

# Análise do efeito da LED (*light emitting diode*) terapia em tendinopatia traumática em ratos

## *Analysis of the effect of LED (light emitting diode) therapy in traumatic tendinopathy in rats*

Márcio Parente<sup>1</sup>; Rodolfo de Paula Vieira<sup>2</sup>; Heliodora Leão Casalechi<sup>3</sup>; Mariana de Souza Vasconcellos<sup>4</sup>; Nilce Tamae Kamimura<sup>5</sup>; Flávio Aimbire<sup>6</sup>; Regiane Albertini<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação – Uninove. São Paulo, SP – Brasil.

<sup>2</sup>Professores Doutores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação – Uninove. São Paulo, SP – Brasil.

<sup>3</sup>Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação – Uninove. São Paulo, SP – Brasil.

<sup>4</sup>Graduanda em Enfermagem – Uninove. São Paulo, SP – Brasil.

<sup>5</sup>Graduanda em Biomedicina – Uninove. São Paulo, SP – Brasil.

<sup>6</sup>Professor Doutor – Unifesp. São Paulo, SP – Brasil.

### Endereço para correspondência

Márcio Parente  
R. Vergueiro, 235,  
01504-001 – São Paulo – SP [Brasil]  
parente10@yahoo.com.br

### Resumo

**Introdução:** A tendinopatia refere-se a qualquer processo mórbido e/ou doença que afeta os tendões (tendinite e/ou tendinose). **Objetivo:** Investigar o efeito da fototerapia (LED 640 nm) no processo de reparação da tendinite no tendão calcâneo de rato. **Método:** A tendinite foi induzida no tendão calcâneo esquerdo por meio de trauma mecânico. Foram utilizados 40 ratos Wistar (300 ± 20g), divididos em quatro grupos com dez animais, cada grupo foi subdividido em dois subgrupos com cinco roedores para os tempos experimentais de 7 e 21 dias. Os grupos foram nomeados da seguinte forma: CONTR, TEND, LED, DROG. Para análises histopatológicas foi determinado  $p \leq 0,05$ . **Resultados:** Houve menor número de células inflamatórias e maior reparação tecidual nos grupos tratados com LED. **Conclusão:** Com os resultados obtidos, concluiu-se que o LED de baixa potência tem ação positiva no processo anti-inflamatório e na reparação em tendão calcâneo de ratos.

**Descritores:** Fototerapia; Tendão calcâneo; Tendinopatia.

### Abstract

**Introduction:** Tendinopathy refers to any disease process and/or disease that affects the tendons (tendonitis and/or tendinosis). **Objective:** To investigate the effect of phototherapy (LED 640 nm) in the repair process of tendonitis in the Achilles tendon in rats. **Methods:** Tendinitis was induced in left Achilles tendon by mechanical injury. A total of 40 Wistar rats (300 ± 20 g) were divided into four groups of ten animals. Each group was subdivided into two subgroups of five animals for experimental periods of 7 and 21 days. The groups were named as follows: CONTR, TEND, LED, DROG. For histopathological analysis it was determined the  $p \leq 0.05$ . **Results:** The survey showed fewer inflammatory cells and increased tissue repair in the groups treated with LED. **Conclusion:** Thus with the results we conclude that the low power LED has positive action on the anti-inflammatory process and Achilles tendon repair in rats.

**Key words:** Achilles tendon; Phototherapy; Tendinopathy.

## Introdução

A tendinopatia refere-se a qualquer processo mórbido e/ou doença que afeta os tendões. Na literatura, encontram-se os termos tendinose e tendinite, estes formam a tendinopatia. A tendinose se refere aos processos degenerativos (destrutivos) crônicos progressivos; e a tendinite, aos inflamatórios<sup>1</sup>.

