



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

WAYDJA LÂNIA VIRGÍNIA DE ARAÚJO MARINHO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO BIOMODULADOR DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE
DE 3J E 6J SOBRE AS PROPRIEDADES BIOMECÂNICAS DO TENDÃO DO
CALCÂNEO DE RATOS DIABÉTICOS**

RECIFE

2017

WAYDJA LÂNIA VIRGÍNIA DE ARAÚJO MARINHO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO BIOMODULADOR DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE
DE 3J E 6J SOBRE AS PROPRIEDADES BIOMECÂNICAS DO TENDÃO DO
CALCÂNEO DE RATOS DIABÉTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do Grau de Mestre em Fisioterapia.

Linha de Pesquisa: Desempenho físico-funcional e qualidade de vida.

Orientadora: Profa Dr^a Silvia Regina Arruda de Moraes.

RECIFE

2017

Catálogo na fonte:
Bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4-1895

M337a Marinho, Waydja Lânia Virgínia de Araújo.
Avaliação do efeito biomodulador do laser de baixa intensidade de 3J e 6J sobre as propriedades biomecânicas do tendão do calcâneo de ratos diabéticos / Waydja Lânia Virgínia de Araújo Marinho. – Recife: o autor, 2017.
78 f.: il.; 30 cm.

Orientadora: Sílvia Regina Arruda de Moraes.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Laserterapia. 2. Tendinoterapia. 3. Biomecânica. 4. Diabetes mellitus.
5. Ratos. I. Moraes, Sílvia Regina Arruda de (Orientadora). II. Título.

615.82 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2017 - 303)

"AVALIAÇÃO DO EFEITO BIOMODULADOR DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE DE 3J E 6J SOBRE AS PROPRIEDADES BIOMECÂNICAS DO TENDÃO DO CALCÂNEO DE RATOS DIABÉTICOS"

WAYDJA LÂNIA VIRGÍNIA DE ARAÚJO MARINHO

APROVADA EM: 12/06/2017

ORIENTADORA: PROF.^a DR.^a SILVIA REGINA ARRUDA DE MORAES

COMISSÃO EXAMINADORA:

**PROF.^a DR.^a ANNA MYRNA JAGUARIBE DE LIMA – MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL/
UFRPE**

PROF.^a DR.^a DENISE MARIA MARTINS VANCEA – ESEF/ UPE

PROF. DR. IVSON BEZERRA DA SILVA – ANATOMIA/ CB/ UFPE

Visto e permitida à impressão

Coordenadora do PPGFISIOTERAPIA/DEFISIO/UFPE

“Que as outras pessoas e o medo nunca te vençam. Seja apenas tu a derrotar a ti mesmo, pela graça de teres superado todos os teus limites!”

Augusto Branco

AGRADECIMENTOS

Se você está lendo estas páginas é porque eu consegui. Não foi fácil chegar nesse momento, desde a graduação os sonhos foram construídos e molduras trabalhadas. Houve as barreiras do processo seletivo, passando pela aprovação, acidentes de percursos até a conclusão do Mestrado. Foi um longo caminho percorrido. Nada foi fácil, nem tampouco tranquilo. Finais de ciclos sempre nos impulsionam para o novo. É o processo vital que leva à renovação. E, por essa renovação eu só tenho a agradecer...

Inicialmente agradeço à Deus, que aos trancos e barrancos me proporcionou esse momento, aos meus mantras construídos de que “tudo vai dar certo”, “tudo tem um por quê” e “vai... Se der medo, vai com medo mesmo”. Que a cada dia repetidos geraram forças e confiança para alcançar os objetivos pessoais e acadêmicos traçados.

Agradeço aos meus pais, Arnaldo e Zélia... Que me orientaram o caminho a trilhar, e que muitas vezes sacrificaram o próprio querer para que eu pudesse estar aqui... Que, em muitos casos, esconderam as lágrimas de preocupação e ficaram na torcida pela busca do meu sonho! Não há como reduzir a meras palavras todo o significado daqueles que orientaram meus primeiros passos, que me ensinaram a fazer as escolhas certas e que são pilares ativos da minha existência. A vocês, meu mundo, o meu amor eterno!

Aos meus irmãos, Wenyo e Washley, que sempre torceram por mim e eu sei que se espelharam em algumas das minhas escolhas positivas, além de me proporcionarem momentos ímpares de felicidade e diversão... Ao meu irmão e minha cunhada Marília, agradeço em especial por “ter me dado” os meus tão amados “três filhos”: João, Nathália e José, amo vocês meus pequenos. Wash, minha boneca de carne, meu mais valioso presente, minha “filha”. Só se espelhe em alguns aspectos da minha vida, e trilhe em busca das suas vitórias. Estarei sempre ao lado de vocês!

Devo dizer também que, inquestionavelmente, benditos sejam os meios tecnológicos que ao menos camuflavam o aperto da ausência destes. A esses que, mesmo longe geograficamente se faziam tão presentes...

Agradeço a toda minha família, em especial a minha avó dona Neguinha, porém sem citar mais nomes, aprecio aqueles que estavam sempre na torcida para

que tudo desse certo, e nos momentos mais inesperados surgiam com alguma palavra sem imaginar a importância que teve, uma convivência peculiar e confiança numa intensidade tão profunda que tudo supera...

Aos meus amigos... Você convive, confia e se torna amigo! E existem alguns que se enquadram como essenciais e permanecem. É uma convivência e confiança numa intensidade tão profunda que supera qualquer marcador de tempo... É uma forma de amor tão distinta, aos meus “quase irmãos”, eu agradeço do fundo do coração. Genoveva, que surgiu na minha vida de uma forma despreziosa, a qual mesmo odiando, hoje amo de coração e confio a minha vida. Alecsandra, tenho tanto a te agradecer, os momentos de conversas e conselhos, de filosofias e puxões de orelha. Janayna, especialmente pelos momentos de conversa e companhia, os conselhos dispensados e a partilha de uma graduação e pós-graduação. Minhas meninas, meu “up de vida”, obrigada!

Larissa, te agradeço por ter me acolhido a maior parte desse percurso, pelos momentos de conversas, no sofá ou na rede, pelos momentos de distrações, risadas e companheirismo, e que com seu exemplo me mostrou a dedicação. Camila, aproveito para te agradecer pelos momentos de saídas, caronas e risadas, posso dizer que o “Cidades do Mundo” me deu, no mínimo, duas amigas. Kelly, te agradeço pela paciência e auxílios em meus momentos, que você sabe exatamente quais, esse momento tem muito de você. Leandro, o meu gêmeo de outra família, te agradeço por tudo que você tem feito na minha vida. Pelas brigas, pelas presenças, anseios e lágrimas compartilhadas, aquele que “Vamos? Vamos.”. Pelas saídas, pela confiabilidade, enfim, pela amizade construída, obrigada por me entender e sempre ter uma palavra amiga. Nayron, pelas conversas e objetivos compartilhados, aos estímulos acadêmicos desde a graduação, pela sua presença sempre. Agradeço ao 302B, Lai e Leo vocês são mais que *roommates*, são aqueles que divido a vida diária, dificuldades e ensejos.

Agradeço a Simone e a Conceição, pelo acolhimento, conversas, almoços, lanches, pelo cuidado e pelas oportunidades. Cê, obrigada por ter ajudado meus pais bem no início da minha vida, desde o ventre, você teve papel essencial na formação do meu caráter, obrigada por todos esses anos!

Agradeço aos amigos que a UEPB me proporcionou, por tentarem ao máximo estar presentes ao longo dessa trajetória, pelas palavras dispensadas, pelo carinho, bate-papos, sorvetes e saídas nas minhas idas a Campina ou por meio virtual, em

sua grande maioria.

Aos profissionais Alexandro e Nilk, por todos os momentos de escuta e aconselhamento, por acreditarem em mim e me encorajar a seguir adiante. Por me mostrarem um caminho de esperança diante de tantos obstáculos a serem vencidos e acreditarem em meu potencial.

Aos pós-graduandos do LAPLAN: Camilinha, por me conduzir, literalmente, ao anexo, pelas caronas no começo do percurso e as conversas advindas delas; a Dinah, pela paciência em compartilhar seus conhecimentos e conversas sempre esclarecedoras; e em especial a Cybelle e Márcio, por me ensinarem o básico da minha pesquisa e por estarem lá me auxiliando na prática. Ana Camila e Deniele pelo incremento na experiência de vida. À, hoje, Prof.^a Dr^a Ana Cristina Falcão Esteves, por confiar seu material cirúrgico e as peças do ensaio mecânico, tudo entregue 100% e esterilizado sempre

A Prof.^a Dr^a Silvia Regina de Arruda Moraes, minha orientadora e exemplo profissional, por inicialmente ter confiado a mim esse projeto, por acreditar que eu conseguiria trabalhar com experimentação animal, por não ter permitido que eu interrompesse o processo, pela confiança em designar tarefas distintas e pela paciência a mim dispensada...

Agradeço aos estimados alunos de iniciação científica: Diogo, Elvis, Laylla, Marina Lira, Paulo, Sara, Sílvia, Tamires e Wilayane pelo tempo dispensado à minha pesquisa, pelas conversas e risadas nos momentos descontraídos. Em especial, agradeço a Wendy, por ser quem és, pela amizade, pelos valiosos momentos compartilhados, por estar na maioria das minhas coletas e a Paula, uma pessoa essencial à minha vida, um dos pilares do meu projeto, minha “filha acadêmica” de verdade, que iniciou e aprendeu junto comigo o manejo dos animais e dos equipamentos, que esteve sempre presente nas coletas e na minha vida, por suas palavras de paz e compromisso sempre. Incluo Polyne, a agregada, que também agradeço pelos momentos, pelas risadas e estímulos. Agradeço a Marina Cerqueira, minha “filha acadêmica” aos 45 do segundo tempo e desde então, pela dedicação e esforço em cumprir prazos e afazeres, por você sinto orgulho. A família Cerqueira, Bruna e Lídia, pelos momentos pessoais, pela acolhida, por vocês gratidão. Meninos, sempre me senti parte de vocês, agradeço a todos pelos ensinamentos mútuos e por toda dedicação.

Ao Departamento de Engenharia Química, na pessoa de Magno Felipe, por

dispensar e conciliar um pouco do seu tempo e ensinamentos para que o objetivo desse projeto pudesse ser alcançado.

Ao Departamento de Fisioterapia da UFPE, ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, em especial à Niége, por sempre me ouvir, aconselhar, por ser sempre prestativa e dedicada em tudo que faz. Agradeço pela amizade e principalmente pelas horas de conversa. Você foi meu primeiro contato com meu sonho, foi aquela que me acalmou em meio a tantos momentos, quando tudo teimava em dar errado, quando eu ligava e você dizia que “tudo vai dar certo”, isso me acalmava. E, hoje, realmente deu.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da UFPE, pelos ensinamentos devo os mais sinceros agradecimentos, sem exceção, todos de alguma forma contribuíram e fizeram parte da minha formação. E como diria Henry B. Adams “Um professor pode encontrar a eternidade, pois nunca poderemos determinar onde para a sua influência sobre os alunos que um dia serão homens, gênios, inventores, sementes que germinaram pelas mãos de seus mestres”.

Aos docentes da graduação na UEPB, que me mostraram que os obstáculos sempre vão existir, mas que devemos seguir nossos sonhos e lutar por eles. Obrigado pelo aprendizado, troca de conhecimentos e experiência de vida. Em especial a Prof Dr^a Doralúcia (*in memoriam*), minha orientadora durante toda a graduação, que partiu deixando uma saudade imensa, um vazio sufocante, que lutou, reclamou e acreditou que esse momento chegaria, não irei deixar de disseminar o seu legado.

Aos meus colegas de mestrado, alguns já venceram essa batalha, e ainda haveremos de nos deparar com outras. É um momento de vitória coletiva, nesses dois anos passamos juntos por dificuldades, inseguranças, medo, erros, acertos, angústias, aflições, vitórias e alegrias. Agradeço especialmente a Igor, que se tornou amigo e que partilhou mais intimamente os anseios e dificuldades dessa trajetória, pelas conversas, filmes e risadas nas suas “visitas” a Recife. Desejo muito sucesso a todos!

Agradeço ao Departamento de Nutrição, em especial ao veterinário Dr França, pela cautela e paciência em mensurar a quantidade de animais cedidos.

Agradeço aos “meus ratos”, por doarem a vida pela pesquisa científica, sem vocês o meu projeto não teria saído do papel.

Agradeço ao CNPq, pela verba destinada a pesquisa científica, que nos

proporcionou a aquisição de novos equipamentos.

Agradeço a FACEPE, de coração, por ter aceitado a proposta e por custear nesses dois anos a minha estadia em Recife.

Finalizo salientando que de nada adianta essa ansiedade e essa sede incontrolável de prever o amanhã, o depois, os próximos minutos. Tudo pode mudar no infinito de um segundo. Comemorem as vitórias, mesmo que sejam pequenas e delicadas. E, acreditemos que as pessoas que se importam permanecem, apesar de. A todos os citados, e me perdoem se esqueci alguém, eu ratifico que sinto por vocês uma forma de amor tão distinta e grandiosa, que chega a saltar do peito.

A todos vocês, os meus mais sinceros agradecimentos, por tudo. Ao fim dessa jornada, permanece o sentimento de plena satisfação e de que todo esforço valeu à pena!

Obrigada!

RESUMO

O Diabetes Mellitus (DM) caracteriza-se por um grupo de doenças metabólicas com a presença de hiperglicemia, resultante de defeitos na secreção de insulina e/ou em sua ação e atualmente é considerado uma pandemia. O objetivo do estudo foi verificar se a terapia fotobiomoduladora aplicada precocemente (após a indução, e antes da instalação do diabetes) poderia ser útil, em função de suas propriedades proliferativas, na atenuação dos danos causados ao tendão do calcâneo em animais diabéticos. O estudo foi executado em duas partes: inicialmente foi realizada uma revisão sistemática a fim de avaliar qual seria o protocolo de Laserterapia mais eficaz na atenuação dos danos causados pela tenotomia nas propriedades biomecânicas do tendão do calcâneo de ratos. Na segunda parte, foi desenvolvido um estudo de caráter experimental que teve por objetivo avaliar o efeito da Laserterapia de Baixa Intensidade (3J e 6J) na resposta biomecânica do tendão do calcâneo de ratos induzidos ao DM. Utilizamos 45 ratos *Wistar* machos, mantidos em condições padrões de biotério, distribuídos aleatoriamente em quatro grupos: Grupo Controle (GC; n=15), ratos não diabéticos, Grupo Diabético (GD; n=10), ratos diabéticos sem nenhuma intervenção, c) Grupo Diabético Laser 1 (GDL1; n=10), ratos induzidos ao DM e tratados com Laserterapia (LT) de 3J/cm²; e d) Grupo Diabético Laser 2 (GDL2; n=10), ratos induzidos ao DM e tratados com LT de 6J/cm². Aos 60 dias de vida, os animais foram induzidos ao DM através de injeção intraperitoneal de Estreptozotocina (55mg/kg), diluída em solução tampão de Citrato de Sódio (10 mM e pH 4,5), dose única. Para a LT foi utilizado um aparelho *Photron Laser III* da marca DMC, em 21 sessões consecutivas pelo método do contato, modo pontual, caneta com diodo de GaAs no tendão do calcâneo. Os animais do GC foram sujeitos apenas a manipulação. Após o período de intervenção, foi realizada a coleta do material biológico, e em seguida encaminhados para o ensaio biomecânico de tração. Os dados foram tratados estatisticamente através do programa SPSS *Statistics* versão 18.0, utilizando-se *Anova* com um fator (*One way*) com *post hoc Tukey*, e nível de significância de 5%. Após o tratamento observou-se diferença nos seguintes parâmetros: Deformação Específica Força Máxima: GDL1 (300,85± 143,59) e GDL2 (365,55± 193,71) < GC (147,35 ± 65,04) (p = 0,018 e p = 0,018, respectivamente); Módulo Elástico: GDL1 (8,54 ±5,25) e GDL2 (11,00 ± 7,03) < GD (26,43 ± 18,55) (p = 0,033 e p = 0,001) e Área de Secção Transversa: GDL2 (1,05 ±0,62) < GC (2,15 ± 1,29) (p = 0,027) e GD (1,72 ± 0,21) < CG (p = 0,025). A terapia de fotobiomodulação minimizou, em parte, as alterações do tendão de ratos induzidos ao DM, possivelmente retardando o processo degenerativo.

Palavras-Chave: Laserterapia. Tendinopatia. Biomecânica. Diabetes *Mellitus*. Ratos. Revisão Sistemática.

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is characterized by a group of metabolic diseases with the presence of hyperglycemia, resulting from defects in insulin secretion and / or its action and currently is considered an pandemic. The objective of the study was to verify whether photobiomodulatory therapy, since applied early (after induction, but before the onset of diabetes) could be useful, due to its proliferative properties, in attenuating damage to the tendon in diabetic animals. The study was carried out in two parts: initially it was carried out to evaluate which would be the most effective in attenuating the damage caused by the tenotomy in the biomechanical properties of the calcaneus tendon of rats. In the second part, an experimental study was developed that aimed to evaluate the effect of Low Intensity Laser Therapy (3J and 6J) on the biomechanical response of the calcaneal tendon of rats induced to DM. We used 45 male Wistar rats, kept under conditions of biotery standard, randomly distributed in four groups: Control Group (CG, n = 15), non-diabetic rats, Diabetic Group (GD; n = 10), diabetic rats without intervention, C) Diabetic Group Laser 1 (GDL1; n = 10), DM-induced mice treated with 3J / cm² Laser Therapy (LT); And d) Laser Diabetic Group 2 (GDL2; n = 10), DM-induced mice and treated with 6J / cm² LT. At 60 days of age, the animals were induced to DM by intraperitoneal injection of streptozotocin (55mg / kg), diluted in a single dose of sodium citrate buffer (10 mM and pH 4.5). For LT, a Photon Laser III device of the DMC was used in 21 consecutive sessions by contact method, punctual mode, GaAs diode pen in the calcaneus tendon. The CG animals were subjected to only one manipulation. After the intervention period, the biological material was collected and then sent to the biomechanical traction test. The data are treated using SPSS Statistics version 18.0, use Anova with a factor (One way) with post hoc Tukey. After treatment, we observed the difference nosobs: Specific Deformation Maximum Strength: LGD1 (300.85 ± 143.59) and LGD 2 (365.55 ± 193.71) < CG (147.35 ± 65.04) (p = 0.018 and p = 0.018, respectively); Elastic modulus: LGD 1 (8.54 ± 5.25) and LGD2 (11.00 ± 7.03) < DG (26.43 ± 18.55) (p = 0.033 and ep = 0.001) and Transverse Section Area: LGD2 (1.05 ± 0.62) < CG (2.15 ± 1.29) (p = 0.027) and DG (1.72 ± 0.21) < CG (p = 0.025). We could observe in tendon a improvement in the structure and biomechanics in the parameters Energy / Area, Specific Deformation Maximum Strength and Area of Transversal Section of the tendon of rats induced to DM delaying its degenerative process.

