

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

MARCELO BAPTISTA DÖHNERT

ADMINISTRAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO POR  
FONOFORESE E IONTOFORESE NA TENDINOPATIA INDUZIDA  
EM RATOS

CRICIÚMA (SC), OUTUBRO DE 2011.

MARCELO BAPTISTA DÖHNERT

ADMINISTRAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO POR  
FONOFORESE E IONTOFORESE NA TENDINOPATIA INDUZIDA  
EM RATOS

Tese de Doutorado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciências da Saúde para obtenção do  
título de doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Marques  
da Silva Paula

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alexandra  
Ioppi Zugno

CRICIÚMA (SC), OUTUBRO DE 2011

Dedico esta tese a minha esposa e meus filhos,  
pela incansável paciência com os vários  
momentos de minha ausência no laço familiar  
durante estes anos de dedicação ao doutorado.  
Vocês são a razão da minha vida. Amo muito  
vocês!

## AGRADECIMENTOS

Aos colegas de pós-graduação Mirelli e Rodrigo, pelo incondicional apoio e ajuda na realização dos experimentos. Amigos que levamos para o resto da vida.

Ao bolsista e amigo, Jonathann, nosso “alemão”, dedicado e incansável em auxiliar o bom andamento dos experimentos.

À minha esposa, amor de minha vida, companheira e colega Luciana, maior incentivadora de meu crescimento profissional e meu “porto seguro”.

Aos meus filhos Renan, Lucas e Victor que, com certeza, sentiram a minha ausência em diversos momentos, mas que espero seja uma forma de orgulho e exemplo na sequência de suas vidas.

Finalmente, presto minha homenagem *in memoriam* a minha querida mãe Adélia que, aonde estiver, com certeza está iluminando meu caminho com seus eternos ensinamentos e exemplos de luta pela vida.

*Muito Obrigado!!*

## AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha coorientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alexandra Ioppi Zugno, pela compreensão e incentivo na mudança de meu rumo dentro do programa de pós-graduação. Só pessoas extremamente sábias conseguem compreender as aflições do seu próximo. Ainda como minha orientadora, abriu mão de seu orientando por compreender que este não era o meu verdadeiro caminho. A ela, por tudo que fez por mim, meu muito obrigado.

Agradecer ao meu orientador prof. Dr. Marcos Marques da Silva Paula deveria ser uma tese específica. Procurado por mim pela primeira vez, respondeu ao meu questionamento sobre minha tese da seguinte forma: “podemos fazer!! Se queres encarar este desafio, pode contar comigo”. E realmente foi sempre assim. Com ele, realmente conheci “um mundo diferente do meu”. Seus ensinamentos e parceria me levaram a traçar um caminho diferente em minha carreira profissional. Atualmente, mais do que apenas um orientador, tenho nele um amigo e parceiro inquestionável, o qual espero, com certeza, novas parcerias realizar. Grande amigo “Bocão”, meu emocionado muito obrigado por me acolher e me apoiar.

Agradecemos a UNESCO e CNPQ pelo apoio financeiro dado ao estudo.

## RESUMO

Lesões tendinosas são frequentes em atletas ou atividades profissionais que envolvam trabalho repetitivo. Dentre as diversas terapias disponíveis para o tratamento de lesões musculoesqueléticas agudas destacam-se a terapia ultrassônica (UST) e as correntes elétricas. A UST, quando utilizada para o transporte transdermal de fármacos é denominada fonoforese. Na iontoforese o transporte medicamentoso transcutâneo ocorre por eletroforese. Nanopartículas de ouro (GNP) exibem propriedades antiinflamatórias e de agente transportador de fármacos. O objetivo deste trabalho foi medir os níveis de interleucina 1- $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) e fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) na lesão aguda do tendão do calcâneo em ratos submetidos à administração de GNP isoladas ou associadas à diclofenaco dietilamônio (DFDA) por fonoforese e iontoforese. Foram usados, no total para os dois experimentos, 105 ratos Wistar machos, divididos em grupos com quinze ratos em cada. Para o experimento utilizando fonoforese foram quatro grupos: Grupo 1 – Grupo lesão sem tratamento. Grupo 2 – Grupo lesão tratado com DFDA via fonoforese. Grupo 3 – Grupo lesão tratado com DFDA via iontoforese. Grupo 4 – Grupo lesão tratado com GNP via fonoforese. Já para o experimento utilizando a iontoforese também foram quatro grupos, sendo que o grupo controle foi o mesmo nos dois experimentos: Grupo 2 – Grupo lesão tratado com GNP via iontoforese. Grupo 3 – Grupo lesão tratado com GNP + DFDA via fonoforese. Grupo 4 – Grupo lesão tratado com GNP + DFDA via iontoforese. As concentrações das citocinas foram mensuradas por immunoblott. Observou-se uma significativa redução na expressão da IL-1 $\alpha$  e TNF- $\alpha$  nos grupos tratados por fonoforese e iontoforese associando DFDA e GNPs em relação ao grupo lesão sem tratamento. Os níveis observados de ambas as citocinas ao final do tratamento não mostrou diferença significativa ao grupo 1. Este trabalho demonstrou que GNP associadas ao DFDA administrados via transdermal por iontoforese e fonoforese reduzem os níveis de IL-1 $\alpha$  e TNF- $\alpha$  na fase aguda da tendinopatia.

Palavras-chave: Lesão tendinosa; citocinas pró-inflamatórias; diclofenaco; nanopartículas de ouro; iontoforese; nanopartículas.

## ABSTRACT

## Abstract

Tendinous injury is frequent in athletes and different work activities that involve repetitive movements. Among the several therapy strategies developed to treat musculoskeletal injury are the therapeutic ultrasound therapy (TPU) and electric current. When used in transdermal transport of medicinal drugs, TPU is called phonophoresis. In iontophoresis, the transport of drugs takes place by electrophoresis. Gold nanoparticles (GNP) have anti-inflammatory properties and also act as drug transporters. The present study measured the levels of interleukin 1- $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) and tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in acute injury of the calcaneal tendon of rats treated with GNP and GNP in association with diethylammonium diclofenac (DFDA) by phonophoresis and iontophoresis. In total for the two experiments 105 male Wistar rats were used, divided in groups (n=15). For the experiment using phonophoresis were four groups: Group 1 (non-treated injury); Group 2 (injury treated with DFDA via phonophoresis); Group 3 (injury treated with DFDA via iontophoresis); Group 4 (injury treated with GNP via phonophoresis). For the experiment using iontophoresis were also four groups, with the control group was the same in both experiments: Group 2 (injury treated with GNP via iontophoresis); Group 3 (injury treated with GNP + DFDA via phonophoresis); Group 4 (injury treated with GNP + DFDA via iontophoresis). Cytokine concentrations were measured by immunoblotting. A significant decrease was observed in IL-1 $\alpha$  and TNF- $\alpha$  expression in groups treated with phonophoresis and iontophoresis associated to DFDA and GNP, in comparison to untreated rats challenged with injury. The levels of both cytokines at the end of the treatment did not statistically differ against Group 1. The results demonstrate that GNP associated to DFDA and intradermally administered by iontophoresis and phonophoresis reduce IL-1 $\alpha$  and TNF- $\alpha$  levels during the acute phase of tendinopathy.

Keywords: tendinous injury; pro-inflammatory cytokines; diclofenac; gold nanoparticles; iontophoresis; nanoparticles.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

DFDA – diclofenaco dietilamônio

EROs – Espécies reativas de oxigênio

GNP – Nanopartículas de ouro

HUVEC – Células endoteliais vasculares umbilicais

IGF-1 – Fator de crescimento insulina 1

IL-1 $\beta$  – Interleucina 1 beta

JNK - c-Jun N-terminal Kinase

MMPs – Metaloproteases

Nm – nanômetro

NOS – Oxido nítrico sintase

TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral alfa

UNESC – Universidade do Extremo Sul Catarinense

UST – Ultrassom terapêutico

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Esquema da estrutura multi hierárquica do tendão.....	12
Figura 2: Efeito mecânico, direção e profundidade da onda ultrassônica.....	24
Figura 3: Mecanismo de eletrólise da aplicação da corrente contínua.....	27

## SUMÁRIO

## PARTE I

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. Estrutura tendinosa, composição e função.....	12
1.2. Tendinopatia.....	16
1.2.1 Mudanças histopatológicas na tendinopatia.....	18
1.3 Mecanismos fisiopatológicos da lesão tendínea .....	20
1.4 Ultrassom e Fonoforese.....	23
1.5 Eletroforese e Iontoforese.....	26
1.6 Nanopartículas de Ouro.....	27
2. JUSTIFICATIVA E PROBLEMA.....	30
3. OBJETIVOS.....	33
3.1 Objetivo Geral.....	33
3.2 Objetivos Específicos.....	33

## PARTE II

4. Artigo1.....	35
5. Artigo 2 .....	44

## PARTE III

6. DISCUSSÃO.....	62
7. LIMITAÇÕES DO ESTUDO .....	68
8. CONCLUSÃO.....	69
9. PERSPECTIVAS.....	70
10. REFERÊNCIAS.....	71

PARTE I

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Estrutura tendinosa, composição e função

Tendões são tecidos especializados que conectam músculos a ossos e transmitem as forças geradas pelo músculo ao osso, gerando movimento articular. Além disso, são tecidos vivos que respondem a forças mecânicas pelas mudanças de seu metabolismo, assim como de sua propriedade estrutural e mecânica (Wang, 2006).

O tendão possui uma estrutura hierárquica multi unidade, composta de moléculas colágenas, fibrilas, feixes de fibras, fascículos e a unidade tendínea que corre paralela ao longo eixo axial do tendão (fig 1).

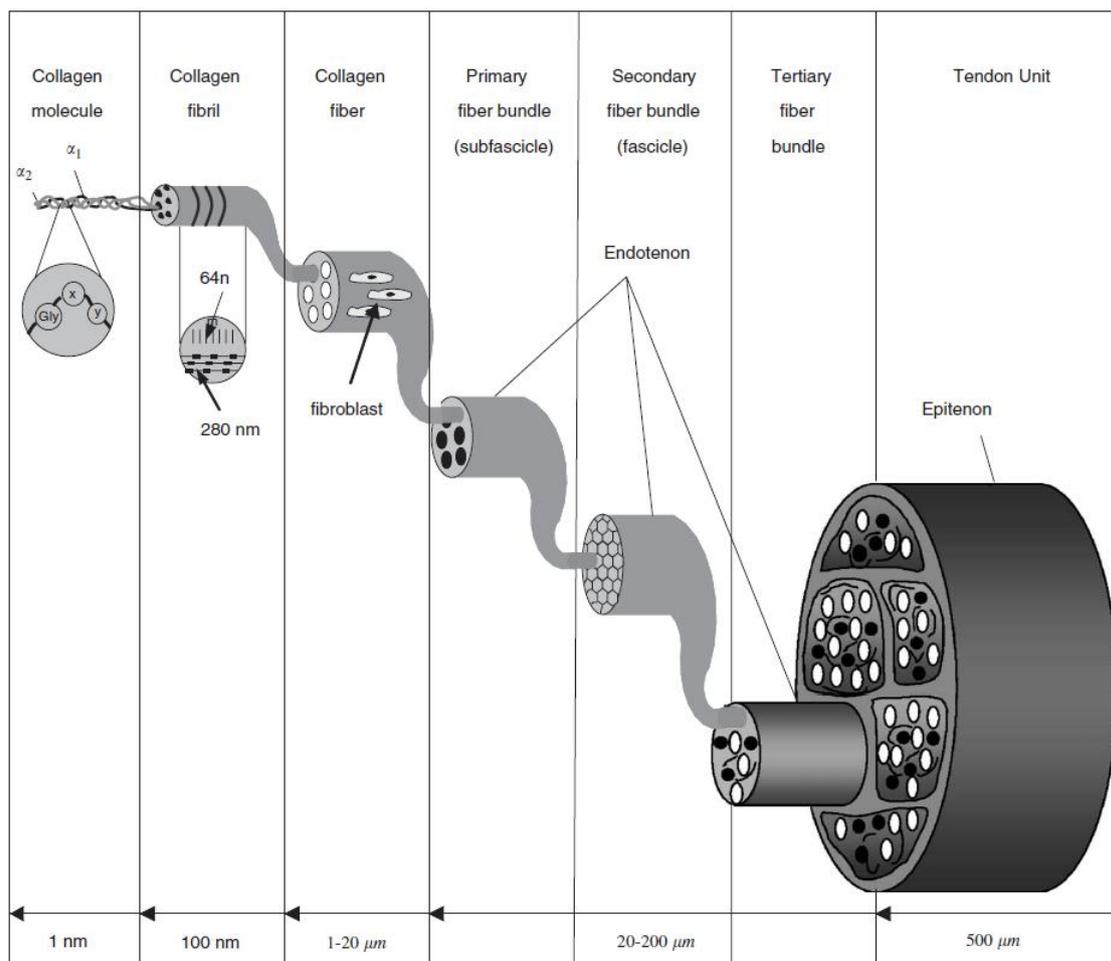


Figura 1. Esquema da estrutura hierárquica multimodal de tendão (modificado por Silver *et al*, 2003).

