

UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA
INSTITUTO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA
DOUTORADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

LÍZIA DANIELA E SILVA NASCIMENTO

**EFEITO DA MEMBRANA DE POLIHIDROXIBUTIRATO À BASE DE NORBIXINA
ASSOCIADA À TERAPIA LED DE BAIXA INTENSIDADE NO PROCESSO DE
REPARO TENDÍNEO PÓS-TENOTOMIA - ESTUDO *IN VIVO***

SÃO JOSÉ DOS CAMPOS, SP
2020

Lízia Daniela e Silva Nascimento

**EFEITO DA MEMBRANA DE POLIHIDROXIBUTIRATO À BASE DE NORBIXINA
ASSOCIADA À TERAPIA LED DE BAIXA INTENSIDADE NO PROCESSO DE
REPARO TENDÍNEO PÓS-TENOTOMIA - ESTUDO *IN VIVO***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica como complementação dos créditos necessários para obtenção do grau de Doutora em Engenharia Biomédica.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Renata Amadei Nicolau

São José dos Campos, SP
2020

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

Ficha catalográfica

Nascimento, Lízia Daniela e Silva
Efeito da membrana de polihidroxi-butilato à base de norbixina associada à terapia led de baixa intensidade no processo de reparo tendíneo pós-tenotomia : estudo in vivo / Lízia Daniela e Silva Nascimento; orientadora, Renata Amadei Nicolau. - São José dos Campos, SP, 2020.
1 CD-ROM, 76 p.

Tese (Doutorado) - Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica.

Inclui referências

1. Engenharia Biomédica. 2. Tendão calcâneo. 3. Polihidroxi-butilato. 4. Norbixina. 5. Terapia com LED. I. Nicolau, Renata Amadei, orient. II. Universidade do Vale do Paraíba. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica. III. Título.

Eu, Lízia Daniela e Silva Nascimento, autor(a) da obra acima referenciada:

Autorizo a divulgação total ou parcial da obra impressa, digital ou fixada em outro tipo de mídia, bem como, a sua reprodução total ou parcial, devendo o usuário da reprodução atribuir os créditos ao autor da obra, citando a fonte.

Declaro, para todos os fins e efeitos de direito, que o Trabalho foi elaborado respeitando os princípios da moral e da ética e não violou qualquer direito de propriedade intelectual sob pena de responder civil, criminal, ética e profissionalmente por meus atos.

São José dos Campos, 9 de Junho de 2020.

Lízia Daniela e Silva Nascimento

Autor(a) da Obra

Data da defesa: 30 / 03 / 2020

LÍZIA DANIELA E SILVA NASCIMENTO

“EFEITO DA MEMBRANA DE POLI(HIDROXIBUTIRATO) À BASE DE NORBIXINA ASSOCIADA À TERAPIA LED DE BAIXA INTENSIDADE NO PROCESSO DE REPARO TENDÍNEO PÓS-TENOTOMIA – ESTUDO *In Vivo*.”

Tese aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba – Univap, pela seguinte banca examinadora:

PROF.^ª DR.^ª EMILIA ANGELA LO SCHIAVO ARISAWA _____

PROF.^ª DR.^ª RENATA AMADEI NICOLAU _____

PROF. DR. MÁRIO OLIVEIRA LIMA _____

PROF.^ª DR.^ª LUCIANE DIAS DE OLIVEIRA / Unesp _____

PROF.^ª DR.^ª TATIANA DE SOUSA DA CUNHA UCHIYAMA / Unifesp _____

Prof. Dr. Leandro José Raniero

Diretor do IP&D – Univap

São José dos Campos, 30 de março de 2020.

Dedico este trabalho a meus pais, Maria de Fátima e José Francisco, por todo amor, apoio e ajuda incondicional, e à minha filha Ana Cecília, amor maior da minha vida e motivação para que todos os dias eu seja um ser humano melhor.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida, por todas as conquistas e por todas as experiências positivas e negativas ao longo da realização desta pesquisa, pois tudo é um aprendizado. Por me fazer exercitar a paciência e sempre me mostrar luz nos momentos de escuridão.

À Nossa Senhora do Perpétuo Socorro por atender às minhas preces, dando-me força e coragem para prosseguir diante das dificuldades.

A meus pais por acreditarem em mim, incentivarem e financiarem grande parte deste estudo.

À Prof^a. Dr^a Renata Amadei Nicolau, por sua orientação, competência, paciência, atenção, encorajamento e ânimo nos momentos difíceis.

À Universidade Estadual do Piauí (UESPI) pela concessão do afastamento das minhas atividades docentes para esta qualificação.

Ao NPBio - UESPI (Núcleo de Biotecnologia e Biodiversidade da Universidade Estadual do Piauí) na pessoa do Prof. Dr Antônio Luiz Martins Maia Filho, pela execução das cirurgias.

Aos Professores do IFPI Dr. Vicente Galba, Dr. Luiz Fernando Menezes e à Msc. Rayssilane de Sousa por me ceder a membrana, possibilitando o desenvolvimento desta tese.

À Lidiana Sena, pela ajuda na contenção dos animais durante os experimentos.

Às acadêmicas de enfermagem e bolsistas do NPBio Karolliny dos Santos e Larissa Roque pela ajuda na contenção dos animais durante os experimentos realizados nos finais de semana e feriados.

Ao Prof. Msc. José Zilton Lima Verde Santos (UESPI) pela ajuda nas fotomicrografias e análises histológicas, estando sempre disponível a me atender.

Ao Prof. Dr. José Figueredo da Silva (UESPI) pela ajuda nas fotomicrografias e análise histopatológica usadas em uma publicação relacionada a este estudo.

À ex-aluna, fisioterapeuta, Msc. Kéthyra Moreira pela preciosa ajuda na contagem de células.

À Mariana Campelo pela disponibilidade em sempre compartilhar informações bastante úteis, dentre as quais sobre o microscópio com luz polarizada.

Ao técnico Danniell Cabral Leão Ferreira por me ensinar a usar o programa Image-J®.

À Profª Drª Ana Paula Negreiros Nunes Alves (Laboratório de Patologia Bucal - UFC) por permitir que eu usasse o microscópio com luz polarizada e pela ajuda de suas orientandas Msc. Maria Eliza Lima Verde e mestranda Dairyne de Paula durante o uso.

Ao Prof. Dr. Wellington Santos pela disponibilidade em me ensinar a usar o programa Image-J Pro-plus.

À minha irmã Kárita Nascimento pela colaboração em algumas publicações sobre esta tese.

Ao querido ex-aluno, fisioterapeuta e Msc. Diego Pessoa pela colaboração em algumas publicações referentes a esta tese.

À Profª Drª Rosemary Brito (GERATEC – UESPI) e seu monitor, hoje profissional, Jônatas, por disponibilizar o microscópio e seu auxílio sempre que eu precisasse.

Ao Prof. Dr. João Marcelo de Castro e Sousa (LAPGENIC – UFPI) pela gentileza com que me recebeu e permitiu o uso do microscópio, deixando-o sempre à minha disposição.

A todos os professores das disciplinas que cursei pelos valiosos conhecimentos repassados.

Às queridas Lilian Melo e Fernanda Amorim, pelos conhecimentos, ansiedades, angústias e boas risadas compartilhadas.

À Vânia Thaís Gomes que, apesar de não nos conhecermos pessoalmente, compartilhou informações importantes para as publicações.

A todos os familiares, parentes, amigos e pacientes que torciam pelo sucesso deste trabalho.

A todos os professores membros das bancas examinadoras (qualificações e defesa) pelas valiosas considerações, contribuindo para a qualidade desta tese.

Às funcionárias da UNIVAP Miriam, Nanci e em especial à Diva Borelli pela sua atenção e delicadeza sempre.

EFEITO DA MEMBRANA DE POLIHIDROXIBUTIRATO À BASE DE NORBIXINA ASSOCIADA À TERAPIA LED DE BAIXA INTENSIDADE NO PROCESSO DE REPARO TENDÍNEO PÓS-TENOTOMIA - ESTUDO *IN VIVO*

RESUMO

A ruptura do tendão calcâneo apresenta uma elevada incidência, podendo resultar em redução severa da funcionalidade do tornozelo. O tratamento cirúrgico dessa lesão possibilita tanto a reparação como menor índice de recidiva da ruptura. Diversos estudos apontam o sucesso da terapia com LED no reparo da tenotomia, contudo sem a associação com membranas biológicas. O presente estudo teve como objetivo investigar o efeito da membrana de polihidroxibutirato (PHB) à base de norbixina associada à terapia com LED no reparo tendíneo após tenotomia calcânea em ratos. Foram utilizados 60 ratos machos, com aproximadamente 10 semanas de vida e 250g, divididos em 12 grupos, sendo 4 grupos: LC1 (Lesionado-controle), MNo1 (Membrana), LED1 (LED) e MNo+LED1 (Membrana+LED) eutanasiados 7 dias após a cirurgia, 4 grupos: LC2, MNo2, LED2 e MNo+L2 eutanasiados com 14 dias de PO e 4 grupos: LC3, MNo3, LED3 e MNo+LED3 eutanasiados 21 dias após o início do experimento. Nos grupos MNo e MNo+LED foram colados fragmentos de membranas no local da transecção tendínea, enquanto os grupos LC e LED não receberam a membrana. A terapia com LED foi realizada em um único ponto nos grupos LED e MNo+LED com a dosagem de 6 J/cm^2 a cada 24 horas, durante 214,3 segundos por vez. No final dos experimentos os tendões foram removidos para análise histológica utilizando os programas Image-J® e Image J Pro-plus. Este estudo apresentou redução significativa de células inflamatórias no grupo MNo+LED em relação ao grupo LC ($p < 0,0001$) nos três períodos de tempo. Foi verificada também proliferação significativa de fibroblastos no grupo MNo+LED em relação ao LC ($p < 0,0001$) aos 7 e 14 dias, bem como um expressivo aumento de fibroblastos no grupo LED em todos os tempos experimentais. Observou-se também a formação do colágeno tipo I com resultados estatisticamente significativos nos grupos MNo1 ($p = 0,0133$), MNo+LED1 ($p = 0,0002$) e MNo2 ($p = 0,0210$) quando comparados aos respectivos LC. A concentração de colágeno tipo III foi maior em todos os grupos aos 7, 14 e 21 dias do estudo. Conclui-se, assim, que o emprego da membrana de PHB à base de norbixina associada à terapia LED de baixa intensidade no tratamento de tenotomia total calcânea de ratos reduziu os níveis de infiltrado inflamatório na lesão, favoreceu a proliferação de fibroblastos nas duas primeiras semanas, porém não otimizou a formação de colágeno tipo I no estágio esperado do processo de reparação, indicando que houve pouca efetividade no uso simultâneo dos dois elementos terapêuticos.

Palavras-Chave: Tendão calcâneo. Membrana. Polihidroxibutirato. Norbixina. Terapia com LED.

