

LASERTERAPIA PARA TRATAMENTO DE TENDINOPATIA INDUZIDA EM RATOS WISTAR: ESTUDO HISTOMORFOMÉTRICO

Maria Verônica de Souza¹

Júlio Crepaldi²

Thayne de Oliveira Silva³

Mariana Brettas Silva³

Gabriel Barbosa de Melo Neto⁴

José do Carmo Lopes Moreira⁵

RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da laserterapia na lesão do tendão calcâneo comum de ratos Wistar. Foram utilizados 12 ratos machos adultos, distribuídos aleatoriamente em dois grupos (L=laser e C=controle). Todos foram submetidos à tendinopatia unilateral (escolha aleatória) mediante compressão transversal do tendão (10 segundos) com pinça *Halstead* mosquito, assim como escarificações (com bisturi). Após 24 horas da indução da lesão os animais do grupo L receberam laser (904 nm/3 J/cm²/9s) por 20 dias. Os do grupo C foram manipulados como se fossem receber a radiação. Após 3, 7, 14 e 21 dias da realização da lesão, três ratos de cada grupo foram submetidos à eutanásia, e os tendões obtidos para análise histomorfométrica. As amostras foram processadas como de rotina e os fragmentos corados com hematoxilina-eosina, tricrômico de Masson e Picrosirius Red. Os dados foram analisados por ANOVA, a 5% de probabilidade e análise de regressão. Não houve diferença entre grupos nem entre tempos para as características hemorragia, angiogênese, espessamento do epitendão. Independente do tratamento ocorreu diminuição ($p=0,0129$) da formação de aderência fibrinosa (do 3^o ao 21^o dias). Por outro lado, a avaliação morfométrica revelou maiores ($p=0,0120$) quantidades de fibroblastos no grupo que recebeu laserterapia, não havendo efeito de tempo. Avaliação semiquantitativa, revelou maiores ($p=0,0000$) quantidades de fibroblastos no grupo tratado, porém nessa análise, a quantidade dessas células aumentou com o tempo ($p=0,0001$) em ambos os grupos. Diferentemente, ANOVA revelou redução do infiltrado inflamatório do 3^o ao 21^o dia em ambos os grupos (histologia: $p=0,0003$; morfometria: $p=0,0000$). Embora não tenha ocorrido diferença entre grupos na quantidade de fibras colágenas (I e III), a morfometria revelou que os ratos do grupo L apresentaram maiores ($p=0,0096$) quantidades de fibras colágenas do que do grupo C. Para essa característica, não ocorreu efeito do tempo, ainda que tenha sido observada maior ($p=0,0000$) organização da deposição de colágeno (7^o dia). A quantidade de fibras colágenas determinada por histologia revelou efeito apenas do tempo ($p=0,0005$), independente do tratamento, ocorrendo aumento dessa variável até o 14^o dia, com posterior redução. A laserterapia iniciada 24 horas após indução cirúrgica de lesão no tendão calcâneo de ratos Wistar apresenta a vantagem de aumentar em qualidade e quantidade as fibras colágenas, assim como os fibroblastos, células fundamentais na síntese dos colágenos.

¹ Professora de Clínica Médica, Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Campus Universitário, s/n, Viçosa, MG, 36570-000, Brasil. Correspondência: msouza@ufv.br, msouzavet@gmail.com.

² Graduando em Medicina Veterinária, Departamento de Veterinária, UFV, Viçosa, MG. julio.crepaldi@ufv.br.

³ Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Departamento de Veterinária, UFV, Viçosa, MG. thayne.mvet@yahoo.com.br, mbrettass@gmail.com.br.

⁴ Médico Veterinário, Programa de Residência em Medicina Veterinária, Departamento de Veterinária, UFV, Viçosa, MG. gabrielveterinario@yahoo.com.br.

⁵ Médico, Prevent – Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatologia, Rua Benjamin Araújo, 56, sala 110, Centro, 36570-000, Viçosa, MG. tmjc@terra.com.br

Palavras-chave: tendão de Aquiles, laser de baixa potência, reparação tendínea.

LASER THERAPY FOR TREATMENT OF TENDINOPATHY INDUCED IN WISTAR RATS: AN HISTOMORFOMETRIC STUDY

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects of laser therapy in tendinopathy of Achilles tendon of Wistar rats. Thus, 12 adult male rats which were divided into two groups (L=laser and C=control) were used. All animals were submitted to unilateral tendinopathy (random selection) by transverse compression of the tendon (10 seconds) with Halsted forceps, as well as 10 scarifications (using a scalpel). After 24 hours of induction of lesion all animals of Group L received laser (904 nm/3 J/cm²/ 9 s) for 20 days, while Group C were handled as if they would receive radiation. After 3, 7, 14 and 21 days lesion induction, three rats from each group were euthanized, and the tendons obtained for histomorphometric analysis. The samples were processed as routine and the sections stained with hematoxylin-eosin, Masson's trichrome and Picrosirius Red. Data were analyzed by ANOVA, at 5% probability and regression analysis. No differences between groups neither between time for hemorrhage characteristics, angiogenesis, thickening of epitendon. Independently of the treatment there was a decrease (p=0.0129) of fibrinous adhesion (3rd to 21st day). On the other hand, morphometric analysis revealed higher (p=0.0120) amounts of fibroblasts cells in the group receiving laser therapy, with no effect of time. Semiquantitative assessment also showed higher (p=0.0000) amounts of fibroblasts cells in the treated group, but in this analysis, the number of fibroblasts increased with time (p=0.0001) in both group. In contrast, ANOVA revealed a reduction of the inflammatory cells from 3rd to 21st day in both groups (histology: p=0.0003; morphometry: p=0.0000). Although there was no difference between groups in the amount of collagen type I and III, morphometry revealed that the rats of group L showed higher (p=0.0096) amounts of collagen fibers than group C. For this characteristic, there was no effect of time, even though it was observed higher (p=0.0000) organization of collagen deposition on day 7. The amount of collagen fibers determined by histology revealed only the effect of time (p=0.0005), regardless of treatment, with an increase in this variable until the 14th day, with further reduction. Laser therapy initiated 24 hours after surgical induction of tendinopathy in the Achilles tendon of rats has the advantage of increasing quality and quantity collagen fibers, as well as the fibroblasts cells, which are fundamental on the synthesis of collagen.

Keywords: Achilles tendon, low-level laser therapy, tendon healing.