A tendinopatia pode ocorrer por traumatismo, por repetições de movimentos em excesso, por infecções e desnutrição, estas ocorrências desencadeiam um processo de degeneração, inflamação e até o rompimento de tendão<sup>1</sup>. Embora a maioria dos tendões tenha a habilidade de reparação espontânea após um ferimento, o tecido de cicatrização formado pode impedir que o tendão execute suas funções normais<sup>1</sup>. Os tendões normais são brancos, brilhantes e possuem uma textura fibroelástica, são ricos em colágeno do tipo I; e pobres em colágenos dos tipos III, IV, V e VI. O colágeno é a principal proteína estrutural do corpo e o maior componente da matriz extracelular do tendão. Os tendões são formados por tecido conjuntivo, fibras de colágeno que se entrelaçam para permitir as forças geradas pelos músculos<sup>2</sup>.

Atualmente, existem evidências científicas de que fototerapia tem ação terapêutica, estudos nessa área demonstram que o *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* (Laser) de baixa potência é eficaz para a reparação de músculos e de tendões em ratos, após indução de uma lesão. Entretanto, estudos com *Light Emitting Diode* (LED) são mais escassos<sup>3, 4, 5, 6, 7</sup>.

Em sua maioria, o tratamento convencional para a tendinite é farmacológico. Dentre os fármacos mais usados, pode-se destacar os anti-inflamatórios não esteroidais, os glicocorticoides e drogas imunossupressoras. Estes fármacos podem apresentar diversos efeitos colaterais<sup>8</sup>. Até o momento, não existem evidências de efeitos colaterais da terapia com LED.

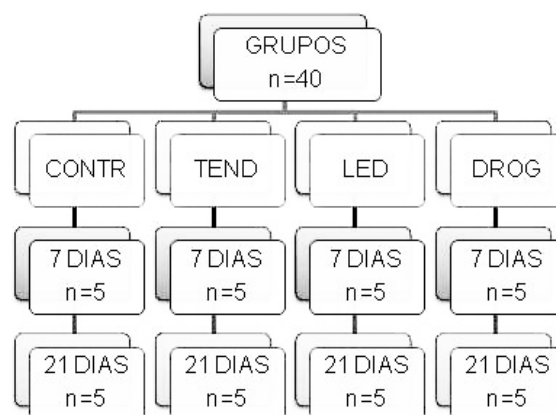
Neste estudo, teve-se como objetivo investigar os efeitos da terapia com LED (640 nm) de baixa intensidade em modelo de tendinite traumática em ratos.

## Material e métodos

### Animais

Foram utilizados 40 ratos jovens, machos, da linhagem Wistar ( $300 \pm 20$  g). Os aspectos éticos deste estudo seguiram as premissas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (Cobea), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Nove de Julho (Uninove), com protocolo de aprovação de número 0033/2011.

Os 40 animais foram aleatoriamente distribuídos em quatro grupos (n=10), denominados: grupo CONTR (controle); TEND (tendinopatia), em que os ratos sofreram lesão traumática no tendão calcâneo esquerdo, sem nenhum tipo de tratamento; LED (terapia com LED), no qual tiveram lesão traumática no tendão calcâneo esquerdo e foram tratados com LED; DROG (terapia fármaco), grupo em que os animais foram submetidos à lesão traumática no tendão calcâneo esquerdo, porém receberam tratamento com injeção intraperitoneal do fármaco diclofenaco sódico (1mg/kg/dia), o qual foi iniciado após 12 h da lesão, durante sete dias (posologia). Cada grupo foi subdividido conforme dois tempos de sacrifício, 7 e 21 dias (n=5), de acordo com a Figura 1.



**Figura 1:** Distribuição dos animais em quatro grupos de acordo com dois períodos experimentais (7 e 21 dias). Cada período experimental obteve número (n) de cinco animais

## Indução da lesão

Os animais submetidos à lesão foram previamente anestesiados com cloridrato de ketamina (80-100 mg/kg) e xilazina (10-15 mg/kg)<sup>9,10</sup>. Em seguida, realizou-se indução de lesão traumática no calcâneo esquerdo dos ratos, conforme o protocolo descrito por Joensen et al.<sup>11</sup> e Salate et al.<sup>12</sup>. Assim, foram posicionados em aparelho para produção de uma contusão controlada, sendo determinada massa de 220 g, posicionada a 25 cm do tendão do animal. Seu impacto possibilitou uma energia aplicada de 0,5 J na região medial do tendão de Aquiles dos roedores.