EFFECT OF NORBIXIN-BASED POLYHYDROXYBUTYRATE MEMBRANE ASSOCIATED WITH LOW-INTENSITY LED THERAPY IN THE POST-TENOTOMY PROCESS OF TENDON REPAIR - IN VIVO STUDY

ABSTRACT

The rupture of the calcaneus tendon has a high incidence and may result in severe reduction of ankle functionality. The surgical treatment of this lesion allows both repair and reduced recurrence rates of the rupture. Several studies point to the success of LED therapy in tenotomy repair, but without association with biological membranes. This study aimed to investigate the effect of norbixin-based poly(hydroxybutyrate) (PHB) membrane associated with LED therapy in the repair of calcaneal tendon ruptures in tenotomized rats. Were used 60 male rats, approximately 10 weeks old and 250g, divided into 12 groups, 4 groups: LC1 (Control Injury), MNo1(Membrane), LED1(LED) and MNo+LED1(Membrane+LED) were euthanasiated 7 days after surgery, 4 other groups: LC2, MNo2, LED2 and MNo+LED2 were euthanasiated 14 days postoperatively and 4 other groups: LC3, MNo3, LED3 and MNo+LED3 were euthanasiated 21 days after the start of the experiment. Membrane fragments were glued at the site of the tendinous transection in the MNo and MNo+LED groups, while the LC and LED groups did not receive the membrane. The LED therapy was performed at a single point in the LED and MNo+LED groups using a dosage of 6 J/cm² every 24 hours for 214.3 seconds at a time. At the end of the experiments, the tendons were removed for histological analysis using the Image-J® and Image J Pro-plus programs. This study showed significant reduction of inflammatory cells in the MNo+LED group compared to the LC group ($p < 0,0001$) in the three time periods. Significant proliferation of fibroblasts in the MNo+LED group was also observed in relation to LC ($p < 0,0001$) at 7 and 14 days, as well as a significant increase of fibroblasts in the LED group at all experimental times. Type I collagen formation was also observed with statistically significant results in groups MNo1 ($p = 0,0133$), MNo+LED1 ($p = 0,0002$) and MNo2 ($p = 0,0210$) when compared to the respective LC. The concentration of collagen type III was higher in all groups at 7, 14 and 21 days of the study. It is concluded that the use of norbixin-based PHB membrane associated with low intensity LED therapy in the treatment of total calcaneal tenotomy of rats reduced the levels of inflammatory infiltration in the lesion, favored the proliferation of fibroblasts in the first two weeks, but did not optimize the formation of type I collagen in the expected stage of the repair process, indicating that there was little effectiveness in the simultaneous use of the two therapeutic elements.

Keywords: Calcaneal tendon. Membrane. Poly(hydroxybutyrate). Norbixin. LED therapy

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da organização do tendão calcâneo conectando-se ao osso e sua estrutura como um todo.....	21
Figura 2 Fases do reparo tecidual.....	26
Figura 3. Membrana de polihidroxibutirato e norbixina	38
Figura 4. Cirurgia: isolamento do tendão de Aquiles (A). Posicionamento da membrana de PHB e norbixina (B). Tenotomia (C). Sutura da pele pós-cirurgia (D).	39
Figura 5. A: Protótipo de LED (660± 20nm); B: Colimador; C:LED com colimador acoplado.....	40
Figura 6. Posicionamento adequado do LED a 90° com a região do tendão (A). Aplicação diária com auxílio para contenção do rato (B). Manipulação da pata direita sem irradiação nos grupos controle e membrana (C).....	41
Figura 7. Exposição do Tendão (A), Dissecção do tendão (B e C) e Tendão removido (D).....	42
Figura 8. Análise intergrupos do número médio de Células Inflamatórias.....	46
Figura 9. Análise intergrupos do número médio de Fibroblastos.....	48
Figura 10. Grupo Lesionado-controle (A). Grupo Membrana (B). Grupo LED (C). Grupo Membrana + LED (D). Tempo experimental de 7 dias. H.E (400x).	49
Figura 11. Grupo Lesionado-controle (A). Grupo Membrana (B). Grupo LED (C). Grupo Membrana + LED (D). Tempo experimental de 14 dias. H.E (400x).	50
Figura 12. Grupo Lesionado-controle (A). Grupo Membrana (B). Grupo LED (C). Grupo Membrana + LED (D). Tempo experimental de 21 dias. H.E (400x).	51
Figura 13. Análise intergrupos do colágeno formado.	53
Figura 14. Fibras de colágeno nos grupos Lesionado-controle (A), Membrana (B), LED (C) e Membrana+LED (D) aos 7 dias, corados com <i>Picrosirius red</i> (400x).	54
Figura 15. Aspectos histológicos das fibras de colágeno nos grupos Lesionado-controle (A), Membrana (B), LED (C) e Membrana+LED (D) aos 14 dias, corados com <i>Picrosirius red</i> (400x).....	55
Figura 16. Fibras de colágeno nos grupos Lesionado-controle (A), Membrana (B), LED (C) e Membrana+LED (D) aos 21 dias, corados com <i>Picrosirius red</i> (100x).	56

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Resumo dos parâmetros e resultados obtidos a partir de estudos realizados com terapia LED de baixa intensidade em lesões do tendão calcâneo. (<i>continuação</i>).....	33
Quadro 2. Relação da quantidade de animais, grupos, tratamento e eutanásia.	37
Quadro 3. Parâmetros de irradiação do LED.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Avaliação intragrupos da média da contagem das Células Inflamatórias (média \pm erro-padrão).	45
Tabela 2. Avaliação intragrupos da contagem de Fibroblastos (média e \pm erro-padrão).	47

LISTA DE ABREVIATURAS

AIG	Avaliação intragrupo
ATP	Trifosfato de Adenosina
ADM	Amplitude de Movimento
cm²	Centímetros Quadrados
CCS	Centro de Ciências da Saúde
°C	Grau Celsius
CEUA	Comitê de Ética em Uso de Animais
COBEA	Colégio Brasileiro em Experimentação em Animais
CTI	Colágeno Tipo I
CTIII	Colágeno tipo III
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
FBM	Fotobiomodulação
g	Grama
HE	Hematoxilina&eosina
IP&D	Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento
J	Joule
L	LED
LED	Light Emitting Diode
ml	Mililitros
mW	Miliwatts
M	Membrana
MEC	Matriz extracelular
min	Minuto
ML	Membrana+LED
nm	Nanômetro
NASA	Administração Nacional do Espaço
NPBIO	Núcleo de Biotecnologia e Biodiversidade
ns	Diferença não significativa
PHA	Poli(hidroxialcanoato)
PHB	Polihidroxibutirato
PO	Pós-operatório

RNA Ácido Ribonucléico
TLBI Terapia Laser de Baixa Intensidade
UESPI Universidade Estadual do Piauí

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2. HIPÓTESES	18
3 OBJETIVOS	19
3.1 Objetivo Geral.....	19
3.2 Objetivos específicos	19
4 REFERENCIAL TEÓRICO	20
4.1 Tendão Calcâneo.....	20
4.2 Lesão Tendínea	22
4.3 Reparo Tendíneo	24
4.4 Membranas Biológicas de Polihidroxiacetato e Norbixina	27
4.5 Terapia com LED	29
5 MATERIAIS E MÉTODOS	35
5.1 Tipo de estudo.....	35
5.2 Local do estudo.....	35
5.3 Amostra.....	35
5.4 Aspectos Éticos	36
5.5 Grupos Experimentais.....	36
5.6 Aquisição da Membrana.....	37
5.7 Procedimento Cirúrgico:	38
5.8 Terapia com LED	39
5.10 Técnica histológica.....	42
5.11 Morfometria.....	43
5.12 Análise do colágeno	43
5.13 Análise Estatística.....	43
6 RESULTADOS	45
6.1 Análise Quantitativa.....	45
6.1.1 Células inflamatórias	45
6.1.2 Fibroblastos.....	47
6.1.3 Colágeno	51
7 DISCUSSÃO	57
8 CONCLUSÃO	62
REFERÊNCIAS	63
ANEXO A - DECLARAÇÃO CEUA-UESPI	73
ANEXO B – ARTIGO 1	74
ANEXO C – ARTIGO 2	75
ANEXO 3 – ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO	76

1 INTRODUÇÃO

A ruptura do tendão calcâneo é uma lesão comum que afeta tanto atletas recreativos como de competição com incidência anual em torno de 13-55/100.000 pessoas, sendo 5 a 10 vezes mais comum no sexo masculino e na faixa etária de 35 a 45 anos (ZHAO *et al.*, 2017; WESTIN *et al.*, 2018; LEMME *et al.*, 2019). Essa lesão pode resultar em redução severa da funcionalidade do tornozelo, caracterizando-se pela presença de dor e edema geralmente localizados entre 2 e 6 cm da inserção do osso calcâneo, além de diminuição da amplitude de movimento (ADM) (LIN *et al.*, 2016). A lesão pode retardar o retorno às atividades esportivas e laborais. Em alguns casos pode levar ao fim da carreira de um atleta profissional (ALTSCHULER, 2016; GROSS; NUNLEY, 2016).

Estudos revelam que as rupturas do tendão calcâneo ocorrem em sua maioria durante a prática de atividades desportivas de alto impacto, tais como atletismo, basquetebol, salto, tênis e badminton, sendo a causa geralmente atribuída à falha dos mecanismos inibidores que normalmente protegem o sistema musculotendíneo de contrações musculares excessivas e/ou descoordenadas e que podem ocasionar rompimento do tendão no local de máxima tensão (GROSS; NUNLEY, 2016; KAUWE, 2017).

Outros fatores de risco de ruptura do tendão calcâneo também são sugeridos tais como história prévia de tendinopatia, o sexo, tratamentos farmacológicos com fluoroquinolona, uso local e oral de corticosteroides, sedentarismo, sobrepeso, bem como alterações biomecânicas relacionadas com o envelhecimento, não sendo, portanto, totalmente clara a etiologia dessa lesão (NOBACK *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2018).

Como opções de tratamento clínico para a ruptura do tendão calcâneo existem o conservador (imobilização rígida em torno de seis semanas) e o cirúrgico (aberto ou percutâneo). O tratamento cirúrgico é praticado com maior frequência devido a possibilidade de correção da posição do tecido lesionado, o que contribui para o processo de reparo tecidual e retomada da função, bem como para um menor índice de recidiva da ruptura (MAYER *et al.*, 2010; AL-MOUAZZEN *et al.*, 2015; HSU *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2015; ZHAO *et al.*, 2017).

Diante de todo o contexto epidemiológico e cirúrgico da ruptura do tendão calcâneo, a ciência tem investido no desenvolvimento de novos biomateriais, tais

como membranas biológicas, constituindo alternativas terapêuticas. Diversas pesquisas científicas têm sido realizadas a fim de verificar a sua interação com tecidos biológicos em animais obtendo resultados promissores (DUEK *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2016; NICODEMO *et al.*, 2017).