Keywords: Lasertherapy. Tendinopathy. Biomechanics. Diabetes Mellitus. Rats. Systematic Review.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGEs - *Advanced Glycated End-Products* (produtos finais de glicação avançada)

AsGa - Arsenieto de gálio

AsGaAl - Arsenieto de gálio e alumínio

CEL - carboxietilisina

CML- carboximetilisina

CO₂ - Dióxido de carbono

DM - *Diabetes Mellitus*

DOGDIC - ligação cruzada imidazolina derivada de 3-deoxiglicosona

DOLD - dímero de lisina e 3-deoxiglicosona

g- gramas

GALA - ácido glioxílico lisina amida

GC - Grupo Controle

GD - Grupo Diabético

GDL1 - Grupo Diabético Laser

GDL2 - Grupo Diabético Laser 2

GODIC - ligação cruzada imidazolina derivada de glioxal

GOLA - glioxal lisina amida

GOLD - dímero de glioxal-lisina

HbA_{1c} - Hemoglobina Glicada.

He-Ne - Hélio-Neônio

J - Joules

J/cm² - Joules/centímetro quadrado

LAPLAN - Laboratório de Plasticidade Neuromuscular

LLLT - *Low Level Laser Therapy* (Laserterapia de baixa intensidade)

mg/dL – Miligrama/Decilitro

mg/kg – Miligramas/Kilogramas

ml – Mililitros

mm - Milímetro

mM - Milimol

mm/s - Milímetros/Segundo

mm² – Milímetro quadrado

MODIC - ligação cruzada imidazolina derivada de metil glioxal

MOLD - dímero de metilglioxal-lisina

MPa - Megapascal

mW - Miliwatts

N - Newton

N.mm/mm² –Newton.Milímetro/Milímetro quadrado

nm - Nanômetros

NPH *Insulina Humulin* - *Neutral Protamine Hagedorn Insulin* (Neuro Protamina Hagedorn Insulina)

pH - Potencial Hidrogeniônico

RAGE - *A common thread in aging, diabetes, neurodegeneration, and inflammation*
(um filamento comum no envelhecimento, diabetes, neurodegeneração e inflamação)

SPSS - *Statistical Package for the Social Sciences*

UFPE – Universidade Federal de Pernambuco

UI - Unidade Internacional

USA - *United States of America* (Estados Unidos da América)

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1 - Metas de controle Glicêmico recomendados pela Sociedade Brasileira de Diabetes. HbA1c: Hemoglobina Glicada. B: Estudos observacionais de menor consistência. *As metas devem ser alcançadas sem aumentar o risco de hipoglicemia (adaptado de CAMPANA; BRANDÃO, 2013).

Figura 1 - Procedimento de indução do diabetes experimental com solução de Estreptozotocina (55mg/kg de peso do animal em tampão citrato de sódio a 10mM e pH 4,5).

Figura 2 - Terapia de biofotomodulação com o aparelho *Phothon Laser III* da marca DMC, com contenção manual do animal para a aplicação do protocolo experimental.

Figura 3 - Incisão ao longo da superfície posterior da pata direita do animal para remoção da pele e de algumas partes moles, para sua coleta e dissecação do tendão do calcâneo.

Figura 4 - Ensaio mecânico convencional EMIC do Laboratório de Materiais Poliméricos - Departamento de Engenharia Química da UFPE (modelo DL 500, Brasil).

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Diabetes <i>Mellitus</i> (DM).....	18
2.2 Repercussões do Diabetes <i>Mellitus</i> no tecido colágeno	19
2.3 Biomecânica do tendão e o DM	20
2.4 Fotobiomodulação e cicatrização de tendão e Diabetes <i>Mellitus</i> (DM).....	21
3 OBJETIVOS	25
3.1 Objetivo Geral.....	25
3.2 Objetivos Específicos	25
4 HIPÓTESES	26
5 MÉTODOS	27
5.1 Tipo de Pesquisa	27
5.2 Local de realização da pesquisa	28
5.3 Amostra	28
5.4 Grupos Experimentais	28
5.5 Indução do Diabetes	28
5.6 Avaliação do peso corpóreo e da glicemia	29
5.7 Administração de insulina	29
5.8 Terapia de biofotomodulação.....	30
5.9 Eutanásia e coleta do material	31
5.10 Ensaio Biomecânico	31
5.11 Aspectos éticos.....	32
5.12 Análise Estatística	32
6 RESULTADOS	34
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	35
8 DIFICULDADES ENCONTRADAS	36
REFERÊNCIAS	37
APÊNDICE A – Artigo de Revisão Sistemática	42
APÊNDICE B – Artigo original	60
ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Experimentação animal	76
ANEXO B – Normas para a submissão do Artigo 1 (Revista Brasileira de Biomecânica)	77
ANEXO C - Comprovante de submissão do Artigo 1	78

1 INTRODUÇÃO

A presente dissertação faz parte de uma linha de pesquisa já consolidada no Laboratório de Plasticidade Neuromuscular (LAPLAN) – Departamento de Anatomia da UFPE, que tem por objetivo estudar as comorbidades resultantes do diabetes nas estruturas do aparelho locomotor, mediante experimentações com modelos animais.

Nesse sentido, observamos em estudos prévios realizados no nosso laboratório, através do ensaio biomecânico do tendão do calcâneo, a presença de sinais de fragilidade tendínea em animais com diabetes crônica experimental não-controlada. A partir desses resultados, idealizamos um modelo experimental tentando mimetizar as condições clínicas observadas em pacientes diabéticos tipo 1, fazendo uso de insulino-terapia, para testar a hipótese de que uma terapia fotobiomoduladora, desde que iniciada precocemente (após a indução, mas antes da instalação dos danos causados pelo diabetes) poderia ser útil, em função de suas propriedades proliferativas, na atenuação dos danos causados ao tendão em indivíduos diabéticos.

Inicialmente foi realizada uma revisão da literatura com o intuito de avaliar a eficácia de variados protocolos de Laserterapia, em estudos experimentais na atenuação dos danos causados pela Tenotomia nas propriedades biomecânicas do tendão do calcâneo de ratos; de modo a balizar a escolha do protocolo a ser utilizado no presente estudo.

Da revisão, originou-se o primeiro artigo resultante dessa dissertação intitulado: “EFICÁCIA DA TERAPIA FOTOBIMODULADORA DE BAIXA INTENSIDADE NA ATENUAÇÃO DOS DANOS CAUSADOS AS PROPRIEDADES BIOMECÂNICAS DO TENDÃO DO CALCÂNEO DE RATOS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA” (incluído no capítulo de Revisão da Literatura, submetido para publicação na Revista Brasileira de Biomecânica Qualis B2, na área 21 da CAPES).

Através da revisão sistemática, foi elaborado o protocolo experimental utilizando animais de laboratório, ratos *Wistar*, com o objetivo de avaliar o efeito da Laserterapia de Baixa Intensidade de 3J e 6J sobre as Propriedades Biomecânicas do Tendão do Calcâneo de Ratos Diabéticos.

Desde forma, hipotetizamos que a Laserterapia aplicada no tendão do

calcâneo no período imediatamente após a indução poderia minimizar as alterações tendíneas observadas em decorrência do diabetes.

Atendendo às normas vigentes do Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Fisioterapia da UFPE para a elaboração da dissertação, o presente exemplar foi estruturado da seguinte maneira:

1 Revisão da Literatura

2 Objetivos

3 Hipóteses

4 Métodos

5 Resultados – Apresentação dos resultados desse estudo no formato de dois artigos originais:

Artigo original 1 - **Eficácia da Terapia Fotobiomoduladora de Baixa Intensidade na atenuação dos danos causados as Propriedades Biomecânicas do Tendão do Calcâneo de Ratos: Uma Revisão Sistemática (APÊNDICE A)**

Artigo original 2 - **Laser de Baixa Intensidade de 3J e 6J sobre o as Propriedades Biomecânicas do Tendão do Calcâneo de Ratos Diabéticos (APÊNDICE B)**

6 Considerações Finais.

7 Dificuldades Encontradas.

Referências

Apêndices

Anexos

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Diabetes *Mellitus* (DM)

O DM é caracterizado por um grupo de doenças metabólicas com a presença de hiperglicemia, resultante de defeitos na secreção de insulina e/ou em sua ação (GROSS *et al.*, 2002). Está relacionado a grandes encargos econômicos e sociais em decorrência da alta frequência de complicações agudas e crônicas, que causam hospitalização, incapacitações, perda de produtividade de vida e morte prematura (HARRIS,1998).

Possui quatro formas diferenciadas de apresentação: DM tipo 1, DM tipo 2, DM gestacional e outros tipos específicos de DM. Os que apresentam maior índice na população em geral são: tipo 1 e tipo 2. O tipo 1 consiste na destruição das células beta levando a uma deficiência de insulina, sendo subdividido em tipos 1A (autoimune), encontrado em 5 a 10% dos casos de DM, sendo o resultado da destruição imunomediada de células betapancreáticas com conseqüente deficiência de insulina, e 1B (idiopática), caracterizado pela ausência de marcadores de autoimunidade contra as células beta. Os indivíduos com o tipo 1B de DM podem desenvolver cetoacidose e apresentam graus variáveis de deficiência de insulina, já o DM tipo 2 é verificado em 90 a 95% dos casos e marcado por defeitos na ação e na secreção da insulina e na regulação da produção hepática de glicose e é causada por uma interação de fatores genéticos e ambientais (Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2015-2016). O controle da glicose no sangue reduz o risco de complicações microvasculares (RODRIGUES, 2005).

Idade avançada, maior duração do diabetes, pior grau de controle glicêmico, e a presença de complicações microvasculares (JACOBSON *et al.*, 2014) foram observados como fatores de risco para alterações locomotoras, principalmente Limitação da Mobilidade Articular, na DM tipo 1 (SMITH, BURNET, MCNEIL, 2003; SILVA; SKARE, 2012; JACOBSON *et al.*, 2014).

A duração do DM e os níveis de hemoglobina glicosilada são os principais fatores de risco para as complicações crônicas e conseqüente agravo dos casos (YAGIHASHI; MIZUKAMI; SUGIMOTO, 2011). Conjuntamente ao controle metabólico, o tratamento da Hipertensão Arterial nos pacientes diabéticos tem importância crucial para redução das complicações macro e microvasculares,

recomenda-se como metas glicêmicas, de acordo com a Sociedade Brasileira de Diabetes, a serem alcançadas em pacientes adultos diabéticos os valores dispostos na Tabela 1.

Parâmetro	Metas*	Nível de evidência
HbA1c	<7%	B
Glicemia de jejum	<110 mg/dl	B
Glicemia pré-prandial	<110 mg/dl	B
Glicemia pós-prandial	<140 mg/dl	B

Tabela 1. Metas de controle Glicêmico recomendados pela Sociedade Brasileira de Diabetes. HbA1c: Hemoglobina Glicada. B: Estudos observacionais de menor consistência. *As metas devem ser alcançadas sem aumentar o risco de hipoglicemia (adaptado de CAMPANA; BRANDÃO, 2013).

2.2 Repercussões do Diabetes *Mellitus* no tecido colágeno

O DM causa alteração no processo inflamatório, na angiogênese (LEEPER, COOKER, 2011), proliferação celular e distúrbios da matriz celular, principalmente o colágeno (REDDY, 2004), levando ao desenvolvimento de disfunções mecânicas. Propriedades estruturais alteradas de tecidos musculoesqueléticos predis põem o maior risco de tendinopatia e de lesão musculoesquelética em pacientes diabéticos (JACOBSON *et al.*, 2014).

Com o aumento da idade, o colágeno torna-se menos solúvel, com uma maior quantidade de pigmentos reticulados, danos evidenciados de forma mais precoce no DM (MONNIER; KOHNT; CERAMI, 1984).

Relatos de casos e alguns estudos epidemiológicos enfatizam a possível ligação entre DM e alterações de tendões em várias partes do corpo de seres humanos (AKTURK *et al.*, 2002; BOLTON *et al.*, 2005; DIDOMENICO; WILLIAMS; PETROLLA, 2008). Porém detalhes sobre sua associação ainda permanecem obscuros, Papanas e colaboradores (2009), avaliando o tendão do calcâneo, sugerem que o DM pode alterar o mesmo, ocasionando rigidez e espessamento.

No tecido conjuntivo do tendão, que possui alto teor de colágeno, ocorre uma série de reações entre a porção amino-terminal do colágeno e a glicose livre, denominada glicosilação não enzimática, processo determinante no processo

degenerativo e regenerativo criado pelo quadro diabético (BARBOSA, OLIVEIRA, SEARA, 2008).

De Oliveira e colaboradores (2010), em uma revisão sistemática, demonstraram diversas alterações morfológicas no tendão do calcâneo, tais como o aumento da densidade, de irregularidades e menor diâmetro da fibrila e desorganização do colágeno com uma configuração anormal, além da ocorrência de alterações no funcionamento biomecânico do tecido conjuntivo.

A questão vascular também contribui para a instalação de lesões cutâneas, pela presença de macro e microangiopatias, as alterações vasculares geradas, como aumento da permeabilidade e diminuição da resposta dos vasos à inervação simpática, resultam numa conseqüente queda da capacidade de reação ao estresse térmico e/ou hipóxia local (BUB; OLERUD, 2003). Não existem causas esclarecidas acerca da maior susceptibilidade dos indivíduos diabéticos às infecções, mas sugere-se que poderia haver associação de um defeito imunológico característico do diabético, bem como às micro/macroangiopatia e/ou neuropatia diabética já descritas (DELAMAIRE *et al.*, 1997).

2.3 Biomecânica do tendão e o DM

A lesão tecidual, proveniente de alterações metabólicas próprias do DM, apesar de ser o estímulo inicial para o processo de cicatrização, coloca elementos sanguíneos em contato com o colágeno e outras substâncias da matriz extracelular, dessa forma, há liberação de vários mediadores vasoativos e quimiotáticos que conduzem o processo cicatricial (interação entre sua síntese, fixação e degradação no tecido cicatricial), dessa forma pode ser induzida, também, por questões nutricionais e/ou metabólicas (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007).

Além disso, o DM leva a alteração na angiogênese (LEEPER, COOKER, 2011) e dos processos inflamatório e de proliferação celular e distúrbios da matriz celular, principalmente do colágeno (REDDY 2004), que acarretam a longo prazo déficits mecânicos. As propriedades mecânicas do tendão calcâneo influenciam diretamente no funcionamento e desempenho do sistema músculo-esquelético durante a locomoção.

A elasticidade dos tendões aumenta a eficiência do músculo durante ciclos de atividade, tal como a marcha. Ou seja, as propriedades mecânicas do tendão

calcâneo reduzem o trabalho e o gasto energético exigido do músculo. Isto torna possível para o ato de locomoção, que seria desfavorável mecanicamente para o músculo isoladamente, para ser realizada utilizando menos energia (ROBERTS; MARSH, 2003).

Uma das razões que leva ao dano tendíneo está no fato da redução do número e diâmetro dos vasos intratendíneos, que diminuem das partes distais até as mais proximais, tornando o tecido mais susceptível a rupturas. Sua vascularização é extremamente delicada e possui zonas críticas de redução de aporte sanguíneo o que contribui para a ocorrência de rupturas (ZANTOP; TILLMANN; PETERSE, 2003).

2.4 Fotobiomodulação e cicatrização de tendão e Diabetes *Mellitus* (DM)

O DM prejudica a angiogênese fisiológica, o que pode se manifestar de diversas formas, como, por exemplo, a formação de úlceras nos pés que não cicatrizam ou angina refratária. Dentre os vários mecanismos moleculares propostos para a justificativa da não cicatrização tecidual em indivíduos com DM, a hiperglicemia induziria a produção de espécies reativas de oxigênio que causam distúrbios endoteliais, incluindo a síntese reduzida e degradação acelerada de óxido nítrico derivado do endotélio (LEEPER, COOKER, 2011). Essas alterações promovem, em longo prazo, distúrbios mecânicos do tendão do calcâneo em modelos experimentais em estudos anteriores realizados por nosso grupo.

A fotobiomodulação, através da aplicação de laser, atua sobre os tecidos como reações não térmicas (SCHAFFER *et al.*, 2000). Moléculas com propriedades fotorreceptoras que estão distribuídas nas células (flavoproteínas, porfirinas, citocromo, tirosina e asparaginina), ao receber radiação com comprimento de onda específico, provocam variações no metabolismo celular (AMAT *et al.*, 2005). Apesar da inespecificidade dos estímulos lesivos, as lesões teciduais são responsáveis pela resposta inflamatória, e, para fins de reparação tecidual, o emprego da luz encontra vantagens no que se refere à ação menos invasiva, muitas vezes mais barata, ocupando menos tempo quando comparada a outras modalidades terapêuticas e a praticidade de aplicação (VINCK *et al.*, 2003).