## Terapia LED

Os animais foram expostos à radiação LED em dias alternados, com intervalo de 48 horas entre as aplicações, iniciando 12 horas após a indução da lesão e foram interrompidas de acordo com o tempo de eutanásia (7 ou 21 dias). Os parâmetros da irradiação estão especificados na Tabela 1.

**Tabela 1:** Parâmetros utilizados para determinar dose da terapia com LED

Informações LED	
Parâmetros	Variáveis
Densidade de energia	2.04 J/cm <sup>2</sup>
Comprimento de onda	640
Potência	96 mW
Área determinada	3,30 cm <sup>2</sup>
Tempo de aplicação	70 s
Técnica	Contato

## Tratamento medicamentoso

Após 12 horas da lesão, o grupo Droga foi tratado com diclofenaco sódico na concentração de 1 mg/kg, administrado por meio de injeção via intraperitoneal, a cada 24 horas, por um período de sete dias<sup>13</sup>.

## Eutanásia

Os animais foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub><sup>9</sup>, 12 horas após a última aplicação da

terapia LED ou da administração da última dose de diclofenaco. Na sequência, os tendões foram removidos por dissecação, realizando-se a primeira incisão na junção miotendínea seguida por outra na junção osteotendínea, na inserção calcanear. Em seguida, os tendões foram identificados e armazenados a -80 °C.

## Análise histológica

Para a confecção das lâminas, foram feitos cortes das amostras congeladas no criostato. Os tendões foram posicionados longitudinalmente e cortados em 7 µm de espessura, em temperatura mínima de -20 °C. Para cada amostra, determinaram-se dois cortes semisseriados. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) e *picrossirius red*. Dois campos da área da lesão de cada lâmina foram fotografados em um aumento de 400 vezes, em microscópio de luz. A fim de analisarem-se as amostras coradas em picrossírius utilizou-se o polarizador; e, posteriormente, as fotos foram analisadas com *software* Image Pro-Plus. As lâminas foram, de maneira aleatória, analisadas sem cegamento.

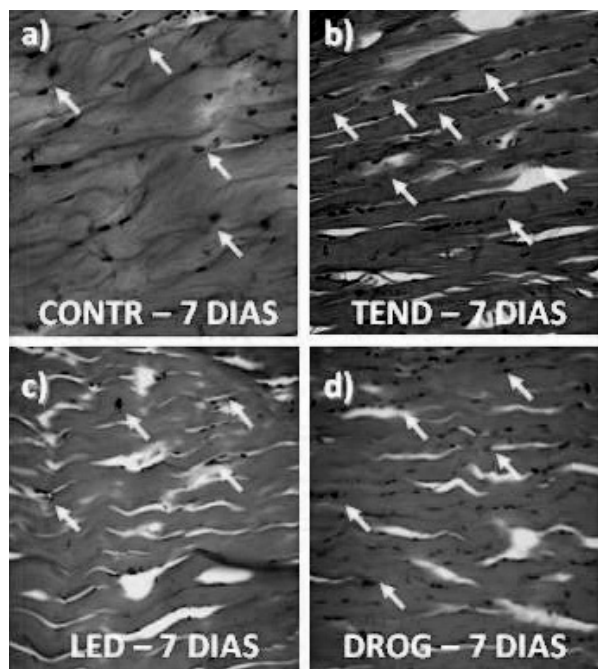
## Descrição da estatística

Os dados são apresentados como média ± erro-padrão da média. O teste de D'Agostino e Pearson foi utilizado para verificar a distribuição Gaussiana dos dados. Os dados foram analisados por meio do teste "t" de Student ou Mann-Whitney para comparações de duas amostras independentes, respectivamente. O teste de qui-quadrado foi empregado em análise de contingência. O nível de significância foi fixado em p≤0,05.