Dentre os materiais produzidos pela engenharia de tecidos, membranas de polihidroxibutirato com norbixina têm sido citadas em estudos recentes, sugerindo, por suas características, a aplicabilidade em reparo tendíneo. O polihidroxibutirato (PHB) é um polímero natural biocompatível, que apresenta como propriedades mais importantes para utilização como biomaterial sua lenta reabsorção, compatível com o tempo de regeneração tecidual, e ótimas propriedades mecânicas (REIS *et al.*, 2012). A norbixina é um carotenoide caracterizado por ser antioxidativo, que apresenta influência sobre o número de fibroblastos e quantidade de colágeno, ambos necessários para a fase de remodelamento do tecido lesionado (SANTOS *et al.*, 2014).

Além dos tratamentos preconizados pela medicina (conservador e cirúrgico), faz-se necessário o acompanhamento fisioterapêutico, realizado com a utilização de recursos fotobiomoduladores que estimulam o processo de reparação do tecido tendíneo lesionado, possibilitando, assim, o posterior restabelecimento da função articular interrompida pela lesão.

A biomodulação, com TLBI (terapia laser de baixa intensidade) ou LED (*light emitting diode*), apresenta resultados já comprovados de sua eficácia no tratamento de lesões teciduais. Os benefícios da TLBI são reportados desde a década de 60, enquanto as terapias com LED iniciaram mais recentemente, na década de 90, evidenciando resultados tão satisfatórios quanto a terapia com laser de baixa intensidade (CHAVES *et al.*, 2014, FREITAS; HAMBLIN, 2016).

A terapia com LED de baixa intensidade tem sido empregada em estudos, comprovando seus efeitos anti-inflamatórios, na angiogênese, no aumento do número de fibroblastos e na produção de colágeno, necessários para uma reparação de tecido com características semelhantes às de um tendão íntegro (DONG; XIONG, 2017; ALZYOUD *et al.*, 2019), sendo algumas vezes associada a biomateriais. Entretanto, não há qualquer descrição na literatura científica sobre o uso de membranas de PHB à base de norbixina associada à terapia com LED em ruptura de tendões, estimulando, assim, a realização deste estudo.

Diante disso e levando em consideração o interesse por novos protocolos terapêuticos que possam ser adotados no reparo do tendão calcâneo, justifica-se o desenvolvimento desta pesquisa em rupturas tendíneas de ratos, comprovada por meio das análises de células inflamatórias, fibroblastos e do colágeno.

2 HIPÓTESES

H₀ = A utilização do biomaterial polihidroxi-butirato à base de norbixina estimulada com a terapia LED de baixa intensidade não promove um processo de reparação a nível celular e na formação do colágeno.

H₁ = A utilização do biomaterial polihidroxi-butirato à base de norbixina estimulada com a terapia LED de baixa intensidade promove um processo de reparação a nível celular e na formação do colágeno.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da membrana de PHB à base de norbixina associada à terapia LED de baixa intensidade no processo de reparo tendíneo pós-tenotomia em ratos nos tempos experimentais de 7, 14 e 21 dias, por meio de análise histomorfométrica.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar a quantidade de células inflamatórias no processo de reparo do tendão;
- Analisar a quantidade de fibroblastos no processo de reparo do tendão;
- Analisar a concentração de colágeno dos tipos I e III na reparação tendínea.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 Tendão Calcâneo

O tecido tendinoso é um tecido conjuntivo denso, cuja função é transmitir a força de um músculo para um osso. O tendão calcâneo é o mais grosso e forte tendão no corpo humano e é formado pela conexão, na região central e posterior da perna, dos músculos que formam o tríceps sural, gastrocnêmio e sóleo, sendo também, quando presente, incluído o músculo plantar na formação do tendão, se visualizado separadamente. Em um adulto, esse tendão apresenta cerca de 15 cm de comprimento, 2,5 cm de diâmetro, sendo irrigado pelas artérias fibular e tibial posterior, e inervado pelos nervos tibial e sural (KADIR *et al.*, 2015).

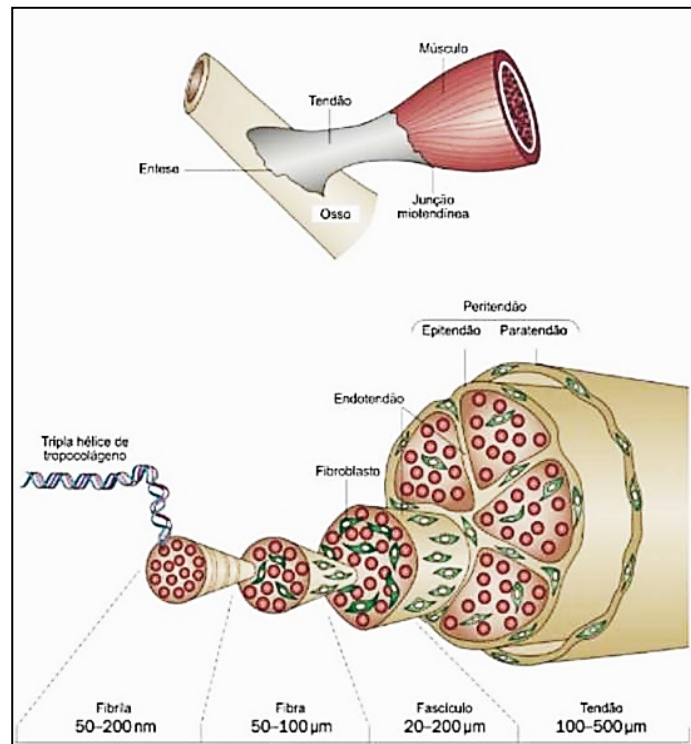
Os músculos que constituem a panturrilha e o tendão calcâneo estão localizados superficialmente na região posterior da perna. O gastrocnêmio tem formato fusiforme e apresenta duas cabeças, uma medial e outra lateral, originando-se nos côndilos femorais medial e lateral, respectivamente. O músculo sóleo está localizado embaixo dos gastrocnêmios, tendo formato peniforme, largo e plano. Tais músculos são responsáveis, conjuntamente ao tendão calcâneo, pelo movimento de flexão plantar do tornozelo (DALMAU-PASTOR *et al.*, 2014; KADIR *et al.*, 2015).

O tendão normal consiste predominantemente de tecido extracelular com baixos requerimentos metabólicos, apresentando em análise macroscópica a coloração esbranquiçada. Essa característica de retardo da nutrição permite que o tendão permaneça em tensão durante um longo período de tempo, sem risco de necrose ou isquemia (VAN STERKENBURG; VAN DIJK, 2011). De acordo com Dietrich (2017), a força produzida pelo tendão calcâneo corresponde a 12,5 vezes o peso do corpo humano.

Muitos tendões são envolvidos por uma membrana de bainha sinovial a fim de possibilitar o deslizamento entre tendões vizinhos ou estruturas ósseas sem causar atrito. O tendão calcâneo não apresenta essa bainha sinovial, mas sim uma camada peritendínea chamada paratendão, reduzindo o atrito durante o livre movimento do tendão contra seus tecidos circundantes. Internamente a essa camada existe o epitendão revestindo os feixes de fibras colágenas. Cada fibra colágena é revestida pelo endotendão, ligando as fibras individuais e fornecendo suprimento sanguíneo e

inervação ao tendão (KANNUS, 2000; NOURISSAT; BEREMBAUM; DUPREZ, 2015; CURY *et al.*, 2016). (Figura 1)

Figura 1. Representação da organização do tendão calcâneo conectando-se ao osso e sua estrutura como um todo.



Fonte: Dietrich (2017), imagem adaptada de Nourissat, Berenbaum e Duprez (2015).

Os tendões são constituídos por fibroblastos e uma matriz extracelular composta por proteínas fibrosas de colágeno, elastina, proteoglicanos, glicoproteínas e polissacarídeos. O colágeno é a principal proteína estrutural e o componente principal da matriz extracelular, representando cerca de 86 a 95% do peso úmido e a elastina representando aproximadamente 1 a 2% da massa tendínea. Esses elementos são produzidos por tenoblastos e tenócitos, que são os fibroblastos e fibrócitos alongados, localizados entre as fibras de colágeno (KANNUS, 2000; NICODEMO *et al.*, 2017) As fibrilas de colágeno são longas, altamente alinhadas e têm uma estrutura cristalina (NEVES *et al.*, 2011).

O colágeno é organizado em níveis hierárquicos de aumento da complexidade, começando com tropocolágeno, um polipeptídeo de tripla cadeia em hélice, que se une em fibrilas (JAMES *et al.*, 2008). As fibrilas formam fibras (feixes primários) e as fibras formam fascículos (feixes secundários), feixes terciários e o tendão em si. Moléculas de tropocolágeno solúveis formam ligações cruzadas para

criar moléculas de colágeno insolúveis, que se juntam para formar fibrilas de colágeno. Uma fibra de colágeno é a menor unidade de tendão. Embora as fibras de colágeno estejam principalmente orientadas longitudinalmente, elas também correm transversal e horizontalmente, formando espirais e tranças (SHARMA; MAFFULLI, 2005; ROMPE; FURIA; MAFFULLI, 2008).

4.2 Lesão Tendínea

A tendinopatia é definida como uma apresentação clínica de dor levando a uma diminuição da capacidade funcional e pode ser acompanhada pela presença de sintomas como inchaço ou espessamento (CASSEL *et al.*, 2014). Constitui a condição clínica de uma lesão do tendão. As tendinopatias podem ser classificadas como tendinites, tendinoses e rupturas do tendão. Tendinite é o processo inflamatório propriamente dito, enquanto tenossinovite é a inflamação do tendão e sua bainha sinovial, estrutura que o tendão calcâneo não possui. Tendinose, diferentemente, é a degeneração das fibras colágenas que formam o tendão, sem inflamação significativa, mas que o torna suscetível à ruptura (FEDERER *et al.*, 2017).

As lesões do tendão podem ser agudas ou crônicas e ocasionadas por fatores intrínsecos e extrínsecos, isoladamente ou em combinação, com predomínio dos fatores extrínsecos em traumas agudos. Por ser o tendão um tecido mal vascularizado, que conseqüentemente tem baixa nutrição e oxigenação, a capacidade para reparo tecidual no tendão é baixa (MATTOS *et al.*, 2015).

Lacerações, rupturas ou inflamação do tendão causam morbidade acentuada e pode ter um grande impacto no trabalho, atividades recreativas e necessidades diárias (JAMES *et al.*, 2008; ALIODOUST *et al.*, 2014). De acordo com estudos epidemiológicos, os distúrbios musculotendíneos constituem o motivo de mais de 1/3 de dias de trabalho perdidos e as lesões resultantes de traumas repetitivos, tais como as tendinopatias, abrangem aproximadamente 65% desses distúrbios. Estudos revelam que as lesões tendíneas crônicas compreendem uma parcela significativa de lesões relacionadas ao esporte, pois cerca de 30% estão relacionadas a corrida e apresentam prevalência de 40% em tenistas (FEDERER *et al.*, 2017).