De acordo com Grieco (2014), os lasers são classificados de acordo com a

potência de emissão da radiação, podem ser: laser de alta, média e baixa intensidade:

- Os lasers de alta intensidade, também conhecidos como laser cirúrgico, laser quente, laser duro ou *hard laser* emitem radiação de alta potência, com potencial destrutivo, são usados em cirurgias, ou seja, possui uma ação fototérmica de corte, vaporização, coagulação e esterilização dos tecidos. Os principais lasers de alta intensidade são o Excimer, Argônio, Kriptônio, Dye, Rubi, Família YAG (ítrio-alumíniogranada) e CO₂.

- Os lasers de média intensidade ou *mid-laser* emitem radiações com potências medianas, sem poder destrutivo, amplamente utilizados em tratamentos fisioterapêuticos. Entre eles encontram-se o laser de Hélio-Neônio (He-Ne) e o Arsenieto de gálio (AsGa).

- Os lasers de baixa intensidade, também denominados laser mole, laser frio, laser terapêutico ou "*soft-laser*", emite radiação de baixa potência, sem potencial destrutivo, com ação fotoquímica de analgesia, são anti-inflamatórios e promovem bioestimulação tecidual. Entre os lasers de baixa intensidade encontram-se os lasers: He-Ne (Hélio-Neônio), diodo (Arsenieto de gálio - AsGa e Arsenieto de gálio e alumínio - AsGaAl).

Nas últimas duas décadas a Laserterapia, denominada especificamente, "*Low Level Laser Therapy*" (LLLT) vem sendo amplamente pesquisada na área da saúde, pois apresenta aplicabilidade bem expandida na cicatrização de feridas, redução de edema e dor (FIÓRIO *et al.*, 2011). Seu princípio baseia-se na bioestimulação dos tecidos, que não provoca aumento súbito de temperatura, entretanto, estimula efeitos bioquímicos nos tecidos, o que alavanca a sua utilização na prática clínica (EBRAHIMI T. *et al.*, 2012).

Dessa forma, ao escolher a utilização do laser como modalidade terapêutica,

é necessário cuidado com os seus principais parâmetros, como: comprimento de onda, energia depositada no tecido, densidade de energia, área do feixe e tempo de aplicação (FUKUDA; MALFATTI, 2008).

Nos últimos anos, a fototerapia destaca-se como método bioestimulador para o reparo tecidual por aumentar a circulação local, proliferação celular e síntese de colágeno. Vários estudos clínicos avaliaram a fototerapia no tratamento em vários tipos de úlceras crônicas, diferindo, entretanto, quanto aos protocolos utilizados (comprimento de onda, potência, intensidade), o que motiva controvérsias da real eficácia de seu uso na cicatrização tecidual (MINATEL *et al.*, 2009).

Entretanto, várias modalidades terapêuticas, com o objetivo de acelerar o processo regenerativo, tem demonstrado que a fotobiomodulação, através da radiação laser de baixa intensidade com diferentes comprimentos de onda, interage de diferentes formas no reparo tendíneo. No entanto, por ser uma tecnologia relativamente nova, ainda se encontram em avaliação os seus reais efeitos, aplicações efetivas e limitações e seu uso vem sendo bastante pesquisado na presença de lesão tendínea experimental (tenotomia) (ARRUDA *et al.*, 2007, BERTONILI; SILVA; TRINDADE, 2008, BARBOSA *et al.*, 2013; CASALECHI *et al.*, 2013; GUERRA *et al.* 2013).

A fotobiomodulação, através da aplicação da Laserterapia, tem demonstrado uma influência no crescimento de células fibroblásticas, na expressão do colágeno tipo 1 e de proteoglicanos (CHEN *et al.*, 2009), que teoricamente podem promover uma otimização das propriedades tendíneas em modelos experimentais. A Laserterapia, quando usada em baixa potência apresenta características de estimulação à proliferação de fibroblastos, redução do processo inflamatório, no entanto com aceleração na síntese de colágeno, facilitação na formação de fibrilas colágenas e aumento na força tênsil final de tendões em processo de regeneração (BERTONILI; SILVA; TRINDADE, 2008).

Além disto, a Laserterapia pode promover o realinhamento das fibras de colágeno, que se encontram desestruturadas pelo DM, visto que em estudo realizado com a Laserterapia aplicada em tendões que sofreram reparo cirúrgico, promoveram alterações micro e macroestruturais tendíneas, retardando esse processo, estes apresentaram melhor organização das fibras e uma maior resistência no teste biomecânico (ELWAKIL, 2007). Porém, seu uso apresenta inúmeras controvérsias, por conta da grande divergência nos parâmetros

dosimétricos e as discrepâncias nos achados (BERTONILI; SILVA; TRINDADE, 2008).

Há constatação da associação da fragilidade biomecânica do tendão do calcâneo com o DM em modelos experimentais em estudos anteriores realizados por nosso grupo, a partir da avaliação das características biomecânicas do tendão em animais com diabetes crônica experimental não controlada (OLIVEIRA *et al.*, 2011), o que nos leva a implementar uma estratégia terapêutica a ser considerada.

A regeneração tendínea é realizada pelos fibroblastos da bainha interna, na ausência da bainha (quando ocorre lesão tendínea), é então, realizada pelo tecido conjuntivo frouxo adjacente. Os novos feixes de fibras colágenas crescem em direção ao interior da lesão, restaurando assim a continuidade do tendão (CASALECHI *et al.*, 2007). Entretanto, por possuir pouca vascularização, oxigenação e nutrição, o tendão possui baixa capacidade de regeneração (ENWEMEKA, 2001).

A terapêutica com Laserterapia, quando utilizada em baixa potência, apresenta características de estimulação à proliferação de fibroblastos, redução do processo inflamatório, favorecendo a aceleração na síntese de colágeno, formação de novas fibrilas colágenas e consequente aumento na força tênsil final de tendões em processo de reparo (CHEN *et al.*, 2009).

Em pacientes diabéticos os mecanismos de reparação do tecido conjuntivo estão comprometidos devido a reduções na função de resposta sobre monócitos/macrófagos, neutrófilos e células T, que também influenciam a expressão de fatores de crescimento nos macrófagos (LOW *et al.*, 2001), bem como as alterações na imunidade humoral, síntese de colágeno e angiogênese (DEVALARAJA *et al.*, 2000), tornando os indivíduos com DM mais suscetíveis às lesões tendíneas (AKTURK, *et al.* 2002; BOLTON, *et al.* 2005).

Desta forma, idealizamos um modelo experimental tentando mimetizar as condições clínicas observadas em pacientes diabéticos tipo 1, em que é preconizada a administração de insulina. Baseadas no protocolo de Marcos *et al.* (2011), foram utilizadas duas doses em grupos distintos, por apresentarem efeitos terapêuticos diferentes: 3J predominantemente anti-inflamatório e 6J por possuir propriedades cicatriciais, para testar a hipótese de que uma terapia fotobiomoduladora, desde que iniciada precocemente (após a indução, mas antes da instalação do diabetes) poderia ser útil na atenuação dos danos causados ao tendão em diabéticos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da Laserterapia de Baixa Intensidade de 3J e 6J na resposta biomecânica do tendão do calcâneo de ratos induzidos ao Diabetes Mellitus.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar estudos experimentais que utilizaram variados protocolos de Laserterapia;
- ✓ Avaliar (através da revisão sistemática) qual o protocolo de Laserterapia seria mais eficaz na atenuação dos danos causados pela tenotomia sobre as propriedades biomecânicas do tendão do calcâneo de ratos;
- ✓ Avaliar os parâmetros biomecânicos: Módulo Elástico - ME (MPa), Força Máxima - FM (MPa), Deformação Específica Força Máxima - DE (mm), Energia/Área - E/A (N.mm/mm²), e Área de secção transversa - AST (mm²);
- ✓ Avaliar os parâmetros metabólicos: peso corpóreo e a glicemia dos animais.

4 HIPÓTESES

H0 – A fotobiomodulação, através da aplicação de laser de baixa intensidade, não promove alterações micro e macro estruturais tendíneas.

H1– A fotobiomodulação, através da aplicação de laser de baixa intensidade (3J), promove alterações micro e macroestruturais tendíneas acarretando melhora na estrutura e biomecânica do tendão de ratos induzidos ao DM retardando seu processo degenerativo.

H2– A fotobiomodulação, através da aplicação de laser de baixa intensidade (6J), promove alterações micro e macroestruturais tendíneas acarretando melhora na estrutura e biomecânica do tendão de ratos induzidos ao DM retardando seu processo degenerativo.

5 MÉTODOS

Essa dissertação inclui dois tipos de estudo, uma Revisão Sistemática (RS) e um estudo experimental.

Para a confecção da RS foram pesquisados artigos indexados nas bases de dados COCHRANE e MEDLINE/PUBMED (MeSH); e SCIELO, LILACS, WEB OF SCIENCE (DeCS), conduzida em Agosto a Dezembro de 2015. Como estratégia de busca, em todas as bases de dados, foram utilizados dois descritores de forma combinada.

Extraídos do Medical Subject Headings (MeSH):

- ✓ Rats Wistar “AND” Achilles Tendon; Rats Wistar “AND” Lasers Therap Low Level; Achilles Tendon “AND” Lasers Therap Low Level; Rats Wistar “AND” Achilles Tendon “AND” Lasers Therap Low Level

E dos Descritores em Ciências da Saúde (DeCS):

- ✓ Rats, Wistar “AND” Achilles Tendon; Rats, Wistar “AND” Laser Therapy, Low-Level; Achilles Tendon “AND” Laser Therapy, Low-Level; Rats, Wistar “AND” Achilles Tendon “AND” Laser Therapy, Low-Level

Os estudos foram considerados elegíveis para inclusão quando corresponderam aos seguintes critérios: 1) estudos experimentais com ratos da linhagem *Wistar* com tendinopatias, 2) uso de Laserterapia de baixa intensidade.

Não houve restrição linguística nem de data para a seleção dos estudos encontrados.

A metodologia do estudo experimental encontra-se descrita a seguir:

5.1 Tipo de Pesquisa

A pesquisa foi um estudo experimental de caráter quantitativo.

5.2 Local de realização da pesquisa

As diversas etapas desse estudo foram realizadas no Laboratório de Plasticidade Neuromuscular – LAPLAN (Departamento da Anatomia) em parceria com o Laboratório de Materiais Poliméricos - Departamento de Engenharia Química, ambos localizados na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), campus Recife.

5.3 Amostra

A amostra foi composta por 45 ratos machos da raça *Rattus Novergicus Albinus*, da linhagem *Wistar* mantidos em gaiolas em grupos de três/quatro e submetidos a ciclo claro/escuro invertido de 12 horas e temperatura de $23^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$, controlada por ar condicionado e com uso de exaustor de ar, recebendo ração (Ração Presence®) e água filtrada *ad libitum*.

5.4 Grupos Experimentais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos: a) Grupo Controle – GC (n=15) ratos não diabéticos, b) Grupo Diabético – GD (n=10) ratos diabéticos sem nenhuma intervenção, c) Grupo Diabético Laser 1 – GDL1 (n=10) ratos induzidos ao Diabetes *Mellitus* e tratados com Laserterapia de baixa intensidade, com dose de 3J/cm² d) Grupo Diabético Laser 2 – GDL2 (n=10) ratos induzidos ao Diabetes *Mellitus* e tratados com Laserterapia de baixa intensidade, com dose de 6J/cm².

5.5 Indução do Diabetes

Ao completarem 60 dias de vida e após um jejum de 12 horas, os animais foram induzidos ao diabetes experimental tipo 1 através da injeção intraperitoneal de solução de Estreptozotocina Anomeros Mistos (*Sigma-Aldrich* Brasil Ltda.) 55mg/kg de peso animal por via intraperitoneal diluída em solução tampão de Citrato de Sódio a 10 mM e pH 4,5, em dose única (Figura 1). Os animais não diabéticos receberam doses semelhantes de solução tampão Citrato de Sódio (0,6 ml), a fim de reproduzir o mesmo estresse da indução. Decorridos 30 minutos após o procedimento todos os animais tiveram livre acesso a ração e a água. Só foram incluídos no estudo os animais que apresentaram valores glicêmicos acima de 200 mg/dL, avaliados a partir

da coleta de uma gota de sangue da ponta da cauda do animal (Glicosímetro Kit Accu-Chek Active), (CARVALHO, CARVALHO, FERREIRA, 2003). Os animais que apresentaram níveis glicêmicos inferiores foram excluídos da pesquisa.

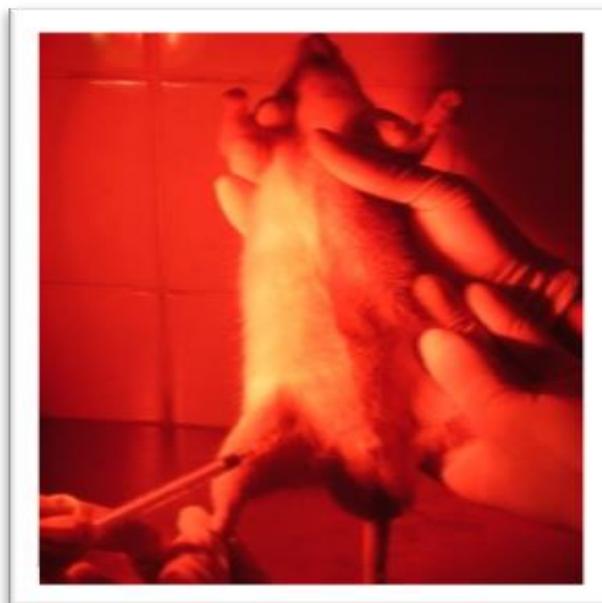


Figura 1 - Procedimento de indução do diabetes experimental com solução de Estreptozotocina (55mg/kg de peso do animal em tampão citrato de sódio a 10mM e pH 4,5).

5.6 Avaliação do peso corpóreo e da glicemia

O peso corpóreo dos animais foi aferido semanalmente ao longo de todo o experimento. A verificação da glicose sanguínea (Glicosímetro Kit Accu-Chek Active) foi realizada nas seguintes etapas do experimento: após jejum de 12 horas, antes da indução ao diabetes, no 3º e 7º dias após a indução, e, após a confirmação do diabetes, semanalmente até o fim do experimento.

5.7 Administração de insulina

Foi administrada a insulina (2 UI/dia/rato; subcutânea - Insulina *Humulin* NPH) em todos os grupos diabéticos imediatamente após a constatação do estado hiperglicêmico, ao longo de todo o protocolo experimental.

5.8 Terapia de biofotomodulação

Para a terapia de biofotomodulação foi utilizado o protocolo adaptado de Marcos e colaboradores (2011) *Phothon Laser III*, marca DMC, Dosagem total ou energia de 3J para o Grupo Diabético Laser 1 (GDL1) e 6J para o Grupo Diabético Laser 2 (GDL2). Foram realizadas 21 sessões consecutivas pelo método do contato, iniciado ao 4º dia pós indução ao DM de modo pontual, realizado por um único pesquisador, utilizando uma caneta com diodo de GaAs que opera na função contínua com comprimento de onda de 808nm, Densidade de energia ou Fluência de 60J/cm² e potência de pico de 100mW aplicada ao tendão do calcâneo dos ratos dos grupos GDL1 e GDL2 (Figura 2). Os animais dos grupos GC e GD permaneceram em suas respectivas gaiolas, sujeitos apenas à manipulação.



Figura 2 - Terapia de biofotomodulação com o aparelho *Phothon Laser III* da marca DMC, com contenção manual do animal para a aplicação do protocolo experimental.

5.9 Eutanásia e coleta do material

Ao final do período de intervenção foi realizada uma anestesia com solução de Xilazina (Anasedan®) (20mg/Kg) e Cloridrato de Ketamina (Dopalen®) (100mg/kg), perfazendo um volume de 0,1 ml e 0,1 ml para cada 100g de peso do animal, respectivamente, por via intraperitoneal. Foi realizada uma incisão ao longo da superfície posterior da pata direita do animal para remoção da pele e de algumas partes moles, para sua coleta e dissecação do tendão calcâneo (Figura 3), em seguida as amostras foram encaminhadas para o ensaio biomecânico. Após a coleta do material biológico, e ainda sob efeito de anestésicos, os animais receberam uma dosagem via intracardíaca de 1ml de Cloreto de Potássio (19,1%), para sua eutanásia.



Figura 3 - Incisão ao longo da superfície posterior da pata direita do animal para remoção da pele e de algumas partes moles, para sua coleta e dissecação do tendão do calcâneo.

5.10 Ensaio Biomecânico

Para o ensaio biomecânico o tendão dissecado foi acoplado em dois conectores, um em cada extremidade, e em seguida foi utilizada a fórmula da elipse para mensurar a área da secção transversa do tendão (SILVEIRA; NERY, 1999). A amostra foi conectada em uma máquina de ensaio mecânico convencional EMIC do Laboratório de Materiais Poliméricos – Departamento de Engenharia Química da UFPE (modelo DL 500, Brasil) através de garras autotravantes, sendo em seguida aferido o comprimento da amostra para o ensaio (Figura 4).



Figura 4 – Máquina de Ensaio mecânico convencional (EMIC) do Laboratório de Materiais Poliméricos - Departamento de Engenharia Química da UFPE (modelo DL 500, Brasil).

As amostras tendíneas foram tracionadas até o ponto de falha do corpo de prova, em velocidade de 0,1 mm/s, com célula de carga de 5000 N. As variáveis avaliadas foram: Força Máxima (FM); Tensão Força Máxima (TFMáx), Deformação Específica Força Máxima (%), Energia/Área - E/A (N.mm/mm²), Módulo Elástico (ME), e Área de secção transversa - AST (mm²).

5.11 Aspectos éticos

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE (Proc.: 23076.029551/2015-61), (ANEXO A) e todo o manejo e procedimento adotados nesse estudo estão de acordo com o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animal*, obedecendo as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794, de 8 de Outubro de 2008, que trata do uso de animais para fins científicos e didáticos.