TERAPIA CON LÁSER PARA TRATAMIENTO DE TENDINOPATIA INDUCIDA EN RATAS WISTAR: ESTUDIO HISTOMORFOMÉTRICO

RESUMEN

La finalidad de ese estudio fue evaluar los efectos del láser en la lesión del tendón calcáneo común de ratas Wistar. Fueron utilizadas 12 ratas machos adultos, distribuidos al azar en dos grupos (L=láser y C=control). Todos fueron sometidos a tendinopatía unilateral (selección aleatoria) por la compresión transversal del tendón (10 segundos) con una pinza Halstead-Mosquito, y escarificación (con bisturí). Después de 24 horas de la inducción de la lesión los animales del grupo L recibieron láser (904 nm/3J/ cm²/9s) durante 20 días. Los tendones del grupo C fueran manejados como si recibiera la radiación. Después de 3, 7, 14 y 21 días de

realización de la lesión, tres ratas de cada grupo fueron sacrificadas, y los tendones obtenidos para análisis histomorfométrico. Las muestras fueron procesadas como de rutina y los fragmentos se tiñeron con hematoxilina-eosina, tricrómico de Masson y Picrosirius Red. Los datos fueron analizados por ANOVA, con una probabilidad de 5%, además de análisis de regresión. No hubo diferencias entre los grupos o tiempos para las variables hemorragia, angiogénesis, engrosamiento del epitendón. Independientemente del tratamiento se redujo ($p=0,0129$) la formación de adherencia fibrinosa (del 3º al 21º días). Por otra parte, la evaluación morfométrica mostró cantidades más altas ($p=0,0120$) de los fibroblastos en el grupo que recibió el tratamiento con láser, sin efecto del tiempo. Evaluación semicuantitativa reveló mayor ($p=0,0000$) cantidad de fibroblastos en el grupo tratado, pero en esa análisis la cantidad de esas células aumentó con el tiempo ($p=0,0001$) en ambos grupos. En contraste, ANOVA reveló reducción del infiltrado inflamatorio entre el 3º y el 21º días, en ambos grupos (histología: $p=0,0003$; morfometría: $p=0,0000$). Aunque no hubo diferencias entre grupos en la cantidad de fibras de colágeno (I y III), la morfometría reveló que las ratas del grupo L presentaron mayores cantidades ($p=0,0096$) de fibras de colágeno. Para esa variable no hubo efecto del tiempo, a pesar de que se observó mayor ($p=0,0000$) organización de la deposición de colágeno (7º día). La cantidad de fibras de colágeno determinados por histología reveló efecto del tiempo ($p=0,0005$), independientemente del tratamiento, con aumento de esa variable con 14º día, con posterior reducción. La terapia con láser iniciada 24 horas después de la inducción quirúrgica de lesión en el tendón calcáneo común de ratas Wistar presenta la ventaja de aumentar la calidad y la cantidad de fibras de colágeno y fibroblastos, que son células fundamentales en la síntesis de colágeno.

Palabras clave: tendón de Aquiles, láser de baja potencia, reparación del tendón.

INTRODUÇÃO

Há alguns anos, o termo tendinopatia passou a ser utilizado para substituir o amplamente utilizado, tendinite. Isso se deve ao fato de que durante uma lesão tendínea ocorre um processo degenerativo, além do inflamatório (1,2). O quadro clínico, amplamente conhecido, se caracteriza por dor, aumento de volume e comprometimento da locomoção. Atletas são comumente afetados pela enfermidade, tendo em vista a predisposição a diferentes fatores, tais como, sobrecarga e esforço repetitivo, que podem culminar com a afecção e, portanto, o desempenho atlético (2). Medeiros e Segatto (3) relatam o quadro em indivíduos sedentários, decorrente do sobrepeso, postura inadequada, etc. O processo de reparação normalmente é longo.

Um tratamento é considerado eficiente quando ocasiona diminuição da inflamação e proporciona a reparação dos tecidos (4). Portanto, os anti-inflamatórios não esteroidais são tradicionalmente utilizados na fase inicial da lesão tendínea, quando a existência de inflamação é visível macroscopicamente, cujo período de permanência varia de 2 horas (5) a algumas semanas (6). Entretanto, essas drogas possuem efeitos colaterais como úlceras gástricas, acometimento da função renal e bloqueio da agregação plaquetária (7), de forma que existe uma busca incessante pela descoberta de uma terapia que seja eficiente e que acelere o processo de reparação tendínea. Uma terapia alternativa é a laserterapia, que além de efeito anti-inflamatório/analgésico, pode facilitar a neovascularização (8), aumentar a síntese do colágeno (9), o que, conseqüentemente, deve favorecer a recuperação do tendão (10). O presente estudo parte da hipótese de que o tratamento com laser ocasiona uma reparação tendínea com características histológicas mais semelhantes ao de um tendão sadio. O objetivo do estudo foi avaliar por morfometria, a resposta à terapia com laser arseneto de gálio em lesão induzida experimentalmente em tendão calcâneo comum de ratos Wistar.

MATERIAL E MÉTODOS

Essa pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso Animal (Protocolo 108/2011). Foram utilizados 12 ratos adultos, (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar), machos, com idade entre 12 e 14 semanas. Durante uma semana os ratos foram alojados em gaioleiros individuais, cuja finalidade foi se adaptarem às condições de temperatura (aproximadamente 26°C), e aos fotoperíodos de 12 horas diárias. Os animais se movimentaram livremente dentro da gaiola, e receberam ração comercial e água *ad libitum*.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos (L e C) contendo 12 ratos em cada um deles, sendo três tendões em cada momento estudado. O grupo L foi composto por ratos submetidos à laserterapia durante o processo de reparação tendínea até o 20º dia, enquanto que os do grupo C foram apenas manipulados como se fossem receber a radiação, porém o equipamento permaneceu desligado. A identificação dos animais foi realizada por meio de sequência numérica localizada na cauda, de acordo com o grupo a que pertenciam.

A escolha de qual tendão calcâneo comum seria submetido à tendinopatia unilateral foi aleatória. Para o procedimento cirúrgico, os ratos foram mantidos em jejum alimentar (2 horas), e hídrico (1 hora) antes do início da anestesia. A região plantar do membro pélvico escolhido ao acaso, foi tricotomizada, e os animais colocados em câmara de indução onde receberam isoflurano (5% em 2 L de O₂) durante aproximadamente 2 minutos. Em seguida foram retirados da câmara e posicionados na mesa cirúrgica, onde permaneceram recebendo isoflurano (3% em 1,5 L de O₂) até finalização do procedimento cirúrgico.

Após antissepsia local (iodo-povidine tópico a 1%), os animais foram posicionados em decúbito ventral, sendo então realizada incisão cutânea longitudinal (1,5 cm) na região plantar do membro pélvico direito ou esquerdo, utilizando lâmina de bisturi. Na sequência foi realizada divulsão romba do tecido subcutâneo e exposição do tendão calcâneo comum. A tendinopatia foi feita na região média situada entre a junção miotendínea e a inserção do tendão no osso calcâneo conforme descrito por Silva et al. (11), mediante realização de compressão transversal de toda a espessura do tendão durante 10 segundos com pinça *Halstead* mosquito hemostática, assim como 10 escarificações das fibras do tendão, em sentido próximodistal, utilizando lâmina de bisturi nº 11. Foi realizada a sutura de pele utilizando Nylon 3-0, padrão contínuo (*Wolff*).

