estar relacionada com diversos fatores intrínsecos e extrínsecos ao tendão (Riley, 2004; Rees et al., 2006) como idade, genética, suprimento vascular (Abate et al., 2013) e, inclusive, aplicação de medicamentos, como, por exemplo, as fluoroquinolonas em pacientes que possuem suscetibilidade idiossincrática (Chhajed et al., 2002), ou seja, uma predisposição individual.

Uma vez lesionado, dependendo da gravidade, pode levar meses para completa reparação do tendão. Entretanto, as características biomecânicas podem não retornar a sua normalidade (Hope e Saxby, 2007). Portanto, existe uma busca incessante por modalidades terapêuticas que promovam uma recuperação mais rápida e de melhor qualidade dos tendões. Nesse contexto, o laser de baixa potência é uma terapia que vem sendo utilizada em lesões tendíneas, por promover analgesia (Aras et al., 2010), e por estimular a síntese de colágeno (Dogan et al., 2010), fatores de crescimento e a angiogênese, o que possibilita o reparo tecidual mais rápido (Salate et al., 2005), com adequada organização estrutural das fibras de colágeno (Arruda et al., 2007).

Atividade física controlada também é considerada como uma alternativa importante não apenas para a prevenção, mas como forma de tratamento das tendinopatias (Riley, 2008). Entre as atividades utilizadas se destacam as que utilizam os exercícios com contração excêntrica, onde a força gerada pelo músculo não é suficiente para superar a carga a ele imposta. Portanto, as fibras musculares se estendem e alongam quando estão contraindo (Frick, 2010), o que resulta em importantes

adaptações fisiológicas na força e massa muscular. A caminhada em declive é um tipo de exercício excêntrico (Duan et al., 1990), que de acordo com Langberg et al. (2007), provoca melhora na estrutura do tendão, com aumento na produção do colágeno. Essas características favorecem uma melhor qualidade de reparação ao tecido, deixando-o o mais próximo das suas características normais.

O presente estudo parte da hipótese de que a associação de laserterapia com exercício excêntrico controlado resultará em um processo de reparação mais rápido, com um tendão mais resistente a cargas e com menor rigidez. Nesse sentido, o objetivo desse estudo foi avaliar, mediante estudo biomecânico, a resposta à terapia com laser de baixa potência arseneto de gálio (GaAs), associada a exercício excêntrico, na tendionopatia do tendão calcâneo comum de ratos Wistar.

Material e Métodos

Esse projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa (Processo 108/2011). Os procedimentos foram realizados de acordo com as Normas de Conduta para o Uso de Animais no Ensino, Pesquisa e Extensão do DVT/UFV, o Código de Ética Profissional do Médico Veterinário, os princípios éticos para pesquisa animal, estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e a Legislação brasileira vigente.

Foram utilizados 18 tendões calcâneo comum, provenientes de 15 ratos adultos (*Rattus Norvegicus*, linhagem Wistar), machos, com idade entre 12 e 14 semanas ($13\pm 1,4$), e peso corporal variando entre 300 e 350 g ($325\pm 35,35$). Somente foram incluídos no estudo animais com integridade física do aparelho locomotor, determinada após exame físico, onde foram realizados testes comportamentais para avaliação da sensibilidade dolorosa e capacidade de locomoção (Tabela 1).

A sensibilidade dolorosa foi avaliada mediante escala subjetiva, classificada de 0 a 5, conforme protocolo utilizado por Attal et al. (1990) com adaptações (reclassificação dos escores, e maiores detalhes sobre as características). A capacidade motora foi avaliada com escores que variaram de 0 a 12, segundo protocolo descrito por Silva (2008), onde quanto maior o escore, mais próximo o animal se encontrava da normalidade. Para essa avaliação, foi observada a atividade espontânea dos animais, no que se refere ao movimento dos membros pélvicos e andamento, ou seja, a deambulação. Inicialmente, os animais foram colocados individualmente em um espaço de 1,5 m de comprimento por 0,5 m de largura, para observação do andamento

(incluindo claudicação) e, na sequência, foram submetidos a uma avaliação mais específica, realizada em barras de madeira. Foram utilizadas seis barras, cada uma com 1 m de comprimento, e com larguras de 7,7; 6,7; 5,7; 4,7; 3,7; 2,7 e 1,7 cm. Todos os ratos foram colocados para caminhar duas vezes em cada uma das barras, sendo o procedimento realizado da barra mais larga para a mais estreita.

Durante o período de uma semana, os animais foram alojados em gaioleiros individuais (Beiramar Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, SP, Brasil), para se adaptarem às condições de temperatura de aproximadamente 26°C, e aos fotoperíodos de 12 h diárias. Todos os ratos se movimentaram livremente dentro da gaiola, receberam ração comercial (VETCOM Comercial Agroveterinária Ltda, Belo Horizonte, MG, Brasil), e água *ad libitum*.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos (L, E, LE, R, S e CL) contendo três amostras de tendões em cada grupo. O grupo “L” foi composto por animais submetidos à laserterapia, enquanto que o grupo “E” a exercício excêntrico do tipo caminhada em esteira. Os animais do grupo “LE” foram submetidos tanto a laserterapia quanto a caminhada em esteira, já os do grupo “R” ficaram em repouso durante todo o processo de reparação tendínea. No grupo “S”, os animais possuíam completa integridade dos tendões, ou seja, eram sadios, e o grupo “CL” foi formado pelo membro contralateral ao tendão lesionado dos grupos R, E e LE (escolha aleatória). A identificação dos animais foi realizada por meio de sequência numérica localizada na cauda, de acordo com o grupo a que pertenciam. Os animais dos grupos E e R foram manipulados como se fossem receber a radiação, porém o equipamento foi mantido desligado.

Tabela 1 Teste comportamental baseado na sensibilidade dolorosa e na capacidade motora

Escore	Avaliação física
Sensibilidade dolorosa (de acordo com Attal et al., 1990)	
0	Ausente (região distal do membro pressiona normalmente no solo)
1	Discreta (região distal do membro repousa discretamente no solo, com manutenção dos dígitos flexionados)
2	Discreta a moderada (apenas a face interna da região distal do membro é pressionada no solo durante o andamento)
3	Moderada (apenas a região talocalcânea é pressionada no solo)
4	Moderada a intensa (toda a região distal se encontra elevada)
5	Intensa (região distal elevada e sendo lambida pelo animal)
Capacidade Motora (de acordo com Silva, 2008)	
0	Nenhum movimento nos posteriores, sem apoio de peso
1	Movimento sutil, desconexo dos posteriores, sem apoio de peso
2	Movimento bem visível nos posteriores, sem apoio de peso
3	Apoio de peso nos posteriores, anda com déficit
4	Anda com dificuldade moderada
5	Anda com déficit discreto e não consegue andar na barra de 7,7 cm
6	Anda normal ou com déficit discreto, e consegue andar na barra de 7,7 cm
7	Consegue andar na barra de 6,7 cm
8	Consegue andar na barra de 5,7 cm
9	Consegue andar na barra de 4,7 cm
10	Consegue andar na barra de 3,7 cm
11	Consegue andar na barra de 2,7 cm
12	Consegue andar na barra de 1,7 cm

Indução de tendinopatia

A escolha de qual tendão calcanear comum seria submetido à tendinopatia unilateral foi aleatória. Para realização da indução cirúrgica de tendinopatia, os ratos foram submetidos a jejum alimentar (2 h), e hídrico (1 h) antes do início do procedimento

anestésico, que foi realizado conforme descrito por Silva et al. (2013). Após tricotomia na região plantar do membro pélvico, os animais foram colocados em câmara de indução onde receberam isoflurano (Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP, Brasil) na concentração de 5% em 2 L de O₂ por um período de aproximadamente 2 min. Na sequência foram retirados da câmara e posicionados na mesa cirúrgica, onde continuaram recebendo isoflurano (3% em 1,5 L de O₂) durante todo o procedimento cirúrgico.

Após antisepsia local com iodo-povidine tópico a 1% (Rioquímica Indústria Farmacêutica, São José do Rio Preto, SP, Brasil), os animais foram posicionados em decúbito ventral, sendo então realizada incisão cutânea longitudinal de aproximadamente 1,5 cm na região plantar do membro pélvico direito ou esquerdo, (escolha aleatória), utilizando bisturi nº 11. Na sequência foi realizada divulsão romba do tecido subcutâneo e exposição do tendão calcâneo comum. A lesão foi realizada no ponto médio situado entre a junção miotendínea e a inserção do tendão no osso calcâneo, mediante a realização de compressão transversal de toda a espessura do tendão durante 10 segundos, utilizando duas cremalheiras da pinça *Halstead* mosquito hemostática, assim como 10 escarificações das fibras do tendão, em sentido próximal, utilizando lâmina de bisturi nº 11. Em seguida a pele foi suturada utilizando Nylon 3-0 (Shalon Fios Cirúrgicos Ltda, São Luiz de Montes Belos, GO, Brasil), no padrão contínuo, do tipo *Wolff*.

Ainda com os animais sob efeito anestésico, foi administrada dose única (40 mg/kg) do antibiótico enrofloxacin (Laboratórios Vencofarma do Brasil Ltda, Londrina, PR, Brasil) por via intramuscular, assim como o analgésico morfina [3 mg/kg, via subcutânea (Cristália produtos químicos e farmacêuticos Ltda, Itapira, SP, Brasil)], que foi repetido a cada 6 h, por um período de 12 h. Ao final do procedimento cirúrgico, os animais foram acomodados em aquecedores, a uma temperatura de aproximadamente 27°C, onde permaneceram até completa recuperação anestésica, o que ocorreu em um tempo máximo em 7 min. Durante o período pós-operatório, as feridas foram limpas diariamente com gaze embebida em água corrente.

Tratamentos

Os animais dos grupos L e LE receberam laser de baixa potência, a base de GaAs. A aplicação foi realizada de forma pontual, com a caneta de laser localizada em um único ponto, no modo pulsátil, durante 9 seg/dia, com o aparelho laserpulse (Ibramed

Indústria Brasileira de Equipamentos Médicos Ltda, Amparo, SP, Brasil), comprimento de onda de 904 nm, densidade de energia de 3 J/cm² e potência máxima de 100 mW/cm². O tratamento foi iniciado 24 h após indução da lesão, sendo aplicado diariamente por um período de 20 dias. Durante a aplicação do laser, os animais foram imobilizados manualmente e posicionados em decúbito ventral, conforme protocolo utilizado por Xavier et al. (2010). O aparelho foi colocado perpendicular à lesão, sendo a radiação feita sempre no mesmo horário, observando um intervalo de 24 h entre as aplicações, conforme descrito por Taciro et al. (2007) e Silva et al. (2011). Como medida de segurança, os executores utilizaram óculos de proteção (Ibramed Indústria Brasileira de Equipamentos Médicos Ltda, Amparo, SP, Brasil) contra a radiação emitida.

Os animais dos grupos E e LE foram submetidos diariamente a exercício excêntrico controlado, a partir de 24 h da indução de tendinopatia. Foi adotado um protocolo de caminhada em esteira rolante com motor elétrico (Insight Pesquisa e Ensino Ltda, São Paulo, SP, Brasil) própria para ratos, durante um período de três semanas, modificado a partir do descrito por Nakamura et al. (2008), que utilizaram corrida em esteira, com maior período de exercício (60 min) e velocidade (15m/min). Com a finalidade de adaptação prévia ao exercício, os ratos foram exercitados durante sete dias consecutivos antes da indução cirúrgica da lesão.

A velocidade foi fixada em 12 m/min, por um tempo de 50 min/dia, tanto durante o período de adaptação como no experimental. A esteira foi mantida com 15° de inclinação, e os animais caminharam em declive, ou seja, em sentido contrário ao tradicional. O exercício excêntrico foi realizado em ambiente tranquilo, com pouca iluminação e em temperatura ambiente de aproximadamente 25°C.

Avaliação física

Após indução de tendinopatia e durante a realização dos tratamentos, os ratos foram submetidos à avaliação física do local da lesão e aos testes comportamentais descritos na Tabela 1. O primeiro exame foi conduzido 12 h após a cirurgia, sendo os demais realizados a cada três dias, durante 20 dias. Foram realizadas 24 observações (n=24) durante os testes comportamentais, ou seja, 8 avaliações contendo 3 animais (repetições) em cada grupo. O exame local consistiu de avaliação da presença de edema. Inicialmente foi observado se havia aumento de volume no local da cirurgia, e

imediatamente após a eutanásia dos ratos, foi verificado o diâmetro transversal do tendão.

Avaliação biomecânica

Amostras do tendão foram obtidas dos diferentes grupos experimentais para avaliação biomecânica, mediante teste de tração do tendão calcanear comum, durante a fase proliferativa do processo de reparação tendínea. Para isso os ratos foram eutanasiados aos 20 dias após o início dos tratamentos, conforme protocolo utilizado por Orhan et al. (2004). Para a realização da eutanásia, os animais foram deixados em jejum alimentar (2 h) e hídrico (1 h). O procedimento foi realizado com tiopental sódico [100 mg/kg, via intraperitoneal (Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP, Brasil)].

Após eutanásia, foi realizada incisão cutânea da pele referente à região plantar dos membros pélvicos, divulsão romba do tecido subcutâneo, e exposição do tendão calcanear comum. Nesse momento foi averiguada a possível existência de aderências entre o tendão e a pele e/ou tecidos adjacentes. Na sequência foi avaliado o diâmetro transversal dos tendões, mediante a utilização de um paquímetro (Innovare, Cirúrgica Passos, Curitiba, PR, Brasil), posicionado no ponto médio do tendão entre a junção miotendínea e a sua inserção no osso calcâneo, de acordo com os procedimentos descritos por Eliasson et al. (2012).

O tendão calcanear comum do membro lesionado e contralateral foram dissecados e posteriormente removidos, sendo mantida sua inserção no osso calcâneo. A continuação os tendões juntamente com a região distal dos membros foram envolvidos em gazes, e colocados em recipientes plástico contendo NaCl a 0,9%, conforme protocolo adotado por Souza et al. (2010). Finalmente, o material foi deixado congelado a -20°C até o momento da realização da análise biomecânica.

Imediatamente antes dos procedimentos para análise biomecânica, os membros foram descongelados utilizando água corrente, e dissecados, de forma que o tendão ficasse fixado na sua origem a uma pequena região onde se encontram os músculos gastrocnêmio e sóleo, e na sua inserção com toda a região denominada como “pata”. Um fragmento tendíneo de aproximadamente 1 cm foi testado até ruptura, utilizando máquina universal de ensaio mecânico (Instron Brasil, Tocantins, Barueri, SP, Brasil), que se encontrava acoplada a um computador, fornecendo o diagrama de deformação de cada tendão avaliado (Fig. 1). O tendão foi fixado em garras e o teste conduzido (Fig. 2) com uma velocidade de deformação da carga de 0,5 mm/s, conforme protocolo

realizado por Sardenberg et al. (2011), e com uma distância de 6 mm entre as garras. Os fragmentos foram mantidos úmidos pela aplicação contínua de NaCl a 0,9% (Souza et al., 2010). Foram avaliadas as características carga máxima (N), tensão na carga máxima (MPa) e extensão máxima (mm).

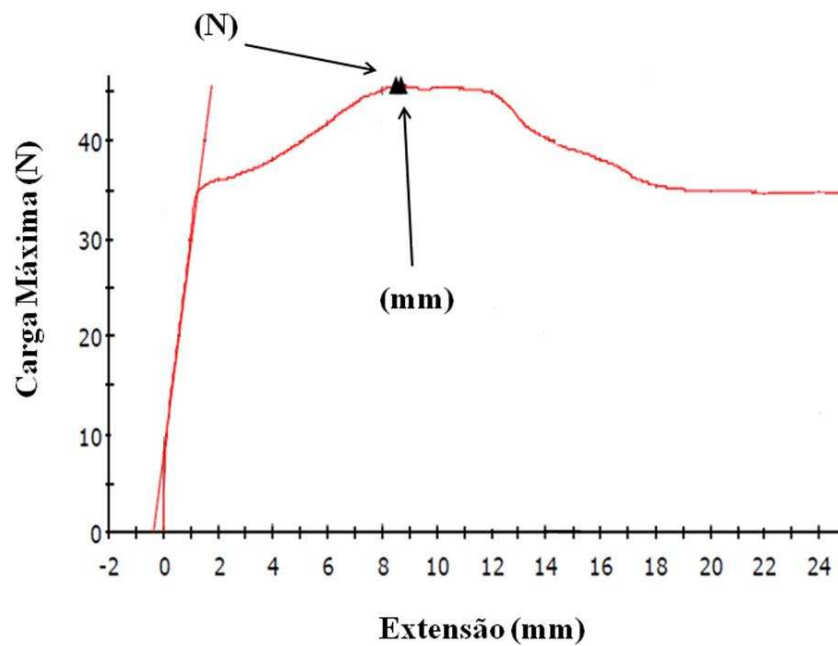


Fig. 1 Diagrama fornecido pela máquina universal de ensaio mecânico, onde se observa a carga máxima (N) necessária para romper o tendão, e a extensão máxima (mm) alcançada pelo tendão calcâneo comum de ratos Wistar.

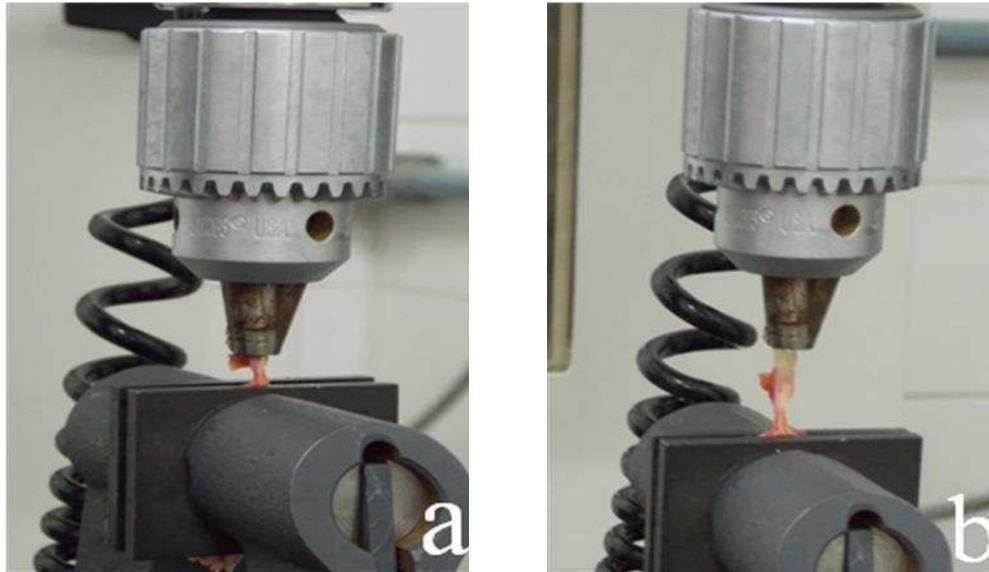


Fig. 2 Teste biomecânico realizado em máquina universal Instron. Tendão calcanear comum de ratos Wistar, com sua junção miotendínea fixada na garra proximal, e sua inserção no osso calcâneo fixada na garra distal (a). Tração do tendão a velocidade de 0,5 mm/seg (b).

Análise estatística

O experimento foi instalado no delineamento inteiramente casualizado, com seis tratamentos (grupos L, E, LE, R, S e CL), em três repetições (animais), avaliado aos 21 dias após a indução da lesão. A quantidade de tendões estabelecida por grupo foi a mínima necessária para a condução do experimento e permitiu a realização de análises inferenciais com um número adequado de graus de liberdade para o resíduo da análise de variância (ANOVA). Para as avaliações física (edema, sensibilidade dolorosa e capacidade locomotora) e macroscópica (aderência tecidual do tipo fibrosa) não foram considerados os grupos contralateral e sadio. Os dados foram submetidos à análise descritiva com a apresentação dos valores médios e desvios padrão. Foram efetuados os testes de Lilliefors e de Cochran para verificação da normalidade e da homogeneidade de variâncias, respectivamente. Em seguida foi utilizada ANOVA para verificação do efeito dos tratamentos nas avaliações físicas (anteriormente mencionadas, além do diâmetro transversal) e biomecânica [carga máxima (N), tensão na carga máxima (MPa) e extensão máxima (mm)]. Os tratamentos foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Todas as análises foram realizadas com o software Statistica 12, 2013 (www.statsoft.com).