5.12 Análise Estatística

Com os dados obtidos foi criado um banco de dados no Microsoft Excel 2016 e posteriormente analisados através do software SPSS *Statistics* versão 18.0. Após a confirmação da normalidade pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Para comparação entre três ou mais grupos foi usado a Análise de Variância (ANOVA)

seguido pelo *post hoc de Tukey*, para as variáveis com distribuição não normal foi usado o *Kruskal-Wallis* (para comparar três ou mais grupos) e *Mann Whitney* (para comparar dois grupos). O nível de significância adotado foi 5%.

6 RESULTADOS

Os resultados desta pesquisa serão apresentados em forma de dois Artigos Originais intitulados: “Eficácia da Terapia Fotobiomoduladora de Baixa Intensidade na atenuação dos danos causados as Propriedades Biomecânicas do Tendão do Calcâneo de Ratos: Uma Revisão Sistemática” (APÊNDICE A), submetido à Revista Brasileira de Biomecânica (Qualis B2); e “Efeito do Laser de Baixa Intensidade de 3J e 6J sobre o as Propriedades Biomecânicas do Tendão do Calcâneo de Ratos Diabéticos” (APÊNDICE B), à ser submetido ao periódico *Journal of Diabetes and its Complications* (Qualis A2).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os protocolos de Laseterapia (3 e 6J) aplicados durante 21 dias consecutivos, promoveram o restabelecimento dos parâmetros biomecânicos Energia/Área, Deformação Específica Força Máxima e Área de Secção Transversa do tendão de ratos induzidos ao DM retardando seu processo degenerativo.

Provavelmente a Laserterapia favoreceu o realinhamento das fibras de colágeno, que se encontram desestruturadas pelo DM, levando a uma melhor organização e, conseqüentemente, uma maior resistência ao ensaio de tração do tendão. O aumento do valor da Deformação Específica Força Máxima nos grupos tratados com o laser, demonstra uma maior resistência do tendão ao ponto de ruptura.

8 DIFICULDADES ENCONTRADAS

Inicialmente houve demora na aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal. O projeto dispôs para a sua execução de recursos provenientes do Edital Universal/ CNPq (processo nº 446538/2014-0), porém a verba para a aquisição dos materiais necessários (Estreptozotocina, Esteira adaptada) ainda não foi liberada na íntegra. Ambos acarretaram em atrasos e necessidade de adequações do projeto inicial (o qual faria uso da Esteira adaptada). A aquisição de novos animais foi restrita, visto que o biotério que nos forneceu os animais possui uma alta demanda. Além disso, tivemos perdas amostrais por conta de animais que não se tornaram diabéticos após a indução ao DM por Estreptozotocina.

REFERÊNCIAS

AKTURK, M., *et al.* Thickness of the supraspinatus and biceps tendons in diabetic patients. **Diabetes Care**. v. 25, n. 2, p. 408, 2002.

AMAT, A. *et al.* Modification of the intrinsic fluorescence and the biochemical behavior of ATP after irradiation with visible and near-infrared laser light. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Lausanne, v. 81, n.1, p. 26-32, oct. 2005.

ARONSON, D. Potential role of advanced glycosylation end products in promoting restenosis in diabetes and renal failure. **Medical hypotheses**, v. 59, n. 3, p. 297–301, set. 2002.

ARRUDA, E. R. B., *et al.* Influência de diferentes comprimentos de onda da Laserterapia de baixa intensidade na regeneração tendínea do rato após tenotomia. **Rev. bras. fisioter.**, v. 11, n. 4, p. 283-288, 2007.

BARBOSA, D. *et al.* Low-level laser therapy combined with platelet -rich plasma on the healing calcaneal tendon: a histologic al study in a rat model. **Lasers Med Sci** v. 28, p. 1489–1494, 2013.

BARBOSA, J. H. P.; OLIVEIRA, S.L.; SEARA, L.T. O papel dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes. **Arq Bras Endocrinol Metab**. v..52, n. 6, p. 940-6, 2008.

BERTONILI, G. R.; SILVA, T. S.; TRINDADE, D. L. Efeitos do laser de baixa potência sobre a dor e edema no trauma tendíneo de ratos. **Revista Brasileira de Medicina no Esporte**, Niterói, v.14, n.4, jul/ago 2008.

BOLTON, N. R., *et al.* Computed tomography to visualize and quantify the plantar aponeurosis and flexor hallucis longus tendon in the diabetic foot. **Clin. Biomech.** (Bristol, Avon) v. 20, n. 5, p. 540–546, 2005.

BUB, J. L.; OLERUD, J. E. Diabetes Mellitus. In: Freedberg IM, Elsen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI, McGraw-Hill, editors. Chapter 168. **Fitzpatrick's dermatology in general medicine**. New York: McGraw-Hill; p. 1651-61, 2003.

CAMPANA, É. M. G.; BRANDÃO, A. A. O acometimento renal na hipertensão arterial e diabetes mellitus tipo 2: como identificar e prevenir? A visão do cardiologista. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**. v. 12 (Supl. 1), p. 44-52, 2013.

CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. Cicatrização de feridas. **ABCD, Arq. Bras. Cir. Dig.**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 51-58, Mar. 2007.

CARVALHO, E. N.; CARVALHO, N. A. S.; FERREIRA, L. M. Modelo experimental de indução do *diabetes mellitus* em ratos. Experimental model of induction of diabetes mellitus in rats. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v. 18, 2003.

CASALECHI, H. A. *et al.* Low-level laser therapy in experimental model of collagenase-induced tendinitis in rats: effects in acute and chronic inflammatory phases. **Lasers Med Sci**, v. 28, p. 989–995, 2013.

CHEN *et al.*, C. H., *et al.* Low-level laser irradiation promotes cell proliferation and mRNA expression of type 1 collagen and decorin in porcine Achilles tendon fibroblasts in vitro. **J Orthop Res**, v. 27, p. 646-50, 2009.

DE OLIVEIRA, R. R. *et al.* Alterations of tendons in patients with diabetes mellitus: a systematic review. **Diabetic Medicine**, no-no, 2010.

DELAMAIRE M. *et al.* Impaired leucocyte functions in diabetic patients. **Diabet Med**. v. 14, p. 29-34, 1997.

DIDOMENICO, L. A., K.; WILLIAMS; A. F. PETROLLA. Spontaneous rupture of the anterior tibial tendon in a diabetic patient: results of operative treatment. **J. Foot Ankle Surg**. v. 47, n. 5, p. 463–467, 2008.

DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Sociedade Brasileira de Diabetes**, 2015-2016.

EBRAHIMI T. *et al.* The Influence of Low-Intensity Laser Therapy on Bone Healing. **Journal of Dentistry, Tehran University of Medical Sciences**. v. 9, n. 4, p. 238-48, 2012.

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

ENWEMEKA, C. S. Attenuation and penetration of visible 632.8nm and invisible infra-red 904nm light in soft tissues. **Laser Therapy**, v. 13, p. 95-101, 2001.

FIÓRIO, F. B. *et al.* Effect of incoherent LED radiation on third-degree burning wounds in rats. **Journal of Cosmetic and Laser Therapy**, v. 13, n. 6, p. 315-322, 2011.

FUKUDA, T. Y.; MALFATTI, C. A. Analysis of low-level laser therapy doses in Brazilian equipment. **Rev Bras Fisioter.** v. 12, n. 1, p.70-4, 2008.

GRIECO, F. A. D. Estudo da imunomarcção da interleucina-6 (IL-6) no periodonto de ratos submetidos à movimentação ortodôntica e laserterapia de baixa intensidade. 2014. 63 f. Tese (Doutorado em Odontologia)-Universidade Cruzeiro do Sul, São Paulo, 2014.

GROSS, J. L. *et al.* Diabetes Melito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. **Arq Bras Endocrinol Metab**, São Paulo, v. 46, n. 1, Feb. 2002.

GUERRA, F. R. *et al.* LLLT improves tendon healing through increase of MMP activity and collagen synthesis. **Lasers Med Sci.** v. 28, p. 1281–1288, 2013.

HARRIS, M. I. Diabetes in America: Epidemiology and scope of the problem. **Diabetes Care**, 21 (Sup. 3), p. 11-14, 1998.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas**. Belgium: IDF. 2013.

JACOBSON, A. M. *et al.* A 23-year follow-up of the Diabetes Control and Complications/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications cohort. **Diabetes care.** v 36. p. 3131-38. 2013.

LEEPER, N. J.; COOKE, J. P. MicroRNA and Mechanisms of Impaired Angiogenesis in Diabetes Mellitus. **Circulation**, v.123, p. 236-8, 2011.

LOW, Q. E. *et al.* Wound healing in MIP-1alpha(-/-) and MCP-1(-/-) mice. **Am. J. Pathol.**, v. 159, p. 457-463, 2001.

MARCOS, R. L. *et al.*, Infrared (810 nm) Low-level Laser Therapy in Rat Achilles Tendinitis: A Consistent Alternative to Drugs. **Photochemistry and Photobiology**, v. 87, p. 1447–1452, 2011.

MINATEL, D. G. *et al.* Fototerapia (LEDs 660/890nm) no tratamento de úlceras de perna em pacientes diabéticos: estudo de caso. **An Bras Dermatol.** v. 84, n. 3, p. 279-83, 2009.

MONNIER, V. M.; KOHNT, R. R.; CERAMI, A. Accelerated age-related browning of human collagen in diabetes mellitus. **Medical Sciences.** v. 81, p. 583-587, 1984.

OLIVEIRA, R. R. *et al.*, Mechanical Properties of Achilles Tendon in Rats Induced to Experimental Diabetes. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 39, n. 5, p. 1528–1534, 2011.

PAPANAS, N., *et al.* Achilles tendon volume in type 2 diabetic patients with or without peripheral neuropathy: MRI study. **Exp. Clin. Endocrinol.Diabetes** v. 117, n. 10, p. 645–648, 2009.

PELEG A. Y., *et al.* Common infections in diabetes: pathogenesis, management and relationship to glycaemic control. **Diabetes Metab Res Rev.** v. 23, p.3–13, 2007.

REDDY, G. K. Cross-linking in Collagen by Nonenzymatic Glycation Increases the matrix stiffness in rabbit Achilles Tendon. **Experimental Diab. Res.**, v. 5, p. 143-53, 2004.

REDDY, G. K. Glucose-mediated in vitro glycation modulates biomechanical integrity of soft tissues but not hard tissues. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 21, p. 738-43, 2003.

ROBERTS, T. J., MARSH, R. L. Probing the limits to muscle-powered accelerations: lessons from jumping bullfrogs. **J. Exp. Biol.**, v. 206, Pt 15, p. 2567–2580, 2003.

RODRIGUES; T. C. *et al.* Homeostase pressórica e complicações microvasculares em pacientes diabéticos. **Arq Bras Endocrinol Metab**, São Paulo , v. 49, n. 6, p. 882-890, Dec. 2005.

SCHAFFER, M. *et al.* Magnetic resonance imaging (MRI) controlled outcome of side effects caused by ionizing radiation, treated with 780nm diode laser – preliminary results. 1: **Journal of Photochemistry and Photobiology.B: Biology**, Lausanne, v. 59, n.1-3, p. 1-8, dec. 2000.

SILVA, M. B. G.; SKARE, T. L. Manifestações musculoesqueléticas em diabetes mellitus. **Rev. Bras. Reumatol.**, São Paulo , v. 52, n. 4, p. 601-609, Aug. 2012.

SILVEIRA, A. C. M.; NERY, C. A. S. Estudo macroscópico e morfométrico do tendão do músculo tibial posterior. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 34, n. 8, p. 475-480, 1999.

SMITH; L. L.; BURNET. S.P.; MCNEIL, J. D. Musculoskeletal manifestations of diabetes mellitus. **Br J Sports Med.** v. 37, n. 1, p. 30-5. 2003.

VINCK, E. M. *et al.* Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. **Lasers in Medical Science**, London, v.18, n.2, p. 95-99, may 2003.

YAGIHASHI, S.; MIZUKAMI, S.; SUGIMOTO, K. Mechanism of diabetic neuropathy: Where are we now and where to go? **Journal of Diabetes Investigation**, v. 2, n. 1, p. 19-27, 2011.

YU, C. *et al.* Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 52, p. 50230–6, dez. 2002.

ZANTOP T.; TILLMANN B.; PETERSE W. Quantitative assessment of blood vessels of the human Achilles tendon: an immunohistochemical cadaver study. **Arch Orthop Trauma Surg.** v. 123, p. 501-04, 2003.

APÊNDICE A – Artigo de Revisão Sistemática**EFICÁCIA DA TERAPIA FOTOBIMODULADORA DE BAIXA INTENSIDADE NA
ATENUAÇÃO DOS DANOS CAUSADOS AS PROPRIEDADES BIOMECÂNICAS DO
TENDÃO DO CALCÂNEO DE RATOS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA**

Waydja Lânia Virgínia de Araújo Marinho^a,

Paula Ketilly Nascimento Alves^b,

Silvia Regina de Arruda Moraes^c.

^a- Programa de Pós Graduação em Fisioterapia - Mestrado – Universidade Federal de Pernambuco –Brasil; email: waydjaa@gmail.com

^b-Graduação em Fisioterapia - Universidade Federal de Pernambuco-UFPE – Brasil; email: paulaket_2007@hotmail.com

^c-Laboratório de Plasticidade Neuromuscular - Departamento de Anatomia - Universidade Federal de Pernambuco-UFPE – Brasil; sramoraes@gmail.com

* Corresponding author: Tel.: +55-81-983196724.

E-mail address: waydjaa@gmail.com (W. L. V. A. MARINHO)

TÍTULO:

EFICÁCIA DA TERAPIA FOTOBIMODULADORA DE BAIXA INTENSIDADE NA ATENUAÇÃO DOS DANOS CAUSADOS AS PROPRIEDADES BIOMECÂNICAS DO TENDÃO DO CALCÂNEO DE RATOS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

RESUMO

Introdução: A Laserterapia tem demonstrado uma influência no crescimento de células fibroblásticas, na expressão do colágeno tipo 1 e de proteoglicanos, efeito esse que poderia atenuar os distúrbios na matriz celular, protegendo o tendão e melhorando suas propriedades biomecânicas. **Objetivo:** Realizar uma revisão sistemática sobre estudos experimentais que analisam os variados protocolos de Laserterapia, de modo a avaliar qual é mais eficaz na atenuação dos danos causados pela Tenotomia nas propriedades biomecânicas do tendão do calcâneo de ratos. **Fonte de dados:** Realizada pesquisa de dados sem restrição de idioma ou período de publicação, utilizando as bases de dados COCHRANE, MEDLINE/PUBMED, LILACS, WEB OF SCIENCE, bem como as referências encontradas nos estudos. **Extração de dados:** Extração independente de artigos por dois revisores que posteriormente foram analisados quanto a sua qualidade metodológica, utilizando a escala própria para avaliar estudos experimentais Syrcle. **Síntese de dados:** 17 artigos foram incluídos no estudo. **Conclusão:** Os resultados sugerem que, a terapia a laser para tratamento de tendinopatias é, por si só, eficaz para a cicatrização do tendão, porém a combinação dos tratamentos resulta em redução adicional na regeneração do tendão, acelerando o tempo e o processo de cicatrização.

Palavras Chave: Laserterapia; Tendinopatia; Ratos; Revisão Sistemática.

ABSTRACT

Introduction: Laser therapy has shown an influence on the growth of fibroblast cells, the expression of type 1 collagen and proteoglycans, which could attenuate the disturbances in the cell matrix, protecting the tendon and improving its biomechanical properties.

Objective: To perform a systematic review of experimental studies that analyze the various protocols of Laser Therapy in order to evaluate which is more effective in attenuating the damage caused by Tenotomy in the biomechanical properties of the calcaneus tendon of rats.

Data source: Data search was carried out without restriction of language or period of publication, using the databases COCHRANE, MEDLINE/PUBMED, LILACS, WEB OF SCIENCE, as well as the references found in the studies.

Data extraction: Independent extraction of articles by two reviewers who were later analyzed for their methodological quality, using the proper scale to evaluate experimental studies Syrcle.

Data synthesis: 17 articles were included in the study. **Conclusion:** The results suggest that laser therapy for the treatment of tendinopathies is effective in tendon healing, but the combination of treatments results in an additional reduction in tendon regeneration, accelerating the time and healing process.

Keywords: Laser therapy; Tendinopathy; Rats; Systematic Review.

INTRODUÇÃO

A fotobiomodulação, através da aplicação de laser, atua sobre os tecidos como reações não térmicas (SCHAFFER *et al.*, 2000). Moléculas com propriedades fotorreceptoras que estão distribuídas nas células (flavoproteínas, porfirinas, citocromo, tirosina e asparaginina), ao receber radiação com comprimento de onda específico, provocam variações no metabolismo celular (AMAT *et al.*, 2005). Apesar da inespecificidade dos estímulos lesivos, as lesões teciduais são responsáveis pela resposta inflamatória, e,

para fins de reparação tecidual, o emprego da luz encontra vantagens no que se refere à ação menos invasiva, muitas vezes mais barata, ocupando menos tempo quando comparada a outras modalidades terapêuticas e a praticidade de aplicação (VINCK *et al.*, 2003).

Esse efeito esse que poderia atenuar os distúrbios na matriz celular, protegendo o tendão e melhorando suas propriedades biomecânicas. Além disto, a Laserterapia pode promover o realinhamento das fibras de colágeno (ELWAKIL, 2007; CHEN *et al.*, 2009). Vários estudos clínicos avaliaram a fototerapia no tratamento de vários tipos de úlceras crônicas, mas diferem quanto ao protocolo utilizado (comprimento de onda, potência, intensidade), que geram descrença da real eficácia de seu uso na cicatrização tecidual (MINATEL *et al.*, 2009). Várias modalidades terapêuticas, com o objetivo de acelerar o processo regenerativo, tem demonstrado que a fotobiomodulação, através da radiação laser de baixa intensidade com os diferentes comprimentos de onda, interage de diferentes formas no reparo tendíneo (ARRUDA *et al.*, 2007).