A fibrila é a menor unidade estrutural do tendão que consiste de uma longa “cadeia” de moléculas colágenas alinhadas, com diâmetro variando de 10 a 50 nm, dependendo da espécie, idade e localização da amostra.

Os feixes de fibras formam o nível seguinte da estrutura do tendão, compostas de fibrilas de colágeno e são revestidas pelo endotendão (Kastelic *et al*, 1978), uma fina camada de tecido conjuntivo que contém vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos (Kastelic *et al*, 1978; Ochiai *et al*, 1979). Feixes de fibras formam fascículos, e feixes de fascículos (unidade de tendão) são envolvidos pelo epitendão, que é uma fina e solta bainha de tecido conetivo contendo o suprimento vascular, linfático e nervoso do tendão (Kastelic *et al*, 1978).

Sabe-se que o tendão é também cercado por três camadas de um tecido conectivo chamado paratendão (conhecida como bainha sinovial em vários locais). À associação do epitendão e do paratendão denomina-se peritendão, responsável por reduzir a fricção com os tecidos adjacentes (Schatzker e Branemark, 1969).

Os tendões se conectam ao osso e ao músculo em suas terminações. A junção osteotendínea é chamada de entese. Há dois tipos de entese: fibrosa e fibrocartilaginosa. Na entese fibrosa o tendão se firma no perióstio durante a infância e diretamente ao osso na vida adulta. Já na fibrocartilaginosa, uma zona tradicional de fibrocartilagem hialina que distribui cargas, está presente (Benjamin *et al*, 2002). A entese pode ser tênsil, compressiva e de cisalhamento de forças. As forças tênsil aplicadas sobre a junção osteotendínea pode levar a mudanças histopatológicas da fibrocartilagem, a

qual somada ao acúmulo de proteoglicanos na inserção do tendão são descritos na entesopatia (McGonagle *et al*, 2003; Thomopoulos *et al*, 2003).

A junção miotendínea transfere forças do músculo ao tendão e modifica o tamanho do músculo (Benjamin e Ralphs, 1996). Nesta junção, fibrilas colágenas são inseridas dentro do recesso formado pelos miofibroblastos (Michina, 1983; Tidball, 1991). Esta também reduz a tensão no tendão durante a contração muscular. Entretanto, a junção miotendínea é também o ponto fraco da unidade músculo-tendão (Garrett, 1990; Jarvinen *et al*, 1991).

Os tendões consistem de colágeno, proteoglicanos, glicoproteínas, água e células. O colágeno é a estrutura predominante do tendão. Há 27 tipos diferentes de moléculas de colágeno identificadas. Embora o colágeno tipo I conte com aproximadamente 65 a 80% da massa do tendão e represente cerca de 95% do colágeno total em um tendão normal, outros colágenos, incluindo colágenos tipo II, III, IV, V, VI IX, X, XII e XIV também têm sido descobertos em pequena quantidade (Evans e Barbenel, 1975; Riley *et al*, 1994). Os 5% restantes consistem basicamente de colágenos tipo III e V. No tendão normal, o colágeno tipo III está localizado no endotendão e no epitendão (Duance *et al*, 1977). Entretanto, também é encontrado em tendões envelhecidos e em locais de inserção de tendões com alta tensão tais como no supraespinhoso do ombro (Fan *et al*, 1997). O colágeno tipo III forma fibrilas menores e menos organizadas, a qual pode resultar num decréscimo da força mecânica. O colágeno tipo V é intercalado no centro do colágeno tipo I e regula o crescimento das fibrilas (Birk *et al*, 1990).

Mudanças no conteúdo e composição têm sistematicamente sido descobertas na tendinopatia. Estas mudanças incluem: (1) redução no

conteúdo normal de colágeno, um aumento da proporção dos colágenos tipos I, III e V, e um aumento da taxa de colágeno tipo III em relação ao I; (2) alto percentual desnaturado; e (3) uma baixa taxa de pentosidina e altas taxas de resíduos de lisina hidroxilada.

Além do colágeno, os tendões também contêm proteoglicanos em pequena quantidade. Proteoglicanos são complexos proteínas/polissacarídeos localizados na matriz extracelular, que retêm água e afetam a propriedade viscoelástica do tecido, ajudando nas forças de resistência compressiva do tecido. Os proteoglicanos e seus constituintes glucosaminoglicanos podem influenciar muitos processos fisiológicos do tendão, incluindo transporte iônico, retenção d'água, difusão de nutrientes, mediação da interação célula-matriz, resistência de compressão e seqüestro de fatores de crescimento e enzimas na matriz. O conteúdo de proteoglicanos varia de acordo com o local do tendão e depende das condições de carga mecânica sobre este (Riley *et al*, 1994; Berenson *et al*, 1996). Há muitos tipos de proteoglicanos, incluindo os agrecanos e a decorina (Vogel e Heinegard, 1985). Os agrecanos possuem água dentro de uma fibrocartilagem e são resistentes à compressão. Já a decorina é um proteoglicano pequeno rico em leucina, localizando-se na superfície da porção média das fibrilas colágenas e serve para facilitar o deslizamento das fibrilas durante a deformação mecânica (Pins *et al*, 1997). Vários estudos demonstram que os proteoglicanos desenvolvem papel importante na regulação da formação e maturação das fibras de colágeno (Danielson *et al*, 1997; Chakravarti, 2002; Matheson *et al*, 2005).

Muitas glicoproteínas presentes na matriz extracelular do tendão incluem tenascina-C e fibronectina. A tenascina-C contribui para a estabilidade

mecânica da matriz extracelular através da interação com as fibras colágenas (Elefteriou *et al*, 2001). A fibronectina está localizada na superfície do colágeno e sua síntese aumenta a facilidade de reparo de lesão (Butler *et al*, 1978; Williams *et al*, 1984; Jozsa *et al*, 1989). Além disso, os tendões possuem elastina, que compõem cerca de 2% do peso tecidual do tendão. As fibras elastinas, que incluem elastina e proteínas microfibrilares, podem contribuir para a recuperação da configuração linear das fibras colágenas após estiramento (Butler *et al*, 1978).

Embora as células endoteliais, células sinoviais e condrócitos estejam presentes no tendão, os fibroblastos (tenoblastos e tenócitos) são as células predominantes no tendão. Eles alinham linearmente as bandas de fibras colágenas e também são responsáveis pela síntese de proteínas na matriz extracelular (colágeno, fibronectina e proteoglicanos), produzindo uma organização na matriz colágena e remodelando-a durante a cura do tendão (Wang, 2006). Os fibroblastos são os maiores tipos celulares no tendão, e tem sido histologicamente classificados como tenócitos alongados ou tenoblastos ovóides. Estas células são importantes na manutenção do tendão saudável. Podem proliferar e produzir colágeno para manter a matriz extracelular apropriada. Há evidências que mudanças ocorrem nas células antes do desenvolvimento claro da tendinopatia (Yinghua e George, 2008).

## 1.2 Tendinopatia

As lesões tendinosas são comuns e afetam uma porção substancial de atletas profissionais e recreacionais, e também muitas ocupações envolvendo trabalho repetitivo. A tendinite é uma condição dolorosa que ocorre em tendões

em resposta ao uso repetitivo (“*overuse*”). A terminologia tendinite implica dor associada a condições resultantes de um processo inflamatório. Há dois problemas que envolvem esta afirmação. Primeiramente, existem evidências de pouca ou nenhuma inflamação presente em tendões expostos a *overuse*. Em segundo plano, as modalidades terapêuticas comumente utilizadas objetivando a modulação da inflamação têm tido limitado sucesso nos casos crônicos, em condições dolorosas surgindo pelo uso excessivo do tendão. Mais recentemente, a terminologia tendinopatia tem sido utilizada para descrever a variedade de condições dolorosas em resposta ao “*overuse*” (Bratt *et al*, 2008). A patogênese da tendinopatia ainda é pouco conhecida. Embora muitos medicamentos sejam prescritos, há poucas evidências da eficácia (Yinghua e George, 2008).

A tendinopatia apresenta prevalência em indivíduos mais velhos, do sexo masculino e em obesos. Corridas de longas distâncias, intensidade, e trabalhos em subidas também são fatores de risco para desenvolver tendinopatia Aquileu aguda (Yinghua e George, 2008).

Os modelos animais de tendinopatia têm sido considerados meios eficientes e eficazes para promover uma maior compreensão sobre os mecanismos histopatológicos que envolvem uma tendinopatia humana. Estudos histopatológicos têm demonstrado que a tendinopatia em seres humanos é normalmente devida a uma tendinose. Esta é caracterizada histologicamente por tecido degeneração com uma resposta reparativa fracassada e uma ausência de células inflamatórias. O fator de risco para desenvolvimento de um modelo animal de tendinose mais comumente utilizado é o fator extrínseco, ou seja, uma sobrecarga mecânica. Estes fatores

extrínsecos têm tido relativo sucesso em diversas condições de tendão. Métodos utilizando fatores intrínsecos também têm sido sugeridas, mas sua utilização de forma isolada têm sido questionável (Warden, 2007). Para a utilização de uma carga em deslocamento com queda livre sobre o terço médio do tendão para a produção de uma lesão tendínea sem haver a ruptura de suas fibras, deve ser considerada a energia acumulada pela peça móvel que é deixada cair sobre o corpo de prova, no caso o tendão.

### 1.2.1 Mudanças histopatológicas na tendinopatia

Um tendão normal é branco brilhante e com textura fibroelástica firme (Yinghua e George, 2008). As mudanças histopatológicas associadas à tendinopatia incluem degeneração e desorganização das fibras colágenas, celularidade aumentada e mínima inflamação (Khan *et al*, 1999). As mudanças macroscópicas incluem espessamento tendíneo, perda da propriedade mecânica e dor (Soslowky *et al*, 2000). Microscopicamente, os feixes colágenos são desorganizados, há um aumento da substância e os núcleos são escuramente tingidos, e em maior número. Isto contrasta com a organização paralela das bandas colágenas no tendão normal com formas arredondadas dos núcleos tenócitos arranjados no alinhamento paralelo.