Segundo Moraes *et al.* (2013), muitas evidências têm demonstrado que o tendão calcâneo representa o tendão mais lesionado dos atletas, além de ser o alvo mais comum de rupturas espontâneas. As atividades que incluem corrida e salto, tais como badminton, voleibol, futebol e atletismo, conforme Huttunen *et al.* (2014), estão entre as que apresentam maior índice de lesão nessa estrutura, sendo os atletas de alto nível os mais acometidos (7-9%) em dez vezes mais que em indivíduos de igual idade. As causas geralmente estão relacionadas a fatores mecânicos e biológicos associados (ARNAL-BURRÓA *et al.*, 2015).

A ruptura do tendão calcâneo é grave e apresenta elevada incidência (LAWRENCE *et al.*, 2017). Essa lesão tende a afetar principalmente o sexo masculino na faixa etária entre 30 a 40 anos, porém não somente atletas profissionais como atletas recreacionais. Além dessa faixa etária, estudos recentes têm indicado sua crescente incidência entre idosos ativos (HO *et al.*, 2017; OCHEN *et al.*, 2018). A ruptura do tendão calcâneo geralmente ocorre 3 a 6 cm proximal à inserção no calcânhar, sendo a maioria durante a atividade esportiva. O mecanismo da lesão é classificado em 3 categorias: primeiro, o rolamento de peso empurrando o antepé e joelho estendido; segundo, uma dorsiflexão antecipada do tornozelo e terceiro, uma violenta dorsiflexão de um pé em flexão plantar (CLAESSEN *et al.*, 2014; KAUWE, 2017).

Os tratamentos empregados na ruptura do tendão calcâneo podem ser o conservador e o cirúrgico, sendo este o que apresenta menor taxa de reincidência, ou seja, de re-ruptura, que classicamente ocorre na mesma região do primeiro rompimento (RUSHTON; SINGH; DESHMUKH, 2012; KRAPP; KAIPEL; MAJEWSKI, 2012; AL-MOUAZZEN *et al.*, 2015; SHETH *et al.*, 2017).

Os tratamentos cirúrgico e conservador ainda geram bastante controvérsia entre os pesquisadores. Na década passada ainda havia bastante apoio ao tratamento não-operatório, com grandes estudos que não sugerem diferença significativa em taxa de re-ruptura dos dois tipos de tratamentos, e a falta de conhecimento desses dados somada a taxa elevada de infecção após cirurgias, levou a um acentuado aumento na proporção de tratamento conservador (LAWRENCE *et al.*, 2017).

A partir da década atual houve um crescimento no reparo cirúrgico. A melhoria inicial da força com o reparo cirúrgico visto em vários estudos randomizados pode ser um determinante na escolha do tratamento em pacientes

mais jovens que desejam retornar aos esportes de alta demanda (SHETH *et al.*, 2017).

O reparo cirúrgico do tendão calcâneo pode ser percutâneo ou aberto. O reparo percutâneo envolve a sutura do tendão calcâneo por meio de várias incisões pequenas, feitas sob anestesia local sem expor o local da ruptura (YANG *et al.*, 2018), constitui assim, o tipo minimamente invasivo, com a utilização de instrumentos especiais para técnicas minimamente invasivas que guiam as suturas tendíneas (DEVRIES; SCHARER; SUMMERHEYS, 2017). De acordo com Al-Mouazzen *et al.* (2015), o reparo percutâneo do tendão calcâneo reduz os riscos de reparo aberto, como infecção de ferida, deiscência e aderências de cicatrizes, atribuindo a re-ruptura após reparo cirúrgico a carga completa com provisão ortótica inadequada, aposição final dos tendões de maneira incorreta e cirurgia tardia.

Apesar dos riscos de complicações como infecções serem maiores no tratamento operatório, estudos mostram diminuição de retorno ao trabalho, uso por tempo mais prolongado de muletas, aderências cicatriciais, fraqueza da panturrilha e índice de re-ruptura maior nos casos não operados em razão do prolongado tempo de imobilização e quando não realizada a fisioterapia. O tratamento cirúrgico, aberto ou percutâneo, mesmo com imobilização pós-operatória tradicional, rende uma taxa de re-ruptura mais baixa (WANG *et al.*, 2015)

O tratamento mais adequado, se cirúrgico ou não, deverá ser bem escolhido pelo profissional e pelo paciente, levando em consideração as atividades exercidas (laborais, esportivas) e estilo de vida, bem como as metas funcionais a serem atingidas.

4.3 Reparo Tendíneo

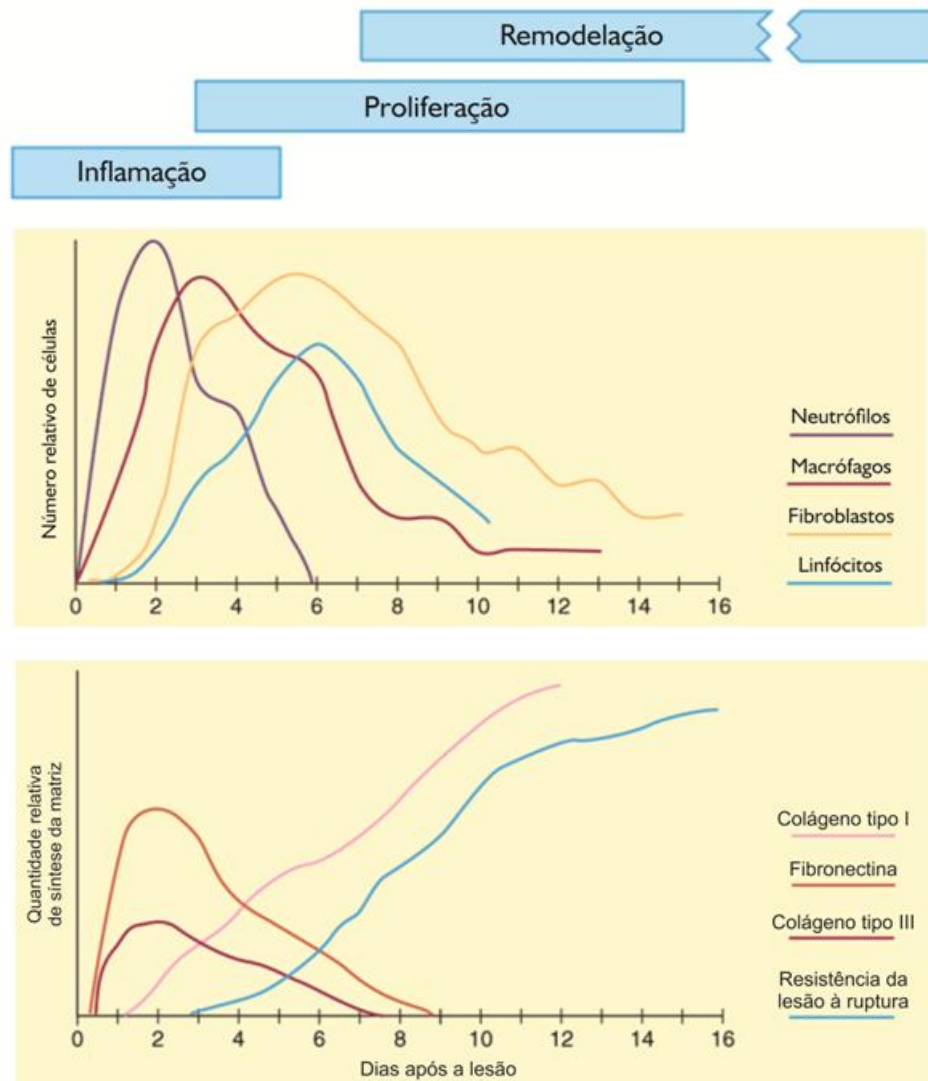
Após lesão do tendão, o processo de cicatrização ou reparo tecidual começa por meio de uma reação inflamatória local caracterizada por edema, vasodilatação no tecido e dor no tendão durante o movimento e em repouso. Além disso, ocorre também no local o recrutamento de células inflamatórias e produção de mediadores químicos tais como citocinas e eicosanoides (WALDEN *et al.*, 2016). A cicatrização tendínea nas lesões agudas ocorre, de uma maneira geral, com uma sucessão de eventos em três estágios distintos e consecutivos: inflamação, proliferação e remodelamento.

A inflamação faz parte de um processo protetivo do organismo. Visa eliminar agentes prejudiciais do local, mediante o aumento da vasodilatação e da permeabilidade capilar, levando à formação de edema. Durante essa fase, o extravasamento de sangue enche a área lesionada com elementos celulares do plasma e plaquetas, coagulando o sangue e gerando um tampão rico em fibrina. Após a saída das plaquetas da camada vascular, as células inflamatórias, neutrófilos, monócitos, macrófagos e fatores de crescimento, migram para o leito da lesão em resposta a agentes quimiotáticos (citocinas pró-inflamatórias) (MULLER *et al.*, 2015). Fibroblastos e tenócitos locais recrutados para o local começam a sintetizar vários componentes da matriz extracelular, predominantemente o colágeno tipo III, que exerce um papel importante no processo de cicatrização (ZABRZYNSKI *et al.*, 2018).

Na fase de proliferação há a migração e proliferação de células endoteliais, fibroblastos, ocorrendo também fibroplasia e angiogênese, criando o tecido de granulação, responsável pela ocupação do tecido lesionado poucos dias após a lesão. Nessa fase, o recrutamento continuado de fibroblastos e sua rápida proliferação no local da lesão são responsáveis pela síntese de colágenos, de proteoglicanos e de outros componentes da matriz extracelular. Estes componentes são inicialmente organizados de forma aleatória dentro da matriz extracelular, que neste momento é composta em grande parte de colágeno tipo III (fibras pequenas e fracas). Outra característica desse estágio, além do aumento da celularidade, é a absorção de grande quantidade de água (DOCHEVA *et al.*, 2015; WU; NERLICH; DOCHEVA, 2017).

A fase de remodelação é caracterizada por uma diminuição da celularidade, síntese de matriz reduzida, diminuição do colágeno tipo III e um aumento no colágeno tipo I. Este tipo de colágeno, considerado responsável pela resistência mecânica do tecido tendinoso, começa a se organizar ao longo do eixo do tendão. A proliferação de células do tendão e a síntese de uma nova matriz são essenciais para a recuperação do tendão, onde a organização linear do colágeno e das células tendíneas deve ser restabelecida durante o processo de remodelação (ANDARAWIS-PURI; FLATOW; SOSLOWSKY, 2015, DOCHEVA *et al.*, 2015, MULLER *et al.*, 2015, TAN; SCHON, 2016).

Figura 2 Fases do reparo tecidual



Fonte: Adaptação de Mcelroy; Webb (2020).

O principal e mais predominante componente fibrilar do tendão é o colágeno tipo I, presente na matriz extracelular, enquanto o colágeno tipo III está presente no endotendão e epitendão. Durante o processo de reparação, o diâmetro da fibra de colágeno é notavelmente menor, reduzindo assim a resistência à tração do tendão. A síntese de colágeno tipo III aumenta durante a fase inicial do processo de reparo e remodelação, diminuindo com a produção aumentada de colágeno tipo I, tornando altamente organizadas as estruturas fibrilares da matriz extracelular (Figura 4) (JAMES *et al.*, 2008; VAN STERKENBURG; VAN DIJK, 2011).