Resultados

Durante todo período experimental, nenhum animal apresentou infecção local ou deiscência da ferida cirúrgica. Na primeira avaliação, realizada 12 h após a indução de tendinopatia, foi observado edema de intensidade discreta nos membros lesionados, que se manteve até 72 h. Não houve aderência tecidual nem aumento do diâmetro transversal dos tendões ($p=0,5820$) após 21 dias da cirurgia, quando essas características foram avaliadas.

Durante a avaliação da sensibilidade dolorosa, os ratos aparentemente não apresentaram sinais de desconforto, e mantiveram postura normal do membro pélvico. Portanto, todos os ratos receberam escore 0 (ausente) para a classificação da sensibilidade dolorosa adotada no estudo. Por outro lado, a avaliação da capacidade locomotora revelou discreta claudicação em todos os animais até 72 h após indução de tendinopatia, observada durante deambulação em campo aberto. Houve diferença ($p=0,0000$) entre os grupos para a capacidade motora (Tabela 2). Os animais exercitados, mas não tratados com laser, apresentaram menor capacidade locomotora do que os demais, já que os ratos não conseguiram se locomover nas barras de 2,7 e 1,7 cm. A figura 3 apresenta as informações referente a capacidade de locomoção, sendo possível observar a menor capacidade de se locomover nos animais apenas exercitados.

Dois animais do grupo que foram deixados em repouso (durante todos os tempos avaliados, ou seja, oito), um animal do grupo tratado com laser (a partir da sexta avaliação) e outro do que recebeu laser associado exercício excêntrico (a partir da terceira avaliação) conseguiram se locomover na barra de 1,7 cm.

Tabela 2 Valores médios e desvios padrão referentes aos escores para avaliação da capacidade motora dos animais dos diferentes grupos após 21 dias da indução de tendinopatia

Grupos	Escore	Capacidade locomotora
Repouso	11,04±1,49 a	Caminhou até a barra com 2,7 cm
Exercício excêntrico	9,96±1,00 b	Caminhou até a barra com 3,7 cm
Laser	11,67±0,76 a	Caminhou até a barra com 2,7 cm
Laser e exercício excêntrico	11,29±0,91 a	Caminhou até a barra com 2,7 cm

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

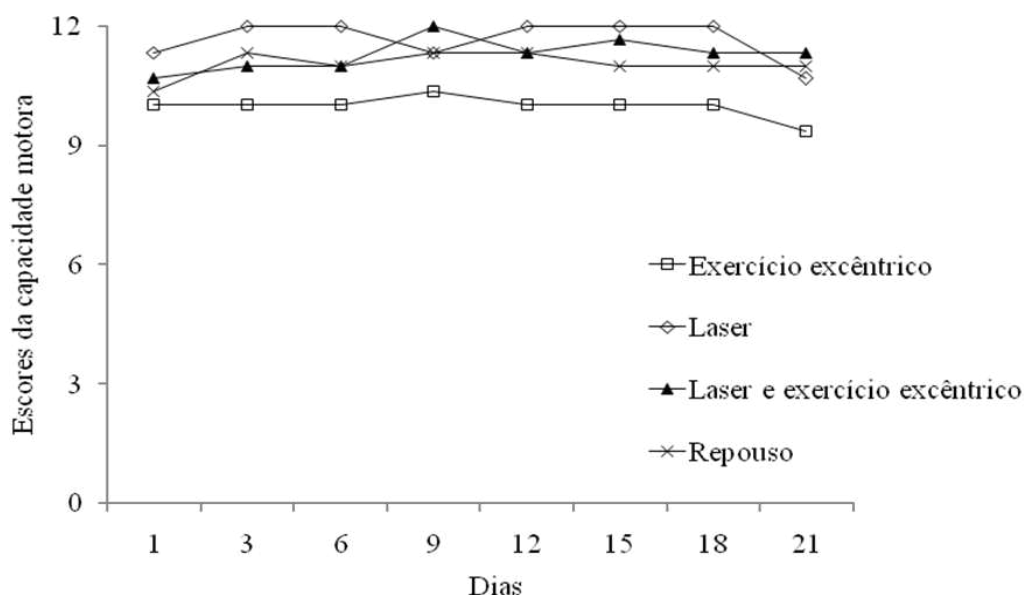


Fig. 3 Evolução dos escores médios obtidos na avaliação da capacidade motora ao longo do tempo. Nota-se que o grupo submetido a exercício excêntrico apresentou em todos os tempos avaliados menor capacidade de locomoção, diferentemente do grupo submetido apenas a laserterapia.

Todos os tendões submetidos à análise biomecânica romperam na junção miotendínea. Ainda que os valores obtidos tenham demonstrado que os tendões tratados com laser e exercício excêntrico necessitaram de maior carga ($26,59 \pm 19,63$ N), e tensão ($2,25 \pm 1,67$ MPa) para se romperem, não houve diferença entre os grupos avaliados para as variáveis biomecânicas extensão ($p=0,3820$), tensão ($p=0,4605$) e carga máximas ($p=0,4379$) (Tabela 3).

Tabela 3 Valores médios e desvios padrão referentes às variáveis avaliadas na análise biomecânica realizada após 21 dias da indução de tendinopatia

Grupos	Carga Máxima (N)	Tensão na carga (MPa)	Extensão Máxima (mm)
Repouso	$20,53 \pm 6,09$	$1,77 \pm 0,53$	$9,14 \pm 1,69$
Exercício excêntrico	$25,47 \pm 20,10$	$2,16 \pm 1,71$	$8,96 \pm 0,98$
Laser	$15,31 \pm 7,97$	$1,30 \pm 0,68$	$9,16 \pm 2,26$
Laser e exercício excêntrico	$26,59 \pm 19,63$	$2,25 \pm 1,67$	$6,99 \pm 2,26$
Contralateral	$35,15 \pm 1,76$	$2,96 \pm 0,13$	$9,29 \pm 1,03$
Sem lesão	$34,33 \pm 11,68$	$2,87 \pm 0,95$	$7,33 \pm 1,19$

$p > 0,05$ pelo teste de Tukey.

Discussão

Existem vários métodos de indução tendinopatia em ratos, sendo o procedimento cirúrgico por tenotomia (Laraia et al, 2012; Barbosa et al, 2013) ou tenectomia (Eliasson et al, 2012) e a administração de colagenase (Marsolais et al., 2001; Pires et al., 2011) os mais utilizados. O trauma mecânico com guilhotina (Salate et al., 2005; Joensen et al., 2012) e com carga (Fillipin et al., 2005), a sobrecarga mecânica (Glazebrook et al., 2008) e o uso de substâncias como citocinas, antibióticos e prostaglandinas, também são mencionados (Lui et al., 2011). O protocolo de indução de tendinopatia utilizado na presente pesquisa foi testado anteriormente e se mostrou eficiente em promover a lesão em ratos Wistar, já que ocasiona um quadro de tendinopatia aguda (Silva et al., 2013).

A ausência de infecção local da ferida cirúrgica sugere que os procedimentos de antissepsia adotados no pré e pós-operatório foram adequados. Adicionalmente, a ausência de aderência fibrosa do tendão com os tecidos adjacentes sugere que a fase inflamatória da tendinopatia esteve sob controle, já que aderências estão intimamente relacionadas com a intensidade e duração do processo inflamatório (Orhan et al., 2004). Na realidade, além de células inflamatórias originadas da periferia do tecido para o local da lesão, a formação aderências também está relacionada com outros fatores como, por exemplo, a migração extrínseca de fibroblastos (Sharma e Maffulli, 2005; James et al., 2007), crescimento excessivo e desordenado do tecido de granulação (Foland et al., 1992) e formação de um tecido cicatricial em torno da bainha tendínea (Wang et al., 2012). Por outro lado, a atividade física controlada, ou pelo menos, a possibilidade de livre movimentação dos ratos nas gaiolas também foi importante para o não aparecimento de aderências. Enquanto a imobilização do membro pode afetar as propriedades biomecânicas do tendão (Wren et al., 2000), a atividade física é essencial para sua recuperação (Nakamura et al., 2008).

O edema local observado por 72 h era esperado devido ao trauma cirúrgico. Após uma lesão se inicia a fase inflamatória da reparação tendínea, que é caracterizada macroscopicamente pela presença de edema (Dahlgren, 2007). A duração dessa fase é variada, podendo se estender de 24 (Wang et al., 2006) a 72 h (Eliasson et al., 2009), ou até uma a duas semanas (Dahlgren, 2007). A redução do edema nos animais submetidos a exercício excêntrico pode estar relacionada com a intensidade do tratamento realizado, já que de acordo com Lana et al. (2008), pode influenciar no volume do edema na fase aguda da lesão. Os autores trabalharam com ratos, cujo tecido subcutâneo do coxim

plantar foi lesionado com injeção de carragenina, uma solução irritante utilizada para induzir inflamação aguda, e submetidos a exercícios físicos em esteira ergométrica em baixa (de 5 a 15 m/min/60 min; esteira com 1% inclinação/12 semanas) ou alta intensidade (de 5 a 25 m/min/75 min; esteira com 15% inclinação /11 semanas). O grupo que realizou atividade em alta intensidade, não apresentou nas primeiras 24 h após a lesão, diferença ($p>0,05$) no volume do edema, quando comparado com um grupo de animais que não foram exercitados. De acordo com os autores, o exercício em alta intensidade provoca aumento da IL-6. Entretanto, apesar dessa citocina desencadear um efeito pró-inflamatório, ela também está relacionada com uma ação anti-inflamatória, embora não seja suficiente para reduzir o volume do edema. O aumento dessa citocina se deve ao fato de que o treinamento em alta intensidade pode acarretar estresse, e aumentar os níveis de glicocorticóides endógenos.

Nos animais do grupo tratado apenas com laserterapia, a redução do edema pode estar relacionada com a ação do laser na melhora da circulação local, o que promove a redução do edema (Gur et al., 2004). Embora o grupo que foi mantido em repouso não tenha recebido nenhum tratamento, a possibilidade de movimentação livre dentro da gaiola também pode ter sido um fator positivo para a redução do edema nesses animais. Por outro lado, a ausência de diferença entre os grupos no diâmetro transversal do tendão, aos 21 dias após indução da lesão, sugere que o tendão calcâneo comum de ratos, lesionado conforme metodologia adotada no presente estudo se encontra macroscopicamente reparado em apenas três semanas. Essa rápida recuperação da tendinopatia foi confirmada pela análise biomecânica, que não revelou diferença entre os grupos.

A ausência de sensibilidade dolorosa na avaliação física realizada 12 h após a cirurgia pode estar relacionada com o analgésico administrado, o que pode ter mascarado o quadro álgico. No entanto, os ratos permaneceram sem dor nas avaliações seguintes. Nos grupos que receberam laserterapia, essa ausência pode ser justificada pelo efeito analgésico do laser de baixa potência (Hamblin e Demidova, 2006), o que pode resultar do aumento da liberação de endorfinas, as quais ampliam o limiar de dor (Moshkovska e Mayberry, 2005).

Apesar da ausência de sensibilidade dolorosa, não pode ser descartada a possibilidade de incômodo de origem mecânica, visto que os animais apresentaram uma discreta claudicação durante a avaliação da capacidade locomotora. Outra hipótese é de que a escala utilizada para a avaliação da sensibilidade dolorosa pode não ter sido

adequada para o tipo de lesão provocada. A escala adotada para o exame físico foi baseada naquela descrita por Attal et al. (1990), para avaliação da dor em ratos com lesão do nervo ciático, ou seja, para dor de maior intensidade. Miniville et al. (2008) também utilizaram a mesma classificação para verificar a resposta de ratos com fratura induzida por trauma na tíbia (reduzida com pino intramedular) ao tratamento com morfina ou cetoprofeno. De acordo com os autores, a escala foi eficaz na identificação da dor, e os medicamentos utilizados promoveram analgesia dose-dependente. Entretanto, como a fratura foi realizada com guilhotina, deve ter afetado não apenas o tecido ósseo, mas também os adjacentes. Segundo Oliva et al. (2004) lesão no periósteo, proveniente de procedimentos ortopédicos, provocam maior severidade de dor no período pós-operatório, que as ocasionadas em tecidos moles.

A escala utilizada para avaliar a capacidade locomotora dos animais se mostrou eficiente. Foi possível perceber a evolução funcional dos animais durante o caminhar nas barras, embora os ratos do grupo E tenham apresentado menor capacidade de locomoção. De acordo com Silva (2008), a escala possibilita identificar alterações mínimas, que muitas vezes são imperceptíveis durante avaliação da deambulação em campo aberto. Os autores utilizaram a escala para avaliar a capacidade locomotora em ratos Wistar submetidos à osteotomia do processo espinhal de vértebras torácicas, seguida pela retirada da lâmina dorsal da vértebra. Na sequência a duramáter foi lesionada utilizando um aparelho estereotáxico e carga de 50,5 por cinco minutos.

See et al. (2004) demonstraram que exercícios do tipo corrida em esteira (de 4 a 12 m/min, durante 15 a 19 min), realizado a partir do 5^o dia após ruptura parcial do tendão calcâneo comum melhoram a sua função. Da mesma forma, Barbato (2011) demonstrou que o exercício do tipo corrida em esteira, iniciado uma semana após ruptura total do tendão exerce efeito positivo na recuperação tendínea. Por outro lado, apesar de Godbout et al. (2006) mencionarem que exercício realizado de forma voluntária (roda giratória presente no interior das gaiolas, acoplada a um contador), iniciada sete dias após lesão do tendão calcâneo comum por colagenase, promove a síntese de colágeno, também pode ter um efeito negativo, como o prolongamento da fase inflamatória. O protocolo adotado no presente estudo, com início do exercício excêntrico 24 h após tendinopatia induzida por compressão transversal e escarificação, não foi benéfico em promover completa recuperação da capacidade locomotora dos animais, pois o grupo tratado apenas com exercício excêntrico apresentou dificuldade

em se locomover nas barras mais estreitas (2,7 e 1,7 cm), entretanto, quando associado à laserterapia essa capacidade de locomoção foi maior do que a dos grupos R e E.

Apesar da importância do exercício excêntrico na recuperação das tendinopatias, contração tipo excêntrica pode promover microrrupturas das fibras musculares (Clebis et al., 2001). A decisão em começar o exercício após 24 h de indução da tendinopatia foi para padronizar o momento de início dos tratamentos, de forma a minimizar os fatores de riscos que pudessem comprometer a interpretação dos resultados obtidos.

Adicionalmente, esse momento para início das atividades era particularmente importante pelo fato de que o laser de baixa potência está indicado já nas primeiras horas após lesão tendínea, devido ao seu efeito analgésico e anti-inflamatório. Esse momento, considerado como ideal, também foi baseado no protocolo descrito por Nakamura et al. (2008), que observaram efeito benéfico da corrida em declive (15° de inclinação; 15m/min por 60 min/durante 14 dias), quando iniciada 24 h após indução cirúrgica de tendinopatia no tendão patelar de ratos. Entretanto, os pesquisadores comprovaram a eficácia da atividade física por histopatologia, mas não por avaliação biomecânica. Esse tendão, juntamente com o calcâneo comum são as estruturas anatômicas mais comumente afetadas por tendinopatia nos seres humanos (Warden et al., 2007; Lui et al., 2011). Entretanto, ao que parece o patelar é mais resistente. Kaux et al. (2012) compararam o exercício excêntrico corrida em declive (15° de inclinação da esteira; 17 m/min; 60 min/5 semanas) com o exercício concêntrico corrida em aclive e observaram que o tendão patelar sadio, submetido ao exercício excêntrico necessitou de maior carga (79,3 N) para romper em relação ao seu controle (61,2 N) (animais não exercitados), diferentemente do que ocorre com o tendão calcâneo comum, cujos valores nos animais submetidos ao exercício excêntrico (66,4 N) não foram estatisticamente diferentes do controle (61,7 N), ou seja, animais não exercitados. Esses autores ressaltaram a importância do exercício excêntrico em relação ao concêntrico que, aparentemente, resultou em um tendão com propriedades biomecânicas superiores. Por outro lado, considerando a velocidade (17 m/min), o tempo de atividade (60 min/dia) e período de avaliação (5 semanas), utilizados por esses autores, o protocolo de exercício excêntrico adotado no presente estudo não parece ter sido excessivo. Além do mais, os animais foram adaptados previamente, conforme realizado em outros estudos (Glazebrook et al. 2008; Eliasson et al., 2012). Esse processo de adaptação, que geralmente varia de uma a duas semanas, é considerado como fundamental por Godbout et al. (2006), já que possivelmente melhora a capacidade de desempenho dos animais.

Por outro lado, estudos ainda são necessários para definir o melhor momento de realização da laserterapia e do exercício excêntrico para o tratamento de tendinopatias. Também é importante que técnicas com alta especificidade e sensibilidade como a imunistoquímica e reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real sejam utilizados, para validar e possibilitar maior conhecimento sobre a eficácia dessas modalidades fisioterapêuticas.

Ensaio biomecânicos são utilizados em estudos experimentais, para avaliar a eficácia de diferentes terapias, tomando como base as propriedades do tendão lesionado cirurgicamente, por trauma ou por substâncias químicas. A ruptura de todos os tendões na junção miotendínea se deve, provavelmente, ao fato de que essa região é mais vulnerável a lesões. Esse achado também pode estar relacionado com a presença do colágeno tipo III, que possui fibras mais delgadas e de menor resistência do que o colágeno tipo I. Essa hipótese é baseada nos achados de Barbato (2011), que observou em ratos submetidos à tenotomia total do tendão calcâneo comum, tratados com anti-inflamatório (tenoxicam, 10 mg/kg; 24 h/7 dias) ou submetidos a atividade física (corrida em esteira), que a deposição de colágeno tipo III ocorre inicialmente na junção miotendínea, particularmente duas semanas após procedimento cirúrgico.

A comparação dos valores médios das características biomecânicas avaliadas não revelou diferenças ($p > 0,05$) entre os grupos. Esse resultado pode estar relacionado com o metabolismo dos ratos, que é considerado como “mais acelerado” do que o dos seres humanos (Fagundes e Taha, 2004; Santos, 2009), o que pode resultar em mais rápida reparação do tendão. Portanto, é possível que o período de 21 dias após a lesão para realização da análise biomecânica seja muito longo para constatar diferença entre grupos, pois esse período pode ser suficiente para a recuperação fisiológica dos tendões. Apesar dessa diferença de metabolismo, os ratos são considerados excelentes modelos experimentais para os humanos devido à semelhança anatômica e fisiológica. Adicionalmente, a resistência desses animais em comparação com outras espécies (Warden, 2007; Lui et al., 2011), é um aspecto positivo a ser considerado em estudos dessa natureza.

See et al. (2004) também não observaram diferenças entre grupos em algumas características biomecânicas estudadas em ratos portadores de tendinopatia induzida cirurgicamente, mediante ruptura parcial do tendão calcâneo comum. Os autores dividiram os animais em três grupos, sendo um controle (com lesão e sem tratamento), um exercitado em esteira, com aumento progressivo da velocidade da atividade (de 4 a

12 m/min, durante 15 a 19 min), e um grupo submetido a natação (15 a 19 min; temperatura de 25°C). Os grupos que realizaram corrida em esteira ou natação foram exercitados 6 dias por semana, durante 3 semanas, a partir do 5º dia após indução da lesão. Não foram observadas diferenças ($p>0,05$) entre os grupos nas variáveis rigidez e extensão do tendão, quando as amostras foram analisadas 30 dias após lesão, entretanto a carga máxima necessária para a ruptura do tendão foi maior ($p=0,015$) no grupo que realizou corrida em esteira, do que no controle. No presente estudo, o valor da carga máxima também foi maior no grupo submetido a exercício excêntrico associado ($26,59\pm 19,63$) ou não ($25,47\pm 20,10$) à laserterapia, quando comparado com o grupo submetido à tendinopatia, mas mantido em repouso ($20,53\pm 6,09$). Porém, diferentemente do estudo de See et al. (2004), não houve diferença significativa entre os grupos. Essa ausência de diferença pode estar relacionada com o número de animais por grupo, que foi de três na presente pesquisa e de 9 a 11 no estudo desses autores. Tendo em vista a necessidade de se atender aos critérios de bem estar animal e, conseqüentemente à comissão de ética, foi decidido utilizar apenas três animais, que estatisticamente é considerado como o número mínimo necessário para a condução de um experimento, já que permite a realização de análises inferenciais. Por outro lado, comparado com os tendões não lesionados ($34,33\pm 11,68$), nota-se que, embora não seja estatisticamente diferente, a carga necessária para a ruptura dos tendões lesionados e exercitados foi menor do que nos tendões não lesionados. Entretanto, esse achado reforça a observação de que o exercício excêntrico caminhada em esteira, iniciada na fase aguda da tendinopatia induzida, realizado durante 21 dias após a lesão, promove maior resistência do tendão à carga, quando comparado aos tendões lesionados, porém não exercitados.