Recentes estudos demonstram as muitas mudanças que ocorrem em respostas ao “*overuse*” e ao trauma, resultando em um desequilíbrio entre proteção/regeneração, incluindo a produção de uma matriz metaloproteinase, apoptose de células tendíneas, metaplasia condróide do tendão, e expressão de fatores de proteção tais como fator de crescimento insulina 1 (IGF-1) e óxido nítrico sintase (NOS) (Yuan *et al*, 2002; Scott *et al*, 2005; Takahashi *et al*, 2006;

Jones *et al*, 2006; Archambault *et al*, 2007; Lian *et al*, 2007; Longo *et al*, 2007; Scott *et al*, 2007). O tendão tendinopático, freqüentemente tem infiltrações vasculares de pequenos vasos sanguíneos, uma autorregulação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). O VEGF é uma potente citocina angiogênica e um sinalizador peptídeo. VEGF regula muitos genes que dirigem a resposta angiogênica e adaptativa à inflamação ou hipoxia celular. Em patologias como câncer e em reparos teciduais promove a proliferação de células endoteliais, a migração e sobrevivência, assim como a permeabilização de capilares levando ao edema localizado (Scott *et al*, 2008). VEGF não se apresenta aumentado no tendão humano adulto, mas esta expressão é aumentada em muitos modelos animais de lesão aguda ou sobrecarga mecânica, como no overuse (Perry *et al*, 2005; Pufe *et al*, 2005). Os níveis de VEGF e mRNA são elevados em biópsias tendinosas aquileu homogenizadas e pode surgir em tendões fibroblásticos, células endoteliais ou populações celulares extrínsecas recrutadas no sítio da lesão (Pufe *et al*, 2005). Então, o mecanismo de sobrecarga, lesão e inflamação, condições de hipóxia ou a combinação destas levam ao aumento da expressão VEGF no tendão (Pufe *et al*, 2001). Scott, Bahr e Duromio (2005) coletaram tecido tendíneo patelar de 22 pacientes que sofreram ruptura parcial e de 10 pacientes com retirada da parte intramedular da inserção na tíbia para controle e verificaram uma expressão VEGF ausente nos controles e presente no grupo de pacientes com evidências histopatológicas de tendinose angiofibroblástica (Perry *et al*, 2005). Estas evidências de mudanças patológicas são consistentes com degeneração e tentativas de regeneração.

Estudos imunohistoquímicos demonstram que o número de fibras nervosas nociceptoras está aumentado em amostra tendinopáticas dolorosas em comparação com amostras de tendões normais (Schubert *et al*, 2005; Lian *et al*, 2006). Microdiálises mostram um aumento nos níveis do neurotransmissor glutamato nas tendinoses patelares e aquileu crônicas comparadas com tendões controles livres de dor. Maffulli *et al* (2000) e Danielson *et al* (2007) recentemente relataram que os tenócitos no tendão patelar danificado exibem mais imunoreações para receptores adrenérgicos e catecolaminas. Estas descobertas são importantes, pois estudos têm demonstrado que a estimulação de receptores adrenérgicos pode levar a proliferação celular e/ou a degeneração celular e apoptose.

A transformação de células tendíneas através de um fenótipo fibrocondrogênico tem sido observada em sofrimento de tendões do manguito rotador. Tenócitos do local da tendinopatia também produzem quantidades anormais de colágeno tipo III, comumente associada com cicatrização de ferimentos, mesmo quando o movimento repetitivo não está presente (Danielson *et al*, 2007).

A ciência básica apresenta diversas opções terapêuticas para abordagem da tendinopatia, tanto na fase aguda ou inflamatória quanto na fase tardia ou crônica. Dentre as modalidades terapêuticas para abordagem da fase inflamatória, dispomos do ultrassom e da eletroterapia.

### 1.3 Mecanismos fisiopatológicos da lesão tendínea

Um aumento de apoptose ocorre em um tendão degenerado. Em um tendão do supraespinhoso do ombro com ruptura se encontram duas vezes

mais células apoptóticas do que no tendão normal. Pode ser induzida pelo alto uso mecânico do tendão. Ativação do c-Jun N-terminal Kinase (JNK), o aumento do citocromo *c* relatado e ativação da caspase-3 podem ser duas vias potenciais para a indução da apoptose tendinosa. Estas duas vias são associadas com estresse oxidativo, que pode ser induzido durante alta dose de esforço físico em humanos e em células tendinosas animais *in vitro* e em *ex vivo* (Yinghua e George, 2008).

“Espécies reativas de oxigênio” (EROs) é um termo coletivo para espécies reativas radicais e não radicais derivadas do oxigênio. Um radical livre é qualquer espécie capaz de existir independentemente que contém um ou mais elétrons não pareados. A presença de tal elétron não pareado freqüentemente confere considerável reatividade (Halliwell e Gutteridge, 1999). Os EROs incluem o ânion superóxido, peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), radical hidroxil e radicais peroxil. São comumente desenvolvidos durante o metabolismo celular normal. Tradicionalmente, EROs impõem dano tecidual/celular através da peroxidação lipídica, modificação de proteínas, clivagem da fita DNA e modificação da base oxidativa. Então, a produção de EROs é implicada em numerosos aspectos fisiopatológicos incluindo tumorigêneses, doença coronariana cardíaca, doenças auto imunes, exercícios excessivos e recuperação de fraturas (Gorkturk *et al*, 1995; Halliwell e Gutteridge, 1999).

Há uma escassez de estudos na participação de EROs em modelos clínicos de tendinopatia. Entretanto, uma recente investigação mostrou um aumento da expressão do peroxiredoxina 5, uma tioredoxina peroxidase com propriedades anti oxidantes no tendão tendinopático, sugerindo que o estresse

oxidativo pode estar envolvido na patogênese da degeneração tendinosa (Wang *et al*, 2003).

EROs são potentes indutores e modificadores do processo apoptótico, mas esta relação é bastante complexa. Por exemplo, altas concentrações de peróxido de hidrogênio podem prevenir apoptose. Reciprocamente, pulsos de EROs e a diminuição de enzimas anti oxidantes freqüentemente acompanham a indução de apoptose, e o estresse oxidativo é uma característica comum na fase tardia da apoptose. Recentes trabalhos mostraram que estresse oxidativo induz apoptose em tenócitos humanos envolvendo um lançamento clássico do citocromo c mitocondrial dentro do citosol e ativação da caspase-3 protease (Yuan *et al*, 2003).

Metaloproteases (MMPs) são uma grande família de enzimas que degradam todos os componentes da matriz do tendão e estas enzimas e seus inibidores fazem o maior papel na degradação de matriz durante o desenvolvimento, adaptação e reparo. Em adição ao seu importante papel nos eventos fisiológicos normais na homeostase do tendão e reparo, estas enzimas podem ter efeitos chaves no processo patológico da doença tendínea (Yinghua e George, 2008).

Arnoczky *et al* (2007) demonstraram em um estudo *in vitro* que os inibidores MMPs podem prevenir a ativação das MMPs-13, inibir a degeneração da matriz pericelular e a perda da propriedade material associada com privação de estresse. Relataram também um aumento na atividade e na expressão mRNA das MMPs-1, -9, -11 e -13 na tendinopatia. A elevação das MMPs-13 é associada ao remodelamento do tendão e reparo no tendão normal

e lesado. Já a diminuição da atividade e a expressão mRNA das MMPs-3 foram descobertas na tendinopatia do supraespinhoso e do Aquiles.

O balanço entre metaloproteinases e seus inibidores são provavelmente essenciais na manutenção da homeostasia da matriz extracelular do tendão e um desequilíbrio pode resultar em um dano incontrolado no tendão (Yinghua e George, 2008).

#### 1.4 Ultrassom e Fonoforese

A terapia ultrassônica tem sido utilizada a mais de 50 anos para o tratamento de diversas lesões nos tendões, ligamentos, músculos, inflamação da cápsula articular, bursites e disfunções musculoesqueléticas (Ramirez *et al*, 1987; Kitchen e Patridge, 1990). O ultrassom é uma forma de energia acústica freqüentemente utilizada na fisioterapia pelos seus efeitos de calor profundo e analgésico. Quando a onda ultrassônica penetra no organismo, interage com células e tecidos através de mecanismos térmicos e não térmicos. Estruturas aquecidas pelo ultrassom são preferencialmente músculos fibrosados, bainhas tendíneas e raízes nervosas (Guffey e Knaust, 1997). Evidências indicam, entretanto, que utilizando o mecanismo não térmico ocorra uma transformação primária de energia na produção de significativos efeitos terapêuticos, ou seja, a estimulação da regeneração tecidual, caracterizando-se pelos aumentos na taxa de permeabilidade de membrana, de difusão celular e dos níveis de cálcio intracelular, além de mudanças nas atividades elétricas de nervos periféricos (Currier *et al*, 1978; Ter Haar, 1999).

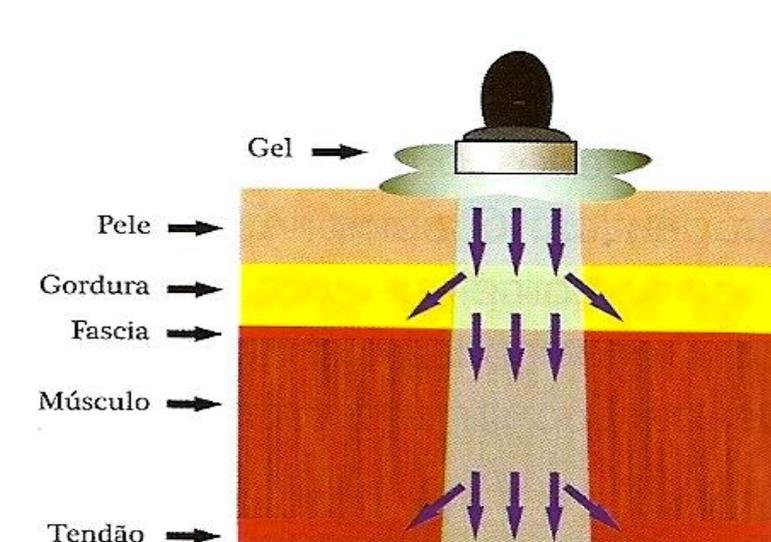


Figura 2. Efeito mecânico, direção e profundidade da onda ultrassônica. (Agne, 2010)

A fonoforese e a iontoforese são sistemas de liberação de fármacos via transcutânea que usam agentes físicos (mecânicos e elétricos) para introduzir uma medicação tópica no local da lesão. Isto diminui os riscos e inconveniências da terapia intravenosa, reduzindo a passagem da medicação pelo fígado e fornecendo pouca chance de *overdose* ou baixa dose, permitindo fácil término dos efeitos (p.e remover o fármaco da pele) (Chien, 1987; Chien, 1987; Bronaugh e Maibach, 1991).

A fonoforese é a migração de moléculas de fármacos através da pele por estímulo mecânico por ultrassom. Na fisioterapia, a fonoforese com fármacos antiinflamatórios não esteroidais é comumente usada para tratar lesões inflamatórias dos tecidos (Hsieh, 2006). Becker *et al* (2005) relataram que a profundidade de penetração do medicamento pelo ultrassom varia de acordo com a frequência do equipamento. Sabe-se que a frequência do ultrassom é inversamente proporcional a sua capacidade de penetração no organismo. Kim *et al* (2004) avaliaram os efeitos anestésicos da lidocaína em duas frequências distintas de ultrassom (0.5 e 1 MHz). A fonoforese em ambas as frequências

apresentou um aumento no limiar de dor e significativa mudança no potencial de ação dos nervos sensitivos. O ultrassom de 0,5 MHz mostrou-se mais efetivo do que o de 1 MHz. Outro estudo avaliou o efeito do ultrassom na absorção de dexametasona aplicada via um curativo fechado por 30 minutos antes da aplicação do ultrassom, mostrando que a fonoforese foi efetiva com a saturação da pele (Saliba *et al*, 2007). Hsieh (2006) avaliou o efeito da fonoforese utilizando diclofenaco na supressão do óxido nítrico sintase (NOS) induzida em ratos artríticos e constatou uma diminuição quando comparado ao grupo controle na fase inicial da inflamação (Yuan *et al*, 2003). Outro estudo avaliou a comparação dos níveis tecidual e plasma de Cetoprofeno nas aplicações por fonoforese e tópica, confirmando que a fonoforese permitiu alcançar uma alta concentração local, enquanto que a exposição sistêmica foi mínima (Cagnie *et al*, 2003).