Depois de finalizada a cirurgia, com os animais ainda sob efeito anestésico, foi administrada dose única do antibiótico enrofloxacin (40 mg/kg, via intramuscular), e do analgésico morfina (3 mg/kg, via subcutânea). Esse último foi repetido a cada 6 horas, totalizando duas aplicações. Finalmente, os ratos foram acomodados em aquecedores (aproximadamente 27°C) até recuperação anestésica. As feridas foram limpas diariamente com gaze e água corrente.

Os animais do grupo L receberam laser de baixa potência, arseneto de gálio (GaAs). A aplicação foi realizada com a caneta posicionada em um único ponto, no modo pulsátil por 9 segundos/dia, utilizando o aparelho laserpulse (Ibramed Indústria Brasileira de Equipamentos Médicos Ltda, Amparo, SP, Brasil), comprimento de onda 904 nm, densidade de energia de 3 J/cm² e potência máxima de 100 mW/cm². O tratamento foi iniciado 24 horas após induzida a lesão, sendo aplicado diariamente durante 20 dias. Para o procedimento, os animais foram imobilizados manualmente e posicionados em decúbito ventral. O aparelho foi colocado perpendicular à lesão, sendo a radiação feita sempre no mesmo horário, observando um intervalo de 24 horas entre as aplicações. Óculos de proteção foram utilizados contra a radiação emitida.

Fragmentos de tendões foram obtidos durante as fases inflamatória e proliferativa do processo de reparação tendínea. Três ratos de cada grupo foram aleatoriamente eutanasiados 3, 7, 14 e 21 dias após realização da tendinopatia, utilizando tiopental sódico (100 mg/kg, via intraperitoneal). Uma vez realizada a exposição do tendão calcâneo comum, foi avaliada a existência ou não de aderência entre o tendão e a pele e/ou tecidos adjacentes. Na sequência, os tendões foram obtidos desde a junção miotendínea até a inserção no osso calcâneo, e colocado em formol tamponado a 10%, onde permaneceram por 48 horas. As amostras foram processadas como de rotina para análise histomorfométrica. Foram realizados cortes longitudinais (4 µm de espessura), que foram corados pelas técnicas de hematoxilina-eosina (HE), tricrômico de Masson e Picrosirius Red. As análises foram conduzidas as cegas, por três avaliadores.

A caracterização celular e organização da matriz tendínea foram determinadas nos cortes corados com HE. A avaliação foi de acordo com critérios definidos por Orhan et al. (12), sendo realizadas discretas alterações, no que se refere a nomenclatura usada para as variáveis estudadas. As características avaliadas foram formação de aderências fibrinosa, quantidade e organização das fibras colágenas, espessamento do epitendão, angiogênese, densidade do infiltrado inflamatório e quantidade de fibroblastos. Hemorragia, caracterizada pela presença de hemácias, foi averiguada utilizando o sistema de pontuação mencionado por Eliasson et al. (13), com modificações nos escores adotados, os quais oscilaram de 0 a 4, sendo 0: ausente, 1: discreta, 2: moderada, 3: moderada a intensa e 4: intensa.

A avaliação do infiltrado inflamatório, angiogênese, quantidade de fibroblastos, assim como total e tipos (I ou III) de fibras colágenas foi determinada por morfometria. Foram obtidas 10 fotomicrografias de cada lâmina, que foram escolhidas aleatoriamente. As imagens foram colocadas sob uma grade com 400 interseções confeccionada no programa Power Point. O experimento foi instalado no delineamento inteiramente casualizado, com dois tratamentos (grupos L e C) e três repetições (animais), avaliados aos 3, 7, 14 e 21 dias após a indução da lesão. Seguindo a recomendação da comissão de ética, a quantidade de ratos estabelecida por grupo foi à mínima necessária para a condução do experimento, determinada por profissional da área de estatística. De forma que, o número de animais possibilitou a realização de análises inferenciais com número adequado de graus de liberdade para o resíduo da análise de variância (ANOVA). Os resultados também foram avaliados por análise descritiva, com apresentação dos valores médios e desvios padrão. Teste F (ANOVA) a 5% de probabilidade foi utilizado para verificação do efeito dos tratamentos nas variáveis avaliadas. Também foi feita análise de regressão para as características aderência fibrinosa, quantidade de infiltrado inflamatório, fibras colágenas, fibroblastos e organização do tecido conjuntivo. Para essas análises foi utilizado o software Statistica 12, 2013 (www.statsoft.com).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve infecção nem deiscência da ferida cirúrgica, o que se deve ao adequado procedimento de antissepsia adotado durante todo o experimento. As áreas lesionadas e sadias foram facilmente identificadas utilizando os corantes previamente utilizados. Essas áreas variaram de tamanho e predominância das características estudadas, conforme a fase em que se encontrava o fragmento avaliado, ou seja, na inflamatória ou proliferativa. As áreas lesionadas foram mais acentuadas na periferia do tendão. Considerando a observação geral dos cortes histológicos em ambos os grupos, no 3º dia depois de induzida a lesão, ocorreu discreta hemorragia, com moderada a intensa aderência, caracterizada pela presença de fibrina. Também ocorreu espessamento do epitendão. Infiltrado inflamatório, composto

praticamente por polimorfonucleares foram observados em quantidades superiores aos demais tempos avaliados (Figura 1a), enquanto no 21^o dia, foi observada uma menor quantidade (Figura 1b). Nesse tempo de observação, existia discreta quantidade de fibroblastos com núcleos arredondados (células blásticas). Neoformação vascular, desorganização tecidual e falta de paralelismo das fibras colágenas também foram encontrados.

As características histológicas observadas na biopsia realizada três dias após a tendinopatia são compatíveis com tecido de granulação em fase inicial que, de acordo com Van Schie et al. (14), é composto particularmente por elevado número de fibroblastos arredondados, infiltrado inflamatório, sem que se observe distribuição regular das células ou de arranjo longitudinal dos elementos fibrilares. Esses autores avaliaram o tendão do músculo flexor digital superficial de equinos.

Amostras avaliadas após a primeira semana, ainda possuía discreta hemorragia, assim como epitendão espesso, devido ao acúmulo local de células inflamatórias. A quantidade de leucócitos se manteve moderada, havendo grande quantidade de neutrófilos. Por outro lado, não houve alteração nas características angiogênese e quantidade de fibroblastos. Fibras colágenas não apresentavam ainda o paralelismo entre elas. Depois de passadas duas semanas após indução da tendinopatia, havia grande quantidade de fibroblastos arredondados (Figuras 1c,d), aumento da neovascularização, discreta quantidade de células inflamatórias e de organização das fibras colágenas. Finalmente, na terceira semana havia sinal de remodelação tecidual, a qual esteve caracterizada pela redução das células inflamatórias, com moderada organização e paralelismo das fibras colágenas (Figuras 1e,f), além de maior quantidade de fibroblastos em formato fusiforme. Esses achados aos 21 dias são compatíveis com um tecido em fase mais avançada de reparação.