## Resultados

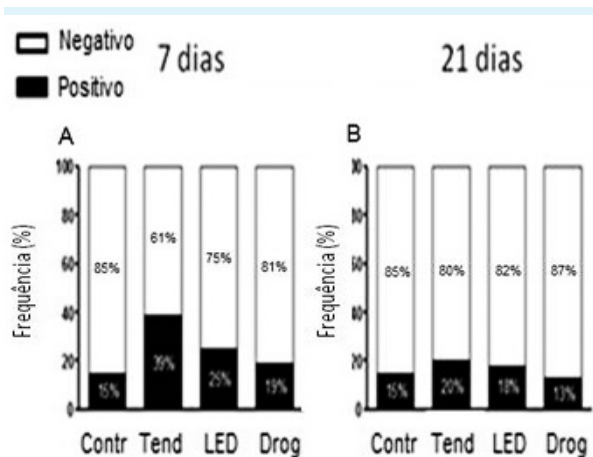
O grupo tendinite (TEND) apresentou maior quantidade de células inflamatórias (Figuras 2b e 3) e maior desorganização nas fibras colágenas comparado com os demais grupos (Figura 4b). Quanto ao grupo tratado com LED 7 dias (Figuras 2c e 3), nota-se que a quan-

tidade de células (Figuras 2c e 3) e a organização das fibras colágenas (Figura 4c) nesses animais são respectivamente parecidas com as de seu grupo controle (Figuras 2<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup>). Já o DROG 7 dias (Figuras 2d e 3) apresentou quantidade de células parecida com o TEND 7 dias (Figuras 2b e 3), mas a fibras colágenas (Figura 4d) demonstram estar bem mais alinhadas, comparadas as do mesmo grupo (Figura 4b).

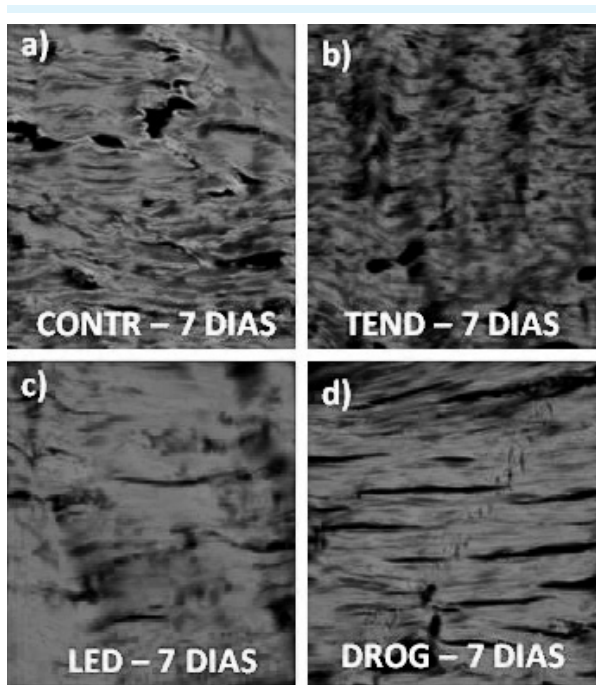


**Figura 2:** Fotos dos tendões com aumento de 400x, corados com HE. Células dos animais no período experimental de 7 dias: a) CONTR = Controle; b) TEND = Tendinite; c) LED (redução de células) e d) DROG = Drogas (aumento de células). Às setas indicam os núcleos das células

As imagens representativas dos grupos com tempo experimental de 21 dias estão apresentadas nas Figuras 5 e 6. O TEND também apresentou maior quantidade de células (Figuras 5b e 3) e maior desorganização nas fibras colágenas (Figuras 6b), comparado com os demais grupos. Quanto ao grupo tratado com LED 21 dias, percebe-se que a quantidade de células (Figuras 5c e 3) e a organização das fibras colágenas (Figura 6c) nesses animais também são parecidas com as do controle, diferentemente do grupo droga 21



**Figura 3:** Proporção de leucócitos (células positivas) para inflamação ao longo de 7 e 21 dias de acompanhamento. O teste qui-quadrado (2x2) foi aplicado para as comparações dos respectivos períodos. A proporção de células positivas para inflamação foi significativamente elevada para 7 dias ( $p=0,0005$ )



**Figura 4:** Fotos dos tendões com aumento de 400x, corados com picrossírius. Células dos animais no período experimental de 7 dias: a) CONTR = Controle (fibras colágenas alinhadas); b) TEND = Tendinite (fibras colágenas desalinhadas); c) LED (fibras colágenas alinhadas) e d) DROG = Drogas (fibras colágenas alinhadas)



dias que apresentou quantidade de células parecida com a do grupo tendinite 21 dias (Figuras 5d e 3), mas as fibras colágenas demonstram estar bem mais alinhadas em comparação com as do mesmo grupo (Figura 6d).