Alguns estudos analisaram o efeito terapêutico do ultrassom na tendinopatia. Dyson *et al* (1968) sugeriram que o ultrassom pode interferir na formação química associada a polimerização do colágeno. Também sugere que o ultrassom estimula a ação fibroblástica, células fundamentais no reparo do tecido conetivo, além de ser responsável pela síntese de colágeno e outras proteínas da matriz (Dyson *et al*, 1968). Outro estudo avaliou o efeito terapêutico do ultrassom, tanto de forma pulsada como contínua, no reparo do tendão aquileu de rato. Os resultados mostraram uma alta birrefringência para os tendões tratados com ultrassom pulsado, com uma melhor organização e agregação das bandas colágenas (Cunha *et al*, 2001). Com relação ao uso de medicamentos no reparo do tendão aquileu via ultrassônica, um estudo comparou a eficácia terapêutica da aplicação tópica do medicamento

hidrocortisona e via fonoforese, verificando que apenas a via fonoforese foi eficiente na resposta de estímulo das moléculas de colágeno (Koeke *et al*, 2005).

### 1.5 Eletroforese e Iontoforese

Iontoforese tem sido estudada há mais de um século pela sua capacidade de liberação medicamentosa transcutânea através de correntes elétricas de baixa frequência (Banga, 1998; Kalia *et al*, 2004). Apesar de aumentar a permeabilidade da pele, a iontoforese fornece principalmente carga de transporte elétrico através do estrato córneo da pele. Medicamentos com cargas elétricas são transportados via eletroforese, enquanto medicamentos com cargas elétricas fracas ou compostas sem gradiente elétrico podem ser movidos pelo fluxo eletro osmótico da água gerada pelo movimento preferencial dos cátions móveis (p.e  $\text{Na}^+$ ) ao invés dos anions fixos no estrato córneo (Pikal, 2001).

Os fármacos comumente usados no sistema transcutâneo têm uma variedade de mecanismos de liberação com marcadores específicos. Na reabilitação, entretanto, os marcadores de liberação de fármacos via transcutânea são basicamente locais, com três tipos mais comuns de medicamentos: (1) anestésicos, (2) contra irritantes e (3) antiinflamatórios tais como medicações não esteróides ou esteróides (Byl, 1995).

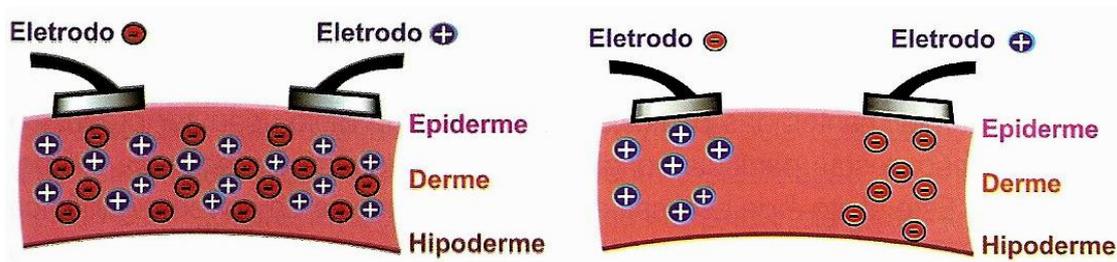


Figura 3. Mecanismo de eletrólise da aplicação da corrente contínua (Agne, 2010).

### 1.6 Nanopartículas de Ouro

Recentemente, nanomateriais, cujas dimensões estão compreendidas na faixa de 1 a 100nm, têm sido usados para criar dispositivos únicos numa escala nanométrica, apresentando novas propriedades funcionais físicas e químicas. Os nanotransportadores têm fornecido uma nova plataforma para transporte a alvos específicos de agentes terapêuticos. No final da década passada, muitos veículos carreadores foram designados baseados em diferentes nanomateriais, tais como polímeros, dendrímeros, liposomas, nanotubos e nanofios. Estas nanopartículas inorgânicas cujas estruturas exibem funcionalidade e propriedades biológicas devido ao seu tamanho têm despertado muito interesse de diferentes grupos e áreas de pesquisa (Bhattacharya e Mukherjee, 2008).

Dentre elas, destacam-se as nanopartículas de ouro, que recebem atenção especial devido às propriedades ópticas, eletrônicas, redox e catalíticas (Daniel e Astruc, 2004). Nanopartículas de ouro (GNPs) tem recentemente emergido como um candidato atraente para transporte de várias proteínas e seus marcadores. Podem ser pequenas moléculas de drogas ou grandes biomoléculas, proteínas, DNA ou RNA. Uma eficiente liberação destes

agentes terapêuticos é um pré-requisito para uma efetiva terapia (Ghosh *et al*, 2008).

GNPs apresentam propriedades químicas e físicas ímpares para transporte e descarregamento de fármacos. Primeiro, o núcleo do ouro é essencialmente inerte e não tóxico. A segunda vantagem é sua facilidade de síntese. Nanopartículas monodispersas podem ser formadas com tamanhos variando entre 1 nm a 150 nm (Ghosh *et al*, 2008).

Os sistemas de liberação de medicamentos, como as GNPs, fornecem atributos positivos para uma medicação livre por fornecer solubilidade, estabilidade *in vivo* e biodistribuição. Também podem alterar de forma favorável a farmacocinética. Além disso, o transporte de farmacocinéticos nestes sistemas pode servir como reservatório de fármacos para liberação controlada e mantida, bem como manter os níveis da droga dentro da janela terapêutica. Por exemplo, uma nanopartícula de ouro com 2 nm de diâmetro deveria ser, a princípio, conjugada com aproximadamente 100 moléculas com ligantes disponíveis na monocamada. As GNPs são capazes de liberar grandes moléculas sem a restrição de ter que carregar apenas fármacos com moléculas pequenas. Eles têm mostrado sucesso na entrega de peptídeos, proteínas ou ácidos nucleicos do DNA ou RNA (Ghosh *et al*, 2008) Sonavane *et al* (2008) avaliaram a penetração das GNPs na pele e no intestino de ratos, bem como se o tamanho de partícula (15, 102 e 198 nm) influenciava nesta penetração. Os resultados mostraram que as GNPs são excelentes carreadores tanto via transcutânea como oral, e que as partículas de ouro de tamanhos menores se mostraram mais permeáveis na forma transcutânea (Ghosh *et al*, 2008).

As GNPs têm sido ativamente investigadas em uma ampla variedade de aplicações biomédicas, devido a sua biocompatibilidade e facilidade de conjugação com biomoléculas. Já que o ouro se liga fortemente a grupo tióis e aminos, GNPs inibem a proliferação endotelial pelo VEGF<sub>165</sub>-induzido pela interação com o enxofre/aminos presente neste campo heparina-ligante, e desse modo inibe a sinalização da permeabilidade do VEGF<sub>165</sub>-induzido em modelos de tumor de ouvido e tumor de ovários em ratos (Sonavane *et al*, 2008). Tsai *et al* (2007) avaliaram a entrega intra articular de nanopartículas de ouro em artrite induzida em ratos, e observaram que o nanouro inibiu a proliferação e migração celular na artrite induzida, bem como os escores histológicos, densidade de microcapilares, infiltração de macrófagos e níveis de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Outro estudo avaliou os efeitos antiinflamatórios de nanopartículas de ouro com 20-45 nm de diâmetro em lesões cerebrais focais, mostrando que o tratamento reduziu de forma significativa os níveis cerebrais de TNF $\alpha$ , dano oxidativo no DNA e de marcadores pró apoptose (Tsai *et al*, 2007). Outro estudo avaliou as propriedades antiangiogênicas das GNPs em um modelo animal de tumor de ovário, e constatou que o nanouro inibiu seletivamente o VEGF<sub>165</sub>-induzido e a proliferação induzida de  $\beta$ -FGF (fator de crescimento fibroblástico básico) de células endoteliais vasculares umbilicais humanas (HUVEC) e fibroblastos, respectivamente (Pedersen *et al*, 2009).

## 2 JUSTIFICATIVA E PROBLEMA

As lesões tendinosas estão entre as lesões musculoesqueléticas de maior grau de dificuldade de tratamento. As modalidades terapêuticas comumente utilizadas para modular a inflamação tem tido limitado sucesso nas condições dolorosas surgidas pelo *overuse* do tendão. Mais recentemente, a terminologia tendinopatia tem sido utilizada para descrever a variedade de condições dolorosas em resposta ao "*overuse*" (Bratt *et al*, 2008). Recentes estudos demonstraram as muitas mudanças que ocorrem em respostas ao uso repetitivo e ao trauma, resultando em um desequilíbrio entre proteção/regeneração, incluindo inflamação, produção de uma matriz metaloproteinase, apoptose de células tendíneas, metaplasia condróide do tendão, e expressão de fatores de crescimento (Archambault *et al*, 2007; Lian *et al*, 2007; Jones *et al*, 2008). O TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  são duas importantes citocinas pró inflamatórias envolvidas na patogênese da fase inflamatória da lesão tendínea (Tsai *et al*, 2007). TNF- $\alpha$  encontra-se expresso em tendinócitos em condições inflamatórias e há excessiva proliferação de tendinócitos em uma inflamação tendínea (Hosaka *et al*, 2005).

Nos recentes anos surgiram os nanomateriais, estes com uma de suas dimensões compreendida na faixa de 1 a 100nm. Estes têm fornecido uma nova plataforma para transporte a alvos específicos de agentes terapêuticos (Bhattacharya R; Mukherjee P, 2008). GNPs emergem como um candidato atraente para transporte de várias proteínas (Ghosh *et al*, 2008). As GNPs fornecem atributos positivos para uma medicação livre por fornecer solubilidade, estabilidade *in vivo* e biodistribuição. Também podem alterar de

forma favorável a farmacocinética e servirem como reservatório de fármacos para liberação controlada.

Dentre os diversos recursos terapêuticos propostos para a tendinopatia, dispomos de recursos físicos, químicos e a associação entre os dois. Os recursos fisioterapêuticos estudados para a abordagem terapêutica da lesão tendínea são amplos, tendo como base da reabilitação a cinesioterapia. Já dentre os recursos eletroterapêuticos, dispomos da fonoforese e a iontoforese. Estes objetivam a introdução transcutânea de um fármaco diretamente no local da lesão, seja através de uma onda mecânica ou através da corrente elétrica contínua.

Existem diversos estudos abordando o uso das GNP como agente transportador de fármacos (Tsai *et al*, 2007; Chwalibog *et al*, 2010). Contudo, nenhum estudo foi encontrado utilizando GNP pura ou associada a fármaco (p.e DFDA) com transporte transdermal através de fonoforese e iontoforese. Não encontramos na literatura estudos integrando fármacos a GNPs e sua administração transdermal através da fonoforese e iontoforese em lesões musculoesqueléticas.

Nosso grupo de pesquisa vem estudando a associação das GNP aos recursos físicos usados rotineiramente na fisioterapia. Estudo realizado avaliando o efeito do dimetilsulfóxido administrado através da fonoforese avaliou os parâmetros de estresse oxidativo num modelo animal de lesão muscular. Os resultados mostraram uma diminuição do dano oxidativo no grupo tratado associando dimetilsulfóxido e UST (Silveira *et al*, 2009) Os resultados parciais apresentados aqui fazem parte de um projeto maior que contempla um amplo estudo do desenvolvimento de uma lesão tendinopática e

o uso das GNP como agente terapéutico e carreador de fármacos administrados por recursos físicos, as amostras aqui relatadas já contemplam uma série de avaliações moleculares, bioquímicas e histológicas futuras que ainda serão realizadas.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo avaliar os mecanismos envolvidos no efeito terapêutico agudo da administração de nanopartículas de ouro através da fonoforese e da iontoforese em tendinopatia induzida em ratos.