É importante destacar que em atletas de corrida as microfragmentações do colágeno tipo I que ocorrem durante a atividade desportiva regular são normalmente

reparadas, porém, se a tensão ou carga aplicada ao tendão durante a recuperação exceder o limiar de uma possível adaptação reparadora, ocorre uma produção desorganizada da matriz extracelular, pois o colágeno não tem tempo para sua maturação, sendo substituído por colágeno tipo III entre áreas de degeneração mixóide (ARNAL-BURRÓA *et al.*, 2015; ZABRZYNSKI *et al.*, 2018).

4.4 Membranas Biológicas de Polihidroxibutirato e Norbixina

A síntese de novos biomateriais decorre de um rápido progresso e realizações de pesquisas científicas na área de engenharia de materiais, fazendo-se necessário o conhecimento sobre as interações entre biomateriais, tecidos biológicos e desempenho em uso clínico (SINHORETI; VITTI; CORRER-SOBRINHO, 2013).

Dentro deste contexto, o polihidroxibutirato (PHB), um polímero natural pertencente à classe dos poli(hidroxicanoatos) (PHAs), é um poliéster saturado linear, parcialmente cristalino, com a característica única de ser um termoplástico biodegradável produzido por bactérias, a partir de fontes de carbono renováveis como a cana-de-açúcar e que possui propriedades semelhantes aos de plásticos derivados do petróleo, como o polietileno e polipropileno (VILLANOVA; ORÉFFICE; CUNHA, 2010; AARTHI; RAMANA, 2011; MELO *et al.*, 2012). Por ser biocompatível não requer a remoção subsequente do corpo e não causa efeitos indesejáveis no organismo em longo prazo, uma vez que apresentam redução da massa quando em contato com o ambiente corporal. É, portanto, facilmente absorvido pelo organismo humano, podendo, assim, ser usado na produção de membranas biológicas para fins de guiar e estimular a reparação e regeneração tecidual (SOUSA *et al.*, 2016; SOUSA *et al.*, 2018).

De acordo com Sousa *et al.* (2018), o PHB pode ser usado em suturas, como dispositivos para controle e distribuição de medicamento, como dispositivos de fixação ortopédica tais como parafusos e placas de osteossíntese, na prevenção de aderência e na engenharia de tecidos, apoiando e orientando o crescimento de novos tecidos biológicos por meio da proliferação celular e controle da resposta inflamatória e imunológica.

Aliada ao PHB na produção de membranas, produtos naturais como a norbixina podem conferir propriedades importantes para a cicatrização tecidual. A

norbixina é um carotenoide oriundo da superfície das sementes de urucum, fruto Urucuzeiro, da espécie vegetal *Bixa orellana* L. Esta planta tropical é nativa das florestas das Américas Central e do Sul, sendo o Brasil o maior produtor de sementes de urucum, representando aproximadamente 70% de todo o urucum produzido no mundo, ou seja, é uma planta típica e abundante no país e de baixo custo (LIMA *et al.*, 2001; YUSÁ-MARCO *et al.*, 2008; MAGESTE *et al.*, 2012).

Os compostos extraídos da *Bixa orellana* L. são amplamente utilizados em muitas indústrias farmacêuticas, alimentícias e cosméticas por apresentarem atividade antibacteriana, antifúngica e anti-inflamatória (ZHANG; ZHONG, 2013; NATIVIDAD; RAFAEL, 2014; SANTOS *et al.*, 2014; VILAR *et al.*, 2014). O carotenoide norbixina (C₂₄H₂₈O₄) é um ácido dicarboxílico que contém nove ligações duplas conjugadas e é não tóxico e hidrossolúvel, embora seja pouco solúvel em etanol e acetona. A norbixina é degradada na presença de oxigênio, luz visível, em temperaturas acima de 180 °C e em solução quando o pH muda (FONTINELE *et al.*, 2018). A norbixina apresenta propriedades antioxidantes (devido às ligações duplas conjugadas na sua estrutura), antimicrobianas e antitumorais, comprovadas em estudos citados por Teixeira da Silva, Dobránszki e Rivera-Madrid (2018) e, em razão dessas características, tem grande potencial para uso em membranas biodegradáveis e biocompatíveis de polímeros como o PHB (LIMA *et al.*, 2001; CHISTÉA *et al.*, 2011; MUTHUKUMAR *et al.*, 2014; SOMACAL *et al.*, 2015; SOUSA *et al.*, 2018).

Estudos sobre os efeitos genotóxicos, teratogênicos ou mutagênicos desses materiais foram realizados para avaliar as propriedades de interações com meio biológico em animais. Sousa *et al.* (2016) avaliando a citotoxicidade da membrana de PHB com norbixina e adição de etilenoglicol, afirmam que o teste do micronúcleo sugeriu que o biomaterial não tem toxicidade biológica. O ensaio cometa do mesmo material, mesmo tendo revelado um aumento no dano ao DNA nas primeiras 4h, sugeriu um reparo em 24 horas. Monte *et al.* (2016) em estudos sobre genotoxicidade da membrana de poliestireno com colágeno e norbixina constataram que não houve toxicidade biológica desse biomaterial em ratos.

Pesquisas científicas com biomateriais aplicados a lesões tendíneas têm sido desenvolvidas ao longo dos últimos anos, especialmente usando membrana amniótica isolada ou associada a outros materiais estimuladores do reparo tecidual. (LIU *et al.*, 2016, SEO; KIM; EO, 2016; NICODEMO *et al.*, 2017). Suckow *et al.*

(2007) em seu estudo comparativo entre submucosa do intestino delgado suíno e matriz de cápsula renal suína em reparo tendíneo citou diversas pesquisas já realizadas em tendões com biomateriais artificiais tais como filmes biodegradáveis de poliepsilon-caprolactona, membrana de polihidroxietil metacrilato (pHEMA) e malha de polipropileno.

4.5 Terapia com LED

Fotobiomodulação (FBM) é um termo amplamente utilizado na atualidade, caracterizando intervenções com fototerapia visando modular processos biológicos (HASLERUD *et al.*, 2017). A Terapia com Laser de Baixa Intensidade (TLBI), nos comprimentos de onda do vermelho e do infravermelho, constitui uma modalidade da FBM. Tem sido referenciada em diversos estudos ao longo dos anos, demonstrando resultados favoráveis na modulação do processo inflamatório de modo geral, no controle da dor e edema, no aumento da perfusão sanguínea, na prevenção de necrose e no aumento do influxo de neutrófilos, bem como controlando a atividade das células inflamatórias. Atua ainda diretamente no aumento da proliferação de fibroblastos e na produção de colágeno durante o reparo tecidual (CASALECHI *et al.*, 2013; MARCOS *et al.*, 2014; GOMES *et al.*, 2017).

A TLBI é a modalidade mais antiga da fotobiomodulação, tendo seus fundamentos teóricos descritos por Einstein desde 1917 e mais tarde, em 1950, por Townes, Gennadiyevich e Mikhailovich. Essa teoria se tornou realidade em 1960, quando Maiman desenvolveu o primeiro laser nos Laboratórios Bell. Desde 1971, o laser foi descrito como um dos métodos terapêuticos não invasivos mais importantes no tratamento de lesões crônicas. O laser pode ser contínuo ou pulsado, com diferentes comprimentos de onda, potência (W) e energia (J), densidade de energia (J/cm^2), tempo (s) e área de irradiação (cm^2) (LORETI *et al.*, 2015; FRANCK; HENDERSON; ROTHHAUS, 2016).

Estudos apontam evidências de que o LED, outro subtipo da FBM, produz efeitos teciduais semelhantes à TLBI (terapia laser de baixa intensidade), porém diferem no modo como as ondas são formadas (TAKHTFOOLADI *et al.*, 2015). Enquanto o laser é limitado por uma cavidade de ressonância que promove a amplificação e irradiação de fótons para formar um feixe coerente e colimado, o LED não tem esta cavidade óptica. Portanto, a luz emitida por um LED não é coerente e

colimada, mas produz um espectro eletromagnético semelhante ao produzido por um laser (MATTOS *et al.*, 2015).

Até o final da década de 1990, os LEDs não haviam obtido o mesmo grau de aceitação que os sistemas baseados em laser de diodo, devido às baixas e instáveis potências de saída, altos ângulos de divergência e falta de especificidade do comprimento de onda. Após a introdução dos LEDs da Administração Nacional do Espaço e da Aeronáutica (NASA), em 1998, como resultado do trabalho em uma nova geração de superLEDs para o crescimento de plantas na Estação Espacial, estes tornaram-se disponíveis para fototerapeutas e pesquisadores (KIM; CALDERHEAD, 2011; MIN; GOO, 2013).

A luz emitida pelos LEDs vai do comprimento de onda do ultravioleta ao infravermelho, ou seja, de 247 aos 1300 nanômetros (nm), sendo as regiões mais utilizadas do espectro eletromagnético o Azul (400-470 nm), o Verde (470-550 nm), o Vermelho (630-700 nm) e o Infravermelho (700-1200 nm) (DOURADO *et al.*, 2011). Os LEDs terapêuticos mais utilizados são caracterizados por emissão de luz visível ou na região do infravermelho próximo e foram investigados em campos biológicos e médicos para a terapêutica voltada para reparo tecidual e cicatrização. A terapia por LED tem sido associada à síntese de ATP, à taxa de síntese de RNA e DNA e proliferação celular, à síntese de fibroblastos e colágeno e ao aumento da vascularização (MOURA JÚNIOR *et al.*, 2015; NASCIMENTO *et al.*, 2019).

De acordo com Lima, Sergio e Fonseca (2019), os efeitos de PBM dependem da absorção de energia por cromóforos (fotoreceptores) da radiação incidente nas células, que provocam eventos fotofísicos e fotoquímicos nas moléculas em níveis celulares. Esses eventos são influenciados por parâmetros de irradiação física como comprimento de onda, densidade de energia, densidade de potência, modo de emissão (onda pulsada ou contínua), tempo de irradiação e modo de irradiação, bem como parâmetros clínicos tais como número de pontos irradiados, área irradiada, técnica de aplicação, frequência de aplicação e tempo de tratamento. Além desses fatores, segundo Zein, Selting e Hamblin (2018), características de absorção do tecido, intervalo de repetição do tratamento e aquecimento inadvertido do tecido biológico também podem influenciar nos resultados obtidos com a terapia por LED.

Estudos comparativos entre a TLBI e a terapia com LED têm demonstrado semelhança entre os efeitos terapêuticos das duas técnicas, conforme Dall Agnoll *et al.* (2009) observaram em estudo realizado sobre lesão na pele com ratos diabéticos

e não diabéticos usando o LED (640nm) e o laser (660nm). Ambas as terapias mostraram redução das células inflamatórias e aumento da proliferação de fibroblastos.