## Discussão

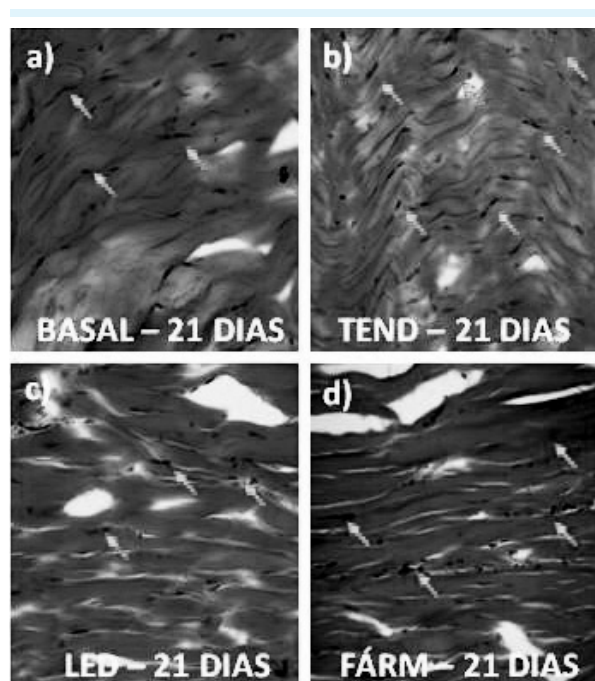
Dentre os efeitos da fototerapia nos tecidos biológicos, um dos mais discutidos é sua influência sobre os fibroblastos, na síntese de colágeno, no remodelamento e na melhora funcional dos tendões<sup>14</sup>. Alguns estudos demonstram que há aumento do número de fibroblastos em tecidos tratados com essa terapia<sup>15, 16</sup>.

Estudos também atribuem à laserterapia efeito pró-angênico, aumento da síntese de *vascular endothelial growth factor* (VEGF) e *platelet-*

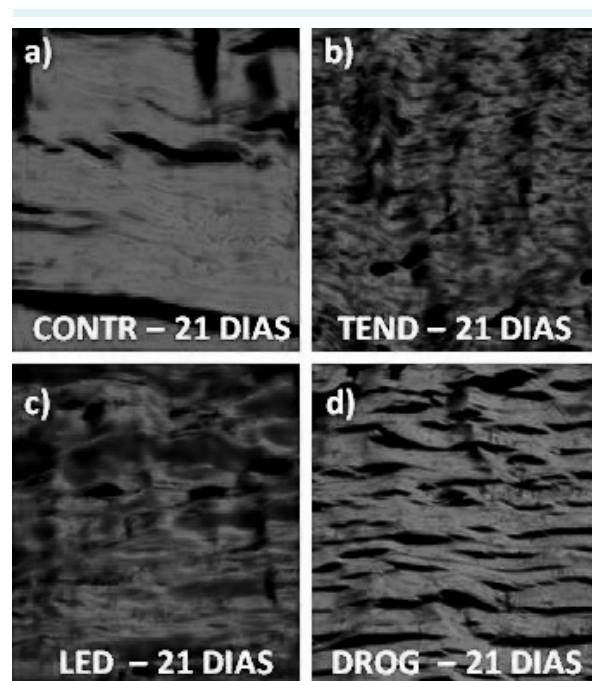
*derived growth factor* (PDGF), melhora na troca de gases e eliminação de catabólitos por meio dos vasos sanguíneos, facilitando a migração de macrófagos e fibroblastos nos casos de reparação tecidual<sup>17, 18</sup>. A utilização do LED terapêutico em estudos mostra resultados semelhantes aos da laserterapia para reparo tecidual<sup>13, 19, 20</sup>.