Os valores médios e desvios padrão por grupo e por tempo da avaliação semiquantitativa das características histológicas, assim como quantitativa das morfométricas estão apresentados nas Tabelas 1, 2 e 3. Não houve diferença ($p=0,1156$) entre grupos, nem entre tempos ($p=0,1795$) para a característica hemorragia. Discreta quantidade de hemácias extravasadas foi observada em ambos os grupos no 3^o e 7^o dias. Na segunda semana o grupo L apresentou discreta hemorragia, enquanto no grupo C esse achado esteve ausente.

Na terceira semana já não havia hemorragia no grupo L, porém no grupo C esse achado ocorreu de forma discreta (Tabela 1). Apesar de a hemorragia ser indicativa de lesão tecidual, não foi suficiente grave para prejudicar o processo de reparação tendínea. Eliasson et al. (13) observaram intensa hemorragia em análise histológica realizada no tendão calcâneo comum transecionado, de ratos submetidos ao exercício físico caminhada (30 minutos/dia). De acordo com os autores, a presença da hemorragia indicou maior dano tecidual no grupo exercitado em comparação com o grupo que permaneceu em repouso. Por outro lado, avaliação biomecânica demonstrou que a hemorragia não foi prejudicial, uma vez que os tendões que demonstraram maior sangramento apresentaram melhor ($p=0,04$) elasticidade, e mais elevado pico de força ($p<0,0001$) para ocorrer ruptura, os quais indicam adequado reparo tecidual.

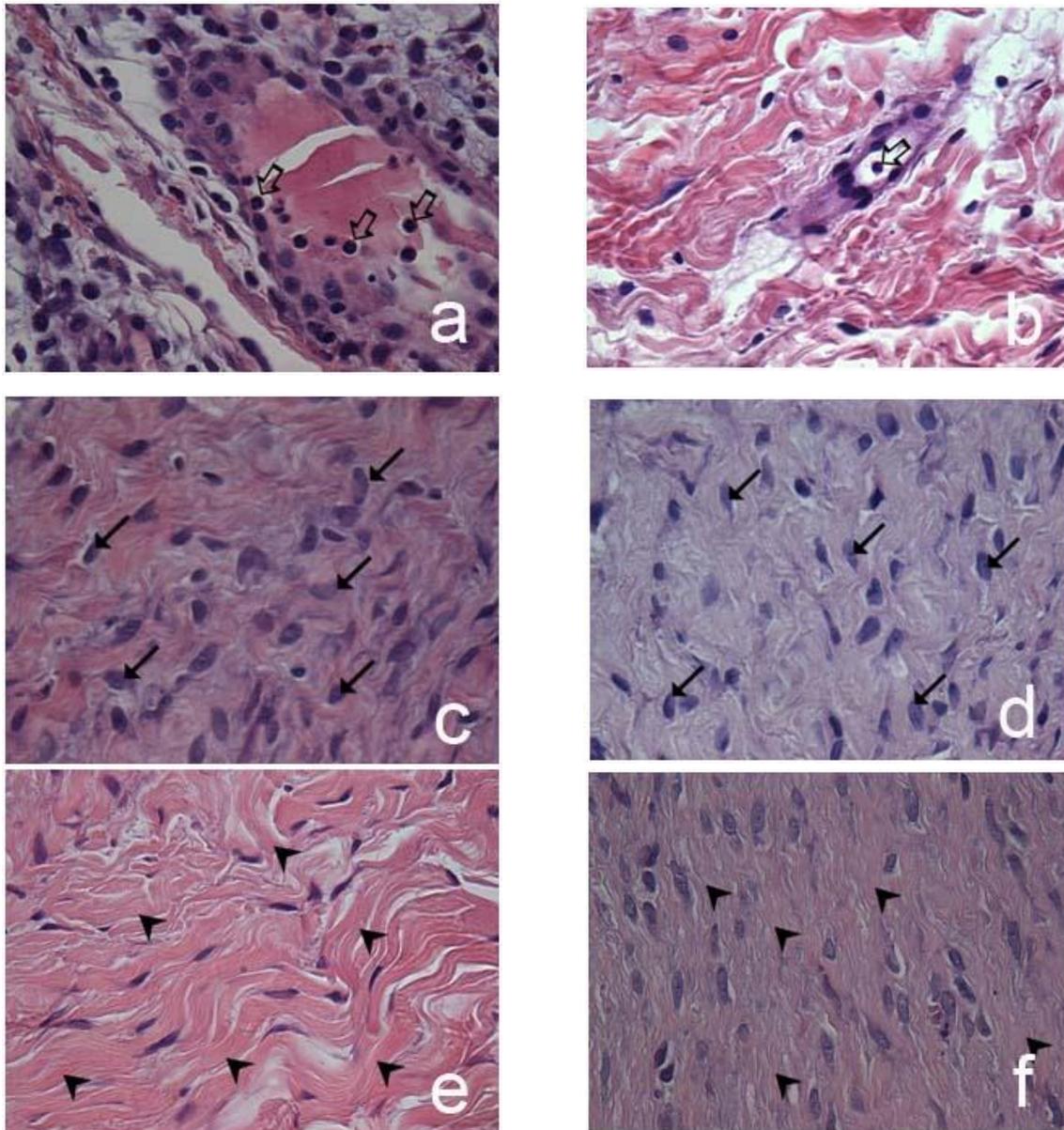


Figura 1. Fotomicrografias do tendão calcanear de ratos Wistar submetido à tendinopatia induzida, no grupo tratado (L) ou não (C) com laserterapia. Infiltrado inflamatório, com polimorfonucleares (seta vazada) observados no 3^o (a), e 21^o dias no grupo tratado (b). Nessa última figura também se observa discreto grau de hemorragia. Proliferação fibroblástica (setas) acentuada no 14^o dia ocorreu em ambos os grupos, L (c) e C (d). Feixes de fibras colágenas organizadas (cabeça de seta) foram verificados no 21^o dia, tanto no grupo L (e) como no C (f). HE; 400x.

Ambos os grupos apresentaram redução ($p=0,0129$) da aderência fibrinosa nos tempos avaliados, independente do tratamento. No 3^o dia de pós-operatório, essa característica variou de moderada a intensa, com diminuição no 7^o dia em ambos os grupos. Porém nos tendões dos ratos tratados e avaliados no 14^o dia foi constatado aumento da formação da aderência, diferentemente do observado no grupo C, que apresentou redução nesse tempo de avaliação. Por outro lado, o oposto ocorreu no 21^o dia, onde os tendões dos ratos do grupo L manifestou redução da aderência fibrinosa, enquanto os do grupo C aumento da mesma (Tabela 1). Análise de regressão demonstrou redução dessa característica (Figura 2a) nos tempos avaliados. De acordo com Abate et al. (15), esse achado é frequentemente observado entre tendão e paratendão na fase aguda da tendinopatia. Na realidade, além de células

inflamatórias originadas da periferia tecidual, a formação de aderências também está relacionada com fatores como migração extrínseca de fibroblastos (16,17).

Tabela 1. Valores médios e desvios padrão para escores da avaliação semiquantitativa das características hemorragia, formação de aderência fibrinosa, espessamento do epitendão, quantidade de fibras colágenas, proliferação fibroblástica e infiltrado inflamatório, realizada em diferentes momentos do processo de reparação tendínea.