#### 3.1 Objetivos Específicos

1. Dosificar os níveis da citocina pró-inflamatória IL-1 $\alpha$  após tratamento de lesão tendínea em ratos através da fonoforese administrando nanopartículas de ouro.
2. Dosificar os níveis da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  após tratamento de lesão tendínea em ratos através da fonoforese administrando nanopartículas de ouro.
3. Dosificar os níveis da citocina pró-inflamatória IL-1 $\alpha$  após tratamento de lesão tendínea em ratos através da iontoforese administrando nanopartículas de ouro.
4. Dosificar os níveis da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  após tratamento de lesão tendínea em ratos através da iontoforese administrando nanopartículas de ouro.

PARTE II – RESULTADOS

## 4. ARTIGO I

Gold nanoparticles and diclofenac diethylammonium administered by iontophoresis reduce inflammatory cytokines expression in achilles tendinitis

Marcelo B Dohnert<sup>ab</sup>, Mirelli Venâncio<sup>a</sup>, Jonathann C Possato<sup>a</sup>, Rodrigo C Zeferino<sup>a</sup>, Luciana H Dohnert<sup>b</sup>, Thais F. Luciano<sup>a</sup>, Alexandra I Zugno<sup>a</sup>, Cláudio T de Souza<sup>a</sup>, Marcos M S Paula<sup>a</sup>

*Artigo aceito para publicação no periódico International Journal of Nanomedicine*

[http://www.dovepress.com/print\\_invoice.php?invoice\\_id=4359](http://www.dovepress.com/print_invoice.php?invoice_id=4359)

**Dovepress**  
open access to scientific and medical research

#### Invoice

Dove Medical Press Ltd  
Beechfield House  
Winterton Way  
Macclesfield SK11 0JL  
UK

VAT: GB 834 5642 20  
COMPANY REGISTRATION: 496 76 56  
Web site: [www.dovepress.com](http://www.dovepress.com)  
Email: [jeanette@dovepress.com](mailto:jeanette@dovepress.com)

Invoice ID: 4359  
Submission ID: 25164  
Date Invoiced: 20th September 2011  
Currency: EUR  
User: Professor Dohnert  
Organisation: Universidade Luterana do Brasil  
Department: Department of Physiotherapy  
Country: Brazil

#### Billing Address

Av. Universitária  
1105 - Bairro Universitário  
C.P. 3167 - CEP: 88806-000  
Criciúma - SC  
Brazil

#### Details

Product	Description	Unit Price	Qty	Currency	Amount
PPF	Publication Processing Fee - Approved Publisher discount included Journal: International Journal of Nanomedicine Paper Title: Gold Nanoparticles And Diclophenac Diethylammonium Administered By Iontophoresis Reduce Inflammatory Cytokines Expression In Ac	795.00	1	EUR	795.00
	Total			EUR	795.00
	(VAT)			EUR	0.00
	Total Due			EUR	795.00

**PAID**

#### Payment

Dove Medical Press accept payment via VISA\*, MasterCard\* and bank transfer\*\*.

\*Credit Card payments: All payments are converted to British Pounds at the exchange rate in effect on the day of processing. Accordingly your credit card charges may vary slightly from the price shown above.

\*\*Bank transfer payments: If you are paying by bank transfer you must quote the invoice ID number (4359) of your submission in the bank transfer documentation. Failure to quote your invoice ID number will mean that we are unable to match your payment to your submission and publication of your paper may be seriously delayed.

\*\*\*Bank transfer costs: If paying by bank transfer you must ensure that the full amount of the invoice is transferred to Dove Medical Press. Any bank fees should be at the senders expense as under-payment of your invoice will result in delays to your paper being published.

#### Bank transfer details:

Dove Medical Press Ltd  
Bank of Scotland  
33 Old Broad Street, London, EC2N 1HZ, United Kingdom

Account name: Dove Medical Press Ltd NO2 A/C  
Account No. 06024718 Sort Code: 12-17-40  
VAT No. GB 834 5642 20  
IBAN: GB08 BOFS 1217 4006 0247 18  
SWIFT BIC: BOFSGB21274

All prices, specifications and details are subject to change without prior notification.

For any invoice enquiries please email [Jeanette@dovepress.com](mailto:Jeanette@dovepress.com)















## 5. ARTIGO II

Inflammatory signaling in achilles tendinopathy after phonophoresis treatment combined with gold nanoparticles and diclophenac diethylammonium in rats

Marcelo B. Dohnert, PT, MS<sup>1, 3</sup> Mirelli Venâncio, PT<sup>2, 3</sup> Jonathann C. Possato<sup>3</sup>  
Rodrigo C. Zeferino, MS<sup>3</sup> Luciana H. Dohnert<sup>4</sup> Alexandra Ioppi Zugno, Dr<sup>3</sup> Ph  
Cláudio Teodoro de Souza, Dr.<sup>3</sup> PhD Marcos M. S. Paula, Dr.<sup>3</sup> PhD

*Artigo submetido ao periodic Ultrasound in Medicine and Biology*































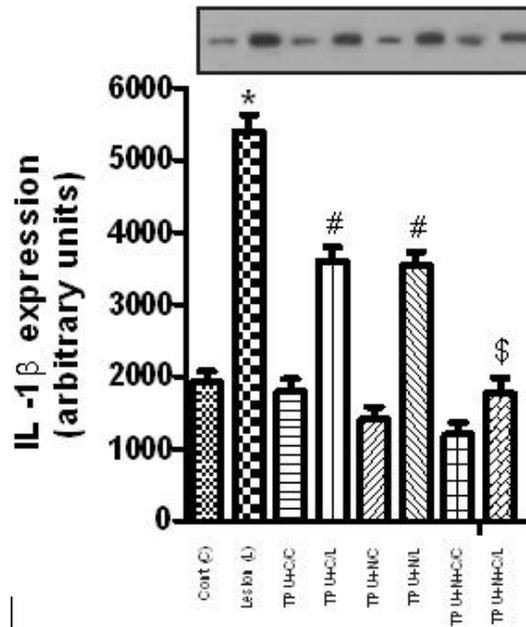


FIGURE 1. Effect of phonophoresis with diclophenac diethylammonium, GNPs gel and association thereof on IL-1 $\beta$  expression after a 5-day treatment period. Data expressed as mean  $\pm$  SD for 15 animals of each treatment group.

\*  $p < 0.05$  in comparison to the control of the group not exposed to injury.

#  $p < 0.05$  in comparison to the group exposed to injury.

\$  $p < 0.05$  in comparison to the groups treated with TPU + diclophenac and TPU + GNPs.

Cont: External control tendon, no treatment; Injury: lesion tendon without treatment; TPU +C/C: ultrasound treatment + diclophenac / internal control tendon; TPU +C/L: ultrasound treatment + diclophenac / internal control tendon / lesion tendon; TPU +N/C: ultrasound treatment + GNPs / control tendon; TPU +N: ultrasound treatment + GNPs / internal control tendon / lesion tendon; TPU + N + C/C: ultrasound treatment + GNPs + diclophenac / internal control tendon; TPU + N + C/L: ultrasound treatment + GNPs + diclophenac / internal control tendon / lesion tendon.

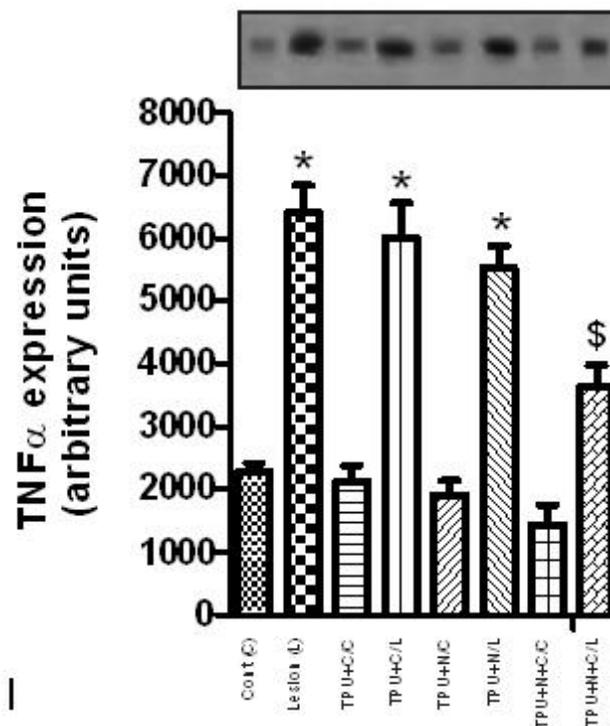


FIGURE 2. Effect of phonophoresis with diclophenac diethylammonium, GNPs gel and association thereof on TNF- $\alpha$  expression after a 5-day treatment period. Data expressed as mean  $\pm$  SD for 15 animals of each treatment group.

\*  $p < 0.05$  in comparison to the control of the group not exposed to injury.

#  $p < 0.05$  in comparison to the group exposed to injury.

\$  $p < 0.05$  in comparison to the groups treated with TPU + diclophenac and TPU + GNPs.

Cont: External control tendon, no treatment; Injury: lesion tendon without treatment;

TPU +C/C: ultrasound treatment + diclophenac / internal control tendon; TPU +C/L:

ultrasound treatment + diclophenac / internal control tendon / lesion tendon; TPU

+N/C: ultrasound treatment + GNPs / control tendon; TPU +N: ultrasound treatment +

GNPs / internal control tendon / lesion tendon; TPU + N + C/C: ultrasound treatment +

GNPs + diclophenac / internal control tendon; TPU + N + C/L: ultrasound treatment +

GNPs + diclophenac / internal control tendon / lesion tendon.

## 6. DISCUSSÃO

A baixa frequência do UST altera a estrutura do *stratum corneum*, melhorando a sua permeabilidade (Merino *et al*, 2003). Alguns estudos demonstraram histologicamente a eficácia da terapêutica ultrassônica no reparo de lesões tendinosas em modelo animal. Cunha, Parizotto e Vidal (2001) avaliaram a eficácia da terapêutica ultrassônica de 1 MHz com uma intensidade de  $0.5 \text{ W/cm}^2$  na forma contínua e pulsada após tenotomia no tendão de Aquiles de ratos, e demonstraram uma melhor organização e alinhamento das bandas colágenas no ultrassom aplicado na forma pulsada. Em nosso estudo, também utilizamos um modelo de ultrassom de 1 MHz na forma pulsada, com intensidade de  $0,5 \text{ W/cm}^2$ .