Em outro estudo, realizado por Bastos, Lizarelli e Parizotto (2009), foram comparados os efeitos entre a irradiação com diferentes comprimentos de onda entre a LED terapia de 630 nm (visível) e de 880 nm (invisível) e a TLBI de 685 nm (visível) e de 830 nm (invisível), em ratos submetidos ao processo de tenotomia do tendão de Aquiles, comprovando ao término do experimento que o emprego das terapias na região do espectro eletromagnético do infravermelho próximo (830 nm e 880 nm) favoreceram a melhora da organização, agregação e alinhamento do colágeno, contribuindo assim, para uma reparação tecidual mais efetiva. Prindeze, Moffatt e Shupp (2012), no entanto, em estudo de revisão, afirmam que a terapia de luz no espectro vermelho (630-690 nm) demonstrou produzir maior resposta biológica.

Diversos estudos, ao longo dos últimos anos, têm evidenciado os efeitos terapêuticos da terapia LED, especialmente no tecido tendíneo. Casalechi *et al.* (2009) realizaram um estudo que objetivou avaliar os efeitos da terapia LED sobre o processo de reparo tecidual em ratos submetidos ao processo de tendinopatia experimental traumática. Os resultados apontaram para uma diminuição significativa do número de fibroblastos, após irradiação com a terapia LED. Estes resultados foram ratificados por Parente *et al.* (2013) em seu estudo onde a terapia LED propiciou efeitos benéficos quanto à redução no número de células inflamatórias e no alinhamento das fibras colágenas, corroborando também com os resultados obtidos por Silva, Carvalho e Moura-Junior (2011) que observaram efeitos fotobiomoduladores após irradiação com a dose igual a 4 J/cm^2 , favoráveis a maior ação pró-inflamatória.

Moura Junior *et al.* (2015) avaliaram os efeitos do tratamento constituído pelo ultrassom terapêutico (US) e a terapia LED (625 nm e 945 nm) em um modelo experimental de tenotomia do tendão calcâneo, comprovando que o US promoveu a redução das células inflamatórias em diferentes tempos experimentais (14º dia), enquanto a LED terapia (625 nm) apresentou melhor resultado, ou seja, maior síntese de colágeno tipo I (14º dia) em relação aos outros tratamentos.

Ferreira *et al.* (2013) esclarecem que a radiação eletromagnética, coerente e não-coerente, favorece, significativamente, a neovascularização do tecido lesionado,

colaborando com o processo de reparo, reduzindo a área necrosada, por meio do incremento do fluxo sanguíneo nos locais da lesão. Além destes efeitos a fototerapia contribui para a diminuição do número de células inflamatórias, promovendo efeito estimulador sobre o Fator de Crescimento Tumoral Alfa e Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas, diretamente relacionados ao processo de reparo tecidual.

Estudos descreveram que a terapia LED é capaz de modular a expressão do gene RNAm em células produtoras de mediadores pró-inflamatórios em modelo experimental de tendinite. Xavier *et al.* (2010) investigaram os efeitos da terapia LED (880 ±10 nm) em um modelo experimental de tendinite calcânea induzida por colagenase. Foi comprovado que a terapia LED promoveu um decréscimo no influxo de células inflamatórias, expressão de RNAm, interleucinas (IL-1 beta), IL-6, TGF- α e ciclo-oxigenase-2 (COX-2). Xavier *et al.* (2014) avaliaram as alterações quantitativas na composição do colágeno (tipo I e III) em tendões após tenotomia e o emprego da terapia LED. Foi possível concluir que a terapia LED (880 nm) mostrou ser eficaz no aumento da expressão de RNAm, interleucinas 10 (IL-10) e colágeno (tipo I e III), sugerindo que o recurso apresenta efeitos potencialmente terapêuticos em lesões do tendão calcâneo.

Helrigle *et al.* (2015) evidenciaram que a terapia LED de baixa intensidade foi favorável à modulação da IL-6, IL-10 e TNF- α suprimindo a ação pró-inflamatória, por meio da determinação dos eicosanoides sobre a inflamação do tendão. A eficiência do LED relatada acima pode estar relacionada a diferentes efeitos do LED quanto aos parâmetros dosimétricos (energia, comprimento de onda, tempo e potência), constituindo uma das características mais importantes no protocolo de irradiação, uma vez que favorecerá os efeitos fotobiomodulares importantes no processo de reparo tecidual.

A tabela 1 apresenta o resumo dos estudos de fotobiomodulação com LED em tendão calcâneo de ratos, apresentando os principais parâmetros e resultados:

Quadro 1. Resumo dos parâmetros e resultados obtidos a partir de estudos realizados com terapia LED de baixa intensidade em lesões do tendão calcâneo. *(continuação)*

Autores/ Ano	Tipo de lesão	Parâmetros do LED	Resultados
Bastos; Lizarelli; Parizotto (2009)	Tenotomia parcial	Ø mm: NC λ (nm) 880 e 630 P (W): 0,025 A (cm ²): 0,2826 T (s): NC DE (J/cm ²): 6 E (J): NC DP (W/cm ²): NC	Após 5 dias: ↑ proliferação de fibroblastos Após 10 dias: ↑ alinhamento e organização das fibras colágenas
Casalechi <i>et al.</i> (2009)	Tenotomia	Ø mm: NC λ (nm) 640 P (W): 0,1 A (cm ²): 0,5 T (s): 120 DE (J/cm ²): 20 E (J): NC DP (W/cm ²): NC	↓ células inflamatórias, ↓ remodelamento e ↑ organização das fibras de colágeno
Xavier <i>et al</i> (2010)	Tendinite	Ø mm: NC λ (nm) 880 P (W): 0,022 A (cm ²): 0,5 T (s): 170 DE (J/cm ²): 7,5 E (J): NC DP (W/cm ²): NC	↑ células inflamatórias, reorganização das fibras colágenas, ↓ expressão de mRNA, de IL-6 e TNF-α
Silva; Carvalho; Moura Júnior (2011)	Tendinite	Ø mm: NC λ (nm) 640 P (W): 0,03 A (cm ²): 0,5 T (s): 120 DE (J/cm ²): 4 E (J): NC DP (W/cm ²): NC	Após 7 e 14 dias: ↑ fibroblastos quando comparados com os grupos com tendinite Ausência de resultado significativo entre grupos tratados e os grupos de ratos saudáveis Sem reconstrução da estrutura normal do tendão em todos os animais
Parente <i>et al</i> (2013)	Tendinopatia	Ø mm: NC λ (nm): 640 P (W): 0,096 A (cm ²): 3,3 T (s): 70 DE (J/cm ²): 2,04 E (J): NC DP (W/cm ²): NC	Grupos TEND após 7 e 21 dias: ↑ células inflamatórias e ↑ desorganização das fibras colágenas Grupos LED após 7 e 21 dias: quantidade de células e organização das fibras colágenas semelhantes aos grupos controles Grupos DROG 7 e 21 dias: número de células semelhantes aos dos grupos TEND com ↑ organização das fibras colágenas
Xavier <i>et al</i> (2014)	Tendinite	Ø mm: NC λ (nm): 880 P (W): 0,02 A (cm ²): 0,5 T (s): 170 DE (J/cm ²): 7,5 E (J): NC DP (W/cm ²): NC	Após 7 dias: ↑ IL -10; Após 7 e 14 dias: ↑ colágenos tipos I e III

Quadro 1. Resumo dos parâmetros e resultados obtidos a partir de estudos realizados com terapia LED de baixa intensidade em lesões do tendão calcâneo. *(conclusão)*

Helrigle <i>et al</i> (2015)	Tendinopatia	\varnothing mm: NC λ (nm): 945 P (W): 0,032 A (cm ²): 1 T (s): 120 DE (J/cm ²): 3,84 E (J): 3,84 DP (W/cm ²): 0,032	Após 7 e 14 dias: ↓ IL-6 e TNF- α , ↑ IL-10; ↓ efeitos inflamatórios.
Moura Júnior <i>et al</i> (2015)	Tenotomia	\varnothing mm: todo o diâmetro λ (nm) 625 e 945 P (W): 0,033 A (cm ²): 0,5 T (s): 60 DE (J/cm ²): 4 E (J): 2 DP (W/cm ²): 0,5	Grupos LED 945 após 7 dias: ↓ células inflamatórias e ↑ colágeno tipo III (Raman) Grupos LED 625 após 7 dias: sem diferença do grupo controle e ↑ síntese de colágeno tipo I (Raman)

\varnothing : diâmetro, NC: não consta no artigo, λ : comprimento de onda, P: potência, A: área do feixe, T: tempo, DE: densidade de energia, E: energia, DP: densidade de potência.

Fonte: Tabela adaptada de Nascimento *et al.* (2019).

O aumento do número de pesquisas sobre a terapia com LEDs em comparação com a terapia a laser está baseado no fato de que a luz, ao incidir no tecido biológico, perde sua coerência nos primeiros estratos da pele, não sendo este um fator preponderante da luz em baixa intensidade. Outro fator é o econômico devido ao menor custo e maior durabilidade dos LED em relação aos lasers.

O custo menor dos LEDs está relacionado à menor complexidade da configuração dos equipamentos e menor rigor da legislação vigente, diretamente relacionada ao risco biológico de lesão ocular (não coerência dos LEDs). Já a durabilidade dos LEDs está relacionada à ausência da necessidade de grande estímulo dos materiais que compõem o meio ativo, para a produção de luz não coerente. Os aparelhos que emitem radiação laser (luz coerente) têm alto custo, fazendo-se necessária a busca por fontes luminosas alternativas. Nesse contexto, os LEDs surgem como uma excelente opção em virtude do seu potencial de ação e de seu valor mais acessível (SILVA; CARVALHO; MOURA JÚNIOR, 2011).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo de caráter quantitativo, realizado de modo experimental.

5.2 Local do estudo

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Cirurgia Experimental do Núcleo de Biotecnologia e Biodiversidade da Universidade Estadual do Piauí (NPBIO – UESPI).

5.3 Amostra

Para este estudo foram usados 60 ratos wistar (*Rattus norvegicus*), machos, com aproximadamente 10 semanas de vida, clinicamente sadios, obtidos do Biotério do Núcleo de Biotecnologia e Biodiversidade da Universidade Estadual do Piauí (NPBIO – UESPI), com peso médio variando de 250 a 300g. Os animais foram mantidos em espaço acusticamente isolado, dentro de gaiolas de polipropileno com ração e água *ad libitum*, em condições controladas de temperatura (19°) e luz (12-12h de ciclos claro-escuro). Durante o experimento foram cumpridas as recomendações de conforto e bem-estar dos animais de acordo com as normas do Comitê de Ética em experimentação animal.