A padronização de protocolos de avaliação experimental em laboratório do uso da Laserterapia em lesões tendíneas permanece obscura, principalmente no que se refere à avaliação tendínea. Desta forma, realizamos uma revisão sistemática sobre estudos experimentais que analisam os variados protocolos de Laserterapia, de modo a avaliar qual é mais eficaz na atenuação dos danos causados pela Tenotomia nas propriedades biomecânicas do tendão do calcâneo de ratos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram consultados artigos indexados nas bases de dados COCHRANE e MEDLINE/PUBMED (MesH); e SCIELO, LILACS, WEB OF SCIENCE (DeCS) conduzida em Agosto a Dezembro de 2015. Como estratégia de busca, em todas as bases de dados foram utilizados dois descritores de forma combinada, que foram extraídos do *Medical*

Subject Headings (MeSH) e do *Descritores em Ciências da Saúde (DeCS)*.

Para a busca dos artigos obedeceu-se a seguinte sistematização (para as bases de dados que utilizam o MESH):

- 1) Rats Wistar “AND” Achilles Tendon
- 2) Rats Wistar “AND” Lasers Therap Low Level
- 3) Achilles Tendon “AND” Lasers Therap Low Level
- 4) Rats Wistar “AND” Achilles Tendon “AND” Lasers Therap Low Level

Para a busca dos artigos obedeceu-se a seguinte sistematização (para as bases de dados que utilizam o DECS):

- 1) Rats, Wistar “AND” Achilles Tendon
- 2) Rats, Wistar “AND” Laser Therapy, Low-Level
- 3) Achilles Tendon “AND” Laser Therapy, Low-Level
- 4) Rats, Wistar “AND” Achilles Tendon “AND” Laser Therapy, Low-Level

Os estudos foram considerados elegíveis para inclusão quando corresponderam aos seguintes critérios: 1) estudos experimentais com ratos da linhagem *Wistar* com tendinopatias, 2) uso da Laserterapia de baixa intensidade. Não houve restrição de linguística nem de data para a seleção dos estudos encontrados.

As buscas foram realizadas nas bases de dados eletrônicas por dois pesquisadores independentes treinados bem como as referências encontradas nos estudos, um terceiro pesquisador foi consultado mediante resultados discrepantes para que as dúvidas acerca dos critérios de elegibilidade dos artigos fossem sanadas.

A sistematização da busca e artigos inclusos na análise qualitativa encontram-se no fluxograma representado na Figura 1.

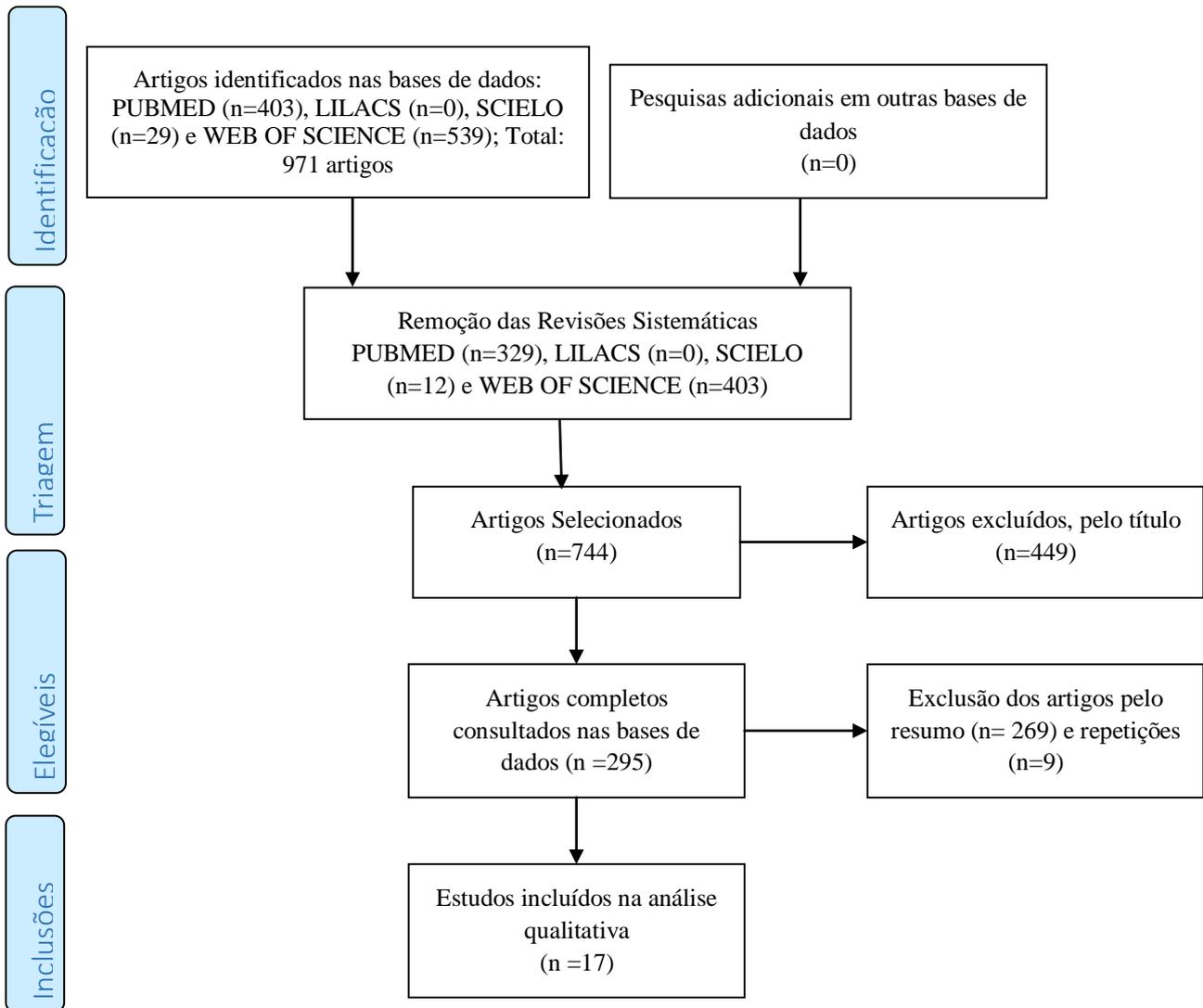


Figura 1: Fluxograma dos artigos incluídos na análise qualitativa

RESULTADOS

A busca inicial gerou 971 artigos, que foram submetidos a primeira triagem, entre estes, foram excluídos os artigos de revisão sistemática. Os 744 artigos restantes foram submetidos a segunda triagem, dos quais foram excluídos os que não citavam qualquer tipo de intervenção terapêutica no tendão de ratos da linhagem Wistar em seu título. Os 295 artigos restantes, foram avaliados a partir do resumo. Após as etapas iniciais, foram excluídos os que não se enquadrassem nos critérios de elegibilidade. Dessa forma restaram 17 artigos.

Os estudos demonstraram um resultado satisfatório da Laserterapia no tendão de Aquiles lesionado, resultados que incluem a estimulação do processo de reparação (alinhamento de tecido e proliferação de colágeno), ainda citam que não foram observadas aderências fibrosas nem aumento do diâmetro transversal dos tendões.

A Laserterapia de baixa intensidade exibiu uma proteção em média de 7 dias após a lesão, atuando controlando a inflamação do processo através da redução das enzimas. O uso do Laser entre 1 e 6J mostrou a melhor recuperação do tendão, bem como, o melhor desempenho mecânico após 7 dias ao utilizar em ensaios de tração mecânica. Apesar da inclusão de 17 artigos, não pudemos alçar uma metanálise pela heterogeneidade dos mesmos.

DISCUSSÃO

A análise qualitativa encontra-se disposta em 3 tabelas, incluindo a análise pela ferramenta *Syrcla* (Tabela 1). Dois avaliadores independentes seguiram as etapas metodológicas, um terceiro avaliador só foi consultado quando houve disparidade da inclusão, mediante os critérios de elegibilidade.

Um dos estudos fez uso de fêmeas, que apesar de serem da mesma linhagem, fisiologicamente respondem de forma diferente, independente do recurso utilizado (ARRUDA *et al.*, 2007). Todos os estudos avaliaram o tendão do calcâneo, porém após diferentes terapias e combinações, além dos parâmetros do laser. O “n” variou de 28 a 150 animais alocados nos mais diversos grupos, sendo os mais predominantes: tratados com laser, sem tratamento e com tratamento placebo.

A variação da idade entre os estudos também deve ser considerada, pois fisiologicamente há respostas diferentes por cada faixa etária, bem como o peso dos animais, que é diretamente proporcional à idade, predominante de 12 semanas. Apenas o estudo de Lima *et al.* (2012) cita a proveniência dos animais, outro fator preponderante que não foi elucidado diz respeito ao cegamento e aleatorização das amostras (esta última quando citada, não deixa claro os critérios adotados). A tendinopatia tratada em cada estudo diferiu com etiologias de imunossupressão à lesão traumática, além de compressão e escarificação, e trauma de único impacto.

Os estudos demonstram que a Laserterapia de baixa intensidade teve um efeito modulador significativo sobre mediadores inflamatórios durante a cicatrização de incisões do tendão do calcâneo em ratos, causando uma diminuição nas citocinas pró-inflamatórias (Tabela 2). Lima *et al.* (2012) demonstraram que houve aumento na atividade fibroblástica, o que sugere aumento na largura do tendão. No entanto, existem limitações para a aplicabilidade desta dedução em seres humanos. Embora os resultados deste estudo apontem para a deposição de colágeno maior com uma dose de 6 J/cm², não há consenso sobre a dosagem ideal.

Tabela 2. Características dos estudos elegíveis para revisão.

Autor/ano	Amostra e Grupos	Parâmetros do Laser	Tratamentos
ARRUDA et al., 2007	37 ratas.	904nm, pulsado, dose de 3J/cm ²	Tratados com laser, sem tratamento e com tratamento placebo.
BERTOLINI et al., 2008	28 ratos	670 nanômetros, forma pontual e contínua, 2J/cm ² , 4J/cm ² e 8J/cm ² .	Placebo e laser 2J/cm ² , 4J/cm ² e 8J/cm ² .
BUSARELLO et al., 2011	23 ratos	670 nm, dose de 2 J/cm ²	Placebo e laser
CASALECHI et al., 2012	30 ratos	780 nm, dose de 1,54 J	Injetados com colagenase e tratados com o laser
CASALECHI et al., 2013	65 ratos	830 nm técnica de contato, dose de 6 J	Laser e Diclofenaco
DE CARVALHO et al., 2015		660 a 830 nm, dose 0,028J cm ² em três pontos	Laser 660 nm , 830 nm, 660 nm, 830 nm
DE JESUS et al., 2014a	65 ratos	17,5 J / cm ² de fluência durante 10 s	Laser: 1, 3 e 7 aplicações
DE JESUS et al., 2014b	65 ratos	Dose 0,7 J.	Laser 1, 3, ou 7 dias, grupo Sham 1, 3, e 7
DE SOUZA et al., 2015	15 ratos	904 nm,, 3 J / cm ²	Laser, exercício excêntrico
FILLIPIN et al., 2005	32 ratos	904 nm, 5J, de forma contínua.	Laser
LARAIA et al., 2012	30 ratos	660 nm, 6 J, 60 s.	Laser e placebo
LIMA et al., 2012	40 ratos	3J e 6J	Laser em lesão e placebo
MARCOS et al., 2011	150 ratos	810 nm; doses de 1J, 3J e 6J	Laser, colagenase e placebo
MARCOS et al., 2012	12 ratos	810 nm, 1 e 3 J	Laser e diclofenaco
MARCOS et al., 2013	60 ratos	810 nm, doses de 1 e 3 J.	Laser e colagenase
PINFILDI et al., 2014	60 ratos	830 nm, dose 1,12J contato apenas num ponto	Laser e Placebo
TORRES-SILVA et al., 2014	30 ratos	660 nm, doses de 1 e 3 [J.	Laser e Placebo .

Os resultados de Marcos et al. (2012) também corroboram a maioria, que demonstram que a Laserterapia de baixa intensidade é capaz de preservar as características dos tendões com a similaridade dos tendões saudáveis em modelo experimental. Houve uma enorme diferença na metodologia da aplicação do laser (Tabela 3), sendo o modo mais usado: contínuo com dose de $3\text{J}/\text{cm}^2$.

No geral, houve aumento na atividade fibroblástica promovido pela Laserterapia, o que sugere aumento na largura do tendão. No entanto, existem limitações para a aplicabilidade desta dedução em seres humanos. Embora os resultados apontem para a deposição de colágeno aumentada com uma dose maior, não há consenso sobre a dosagem ideal. Pudemos observar que a maioria das metodologias foram descritas minuciosamente, porém os estudos apresentam alto risco de viés por não estarem em consenso com os domínios da ferramenta.

Tabela 3. Síntese dos resultados e limitações dos estudos elegíveis para revisão.

Autor/ano	Resultados	Correlações com outras variáveis
Arruda, E. R. B. et al., 2007	Tiveram evidências qualitativas na aparência da organização das fibras de colágeno no tendão, demonstrando que os grupos tratados com laser estão em melhores condições de organização estrutural. A junção dos dois tipos de laser no mesmo tendão mostrou ser mais efetiva na organização das fibras colágenas.	O tendão calcâneo lesado cirurgicamente foi submetido a um tratamento placebo (emissor laser desligado, os animais foram submetidos ao mesmo estresse da simulação do tratamento).
Bertolini, G. R. F. et al., 2008	O laser de baixa potência mostrou-se como uma ferramenta em potencial, pois houveram efeitos de redução nos níveis de COX-2 e PGE ₂ , além de redução do edema inflamatório por provável ação na liberação de hormônios adrenais. Na avaliação histopatológica, observou que o laser produziu alterações fibroproliferativas bem organizadas, com bandas de colágeno alinhadas. O grupo tratado apresentou melhora nas propriedades biomecânicas.	O tendão calcâneo submetido à lesão traumática com tratamento placebo.
Busarello, F. O. et al., 2011	Houve diminuição significativa da TEP (Teste de incapacidade funcional (tempo de elevação da pata) para GP e GL em 48 horas, sendo que para GL também ocorreu em 24 horas (p<0,05). Como também, diminuição da dor no Teste de pressão crescente na pata dos ratos (filamento pata).	Indução a imunossupressão.
Casalechi, H. L. et al., 2012	Laser de Baixa Intensidade (LBI) foi capaz de modular a expressão do gene ARNm de IL-10, VEGF, MMP1, e MMP13 na fase aguda do que na inflamatória crônica. Os resultados sugerem que LBI com os parâmetros utilizados no estudo foi capaz de modular a IL-10, o VEGF, MMP1, e a expressão do gene ARNm MMP13 na fase aguda do que na fase crônica.	-
Casalechi, H. L. et al., 2013	Os grupos apresentaram aumento do colágeno tipo I e III. Na análise biomecânica mostrou aumento na resistência à ruptura, bem como aumento do ângulo rigidez. Dessa forma, concluiu-se que o tratamento com LIL nos parâmetros utilizados e os tempos estudados reduz a migração de células inflamatórias e melhora a qualidade da reparação enquanto reduzir as limitações funcionais. O grupo lesado tratado com diclofenaco mostrou menos resultados, indicando um agravamento destas propriedades mecânicas.	Tratados com diclofenaco.
de Carvalho, P. K. et al., 2015	Não houve diferença significativa no efeito do laser vermelho e do infravermelho no número de fibroblastos. Porém, mostraram diferenças na quantidade de colágeno (I e III) nos tecidos para os grupos experimentais tratados com PRP e laser.	Tratamento com rico em plaquetasplasma (PRP).

de Jesus, J. F. et al., 2014a	As principais conclusões do estudo foram reduções na IL-1 β , inibidores de COX-2 e PGE2 a níveis próximos do normal, após três e sete aplicações de LBI nos tendões de Aquiles feridos, eles apresentaram um processo de reparação lento, e esta característica está diretamente associado a presença dos agentes inflamatórios. Porém, houve uma diminuição em todos os agentes inflamatórios.	-
de Jesus, J. F. et al., 2014b	O presente estudo demonstra uma satisfatória interação entre LBI e o tendão de Aquiles lesionado, incluindo a estimulação do processo de reparação (alinhamento de tecido e proliferação de colágeno).	-
de Souza, M. V. et al., 2015	Não foram observadas aderências fibrosas nem aumento do diâmetro transversal dos tendões. Os animais tratados com exercício mas não tratados com a terapia laser, apresentaram menor capacidade locomotora.	A terapia com laser associado com excêntrico exercício de caminhada downhill, começou 24 horas depois de Tendinite, cirurgicamente induzida por compressão e escarificação.
Fillipin, L. I. et al., 2005	A histologia mostrou uma perda da arquitetura normal, com reação inflamatória, angiogênese, vasodilatação, e formação da matriz extracelular após o trauma, acompanhada por um aumento significativo na concentração de colágeno quando comparada ao grupo de controle.	Laserterapia de baixa intensidade (LBI) sobreestresse oxidativo e fibrose em um modelo experimental de lesão no tendão de Aquiles induzida por um trauma único impacto.
Laraia, E. M. S. et al., 2012	Os resultados do estudo demonstram que a Laserterapia de baixa intensidade teve um efeito modulador significativo sobre mediadores inflamatórios durante a cicatrização de incisões do tendão do calcâneo em ratos, causando uma diminuição nas citocinas pró-inflamatórias.	Laserterapia de baixa intensidade(LBI; 660 nm) sobre os níveis de expressão de proteína de mediadores inflamatórios.
Lima, J. G. M. et al., 2012	Houve aumento na atividade fibroblástica promovido por um LILT, o que sugere aumento na largura do tendão. No entanto, existem limitações para a aplicabilidade desta dedução em seres humanos. Embora os resultados deste estudo apontam para a deposição de colágeno maior com um dose de 6 J / cm ² , não há consenso sobre a dosagem ideal.	Síntese de colágeno in vivo, variações das densidades de energia da Laserterapia nos resultados da atividade fibroblástica.
Marcos, R. L. et al., 2011	Neste estudo o modelo utilizado é adequado para a avaliação dos efeitos de tratamentos anti-inflamatórios. 810 nm, 100 mW, administrado com uma dose de energia de 3J significativamente a permeabilidade vascular e formação de edema em comparação com nenhum tratamento.	Expressão do gene COX-2 e a expressão do gene de produção de PGE2 de COX-2 derivada. De COX-2 e a expressão do gene a formação de edema, semelhante a permeabilidade vascular e significativamente menos para a inibição da COX-2 derivada de PGE2.
Marcos, R. L. et al., 2012	Os resultados demonstram que a LLLT é capaz de preservar as características de tendões, com a similaridade tendões saudáveis em modelo experimental. Um único tratamento com LBI aplicadas 1 há pós lesão induzida por colagenase significativamente resposta inflamatória de curto prazo, o que leva a um aumento da resistência do tendão aos 7	Expressão do gene COX-2, PGE ₂ , TNF- α , MMP – 3, MMP – 9, MMP – 13, Biomecânica.