Na realidade existem diferentes modalidades de exercícios excêntricos, sendo eles os: pliométricos, os isiocinéticos, a corrida em declive (Molina e Amorim 2007) e a caminhada em declive (Duan et al., 1990). Nessas últimas modalidades os músculos atuam contra a gravidade para suportar o peso corporal e absorver os choques (Eston et al., 1995), o que pode resultar em fadiga muscular quando em excesso (Clebis et al., 2001). Por outro lado, já está bem estabelecido que um tendão regenerado não se comportará biomecanicamente semelhante a um sadio (Hope e Saxby, 2007). Outras pesquisas que realizaram ensaios biomecânicos utilizaram um número maior de ratos por grupo (variando de 5 a 11), do que a quantidade usada no presente estudo. Apesar de algumas delas terem encontrado diferenças estatisticamente significativas entre os

grupos (See et al., 2004; Nouruzian et al., 2012), outras não obtiveram efeito positivo do tratamento estudado (Sardenberg et al., 2011; Joensen et al., 2012). Portanto, o número de animais por grupo, apesar de ser um fator limitante na presente pesquisa, não necessariamente interferiu nos resultados obtidos.

Comparando os resultados obtidos na presente pesquisa com os de Godbout et al. (2006) e de Eliasson et al. (2012) que também trabalharam com o tendão calcâneo comum de ratos Wistar submetidos a exercício, os valores médios obtidos para carga máxima no grupo que realizou a atividade física associada ($26,59 \pm 19,63$ N) ou não ($25,47 \pm 20,10$ N) à laserterapia foram abaixo dos encontrados por Godbout et al. (2006) (aproximadamente 30 N), em tendão lesionado com colagenase, e tratado com exercício voluntário por um período de 7 ou 28 dias a partir da indução da lesão. Por outro lado, os valores de carga máxima se mantiveram acima dos relatados por Eliasson et al. (2012) em ratos exercitados em esteira a partir do oitavo dia após a transecção do tendão calcâneo comum, que foi de apenas 17 N. Esses dados revelam que os resultados com exercício excêntrico são contraditórios, e portanto, reforçam a necessidade de melhor definição do momento ideal para início do exercício, assim como, velocidade, duração e frequência do tratamento.

No grupo tratado com laser foi necessária uma carga de apenas 15,31 N para romper o tendão. Esse resultado não foi satisfatório, pois sugere fragilidade do tendão. Resultados diferentes foram relatados por Nouruzian et al. (2012), após tratamento do tendão calcâneo comum de ratos diabéticos ($n=5/\text{grupo}$), submetido a tenotomia e tratamento com laser a base de hélio-neônio (He-Ne), na dose de energia de 2,9, 4,3 ou 11,5 J e comprimento de onda de 632.8 nm, iniciando imediatamente após a cirurgia, sendo mantido por 10 dias consecutivos. De acordo com os autores o tratamento na dose de energia de 2,9 J promoveu aumento ($p < 0,05$) da resistência do tendão. A velocidade de deformação utilizada por esses autores durante a análise biomecânica foi o dobro (1 mm/s) da utilizada no presente estudo (0,5 mm/s), que foi baseada na descrita por Sardenberg et al. (2011). Não existe uma padronização dessa característica nos estudos que realizaram análise biomecânica em tendões de ratos. Existem pesquisas que utilizaram desde 0,1 mm/s (Eliasson et al., 2009,2012) até 1 mm/s (Kaux et al., 2012). See et al. (2004) utilizaram uma velocidade de deformação de apenas 0,16 mm/s durante o teste biomecânico para avaliar a viscoelasticidade do tendão e 8,33 mm/s para avaliar a carga máxima necessária para romper o tendão. Já Marcos et al. (2011) não descreveram a velocidade de deformação utilizada. Acredita-se que essa velocidade

possa interferir nos resultados obtidos durante a avaliação biomecânica do tendão, havendo, portanto, a necessidade de padronização dessa variável. Na realidade, são raros os estudos que discutem a velocidade de deformação da carga.

A densidade de energia utilizada (3 J) no presente estudo foi muito próxima a descrita como adequada (2,9 J) por Nouruzian et al. (2012), para tratamento do tendão calcâneo comum de ratos diabéticos após tenotomia. Entretanto esses autores utilizaram laser de He-Ne, e não o GaAs. Essa dose de 3 J é a recomendada pela associação mundial de laser quando se emprega comprimento de onda de 904 nm, para tratamento do tendão calcâneo comum. No entanto, o laser não promoveu melhora na reparação do tendão, analisado mediante histopatologia, conforme mencionado por Arruda et al. (2007) e Salate et al. (2005), que utilizaram o laser GaAs e/ou alumínio-gálio-índio-fósforo (AlGaInP) em respectivamente 6 e 24 animais por grupo. Os animais do presente estudo, pertencentes ao grupo tratado apenas com laser romperam o tendão com uma carga máxima menor, quando comparados com demais grupos com e sem lesão ($p=0,4379$). O mesmo ocorreu em estudo realizado por Marcos et al. (2012) que utilizaram 6 ratos/grupo, onde tendões tratados com laser na dose de 3 J e comprimento de onda de 810 nm romperam com uma carga semelhante a dos animais do grupo controle, que receberam infiltração tendínea com solução salina, diferentemente do grupo tratado, cuja tendinopatia foi provocada por colagenase. Já os tendões tratados com 1 J romperam com uma carga semelhante à necessária para romper os tendões saudáveis. Portanto, é provável que a densidade de energia de 3 J não seja adequada mesmo sendo a dose comumente utilizada em estudos para tratamento de lesões tendíneas induzidas (Arruda et al., 2007; Lima et al., 2012). Arruda et al. (2007) e Lima et al. (2012) não realizaram avaliação biomecânica, entretanto em seu protocolo de tratamento foi utilizado o laser de baixa potência a base GaAs.

Estudo recente, realizado por Joensen et al. (2012), também não revelou diferença ($p>0,05$) entre grupos tratado e controle (contralateral), na propriedade biomecânica (carga máxima) dos tendões de ratos lesionados com mini guilhotina (dupla lesão, com intervalo de 24 h), e tratados com a laser GaAs (3 J e 904 nm) 30 min/dia/2 dias após a indução da lesão. Avaliação ultrassonográfica revelou diferença ($p<0,05$) na espessura do tendão entre os grupos tratado e controle. De acordo com os autores, nas primeiras duas semanas após tenotomia os tendões costumam romper quando submetidos a uma carga abaixo da necessária para a ruptura de um tendão saudável. Esse fato pode ter ocorrido no presente estudo, já que os tendões tratados apenas com laser romperam com

uma carga de apenas $15,31 \pm 7,97$ N. Joensen et al. (2012) atribuíram os seus resultados a uma possível inadequação da dose de energia utilizada, e ao intervalo entre as aplicações do laser, que foi de apenas 15 h. De acordo com os autores, a dose sugerida pela associação mundial de laser deve ser ajustada para a espécie a ser tratada. Uma dose de energia não adequada pode causar um resultado indesejado; doses altas em tecidos moles podem inibir o processo de reparação do tecido, já as baixas podem não promover o efeito desejado.

Esse foi um estudo controlado conduzido durante um período de 21 dias após tendinopatia induzida do tendão calcâneo comum de ratos Wistar. O protocolo de laserterapia adotado esteve de acordo com o recomendado pela associação mundial de laser. O número de animais por grupo e a realização da atividade física 24 h após a lesão, embora estejam de acordo com protocolos previamente utilizados, são algumas das limitações do estudo. Por outro lado, apesar da quantidade de animais ser um fator limitante na presente pesquisa, não necessariamente interferiu nos resultados obtidos.

Conclusão

Com base nos resultados obtidos nas condições experimentais mencionadas, é possível concluir: 1. Laserterapia associada ao exercício excêntrico caminhada em declive, iniciados 24 h após tendinopatia do tendão calcâneo comum, induzida cirurgicamente por compressão e escarificação, não resultam em um tendão biomecanicamente tão resistente ou elástico quanto um tendão saudável. Por outro lado, também não influenciam negativamente na estrutura e função tendínea. 2. A extensão e carga máxima necessária para romper o tendão calcâneo comum de ratos, três semanas após tendinopatia induzida por compressão e escarificação, não difere daquela necessária para romper o tendão fisiologicamente saudável, testado a uma velocidade de 0,5 mm/s.

Agradecimentos: Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado a primeira autora do trabalho, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio e suporte nas atividades da pesquisa (processo nº 472832/2012-3).

Referências Bibliográficas

Abate M, Schiavone C, Salini V, Andia I (2013) Occurrence of tendon pathologies in metabolic disorders. Review. *Rheumatol* 52:599-608. doi:10.1093/rheumatology/kes395

Alfredson H (2003) Chronic midportion Achilles tendinopathy: an update on research and treatment. *Clin Sports Med* 22:727-741

Aras MH, Omezli MM, Gungormus M (2010) Does low-level laser therapy have an antianesthetic effect? A review. *Photomed Laser Surg* 28:719-722. doi: 10.1089/pho.2008.2430

Arruda ERB, Rodrigues NC, Taciro C, Parizotto NA (2007) Influência de diferentes comprimentos de onda da laserterapia de baixa intensidade na regeneração tendínea de rato após tenotomia. *Rev Bras Fisiot* 11:283-288. doi.org/10.1590/S1413-35552007000400007

Attal N, Jazat F, Kayser V, Guilbaud G (1990) Further evidence for “pain-related” behaviours in a model of unilateral peripheral mononeuropathy. *Pain* 41:235-251. doi: org/10.1016/0304-3959(90)90022-6

Barbato KBG (2011) Efeito do uso de antiinflamatório e do exercício aeróbico sobre a regeneração tecidual e perfil biomecânico do tendão calcâneo de ratos após ruptura completa. Tese, Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Barbosa D, Souza RA, Carvalho WRG, Xavier M, Carvalho PK, Cunha CR, Arisawa EAL, Silveira JR L, Villaverde AB (2013) Low-level laser therapy combined with platelet-rich plasma on the healing calcaneal tendon: a histological study in a rat model. *Lasers Med Sci* 28:1489-1494. doi: 10.1007/s10103-012-1241-x

Chhajed PN, Plit ML, Hopkins PM, Malouf MA, Glanville AR. (2002) Achilles tendon disease in lung transplant recipients: association with ciprofloxacin. *Eur Respir J* 19:469-471. doi:10.1183/09031936.02.00257202

Clebis NK, Natali MJM (2001) Lesões musculares provocadas por exercícios excêntricos. *Rev Bras Ciên Mov* 9:47-53

Dahlgren LA (2007) Pathobiology of tendon and ligament injuries. *Clin Tech Equine Pract* 6:168-172. doi:10.1053/j.ctep.2007.08.002

Dogan SK, Ay S, Deniz E (2010) The effectiveness of low laser therapy in subacromial impingement syndrome: a randomized placebo controlled double-blind prospective study. *Clin Sci* 65:1019-1022. doi: 10.1590/S1807-59322010001000016

Duan C, Hayes DA, Delp PD, Armstrong RB (1990) Rat skeletal muscle mitochondrial [Ca²⁺] and injury from downhill walking. *J App Physiol* 68:1241:1251

Eliasson P, Andersson T, Aspenberg P (2012) Achilles tendon healing in rats is improved by intermittent mechanical loading during the inflammatory phase. *J Orthop Res* 30:274-279. doi:10.1002/jor.21511

Eliasson P, Andersson T, Aspenberg P (2009) Rat Achilles tendon healing: mechanical loading and gene expression. *J Appl Physiol* 107:399-407. doi: 10.1152/jappphysiol.91563.2008

Eston RG, Mickleborough J, Baltzopoulos V (1995) Eccentric activation and muscle damage: biomechanical and physiological considerations during downhill running. *Br J Sp Med* 29:89-94. doi: 10.1136/bjism.29.2.89

Fagundes DJ, Taha MO (2004) Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. *Acta Cir Bras* 19:59-65. doi: org/10.1590/S0102-86502004000100010

Fillipin L, Mauriz JL, Vedoveli K, Moreira AJ, Zettler ZG, Lech O, Maronni NP, González-Gallego J (2005) Low-level laser therapy (LLLT) prevents oxidative stress and reduces fibrosis in rat traumatized Achilles tendon. *Lasers Surg Med* 37:293-300. doi:10.1002/lsm.20225

Foland JW, Trotter GW, Powers BE, Wringley RH, Smith FW (1992) Effect of sodium hyaluronate in collagenase-induced superficial digital flexor tendinitis in horses. *Am J Vet Res* 53:2371-2376

Frick A (2010) Stretching exercise for horses: are they effective? *J Equine Vet Sci* 30:50-59. doi:10.1016/j.jevs.2009.12.001

Glazebrook MA, Wright JR, Langman M, Stanish WD, Lee M (2008) Histological analysis of Achilles tendons in an overuse rat model. *J Orthop Res* 26:840-846. doi: 10.1002/jor.20546

Godbout C, Ang O, Frenette J (2006) Early voluntary exercise does not promote healing in a rat model of Achilles tendon injury. *J Appl Physiol* 101:1720-1726. doi: 10.1152/jappphysiol.00301.2006

Gur A, Sarac AJ, Cevik R, Altindag O, Sarac S (2004) Efficacy of 904 nm gallium arsenide low level laser therapy in the management of chronic myofascial pain in the neck: a double-blind and randomized-controlled Trial. *Lasers Surg Med* 35:229-235. doi: 10.1002/lsm.20082

Hamblin MR, Demidova TN (2006) Mechanisms of low level light therapy. *Proc SPIE* 6140:1-12. doi: 10.1117/12.646294

Hope M, Saxby TS (2007) Tendon healing. *Foot ankle Clin* 12:553-567. doi:10.1016/j.fcl.2007.07.003

James R, Kesturu G, Balian G, Chhabra AB (2008) Tendon: biology, biomechanics, repair, growth, factors and evolving treatment options. Review. *J Hand Surg Am* 33:102-112. doi:10.1016/j.jhsa.2007.09.007

Joensen J, Gjerdet NR, Hummelsund S, Iversen V, Lopes-Martins RAB, Bjordal JM (2012) An experimental study of low-level laser therapy in rat Achilles tendon injury. *Lasers Med Sci* 27:103-111. doi: 10.1007/s10103-011-0925-y

Kaux J-F, Drion P, Libertiaux V, Colige A, Hoffmann A, Nusgens B, Besançon B, Forthomme B, Le Goff C, Franzen R, Defraigne J-O, Cescotto S, Rickert M, Crielaard J-M, Croisier J-L (2012) Eccentric training improves tendon biomechanical properties: a rat model. *J Orthop Res* 31:119-124. doi: 10.1002/jor.22202

Kaux J-F, Forthomme B, Le Goff C, Crielaard J-M, Croisier J-L (2011) Current opinions on tendinopathy. *J Sports Sci Med* 10:238-253

Lana AC, Paulino CA, Gonçalves ID (2008) Efeitos dos exercícios físicos sobre o edema inflamatório agudo em ratos Wistar. *Rev Bras Med Esporte* 14:33-37. doi: org/10.1590/S1517-86922008000100006

Langberg H, Ellingsgaard H, Madsen T, Jansson J, Magnusson SP, Aagaard P, Kjaer M (2007) Eccentric rehabilitation exercise increases peritendinous type I collagen synthesis in humans with Achilles tendinosis. *Scand J Med Sci Sports* 17:61-66. doi: 10.1111/j.1600-0838.2006.00522.x

Laraia E, Silva IS, Pereira DM, Reis FA, Almeida P, Leal Junior ECP, Tarso P, Carvalho C (2012) Effect of low-level laser therapy (660 nm) on acute Inflammation induced by tenotomy of Achilles tendon in rats. *Photochem Photobiol* 88:1546-1550. doi: 10.1111/j.1751-1097.2012.01179.x

Lima JGM, Oliveira Filho GR, Lima MTBRM, Ferreira AS, Silva JG (2012) Influence of low intensity laser therapy (AsGa) on the cicatrization process of mechanic tendon injury in Wistar rats. *Laser Physics* 22:1445-1448. doi: 10.1134/S1054660X12090083

Lui PPY, Maffulli N, Smith RKW (2011) What are the validated animal models for tendinopathy? Review. *Scand J Med Sci Sports* 21:3-7. doi: 10.1111/j.1600-0838.2010.01164.x

Maffulli N, Wong J, Almekinders LC (2003) Types and epidemiology of tendinopathy. *Clin Sports Med* 22:675-692. doi:10.1016/S0278-5919(03)00004-8

Marcos RL, Leal-Junior ECP, Arnold G, Magnenet V, Rahouadj R, Wang X, Demeurie F, Magdalou J, Carvalho MHC (2012) Low-level laser therapy in collagenase-induced Achilles tendinitis in rats: analyses of biochemical and biomechanical aspects. *J Orthop Res* 30:1945-1951. doi:10.1089/pho.2006.24.33

Marsolais D, Côté CH, Frenette J (2001) Neutrophils and macrophages accumulate sequentially following Achilles tendon injury. *J Orthop Res* 19:1203-1209. doi: 10.1016/S0736-0266(01)00031-6

Minville V, Laffosse J-M, Fourcade O, Girolami J-P (2008) Mouse modelo fracture pain. *Anesth* 108:467-472. doi: 10.1097/ALN.0b013e3181649333

Molina R, Amorim AR (2007) Efeito do dano muscular através de diferentes tipos de exercício excêntrico sobre a economia de movimento. *Ensaio Ciên* 2:89-99

Moshkovska T, Mayberry J (2005) It is time to test low level laser therapy in Great Britain. *Postgrad Med J* 81:436-441. doi: 10.1136/pgmj.2004.027755

Nakamura K, Kitaoka K, Tomita K (2008) Effect of eccentric exercise on healing process of injured patellar tendon in rats. *J Orthop Sci* 13:371-378. doi: 10.1007/s00776-008-1242-6

Nouruzian M, Alidoust M, Bayat M, Bayat M, Akbari M (2012) Effect of low-level laser therapy on healing of tenotomized Achilles tendon in streptozotocin-induced diabetic rats. *Lasers Surg Med* 8:399-405. doi: 10.1007/s10103-012-1074-7

Oliva VNLS, Maia LAA, Silva BM, Saito LM, Perri SHV (2004) Avaliação clínica de diferentes antiinflamatórios não esteróides na analgesia pós-operatória de cirurgias ortopédicas em cães. *Clin Vet* 50:42-54

Orhan Z, Ozturan K, Guven A, Cam K (2004) The effect of extracorporeal shock waves on a rat model of injury to tendo Achillis: a histological and biomechanical study. *J Bone Joint Surg Br* 86-B:613-618. doi:10.1302/0301-620X.86B4

Pires D, Xavier M, Araujo T, Silva Junior JA, Aimbre F, Albertini R (2011) Low-level laser therapy (LLLT; 780 nm) acts differently on mRNA expression of anti- and pro-inflammatory mediators in an experimental model of collagenase-induced tendinitis in rat. *Lasers Med Sci* 26:85-94. doi: 10.1007/s10103-010-0811-z

Rees JD, Wilson AM, Wolman RL (2006) Current concepts in the management of the discorders. *Rheumatol* 45:508-521. doi:10.1093/rheumatology/ke1046

Riley G (2004) The pathogenesis of tendinopathy. A molecular perspective. Review. *Rheumatol* 43:131-142. doi:10.1093/rheumatology/keg448

Riley G (2008) Tendinopathy—from basic science to treatment. *Nat Clin Pract Rheumatol* 4:82-89. doi:10.1038/ncprheum0700

Salate ACB, Barbosa G, Gaspar P, Koeke PU, Parizotto NA, Benze BG, Foschiani D (2005) Effect of In-Ga-Al-P Diode laser irradiation on angiogenesis in partial ruptures of Achilles tendon in rats. *Photomed Laser Surg* 23:470-575. doi:10.1089/pho.2005.23.470

Santos SM (2009) Efeitos morfoquantitativos do exercício de força sobre os componentes elástico e muscular da parede da artéria aorta ascendente de ratos Wistar idosos. Dissertação, Universidade São Judas Tadeu

Sardenberg T, Muller SS, Garms LZ, Miduati FB (2011) Efeito tardio e imediato da sutura em tendão extrassinovial íntegro: estudo biomecânico em ratos. *Rev Bras Ortop* 46:305-308. doi: org/10.1590/S0102-36162011000300013

See EKN, Ng GYF, Ng COY, Fung DTC (2004) Running exercise improve the strength of a partially ruptured Achilles tendon. *Br J Sports Med* 38:597-600. doi: 10.1136/bjism.2003.007120

Sharma P, Maffulli N (2005) Tendon injury and tendinopathy: healing and repair. *J Bone Joint Surg Am* 87:187-202. doi:10.2106/JBJS.D.01850

Silva CMO (2008) Efeito da prednisona em lesão medular aguda experimental em ratos (*Rattus norvegicus*). Dissertação, Universidade Federal de Minas Gerais

Silva JMN, Carvalho JP, Moura Júnior MJ (2011) Estudo morfométrico da terapia LED de baixa potência em tendinite de ratos. *Fisioter Pesqui* 18:365-370. doi: org/10.1590/S1809-29502011000400012

Silva MO, Costa MBM, Borges APB, Dornas RF, Moreira JCL, Souza MV (2013) Indução de tendinopatia em ratos Wistar: modelo experimental. *Rev Acad Ciênc Agrár Ambient* 11:1-12.