A semelhança entre os resultados de estudos utilizando *laser* com LED não deve ser atribuída à coerência da luz, uma vez que esta se perde nas primeiras camadas dos tecidos biológicos, mas sim a comprimentos de onda específicos que estimulam os componentes da cadeia respiratória mitocondrial, aumentando o metabolismo energético<sup>21, 22, 23</sup>.

A utilização da fototerapia de baixa intensidade é relatada em diversos estudos, nos quais são mencionados seus efeitos benéficos contra o processo inflamatório, na reparação tecidual,



**Figura 5:** Fotos dos tendões com aumento de 400x, corados com HE. Células dos animais no período experimental de 21 dias: a) CONTR = Controle; b) TEND = Tendinite (aumento de células); c) LED (redução de células) e d) DROG = Drogas (aumento de células). As setas indicam os núcleos das células



**Figura 6:** Fotos dos tendões com aumento de 400x, corados com picrossírius. Células dos animais no período experimental de 21 dias: a) CONTR = Controle (fibras colágenas alinhadas); b) TEND = Tendinite (fibras colágenas desalinhadas); c) LED (fibras colágenas alinhadas) e d) DROG = Drogas (fibras colágenas alinhadas)

bem como seu efeito potencializador na ação anti-inflamatória e no remodelamento de fibras colágenas<sup>22, 24, 25</sup>. Os resultados do LED neste estudo corrobora os demais trabalhos apresentados na literatura sobre a presença do remodelamento das fibras colágenas e ação do LED na diminuição das células, dando a entender que essa diminuição colabora com o processo inflamatório, como demonstrado por Taciro, Serikawa e Parizotto<sup>15</sup> e Casalechi et al.<sup>20</sup>.

Por meio de análise histológica, este estudo demonstrou haver melhor efeito anti-inflamatório nos grupos tratados com LED, quando comparados aos não tratados e/ou tratados com fármacos, assim concordando com algumas pesquisas<sup>15, 20, 22</sup>. As fibras colágenas no grupo LED apresentou melhor remodelamento em relação aos demais grupos que sofreram lesão. Esses resultados corroboram os de outros trabalhos em que se utilizou a fototerapia, como apresentado na literatura<sup>2, 11, 12, 14, 15, 20</sup>.

Autores mostram, com cada vez mais frequência, que a terapia com LED tem efeitos anti-inflamatórios<sup>14, 25</sup>, concordando com os achados do estudo aqui apresentado. A confirmação de resultados positivos atribuídos ao LED nesta pesquisa faz com que se tenha a necessidade de mais estudos utilizando essa fonte de luz.

## Conclusão

Este estudo permite concluir que o LED, no comprimento de onda de 640 nanômetros de baixa intensidade, reduziu o número de células inflamatórias e melhorou o alinhamento das fibras colágenas.

## Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPQ processo nº 472165/2011-9, à Universidade Nove de Julho (Uninove) e ao Laboratório de Investigação Médica – USP (LIM 59) pela disponibilidade de recursos operacionais para a realização desta pesquisa.

## Referências

1. Abreu BJGA, Fonseca LR, Xavier RRM, Trede Filho RG, Souza MS. Tendinopatia crônica de aquiles – uma revisão das evidências biológicas e clínicas com foco no papel do exercício excêntrico. *Rev Ter Man.* 2010;8(S1):S266-75.
2. Montes GS, Junqueira LCU. The use of the picrosirius – polarization method for the study of the biopathology of collagen. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1992;86 Suppl 3:S1-11.
3. Barker DJ, Gluckman PD, Godfrey KM, Harding JE, Owens JA, Obinson JS. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet.* 1993 Apr 10;341(8850):938-41.
4. Stahl L, Ashworth SH, Jandt KD, Mills RW. Light-emitting diode (LED) polymerization of dental composites: flexural properties and polymerization potential. *Biomaterials.* 2000;21(13):1379-89.
5. Susse E, David S, Clair DS, He LI. Latent effects of prenatal malnutrition on adult health. *Ann NY Acad Sci.* 2008;1136:185-92.
6. Medeiros IS. Dispositivos LED para polimerização de resinas compostas dentais: comparação com outra fonte de luz [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2001.
7. Bertolini GRF, Silva TS, Ciena AP, Trindade DL. Efeitos do laser de baixa potência sobre a dor e edema no trauma tendíneo de ratos. *Rev Bras Med Esporte.* 2008 jul/ago;14(4):362-6.
8. Lopes-Martins RA, Marcos RL, Leonardo PS, Prianti Junior AC, Muscará MN, 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(1):283-8.
9. Damy SB, Camargo RS, Chammas R, Figueiredo LFP. Aspectos fundamentais da experimentação animal – aplicações em cirurgia experimental. *Rev Assoc Med Bras.* 2010;56(1):103-11.
10. Massone F. Anestesiologia veterinária: farmacologia e técnicas. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1994. 107 p.
11. Joensen J, Gjerdet NR, Hummelsund S, Iversen V, Lopes-Martins RA, Bjordal JM. An experimental study of low-level laser therapy in rat Achilles tendon injury. *Lasers Med Sci.* 2012 Jan;27(1):103-11. doi: 10.1007/s10103-011-0925-y. Epub 2011 May 6.