A fonoforese pode ser administrada para melhorar a penetração de fármacos e outros princípios ativos na dermatologia (Ka-yun & Yang, 2002). Em nosso estudo, realizamos a administração de diclofenaco dietilamônico, GNPs e a associação destes dois através do UST em um modelo induzido de tendinopatia em ratos e avaliamos a expressão das citocinas inflamatórias IL-1 $\alpha$  e TNF- $\alpha$ . Nossos resultados demonstraram uma diminuição da expressão da IL-1 $\alpha$  nos três grupos terapêuticos, quando comparado ao grupo lesão sem tratamento. Porém, foi na associação do fármaco à GNPs que se observou a menor expressão desta citocina, com valores de referência próximos do grupo controle sem lesão. Com relação à expressão do TNF- $\alpha$ , apenas o grupo que associou o diclofenaco dietilamônico a GNPs mostrou uma redução expressiva desta citocina. Não encontramos, na literatura, estudos associando o uso de GNPs na forma gel a outros medicamentos e administrado via transdermal pelo UST. Também não foram encontrados estudos analisando a expressão de

citocinas inflamatórias com este tipo de intervenção. Tsai *et al* (2007) avaliaram a liberação intra articular de nanopartículas de ouro em um modelo de artrite reumatóide induzida em ratos, e observaram que o nanoouro inibiu a proliferação e migração celular na artrite induzida, bem como os escores histológicos, densidade de microcapilares, infiltração de macrófagos e níveis de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Ter Haar (1999) avaliou os efeitos antiinflamatórios de GNPs com 20-45 nm de diâmetro em lesões cerebrais focais, mostrando que o tratamento reduziu de forma significativa os níveis cerebrais de TNF $\alpha$ , dano oxidativo no DNA e de marcadores pró apoptose. Outro estudo avaliou as propriedades antiangiogênicas das GNPs em um modelo animal de tumor de ovário, e constatou que o nanoouro inibiu seletivamente o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF<sub>165</sub>-induzido) e a proliferação induzida de  $\beta$ -FGF (fator de crescimento fibroblástico básico) de células endoteliais vascular umbilical humana (HUVEC) e fibroblastos, respectivamente (Pedersen *et al*, 2009). Hsich (2006) avaliou o efeito da administração de diclofenaco através da corrente ultrassônica em um modelo induzido de artrite em ratos na supressão da NOS. Seus resultados demonstraram que a fonoforese modulou e preveniu a reação inflamatória articular induzida nos ratos. Já Koeke *et al* (2005) realizaram um estudo comparativo avaliando a eficácia da aplicação de hidrocortisona, UST e fonoforese no reparo do tendão de ratos, e seus resultados demonstraram que o grupo tratado com hidrocortisona tópica não apresentou um transporte transdermal eficaz. Já a aplicação do UST de forma isolada promoveu uma resposta das moléculas de colágeno. Porém, a administração da fonoforese com hidrocortisona foi o método de maior eficiência. Pedersen *et al* (2009) avaliaram os efeitos das GNPs nos níveis de

TNF- $\alpha$  em uma lesão cerebral focal, e seus resultados demonstraram uma redução significativa nos níveis cerebrais de TNF- $\alpha$  no grupo tratado com GNPs. Os resultados destes estudos corroboram com os nossos achados, onde as GNPs, além de mostrarem sua capacidade de reduzir a expressão das citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , demonstraram sua capacidade de nanotransporte de fármacos até os sítios inflamatórios ativos, conforme relatado por Gosh et al. (2008). Selvakannan *et al* (2003) relataram a preparação de GNPs estabilizadas por lisina, na forma de um stable powder hidrossolúvel. Isto se deve a interação dos grupos amino e carboxílico com as GNPs. O diclofenaco dietilamonio também apresenta em sua estrutura grupo amino e grupo ácido carboxílico. É razoável supor que as GNPs possam ter se ligado ao fármaco e potencializado sua ação na administração via fonoforese. Acreditamos que novos estudos devam ser realizados para aprofundar e confirmar os achados encontrados neste estudo.

A iontoforese é uma das estratégias que tem grande potencial de facilitar o transporte transdermal de fármacos. Pode ser definida como o movimento facilitado de íons e sais solutos através da membrana devido a uma diferença de potencial aplicado externamente (Singh & Maibach, 1996). A variabilidade deste potencial intra e inter sujeitos é extremamente reduzido na iontoforese, visto que a taxa de entrega de fármaco é proporcional a corrente aplicada (Bellantone *et al*, 1986; Burnette & Marreo, 1986; Burnette & Ongpipattanakul, 1987; Phillips *et al*, 1989). É um sistema de transporte de fármacos não invasivo, com nenhum trauma, sem risco de infecção ou dano em uma ferida ou lesão cutânea e, conseqüentemente, uma excelente alternativa a terapia injetável (Singh & Maibach, 1996). Em nosso estudo, realizamos a

administração de diclofenaco dietilamônico, GNPs e a associação destes dois através da corrente contínua (iontoforese) em um modelo induzido de tendinopatia em ratos e avaliamos a expressão das citocinas inflamatórias IL-1 $\alpha$  e TNF- $\alpha$ . Nossos resultados demonstraram uma diminuição da expressão da IL-1 $\alpha$  nos três grupos terapêuticos, quando comparado ao grupo lesão sem tratamento. Porém, foi na associação do fármaco à GNPs que se observou a menor expressão desta citocina, com valores de referência próximos do grupo controle sem lesão. Com relação à expressão do TNF- $\alpha$ , apenas o grupo que associou o diclofenaco dietilamônico a GNPs mostrou uma redução expressiva desta citocina. Não encontramos, na literatura, estudos associando o uso de GNPs na forma gel a outros medicamentos e administrado via transdermal pela iontoforese. Também não foram encontrados estudos analisando a expressão de citocinas inflamatórias com este tipo de intervenção. Baseado no princípio geral da eletricidade, isto é, íons de mesma carga se repelem e de cargas opostas se atraem, então para transportar um fármaco de carga negativa através da membrana, este deve ser colocado no eletrodo negativo para que seja repellido e então atraído pelo eletrodo de carga oposta colocado no outro lado da lesão, e vice versa (Singh & Maibach, 1996) Chwalibog et al (2010) avaliaram as características morfológicas de nanopartículas de ouro, prata, platina e diamante na interação com bactéria e fungo. Foi verificado um potencial zeta negativo nas nanopartículas de platina (-9,6 mV), prata (-9,2 mV) e ouro (- 1,9 mV), o que fez com que estas nanopartículas fossem prejudiciais a estas bactérias e fungos. Em nosso estudo, os eletrodos foram posicionados de forma que o eletrodo positivo foi posicionado junto à inserção do tendão aquileu ao calcâneo, e o eletrodo negativo no músculo gastrocnêmio. O

nanogel e o composto associando nanogel + diclofenaco dietilamônico foram colocados em ambos os eletrodos como meio de condução. Por apresentar este potencial zeta negativo, o fluxo destas nanopartículas de ouro fluiu do gastrocnêmio (pólo negativo) em direção ao tendão aquileu (pólo positivo).

Vários estudos corroboram com os nossos achados mostrando níveis apreciáveis de outros fármacos em camadas mais profundas de tecido acompanhando sua aplicação iontoforética transdermal. Glass *et al* (1980) demonstraram a penetração de dexametasona em tecidos abaixo de sítios aplicados de macacos. Outros estudos relataram a profundidade de penetração de lidocaína aplicada via fonoforese no tecido subcutâneo em humanos. Estes verificaram uma penetração de aproximadamente 1,25 cm abaixo da aplicação (Russo *et al*, 1980; Chien *et al*, 1989). Kigasawa *et al* (2011) utilizaram a iontoforese para realizar o transporte transdermal do CpG-oligodeoxinucleotídeo na imunoterapia do câncer melanoma, observando a indução de uma potente atividade antitumorígena desta substância através da iontoforese, que se mostrou ser uma abordagem simples, não invasiva e eficiente na imunoterapia do câncer.

Sonanave *et al* (2008) avaliaram a influência do tamanho da partícula de ouro na penetração através da pele do rato. Foi utilizado nanopartículas com 15 nm, 102 nm e 198 nm. As GNps mostraram um potencial zeta negativo, quanto menor foi o tamanho da partícula, maior foi a taxa de penetração das mesmas. Estes concluíram que as GNPs se mostraram transportadores transdermal interessantes, especialmente com partículas de tamanhos menores. Em nosso estudo, utilizamos GNPs com tamanho aproximado de 30

nm e, possivelmente, a ligação desta nanopartícula ao diclofenaco ofereceu um melhor transporte transdermal deste ao sítio de lesão.

Pedersen *et al* (2009) avaliaram os efeitos das GNPs nos níveis de TNF- $\alpha$  em uma lesão cerebral focal, e seus resultados demonstraram uma redução significativa nos níveis cerebrais de TNF- $\alpha$  no grupo tratado com GNPs. Tsai *et al* (2007) induziram um modelo animal de artrite reumatóide e avaliaram a resposta inflamatória após administração de GNPs intra articular. Neste estudo, os níveis de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  intra articular apresentaram uma redução significativa nos ratos tratados.

Os resultados destes estudos corroboram com os achados em nosso estudo, onde as GNPs, além de mostrarem sua capacidade de reduzir a expressão das citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , demonstraram sua capacidade de nanotransporte de fármacos até os sítios inflamatórios ativos, conforme relatado por Gosh *et al* (2008). Acreditamos que novos estudos devam ser realizados para aprofundar e confirmar os achados encontrados no nosso estudo.

## 7. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Apesar de haverem estudos publicados na literatura abordando o aspecto da citotoxicidade das nanopartículas, bem como sua capacidade de ultrapassar a barreira da pele de acordo com o tamanho da partícula, nosso estudo não avaliou estes aspectos. As partículas de tamanhos menores possuem maior permeabilidade através das barreiras da pele (Sonanave *et al*, 2008)(De Jong *et al*, 2009), porém se tornam mais tóxicas com tamanhos muito pequenos (Cho *et al*, 2009). Outra limitação do estudo é o fato de não termos medido a quantidade de dose do DFDA e da GNP que realmente atingiram o tendão lesado.

## 8. CONCLUSÃO

Nosso estudo é um dos primeiros a administrar GNPs em associação a fármacos e administração destes via transdermal utilizando corrente elétrica contínua ou corrente ultrassônica em um modelo animal de tendinopatia. Os resultados sugerem que GNPs exibiram sua capacidade antiinflamatória e de transporte de fármacos, potencializando a intervenção terapêutica tanto da iontoforese como da fonoforese no controle da citocinas inflamatórias IL-1 $\alpha$  e TNF- $\alpha$  em um modelo animal de tendinopatia.

## 9. PERSPECTIVAS

1. Avaliar a expressão de VEGF na formação de neovasos.
2. Avaliar a expressão de metaloproteinases após administração de nanopartículas de ouro via fonoforese e iontoforese na tendinopatia induzida em ratos.
3. Avaliar os efeitos bioquímicos da fonoforese e iontoforese na produção de espécies reativas de oxigênio após indução de lesão tendínea em ratos Wistar machos.
4. Avaliar a modulação de defesas antioxidantes após a administração de fonoforese e iontoforese em lesão tendínea de ratos Wistar machos.
5. Avaliar os efeitos da fonoforese e iontoforese associada à nanopartículas de ouro sobre a oxidação de lipídeos, proteínas e DNA após indução de lesão tendínea em ratos Wistar.

## 10.REFERÊNCIAS

- AEBI H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*. 105:121-26.1984.
- AGNE JE. *Eu sei Eletroterapia*. Santa Maria: Pallotti, 2009.
- ARCHAMBAULT JM, JELINSKY SA, LAKE SP, HILL AA, GLASER DL, SOSLOWSKY LJ. Rat supraspinatus tendon expresses cartilage markers with overuse. *Journal of Orthopaed Research*. 25:617–624. 2007.
- ARNOCZKY SP, LAVAGNINO M, EGERBACHER M, CABALLERO O, GARDNER K. Matrix metalloproteinase inhibitors prevent a decrease in the mechanical properties of stress-deprived tendons: an in vitro experimental study. *The American Journal of Sports Medicine*. 35:763–769. 2007.
- BANGA, AK. *Electrically-Assisted Transdermal and Topical Drug Delivery*. London: Taylor & Francis; 1998.
- BANNISTER JV, CALABRESE L. Assays for SOD. *Methods of Biochemical Analysis*.32: 279-312. 1987.
- BEÇAK W, PAULET J. *Técnicas de Citologia e Histologia*. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1976: 574.
- BECKER BM, HELFRICH S. Ultrasound with topical anesthetic rapidly decreases pain of intravenous cannulation. *Academic Emergency Medicine*. 12: 276-293, 2005.
- BELLANTONE, NH RIM, S. FRANCOEUR, ML, RASADI, B. Enhanced percutaneous absorption via iontophoresis I. Evaluation of an in vitro system and transport of model compounds. In: *Journal of Pharmaceutical Sciences*.30:63-72. 1986

- BENJAMIN, M, KUMAI, T, MILZ, S, BOSZCZYK, BM, BOSZCZYK, AA, RALPHS, JR. The skeletal attachment of tendons—tendon “entheses”. *Comparative Biochemistry and Physiology A—Molecular and Integrative Physiology*.133, 931–945. 2002
- BENJAMIN, M, RALPHS, JR. Tendons in health and disease. *Manual Therapy*.1, 186–191. 1996.
- BERENSON, MC, BLEVINS, FT, PLAAS, AH, VOGEL, KG. Proteoglycans of human rotator cuff tendons. *Journal of Orthopaed Research*.14, 518–525. 1996.
- BHATTACHARYA R; MUKHERJEE P. Biological properties of "naked" metal nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 60: 1289–1306. 2008.
- BIRK, DE, FITCH, JM, BABIARZ, JP, DOANE, KJ, LINSENMAYER, TF. Collagen fibrillogenesis in vitro: interaction of types I and V collagen regulates fibril diameter. *Journal of Cell Sciences*. 95 (Part 4), 649–657. 1990.
- BRATT M, ANDRES MD, GEORGE AC, MURREL MD. Treatment pf Tendinopathy. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 466(7): 1542-54. 2008.
- BRONAUGH RL, MAIBACH HI. *In Vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals, and Applications*. Ann Arbor, Michigan: CRC Press.:280. 1991.
- BROWNE RW, ARMSTRONG D. Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Methods in Molecular and Cellular Biology*. 108:347-52. 1998.