Souza MV, van Weeren PR, van Schie HTM, van De Lest CHA (2010) Regional differences in biochemical, biomechanical and histomorphological characteristics of the equine suspensory ligament. *Equine Vet J* 42:611-620. doi: 10.1111/j.2042-3306.2010.0089.x

Taciro C, Serikawa MA, Parizzoto NA (2007) Aspectos nanoestruturais do colágeno no processo de regeneração tendínea estimulada por laser de baixa intensidade – Estudo Piloto. *Fisioter Especi* 1:20-24

Tardioli A, Malliaras P, Maffulli N (2012) Immediate and short-term effects of exercise on tendon structure: biochemical, biomechanical and imaging responses. *Br Med Bull*. 169-202. doi: 10.1093/bmb/ldr052

Wang JH-C (2006) Mechanobiology of tendon. Review. *J Biomech* 39:1563-1582. doi: org/10.1016/j.jbiomech.2005.05.011

Wang JH-C, Guo Q, Li B (2012) Tendon biomechanics and mechanobiology - a minireview of basic concepts and recent advancements. *J Hand Ther* 25:133-140

Wang JH-C, Iosifidis MI, Fu FH (2006) Biomechanical basis for tendinopathy. Review. *Clin Orthop Relat Res* 443:320-332. doi: 10.1097/01.blo.0000195927.81845.46

Warden SJ (2007) Animal models for the study of tendinopathy. Review. Br J Sports Med 41:232-240. doi: 10.1136/bjism.2006.032342

Wit T, Putter D, Tra WMW, Rakhorst HA, van Osch GJVM, Hovius SER, van Neck JW. Auto-crosslinked hyaluronic acid gel accelerates healing of rabbit flexor tendons in vivo. J Orthop Res 27:408-415. doi: 10.1002/jor.20730.

Wren AL, Beaupré GS, Carter DR (2000) Tendon and ligament adaptation to exercise, immobilization, and remobilization. J Rehabil Res Dev 3:217-224. doi:10.1114/1.1569267

Xavier M, David DR, Souza RA, Arrieiro NA, Miranda H, Santana ET, Silva Junior JÁ, Salgado MAC (2010) Anti-inflammatory effects of low-level light emitting diode therapy on Achilles tendinitis in rats. Lasers Surg Med 42:553-558. doi: 10.1002/lsm.20896

CAPÍTULO IV

Análise histomorfometria do tendão calcanear comum de ratos Wistar tratados com laserterapia e exercício excêntrico

Resumo

SILVA, Micheline Ozana da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2013. **Efeitos da laserterapia de baixa potência associada ou não a exercício excêntrico no tratamento de tendinopatia induzida do tendão calcanear comum de Ratos (*Rattus norvegicus*)**. Orientadora: Maria Verônica de Souza. Coorientadores: Antônio José Natali e Andréa Pacheco Batista Borges.

O laser de baixa potência é recomendado para o tratamento das tendinopatias, apesar dos resultados contraditórios no que se refere a dose de energia ideal, comprimento de onda e tempo de aplicação. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da laserterapia e do exercício excêntrico na tendinopatia do tendão calcanear comum (TCC) de ratos Wistar. Foram utilizados 48 ratos machos adultos. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos (L=laser; E=exercício excêntrico; LE=laser e exercício excêntrico, e R=repouso). Após 24 h da indução de tendinopatia unilateral, foi iniciada laserterapia (904 nm/3 J/cm²) e/ou exercício excêntrico (caminhada em declive; esteira com 15° de inclinação; 12 m/min; 50 min/dia) que permaneceu por 20 dias. Aos 3, 7, 14 e 21 dias após indução da lesão, três ratos de cada grupo foram submetidos à eutanásia, e os tendões foram obtidos para análises histológica e morfométrica. Não houve diferença entre grupos nem entre tempos nas características hemorragia (p=0,4154), formação de aderências fibrinosas (p=0,0712), e organização das fibras colágenas (p=0,2583) e do tecido conjuntivo (p=0,1046). Considerando os grupos, independentemente do tempo, foi observado que o exercício excêntrico acarretou espessamento do epitendão (p=0,0204), que foi menor no grupo submetido à laserterapia. A análise histológica revelou diferença (p=0,0032) na quantidade de células inflamatórias ao longo do tempo, sendo observado em maior quantidade no grupo apenas exercitado. Esse resultado foi confirmado pela análise morfométrica, que demonstrou haver interação significativa (grupos x tempo) nessa característica, onde o exercício excêntrico aumentou (p=0,0014) o infiltrado inflamatório ao longo do tempo (3 e 21 dias), porém, quando associado à laserterapia, ocorreu redução da reação inflamatória. Por outro lado, a associação dos tratamentos ocasionou maior

angiogênese, nas análises morfométrica ($p=0,0000$) e histológica ($p=0,0006$), quando comparado com os demais grupos, enquanto a aplicação isolada do laser de baixa potência reduziu essa característica ao longo do tempo. Os animais mantidos em repouso foram os que apresentaram menor ($p=0,0000$) quantidade de fibroblastos, na análise morfométrica. Já na avaliação histológica, houve interação significativa (grupo x tempo) ($p=0,0024$). Maior quantidade de fibroblastos foi observada nos grupos E, L e LE, no 7^o, 14^o e 21^o dias, respectivamente. Os animais que receberam laser e foram exercitados apresentaram maior ($p=0,0000$) quantidade de fibras colágenas ao longo do tempo. A laserterapia na dose de 3 J e comprimento de onda de 904 nm, iniciada 24 h após indução cirúrgica de tendinopatia em ratos Wistar é adequada para angiogênese e para evitar o espessamento do tendão, que está relacionado com a intensidade do processo inflamatório. Quando associada ao exercício excêntrico, a terapia apresenta a vantagem de aumentar a quantidade de fibras colágenas, reduzir a aderência fibrinosa e infiltrado inflamatório, apesar de prolongar a angiogênese. Portanto, o exercício excêntrico realizado concomitantemente com a laserterapia melhora as propriedades histológicas do tendão lesionado.

Palavras-chave: Atividade física; Laser; Tendão de Aquiles; Tendinopatia.

Histomorphometric analysis of the common calcaneal tendon of Wistar rats
treated with laser therapy and eccentric exercise

Abstract

SILVA, Micheline Ozana da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, november 2013. **Effects of low level laser therapy associated or not eccentric exercise on tendinopathy of the common calcaneal tendon of rats (*Rattus norvegicus*)**. Adviser: Maria Verônica de Souza. Co-advisers: Antônio José Natali and Andréa Pacheco Batista Borges.

The low-level laser therapy is recommended for the treatment of tendinopathies, in spite of the contradictory results with regard to appropriate dose of energy, wavelength and duration of application. The objective of the present study was to evaluate the effects of laser therapy and eccentric exercise on tendinopathy of the common calcaneal tendon (CCT) of Wistar rats. Forty eight male adult rats were used. The animals were randomly distributed in four groups (L=laser; E=eccentric exercise; LE=laser and eccentric exercise, and R=rest). After 24 hours of the induction of unilateral tendinopathy, laser therapy was began (904 nm/3 J/cm²) and/or eccentric exercise (downhill walking; 15° inclination treadmill; 12 m/min; 50 min/day) that remained for 20 days. Three, 7, 14 and 21 days after lesion induction, three rats of each group were euthanized and tendons were collected for histological and morphometric analyzes. No difference was among groups or between times for the characteristics hemorrhage (p=0.4154), fibrous adhesion formation (p=0.0712), and collagen fibers (p=0.0258) and connective tissue organization (p=0.1046). Considering the groups, regardless of the time, it was observed that eccentric exercise caused epitenon thickening (p=0.0204), which was lower in the group submitted to laser therapy. Histological analysis showed difference (p=0.0032) in the number of inflammatory cells along time, begin observed in greater amount only exercised group. This result was confirmed by morphometric analysis, which demonstrated that there was significant interaction (group x time) in this characteristic, where the eccentric exercise increased (p=0.0014) the inflammatory infiltrate along time (3 and 21 days), however when associate with laser therapy, there was reduction the inflammatory reaction. On the other had, the combination of the treatments led to a greater angiogenesis in morphometric (p=0.0000) and histological (p=0.0006) analyzes compared to the other groups, while the application of low-level laser alone reduced this characteristic along time. Animals kept at rest presented the lowest (p=0.0000) amount

of fibroblasts, in morphometric analysis. However, in the histological evaluation significant interaction (group x time) ($p=0.0024$) was observed. Greater amount fibroblast was observed in groups E, L and LE, the 7th, 14th and 21st days, respectively. The animals who received laser and were exercised showed higher ($p=0.0000$) amount of collagen fibers along time. Laser therapy at a dose of 3 J and wavelength of 904 nm, starting 24 hours after surgically induced tendinopathy in Wistar rats is suitable for angiogenesis and to prevent thickening of the tendon, which is related to the intensity of the inflammatory process. When associated with eccentric exercise, the therapy shows the advantage of increasing the amount of collagen fibers, reduce fibrous adhesion and inflammatory infiltrate, despite prolonging angiogenesis. Therefore, eccentric exercise performed concomitantly with laser therapy improves histological properties of the injured tendon.

Keywords: Physical Activity; Laser; Achilles tendon; Tendinopathy.

Introdução

Até recentemente o termo tendinite era utilizado para as anormalidades crônicas dos tendões, porém sugerindo a presença de processo inflamatório. Entretanto, enquanto pesquisa revelou a coexistência de quadro inflamatório e alterações degenerativas nessa afecção (Andress e Murrel, 2008), outras demonstraram pouco ou nenhum processo inflamatório (Alfredson et al., 2000; Soslowky et al., 2000). Adicionalmente, estudos histológicos revelaram reparação tecidual anormal e degeneração, de forma que a terminologia tendinopatia passou a ser utilizada por pesquisadores para definir diversas condições dolorosas que afetam os tendões (tendinites, tendinoses), e que são acompanhadas por dor, edema e redução do desempenho (Alfredson, 2003; Maffulli et al., 2003; Wang et al., 2006).

Tanto em pessoas atletas como sedentárias, a tendinopatia é considerada altamente prevalente. Warden (2007) relata que 14% dos atletas de elite podem ser afetados pela afecção, cujo tempo de recuperação pode variar entre três a seis meses. Histologicamente pode se manifestar pela desorganização do colágeno, aumento do número de células, arredondamento dos núcleos dos fibroblastos (Glazebrook et al., 2008), aumento na vascularização (Khan et al., 1999) e dos glicosaminoglicanos, possíveis de serem observados na coloração Alcian blue (Movin et al., 1997).

Os tratamentos convencionais para tendinopatia objetivam inicialmente o alívio da dor e a resolução do processo inflamatório, porém os resultados nem sempre são satisfatórios. Para que uma terapia seja considerada como eficaz, deve reduzir a inflamação aguda, e proporcionar reparação tecidual em curto período de tempo (Fillipin et al., 2005). O laser de baixa potência é uma terapia que vem sendo utilizada para tratamento de afecções musculotendíneas e osteo-articulares, devido ao seu efeito analgésico e anti-inflamatório. Também por estimular a síntese de colágeno (Dogan et al., 2010), e fatores de crescimento, o que acelera o reparo tecidual (Salate et al., 2005), com melhora na organização estrutural das fibras de colágeno ao longo do eixo longitudinal do tendão (Arruda et al., 2007). A utilização concomitante do laser com exercício excêntrico controlado pode resultar em uma melhor resposta à terapia, já que pode favorecer a atividade fibroblástica, conduzindo ao realinhamento das fibras colágenas e redução da possibilidade de formação de aderências teciduais, além de promover uma recuperação mais rápida do tendão (Fillipin et al., 2005; Salate et al., 2005; Bjordal et al., 2008). Entretanto apesar dessa assertiva, poucas pesquisas fazem esse tipo de associação. O presente estudo parte da hipótese de que a associação de

laserterapia com atividade física controlada resulta em um processo de reparação mais rápido e organizado, em um tendão com características histológicas mais próximas ao sadio. Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a resposta à terapia com laser (arseneto de gálio) de baixa potência associado ao exercício excêntrico caminhada em declive em tendinopatia induzida do tendão calcâneo comum de ratos Wistar, mediante avaliações histopatológica e morfométrica.

Material e Métodos

Esse projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa. Os procedimentos foram realizados de acordo com as Normas de Conduta para o Uso de Animais no Ensino, Pesquisa e Extensão do DVT/UFV, o Código de Ética Profissional do Médico Veterinário, os princípios éticos para pesquisa animal, estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e a Legislação brasileira vigente.

Foram utilizados 48 ratos adultos, (*Rattus Norvegicus*, linhagem Wistar), machos, com idade entre 12 e 14 semanas ($13,02 \pm 0,83$), e peso corporal variando entre 300 e 350 g ($325 \pm 18,76$). Somente foram incluídos no estudo animais com integridade do aparelho locomotor, determinada após exame físico, onde foram realizados testes comportamentais para avaliação da sensibilidade dolorosa e capacidade de locomoção (Tabela 1).

A sensibilidade dolorosa foi avaliada mediante escala subjetiva, classificada de 0 a 5, conforme protocolo utilizado por Attal et al. (1990) com adaptações (reclassificação dos escores, e maiores detalhes sobre as características). A capacidade motora foi avaliada com escores que variaram de 0 a 12, segundo protocolo descrito por Silva. (2008). Para essa avaliação, foi observada a atividade espontânea dos animais, no que se refere ao movimento dos membros pélvicos e andamento, ou seja, a deambulação. Inicialmente, os animais foram colocados individualmente em um espaço de 1,5 m de comprimento por 0,5 m de largura, para observação do andamento (incluindo claudicação) e, na sequência, foram submetidos a uma avaliação mais específica, realizada em barras de madeira. Foram utilizadas seis barras, cada uma com 1 m de comprimento, e com larguras de 7,7; 6,7; 5,7; 4,7; 3,7; 2,7 e 1,7 cm. Todos os ratos foram colocados para caminhar duas vezes em cada uma das barras, sendo o procedimento realizado da barra mais larga para a mais estreita.

Tabela 1 Teste comportamental baseado na sensibilidade dolorosa e na capacidade motora

Escore	Avaliação física
Sensibilidade dolorosa (de acordo com Attal et al., 1990)	
0	Ausente (região distal do membro pressiona normalmente o solo)
1	Discreta (região distal do membro repousa discretamente no solo, com manutenção dos dígitos flexionados)
2	Discreta a moderada (apenas a face interna da região distal do membro é pressionada no solo durante o andamento)
3	Moderada (apenas a região talocalcânea é pressionada no solo)
4	Moderada a intensa (toda a região distal se encontra elevada)
5	Intensa (região distal elevada, e sendo lambida pelo animal)
Capacidade Motora (de acordo com Silva, 2008)	
0	Nenhum movimento nos posteriores, sem apoio de peso
1	Movimento sutil, desconexo dos posteriores, sem apoio de peso
2	Movimento bem visível nos posteriores, sem apoio de peso
3	Apoio de peso nos posteriores, anda com déficit
4	Anda com dificuldade moderada
5	Anda com déficit discreto e não consegue andar na barra de 7,7 cm
6	Anda normal ou com déficit discreto, e consegue andar na barra de 7,7 cm
7	Consegue andar na barra de 6,7 cm
8	Consegue andar na barra de 5,7 cm
9	Consegue andar na barra de 4,7 cm
10	Consegue andar na barra de 3,7 cm
11	Consegue andar na barra de 2,7 cm
12	Consegue andar na barra de 1,7 cm

Durante o período de uma semana, os animais foram alojados em gaioleiros individuais (Beiramar Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, SP, Brasil), para se adaptarem às condições de temperatura de aproximadamente 26°C, e aos fotoperíodos de 12 h diárias. Todos os ratos se movimentaram livremente dentro da gaiola, receberam ração comercial (VETCOM Comercial Agroveterinária Ltda, Belo Horizonte, MG, Brasil), e água *ad libitum*.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos (L, E, LE e R) contendo 12 ratos em cada um deles, sendo três animais em cada momento estudado. O grupo L foi composto por animais submetidos à laserterapia, enquanto que o grupo E, a exercício excêntrico do tipo caminhada em esteira. Os animais do grupo LE foram submetidos tanto a laserterapia quanto a caminhada em esteira, já os do grupo R ficaram em repouso durante todo o processo de reparação tendínea. A identificação dos animais foi realizada por meio de sequência numérica localizada na cauda, de acordo com o grupo a que pertenciam. Os animais dos grupos E e R foram manipulados como se fossem receber a radiação, porém o equipamento foi mantido desligado.

Indução de tendinopatia

A escolha de qual tendão calcanear comum seria submetido à tendinopatia unilateral foi aleatória. Para indução cirúrgica da lesão, os ratos foram deixados em jejum alimentar (2 h), e hídrico (1 h) antes do início do procedimento anestésico, que foi realizado conforme descrito por Silva et al. (2013). Após tricotomia na região plantar do membro pélvico, os animais foram colocados em câmara de indução onde receberam isoflurano (Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP, Brasil) na concentração de 5% em 2 L de O₂ por um período de aproximadamente 2 min. Na sequência foram retirados da câmara e posicionados na mesa cirúrgica, onde continuaram recebendo isoflurano (3% em 1,5 L de O₂) durante todo o procedimento cirúrgico.

Após antissepsia local com iodo-povidine tópico a 1% (Rioquímica Indústria Farmacêutica, São José do Rio Preto, SP, Brasil), os animais foram posicionados em decúbito ventral, sendo então realizada incisão cutânea longitudinal de aproximadamente 1,5 cm na região plantar do membro pélvico direito ou esquerdo, (escolha aleatória), utilizando bisturi nº 11. Na sequência foi realizada divulsão roma do tecido subcutâneo e exposição do tendão calcanear comum. A lesão foi realizada no ponto médio situado entre a junção miotendínea e a inserção do tendão no osso calcâneo conforme descrito por Silva et al. (2013), mediante a realização de compressão transversal de toda a espessura do tendão durante 10 segundos, utilizando duas cremalheiras da pinça *Halstead* mosquito hemostática, assim como 10 escarificações das fibras do tendão, em sentido próximodistal, utilizando lâmina de bisturi nº 11. Em seguida a pele foi suturada utilizando Nylon 3-0 (Shalon Fios Cirúrgicos Ltda, São Luiz de Montes Belos, GO, Brasil), no padrão contínuo, do tipo *Wolff*.