Variáveis	Tempo (dias)				Média±DS
	3	7	14	21	
Hemorragia					
Laser	1.00±0.00	0.33±0.58	0.33±0.58	0.00±0.00	0.42±0.51
Controle	1.33±0.58	1.00±1.00	0,00±0,00	0.67±1.50	0.75±0.87
Aderência Fibrinosa					
Laser	3.67±0.58	1.67±1.15	2.33±0.58	1.67±0.58	2.33±1.07
Controle	3.33±1.15	3.00±1.00	1.33±0.58	2.00±1.00	2.42±1.16
Espessamento do Epitendão					
Laser	0.33±0.58	0.67±0.58	0.00±0.00	0.67±1.15	0.42±0.67
Controle	2.00±0.00	0.00±0.00	0.67±1.15	0.33±0.58	0.75±0.97
Quantidade de Fibras colágenas					
Laser	0.33±0.58	1.00±0.00	2.33±1.15	1.67±0.58	1.33±0.94
Controle	0.00±0.00	1.67±0.58	1.67±0.58	1.67±0.58	1.25±0.87
Proliferação Fibroblástica*					
Laser	1.33±0.58	1.00±0.00	3.00±0.00	2.00±0.00	1.83±0.83A
Controle	0.33±0.58	0.33±0.58	1.00±0.00	1.33±0.58	0.75±0.62B
Infiltrado inflamatório					
Laser	2.67±0.58	2.00±0.00	1.67±0.58	1.00±0.00	1.83±0.72
Controle	2.33±0.58	1.67±0.58	1.33±0.58	0.67±0.58	1.50±0.8

Na coluna, A diferente de B pelo teste F (p<0,01)*.

Tabela 2. Valores médios e desvios padrão para escores da avaliação semiquantitativa das características angiogênese e organização do tecido conjuntivo, realizada em diferentes momentos do processo de reparação tendínea.

Variáveis	Tempo (dias)				Média±DS
	3	7	14	21	
Angiogênese					
Laser	1.33±0.58	1.00±0.00	1.67±0.58	1.67±0.58	1.42±0.51
Controle	1.33±0.58	1.33±0.58	2.33±0.58	1.33±0.58	1.58±0.67
Organização do Tecido Conjuntivo					
Laser	0.33±0.58	1.67±0.58	1.67±0.58	2.33±0.58	1.50±0.90
Controle	0.00±0.00	0.00±0.00	2.33±0.58	2.33±0.58	1.17±1.27

Tabela 3. Valores médios e desvios padrão para escores da avaliação quantitativa das características colágeno tipo I e III, angiogênese, fibras colágenas, fibroblastos e infiltrado inflamatório, realizada em diferentes momentos do processo de reparação tendínea.

Variáveis (%)	Tempo (dias)				Média±DS
	3	7	14	21	
Colágeno I					
Laser	0,00±0,00	0,00±0,00	2,00±3,46	0,63±1,10	0,66±1,77
Controle	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
Colágeno III					
Laser	22,83±14,70	37,72±22,28	30,65±7,10	38,15±24,18	32,34±16,96
Controle	12,94±1,20	43,78±38,87	44,61±9,44	29,80±20,31	32,78±23,39
Angiogênese					
Laser	1,21±0,38	0,99±0,41	1,66±1,37	1,50±1,20	1,34±0,86
Controle	1,35±0,94	1,22±0,69	2,15±0,54	1,56±0,29	1,57±0,67
Fibras Colágenas*					
Laser	40,01±8,67	40,01±8,67	38,98±14,37	34,33±18,49	40,54±13,07 ^a
Controle	12,69±1,74	21,46±9,90	39,36±4,82	28,47±18,93	25,50±13,85 B
Fibroblastos*					
Laser	2,97±0,41	2,06±0,42	3,29±2,78	2,39±0,35	2,68±1,32A
Controle	1,10±0,70	1,19±0,32	1,85±1,37	1,19±0,37	1,33±0,76B
Infiltrado Inflamatório**					
Laser	0,78±0,33	0,38±0,16	0,18±0,11	0,02±0,03	0,34±0,34
Controle	0,64±0,10	0,37±0,14	0,12±0,05	0,00±0,00	0,28±0,27

Na coluna, A diferente de B pelo teste F ($p < 0,05$)* ; ($p < 0,01$)**.

O espessamento do epitendão não diferiu ($p=0,2453$) entre grupos nem tempos ($p=0,1459$). Contudo, os animais que receberam laser apresentaram menor espessamento em relação ao grupo controle, que foi de discreta no 3º dia, e respectivamente, discreta a moderada e ausente no 7º e 14º dia. Por outro lado, no 21º dia da avaliação voltou a se manifestar de discreta a moderada (Tabela 1), o que pode estar relacionada com a intensidade do processo inflamatório. O espessamento do epitendão também foi observado por Orhan et al. (12) em estudo com tendinopatia induzida no tendão calcâneo comum de ratos tratados com ondas de choque, sendo maior ($p=0,03$) no grupo tratado em relação ao controle. Por outro lado, os tendões dos animais tratados apresentaram maior ($p=0,028$) resistência biomecânica, sendo necessária maior força para que ocorresse a ruptura dos mesmos.

A quantidade do infiltrado inflamatório não diferiu ($p=0,1220$) entre grupos, porém foi diferente entre os tempos ($p=0,0003$). Ainda assim, os tendões tratados apresentaram maior densidade de células inflamatórias em todos os tempos estudados (Tabela 1). Análise de regressão revelou decréscimo dessa característica em todos os tempos avaliados (Figura 2b) durante o processo de reparação tendínea. Resultado semelhante foi obtido na avaliação morfométrica, onde ambos os grupos apresentaram maior quantidade do infiltrado inflamatório no 3º dia após indução da lesão (Figura 2c), e menor quantidade no 21º dia (Tabela 3). Ainda que a o processo inflamatório seja um evento benéfico em debelar a ação do agente agressor (18), a sua permanência pode ser prejudicial ao tecido lesionado, podendo inclusive estimular a formação de fibrose (19). Sabe-se que as células inflamatórias são fontes de fatores de crescimento que atuam na reparação tecidual (20,21). O fator de crescimento transformante beta (TGF- β), por exemplo, pode estimular de forma excessiva a produção de

colágenos pelos fibroblastos (22), embora seja essencial na melhoria das forças mecânicas, por reduzir a expressão gênica do pró-colágeno tipo III e elevar a do tipo I (23).