- BURNETTE RR, MARREO D. Comparison between the iontophoretic and passive transport of thyrotropin releasing hormone across excised nude mouse skin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*.75:738-743. 1986.
- BURNETTE RR, ONGPIPATTANAKUL B. Characterization of the permselective properties of excised human skin during iontophoresis. *Journal of Pharmaceutical Sciences*.76: 765-773. 1987.
- BUTLER, DL, GROOD, ES, NOYES, FR, ZERNICKE, RF. Biomechanics of ligaments and tendons. *Exercise and Sport Science Reviews*. 6: 125–181. 1978.
- BYL NN. The Use of Ultrasound as an Enhancer for Transcutaneous Drug Delivery: Phonophoresis. *Physical Therapy*.75 (6):539-53. 1995.
- CAGNIE B, VINCK E, RIMBAUNT S, VANDERSTRAETEN G. Phonophoresis versus topical application of ketoprofen: comparison between tissue and plasma levels. *Physical Therapy*.83:701–712. 2003
- CASSINA AM, HODARA R, SOUZA JM, THOMSON L, CASTRO L, ISCHIROPOULOS H, FREEMAN BA, RADI R. Cytochrome c nitration by peroxynitrite. *The Journal of Biological Chemistry*.275: 21409-415. 2000.
- CHAKRAVARTI S. Functions of lumican and fibromodulin: lessons from knockout mice. *Glycoconjugate Journal*.19:287–293. 2002.
- CHWALIBOG A, SAWOSZ E, HOTOWY A, SZELIGA J, MITURA S, MITURA K, GRODZIK M, ORLOWSKI P. Visualization of interaction between inorganic nanoparticles and bacteria or fungi. *International Journal of Nanomedicine*.5: 1085-1093. 2010.

CHIEN YW. Advances in transdermal systemic medications. In: Chien YW, ed. Transdermal Controlled Systemic Medications: Volume 31. New York, NY: Marcel Dekker Inc; 1987: chap 12(1-24).

CHIEN YW. Developmental concepts and practice in transdermal therapeutic systems. In: Chien YW, ed. Transdermal Controlled Systemic Medications: Volume 31. New York, NY: Marcel Dekker Inc: 1987: chap 2 (25-82).

CHIEN YW, SIDDIQUIM O, SHI WM, LELAWONGS P, LIU JC. Direct current iontophoretic transdermal delivery of peptide and protein drugs. Journal of Pharmaceutical Sciences.78: 377-383. 1989.

CHO WS, CHO M, JEONG J, CHOI M, CHO HY, HAN BS, KIN SH, KIM HO, LIM YT, CHUNG BH, JEON J. Acute toxicity and pharmacokinetics of 13 nm-sized PEG-coated gold nanoparticles. Toxicology and Applied Pharmacology. 236: 16-24. 2009.

CUNHA A, PARIZOTTO NA, VIDAL BC. The effect of therapeutic ultrasound on repair of the Achilles tendon of the rat. Ultrasound in Medicine and Biology.27 (12): 1691–1696. 2001.

CURRIER DP, GREATHOUSE D, SWIFT T. Sensory nerve conduction: effect of ultrasound. Archives of Physical Medicine and Rehabilitation.59:181–185. 1978.

DANIEL MC; ASTRUC D. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. Chemical Reviews. 104: 293–346. 2004.

- DANIELSON KG, BARIBAULT H, HOLMES DF, GRAHAM H, KADLER KE, IOZZO RV. Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. *The Journal of Cell Biology*.136:729–743. 1997.
- DANIELSON P, ALFREDSON H, FORSGREN S. In situ hybridization studies confirming recent findings of the existence of a local nonneuronal catecholamine production in human patellar tendinosis. *Microscopy Research and Technique*. 70:908–911. 2007.
- DANIELSON P, ALFREDSON H, FORSGREN S. Studies on the importance of sympathetic innervation, adrenergic receptors, and a possible local catecholamine production in the development of patellar tendinopathy (tendinosis) in man. *Microscopy Research and Technique*. 70:310–324. 2007.
- DE JONG WH, HAGENS WI, KRYSTEC P, BURGER MC, SIPS AJAM, GEERTSMAN RE. Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Biomaterials*. 29: 1912-1919. 2008.
- DRAPER HH, HADLEY M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*. 186: 421-31. 1990.
- DUANCE, VC, RESTALL, DJ, BERAD, H, BOURNE, FJ, BAILEY, AJ. The location of three collagen types in skeletal muscle. *FEBS Letters*. 79, 248–252. 1977.
- DYSON M, POND JB, JOSEFH J, WARWICK R. The stimulation of tissue regeneration by means of ultrasound. *Clinical Sciences*. 35:273–285. 1968.

- ELEFTERIOU F, EXPOSITO JY, GARRONE R, LETHIAS C. Binding of tenascin-X to decorin. *FEBS Letters*. 495: 44–47. 2001.
- EVANS, JH, BARBENEL, JC. Structural and mechanical properties of tendon related to function. *Equine Veterinary Journal*; 7: 1–8. 1975.
- FAN, L, SARKAR, K, FRANKS, DJ, UHTHOFF, HK. Estimation of total collagen and types I and III collagen in canine rotator cuff tendons. *Calcified Tissue Int*. 61: 223–229. 1997.
- GARRETT JR, WE. Muscle strain injuries: clinical and basic aspects. *Medicine & Sciences in Sports & Exercises*. 22: 436–443. 1990.
- GHOSH P, HAN G, DE M, KIM CK, ROTELLO VM. Gold nanoparticles in delivery applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 60:1307–1315. 2008.
- GLASS JM, STEPHEN RL, JACOBSEN SC. The quantity and distribution of radiolabeled dexamethasone delivered to tissue by iontophoresis. *International Journal of Dermatology*. 19: 519-525. 1980.
- GNAIGNER E, RENNER K. High-resolution respirometry with cultured cells: A demonstration experiment. In: Gnaiger E (Ed), *Mitochondrial Pathways and Respiratory Control*. 62-73. 2007.
- GORKTURK E, TURGUT A, BAYCU CI. Oxygen free radicals impair fracture healing in rats. *Acta Orthopaedica Scandinavica*. 66:473–5. 1995
- GHOSH P, HAN G, DE M, KIM CK, ROTELLO VM. Gold nanoparticles in delivery applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 60:1307–1315. 2008.
- GUFFEY JS, KNAUST ML. The use and efficacy of ultrasound. *Rehab Management*. 10:44, 48–50, 115. 1997.

- GUPTA RK, ET AL. Methoxychlor Inhibits Growth and Induces Atresia of Antral Follicles through an Oxidative Stress Pathway. *Toxicological Sciences*. 93: 382–89. 2006.
- HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford, New York:Oxford Science Publications, Oxford University Press, 1999.
- HANSEN-SCHWARTZ J, NORDSTROM CH, EDVINSSON L. Human endothelin subtype A receptor enhancement during tissue culture via de novo transcription. *Neurosurgery*. 50: 127–33. 2002.
- HOSAKA Y, KIRISAWA R, UEDA H, YAMAGUCHI M, TAKEHANA K. Differences in Tumor Necrosis Factor (TNF) $\alpha$  and TNF Receptor-1-Mediated Intracellular Signaling Factors in Normal, Inflamed and Scar-Formed Horse. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 67(10): 985-991. 2005.
- HSICH YL. Effects of Ultrasound and Diclofenac Phonophoresis on Inflammatory Pain Relief: Suppression of Inducible Nitric Oxide Synthase In Arthritic Rats. *Physical Therapy*. 86 (1):39-49. 2006.
- JARVINEN, M, KANNUS, P, JOHNSON, RJ. How to treat knee ligament injuries? *Ann Chir Gynaecol Fe*. 80: 134–140. 1991.
- JONES GC, CORPS AN, PENNINGTON CJ, CLARK IM, EDWARDS DR, BRADLEY MM, HAZLEMAN BL, RILEY GP. Expression profiling of metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in normal and degenerate human achilles tendon. *Arthritis & Rheumatism*. 54:832–842. 2006.

- JOZSA L, LEHTO M, KANNUS P, KVIST M, REFFY A, VIENO T, JARVINEN, M, DEMEL, S, ELEK, E. Fibronectin and laminin in Achilles tendon. *Acta Orthopaedica Scandinavica*. 60: 469–471. 1989a.
- KALIA YN, NAIK A, GARRISON J, GUY RH. Iontophoretic drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 56:619–658. 2004.
- KA-YUN NG, YANG L. Therapeutic ultrasound: its application in drug delivery. *Medical Care Research & Review*. 22: 204-208. 2002.
- KASTELIC J, GALESKI A, BAER E. The multicomposite structure of tendon. *Connective Tissue Research*. 6: 11–23. 1978.
- KHAN KM, COOK JL, BONAR F, HARCOURT P, ASTROM M. Histopathology of common tendinopathies. Update and implications for clinical management. *Sports Medicine*. 27:393-408.1999.
- KIGASAWA K, KAJIMOTO K, NAKAMURA T, HAMA S, KANAMURA K. Noninvasive and efficient transdermal delivery of CpG-oligodeoxynucleotide for cancer immunotherapy. *Journal of Controlled Release*. 1010-1016. 2011.
- KIM TY, JUNG DI, KIM YI, YANG JH SHIN SC. Anesthetic Effects of Lidocaine Hydrochloride Gel using Low Frequency Ultrasound of 0.5 MHz. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 10(1):1-8. 2007.
- KITCHEN SS, PATRIDGE CJ. A review of therapeutic ultrasound Part 1: background and physiological effects. *Physiotherapy*. 76:593–599. 1990.
- KLEINER DE, STETLER-STEVENSON W. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Analytical Biochemistry*. 218: 325 – 29. 1994

- KOEKE PU, PARIZOTTO NA, CARRINHO PM, SALATE CB. Comparative study of the efficacy of the topical application of hydrocortisone, therapeutic ultrasound and phonophoresis on the tissue repair process in rat tendons. *Ultrasound in Medicine and Biology*. 31 (3):345–350. 2005.
- LEVINE RL, GARLAND D, OLIVER CN, ET AL. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*. 186: 464-78. 1990.
- LIAN O, DAHL J, ACKERMANN PW, FRIHAGEN F, ENGEBRETSEN L, BAHR R. Pronociceptive and antinociceptive neuromediators in patellar tendinopathy. *The American Journal of Sports Medicine*. 34:1801–1808. 2006.
- LIAN O, SCOTT A, ENGEBRETSEN L, BAHR R, DURONIO V, KHAN K. Excessive apoptosis in patellar tendinopathy in athletes. *The American Journal of Sports Medicine*. 35:605–611. 2007.
- LONGO UG, FRANCESCHI F, RUZZINI L, RABITTI C, MORINI S, MAFFULLI N, FORRIOL F, DENARO V. Light microscopic histology of supraspinatus tendon ruptures. *Knee Surgery Sports Traumatology Arthroscopy*. 15:1390–1394. 2007.
- MAFFULLI N, EWEN SW, WATERSTON SW, REAPER J, BARRASS V. Tenocytes from ruptured and tendinopathic achilles tendons produce greater quantities of type III collagen than tenocytes from normal achilles tendons. An in vitro model of human tendon healing. *The American Journal of Sports Medicine*. 28:499–505. 2000.