Marcos, R. L. et al., 2013	<p>dias. Em relação análises bioquímicas 3 J foi a melhor dose, e com relação a análise biomecânica 1 J foi a melhor dose.</p> <p>A terapia laser de baixa intensidade exibiu uma proteção em 7 dias após a lesão, controlando a inflamação do processo através da redução das enzimas MMP. O uso do Laser com 1 J mostrou a melhor recuperação do tendão, bem como, o melhor desempenho mecânico após 7 dias ao utilizar em ensaios de tração.</p>	<p>Tendinite foi induzida utilizando colagenase. O mesmo volume de PBS sem colagenase foi injetada, utilizando o mesmo procedimento no grupo de controle, e tratados com diclofenaco.</p>
Pinfildi, C. E. et al., 2014	<p>Os resultados indicaram que os grupos tratados com o laser apresentaram uma quantidade maior e estatisticamente significativo de mastócitos 6 h, 24 h, e 2 dias após a ruptura em comparação com os grupos de simulação; que contribui para a primeira fase de inflamação no processo de cura.</p>	<p>O tendão do calcâneo submetido à lesão traumática com tratamento placebo.</p>
Torres-Silva, R, et al., 2014	<p>O tratamento com diclofenaco de sódio e de laser 1 J não foi eficaz na redução dos mediadores inflamatórios. A terapia laser de baixa intensidade (660 nm, 100 mW) a 3 J foi eficaz na redução da inflamação neste modelo.</p>	<p>Um grupo (chamado D) foi tratada com sódio diclofenaco.</p>

CONCLUSÃO

Dos estudos selecionados, apenas quatro apresentaram baixo risco de viés, as dosagens utilizadas por eles ficaram na faixa de 3J e 6J. Foram citadas propriedades anti-inflamatórias e melhora da qualidade da reparação, resultando na redução das limitações funcionais. Os resultados sugerem que, a terapia a laser para tratamento de tendinopatias é, por si só, eficaz para a cicatrização do tendão, acelerando o tempo e o processo de cicatrização. As respostas mais observadas são a diminuição da resposta inflamatória, a estimulação da neovascularização, a aceleração da cicatrização de feridas, e reparação do músculo esquelético após a lesão, além da indução de síntese de proteínas no tratamento.

REFERÊNCIAS

Amat, A. et. al. Modification of the intrinsic fluorescence and the biochemical behavior of ATP after irradiation with visible and near-infrared laser light. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Lausanne; 2005, 81:1, 26-32.

Arruda, E.R.B. et al. Influência de diferentes comprimentos de onda da Laserterapia de baixa intensidade na regeneração tendínea do rato após tenotomia. *Rev. bras. fisioter.*, 2007; 11:4, 283-288.

Bertolini, G. R. F. *et al.*, Efeitos do Laser de Baixa Potência Sobre a Dor e Edema no Trauma Tendíneo de Ratos. *Rev Bras Med Esporte*, 2008, 14:4.

Busarello, F. O. *et al.*, Análise da eficácia do laser de baixa potência no tratamento da dor tendínea em ratos imunossuprimidos. *Fisioter Pesq*, 2011, 18:4, 335-40.

Casalechi, H. L. *et al.*, Low-level laser therapy in experimental model of collagenase-induced tendinitis in rats: effects in acute and chronic inflammatory phases. *Lasers Med*

Sci, 2012, 28, 989–995.

Casalechi, H. L. *et al.*, Analysis of the effect of phototherapy in model with traumatic Achilles tendon injury in rats. *Lasers Med Sci*, 2013, 29, 1075–1081.

Chen, C.H.; *et al.* Low-level laser irradiation promotes cell proliferation and mRNA expression of type 1 collagen and decorin in porcine Achilles tendon fibroblasts in vitro. *J Orthop Res*, 2009, 27, 646-50.

De Carvalho, P. K. *et al.*, Analysis of experimental tendinitis in rats treated with laser and platelet-rich plasma therapies by Raman spectroscopy and histometry. *Lasers Med Sci* .2015.

De Jesus, J. F. *et al.* (a), Low-level laser therapy in IL-1 β , COX-2, and PGE2 modulation in partially injured Achilles tendon. *Lasers Med Sci*, 2014, 30, 153–158.

De Jesus, J. F. *et al.* (b) Low-Level Laser Therapy on Tissue Repair of Partially Injured Achilles Tendon in Rats. *Photomedicine and Laser Surgery*, 2014, 32:6.

De Souza, M. V. *et al.*, Achilles Tendon Of Wistar Rats Treated With Laser Therapy And Eccentric Exercise. *Rev Bras Med Esporte*. 2015, 21:5.

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

Fillipin, L. I. *et al.*, Low-Level Laser Therapy (LLLT) Prevents Oxidative Stress and Reduces Fibrosis in Rat Traumatized Achilles Tendon. *Lasers in Surgery and Medicine*, 2005,37, 293-300.

Laraia, E. M. S. *et al.*, Effect of Low-Level Laser Therapy (660 nm) on Acute Inflammation

Induced by Tenotomy of Achilles Tendon in Rats. *Photochemistry and Photobiology*, 2012, 88, 1546–1550.

Lima, J. G. M. *et al.*, Influence of Low Intensity Laser Therapy (AsGa) on the Cicatrization Process of Mechanic Tendon Injury in Wistar Rats. *Laser Physics*, 2012, 22:9, 1445–1448.

Marcos, R. L. *et al.*, Infrared (810 nm) Low-level Laser Therapy in Rat Achilles Tendinitis: A Consistent Alternative to Drugs. *Photochemistry and Photobiology*, 2011, 87,1447–1452.

Marcos, R. L. *et al.*, Low-Level Laser Therapy in Collagenase-Induced Achilles Tendinitis in Rats: Analyses of Biochemical and Biomechanical Aspects. *Journal Of Orthopaedic Research*, 2012.

Marcos, R. L. *et al.*, Biomechanical and biochemical protective effect of low-level laser therapy for Achilles tendinites. *Journal of the mechanical behavior of biomechanical materials*, 2013, 29, 272-285.

Minatel, D. G. *et al.* Fototerapia (LEDs 660/890nm) no tratamento de úlceras de perna em pacientes diabéticos: estudo de caso. *Bras Dermatol*, 2009, 84:3, 279-83.

Pinfildi, C. E. *et al.*, Mast Cell Curve-Response in Partial Achilles Tendon Rupture After 830 nm Phototherapy. *Photomedicine and Laser Surgery*, 2014, 32:2.

Schaffer, M. *et al.* Magnetic resonance imaging (MRI) controlled outcome of side effects caused by ionizing radiation, treated with 780nm diode laser – preliminary results. 1: *Journal of Photochemistry and Photobiology.B: Biology*, Lausanne, 2000, 59:1-3, 1-8.

Silveira, A.C.M.; Nery, C.A.S. Estudo macroscópico e morfométrico do tendão do músculo tibial posterior. *Revista Brasileira de Ortopedia*, 1999, 34:8, 475-480.

Torres-Silva, R, *et al.*, The low level laser therapy (LLLT) operating in 660 nm reduce gene expression of inflammatory mediators in the experimental model of collagenase-induced rat tendinitis. *Lasers Med Sci*, 2014, 30,1985–1990.

Vinck, E. M. *et al.* Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. *Lasers in Medical Science*, London, 2003, 18:2, 95-99.

APÊNDICE B – Artigo original

EFEITO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE DE 3J E 6J SOBRE O AS PROPRIEDADES BIOMECÂNICAS DO TENDÃO DO CALCÂNEO DE RATOS DIABÉTICOS

Waydja Lânia Virgínia de Araújo Marinho^{a*}, Paula Ketilly Nascimento Alves^b, Wenddy Wyllie Damascena Sougey^b, Magno Felipe Holanda Barboza Inácio Teixeira^e, Cybelle da Silva Nery^c, Márcio Almeida Bezerra^f, Ana Cristina Falcão Esteves^{cd}, Silvia Regina de Arruda Moraes^{cd}.

^a - Programa de Pós Graduação em Fisioterapia - Mestrado – Universidade Federal de Pernambuco –Brasil

^b-Graduação em Fisioterapia - Universidade Federal de Pernambuco-UFPE – Brasil

^c-Departamento de Fisioterapia - Universidade Federal de Pernambuco-UFPE - Brasil

^d- Departamento de Anatomia - Universidade Federal de Pernambuco – UFPE- Brasil

^eDepartamento de Engenharia Química - Universidade Federal de Pernambuco – UFPE- Brasil

^fDepartamento de Fisioterapia - Universidade Federal do Ceará – UFC - Brasil

RESUMO

Introdução. As complicações crônicas do Diabetes incluem alterações macrovasculares e microvasculares, que podem originar degeneração tendínea e causar alterações biomecânicas como o aumento da deformação tendínea associada a uma diminuição da viscoelasticidade e redução da área de seção transversal. **Objetivos.** Determinar o efeito da Laserterapia de Baixa Intensidade de 3J e 6J na resposta biomecânica do tendão do calcâneo de ratos induzidos ao diabetes. **Métodos.** A amostra foi composta por 45 ratos machos da raça *Rattus Novergicus Albinus*, da linhagem *Wistar* mantidos em gaiolas em grupos de três/quatro e submetidos as condições normais de um biotério com ciclos claro/escuro invertido. Aos 60 dias de vida, os animais foram induzidos ao DM através de injeção intraperitoneal de Estreptozotocina (55mg/kg). Para a terapia de biofotomodulação foi utilizado um aparelho Phothon Laser III da marca DMC, doses de 3J e 6J, em 21 sessões consecutivas pelo método do contato, modo pontual, caneta com diodo de GaAs no tendão do calcâneo. Os animais do grupo controle foram sujeitos apenas a manipulação. Após o período de intervenção, foi realizada a coleta do material biológico, e em seguida encaminhados para o ensaio

biomecânico. Os dados foram tratados estatisticamente através SPSS Statistics versão 18.0, utilizando-se *Anova* com um fator (*One way*) com *post hoc Tukey*. **Resultados.** No acompanhamento do Peso dos animais, a média do Grupo Controle ($286,97 \pm 19,39$) apresentou-se mais elevada do que o Grupo Diabético ($248,72 \pm 13,96$), Grupo Diabético Laser 1 ($247,20 \pm 10,39$) e o Grupo Diabético Laser 2 ($260,96 \pm 14,08$). Após o tratamento observou-se diferença nos seguintes parâmetros: Deformação Específica Força Máxima: GDL1 ($300,85 \text{ mm} \pm 143,59$) e GDL2 ($365,55 \text{ mm} \pm 193,71$) < GC ($147,35 \text{ mm} \pm 65,04$) ($p = 0,018$ e $p = 0,018$, respectivamente); Módulo Elástico: GDL1 ($8,54 \text{ MPa} \pm 5,25$) e GDL2 ($11,00 \text{ MPa} \pm 7,03$) < GD ($26,43 \text{ MPa} \pm 18,55$) ($p = 0,033$ e $p = 0,001$) e Área de Secção Transversa: GDL2 ($1,05 \text{ mm}^2 \pm 0,62$) < GC ($2,15 \text{ mm}^2 \pm 1,29$) ($p = 0,027$) e GD ($1,72 \text{ mm}^2 \pm 0,21$) < CG ($p = 0,025$). **Conclusão.** Pudemos observar que houve alterações estruturais tendíneas acarretando melhora na estrutura e biomecânica nos parâmetros Energia/Área, Deformação Específica Força Máxima e Área de Secção Transversa do tendão de ratos induzidos ao DM retardando seu processo degenerativo.

Palavras-Chave: Diabetes Mellitus; Laserterapia; Tendinopatia; Biomecânica.

INTRODUÇÃO

As complicações crônicas do Diabetes incluem alterações macrovasculares e microvasculares (NOZABIELI *et al.*, 2012), que colaboram para taxas de morbidade e mortalidade associadas à enfermidade. A evolução descontrolada do DM pode levar a complicações agudas e crônicas. As agudas normalmente sucedem de eventos esporádicos, e as crônicas originam-se no mau controle glicêmico no decorrer dos anos, ambas são consideradas responsáveis por elevada morbidade e mortalidade (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

A instalação de doenças como o DM podem originar degeneração tendínea e causar alterações biomecânicas como o aumento da deformação tendínea associada a uma diminuição da viscoelasticidade e redução da área de seção transversa do tendão (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Uma das razões que leva ao dano tendíneo é a redução do número e diâmetro dos vasos intratendíneos, acarretando numa escassez na irrigação sanguínea e tornando o tecido mais susceptível a

rupturas. Sua vascularização é extremamente delicada e possui zonas críticas de redução de aporte sanguíneo o que contribui para a ocorrência de rupturas (ZANTOP; TILLMANN; PETERSE, 2003).

A fotobiomodulação, através da aplicação da Laserterapia, tem demonstrado uma influência no crescimento de células fibroblásticas, na expressão do colágeno tipo 1 e de proteoglicanos (CHEN *et al.*, 2009). Esse efeito poderia atenuar os distúrbios na matriz celular, protegendo o tendão e melhorando suas propriedades biomecânicas. Além disto, a Laserterapia pode promover o realinhamento das fibras de colágeno, que se encontram desestruturadas pelo DM, visto que em estudo realizado com a Laserterapia aplicada em tendões que sofreram reparo cirúrgico, estes apresentaram melhor organização das fibras e uma maior resistência no teste biomecânico (ELWAKIL, 2007).

A Laserterapia, quando utilizada em baixa potência, apresenta características de estimulação à proliferação de fibroblastos, redução do processo inflamatório, favorecendo a aceleração na síntese de colágeno, formação de novas fibrilas colágenas e conseqüente aumento na força tênsil final de tendões em processo de reparo (CHEN *et al.*, 2009). As propriedades mecânicas do tendão do calcâneo influenciam diretamente no funcionamento e desempenho do sistema musculoesquelético durante a locomoção.

Nesta perspectiva, há necessidade de uma intervenção que auxilie o estabelecimento dos níveis biomecânicos favoráveis ao manejo do DM. Portanto, o objetivo desse trabalho é determinar o efeito da Laserterapia de Baixa Intensidade de 3J e 6J na resposta biomecânica do tendão do calcâneo de ratos induzidos ao diabetes.

MÉTODOS

A amostra foi composta por 45 ratos machos da raça *Rattus Novergicus Albinus*, da linhagem *Wistar*, mantidos em gaiolas em grupos de três/quatro e submetidos a ciclos claro/escuro invertido de 12 horas e temperatura de $23^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$, e ração (Ração Presence®) e água filtrada *ad libitum*. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos: a) Grupo Controle – GC (n=15), ratos não diabéticos, b) Grupo Diabético – GD (n=10), ratos diabéticos sem nenhuma intervenção, c) Grupo Diabético Laser 1 – GDL1 (n=10), ratos induzidos ao diabetes

mellitus e tratados com Laserterapia de baixa intensidade, dose de 3J/cm²; e d) Grupo Diabético Laser 2 – GDL2 (n=10), ratos induzidos ao diabetes *mellitus* e tratados com Laserterapia de baixa intensidade, dose de 6J/cm².

Ao completarem 60 dias de vida e após um jejum de 12 horas, os animais foram induzidos ao diabetes experimental (tipo 1) através da injeção intraperitoneal de solução de Estreptozotocina Anomeros Mistos (Sigma-Aldrich Brasil Ltda.) 55mg/kg de peso animal por via intraperitoneal diluída em solução tampão de Citrato de Sódio a 10 mM e pH 4,5, em dose única. Os animais do grupo controle receberam a mesma dose apenas de solução tampão citrato de sódio para reproduzir o mesmo estresse da indução. Decorridos 30 minutos após o procedimento todos os animais tiveram livre acesso a ração e a água. Só foram considerados elegíveis para o estudo os animais que apresentaram valores glicêmicos acima de 200 mg/dL (CARVALHO, CARVALHO, FERREIRA, 2003).

O peso corpóreo dos animais foi aferido semanalmente ao longo de todo o experimento. A verificação da glicose sanguínea (Glicosímetro Kit Accu-Chek Active) foi realizada nas seguintes etapas do experimento: após jejum de 12 horas, antes da indução ao diabetes, no 3^o e 7^o dias após a indução e após a confirmação do diabetes, semanalmente até o fim do experimento.

O tratamento com a insulina (2 UI/dia/rato; intraperitoneal - Insulina *Humulin* NPH) foi administrado em todos os grupos diabéticos logo após a constatação do estado hiperglicêmico, durante todo o protocolo experimental.

Para a terapia de biofotomodulação foi utilizado o protocolo adaptado de Marcos e colaboradores (2011) (*Phothon Laser III*, marca DMC), Dosagem total ou energia de 3J para o Grupo Diabético Laser 1 – GDL1 e 6J para o Grupo Diabético Laser 2 – GDL2. Foram realizadas 21 sessões consecutivas pelo método do contato, iniciado ao 4^o dia pós indução ao DM de modo pontual, realizado por um único pesquisador, utilizando uma caneta com diodo de GaAs que opera na função contínua com comprimento de onda de 808nm, Densidade de energia ou Fluência de 60J/cm², e potência de pico de 100mW aplicada ao tendão do calcâneo dos ratos dos grupos GDL1 e GDL2. Os animais dos grupos GC e GD permaneceram em suas respectivas gaiolas, sujeitos apenas a manipulação.