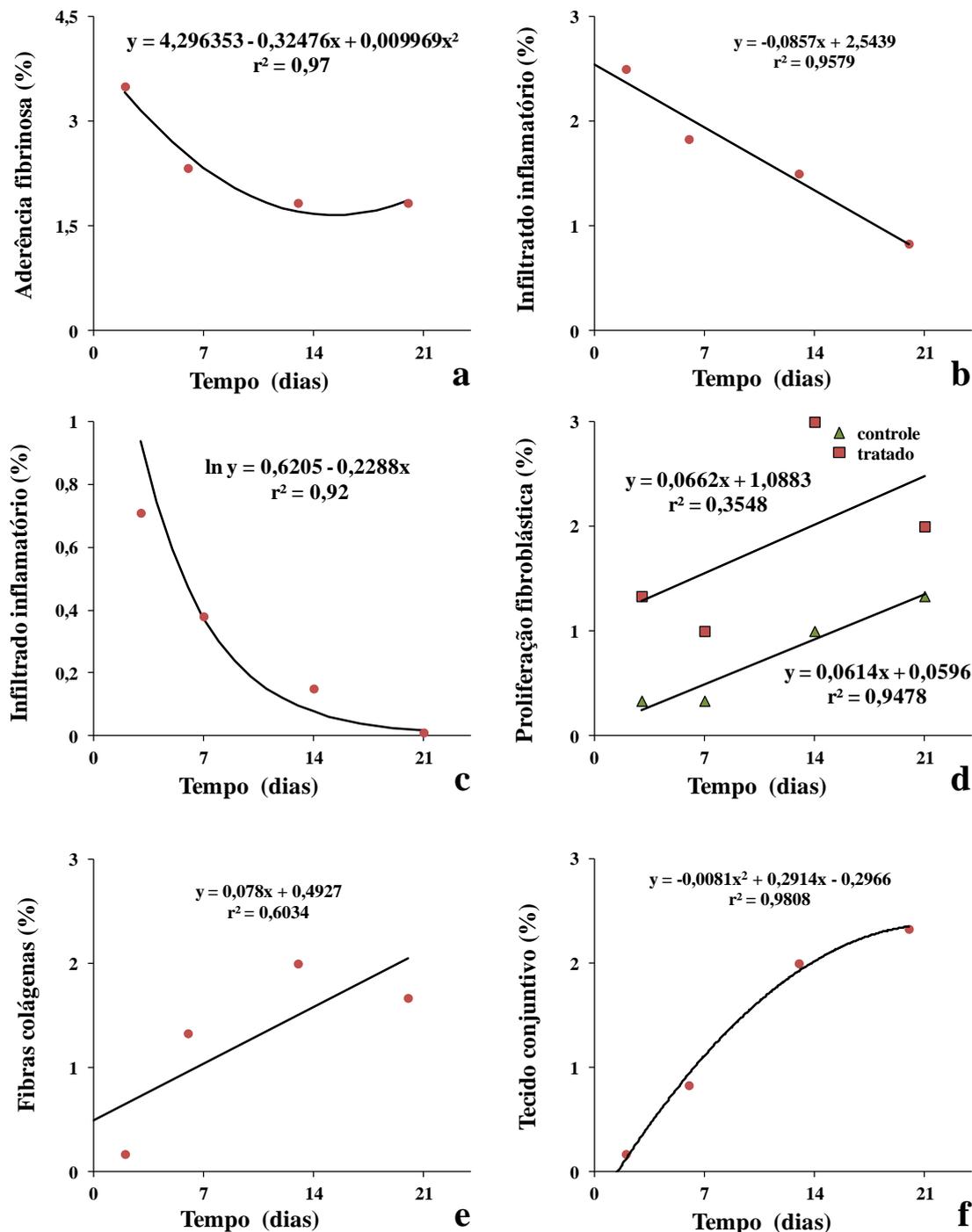


Figura 2. Estimativa da aderência fibrinosa (a), densidade do infiltrado inflamatório resultante da análise histológica (b) e da morfométrica (c), quantidade de fibras colágenas (e) e organização do tecido conjuntivo (f) em função do tempo. Com respeito à proliferação fibroblástica (d), essa estimativa ocorreu em cada grupo, também em função do tempo.

O início do tratamento logo após 24 horas de induzida a tendinopatia foi necessário uma vez que a terapia com laser deve iniciar nas primeiras horas depois de ocorrida uma lesão tendínea, tendo em vista os prováveis efeitos anti-inflamatório e analgésico. A diminuição do infiltrado inflamatório no grupo de animais tratados não foi observada no presente estudo,

apesar desse fato ter sido previamente mencionado 14 e 21 dias após tratamento com laser de baixa potência em tendão calcâneo comum de ratos, com lesão induzida por trauma (4). Essa provável ação na redução do processo inflamatório seria resultantes da diminuição na expressão de mediadores pró-inflamatórios como, por exemplo, a ciclooxygenase 2, o TGF- β e da interleucina 6 (24). Também pode está relacionada com o aumento da expressão da interleucina 10 (25), citocina considerada essencial pela sua ação anti-inflamatória, produzida particularmente por células do sistema imune, como macrófagos, linfócitos, etc.

A angiogênese é importante na oxigenação tecidual, já que favorece a nutrição e a remodelação tendínea. Tecidos bem vascularizados podem se recuperar rapidamente, mas quando pouco irrigados, o processo de reparação é mais lento, aumentando assim a possibilidade de recidiva da lesão (10). Entretanto, apesar da importância da angiogênese, espera-se que ocorra uma posterior redução da mesma durante a reparação de tendões, conforme mencionado por Nakamura et al. (26). A persistência da vascularização pode ocasionar em uma recuperação tendínea mais lenta e de forma inadequada (10). No presente estudo, considerando os momentos avaliados, a característica angiogênese não diferiu entre grupos ($p=0,4950$) e nem entre tempos ($p=0,3862$), embora o grupo C tenha apresentado angiogênese mais pronunciada na maioria dos tempos avaliados. Os grupos se comportaram de forma semelhante, havendo uma redução da angiogênese uma semana após a indução da lesão, com posterior elevação (14 dias). Finalmente, aos 21 dias essa característica voltou a reduzir (Tabela 3). Resultados semelhantes foram observados na avaliação histológica (Tabela 2).

Salate et al. (8) relataram estímulo à angiogênese resultante do tratamento com laser de baixa potência (2,5 e 10 J; 660 nm/10 s) durante as fases inflamatória e proliferativa do processo de reparação do tendão calcâneo comum de ratos Wistar submetido a ruptura parcial. De acordo com os autores, no 4^o dia depois de iniciado o tratamento ocorreu maior ($p<0,01$) quantidade de vasos no grupo tratado com a dose de energia de 10 J, em comparação com o grupo tratado com 2,5 J, o que sugere que a angiogênese é dose-dependente. Esse fato pode explicar a ausência de diferença entre grupos no presente estudo para neovascularização tecidual, a qual poderia estar relacionada com a dose de 3 J adotada. Entretanto, a dose de energia foi baseada na recomendada pela Associação Mundial para Terapia com Laser, quando se emprega um comprimento de onda de 904 nm, para tratamento de tendão calcâneo comum (27). Ainda que haja essa recomendação da associação, com relação ao tempo de aplicação e tipo de afecção, existe variação da dose usada em diversos estudos.