Ainda com os animais sob efeito anestésico, foi administrada dose única (40 mg/kg) do antibiótico enrofloxacin (Laboratórios Vencofarma do Brasil Ltda, Parque das Indústrias Leves, Londrina, PR, Brasil) por via intramuscular, assim como o analgésico morfina [3 mg/kg, via subcutânea (Cristália produtos químicos e farmacêuticos Ltda, Itapira, SP, Brasil)], que foi repetido a cada 6 h, por um período de 12 h. Ao final do procedimento cirúrgico, os animais foram acomodados em aquecedores, a uma temperatura de aproximadamente 27°C, onde permaneceram até completa recuperação anestésica, o que ocorreu em um tempo máximo em 7 min. Durante o período pós-operatório, as feridas foram limpas diariamente com gaze embebida em água corrente.

Tratamentos

Os animais dos grupos L e LE receberam laser de baixa potência, a base de GaAs. A aplicação foi realizada de forma pontual, com a caneta de laser localizada em um único ponto, no modo pulsátil, durante 9 seg/dia, com o aparelho laserpulse (Ibramed Indústria Brasileira de Equipamentos Médicos Ltda, Amparo, SP, Brasil), comprimento de onda de 904 nm, densidade de energia de 3 J/cm² e potência máxima de 100 mW/cm². O tratamento foi iniciado 24 h após indução da lesão, sendo aplicado diariamente por um período de 20 dias. Durante a aplicação do laser, os animais foram imobilizados manualmente e posicionados em decúbito ventral, conforme protocolo utilizado por Xavier et al. (2010). O aparelho foi colocado perpendicular à lesão, sendo a radiação feita sempre no mesmo horário, observando um intervalo de 24 h entre as aplicações, conforme descrito por Taciro et al. (2007) e Silva et al. (2011). Como medida de segurança, os executores utilizaram óculos de proteção (Ibramed Indústria Brasileira de Equipamentos Médicos Ltda, Amparo, SP, Brasil) contra a radiação emitida.

Os animais dos grupos E e LE foram submetidos diariamente a exercício excêntrico controlado, a partir de 24 h da indução de tendinopatia. Foi adotado um protocolo de caminhada em esteira rolante com motor elétrico (Insight Pesquisa e Ensino Ltda, São Paulo, SP, Brasil) própria para ratos, durante um período de três semanas, modificado a partir do descrito por Nakamura et al. (2008), que utilizaram corrida em esteira, com maior período de exercício (60 min) e velocidade (15m/min). Com a finalidade de adaptação prévia ao exercício, os ratos foram exercitados durante sete dias consecutivos antes da indução cirúrgica da lesão.

A velocidade foi fixada em 12 m/min, por um tempo de 50 min/dia, tanto durante o período de adaptação como no experimental. A esteira foi mantida com 15° de inclinação, e os animais caminharam em declive, ou seja, em sentido contrário ao tradicional. O exercício foi realizado em ambiente tranquilo, com pouca iluminação e em temperatura ambiente de aproximadamente 25°C.

Avaliação física

Após indução de tendinopatia e durante a realização dos tratamentos, os ratos foram submetidos aos testes comportamentais descritos na Tabela 1. O primeiro exame foi conduzido 12 h após cirurgia, sendo os demais realizados a cada três dias, durante 20 dias. Foram realizadas 24 observações (n=24) durante os testes comportamentais, ou seja, oito avaliações contendo três animais (repetições) em cada grupo. O exame local consistiu de avaliação da ferida cirúrgica. Inicialmente foi observado se havia sinais de inflamação ou infecção no local da cirurgia.

Avaliações histológica e morfológica

Fragments de tendões foram obtidos durante as fases inflamatória e proliferativa do processo de reparação tendínea. Para isso, três ratos de cada grupo foram aleatoriamente eutanasiados aos 3, 7, 14 e 20 dias após o início do tratamento, conforme o protocolo descrito por Carvalho et al. (2006), com modificação.

Para a realização da eutanásia, os animais foram deixados em jejum alimentar (2 h) e hídrico (1 h). O procedimento foi realizado com tiopental sódico [100 mg/kg, via intraperitoneal, (Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP, Brasil)]. Após eutanásia foi realizada antissepsia e incisão cutânea da pele referente à região plantar do membro pélvico. Na sequência foi realizada divulsão roma do tecido subcutâneo e exposição do tendão calcâneo comum, sendo verificada a existência ou não de aderência tecidual entre o tendão e a pele e/ou tecidos adjacentes. Os tendões foram coletados em toda a sua extensão, desde a junção miotendínea até a inserção no osso calcâneo, e colocado em formol tamponado a 10%, onde permaneceram por 48 h. As amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool, diafanizadas em xilol, infiltradas e incluídas em parafina. Cada bloco, representando uma amostra, foi seccionado em micrótomo para obter cortes longitudinais de 4 µm de espessura. Após serem desparafinados, diafanizados e reidratados, os cortes foram corados pelas técnicas de hematoxilina-eosina (HE), Picrosirius Red e tricrômico de Masson (Erviagas

instrumental cirúrgico Ltda, São Paulo, SP, Brasil), segundo as indicações do fabricante. Em seguida, os cortes foram desidratados, diafanizados e cobertos com lamínula e meio de montagem rápida.

As análises histológica e morfométrica foram conduzidas em microscópio de luz (Olympus BX50, BR Ltda Produtos e Equipamentos para Laboratório, São Paulo, SP, Brasil), acoplado à câmera fotográfica (Olympus QColor 3, Brazeiss Representações Ltda, São Paulo, SP, Brasil), utilizando objetiva de 20x e lentes oculares de 10x. Para a observação em microscópio de luz polarizada foi acoplado um filtro para luz polarizada. As análises foram conduzidas por três avaliadores sem conhecimento sobre os tratamentos aos quais as lâminas pertenciam.

A caracterização celular e organização da matriz tendínea foram determinadas nos cortes corados com HE. A avaliação seguiu os critérios descritos por Orhan et al. (2004) com algumas modificações (nomenclatura utilizada para as características). Foram avaliados formação de aderências fibrinosa, organização das fibras colágenas e espessamento do epitendão (aumento), angiogênese, leucócitos e fibroblastos. Também foi avaliada a ocorrência de hemorragia no tendão, mediante presença de hemácias, de acordo com protocolo utilizado por Eliasson et al. (2012), com algumas modificações nos escores adotados (Tabela 2).

Análise morfométrica foi utilizada para avaliar quantitativamente o infiltrado inflamatório, angiogênese, fibras colágenas, fibroblasto assim como colágenos tipos I e III (coloração de Picrosirius Red). Para isso, em cada amostra, foram obtidas 10 fotomicrografias em objetiva de 20x, escolhidas aleatoriamente e colocadas sob uma grade com 400 interseções confeccionada pelo programa Power Point, conforme realizado por Zandim et al. (2013), com modificações apenas na quantidade de intersecções.

A coloração com o tricrômico de Masson foi utilizada como auxílio na avaliação da organização do tecido conjuntivo, sendo utilizado o mesmo sistema de pontuação descrito na Tabela 2. Já a de Picrosirius Red foi realizada para complementar a observação da organização das fibras colágenas e para realizar a quantificação das fibras colágenas (I e III), que foram analisadas morfometricamente.

Análise estatística

O experimento foi instalado no delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos (grupos L, E, LE e R) em três repetições (animais), avaliados aos 3, 7, 14 e 21 dias após a indução da lesão. A quantidade de ratos estabelecida por grupo foi à mínima necessária para a condução do experimento, o que permitiu a realização de análises inferenciais com um número adequado de graus de liberdade para o resíduo da análise de variância (ANOVA). Os dados foram submetidos à análise descritiva com a apresentação dos valores médios e desvios padrão, que no caso da avaliação física foi realizada a partir dos escores de 0 a 12 (Tabela 1). Foram efetuados os testes de Lilliefors e de Cochran para verificação da normalidade e da homogeneidade de variâncias, respectivamente. Em seguida foi utilizada ANOVA para verificação do efeito dos tratamentos nas avaliações física (capacidade motora), macroscópica (presença de aderência fibrinosa), histológicas (hemorragia, aderência tecidual fibrinosa, organização das fibras colágenas, espessamento do epitélio, angiogênese, leucócitos, fibroblastos e organização do tecido conjuntivo) e morfométricas (fibras colágenas, fibroblastos, infiltrado inflamatório, angiogênese, fibras colágenas do tipo I e III). Os tratamentos foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Foi construído gráfico de linhas, ao longo do tempo, para a característica capacidade motora, e tabelas com valores médios e desvios padrão para características histológicas e morfométricas. Todas as análises foram realizadas com o software Statistica 12, 2013 (www.statsoft.com).

Tabela 2 Sistema de pontuação adotado para as características histológicas avaliadas para classificação da reparação tendínea

Variáveis	Pontuação	Crítérios avaliados
Hemorragia	0	Ausente
	1	Discreta
	2	Moderada
	3	Moderada a Intensa
	4	Intensa
Formação de aderência fibrinosa	0	Ausente
	1	Discreta
	2	Moderada
	3	Moderada a Intensa
	4	Intensa
Organização das fibras colágenas	0	Ausente
	1	Discreta
	2	Moderada
	3	Moderada a Intensa
	4	Intensa
Espessamento do epitendão	0	Ausente
	1	Discreto
	2	Moderado
	3	Moderado a Intenso
	4	Intenso

Tabela 2 Sistema de pontuação adotado para as características histológicas avaliadas para classificação da reparação tendínea (continuação)

Variáveis	Pontuação	Crítérios avaliados
Angiogênese	0	Ausente
	1	Discreta
	2	Moderada
	3	Moderada a Intensa
	4	Intensa
Leucocitos	0	Ausente
	1	Discreto
	2	Moderado
	3	Moderado a Intenso
	4	Intenso
Fibroblastos	0	Ausente
	1	Discreto
	2	Moderado
	3	Moderado a Intenso
	4	Intenso

Resultados

Avaliações física e macroscópica

Nenhum animal apresentou infecção nem deiscência da ferida cirúrgica. Na avaliação física realizada 12 h após indução de tendinopatia ocorreu aumento da temperatura local nos tendões referentes aos grupos L (n=4, 33,3%), R (n=2, 16,6%), E (n=1, 8,3%) e LEA (n=1, 8,3%), que se manteve presente até 72 h após indução da lesão.

Durante a avaliação da sensibilidade dolorosa, os ratos aparentemente não apresentaram sinais de desconforto, e mantiveram postura normal do membro pélvico. Portanto, todos os animais receberam escore 0 (ausente) para a classificação da sensibilidade dolorosa adotada no estudo. Por outro lado, a avaliação da capacidade locomotora revelou discreta claudicação em todos os animais até 72 h após indução de

tendinopatia, observada durante deambulação em campo aberto. Houve diferença ($p=0,0008$) entre os grupos para a capacidade motora. Os ratos mantidos em repouso apresentaram menor capacidade de locomoção ($10,23\pm 2,12$) do que os dos demais grupos, cujos valores médios e desvios padrão foram de $10,73\pm 1,22$ (laser) $11,25\pm 0,99$ (laser e exercício excêntrico) e $11,37\pm 0,92$ (exercício excêntrico). Na avaliação física realizada no 21º dia, apenas um animal de cada grupo conseguiu se locomover na barra de 1,7 cm. A Figura 1 apresenta o comportamento dessa característica ao longo do tempo, sendo possível observar a menor resposta nos animais deixados em repouso.

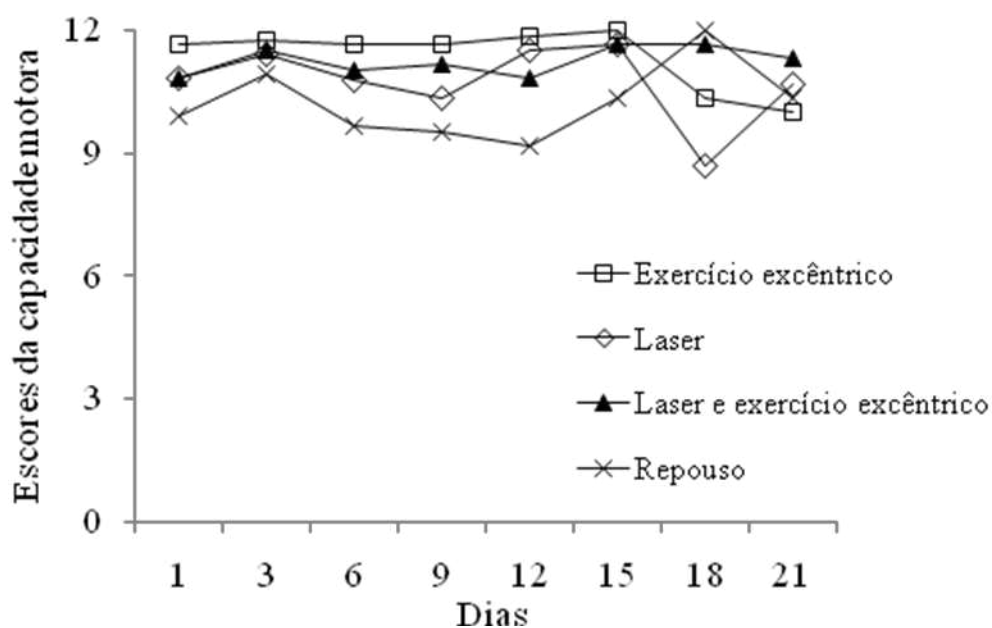


Fig. 1 Evolução dos escores médios obtidos na avaliação da capacidade motora ao longo do tempo. Nota-se que o grupo mantido em repouso apresentou, na maioria dos tempos avaliados, menor capacidade de locomoção, diferentemente do grupo submetido apenas a exercício excêntrico.

Na avaliação macroscópica realizada durante a obtenção das amostras para exame histológico/morfométrico não foi observada aderência tecidual nos ratos eutanasiados no 3º dia, mas os tendões apresentaram coloração rosada. Um rato do grupo L e outro do grupo A apresentaram discreto sangramento local, e não havia sinal de cicatrização inicial na incisão cirúrgica. Após uma semana de indução da lesão, havia formação de aderência entre o tendão e tecidos adjacentes em apenas um animal do grupo L e outro do R, com tendão apresentando coloração acinzentada e fibras de aspecto macio. Os

ratos eutanasiados com duas e três semanas apresentaram tendões aparentemente saudáveis e de coloração amarela clara.

Avaliações histológica e morfológica

Na observação histológica geral das lâminas coradas com HE, tricrômico de Masson e Picrosirius Red foi possível distinguir áreas lesionadas e saudáveis, que se diferenciaram em tamanho e característica dependendo da fase inflamatória ou de proliferação. Áreas lesionadas eram mais acentuadas na periferia do tendão. Os cortes histológicos avaliados no 3º dia após indução da lesão apresentavam discreta hemorragia, com moderada a intensa aderência tecidual, caracterizada pela presença de fibrina, além de espessamento do epitendão. Infiltrado inflamatório constituído predominantemente de polimorfonucleares também foi observado em quantidade superior aos demais tempos avaliados. Fibroblastos com núcleos arredondados (células blásticas) estiveram presentes, ainda que em quantidade discreta, além da formação de novos vasos, desorganização tecidual e falta de paralelismo das fibras colágenas.

Na primeira semana, ainda foi possível observar discreta hemorragia, assim como um epitendão mais espesso devido ao acúmulo local de células inflamatórias. A quantidade de leucócitos se manteve moderada, sendo possível identificar grande quantidade de neutrófilos, aumento da angiogênese e na quantidade de fibroblastos. Nesse momento as fibras colágenas ainda se encontravam desorganizadas e com ausência de paralelismo. Na avaliação realizada na segunda semana após a indução da lesão foi observada grande quantidade de fibroblastos arredondados, e fibras colágenas com discreta organização. Foi observado aumento da vascularização e discreta quantidade de células inflamatórias. Finalmente na terceira semana já havia sinal de remodelação tecidual, caracterizado pela redução das células inflamatórias, tendência à organização e paralelismo das fibras colágenas, além de maior quantidade de fibroblastos em formato fusiforme.

Os valores médios e desvios padrão por grupo e por tempo referente a avaliação semiquantitativa das características histológicas estudadas são apresentados nas Tabelas 3 e 4. Os resultantes da análise morfológica estão demonstrados na Tabela 5.

Não houve diferença ($p=0,4154$) entre grupos para as características hemorragia e aderência tecidual ($p=0,0712$) (Tabela 3). Discreta quantidade de hemácias extravasadas foi observada em todos os grupos no 3º dia e nos grupos LE e R no 7º dia,

sendo ausente nos grupos L e E. Na segunda e terceira semanas não havia hemorragia em nenhum dos grupos.

Na avaliação histológica realizada no 3^o dia, os grupos L, E e R apresentaram aderência tecidual de moderada a intensa, determinada pela presença de fibrina (Fig. 2a) (Tabela 3). Uma semana após a lesão, a aderência foi bastante variável, sendo discreta nos grupos L e E, moderada no LE, e de moderada a intensa no grupo R. Na segunda semana os animais tratados apenas com laserterapia apresentaram moderada aderência, que foi discreta nos grupos E e R, e ausente no LE. Já nos ratos eutanasiados na terceira semana essa característica foi moderada no R, discreta nos grupos L e LE, e considerada como ausente no grupo submetido atividade física controlada.

Houve diferença ($p=0,0204$) para a característica espessamento do epitendão (Tabela 3), sendo menor ou maior no grupo submetido apenas à laserterapia ou exercício excêntrico, respectivamente. Aumento moderado ocorreu no 3^o dia da avaliação nos grupos LE e R, sendo discreto no grupo E, e considerado como ausente no L. Na primeira semana apenas os grupos LE e E apresentaram discreto espessamento do epitendão, também classificada dessa forma no 21^o dia. Os ratos eutanasiados na segunda semana após indução de tendinopatia não apresentaram aumento da camada mais externa do tendão.

Não houve diferença ($p=0,2583$) entre grupos na organização das fibras colágenas, que foi ausente nos grupos L e R, e discreta nos grupos submetidos ao exercício excêntrico (E e LE) no 3^o dia da avaliação. Essa característica foi considerada moderada nos ratos apenas exercitados na primeira semana após indução de tendinopatia, sendo discreta nos grupos L, LE e R. Nos animais tratados com laser associado (Fig. 2b) ou não à atividade física, essa organização moderada foi constatada apenas na segunda semana, permanecendo discreta nos grupos E e R. Três semanas após a indução de tendinopatia os ratos submetidos apenas à laserterapia apresentaram apenas discreta organização das fibras colágenas. O mesmo ocorreu com os animais que se encontravam em repouso. Apenas os ratos exercitados apresentaram moderada organização na avaliação final.

Na coloração Picrosirius Red foi possível a visualização da região lesionada, caracterizada por áreas com pouca organização na fase inicial, mas com maior quantidade de fibras colágenas do tipo III em todos os tempos avaliados. Essas fibras, identificadas na coloração esverdeada, se encontravam emaranhadas com as do tipo I, coradas em amarelo ou vermelho. Essa técnica histoquímica revelou áreas em processo

de organização, com presença de fibras colágenas do tipo I, que foram especialmente observadas nos tendões tratados com laserterapia, que quando associado a exercício excêntrico apresentou feixes de fibras com melhor organização.

A análise morfométrica revelou não haver diferença ($p=0,2783$) entre grupos nem entre tempos ($p=0,4804$) na quantidade de fibras colágenas do tipo I. Entretanto, essas fibras foram observadas a partir da segunda semana, e apenas no grupo tratado com laserterapia, permanecendo no 21º dia. Nos grupos de ratos exercitados (E e LE) essas fibras foram inicialmente visualizadas com três semanas (Fig. 2c).

O comportamento das fibras colágenas do tipo III foi bastante variável, embora não tenha ocorrido diferença ($p=0,3052$) entre grupos nem entre tempos ($p=0,7617$) na quantidade dessas fibras. Foi possível observá-las no 3º dia da avaliação, sendo em maior quantidade no grupo LE ($51,91\pm 33,51$), e menor no grupo R ($12,94\pm 1,20$). Nesse tempo as fibras se apresentavam desorganizadas e com feixes separados. Na primeira semana os animais mantidos em repouso apresentaram maior quantidade ($43,78\pm 38,87$), sendo menor nos animais que realizaram apenas exercício excêntrico ($18,57\pm 9,64$). Na segunda semana o grupo LE ($53,51\pm 7,36$) foi o que apresentou maior quantidade de fibras colágenas do tipo III, enquanto os ratos submetidos apenas a exercício excêntrico ($17,12\pm 7,55$) permaneceram com a menor quantidade. Três semanas após indução da lesão foi o grupo L ($38,25\pm 24,18$) que apresentou os maiores valores dessa característica, que foi menor no grupo LE ($23,74\pm 13,43$).