O tamanho da amostra foi calculado considerando $\alpha = 0,05$ (5% de chance de um erro de tipo I), $1-\beta = 0,95$ (% do poder da amostra) (HERPICH *et al.*, 2014) e os dados da análise histológica do infiltrado inflamatório relatado no estudo de Alves *et al.* (2018) na qual o número mínimo para cada grupo foi determinado para ser de 3 elementos, sendo acrescentados mais dois elementos para compensar possíveis perdas na amostra. Este cálculo foi realizado utilizando os princípios de Armitage e Berry (1987), disponibilizado pela plataforma *online* do Laboratório de Epidemiologia e Estatística da Universidade de São Paulo (LEE – USP) pelo endereço eletrônico http://www.lee.dante.br/pesquisa/amostragem/qua_2_medias.html#niv-sig (acessado em 12/09/2019).

5.4 Aspectos Éticos

O protocolo deste estudo foi submetido à análise e aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEUA) da Universidade Estadual do Piauí (UESPI), sob o número de 14776/16 (ANEXO A).

5.5 Grupos Experimentais

Os 60 animais foram aleatoriamente divididos em doze grupos, cada um contendo cinco ratos em três períodos de tempo (7, 14 e 21 dias) conforme descrição a seguir, também representada no Quadro 2:

Grupo LC1 (n=5): animais tenotomizados, sem tratamento (lesionado-controle), eutanasiados no 7º dia pós-operatório (PO).

Grupo LED1 (n=5): animais tenotomizados, sem membrana, tratados com LED ($6\text{J}/\text{cm}^2$) por seis dias e eutanasiados no 7º dia de pós-operatório.

Grupo MNo1 (n=5): animais tenotomizados, com membrana de polihidroxibutirato e norbixina por 6 dias, eutanasiados no 7º dia PO.

Grupo MNo+LED1 (n=5): animais tenotomizados, com membrana de polihidroxibutirato e norbixina tratados com LED ($6\text{ J}/\text{cm}^2$) por 6 dias, eutanasiados no 7º dia pós-operatório (PO).

Grupo LC2 (n=5): animais tenotomizados, sem tratamento (lesionado-controle), eutanasiados no 14º dia PO.

Grupo LED2 (n=5): animais tenotomizados, sem membrana, tratados com LED ($6\text{J}/\text{cm}^2$) por 13 dias e eutanasiados no 14º dia de pós-operatório.

Grupo MNo2 (n=5): animais tenotomizados, com membrana de polihidroxibutirato e norbixina, eutanasiados no 14º dia pós-operatório (PO).

Grupo MNo+LED2 (n=5): animais tenotomizados, com membrana de polihidroxibutirato e norbixina, tratados com LED ($6\text{ J}/\text{cm}^2$) por 13 dias, eutanasiados no 14º dia PO.

Grupo LC3 (n=5): animais tenotomizados, sem tratamento (lesionado-controle), eutanasiados no 21º dia PO.

Grupo LED3 (n=5): animais tenotomizados, sem membrana, tratados com LED ($6\text{J}/\text{cm}^2$) por 20 dias e eutanasiados no 21º dia de pós-operatório.

Grupo MNo3 (n=5): animais tenotomizados, com membrana de polihidroxibutirato e norbixina, eutanasiados no 21º dia pós-operatório (PO).

Grupo MNo+LED2 (n=5): animais tenotomizados, com membrana de polihidroxibutirato e norbixina, tratados com LED (6 J/cm²) por 20 dias, eutanasiados no 21º dia PO.

Quadro 2. Relação da quantidade de animais, grupos, tratamento e eutanásia.

Grupo (n=5)	Tratamento	Eutanásia dias (PO)
LC1	Lesionado-Controle	7º dia
MNo1	Membrana	7º dia
LED1	LED (640nm)	7º dia
MNo+LED1	Membrana + LED	7º dia
LC2	Lesionado-Controle	14º dia
MNo2	Membrana	14º dia
LED2	LED (640nm)	14º dia
MNo+LED2	Membrana + LED	14º dia
LC3	Lesionado-Controle	21º dia
MNo3	Membrana	21º dia
LED3	LED (640nm)	21º dia
MNo+LED3	Membrana + LED	21º dia

Fonte: A Autora

5.6 Aquisição da Membrana

A membrana utilizada neste estudo foi produzida por pesquisadores do Mestrado em Ciências de Materiais do Instituto Federal do Piauí (IFPI) e está em processo de patente no Núcleo de Inovação Tecnológica com o número do registro: BR 10 2017 028640 1.

Figura 3. Membrana de polihidroxibutirato e norbixina



Fonte: A Autora

5.7 Procedimento Cirúrgico:

Todos os animais receberam um pré-tratamento com atropina (pré-anestésico), na dose de 0,04mL para cada 100g de peso corpóreo, seguido de repouso de 15 minutos para o procedimento anestésico. A droga anestésica foi administrada por via intramuscular, usando 10% de cetamina, com a dose de 0,1mL para cada 100g de peso corpóreo e 2% de xilazina a uma dose de 0,1mL para cada 100g, utilizando uma seringa de insulina de 1mL para cada animal. Em seguida foi realizada a tricotomia e limpeza da pele com álcool iodado a 2% na região do tendão de calcâneo da pata direita do animal. O procedimento cirúrgico teve início com uma incisão longitudinal na pele da parte posterior inferior da porção da pata traseira direita do rato. O tendão foi exposto e seccionado transversalmente na região média com um bisturi, entre a inserção do tendão e a junção miotendínea, em todos os animais, conforme protocolo realizado por Casalechi *et al.* (2009). Em todos os animais dos grupos membrana (MNo1, MNo2 e MNo3, n=15) e Membrana + LED (MNo+LED1, MNo+LED2, MNo+LED3, n=15) o fragmento da membrana, de aproximadamente 6 x 3 mm de comprimento e largura, respectivamente, foi colado com metacrilato em dois pontos unindo as duas porções do tendão: um ponto na porção superior e outro ponto na porção inferior do tendão seccionado, sendo ambos os pontos na face longitudinal e profunda do tendão calcâneo. Os demais animais dos grupos Lesionado-controle (LC1, LC2, LC3, n=15) e LED (LED1, LED2,

LED3, n=15) não receberam a membrana ou qualquer material para fixar os cotos tendíneos, bem como não tiveram a pata imobilizada, conforme realizaram Casalechi *et al.* (2009), Moura Júnior *et al.* (2015) e Parafioriti *et al.* (2011) em seus estudos. Posteriormente à tenotomia, foi realizado o fechamento da pele com fio monofilamento de seda 4-0.

Figura 4. Cirurgia: isolamento do tendão de Aquiles (A). Posicionamento da membrana de PHB e norbixina (B). Tenotomia (C). Sutura da pele pós-cirurgia (D).



Fonte: A Autora

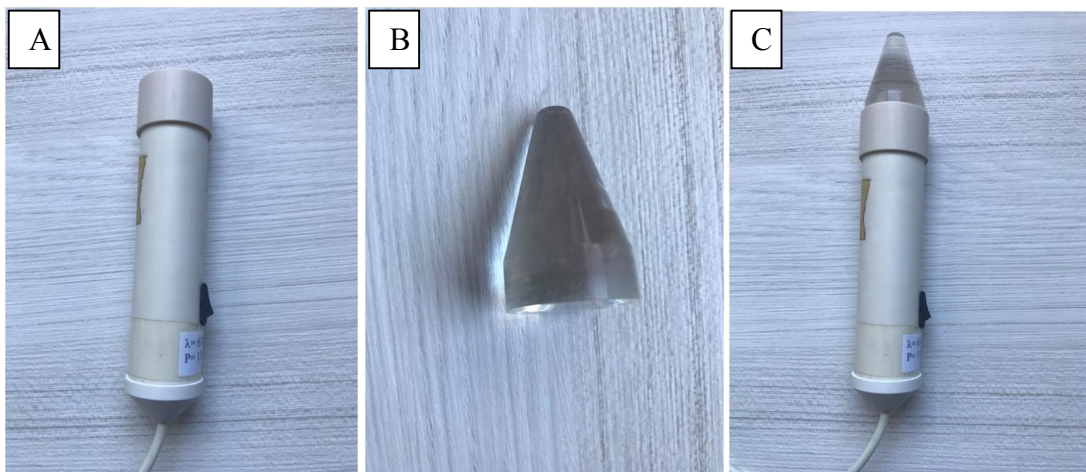
Após o procedimento cirúrgico, os ratos do grupo LC (LC1, LC2 e LC3) e do grupo MNo (MNo1, MNo2 e MNo3) foram mantidos em gaiolas em grupos de cinco animais. Os animais de cada gaiola receberam duas gotas (50 mg/kg) de dipirona diluída em água a cada 12 horas para analgesia, durante o período experimental, conforme o protocolo adotado por Alves *et al.* (2018). Nenhuma cirurgia infeccionou e a pele da região da incisão não exibiu deiscência.

5.8 Terapia com LED

O equipamento utilizado no estudo foi um protótipo de LED ($660 \pm 20\text{nm}$), produzido no Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) da Univap (Figura 5) com potência de 14 mW, diâmetro de 1 cm, área do colimador igual a $0,5\text{ cm}^2$, em

contato direto com a pata do animal. O tempo empregado foi de 214,3 segundos (~3,6 minutos = 3min e 36 s), obtendo-se uma dose final de 6 J/cm^2 por irradiação pontual (Quadro 2). Antes do início dos experimentos, o equipamento de LED foi aferido usando um medidor de potência (Model 13 PEM 001/J, MellersGriot, Netherlands).

Figura 5. A: Protótipo de LED ($660 \pm 20\text{nm}$); B: Colimador; C:LED com colimador acoplado



Fonte: A Autora

Quadro 3. Parâmetros de irradiação do LED.

PARÂMETROS	VALORES
Equipamento	Protótipo de LED – IP&D (UNIVAP)
Comprimento de Onda (nm)	660 ± 20
Potência (mW)	14
Densidade de Potência (W/cm^2)	0,028
Energia (J)	3
Densidade de Energia (J/cm^2)	6
Área do Feixe (cm^2)	0,5
Tempo de irradiação por ponto (s)	214,3 s (~3,6 minutos = 3min e 36 s)
Número de pontos	1
Modo de aplicação	Pontual
Número e frequência das sessões	6 sessões (grupos LED1, MNo+LED1)* 13 sessões (grupos LED2, MNo+LED2)* 20 sessões (grupos LED3, MNo+LED3)* *a cada 24 horas, iniciando uma hora após o procedimento cirúrgico.

Fonte: A Autora

A terapia com LED teve início uma hora após o procedimento cirúrgico e se repetiu a cada 24 horas com todos os animais dos grupos LED e Membrana+LED recebendo o mesmo tratamento. Para isto, os animais foram posicionados em decúbito ventral, dentro de um tubo de PVC fixado em base de madeira, e contidos manualmente por um auxiliar. As patas traseiras direitas receberam irradiação de forma pontual em contato direto com a região tenotomizada, formando um ângulo de 90° em relação à área da lesão, na dosagem de 6J/cm². A caneta do aparelho foi protegida com filme plástico antes de cada irradiação. Os animais dos demais grupos (LC e MNo) foram manipulados, durante o mesmo período de tempo, porém com o aparelho desligado (Figura 6).