Proliferação fibroblástica, um dos efeitos atribuídos à laserterapia, foi mais acentuada ($p=0,0096$) no grupo submetido ao tratamento ($2,68\pm 1,32$), quando comparado com o grupo controle ($1,33\pm 0,76$), porém não houve efeito do tempo. Em ambos os grupos essa característica se apresentou inicialmente de forma crescente, com quantidade máxima no 14^o dia de realizada a tendinopatia, porém no grupo tratado houve redução dos fibroblastos no 21^o dia, enquanto no grupo controle houve uma elevação (Tabela 3). Avaliação histológica confirmou que os animais do grupo L apresentaram maior ($p=0,0000$) quantidade de fibroblastos em função dos tempos avaliados (Tabela 1). Adicionalmente, essa característica se manifestou de forma crescente ($p=0,0001$) em ambos os grupos em função do tempo (Figura 2d). O laser de baixa potência favorece a indução da atividade mitótica dos fibroblastos, que estimulam a produção do fator de crescimento fibroblástico básico, importante para a proliferação e diferenciação celular (28). Salate et al. (8) observaram alinhamento fibroblastos de melhor qualidade no grupo de ratos tratado com laser (660 nm; 2,5 J e 10 J/3, 5 ou 7 dias), cuja terapia foi iniciada seis horas após indução de lesão no tendão calcâneo utilizando guilhotina. Essas células são fundamentais para deposição e remodelação da matriz extracelular (29), assim como para a síntese do colágeno. Segundo Pires et al. (24), durante regeneração tecidual, os fibroblastos aparecem na fase proliferativa e sua redução

deve ocorrer de forma gradativa, conforme observado no presente estudo. Essa posterior diminuição é desejável, pois uma atividade fibroblástica exagerada pode comprometer o processo de reparação tendínea.

Considera-se o aumento na deposição de fibras colágenas como efeito positivo ocasionado pela laserterapia (9,25,30), uma vez que está associado com proliferação de fibroblastos (31), células responsáveis pela síntese de colágeno (22). As amostras coradas com HE revelaram na análise morfométrica, no decorrer do tempo, que a laser a base de GaAs estimulou ($p=0,0096$) de forma mais acentuada a produção de fibras colágenas em relação ao grupo controle. O aumento dessas fibras no 3º e 7º dias após iniciada a terapia foi de $40,01\pm 8,67$ e $48,85\pm 12,31$, respectivamente. Por outro lado, na segunda semana o grupo controle foi o que apresentou maior ($p=0,0096$) quantidade de fibras colágenas ($39,36\pm 4,82$). Enquanto na terceira semana os animais do grupo L voltaram a apresentar maiores quantidades ($p=0,0096$) dessas fibras ($34,33\pm 18,49$) (Tabela 3). De forma semelhante, a avaliação histológica evidenciou uma deposição significativa ($p=0,0005$) das fibras colágenas em função dos tempos avaliados (Figura 2e), onde essa deposição de fibras colágenas aumentou ($p=0,0005$) do 3º ao 14º dias em ambos os grupos, com posterior redução no grupo tratado, se mantendo constante no grupo controle (Tabela 1). Adicionalmente, foi observado maior ($p=0,0009$) organização do tecido conjuntivo no 7º dia, em ambos os grupos, segundo análise de regressão dessa característica em função do tempo ($p=0,0000$), uma vez que não houve diferença ($p=0,1220$) entre grupos (Figura 2f).

Apesar da elevada quantidade de fibras colágenas no grupo tratado com laserterapia, não houve diferença ($p=0,2274$) entre os grupos e tempos ($p=0,5077$) quando as fibras colágenas tipo I foram quantificadas na coloração de Picrosirius Red. Entretanto, essas fibras foram observadas a partir da segunda semana no grupo tratado, permanecendo no 21º dia (Tabela 3). O comportamento das fibras colágenas do tipo III foi bastante variável, embora também não tenha ocorrido diferença ($p=0,9581$) entre grupos nem entre tempos ($p=0,2588$) na quantidade dessas fibras, sendo possível observá-las no 3º dia da avaliação, quando foi encontrada uma quantidade de $12,94\pm 1,20$ e $22,83\pm 14,70$, nos grupos C e L, respectivamente. Nesse tempo as fibras se apresentavam desorganizadas e com feixes separados. Na primeira semana, os animais do grupo C apresentaram maior ($p=0,9581$) quantidade ($43,78\pm 38,87$), que foi mantida na segunda semana ($44,61\pm 9,44$). Entretanto, três semanas após indução da lesão, o grupo L apresentou maiores ($p=0,9581$) valores ($38,15\pm 24,18$) dessa característica, sendo bastante inferior ($29,80\pm 20,31$) no grupo C (Tabela 3).

Embora não significativo ($p=0,5077$), o aumento da quantidade de colágeno tipo I depois de três semanas de indução da lesão tendínea nos ratos tratados com laserterapia é um achado benéfico. Barbosa et al. (32) não encontraram diferença entre grupos tratados com laserterapia (7 J/cm^2) utilizando diferentes comprimentos de onda 660 nm ou 830 nm na quantidade de fibras colágenas tipo I e III no tendão calcâneo comum de ratos Wistar submetido à tenotomia parcial. Por outro lado, a associação da terapia com plasma rico em plaquetas revelou maior ($p<0,05$) quantidade de fibras colágenas tipo I em avaliação realizada 13 dias após tratamentos. Além disso, a associação do laser de baixa potência com o componente rico em plaquetas resultou em menor ($p<0,05$) quantidade das fibras colágenas do tipo III. Ainda no estudo desses pesquisadores, um achado interessante foi o fato do grupo de animais tratados com laserterapia apresentarem maior ($p<0,05$) quantidade de ambas as fibras, quando comparados com os tratados apenas com plasma rico em plaquetas. Esses resultados sugerem que o plasma rico em plaquetas, quando utilizado isoladamente, não apresenta uma resposta tão satisfatória quanto quando associado à terapia com laser. Os dados obtidos por esses autores não corroboram os encontrados no presente estudo, o que pode ser devido à dose de energia utilizada, comprimento de onda, mas, particularmente, com a quantidade de pontos de aplicação, que no estudo desses autores foram três, com duração de

20 segundos cada, enquanto na presente pesquisa foi utilizado apenas um ponto, com duração de 9 s. Futuros estudos devem considerar essas variáveis e, quem sabe a associação do laser com a terapia regenerativa.