12. Salate ACB, Barbosa G, Gaspar P, Koeke PU, Parizotto NA, Benze BG, Foschiani D. Effect of In-Ga-Al-P diode laser irradiation on angiogenesis in partial ruptures of Achilles tendon in rats. *Photomed Laser Surg.* 2005 Oct;23(5):470-5.
13. Chorilli M, Michelin DC, Salgado HRN. Animais de laboratório: o camundongo. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* 2007;28(1):11-23.
14. Silva JMN, de Carvalho JP, Moura Júnior MJ. Estudo morfométrico da terapia LED de baixa potência em tendinite de ratos. *Fisioterapia e Pesquisa, São Paulo.* 2011;18(4):365-70.
15. Taciro C, Serikawa MA, Parizotto NA. Aspectos nanoestruturais do colágeno no processo de regeneração tendínea estimulada por laser de baixa intensidade – estudo piloto. *Fisioterapia Especialidades.* 2007;1(1):21-4.
16. Enwemeka CS. Inflammation, cellularity, and fibrillogenesis in regenerating tendon: implications for tendon rehabilitation. *Physical Therapy.* 1989;69(10):816-25.
17. Chow RT, Barnsley L. Systematic review of the literature of low-level laser therapy (LLLT) in the management of neck pain. *Lasers Sur Med.* 2005;37:46-52.
18. Klebanov GI, Poltanov EA, Chichuk TV, Osipov AN, Vladimirov YA. Changes in superoxide dismutase activity and peroxynitrite content in rat peritoneal macrophages exposed to He-Ne laser radiation. *Biochemistry (Moscow).* 2005;70(12):1335-40.
19. D'Amore PA, Thompson RW. Mechanism of angiogenesis. *Ann Rev Physiol.* 1987;49:453-64.
20. Casalechi HL, Nicolau RA, Casalechi VL, Silveira-Júnior L, Paula AMB, Pacheco MTT. The effects of low level light emitting diode on the repair process of Achilles tendon therapy in rats. *Lasers Med Sci.* 2009;24:659-65.
21. Lim W, Lee S, Kim I, Chung M, Kim, M. Lim, H. et al. The anti-inflammatory mechanism of 635 nm light-emitting-diode irradiation compared with existing COX inhibitors. *Lasers Surg Med.* 2007;39:614-21.
22. Xavier M, David DR, Souza RA, Arrieiro AN, 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 Aug;42(6):553-8. doi: 10.1002/lsm.20896.
23. Karu TI, Pyatibrat LV, Afanasyeva NI. Cellular effects of low power laser therapy can be mediated by nitric oxide. *Lasers Surg Med.* 2005;36:307-14.
24. Albertini R, Aimbire F, Villaverde AB, Silva Júnior JA, Costa MS. COX-2 mRNA expression decreases in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation after low level laser therapy. *Inflamm Res.* 2007;56(6):228.
25. Vinck EM, Cagnie BJ, Cornelissen MJ, Declercq HA, Cambier DC. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. *Lasers Med Sci.* 2003;18(2):95-9.