Análise morfométrica das amostras coradas com HE (Tabela 5) revelou ao longo do tempo, maior ($p=0,0000$) quantidade de fibras colágenas no grupo LE, que foi semelhante ao grupo L. Embora não tenha ocorrido diferença entre os tempos ($p=0,6797$), a quantificação das fibras colágenas revelou que no 3º dia os grupos LE e R apresentaram maior e menor quantidade dessa característica. No 7º dia foram os animais tratados com laser que apresentaram maior quantidade de fibras, sendo menor nos ratos mantidos em repouso. Na segunda semana o grupo LE voltou a apresentar maior quantidade de fibras colágenas, sendo essa característica menor no grupo submetido a exercício excêntrico. Os ratos deixados em repouso e tratados com laser foram os que apresentaram respectivamente, menor e maior quantidade de fibras colágenas aos 21 dias.

Houve diferença ($p=0,0000$) na quantidade de fibroblastos, considerando os grupos, mas não entre os tempos ($p=0,2305$) (Tabela 5), sendo menor no grupo deixado em repouso. No terceiro dia o grupo L apresentou maior quantidade de fibroblastos

arredondados. A quantidade foi maior nos grupos E, L e LE, no 7^o, 14^o e 21^o dias, respectivamente. A Figura 2d corresponde a uma imagem obtida 21 dias após indução de tendinopatia tratada apenas o laser de baixa potência. Resultado semelhante para essa característica ocorreu na avaliação histológica no 7^o, 14^o e 21^o dias, onde ocorreu interação (grupo x tempo) significativa ($p=0,0024$) (Tabela 4).

Também houve diferença ($p=0,0032$) entre grupos para a característica leucócitos (Tabela 4). Os ratos tratados apenas com exercício excêntrico apresentaram maior infiltrado inflamatório no 3^o, 7^o, 14^o e 21^o dias, enquanto os que receberam laserterapia associado ao exercício apresentaram menor infiltrado leucocitário em todos os momentos avaliados. Resultado semelhante foi obtido na análise morfométrica. A quantidade do infiltrado inflamatório, com interação (grupo x tempo) significativa ($p=0,0014$), ocorreu no 3^o e 21^o dias, onde essa característica foi maior nos ratos apenas exercitados (Tabela 5). Na primeira avaliação o infiltrado consistiu principalmente de neutrófilos degenerados, sendo observados poucos macrófagos e eosinófilos. Na primeira e segunda semana não houve diferença entre os grupos, entretanto os animais apenas exercitados continuaram apresentando maior quantidade de células inflamatórias, sendo observados nesse momento tanto neutrófilos como macrófagos e linfócitos. Por outro lado, o grupo LE apresentou menor quantidade de células inflamatórias em todos os tempos avaliados.

Avaliação histológica revelou diferença ($p=0,0006$) entre grupos na característica angiogênese (Tabela 4). Os animais do grupo LE e L apresentaram respectivamente, maior e menor neoformação de vasos sanguíneos. No 3^o dia todos os grupos apresentaram angiogênese classificada como discreta, sendo moderada nos grupos E e LE no 7^o dia, e de moderada a intensa no grupo LE no 14^o dia. Na última avaliação, realizada no 21^o dia se observou redução nessa característica, que foi discreta nos grupos R, E e L, e moderada no grupo LE.

Considerando todos os momentos avaliados, foi observada por morfometria, maior ($p=0,0000$) angiogênese no grupo LE, em relação ao grupo L, que foi semelhante aos grupos E e R (Tabela 5). Não houve diferença entre os tempos avaliados ($p=0,7455$), entretanto no 3^o dia havia angiogênese mais intensa nos grupos E (Fig. 2e), e LE, permanecendo assim na primeira semana. Nas segunda e terceira semanas foi o grupo de animais submetidos laserterapia associada a exercício excêntrico que apresentou maior angiogênese.

Não houve diferença ($p=0,1046$) entre grupos para a característica organização do tecido conjuntivo (Tabela 4), que foi facilmente avaliada nas amostras coradas pelo tricrômico de Masson. Nessa coloração a organização foi ausente no 3^o dia em todos os grupos. Na primeira semana os ratos submetidos a exercício excêntrico apresentaram moderada organização, sendo discreta nos grupos L, LE e ausente no R. Na segunda semana todos os grupos apresentaram moderada organização tecidual, exceto o L no qual essa característica foi discreta. Somente o grupo submetido apenas a exercício excêntrico (Fig. 2f) apresentou uma organização classificada como de moderada a intensa na terceira semana.

Tabela 3 Avaliação histológica semiquantitativa (média±desvios padrão) das características hemorragia, formação de aderências, espessamento do epitendão, organização das fibras colágenas, obtida por sistema de escore, para verificação do processo de reparação tendínea durante diferentes momentos

Tempo (dias)	Repouso	Exercício excêntrico	Laser	Laser + Exercício excêntrico
Hemorragia				
3	1,33±0,58	1,00±0,00	1,00±0,00	1,00±1,00
7	1,00±1,00	0,67±0,58	0,33±0,58	1,00±0,00
14	0,00±0,00	0,00±0,00	0,33±0,58	0,00±0,00
21	0,67±1,5	0,00±0,00	0,00±0,00	0,33±0,58
Média±DP	0,75±0,87	0,42±0,51	0,42±0,51	0,58±0,67
Formação de Aderências				
3	3,33±1,15	3,00±1,73	3,67±0,58	2,67±1,15
7	3,00±1,00	1,33±0,58	1,67±1,15	2,00±1,00
14	1,33±0,58	1,33±0,58	2,33±0,58	0,67±0,58
21	2,00±1,00	0,67±0,58	1,67±0,58	1,00±1,00
Média±DP	2,42±1,16	1,58±1,24	2,33±1,07	1,58±1,31
Espessamento do Epitendão				
3	2,00±0,00	1,67±0,58	0,33±0,58	2,00±0,00
7	0,00±0,00	1,67±0,58	0,67±0,58	1,33±1,15
14	0,67±1,15	0,33±0,58	0,00±0,00	0,00±0,00
21	0,33±0,58	1,33±1,15	0,67±1,15	1,33±0,58
Média±DP	0,75±0,97AB	1,75±0,87A	0,42±0,67B	1,17±0,94AB
Organização das Fibras Colágenas				
3	0,00±0,00	1,00±0,00	0,33±0,58	1,00±0,00
7	1,67±0,58	2,00±0,00	1,00±0,00	1,67±1,15
14	1,67±0,58	1,67±0,58	2,33±1,15	2,33±0,58
21	1,67±0,58	2,00±2,00	1,67±0,58	2,33±1,55
Média±DP	1,25±0,87	1,67±0,98	1,33±0,94	1,83±0,87

Na linha, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$). DP: desvio padrão.

Tabela 4 Avaliação histológica semiquantitativa (média±desvios padrão) das características fibroblastos, leucócitos, angiogênese e organização do tecido conjuntivo, obtida por sistema de escore, para verificação do processo de reparação tendínea durante diferentes momentos (continuação)

Tempo (dias)	Repouso	Exercício excêntrico	Laser	Laser + exercício Excêntrico
Fibroblastos				
3	0,33±0,58	0,67±0,58	1,33±0,58	1,00±0,00
7	0,33±0,58B	2,00±0,00A	1,00±0,00AB	1,67±0,58A
14	1,00±0,00B	1,67±0,58B	3,00±0,00A	1,67±0,58B
21	1,33±0,58B	1,67±0,58AB	2,00±0,00AB	2,67±1,58A
Média±DP	0,75±0,62	1,50±0,67	1,83±0,83	1,75±0,75
Leucocitos				
3	2,33±0,58	3,00±0,00	2,67±0,58	2,00±0,00
7	1,67±0,58	2,67±0,58	2,00±0,00	1,67±0,58
14	1,33±0,58	1,67±0,58	1,67±0,58	1,00±0,00
21	0,67±0,58	1,33±2,00	1,00±0,00	0,67±0,58
Média±DP	1,50±0,80B	2,17±0,94A	1,83±0,72AB	1,33±0,65B
Angiogênese				
3	1,33±0,58	1,67±1,53	1,33±0,58	1,67±0,58
7	1,33±0,58	2,67±0,58	1,00±0,00	2,67±0,58
14	2,33±0,58	2,33±0,58	1,67±0,58	3,33±0,58
21	1,33±0,58	1,33±0,58	1,67±0,58	2,67±0,58
Média±DP	1,58±0,67B	2,00±0,67AB	1,42±0,51B	2,58±0,79A
Organização do Tecido Conjuntivo				
3	0,00±0,00	0,67±0,58	0,33±0,58	0,33±0,58
7	0,00±0,00	2,00±0,00	1,67±0,58	1,67±1,15
14	2,33±0,58	2,00±0,00	1,67±0,58	2,67±0,58
21	2,33±0,58	3,33±1,15	2,33±0,58	2,33±0,58
Média±DP	1,42±1,08	2,00±1,13	1,50±0,90	1,75±1,14

Na linha, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$). DP: desvio padrão.

Tabela 5 Avaliação morfométrica (média±desvios padrão) das características fibras colágenas, fibroblastos, infiltrado inflamatório e angiogênese, realizada em diferentes momentos do processo de reparação tendínea

Tempo (dias)	Repouso	Exercício excêntrico	Laser	Laser + exercício Excêntrico
Fibras Colágenas (%)				
3	12,69±1,74	21,84±6,56	40,01±8,67	52,62±33,24
7	21,46±9,90	24,79±2,96	48,85±12,31	46,27±24,46
14	39,36±4,82	26,04±7,96	38,98±14,37	53,54±7,44
21	28,47±18,93	31,17±10,43	34,33±18,46	31,76±16,20
Média±DP	25,50±13,85B	25,96±7,24B	40,54±13,07AB	46,05±21,22A
Fibroblastos (%)				
3	1,10±0,70	1,25±0,34	2,97±0,41	2,51±0,24
7	1,19±0,32	3,73±1,33	2,06±0,42	2,31±0,34
14	1,85±1,37	2,79±0,63	3,29±0,78	2,76±0,50
21	1,19±0,37	1,80±0,89	2,39±0,35	2,56±0,33
Média±DS	1,33±0,76B	2,39±1,24A	2,68±1,32A	2,54±0,35A
Infiltrado Inflamatório (%)				
3	0,64±0,10B	0,99±0,23A	0,78± 0,33AB	0,54 ±0,00B
7	0,37±0,14	0,66± 0,32	0,38±0,16	0,35± 0,17
14	0,12±0,05	0,22± 0,02	0,18± 0,11	0,08± 0,06
21	0,00±0,06B	0,33±0,08A	0,02±0,03AB	0,00± 0,00B
Média±DP	0,28±0,27	0,55±0,36	0,34±0,34	0,24±0,24
Angiogênese (%)				
3	1,35±0,94	2,43±0,09	1,21±0,38	1,81±1,42
7	1,22±0,64	3,80±2,03	0,99±0,41	2,75±3,20
14	2,15±0,54	2,37±0,72	1,66±1,37	2,98±1,97
21	1,56±0,29	1,51±0,60	1,50±1,20	5,04±4,24
Média±DP	1,57±0,67AB	2,53±1,28AB	1,34±0,86B	3,15±2,78A

Na linha, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$). DP: desvio padrão.

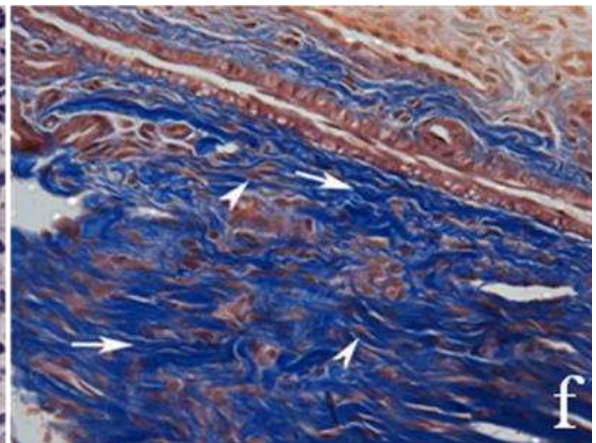
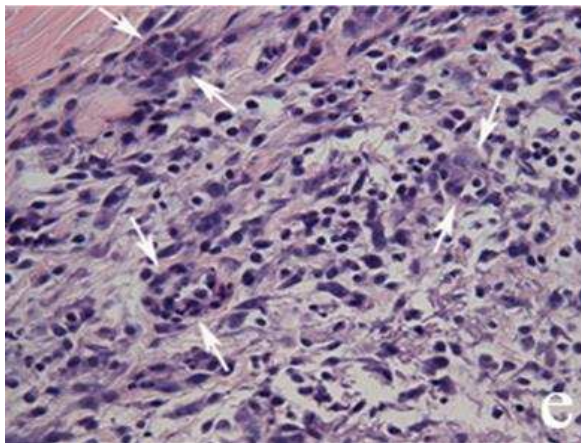
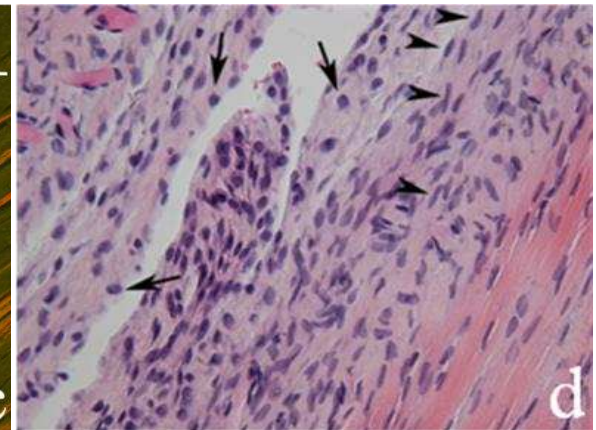
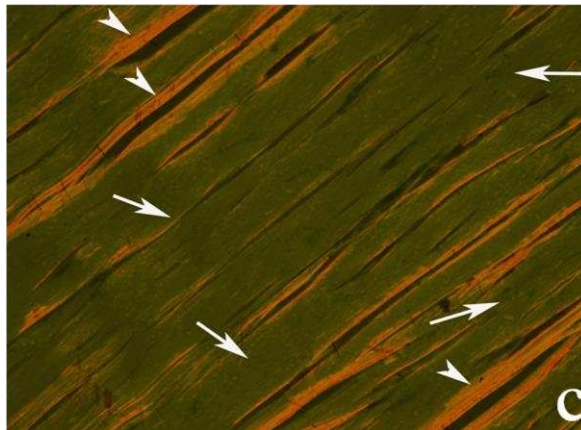
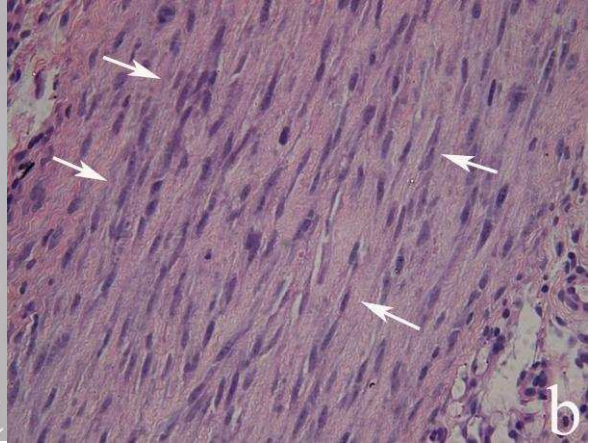
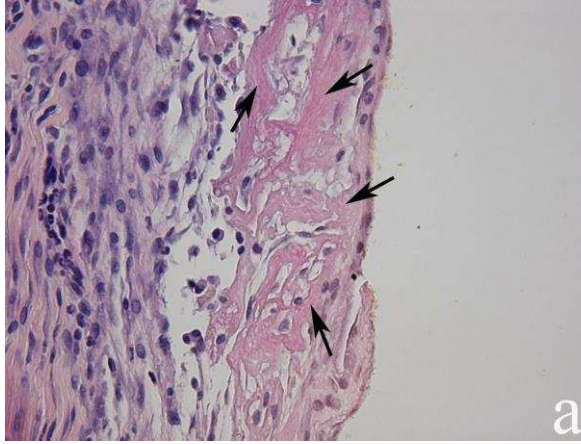


Fig. 2 Fotomicrografia do tendão calcâneo comum de ratos Wistar em diferentes momentos do processo de reparação. Rede de fibrina aprisionando neutrófilos íntegros e degenerados (setas) observada três dias após a indução da lesão no grupo deixado em repouso (a). Fibras colágenas dispostas de forma moderadamente paralelas (setas), em animal tratado com laser e exercício excêntrico, na avaliação realizada após duas semanas (b). Fibras colágenas do tipo III coradas em verde (setas), e do tipo I coradas em amarelo avermelhado (cabeça de setas), presente em animal exercitado e tratado com laserterapia, 21 dias após a lesão (c). Corte apresentando área de transição (normal e lesionada), com proliferação fibroblástica em início de organização, com poucos fibroblastos arredondados (setas) e maior quantidade em formato fusiforme (cabeça de setas), observada 21 dias após indução de tendinopatia em rato do tratado apenas com laserterapia (d). Angiogênese (setas) em animal submetido somente a exercício excêntrico, observada três dias após lesão (e). Moderada organização do tecido conjuntivo (setas), com fibroblastos alinhados (cabeça de setas) em disposição paralela às fibras colágenas, observada no grupo de animais apenas exercitados (f).

Discussão

Vários métodos de indução de tendinopatia em ratos são utilizados objetivando uma melhor compreensão da afecção e do efeito de diferentes terapias, sendo o procedimento cirúrgico por tenotomia (Laraia et al., 2012; Barbosa et al., 2013) ou tenectomia (Eliasson et al., 2012) e a administração de colagenase (Marsolais et al., 2001; Pires et al., 2011) os mais utilizados. Também são mencionados compressão com guilhotina (Salate et al., 2005; Joensen et al., 2012), esmagamento com pinça (Carvalho et al., 2006), trauma com carga (Fillipin et al., 2005), estimulação elétrica (Cho et al., 2011), sobrecarga mecânica com exercício (Glazebrook et al., 2008) e o uso de substâncias como citocinas, antibióticos e prostaglandinas (Lui et al., 2011). O protocolo de indução de tendinopatia utilizado na presente pesquisa foi testado anteriormente (Silva et al., 2013), e se mostrou eficaz em promover a lesão em ratos Wistar, já que ocasiona um quadro de tendinopatia aguda, compatível com as descritas na literatura científica (Ress et al., 2006; Glazebrook et al., 2008).

O aumento de temperatura local observado até 72 h após a indução da lesão é uma característica do processo inflamatório agudo, que ocorre devido ao aumento da permeabilidade vascular, e da liberação de diversos mediadores que participam da

resposta inflamatória. Essa característica foi relatada em vários estudos realizados com tendão de ratos (Bilate, 2007; Laraia et al., 2012).

A ausência de sensibilidade dolorosa durante avaliação física realizada 12 h após a cirurgia pode estar associada ao analgésico administrado, o que pode ter mascarado o quadro álgico. No entanto, os ratos permaneceram sem dor nas avaliações seguintes. Nos grupos que receberam laserterapia, essa ausência pode ser justificada pelo efeito analgésico do laser de baixa potência (Hamblin e Demidova, 2006), o que pode resultar do aumento da liberação de endorfinas, as quais ampliam o limiar de dor (Moshkovska e Mayberry, 2005). Bertolini et al. (2008) também observaram redução da dor durante tratamento do tendão calcâneo comum com laser de baixa potência usando comprimento de onda de 670 nm. Os autores compararam diferentes doses de energia (2J, 4J e 8J) e observaram que a menor dose, ou seja, 2J promoveu alívio da dor de forma mais precocemente. A dose de energia e comprimento de onda utilizados pelos autores diferem dos usados no presente estudo, que foram baseados na recomendação da Associação Mundial de Laserterapia para tendinopatia do tendão calcâneo comum. Segundo Neves et al. (2005), as doses de energia devem ser utilizadas de acordo com o efeito desejado, de modo que a de 3 J abrange a maior parte dos efeitos desejados, como analgésico, anti-inflamatório, circulatório e regenerativo. A padronização dessas características é fundamental na absorção da radiação do laser pelo tecido lesionado. Entretanto, independentemente das dosagens, os resultados de ambos os estudos sugerem o efeito benéfico da terapia na redução da dor.