A coloração Picrosirius Red permitiu avaliar facilmente a área lesionada, que se caracterizou, na maioria dos tempos e em ambos os grupos, por fibras colágenas do tipo III, que foram identificadas na coloração esverdeada, e se encontravam emaranhadas com as do tipo I, coradas em amarelo ou vermelho. Portanto, independentemente do grupo, houve elevação da quantidade de fibras colágenas tipo III já na primeira semana, o que já era esperado, pois esse tipo de fibras deve predominar nas primeiras semanas da reparação tendínea (33), tendo em vista a sua função em manter a estrutura do tendão (32). Apesar da importância da elevação precoce do colágeno tipo III logo depois de ocorrida lesão tendínea, é necessária redução gradual dessas células, já que se trata de um colágeno menos elástico (23,34) em comparação ao colágeno tipo I. Porém essa redução não foi observada no presente estudo, possivelmente pelo tempo em que a estrutura tendínea precisa para se recuperar que pode levar até meses, conforme mencionado por Laraia et al. (18). Portanto, seria interessante investigar o processo de reparação tendínea em ratos Wistar em períodos superiores a três semanas. Por outra parte, não pode ser descartada a possibilidade de que a associação da laserterapia com atividade física pudesse ocasionar resultados diferentes. De acordo com Silva (35), que realizou um estudo com tendão calcâneo comum de ratos Wistar, uma melhor resposta ao tratamento com laser de baixa potência GaAs (3 J e 904 nm) é observada quando realizado em conjunto com o exercício excêntrico, caminhada em esteira e em declive, iniciando 24 horas após indução da tendinopatia. O autor relata que essa associação de tratamentos é fundamental para a síntese do colágeno, por favorecer a atividade fibroblástica, entre outros benefícios na estrutura e resistência do tendão. Essa associação de tratamento ainda merece ser melhor investigada.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que a laserterapia aplicada na dose de energia e comprimento de onda mencionados, iniciada 24 horas após indução da lesão cirúrgica do tendão calcâneo comum de ratos Wistar, promove aumento na qualidade e quantidade de fibras colágenas, assim como de fibroblastos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pela concessão da bolsa de iniciação científica e suporte financeiro. Agradecimento também a CAPES e FAPEMIG pelos auxílios nos trabalhos científicos.

REFERÊNCIAS

1. Warden SJ. Animal models for the study of tendinopathy. *Br J Sports Med.* 2007;41(4):232-40.
2. Andres BM, Murrell GAC. Treatment of tendinopathy: what works, what does not and what is on horizon. *Clin Orthop Relat Res.* 2008;466(7):1539-54.
3. Medeiros UVD, Segatto GG. Lesões por esforços repetitivos (LER) e distúrbios osteomusculares (Dort) em dentistas. *Rev Bras Odontol.* 2012;69(1):49-54.

4. Fillipin L, Mauriz JL, Vedoveli K, Moreira AJ, Zettler ZG, Lech O, et al. Low-level laser therapy (LLLT) prevents oxidative stress and reduces fibrosis in rat traumatized Achilles tendon. *Lasers Surg Med.* 2005;37(4):293-300.
5. Wang JH-C. Mechanobiology of tendon. *J Biomech.* 2006;39(9):1563-82.
6. Dahlgren LA. Pathobiology of tendon and ligament injuries. *Clin Tech Equine Pract.* 2007;6(3):168-73.
7. Souza MV, Pinto JO. Association between nonsteroidal anti-inflammatory drugs and gastric ulceration in horses and ponies. In: Jianyuan C. *Peptic ulcer disease.* Rijeka: Intech; 2011. p.463-86.
8. 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.
9. 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):37-42.
10. 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.
11. Silva MO, Costa MBM, Borges APB, Dornas RF, Moreira JCL, Souza MV. Indução de tendinopatia em ratos Wistar: modelo experimental. *Rev Acad Cienc Agrar Ambient.* 2013;11(3):275-82.
12. Orhan Z, Ozturan K, Guven A, Cam K. 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.* 2004;86(4):613-8.
13. Eliasson P, Andersson T, Aspenberg P. Achilles tendon healing in rats is improved by intermittent mechanical loading during the inflammatory phase. *J Orthop Res.* 2012;30(2):274-9.
14. Van Schie HT, Bakker EM, Jonker AM, Van Weeren PR. Computerized ultrasonographic tissue characterization of equine superficial digital flexor tendons by means of stability quantification of echo patterns in contiguous transverse ultrasonographic images. *Am J Vet Res.* 2003;64(3):366-75.
15. Abate M, Gravare-Silbernagel K, Siljeholm C, Di Lori A, De Amicis D, Salini V, et al. Pathogenesis of tendinopathies: inflammation or degeneration? *Arthritis Res Ther.* 2009;11(3):1-15.
16. Sharma P, Maffulli N. Tendon injury and tendinopathy: healing and repair. *J Bone Joint Surg Am.* 2005;87(1):187-202.
17. James R, Kesturu G, Balian G, Chhabra AB. Tendon: biology, biomechanics, repair, growth, factors and envolving treatment options. *J Hand Surg Am.* 2008;33A(1):102-12.

18. 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. *Photochem Photobiol.* 2012;88(6):1546-50.
19. Pohlers D, Brenmoehl J, Loffer I, Muller CK, Leipner C, Schultze-Mosgau S, et al. TGF- β and fibrosis in different organs molecular pathway imprints. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1792(8):746-56.
20. McGrath MH. Peptide growth factors and wound healing. *Clin Plast Surg.* 1990;17(3):421-32.
21. Branton MH, Kopp JB. TGF- β and fibrosis. *Microbes Infect.* 1999;1(15):1349-65.
22. Klein MB, Yalamanchi N, Pham H, Longaker MT, Chang J. Flexor tendon healing *in vitro*: effect of TGF- β on tendon cell collagen production. *J Hand Surg Am.* 2002;27(4):615-20.
23. Marcos RL. Efeito do laser de baixa potência (810 nM) na tendinite induzida por colagenase em tendão calcâneo de ratos [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2010.
24. Pires D, Xavier M, Araujo T, Silva Júnior JA, Aimbire F, Albertini R. Low-level laser therapy (LLLT; 780 nm) acts differently on mRNA expression of anti- and pro-inflammatory mediators in an experimental model of collagenase-induced tendinitis in rat. *Lasers Med Sci.* 2011;26(1):85-94.
25. Xavier M, de Souza RA, Pires VA, Santos AP, Aimbire F, Silva JA Jr, et al. Low-level light-emitting diode therapy increases mRNA expressions of IL-10 and type I and III collagens on Achilles tendinitis in rats. *Lasers Med Sci.* 2014;29(1):85-90.
26. Nakamura K, Kitaoka K, Tomita K. Effect of eccentric exercise on healing process of injured patellar tendon in rats. *J Orthop Sci.* 2008;13(4):371-8.
27. Bjordal JM, Lopes-Martins 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.
28. 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.
29. Lui PPY, Cheuk YC, Hung LK, Fu SC, Chan KM. Increased apoptosis at the late stage of tendon healing. *Wound Repair Regen.* 2007;15(5):702-7.
30. 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;28(5):1281-8.

31. 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;8(3):239-44.
32. Barbosa D, Souza RA, Carvalho WRG, Xavier M, Carvalho PK, Cunha CR, 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.
33. Kajikawa Y, Morihara T, Sakamoto H, Matsuda K, Oshima Y, Yoshida A, et al. Platelet-rich plasma enhances the initial mobilization of circulation-derived cells for tendon healing. *J Cell Physiol.* 2008;215(3):837-45.
34. Barbato KBG. 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]. Rio de Janeiro: Universidade do Estado do Rio de Janeiro; 2011.
35. Silva MO. 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*) [dissertação]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 2013.

Recebido em: 11/07/2016

Aceito em: 21/06/2017