Ao final do período de intervenção foi realizada uma anestesia com solução de Xilazina (Anasedan®) (20mg/Kg) e Cloridrato de Ketamina (Dopalen®) (100mg/kg), perfazendo um volume de 0,1 ml e 0,1 ml para cada 100g de peso do

animal, respectivamente, por via intraperitoneal. Foi realizada uma incisão ao longo da superfície posterior da pata direita do animal para remoção da pele e partes moles, para dissecação e coleta do tendão do calcâneo. O material foi umedecido em soro fisiológico e encaminhado sob refrigeração ao Laboratório de Engenharia Química - UFPE para a realização do ensaio mecânico de tração. Ainda sob efeito de anestésicos, os animais receberam uma dosagem via intracardíaca de 1ml de Cloreto de Potássio (19,1%), para sua eutanásia.

Para o ensaio biomecânico o tendão dissecado foi acoplado em dois conectores, um em cada extremidade, e em seguida foi utilizada a fórmula da elipse para mensurar a área da secção transversa do tendão (SILVEIRA; NERY, 1999). A amostra foi conectada em uma máquina de ensaio mecânico convencional EMIC do Laboratório de Engenharia Química da UFPE (modelo DL 500, Brasil) através de garras auto travantes, sendo em seguida aferido o comprimento da amostra para o ensaio.

As amostras tendíneas foram tracionadas até o ponto de falha do corpo de prova, em velocidade de 0,1 mm/s, com célula de carga de 5000 N. As variáveis avaliadas foram: Módulo Elástico - ME (MPa), Força Máxima - FM (MPa), Deformação Específica Força Máxima - DE (mm), Energia/Área - E/A (N.mm/mm²), e Área de secção transversa - AST (mm²).

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE sob o Proc.: 23076.029551/2015-61. Todo o manejo e procedimento adotados nesse estudo estão de acordo com o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animal*, obedecendo as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 - art 32 e decreto 3.179 – art 17, de 21/09/1999, que trata do uso de animais para fins científicos.

Com os dados obtidos após o ensaio mecânico de tração foi construído um banco de dados no Excel 2016 e posteriormente analisados através do software SPSS *Statistics* versão 18.0. Após a confirmação da normalidade pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov*, comparação entre três ou mais grupos foi usado a Análise de Variância (ANOVA) seguido pelo *post hoc de Tukey*, para as variáveis com distribuição não normal foi usado o *Kruskal-Wallis* e *Mann Whitney*. O nível de significância adotado foi 5%.

RESULTADOS

Houve perdas amostrais ao longo do experimento, após a avaliação da Glicemia do 3º e 7º dias, quando os animais apresentaram valores $< 200\text{mL/dL}$, dos 70 animais induzidos, 25 foram excluídos (perda amostral de 35,71%). Não houveram perdas por complicações do DM.

Na comparação dos grupos avaliados, foi observada redução do peso corpóreo de todos os grupos diabéticos quando comparados ao grupo controle (Figura 1).

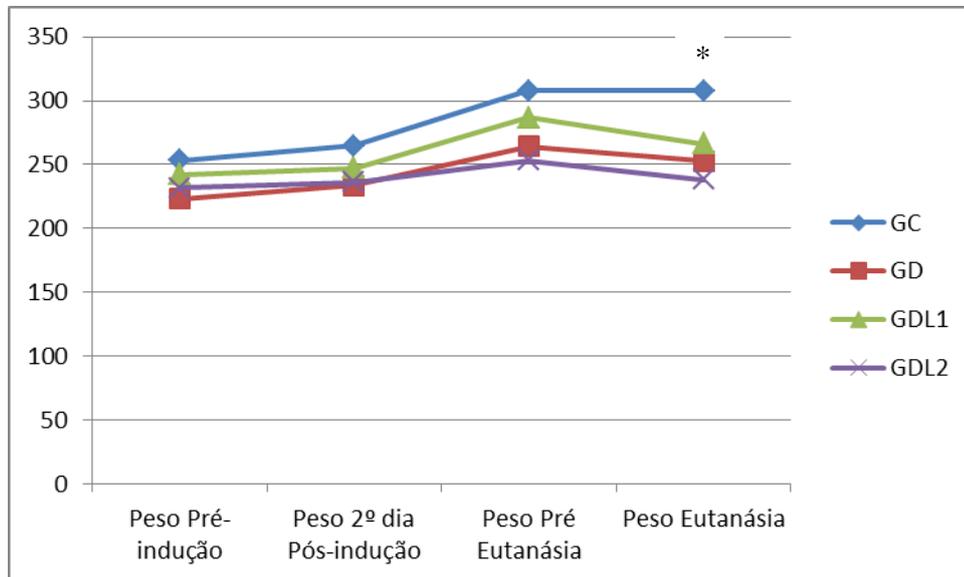


Figura 1- Evolução ponderal do peso dos animais durante o experimento. CG: Grupo Controle; GD: Grupo Diabético; GDL1: Grupo Diabético Laser 1 (3J); GDL2: Grupo Diabético Laser 2 (6J)

*GC > GD; GDL1 e GDL2; $p < 0,01$ - Teste *Kruskal-Wallis*.

Quanto ao controle glicêmico, seu acompanhamento está demonstrado na Figura 2. Os grupos se mantiveram homogêneos na comparação intragrupo.

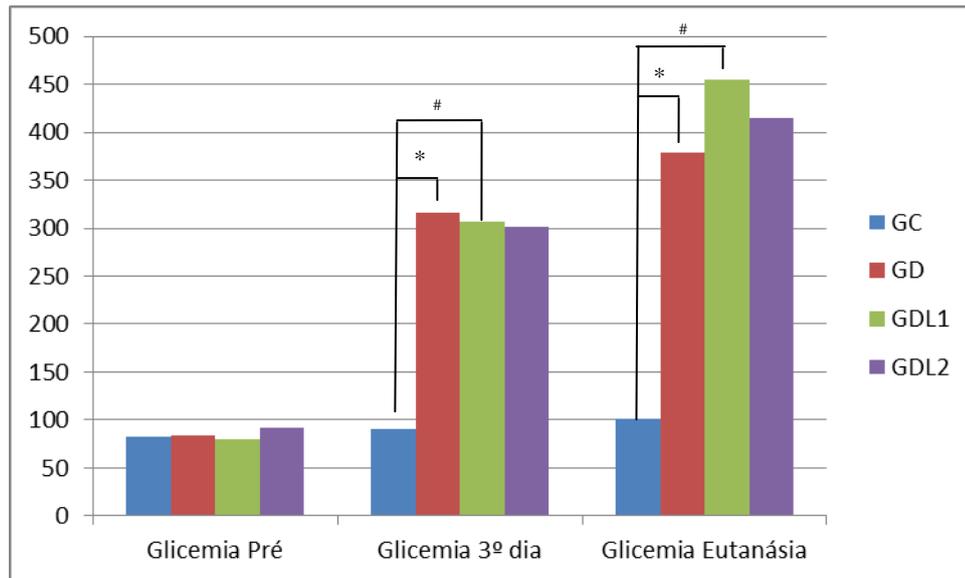


Figura 2. Acompanhamento glicêmico dos animais nos momentos Pré indução, 3º dia pós indução e no dia da eutanásia.

CG: Grupo Controle; GD: Grupo Diabético; GDL1: Grupo Diabético Laser 1 (3J); GDL2: Grupo Diabético Laser 2 (6J).

Teste de *Kruskal-Wallis*, seguido do Teste de *Mann Whitney*: **GC ↔ GD ($p < 0,01$); #GC ↔ GDL1 ($p < 0,01$) para a glicemia do 3º dia e Eutanásia. Os demais grupos não apresentaram diferença. - Glicemia Pré: GC ↔ GD ($p=0,12$), GC ↔ GDL1 ($p=0,31$), GD ↔ GDL1 ($p=0,15$), GD ↔ GDL2 ($p=0,38$), GDL1 ↔ GDL2 ($p=0,06$); - Glicemia 3º dia: GD ↔ GDL1 ($p=0,34$), GD ↔ GDL2 ($p=0,32$), GDL1 ↔ GDL2 ($p=0,91$); - Glicemia Eutanásia: GD ↔ GDL1 ($p=0,34$), GD ↔ GDL2 ($p=0,08$), GDL1 ↔ GDL2 ($p=0,36$).

Tabela 1. Valores médios dos Parâmetros biomecânicos: Módulo Elástico - ME (MPa), Força Máxima - FM (MPa), Deformação Específica Força Máxima - DE (mm), Energia/Área - E/A (N.mm/mm²), e Área de secção transversa - AST (mm²).

GRUPOS	FM (N)	TFMáx (MPa)	DE (%)	E/A (N.mm/mm ²)	ME (MPa)	AST (mm ²)
GC	22,25 ±4,44	13,78 ±6,62	147,35 ± 65,04 ¹	27,49 ± 17,90	12,82 ± 5,56 ²	2,15 ± 1,29 ⁴
GD	21,6 ± 3,46	19,08 ±4,44	145,50 ± 52,01	29,53 ± 9,93	26,43 ± 18,55 ^{2,3}	1,72 ± 0,21 ⁴
GDL1	17,05 ± 9,05	14,16 ± 8,43	300,85 ± 143,59 ¹	24,11 ± 14,94	8,54 ± 5,25 ³	1,62 ± 0,94
GDL2	21,17 ± 4,19	18,29 ± 5,71	365,55 ± 193,71 ¹	33,10 ± 11,13	11,00 ± 7,03 ³	1,05 ± 0,62 ⁴

Valores expressos em Média ± Desvio Padrão (DP), Anova com um fator (*One way*) com *post hoc Tukey*.

Notas:

*GDL1 = GDL2 – A comparação da média entre esses dois grupos, apresentou $p > 0,05$ nos parâmetros biomecânicos.

¹Deformação Específica Força Máxima

GC > GDL1 ($p = 0,018$)

GC > GDL2 ($p < 0,00$)

^{2,3}Módulo Elástico

GC < GD ($p = 0,011$)

GD > GDL1 ($p = 0,033$)

GD > GDL2 ($p = 0,001$)

⁴Área de Secção Transversa

GC > GD ($p = 0,025$)

GC > GDL2 ($p = 0,027$)

DISCUSSÃO

Nosso estudo apresentou resultados distintos dos achados literários bem como do nosso próprio grupo de pesquisa, o que pode ser justificado pelo tratamento diário com 2UI/dia/rato de insulina NPH. De Oliveira (2011) comparou dois grupos, um controle (GC) com um diabético (GD), seus achados significativos foram na Deformação Específica Força Máxima (GC: 113.62 ± 34.40 e GD: 198.99 ± 57.94). O uso da Laserterapia associada à insulina, mostrou similaridades com os grupos em mesmas condições (GC: $147,35 \pm 65,04$ e GD: $145,50 \pm 52,01$) e ocasionou num incremento dos nossos achados (GDL1: $300,85 \pm 143,591$ e GDL2: $365,55 \pm 193,711$), principalmente nas comparações do GC com GDL1 ($p = 0,018$) e GC com GDL2 ($p < 0,001$), o que significa que a deformação alcançada pelo tendão até que o mesmo alcance a força máxima de resistência se mostrou maior no nosso estudo.

O peso corpóreo dos animais diabéticos ao final do experimento apresentou valores diminuídos, Grupo Diabético ($248,72 \pm 13,96$), Grupo Diabético Laser 1 ($247,20 \pm 10,39$) e o Grupo Diabético Laser 2 ($260,96 \pm 14,08$) e Grupo Controle ($286,97 \pm 19,39$), fato já esperado, em virtudes de alterações como a perda de massa muscular imposta pela atrofia diabética. Almeida et al. (2012) e Oliveira et al. (2011) com mesmo protocolo de indução ao diabetes experimental, também observaram diminuição dessa variável nos animais diabéticos o que demonstra concordância como o modelo experimental adotado nesse estudo.

A Energia/Área do mesmo estudo acima, no GC (16.87 ± 8.20) foi bem menor do que no GD (47.29 ± 16.14) apresentando diferenças significativas entre os grupos, no nosso estudo os grupos se mantiveram análogos, sem diferença estatística conforme podemos observar na Tabela 3. Já no Módulo Elástico, De Oliveira (2011) mostrou uma redução nos valores achados no GD, apresentando diferença entre os grupos avaliados (GC: 10.17 ± 4.90 e GD: 3.73 ± 1.79); nesse estudo achamos valores bem acima dos citados com diferenças entre GC com GD ($p = 0,011$), GD com GDL1 ($p = 0,033$), GD com GDL2 ($p = 0,001$) que é calculado e representado pela máxima inclinação encontrada na curva tensão x deformação, a qual representa parte da viscoelasticidade tendínea ou “rigidez” representativa do material biológico tendíneo.

Em outro estudo do nosso grupo (BEZERRA *et al.*, 2013), com ratos submetidos à um treino de natação, mostrou resultados significativos na comparação entre os grupos nos parâmetros biomecânicos: Tensão Força Máxima (TFMáx) (Grupo Controle – GC: 13.16 ± 5.8 e Grupo Natação – GN: 20.50 ± 5.32), Deformação Específica Força Máxima (%) (GC: 28.05 ± 12.28 e GN: 45.93 ± 17.65) e Energia/Área - E/A (N.mm/mm²) (GC: 24.78 ± 19.09 e GN: 48.93 ± 19.87). Tais valores são bem menores que o demonstrado na nossa análise biomecânica (Tabela 3), mesmo sendo um estudo com atividade aeróbia que apresentou benefícios aos animais diabéticos.

O DM causa alteração no processo inflamatório, na angiogênese (LEEPER, COOKER, 2011), proliferação celular e distúrbios da matriz celular, principalmente o colágeno (REDDY, 2004), levando ao desenvolvimento de disfunções mecânicas. Propriedades estruturais alteradas de tecidos musculoesqueléticos predispõem o maior risco de tendinopatia e de lesão musculoesquelética em pacientes diabéticos (JACOBSON *et al.*, 2014). No tecido conjuntivo do tendão, que possui alto teor de colágeno, ocorre uma série de reações entre a porção amino-terminal do colágeno e a glicose livre, denominada glicosilação não enzimática, processo determinante no processo degenerativo e regenerativo criado pelo quadro diabético (BARBOSA, OLIVEIRA, SEARA, 2008).

A elasticidade dos tendões aumenta a eficiência do músculo durante ciclos de atividade, tal como a marcha. Ou seja, as propriedades mecânicas do tendão calcâneo reduzem o trabalho e o gasto energético exigido do músculo. Isto torna possível para o ato de locomoção, que seria desfavorável mecanicamente para o músculo isoladamente, para ser realizada utilizando menos energia (ROBERTS; MARSH, 2003).

Apesar da inespecificidade dos estímulos lesivos, as lesões teciduais são responsáveis pela resposta inflamatória, e, para fins de reparação tecidual, o emprego da luz encontra vantagens no que se refere à ação menos invasiva, muitas vezes mais barata, ocupando menos tempo quando comparada a outras modalidades terapêuticas e a praticidade de aplicação (VINCK *et al.*, 2003).

A fotobiomodulação, através da aplicação de laser, atua sobre os tecidos como reações não térmicas (SCHAFFER *et al.*, 2000). Porém, seu uso apresenta inúmeras controvérsias, por conta da grande divergência nos parâmetros

dosimétricos e as discrepâncias nos achados (BERTONILI; SILVA; TRINDADE, 2008).

Alguns autores mostraram evidências qualitativas na aparência da organização das fibras de colágeno no tendão, demonstrando que os grupos tratados com laser estão em melhores condições de organização estrutural. Foi citado um aumento do colágeno tipo I e III, na variedade de parâmetros citados. Fisiologicamente o tratamento com Laserterapia nos parâmetros utilizados e os tempos estudados reduz a migração de células inflamatórias e melhora a qualidade da reparação enquanto reduzir as limitações funcionais. A junção de tipos de laser, bem como outras terapias no mesmo tendão mostrou ser mais efetiva na organização das fibras colágenas (FILLIPIN, *et al.*, 2005; ARRUDA, *et al.*, 2007; BERTOLINI, *et al.*, 2008; CASALECHI, *et al.*, 2013; DE JESUS, *et al.*, 2014; DE CARVALHO, *et al.*, 2015).

Para Nouruzian *et al.* (2011), o uso do Laser de Baixa Intensidade (LBI) aumentou tanto a Carga Máxima quanto a Tensão Força Máxima no reparo do tendão do Calcâneo de ratos diabéticos, o que difere dos nossos achados. O tratamento com laser tem efeitos benéficos sobre a resistência à ruptura na cicatrização do tendão (DEMIR *et al.*, 2004), tais diferenças podem ser atribuídas à insulinoaterapia.

De acordo com Chbinou & Frenette (2004), a administração de insulina reduziu a acumulação de um tipo de AGE (*Advanced Glycated End-Products*) que previne as alterações nas propriedades mecânicas nos tendões diabéticos e também restaura a resposta inflamatória normal, a neovascularização e a proliferação celular, demonstrado durante o reparo num modelo de rato de lesionado no tendão de Aquiles, induzido por colagenase. Também se demonstrou que a insulina também protege as células beta pancreáticas da apoptose (LUI, 2017). Apresentou-se, no nosso estudo, hipoteticamente como uma maximizadora dos achados benéficos biomecânicos, ou seja, indivíduos com DM, mas tratados com insulina possuem uma diminuição da apoptose, o que pode auxiliar no reparo do tendão após a lesão e predispor um incremento da cicatrização na tendinopatia.