Apesar da ausência de sensibilidade dolorosa e de aparente desconforto, não pode ser descartada a possibilidade de incômodo de origem mecânica, visto que os animais apresentaram uma discreta claudicação durante a avaliação da capacidade locomotora. Ainda existe a possibilidade da escala utilizada para a avaliação da sensibilidade dolorosa pode não ter sido adequada para o tipo de lesão provocada. A escala foi baseada na descrita por Attal et al. (1990), para avaliar dor em ratos com lesão do nervo ciático, ou seja, dor de maior intensidade. Miniville et al. (2008) também utilizaram a mesma classificação para verificar a resposta de ratos com fratura induzida por trauma na tíbia (reduzida com pino intramedular) ao tratamento com morfina ou cetoprofeno. De acordo com os autores, a escala foi eficaz na identificação da dor, e os medicamentos utilizados promoveram analgesia dose-dependente. Entretanto, como a fratura foi realizada com guilhotina, deve ter afetado não apenas o tecido ósseo, mas também os tecidos adjacentes. Segundo Oliva et al. (2004) lesão do periósteo,

proveniente de procedimentos ortopédicos, provocam maior severidade de dor no período pós-operatório, do que a ocasionada em tecidos moles.

A menor ($p=0,0008$) capacidade de locomoção dos animais deixados em repouso sugere efeito desfavorável da limitação de movimentação. Segundo Silva. (2008), a escala utilizada para a avaliação da capacidade motora possibilita identificar alterações mínimas, que muitas vezes são imperceptíveis durante avaliação da deambulação em campo aberto. Os autores utilizaram a escala para avaliar a capacidade locomotora em ratos Wistar submetidos à laminectomia seguido por trauma mecânico na dura-máter.

A ausência de infecção no local da ferida cirúrgica sugere que os procedimentos de antissepsia adotados no pré e pós-operatório foram adequados. As alterações macroscópicas observadas na coloração e aspecto das fibras tendíneas são compatíveis com as descritas por Nirschl e Ashman. (2003) para a tendinopatia em humanos. A privação de exercício excêntrico controlado para um dos animais submetidos apenas a laserterapia e um do grupo repouso pode ter favorecido o aparecimento macroscópico da aderência fibrinosa observada na primeira semana de pós-operatório, que está relacionada com a proliferação fibroblástica. De acordo com Orhan et al. (2004), o aparecimento de aderências depende do grau de mobilização do tendão, ou seja, da quantidade de movimentos realizados no membro lesionado. No que se refere à atividade física controlada, Nakamura et al. (2008) mencionaram que exercício físico é fundamental para a recuperação do tendão, já que promove o realinhamento das fibras tendíneas. Adicionalmente, já está demonstrado que a imobilização do membro pode afetar as propriedades biomecânicas do tendão (Wren et al., 2000). Por outro lado Abate et al. (2009) mencionam que aderência tecidual é frequentemente observada entre tendão e paratendão na fase aguda da tendinopatia. Na realidade, além de células inflamatórias originadas da periferia do tecido, a formação aderências também estar relacionada com outros fatores como, por exemplo, a migração extrínseca de fibroblastos (Sharma e Maffulli, 2005; James et al., 2008), crescimento excessivo e desordenado do tecido de granulação (Foland et al., 1992) e formação de tecido cicatricial em torno da bainha tendínea (Wang et al., 2012). Essas duas últimas possibilidades não podem ser incriminadas como causadoras de lesão nos ratos do presente estudo, já que não houve formação de tecido de granulação exuberante nos tendões, e não existe bainha ao redor do tendão calcâneo comum.

Avaliação histologia utilizando a escala de Orhan et al. (2004) e Eliasson et al. (2012), com algumas modificações, revelou que a laserterapia e/ou exercícios não

influenciaram na característica hemorragia, o que sugere que os tratamento não resulta em importante extravasamento de sangue. Os resultados do presente estudo diferem dos de Eliasson et al. (2012) que observaram essa característica cinco dias após indução cirúrgica de tendinopatia no tendão calcâneo comum de ratos que realizaram corrida em esteira (9 m/min; 30 min/dia; esteira discretamente inclinada/4 dias consecutivos). Os autores explicam que a hemorragia é indicativa de lesão tecidual, entretanto não foi suficiente para promover prejuízos ao tendão. Eles atribuem esse achado a episódios alternados de períodos de exercícios (apenas 30 min/dia) e de repouso, sem maiores explicações a respeito.

Ainda que o protocolo de exercício excêntrico adotado não tenha ocasionado importante hemorragia, análise morfométrica revelou que o exercício excêntrico resulte em uma reação inflamatória maior ($p=0,0000$), havendo interação grupo x tempo no 3^o e 21^o dias, quando comparado com o grupo que também recebeu o laser de baixa potência. Embora essa resposta inflamatória tenha sido mais acentuada apenas nos animais exercitados, já se esperava que na fase precoce da lesão houvesse maior infiltrado de polimorfonucleares, seguido por uma posterior redução na fase proliferativa da lesão, fato que ocorreu na terceira semana após a tendinopatia. Esse resultado foi confirmado pela análise histológica que também demonstrou maior ($p=0,0032$) infiltrado leucocitário no grupo tratado apenas com exercício excêntrico. Portanto, apesar da importância da atividade física na recuperação das tendinopatias, o presente estudo comprova que essa modalidade de tratamento deve ser bem dosada (velocidade, duração, frequência e tempo de tratamento), já que a contração do tipo excêntrica pode promover microrrupturas das fibras musculares, conforme mencionado por Clebis et al. (2001), o que pode atrair células inflamatórias para o local da lesão.

O início do exercício excêntrico com apenas 24 h pode ter sido a causa desse discreto aumento no processo inflamatório local. Por outro lado, a decisão em começar a atividade física após um dia de realizada a tendinopatia teve como finalidade padronizar o momento de início dos tratamentos, já que a laserterapia deveria ser iniciada nas primeiras horas após a lesão tendínea, devido aos seus efeitos analgésico e anti-inflamatório.

Esse momento para iniciar o exercício, considerado como ideal, foi baseado no protocolo descrito por Nakamura et al. (2008) que observaram efeito benéfico da corrida em declive (15° de inclinação; 15m/min por 60 min/durante 14 dias) quando iniciada 24 h após indução cirúrgica de tendinopatia do tendão patelar de ratos.

Entretanto, ao contrário do observado por estes autores, Godbout et al. (2006) mencionaram que atividade física realizada de forma voluntária (roda giratória presente no interior das gaiolas, acoplada a um contador) pode ter efeito negativo, como o prolongamento da fase inflamatória. A distância percorrida pelos ratos no estudo desses autores foi estimada como de aproximadamente 118 km durante os 28 dias de avaliação, e o exercício foi iniciado imediatamente após indução de tendinopatia por colagenase. Por outro lado, como a atividade física foi voluntária, os resultados não podem ser comparados com os do presente estudo.

Aderência tecidual do tipo fibrinosa foi bastante frequente na avaliação histológica, porém não houve diferença entre grupos ou tempos, embora na avaliação final nenhum dos ratos submetidos apenas ao exercício excêntrico tenha apresentado essa característica. Esse achado foi caracterizado microscopicamente pela presença de fibrina, que é uma proteína que participa da cascata de coagulação e da formação de matriz tecidual (Beretta, 2005). Embora Abate et al. (2009) mencionem que o exsudato fibrinoso seja frequente na fase aguda da tendinopatia, Kraux et al. (2012) relatam que pode ser encontrado inclusive após essa fase inicial da afecção no tendão calcâneo comum, conforme ocorreu no presente estudo.

Ainda considerando um discreto, mas possível efeito negativo do exercício excêntrico iniciado apenas com 24 h da indução da lesão, os ratos exercitados apresentaram maior ($p=0,0204$) espessamento do tendão, o que pode estar relacionado com a intensidade do processo inflamatório. O espessamento do epitendão foi observado por Orhan et al. (2004) em estudo com tendão calcâneo comum de ratos tratados com ondas de choque. Conforme mencionado anteriormente, o grupo de animais apenas exercitados foi o que apresentou, ao longo do tempo, maior ($p=0,0032$) infiltrado de leucócitos, nas fases inflamatória e proliferativa, embora a associação do exercício com a laserterapia resultou na redução dessas células. Na realidade a duração da fase inflamatória do processo de reparação tendínea é contraditória, variando desde 24 h (Wang et al., 2006) a 72 h (Eliasson et al., 2009), ou pode inclusive permanecer uma a mais semanas (Dahlgren, 2007). Inicialmente a inflamação é um evento benéfico, que visa à restauração do tecido e remoção do agente agressor. Entretanto, a sua permanência pode ser prejudicial ao tecido lesionado, podendo inclusive estimular a formação de fibrose (Pohlers et al., 2009), tendo em vista que é uma das origens de fatores de crescimento que atuam na reparação tecidual (Mac Grath, 1990; Branton e Kopp, 1999). Um exemplo é o transformante beta, que sabidamente pode estimular de

forma excessiva a produção de colágenos pelos fibroblastos (Klein et al., 2002), embora seja fundamental em melhorar as forças mecânicas do tendão, por diminuir a expressão gênica do pró-colágeno tipo III e aumentar a do tipo I (Marcos, 2010).

A angiogênese é fundamental para oxigenação tecidual, já que favorece a nutrição e remodelação do tendão. Em tendões bem vascularizados, o tecido pode se recuperar rapidamente, mas naqueles pouco vascularizados, o processo de reparação é mais lento, aumentando as chances de recidiva (Pufe et al., 2005). A eficácia da laserterapia no comportamento da angiogênese já havia sido mencionado por Lins et al. (2010) ao revisar os efeitos bioestimulantes do laser de baixa potência no processo de reparo tecidual. Entretanto, durante o processo de reparação tendínea se espera que ocorra inicialmente um aumento da vascularização, que deve ser seguido por uma posterior redução (Nakamura et al., 2008). Foi exatamente isso o que ocorreu nos animais que foram tratados apenas com laserterapia, que foram os que apresentaram menores ($p=0,0006$) quantidades de vasos quando os grupos foram comparados. A persistência da vascularização pode resultar em mais lenta e inadequada recuperação do tendão (Pufe et al., 2005).

Salate et al. (2005) também relataram estímulo à angiogênese decorrente do tratamento com laser de baixa potência (2,5 e 10 J; 660 nm) durante as fases inflamatória e proliferativa do processo de reparação do tendão calcâneo comum de ratos. Os autores observaram no 4^o dia de tratamento, maior ($p<0,05$) quantidade de vasos no grupo tratado com 10 J. Na avaliação realizada com uma semana foi observado que o grupo submetido à laserterapia apresentou maior ($p<0,05$) quantidade de vasos com relação ao controle.

Entre os benefícios promovidos pela laserterapia, está à proliferação fibroblástica (Hamblin e Demidova, 2006), que foi mais adequada (avaliação histológica: $p=0,0024$ e morfométrica: $p=0,0000$) no grupo submetido à terapia (Tabela 5, Fig. 2d) em comparação com mantido em repouso. Salate et al. (2008) mencionam melhor alinhamento dos fibroblastos no grupo tratado com laser (660 nm; 2,5J e 10J/3, 5 ou 7 dias) iniciado seis horas após indução de tendinopatia por trauma, em comparação com o controle. Essas células são fundamentais para deposição e remodelação da matriz extracelular (Lui et al, 2007), assim como para a síntese do colágeno. Surgem na fase aguda da lesão e sua redução deve ocorrer de forma significativa durante a remodelação do tendão, que pode demorar meses, ou seja, além do período utilizado para a avaliação histológica dos tendões no presente estudo.

Thermann et al. (2002) compararam diferentes tratamentos para tendinopatia do tendão calcâneo comum de coelho e observaram maior atividade fibroblástica na primeira e segunda semanas após indução da lesão. A redução dessa característica ocorreu a partir da quarta semana, e somente após doze semanas os tendões se apresentavam histologicamente normais. Esse resultado sugere que a fase de remodelação nesses roedores vai muito além de um mês, de forma que para uma melhor análise histológica do processo de reparação tendínea, deve-se utilizar maior tempo de avaliação. Resultado semelhante ao relatado por esses autores foi notado no presente estudo, no grupo de animais submetidos à laserterapia e exercício excêntrico, onde foi observado de forma não significativa, redução fibroblástica já com três semanas de iniciado os tratamentos. A diminuição dessas células é desejável, pois uma atividade fibroblástica exagerada pode comprometer o processo de reparação tendínea (Pires et al., 2011). Mais especificamente com relação à eficiência do laser de baixa potência na reparação tendínea, Lins et al. (2010) mencionam que se deve à indução da atividade mitótica dos fibroblastos. Adicionalmente o laser estimula a produção do fator de crescimento fibroblástico básico, que resulta na proliferação e diferenciação celular.

Ainda que não tenha ocorrido diferença ($p=0,2583$) entre os grupos e tempos avaliados para a organização das fibras colágenas, já se observa no terceiro dia após a lesão, uma discreta organização nos animais dos grupos submetidos ao exercício excêntrico. Após três semanas essa característica se apresentou de moderada intensidade nos grupo que realizaram atividade física. Esse resultado se deve provavelmente, a quantidade de fibras colágenas do tipo I, observada na terceira semana pela técnica histoquímica Picrosirius Red, nos grupos tratados com laser associado ou não ao exercício excêntrico. Apesar dos possíveis efeitos desfavoráveis mencionados para a introdução precoce da atividade física após uma lesão tendínea, o exercício excêntrico caminhada em esteira foi benéfico ($p=0,0000$) para a quantidade de fibras colágenas, não apenas quando utilizado de forma isolada, mas também quando associado à laserterapia. Essa atividade foi relatada por Nakamura et al. (2008) como importante para o realinhamento das fibras colágenas. Os autores observaram efeito benéfico da corrida em declive (15° de inclinação; 15m/min por 60 min/durante 14 dias), quando iniciada 24 h após indução cirúrgica de tendinopatia no tendão patelar de ratos. Em seu estudo os autores encontraram além de melhor organização das fibras colágenas, conforme encontrado no presente estudo, que a atividade física promoveu intensa angiogênese inicial com posterior redução, constatada na avaliação histológica realizada

após dez dias de indução da lesão. Bring et al. (2007) também observaram melhor organização das fibras colágenas no grupo de ratos submetidos ao exercício excêntrico, do que no grupo imobilizado com gesso e no controle, da 2^a a 4^a semana após início do experimento. De acordo com Oliveira et al. (2009), essa organização é fundamental para a resistência do tendão à tração.

No que se refere à laserterapia na organização das fibras colágenas, Salate et al. (2005) observaram que a estrutura do tendão calcâneo comum de ratos tratados com laserterapia (2,5 J; 660 nm) iniciada 6 h após a indução da lesão se mostra mais organizada do que no grupo não tratado, já com 5 dias de iniciada a terapia. Já Fillipin et al. (2005) relataram melhor organização dessas fibras nesse mesmo tendão, em avaliações realizadas com 14 e 21 dias após lesão induzida por trauma. Os resultados desses autores foram muito semelhantes aos obtidos no presente estudo, e aos relatados por Arruda et al. (2007), que também utilizaram o laser de baixa potência na dose de 3 J, com comprimentos de ondas de 670 nm (GaAsAl) e 904 nm (GaAs).

Da mesma forma que Salate et al. (2005), Oliveira et al. (2009) já observaram efeitos favoráveis após uma semana. Entretanto, diferentemente dos demais estudos, esses últimos autores utilizaram o laser a base de GaAsAl (4 J/cm²; 830 nm). Na laserterapia a energia é produzida pela utilização de um meio ativo que pode ser o hélio neônio (He-Ne), arseneto de gálio (GaAs), e também semicondutores de arseneto de gálio e alumínio (GaAlAs) (Baxter, 2003). Cada um desses meios ativos atuam com um determinado comprimento de onda. O meio ativo utilizado (GaAs) no presente estudo foi adequado para o comprimento de onda de 904 nm, que é indicado para o tipo de lesão induzida.

Embora não significativa ($p=0,1046$), a organização do tecido conjuntivo foi mais intensa nos animais submetidos ao exercício excêntrico, o que pode estar relacionado com o fato de que essa modalidade de tratamento promove o realinhamento das fibras colágenas. Novamente se observa que a atividade física embora possa acarretar efeitos indesejáveis como aumento de células inflamatórias, espessamento do epitélio e o prolongamento da angiogênese, pode ser benéfica em promover não apenas o realinhamento das fibras colágenas, mas em melhorar a organização do tecido tendíneo como um todo.

Ainda que não tenha ocorrido diferença entre os grupos e tempos avaliados, na quantidade de fibras colágenas (tipos I e III), o efeito da laserterapia no aumento da síntese de colágeno está descrito na literatura (Lins et al., 2010; Moreira et al., 2011;

Guerra et al., 2012). Os animais tratados apenas com laser já apresentaram microscopicamente fibras colágenas com apenas uma semana de iniciado o tratamento, embora aumento expressivo tenha sido observado com duas semanas. Nos demais grupos as fibras colágenas do tipo I aumentaram gradualmente. Adicionalmente, os ratos que receberam laserterapia e exercício excêntrico foi que apresentou o melhor comportamento no que se refere ao colágeno tipo III.

Aumento da quantidade de colágeno tipo I com duas semanas após lesão tendínea em ratos foi relatado tanto em pesquisas usando laserterapia associada ao plasma rico em plaquetas (PRP) (Barbosa et al. 2013) como utilizando apenas o componente rico em plaquetas (Kajikawa et al., 2008) por histologia e expressão imunoistoquímica, respectivamente. Barbosa et al. (2013) relataram maior quantidade ($p < 0,05$) de fibras do tipo I em tendão calcâneo comum de ratos com ruptura parcial, 13 dias após iniciada laserterapia (7 J; 660 nm; 830 nm) com PRP, entretanto conforme observado no presente estudo, não houve diferença ($p > 0,05$) entre os grupos tratados apenas com laserterapia, utilizando diferentes (660 nm e 830 nm) comprimentos de onda. Por outro lado, os ratos tratados somente com laser apresentaram maior ($p < 0,05$) quantidade de fibras do tipo I e III, do que os tratados apenas com plasma rico em plaquetas. Adicionalmente, as fibras de colágeno do tipo III foram mais frequentes ($p > 0,05$) nos grupos tratados do que nos não tratados. Os resultados desses autores sugerem que o plasma rico em plaqueta isoladamente não apresenta um resultado tão satisfatório quanto quando associado à terapia com laser. Esses melhores resultados no trabalho desses autores pode estar relacionado com a quantidade de pontos de aplicação, que no caso deles foram três, com duração de 20 seg cada. No presente estudo foi utilizado apenas um ponto, com duração de 9 seg.

O aumento exagerado das fibras de colágeno do tipo III no grupo submetido à laserterapia provavelmente não foi significativo devido ao desvio padrão que foi elevado ($32,34 \pm 16,96$). Por outro lado, a elevação mais precoce do colágeno tipo III já era esperado, pois logo após uma lesão tendínea esse colágeno deve predominar (Kajikawa et al., 2008), tendo em vista a sua função em manter a estrutura do tendão (Barbosa et al., 2013).

Ainda que seja desejado o aumento precoce do colágeno tipo III logo após uma lesão tendínea, é importante que gradualmente ocorra a sua redução, já que se trata de um colágeno menos resistente (Marcos, 2010; Barbato, 2011) em comparação ao colágeno tipo I. Foi exatamente isso que ocorreu, pois na avaliação realizada aos 21 dias

após indução de tendinopatia, se nota redução ($p=0,0305$) na quantidade desse colágeno no grupo que recebeu laserterapia associada ao exercício excêntrico.