- MATHESON S, LARJAVA H, HAKKINEN L. Distinctive localization and function for lumican, fibromodulin and decorin to regulate collagen fibril organization in periodontal tissues. *Journal of Periodontal Research*. 40:312–324. 2005.
- MCCORD JM, FRIDOVICH I. Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte hemoglobin (hemocyanin). *The Journal of Biological Chemistry*, 244:6049–55. 1969.
- MCGONAGLE, D, MARZO-ORTEGA, H, BENJAMIN, M, EMERY, P, Report on the Second international Enthesitis Workshop. *Arthritis & Rheumatism*. 48, 896–905. 2003.
- MERINO G, KALIA YN, GUY RH Ultrasound-enhanced transdermal transport. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 92:1125-1137. 2003.
- MICHNA, H. A peculiar myofibrillar pattern in the murine muscle-tendon junction. *Cell and Tissue Research*. 233, 227–231. 1983.
- MUKHERJEE P, BHATTACHARYA R, WANG P, WANG L, BASU S, NAGY JA, ATALA A, MUKHOPADHYAY D, SOKER S. Antiangiogenic Properties of Gold Nanoparticles. *Clinical Cancer Research*. 11(9): 3530-34. 2005.
- OCHIAI N, MATSUI T, MIYAJI N, MERKLIN R.J, HUNTER, JM, Vascular anatomy of flexor tendons. I. Vincular system and blood supply of the profundus tendon in the digital sheath. *The Journal of Hand Surgery-Am*. 4: 321–330. 1979.
- PEDERSEN MO, LARSEN A, PEDERSEN DS, STOLTENBERG M, PENKOWA M. Metallic gold reduces TNF $\alpha$  expression, oxidative DNA damage and pro-apoptotic signals after experimental brain injury. *Brain Research*. 1271: 103-13. 2009.

- PERRY SM, MCILHENNY SE, HOFFMAN MC, SOSLOWSKY LJ. Inflammatory and angiogenic mRNA levels are altered in a supraspinatus tendon overuse animal model. *Journal of Shoulder and Elbow Surgery*. 14:79S–83S. 2005.
- PHIPPS JB, PADMANABHAN RV, LATTIN GA. Iontophoretic delivery of model inorganic and drug ions. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 78:365-369. 1989.
- PIKAL MJ. The role of electroosmotic flow in transdermal iontophoresis. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 46:281–305. 2001.
- PINS, GD, CHRISTIANSEN, DL, PATEL, R, SILVER, FH. Selfassembly of collagen fibers. Influence of fibrillar alignment and decorin on mechanical properties. *Biophysical Journal*. 73: 2164–2172. 1997.
- PUFE T, PETERSEN W, TILLMANN B, MENTLEIN R. The angiogenic peptide vascular endothelial growth factor is expressed in foetal and ruptured tendons. *Virchows Arch*. 439:579–585. 2001.
- PUFE T, PETERSEN WJ, MENTLEIN R, TILLMANN BN. The role of vasculature and angiogenesis for the pathogenesis of degenerative tendons disease. *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports*. 15:211–222. 2005.
- RAMIREZ A, SCHWANE JA, McFARLAND C, STARCHER B. The effects of ultrasound on collagen synthesis and fibroblast proliferation *in vitro*. *Medicine & Science in Sports & Exercises*. 29(3):326–332. 1987.
- REYNOLDS ES. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy. *The Journal of Cell Biology*. 17: 208-12. 1963.

- RILEY, GP, HARRAL, RL, CONSTANT, CR, CHARD, MD, CAWSTON, TE, HAZLEMAN, BL. Tendon degeneration and chronic shoulder pain: changes in the collagen composition of the human rotator cuff tendons in rotator cuff tendinitis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 53, 359–366. 1994b.
- RILEY, GP, HARRALL, RL, CONSTANT, CR, CHARD, MD, CAWSTON, TE, HAZLEMAN, BL. Glycosaminoglycans of human rotator cuff tendons: changes with age and in chronic rotator cuff tendinitis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 53, 367–376. 1994a.
- RIZZI CF; MAURIZ JL; CORRÊA DSF. Effects of Low-Level Laser Therapy (LLLT) on the Nuclear Factor (NF)- $\kappa$ B Signaling Pathway in Traumatized Muscle. *Laser in Surgery and Medicine*. 38:704–713. 2006.
- ROTA C, CHIGNELL CF, MASON RP. Evidence for free radical formation during the oxidation of 2'-7' dichlorofluorescein to the fluorescent dye 2'-7'-dichlorofluorescein by horseradish peroxidase: possible implications for oxidative stress measurements. *Free Radical Biology and Medicine*. 27: 873-81. 1999.
- RUSSO J, LIPMAN AG, COMSTOCK TJ, PAGE BC, STEPHEN RL. Lidocaine anesthesia: comparison of iontophoresis, injection and swabbing. *American Journal of Health-System Pharmacy*. 37: 843-847. 1980.
- SALIBA S, MISTRY DJ, PERRIN DH, GIECK J, WELTMAN A. Phonophoresis and the Absorption of Dexamethasone in the Presence of an Occlusive Dressing. *Journal of Athletic Training*. 42(3):349–354. 2007.

- SCHATZKER J, BRANEMARK PI. Intravital observations on the microvascular anatomy and microcirculation of the tendon. *Acta Orthopaedica Scandinavica*. 126: 1–23. 1969.
- SCHMITTGEN TD. Real-time quantitative PCR. *Methods*. 2001; 25: 383–5.
- SCHUBERT TE, WEIDLER C, LERCH K, HOFSTADTER F, STRAUB RH. Achilles tendinosis is associated with sprouting of substance P positive nerve fibres. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 64:1083–1086. 2005.
- SCOTT A, BAHR R, DUROMIO V. VEGF Expression in Patellar Tendinopathy. A preliminary study. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 466:1598–1604. 2008.
- SCOTT A, COOK JL, HART DA, WALKER DC, DURONIO V, KHAN KM. Tenocyte responses to mechanical loading in vivo: a role for local insulin-like growth factor 1 signaling in early tendinosis in rats. *Arthritis & Rheumatism*. 56:871–881. 2007.
- SCOTT A, KHAN KM, DURONIO V. IGF-I activates PKB and prevents anoxic apoptosis in Achilles tendon cells. *Journal of Orthopaedic Research*. 23:1219–1225. 2005.
- SELVAKANNAN PR, SAIKAT M, SUMANT P, RENU P, MURALI S. Capping of Gold Nanoparticles by the AminoAcid Lysine Renders Them Water-Dispersible. *Langmuir*. 19: 3545-3549. 2003.
- SERRANO-MOLLAR A, CLOSA D, CORTIJO J, MORCILLO EJ, PRATS N, GIRONELLA M, PANÉS J, ROSELLÓ-CATAFAU J, BULBENAB O. P-selectin upregulation in bleomycin induced lung injury in rats: effect of N-acetylcysteine. *Thorax*. 57: 629–34. 2002.

- SILVEIRA PCL, VICTOR EG, SCHEFFER D, SILVA LA, STRECK EL, PAULA MM, PINHO RA. Effects of Therapeutic Pulsed Ultrasound and Dimethylsulfoxide (DmsO) Phonophoresis on Parameters of Oxidative Stress in Traumatized Muscle, *Ultrasound in Medicine and Biology*. 36(1): 44–50, 2010.
- SINGH P, MAIBACH HI. Iontophoresis: an alternative to the use of carriers in cutaneous drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 18:379–394. 1996.
- SONAVANE G, TOMODA K, SANO A, OHSHIMA H, TERADA H, MAKINO K. *In vitro* permeation of gold nanoparticle through rat skin and rat intestine: Effect of particle size. *Colloids and Surfaces B*. 65:1-10. 2008.
- SOSLOWSKY LJ, THOMOPOULOS S, TUN S, FLANAGAN CL, KEEFER CC, MASTAW J, CARPENTER JE. Neer Award 1999. Overuse activity injures the supraspinatus tendon in an animal model: a histologic and biomechanical study. *Journal of Shoulder and Elbow Surgery*. 9:79–84. 2000.
- TAKAHASHI N, OHTORI S, SAISU T, MORIYA H, WADA Y. Second application of low-energy shock waves has a cumulative effect on free nerve endings. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 443:315–319. 2006.
- TER HAAR G. Therapeutic ultrasound. *European Journal of Ultrasound*. 9:3–9. 1999.
- THOMOPOULOS, S, WILLIAMS, GR, GIMBEL, JA, FAVATA, M, SOSLOWSKY, LJ. Variation of biomechanical, structural, and

- compositional properties along the tendon to bone insertion site. *Journal of Orthopaed Research*. 21, 413–419. 2003.
- TIDBALL, JG. Myotendinous junction injury in relation to junction structure and molecular composition. *Exercise and Sport Sciences Reviews*. 19, 419–445. 1991.
- TOYOKUNI S, MIYAKE N, HIAI H, HAGIWARA M, KAWAKISHI S, OSAWA T, UCHIDA K. The monoclonal antibody specific for the 4-hydroxy-2-nonenal histidine adduct. *FEBS Letters*. 359: 189-91. 1995.
- TSAI CY, SHIAU AL, CHEN SY, CHEN YH, CHENG PC, CHANG MY, CHEN DH, CHOU CH, WANG CR, WU CL. Amelioration of Collagen-Induced Arthritis in Rats by Nanogold. *Arthritis & Rheumatism*. 56(2): 544–54. 2007.
- VIKMAN P, ET AL. Cerebral ischemia induces transcription of inflammatory and extracellular-matrix-related genes in rat cerebral arteries. *Experimental Brain Research*. 183: 499–510. 2007.
- VOGEL, KG, HEINEGARD, D. Characterization of proteoglycans from adult bovine tendon. *The Journal of Biological Chemistry*. 260, 9298–9306. 1985.
- WANG JHC. Mechanobiology of Tendon. *Journal of Biomechanics*. 39: 1563-1582. 2006.
- WANG MX, WEI A, YUAN J. Antioxidant enzyme peroxiredoxin 5 is upregulated in degenerative human tendon. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 284:667–73. 2001.
- WARDEN SJ. Animal Models for the study of tendinopathy. *British Journal of Sports Medicine*. 41(4):232-40. 2007.

- WENDEL A. Glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology*. 77: 325-32. 1981.
- WILLIAMS, IF, McCULLAGH, KG, SILVER, IA. The distribution of types I and III collagen and fibronectin in the healing equine tendon. *Connective Tissue Research*. 12: 211–227. 1984.
- WOESSNER JF. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this amino acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 93: 440–47. 1961.
- XU Q, ET AL. Hypoxia-induced astrocytes promote the migration of neural progenitor cells via vascular endothelial factor, stem cell factor, stromal-derived factor-1 $\alpha$  and monocyte chemoattractant protein-1 upregulation *in vitro*. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 34: 624–31. 2007.
- YINGHUA X, GEORGE ACM. The Basic Science of Tendinopathy. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 466(7):1528-38. 2008.
- YUAN J, MURRELL GA, TRICKETT A. Involvement of cytochrome c release and caspase-3 activation in the oxidative stress-induced apoptosis in human tendon fibroblasts. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1641:35–41. 2003.
- YUAN J, MURRELL GA, WEI AQ, Wang MX. Apoptosis in rotator cuff tendonopathy. *Journal of Orthopaed Research*. 20:1372–1379. 2002.