A cetoacidose diabética é definida como uma disfunção metabólica grave causada pela deficiência relativa ou absoluta de insulina, associada ou não a uma maior atividade dos hormônios contra-reguladores. Quanto à influência da insulina no tecido, podemos relacionar seu papel fundamental no crescimento e manutenção.

Este hormônio possui características anabólicas e sua síntese é controlada através dos níveis circulantes de glicose e aminoácidos (DALL'AGO et al., 2002).

Com a diminuição dos níveis de insulina no Diabetes ocorre queda na síntese da cadeia pesada de miosina esse hormônio é estimulador da síntese dessa molécula para o tecido muscular (VANDENBURGH et al., 1991). A insulina desempenha um papel fundamental no crescimento e manutenção dos tecidos por possuir características anabólicas e ter sua síntese é controlada através dos níveis circulantes de glicose e aminoácidos. Assim, acreditamos que a insulinoaterapia possa ter influenciado no efeito restaurador tecidual e conseqüentemente na maioria dos parâmetros biomecânicos.

Dessa forma, a fotobiomodulação da Laserterapia tem influência no crescimento de células fibroblásticas, na organização do colágeno tipo 1 (ARRUDA et al., 2007; CHEN et al., 2009; NEVES et al., 2011) e diminuição dos distúrbios na matriz celular, protegendo o tendão e melhorando as propriedades biomecânicas (LARAIA et al., 2012), que resulta na resistência à ruptura, bem como aumento do ângulo rigidez (MARCOS et al., 2011; CASALECHI, et al., 2013; MARCOS et al., 2013), nossos achados com seu uso mostraram-se mais robustos quando comparados à estudos já publicados do nosso grupo de pesquisa, o que pode ser atribuído a insulinoaterapia, pelas suas características fisiológicas supracitadas.

CONCLUSÃO

Este estudo trata-se de uma inovação terapêutica, no qual foi testado um protocolo de terapia fotobiomoduladora, através da aplicação de laser de baixa intensidade. Pudemos supor que houve alterações estruturais tendíneas acarretando melhora na estrutura e biomecânica nos parâmetros Energia/Área, Deformação Específica Força Máxima e Área de Secção Transversa do tendão de ratos induzidos ao DM retardando seu processo degenerativo. Com tratamento de 21 dias consecutivos, os resultados apontam para a dosagem de 6J como a terapêutica mais eficaz para restabelecer essa propriedade biomecânica do tendão.

Supõe-se que, com este protocolo, a Laserterapia pode promover o realinhamento das fibras de colágeno, que se encontram desestruturadas pelo DM, levando a uma melhor organização das fibras e uma maior resistência no teste biomecânico. Ressaltamos os valores elevados da Deformação Específica Força

Máxima da Força Máxima, ou seja, no grupo tratado com o laser, os valores alcançados pelo tendão até que o mesmo alcance a força máxima de resistência e ponto de ruptura. O trabalho conseguiu alcançar os objetivos traçados, não foram encontradas similaridades na literatura.

REFERÊNCIAS

ARRUDA, E.R.B. *et al.* Influência de diferentes comprimentos de onda da Laserterapia de baixa intensidade na regeneração tendínea do rato após tenotomia. **Rev. bras. fisioter.**, v. 11, n. 4, p. 283-288, 2007.

BARBOSA, J. H. P.; OLIVEIRA, S.L.; SEARA, L.T. O papel dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes. **Arq Bras Endocrinol Metab.** v..52, n. 6, p. 940-6, 2008.

BERTOLINI, G. R. F. *et al.*, Efeitos do Laser de Baixa Potência Sobre a Dor e Edema no Trauma Tendíneo de Ratos. **Rev Bras Med Esporte.** v. 14, n. 4, 2008.

BEZERRA M, MESQUITA G, NOVAES K, *et al.* (2012) Evaluation of the biomechanical behavior of tendon in rats subjected to physical activity in water. *Phys Ther Sport* 13: e2–e3, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica: diabetes mellitus. Brasília: Ministério da Saúde, 2013. (Cadernos de Atenção Básica, n. 36)

CARVALHO, E.N.; CARVALHO, N.A.S.; FERREIRA, L.M. Modelo experimental de indução do *diabetes mellitus* em ratos. Experimental model of induction of diabetes mellitus in rats. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v. 18, 2003.

CASALECHI, H. L. *et al.*, Analysis of the effect of phototherapy in model with traumatic Achilles tendon injury in rats. **Lasers Med Sci.** v. 29, p. 1075–1081, 2013.

CENCI, D. R. *et al.* Análise do equilíbrio em pacientes diabéticos por meio do sistema F-Scan e da Escala de Equilíbrio de Berg. **Fisioterapia em Movimento**, v. 26, n. 1, p. 55-61, 2013.

CHEN, C. H. *et al.* Low-level laser irradiation promotes cell proliferation and mRNA expression of type 1 collagen and decorin in porcine Achilles tendon fibroblasts in vitro. **J Orthop Res**, v. 27, p. 646-50, 2009.

DALL'AGO, P. *et al.* Reflex control of arterial pressure and heart rate in short-term streptozotocin diabetic rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 7, p. 843–849, 2002.

DE CARVALHO, P. K. *et al.*, Analysis of experimental tendinitis in rats treated with laser and platelet-rich plasma therapies by Raman spectroscopy and histometry. **Lasers Med Sci** .2015.

DE JESUS, J. F. *et al.*, Low-Level Laser Therapy on Tissue Repair of Partially Injured Achilles Tendon in Rats. **Photomedicine and Laser Surgery**. v. 32, n. 6, 2014b.

DE OLIVEIRA RR, LEMOS A, DE CASTRO SILVEIRA P V, *et al.* (2011) Alterations of tendons in patients with diabetes mellitus: a systematic review. **Diabet Med** 28:886–95, 2011.

DEMIR H. *et al.* Comparison of the effects of laser, ultrasound, and combined laser + ultrasound treatments in experimental tendon healing. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 35, n.1, p. 84-9, 2004.

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

FILLIPIN, L. I. *et al.*, Low-Level Laser Therapy (LLLT) Prevents Oxidative Stress and Reduces Fibrosis in Rat Traumatized Achilles Tendon. **Lasers in Surgery and Medicine**. v. 37, p. 293-300, 2005.

JACOBSON, A. M. *et al.* (DCCT/EDIC RESEARCH GROUP). A 23-year follow-up of the Diabetes Control and Complications/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications cohort. **Diabetes care**. v 36. p. 3131-38. 2013.

JUNG, H-J; FISHER, M.B.; WOO, S.L-Y. Role of biomechanics in the understanding of normal, injured, and healing ligaments and tendons. **Sports Medicine, Arthroscopy**,

Rehabilitation, Therapy & Technology, v. 1, n. 9, 2009.

LARAIA, E. M. S. *et al.*, Effect of Low-Level Laser Therapy (660 nm) on Acute Inflammation Induced by Tenotomy of Achilles Tendon in Rats. **Photochemistry and Photobiology**. v. 88, p. 1546–1550, 2012.

LEEPER, N. J.; COOKE, J. P. MicroRNA and Mechanisms of Impaired Angiogenesis in Diabetes Mellitus. **Circulation**, v.123, p. 236-8, 2011.

MARCOS, R. L. *et al.*, Infrared (810 nm) Low-level Laser Therapy in Rat Achilles Tendinitis: A Consistent Alternative to Drugs. **Photochemistry and Photobiology**, v. 87, p. 1447–1452, 2011.

MARCOS, R. L. *et al.*, Low-Level Laser Therapy in Collagenase-Induced Achilles Tendinitis in Rats: Analyses of Biochemical and Biomechanical Aspects. **Journal Of Orthopaedic Research**, 2012.

NEVES M.A.*et al.* Different power settings of LLLT on the repair of the calcaneal tendon. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 29, n. 10, p. 663-8, 2011.

NOURUZIAN M. *et al.* Effect of low-level laser therapy on healing of tenotomized Achilles tendon in streptozotocin-induced diabetic rats. **Lasers in Medical Science**, v. 28, n. 2, p. 399–40, 2012.

NOZABIELI, A. J.; MARTINELLI, A. R.; MANTOVANI, A. M.; FARIA, C. R.; FERREIRA, D. M.; FREGONESI, C. E. Análise do equilíbrio postural de indivíduos diabéticos por meio de baropodometria. **Motricidade**, v. 8, n. 3, p. 30-39, 2012.

OLIVEIRA, D. M. *et al.* Desafios no cuidado às complicações agudas do diabetes mellitus em serviço de emergência adulto. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v. 18, 2016.

OLIVEIRA, R. R. *et al.* Mechanical Properties of Achilles Tendon in Rats Induced to Experimental Diabetes. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 39, n. 5, p. 1528–1534, 2011.

OLIVEIRA, R.R.; LIRA, K.D.S.; SILVEIRA, P.V.C.; COUTINHO, M.P.G.; MEDEIROS,

M.N.; TEIXEIRA, M.F.H.B.I.; MORAES, S.R.A. Mechanical Properties of Achilles Tendon in Rats Induced to Experimental Diabetes. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 39, n. 5, p. 1528-34, 2011.

REDDY, G. K. Cross-linking in Collagen by Nonenzymatic Glycation Increases the matrix stiffness in rabbit Achilles Tendon. **Experimental Diab. Res.**, v. 5, p. 143-53, 2004.

REIS, E. A., REIS, I. A. (2001). Análise Descritiva de Dados- Tabelas e Gráficos. (Relatório Técnico RTE04/2001) Departamento de Estatística - ICEX – Universidade Federal de Minas Gerais.

ROBERTS, T. J., MARSH, R. L. Probing the limits to muscle-powered accelerations: lessons from jumping bullfrogs. **J. Exp. Biol.**, v. 206, Pt 15, p. 2567–2580, 2003.

SCHAFFER, M. *et al.* Magnetic resonance imaging (MRI) controlled outcome of side effects caused by ionizing radiation, treated with 780nm diode laser – preliminary results. 1: **Journal of Photochemistry and Photobiology**.B: Biology, Lausanne, v. 59, n.1-3, p. 1-8, dec. 2000.

SCHAFFER, M. *et al.* Magnetic resonance imaging (MRI) controlled outcome of side effects caused by ionizing radiation, treated with 780nm diode laser – preliminary results. 1: **Journal of Photochemistry and Photobiology**.B: Biology, Lausanne, v. 59, n.1-3, p. 1-8, dec. 2000.

VANDENBURGH, H. H. *et al.* Insulin and IGF-I induce pronounced hypertrophy of skeletal myofibers in tissue culture. **The American journal of physiology**, v. 260, n. 3 Pt 1, p. C475–84, mar. 1991.

VINCK, E. M. *et al.* Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. **Lasers in Medical Science**, London, v.18, n.2, p. 95-99, may 2003

ZANTOP T.; TILLMANN B.; PETERSE W. Quantitative assessment of blood vessels of the human Achilles tendon: an immunohistochemical cadaver study. **Arch Orthop Trauma Surg**. v. 123, p. 501-04, 2003.

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Experimentação animal



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 14 de março de 2016.

Ofício nº 12/16

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof.ª Silvia Regina Arruda de Moraes**

Departamento de Anatomia

Centro de Biociências

Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº 23076.029551/2015-61

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, **“AVALIAÇÃO DO EFEITO BIOMODULADOR DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE DE 3J E 6J SOBRE AS PROPRIEDADES BIOMECÂNICAS DO TENDÃO DO CALCÂNEO DE RATOS DIABÉTICOS.”**

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério de Nutrição; Animais: ratos Wistar; Idade: 60 dias; Peso: 200-300g; Sexo: machos; Nº total de animais: 60.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
UFPE SIAPE 1801584

ANEXO B – Normas para a submissão do Artigo 1 (Revista Brasileira de Biomecânica)

Diretrizes para Autores

Artigos oriundos de investigações originais, Artigos de revisão e ensaios, Artigos tematicamente orientados e à convite do conselho editorial e Notas técnico-metodológicas.

1. Os artigos podem ser redigidos em português ou inglês. Recomenda-se que os artigos redigidos em inglês contenham um resumo em português e quando redigidos em português obrigatoriamente deve conter resumo e abstract, bem como, Palavras-Chave e Key-Words.
2. Para os artigos originais os resumos devem ser apresentados no formato estruturado, com até 250 palavras, destacando o principal objetivo e os métodos básicos adotados, informando sinteticamente local, população e amostragem da pesquisa; apresentando os resultados mais relevantes, quantificando-os e destacando sua importância estatística; apontando as conclusões mais importantes, apoiadas nas evidências relatadas, recomendando estudos adicionais quando for o caso. As palavras-chaves devem ser de 3 a 6.
3. As seções, sempre que se aplicar, devem abranger os seguintes aspectos: Resumo, Palavras-Chave, Abstract, Key-Words, Introdução (Justificativa e Objetivos), Material e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusão, Referências.
4. Cada arquivo original, preferencialmente em Microsoft para Windows, deve ser precedido de uma folha de rosto, contendo título, identificação dos autores e vinculação institucional, endereço do autor para correspondência, emails de TODOS os autores, título resumido para impressão no cabeçalho de cada página (Running Title) e texto opcional de agradecimentos. O título do artigo deve reaparecer na página seguinte, juntamente com o resumo sem identificação de autores. O artigo deve ter sua extensão programada de modo a não exceder 20 páginas no formato final, utilizar letras times new roman ou arial de tamanho 12, o texto deve ser paginado em espaçamento duplo em papel A4 com margens de 2 cm.
5. Todas folhas devem conter o "Running Title".
6. Na redação do artigo, após a folha de rosto despersonalizada, a Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusão e Referências bem como outras que se aplicar devem constituir outra seção com coluna dupla.
7. São aceitas figuras, tabelas, arquivos de áudio e vídeo desde que estes estejam inseridos no local exato onde os autores pretendem que apareçam no texto final acompanhadas de suas respectivas legendas numeradas em algarismos arábicos e na ordem de aparição no texto.
8. Os elementos gráficos (figuras, tabelas, arquivos de áudio e vídeo) devem possuir resolução mínima de 600 dpi em formato gif, jpeg, wav, mp3, mpeg ou avi, e podem ser coloridos ou preto e branco.
9. A Revista Brasileira de Biomecânica requer que todos os procedimentos apropriados para obtenção do consentimento dos sujeitos para participação no estudo tenham sido adotados. Não há necessidade de especificar os procedimentos, mas deve ser indicado no texto que o consentimento foi obtido. Estudos que envolvem experimentos com animais devem conter uma declaração na seção Método, que os experimentos foram realizados em conformidade com a regulamentação sobre o assunto adotada no país.

10. O sistema de medidas básico a ser utilizado na Revista deverá ser o "Système International d'Unités". Uma lista completa das unidades SI pode ser acessada online em <http://physics.nist.gov/>. Como regra geral, só deverão ser utilizadas abreviaturas e símbolos padronizados. Se abreviações não padronizadas forem utilizadas, recomenda-se a definição das mesmas no momento da primeira aparição no texto.

11. As referências devem ser ordenadas alfabeticamente, numeradas e normalizadas de acordo com o estilo Vancouver. Os títulos de periódicos devem ser referidos de forma abreviada, de acordo com o Index Medicus, e grifados. Publicações com 2 autores até o limite de 6 citam-se todos; acima de 6 autores, cita-se o primeiro seguido da expressão latina et al.

Exemplos:

Garcia MAC, Souza MN. Análise do Sinal Mioelétrico a partir de um parâmetro temporal (Brasil), 2002. Rev. Bras Biomecânica 2002; 5: 5-12.

Forattini OP. Ecologia, epidemiologia e sociedade. São Paulo; EDUSP; 1992.

Laurenti R. A medida das doenças. In: Forattini, OP. Epidemiologia geral. São Paulo: Artes Médicas; 1996. p. 64-85.

Vaz MA, Freitas CR, Brentano MA. Comparative Study of Mechanomyographic and Force Signals During Isometric Contractions. Rev Bras Biomecânica [periódico on line] 2006; 12(7). Disponível em URL:<http://citrus.uspnet.usp.br/biomecan/ojs/index.php/rbb> [2007 jun 23].

Para outros exemplos recomendamos consultar o documento "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Medical Publication" (<http://www.icmje.org>). Conforme link no cabeçalho desta página.

12. Citações de referências no texto deverão ser feitas por extenso. Se forem dois autores, citam-se ambos ligados pela conjunção "e"; se forem mais de três, cita-se o primeiro autor seguida da expressão "et al".

13. Os arquivos originais deverão ser encaminhados preferencialmente através do sistema SEER. Caso o autor encontre problemas poderá enviar para o endereço eletrônico do contato com a RBB - rbbjb@gmail.com.

ANEXO C - Comprovante de submissão do Artigo 1

[RBB] Agradecimento pela Submissão

Entrada x



 **Revista Brasileira de Biomecânica** <rbbbjb@usp.br> 16:05 (Há 1 minuto) ☆  

para mim ▾

Waydja Lânia Virgínia de Araújo Marinho,

Agradecemos a submissão do seu manuscrito "EFICÁCIA DA TERAPIA FOTOBIMODULADORA DE BAIXA INTENSIDADE NA ATENUAÇÃO DOS DANOS CAUSADOS AS PROPRIEDADES BIOMECÂNICAS DO TENDÃO DO CALCÂNEO DE RATOS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA" para Brazilian Journal of Biomechanics = Revista Brasileira de Biomecânica. Através da interface de administração do sistema, utilizado para a submissão, será possível acompanhar o progresso do documento dentro do processo editorial, bastando logar no sistema localizado em:

URL do Manuscrito:

<http://citrus.uspnet.usp.br/biomecan/ojs/index.php/rbb/author/submission/353>

Login: waydja

Em caso de dúvidas, envie suas questões para este email. Agradecemos mais uma vez considerar nossa revista como meio de transmitir ao público seu trabalho.

...

Revista Brasileira de Biomecânica

Brazilian Journal of Biomechanics = Revista Brasileira de Biomecânica

Brazilian Journal of Biomechanics = Revista Brasileira de Biomecânica

<http://citrus.uspnet.usp.br/biomecan/ojs/index.php/rbb/index>