Estudos demonstraram que o exercício físico do tipo corrida em esteira quando iniciado no 5^o dia ou uma semana após a indução da lesão no tendão calcanear comum de ratos foi benéfico para a recuperação do tendão (See et al., 2004; Barbato, 2011). Esses resultados reforçam uma hipótese surgida a partir dos resultados obtidos no presente estudo, de que a associação da laserterapia com exercício excêntrico possa apresentar melhores resultados na reparação tendínea do que os tratamentos realizados isoladamente (apenas exercício excêntrico ou laserterapia). Portanto, ainda são necessários estudos controlados que avaliem diferentes momentos de introdução do exercício excêntrico ou da laserterapia.

Conclusão

Conclui-se que a laserterapia na dose de 3 J e comprimento de onda de 904 nm, associada ao exercício excêntrico, iniciados 24 h após tendinopatia induzida do tendão calcanear comum, promove aumento na quantidade de fibras colágenas, com posterior redução das fibras do tipo III, apesar de prolongar a angiogênese. Além disso, reduz a aderência tecidual do tipo fibrinosa e melhora a organização das fibras colágenas. Nesse sentido, o exercício excêntrico quando realizado concomitantemente com o laser de baixa potência melhora as características histológicas do tendão lesionado.

Agradecimentos: Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado a primeira autora do trabalho, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio e suporte nas atividades da pesquisa (processo n^o 472832/2012-3).

Referências Bibliográficas

Abate M, Gravare-Silbernagel K, Siljeholm C, Di Lori A, De Amicis D, Salini V, Werner S, Paganelli R (2009) Pathogenesis of tendinopathies: inflammation or degeneration? Review. *Arthritis Res Ther* 11:1-15. doi:10.1186/ar2723

Alfredson H (2003) Chronic midportion Achilles tendinopathy: an update on research and treatment. *Clin Sports Med* 22:727-741

Alfredson H, Ljung B-O, Thorsen K, Lorentzon R (2000) *In vivo* investigation of ECRB tendons with microdialysis technique-no signs of inflammation but high amounts of glutamate in tennis elbow. *Acta Orthop Scand* 71:475-479

Andres BM, Murrell GAC (2008) Treatment of tendinopathy: what works, what does not and what is on horizon. *Clin Orthop Relat Res* 466:1539-1554. doi: 10.1007/s11999-008-0260-1

Arruda ERB, Rodrigues NC, Taciro C, Parizotto NA (2007) Influência de diferentes comprimentos de onda da laserterapia de baixa intensidade na regeneração tendínea de rato após tenotomia. *Rev Bras Fisioter* 11:283-288. doi: org/10.1590/S1413-35552007000400007

Attal N, Jazat F, Kayser V, Guilbaud G (1990) Further evidence for “pain-related” behaviours in a model of unilateral peripheral mononeuropathy. *Pain* 41:235-251. doi: org/10.1016/0304-3959(90)9022-6

Barbato KBG (2011) Efeito do uso de antiinflamatório e do exercício aeróbico sobre a regeneração tecidual e perfil biomecânico do tendão calcâneo de ratos após ruptura completa. Tese, Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Barbosa D, Souza RA, Carvalho WRG, Xavier M, Carvalho PK, Cunha CR, Arisawa EAL, Silveira JR L, Villaverde AB (2013) Low-level laser therapy combined with platelet-rich plasma on the healing calcaneal tendon: a histological study in a rat model. *Lasers Med Sci* 28:1489-1494. doi: 10.1007/s10103-012-1241-x

Baxter D (2003) Laserterapia de baixa intensidade. In: Kitchen S (ed) *Eletroterapia prática baseada em evidência*. EDN 11. Manole, São Paulo, pp 342-382

Beretta DC (2005) Influência da estimulação elétrica transcutânea na cicatrização do tendão do ventre lateral do músculo gastrocnêmio em coelhos. Dissertação, Universidade Federal de Uberlândia.

Bertolini GRF, Silva TS, Ciena AP, Trindade DL (2008) Efeitos do laser de baixa potência sobre a dor e edema no trauma tendíneo de Ratos Rev Bras Med Esporte 14:362-366

Bjordal JM, Lopes-Martins RAB, Joensen J, Couppe C, Ljunggren AE, Stergioulas A, Johnson MI (2008) A systematic review with procedural assessments and meta-analysis of low level laser therapy in lateral elbow tendinopathy (tennis elbow). BMC Musculoskelet Disord 29:1-15

Bilate AMB (2007) Inflamação, proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas. Temas Reumat Clin 8:86-90

Branton MH, Kopp JB (1999) TGF- β and fibrosis. Microbes Infect 1:1349-1365

Bring DK-I, Kreicbergs A, Renstrom PAFH, Ackermann PW (2007) Physical activity modulates nerve plasticity and stimulates repair after Achilles tendon rupture. J Orthop Res 25:164-172

Carvalho PTC, Silva IS, Reis FA, Belchior ACG, Aydos RD, Facco GG, Dourado DM (2006) Histological study in malnourished Wistar rats treated with ultrasound therapy. Acta Cir Bras 21:13-17

Clebis NK, Natali MJM (2001) Lesões musculares provocadas por exercícios excêntricos. Rev Bras Ciên Mov 9:47-53

Dahlgren LA (2007) Pathobiology of Tendon and Ligament Injuries. Clin Tech Equine Pract 6:168-173. doi:10.1053/j.ctep.2007.08.002

Dogan SK, Ay S, Deniz E (2010) The effectiveness of low laser therapy in subacromial impingement syndrome: a randomized placebo controlled double-blind prospective study. Clin Sci 65:1019-1022. doi: 10.1590/S1807-59322010001000016

Eliasson P, Andersson T, Aspenberg P (2012) Achilles tendon healing in rats is improved by intermittent mechanical loading during the inflammatory phase. *J Orthop Res* 30:274-279. doi:10.1002/jor.21511

Eliasson P, Andersson T, Aspenberg P (2009) Rat Achilles tendon healing: mechanical loading and gene expression. *J Appl Physiol* 107:399-407. doi: 10.1152/jappphysiol.91563.2008

Fillipin L, Mauriz JL, Vedoveli K, Moreira AJ, Zettler ZG, Lech O, Maronni NP, González-Gallego J (2005) Low-level laser therapy (LLLT) prevents oxidative stress and reduces fibrosis in rat traumatized Achilles tendon. *Lasers Surg Med* 37:293-300. doi:10.1002/lsm.20225

Foland JW, Trotter GW, Powers BE, Wringley RH, Smith FW (1992) Effect of sodium hyaluronate in collagenase-induced superficial digital flexor tendinitis in horses. *Am J Vet Res* 53:2371-2376

Glazebrook MA, Wright JR, Langman M, Stanish WD, Lee M (2008) Histological analysis of Achilles tendons in an overuse rat model. *J Orthop Res* 26:840-846. doi: 10.1002/jor.20546

Godbout C, Ang O, Frenette J (2006) Early voluntary exercise does not promote healing in a rat model of Achilles tendon injury. *J Appl Physiol* 101:1720-1726. doi: 10.1152/jappphysiol.00301.2006

Guerra FDR, Vieira CP, Almeida MS, Oliveira LP, Aro AA, Pimentel ER (2013) LLLT improves tendon healing through increase of MMP activity and collagen synthesis. *Lasers Med Sci* 28:1281-1288. doi 10.1007/s10103-012-1236-7

Hamblin MR, Demidova TN (2006) Mechanisms of low level light therapy. *Proc SPIE* 6140:1-12. doi: 10.1117/12.646294

James R, Kesturu G, Balian G, Chhabra AB (2008) Tendon: biology, biomechanics, repair, growth, factors and evolving treatment options. Review. J Hand Surg Am 33:102-112. doi:10.1016/j.jhsa.2007.09.007

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

Kajikawa Y, Morihara T, Sakamoto H, Matsuda K, Oshima Y, Yoshida A, Nagae M, Arai Y, Kawata M, Toshikazu K (2008) Platelet-rich plasma enhances the initial mobilization of circulation-derived cells for tendon healing. J Cell Physiol 215:837-845

Kaux J-F, Drion P, Libertiaux V, Colige A, Hoffmann A, Nusgens B, Besançon B, Forthomme B, Le Goff C, Franzen R, Defraigne J-O, Cescotto S, Rickert M, Crielaard J-M, Croisier J-L (2012) Eccentric training improves tendon biomechanical properties: a rat model. J Orthop Res 31:119-124. doi: 10.1002/jor.22202

Khan KM, Cook JL, Bonar F, Harcourt P, Astrom M (1999) Histopathology of common tendinopathies. Update and implications for clinical management. Sports Med 27:393-408

Klein MB, Yalamanchi N, Pham H, Longaker MT, Chang J (2002) Flexor tendon healing *in vitro*: effect of TGF- β on tendon cell collagen production. J Hand Surg 27A:615-620

Laraia SEM, Silva IS, Pereira DM, Reis FA, Almeida P, Leal Júnior ECP, Carvalho PTC (2012) Effect of low-level laser therapy (660 nm) on acute inflammation induced by tenotomy of Achilles tendon in rats. Photoch Photobiol 88:1546-1550. doi: 10.1111/j.1751-1097.2012.01179.x

Lima JGM, Oliveira Filho GR, Lima MTBRM, Ferreira AS, Silva JG (2012) Influence of low intensity laser therapy (AsGa) on the cicatrization process of mechanic tendon injury in Wistar rats. Laser Physics 22:1445-1448. doi: 10.1134/S1054660X12090083

Lins RDAU, Dantas EM, Lucena KCR, Catão MHCV, Granville-Garcia AF, Carvalho Neto, LG (2010) Efeitos bioestimulantes do laser de baixa potência no processo de reparo. *An Bras Dermatol* 85:849-855

Lui PPY, Cheuk YC, Hung LK, Fu SC, Chan (2007) Increased apoptosis at the late stage of tendon healing. *Wound Rep Reg* 17:702-707

Maffulli N, Wong J, Almekinders LC (2003) Types and epidemiology of tendinopathy. *Clin Sports Med* 22:675-692. doi:10.1016/S0278-5919(03)00004-8

Marcos RL (2010) Efeito do laser de baixa potência (810 nM) na tendinite induzida por colagenase em tendão calcâneo de ratos. Tese, Universidade de São Paulo

Marsolais D, Côté CH, Frenette J (2001) Neutrophils and macrophages accumulate sequentially following Achilles tendon injury. *J Orthop Res* 19:1203-1209. doi: 10.1016/S0736-0266(01)00031-6

Mc Grath MH (1990) Peptide growth factors and wound healing. *Clin Plast Surg* 17:421-432

Minville V, Laffosse J-M, Fourcade O, Girolami J-P (2008) Mouse modelo fracture pain. *Anesth* 108:467-472. doi: 10.1097/ALN.0b013e3181649333

Moreira FF, Oliveira ELP, Barbosa FS, Silva JG (2011) Laserterapia de baixa intensidade na expressão de colágeno após lesão muscular cirúrgica. *Fisioter Pesqui* 18:37-42. doi: org/10.1590/S1809-29502011000100007

Moshkovska T, Mayberry J (2005) It is time to test low level laser therapy in Great Britain. *Postgrad Med J* 81:436-441. doi: 10.1136/pgmj.2004.027755

Movin T, Gad A, Reinholt FP, Rolf C (1997) Tendon pathology in long-standing achillodynia biopsy findings in 40 patients. *Acta Orthop Scand* 68:170-175

Nakamura K, Kitaoka K, Tomita K (2008) Effect of eccentric exercise on healing process of injured patellar tendon in rats. *J Orthop Sci* 13:371-378. doi: 10.1007/s00776-008-1242-6

Neves LS, Silva CMS, Henriques JFC, Cancado RH, Henriques RP, Janson G (2005) A utilização do laser em Ortodontia. *Tópico Espec* 10:149-156

Nirschl RP, Ashman ES (2003) Elbow tendinopathy: tennis elbow. *Clin Sports Med* 22:813-836

Oliva VNLS, Maia LAA, Silva BM, Saito LM, Perri SHV (2004) Avaliação clínica de diferentes antiinflamatórios não esteróides na analgesia pós-operatória de cirurgias ortopédicas em cães. *Clin Vet* 50:42-54

Oliveira FS, Pinfildi CE, Parizoto NA, Liebano RE, Bossini PS, Garcia IB, Ferreira LM (2009) Effect of low level laser therapy (830 nm) with different therapy regimes on the process of tissue repair in partial lesion calcaneous tendon. *Lasers Surg Med* 41:271-276. doi: 10.1002/lsm.20760

Orhan Z, Ozturan K, Guven A, Cam K (2004) The effect of extracorporeal shock waves on a rat model of injury to tendo Achillis: a histological and biomechanical study. *J Bone Joint Surg Br* 86-B:613-618. doi:10.1302/0301-620X.86B4

Pires D, Xavier M, Araujo T, Silva Júnior JA, Aimbre F, Albertini R (2011) Low-level laser therapy (LLLT; 780 nm) acts differently on mRNA expression of anti- and pro-inflammatory mediators in an experimental model of collagenase-induced tendinitis in rat. *Lasers Med Sci* 26:85-94. doi: 10.1007/s10103-010-0811-z

Pohlert D, Brenmoehl J, Loffer I, Muller CK, Leipner C, Schultze-Mosgau, Stallmach A, Kinner RW, Wolf G (2009) TGF- β and fibrosis in different organs molecular pathway imprints. *Biochim Biophys Acta* 1792:746-756

Pufe T, Petersen WJ, Mentlein R, Tillmann BN (2005) The role of vasculature and angiogenesis of degenerative tendons disease. *Scand J Med Sci Sports* 15:211-22

Rees JD, Wilson AM, Wolman RL (2006) Current concepts in the management of the disorders. *Rheumatol* 45:508-521. doi:10.1093/rheumatology/ke1046

Salate ACB, Barbosa G, Gaspar P, Koeke PU, Parizotto NA, Benze BG, Foschiani D (2005) Effect of In-Ga-Al-P Diode laser irradiation on angiogenesis in partial ruptures of Achilles tendon in rats. *Photomed Laser Surg* 23:470-575. doi:10.1089/pho.2005.23.470

See EKN, Ng GYF, Ng COY, Fung DTC (2004) Running exercise improve the strength of a partially ruptured Achilles tendon. *Br J Sports Med* 38:597-600. doi:10.1136/bjism.2003.007120

Sharma P, Maffulli N (2005) Tendon injury and tendinopathy: healing and repair. *J Bone Joint Surg Am* 87:187-202. doi:10.2106/JBJS.D.01850

Silva CMO (2008) Efeito da prednisona em lesão medular aguda experimental em ratos (*Rattus norvegicus*). Dissertação, Universidade Federal de Minas Gerais

Silva JMN, Carvalho JP, Moura Júnior MJ (2011) Estudo morfométrico da terapia LED de baixa potência em tendinite de ratos. *Fisioter Pesqui* 18:365-370 doi.org/10.1590/S1809-29502011000400012

Silva MO, Costa MBM, Borges APB, Dornas RF, Moreira JCL, Souza MV (2013) Indução de tendinopatia em ratos Wistar: modelo experimental. *Rev Acad Ciênc Agrár Ambient* 11:1-12.

Soslowsky LJ, Thomopoulos S, Tun S, Flanagan CL, Keefer CC, Mastaw J, Carpenter JE, Mich AA (2000) Overuse activity injures the supraspinatus tendon in an animal model: A histologic and biomechanical study. *J Shoulder Elbow Surg* 9:79-84. doi:org/10.1067/mse.2000.101962

Taciro C, Serikawa MA, Parizzoto NA (2007) Aspectos nanoestruturais do colágeno no processo de regeneração tendínea estimulada por laser de baixa intensidade – Estudo Piloto. *Fisioter Especi* 1:20-24

Thermann H, Frerichs O, Holch M, Biewener A (2002) Healing of Achilles tendon, an experimental study: part 2 – histological, immunohistological and ultrasonographic. *Foot Ankle Intern* 23:606-613. doi: 10.1177/107110070202300704

Wang JH-C, Iosifidis MI, Fu FH (2006) Biomechanical basis for tendinopathy. Review. *Clin Orthop Relat Res* 443:320-332.

Wang JH-C, Guo Q, Li B (2012) Tendon biomechanics and mechanobiology - a minireview of basic concepts and recent advancements. *J Hand Ther* 25:133-140

Warden SJ (2007) Animal models for the study of tendinopathy. Review. *Br J Sports Med* 41:232-240. doi: 10.1136/bjism.2006.032342

Wren AL, Beaupré GS, Carter DR (2000) Tendon and ligament adaptation to exercise, immobilization, and remobilization. *J Rehabil Res Dev* 3:217-224. doi:10.1114/1.1569267

Xavier M, David DR, Souza RA, Arrieiro NA, Miranda H, Santana ET, Silva Junior JÁ, Salgado MAC (2010) Anti-inflammatory effects of low-level light emitting diode therapy on Achilles tendinitis in rats. *Lasers Surg Med* 42:553-558. doi: 10.1002/lsm.20896

Zandim BM, Souza MV, Frassy LM, Vilória MIV, Maia L, Fonseca CC, Valente FV, Moreira JCL, Magalhães PC (2013) Immunohistochemistry of factor VIII, histology and morphometry in equine tendon treated with platelet-rich plasma. *Vet Bras Med Vet* 35:169-184

Resumo das normas para publicação no periódico

Laser medical Science

Disponível em: <http://www.springer.com/medicine/journal/10103>. Acessado em 20 de maio de 2013.

Para uma melhor leitura dos capítulos III e IV, as citações e referências não foram colocadas nas normas da revista. O número de palavras excedeu o exigido pelo periódico, entretanto, serão realizados os ajustes necessários para adequação das normas da revista, antes do envio.

1. **Laser Medical Science:** The journal publishes articles on the medical application of new lasers, light delivery systems, sensors to monitor laser effects, basic laser-tissue interactions and the modelling of laser-tissue interactions. The journal also welcomes articles relating to the use of non-laser light-tissue interactions. Original research, reviews, brief reports and editorials in relation to these topics will be accepted. Letters to the editor are welcome as enhancement to discussions. Please note, the journal does not accept case reports.
2. **Types of papers:** Original Article – limited to 4000 words, 45 references, no more than 5 figures; Review Article – limited to 5000 words, 50 references, no more than 5 figures; Brief Report - limited to 2000 words, 25 references, no more than 4 figures - Case Reports will not be accepted; Letter to the Editor – up to 600 words.
3. **Manuscript Submission:** Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.
4. **Online Submission:** Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

5. Title Page: The title page should include: The name(s) of the author(s); A concise and informative title; The affiliation(s) and address(es) of the author(s); The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author.
6. Abstract: Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.
7. Keywords: Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.
8. Text Formatting: Manuscripts should be submitted in Word: Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text; Use italics for emphasis; Use the automatic page numbering function to number the pages; Do not use field functions; Use tab stops or other commands for indents, not the space bar; Use the table function, not spreadsheets, to make tables; Use the equation editor or MathType for equations; Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions); Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX ; LaTeX macro package (zip, 182 kB).
9. Abbreviations: Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.
10. Footnotes: Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables. Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols. Always use footnotes instead of endnotes.
11. Acknowledgments: Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.
12. Citation: Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples: 1. Negotiation research spans many disciplines [3]. 2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5]. 3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

13. Reference list: The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list. The entries in the list should be numbered consecutively.
- 13.1. Journal article: Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8; Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted: Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329
- 13.2. Article by DOI: Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086
- 13.3. Book: South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London
- 13.4. Book chapter: Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257
- 13.5. Online document: Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007
- 13.6. Dissertation: Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California.

CONCLUSÃO GERAL

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo pode-se concluir que a laserterapia na dose de 3 J e comprimento de onda de 904 nm, associada ao exercício excêntrico, iniciados 24 h após tendinopatia induzida cirurgicamente por compressão e escarificação, no tendão calcâneo comum:

1. Não resulta em um tendão biomecanicamente tão resistente ou elástico quanto o saudável. Entretanto, a extensão e carga máximas necessárias para ruptura tendínea a uma velocidade de 0,5 mm/s não diferem daquela necessária para o rompimento do tendão sadio.
2. Não influencia negativamente na estrutura e função tendínea.
3. Promove aumento na quantidade de fibras colágenas do tipo III (fase inflamatória) e tipo I (fase proliferativa), com posterior redução das fibras do tipo III (fase proliferativa), apesar de prolongar a angiogênese.
4. Reduz a aderência tecidual fibrinosa e promove organização das fibras colágenas. Portanto, melhoram as características histológicas do tendão lesionado.