Figura 6. Posicionamento adequado do LED a 90° com a região do tendão (A). Aplicação diária com auxílio para contenção do rato (B). Manipulação da pata direita sem irradiação nos grupos controle e membrana (C).



Fonte: A Autora

5.9 Eutanásia dos Animais

A eutanásia dos animais seguiu o esquema abaixo:

1ª eutanásia
↓

2ª eutanásia
↓

3ª eutanásia
↓

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

Os animais foram eutanasiados no 7º dia (grupos LC1, MNo1, LED1 e MNo+LED1), 14º dia (grupos LC2, MNo2, LED2 e MNo+LED2) e 21º dia (grupos LC3, MNo3, LED3 e MNo+LED3) após o procedimento cirúrgico, mediante administração de dose excessiva de anestesia, conforme orientação da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação em Animais (BRASIL, 2008), amparada pela Lei nº 11.794 de 08 de outubro de 2008 . Em seguida, os tendões lesionados foram removidos por dissecação da inserção do calcâneo até a junção miotendínea, fixados em solução de formalina a 10% e, posteriormente, encaminhados para processamento histológico (Figura 8).

Figura 7. Exposição do Tendão (A), Dissecação do tendão (B e C) e Tendão removido (D).



Fonte: A Autora

5.10 Técnica histológica

Após um período de fixação de 12 horas em solução de formalina, as amostras foram desidratadas em uma série de álcool em concentração crescente de

70%, 80% e 90%, depois diafanizados com xilol e posteriormente emblocadas em parafina. De cada bloco foram feitos 4 cortes histológicos semisseriados longitudinais com espessura de 5 micrômetros e corados com Hematoxilina & Eosina (HE, n= 2) e *Picrosirius Red* (n=2).

5.11 Morfometria

O local escolhido para morfometria, em todas as amostras, foi no tecido em regeneração na porção mais proximal das margens do tecido tenotomizado.

Para a quantificação de células inflamatórias e fibroblastos, foi utilizado um microscópio Zeiss, na objetiva de 20x. As microfotografias foram realizadas com câmera Zeiss acoplada, em um aumento de 0,5X e resolução de 5mb. A contagem das células inflamatórias e fibroblastos foi realizada com o programa de análise computacional de imagens Image-J® (Versão 1,32 para Windows) de domínio público (Instituto Nacional de Saúde, NIH, Bethesda, EUA). Cinco campos por lâmina foram avaliados com aumento de 200x com a ferramenta de contagem manual dos núcleos celulares. A pontuação média obtida nos campos determinou a pontuação única para cada amostra de cada grupo experimental.

5.12 Análise do colágeno

O Picrosirius Red é uma agente de contraste usado para potencializar a birrefringência do tecido e possibilitar a visualização do arranjo de fibra de colágeno usando a luz polarizada (SPIESZ *et al.*, 2018).

As lâminas coradas com *Picrosirius Red* foram examinadas e fotografadas ao Microscópio com luz polarizada Leica® DM 2000 acoplado à câmera DFC, na objetiva de 10x. Foram analisadas as quantidades de colágeno do tipo I e do tipo III. Para a quantificação foi usado o programa Image J Pro-plus. Após a calibração, foram identificados os dois tipos de colágeno pelas respectivas colorações, permitindo ao programa a contagem em percentual dos colágenos do tipo I e tipo III em relação a área total ocupada pela imagem.

5.13 Análise Estatística

Os dados foram avaliados quanto ao coeficiente de variação e a distribuição amostral para a determinação do teste estatístico, com auxílio do programa GraphPad Prism, versão 5.0 (GraphPad, California, USA), empregando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. Devido a apresentação não paramétrica dos dados foi utilizado o teste Man-whitney (análise intergrupo) e o teste Kruskal-Wallis com pós-teste de *Dunn's* (análise intragrupo), considerando intervalo de confiança de 95% e nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

6 RESULTADOS

6.1 Análise Quantitativa

6.1.1 Células inflamatórias

Na análise intragrupo do grupo Lesionado-controle foi verificado uma diminuição significativa da contagem média das células inflamatórias nos períodos de 7-21 dias ($p=0,0004$) e 14-21 ($p=0,0004$). No grupo Membrana também foi observada uma redução significativa nos períodos de 7-21 dias ($p=0,0001$) e 14-21 ($p=0,0010$). No grupo LED foi expressa diferença significativa nos períodos de 7-14 dias ($p=0,0021$) e 7-21 ($p=0,0021$). Já no grupo Membrana+LED foi constatada uma diminuição significativa apenas no período de 7-14 dias ($p=0,0018$) (Tabela 1).

Tabela 1. Avaliação intragrupos da média da contagem das Células Inflamatórias (média \pm erro-padrão).

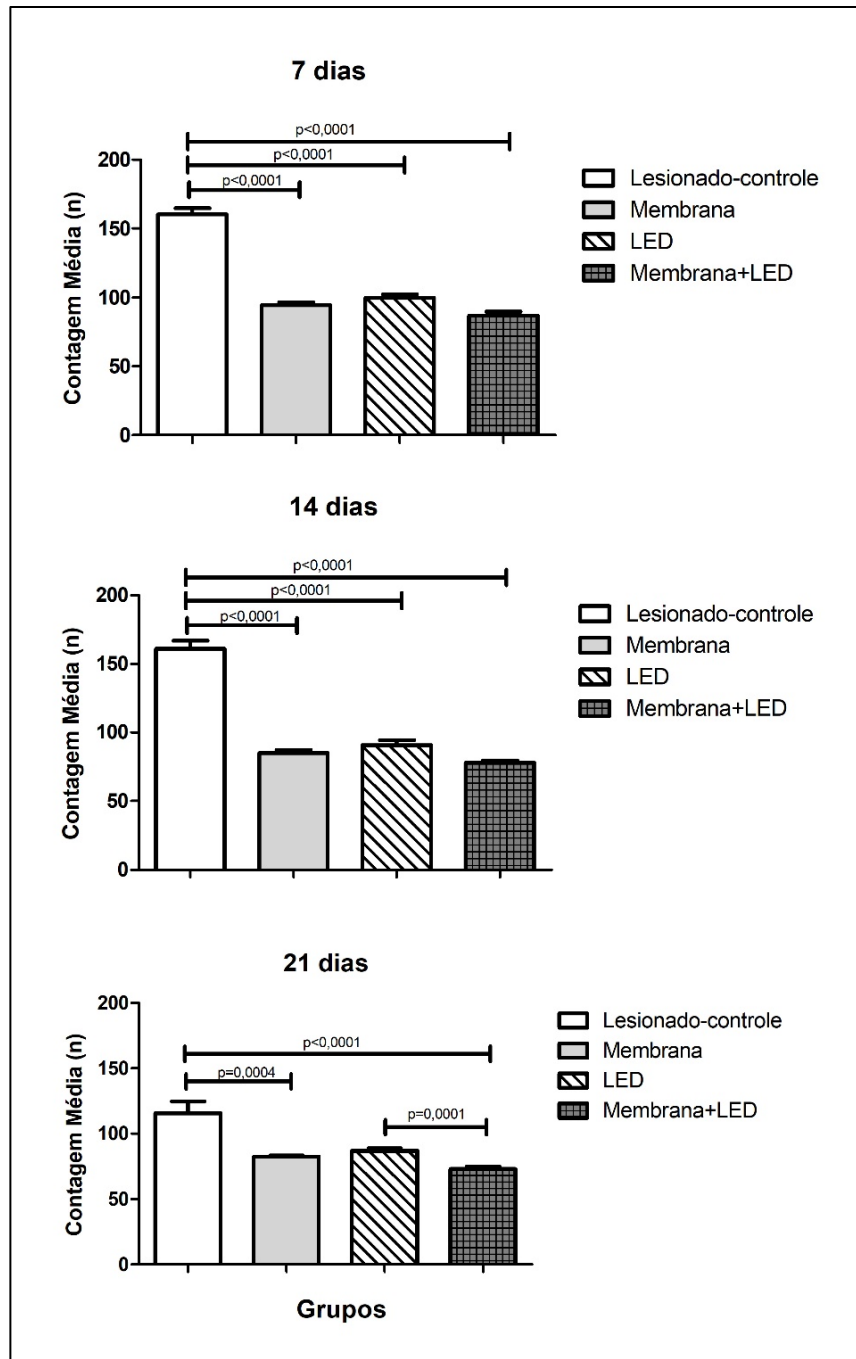
Grupos	Período (dias)			AIG		
	7	14	21	p (7-14)	p (7-21)	p (14-21)
Lesionado-controle	160,3 \pm 4,56	161,1 \pm 6,06	115,5 \pm 9,35	ns	*0,0004	*0,0004
Membrana	94,35 \pm 2,13	85,15 \pm 2,13	82,65 \pm 0,87	ns	*0,0001	*0,0010
LED	99,63 \pm 2,61	90,90 \pm 3,48	87,00 \pm 2,09	*0,0021	*0,0021	ns
Membrana+LED	86,85 \pm 2,88	78,15 \pm 1,50	72,85 \pm 2,07	ns	*0,0018	ns

Legenda: **AIG**= Avaliação intragrupo; * = Diferença significativa; **ns**= Diferença não significativa.

Na análise intergrupos da contagem média de células inflamatórias foi evidenciado que o grupo Lesionado-controle apresentou a maior média em todos os períodos analisados (7, 14 e 21 dias). Por outro lado, a menor média foi constatada no grupo Membrana+LED. Aos 7 e 14 dias foi verificado que os grupos Membrana, LED e Membrana+LED apresentaram uma redução extremamente significativa em relação ao controle ($p < 0,0001$). Aos 21 dias, o grupo Membrana ainda evidenciou

uma redução significativa em relação ao Lesionado-controle ($p=0,0004$). Já o grupo Membrana+LED demonstrou uma redução significativa em relação aos grupos Lesionado-controle ($p<0,0001$) e LED ($p=0,0001$) (Figura 9).

Figura 8. Análise intergrupos do número médio de Células Inflamatórias.



Legenda: **MNo**= Grupo Membrana; **MNo+LED**=Grupo Membrana+LED; *****LC**= Diferença significativa em relação ao Lesionado-controle ($p<0,0001$); *****LED**= Diferença significativa em relação ao grupo LED ($p<0,0001$).

6.1.2 Fibroblastos

Observa-se na tabela 2 a análise intragrupo no número médio de fibroblastos. No Lesionado-controle foi possível verificar um aumento significativo no período de 7-14 dias ($p=0,02$) e 7-21 dias ($p=0,0002$). No grupo Membrana foi constatada uma redução significativa do número de fibroblastos no período de 7-14 ($p=0,004$) e 7-21 dias ($p=0,004$). Já no grupo LED foi apresentado um aumento extremamente significativo em todos os períodos analisados ($p<0,0001$). No grupo Membrana+LED houve uma redução significativa do número de fibroblastos no período de 7-14 ($p=0,001$) e 7-21 dias ($p=0,001$).

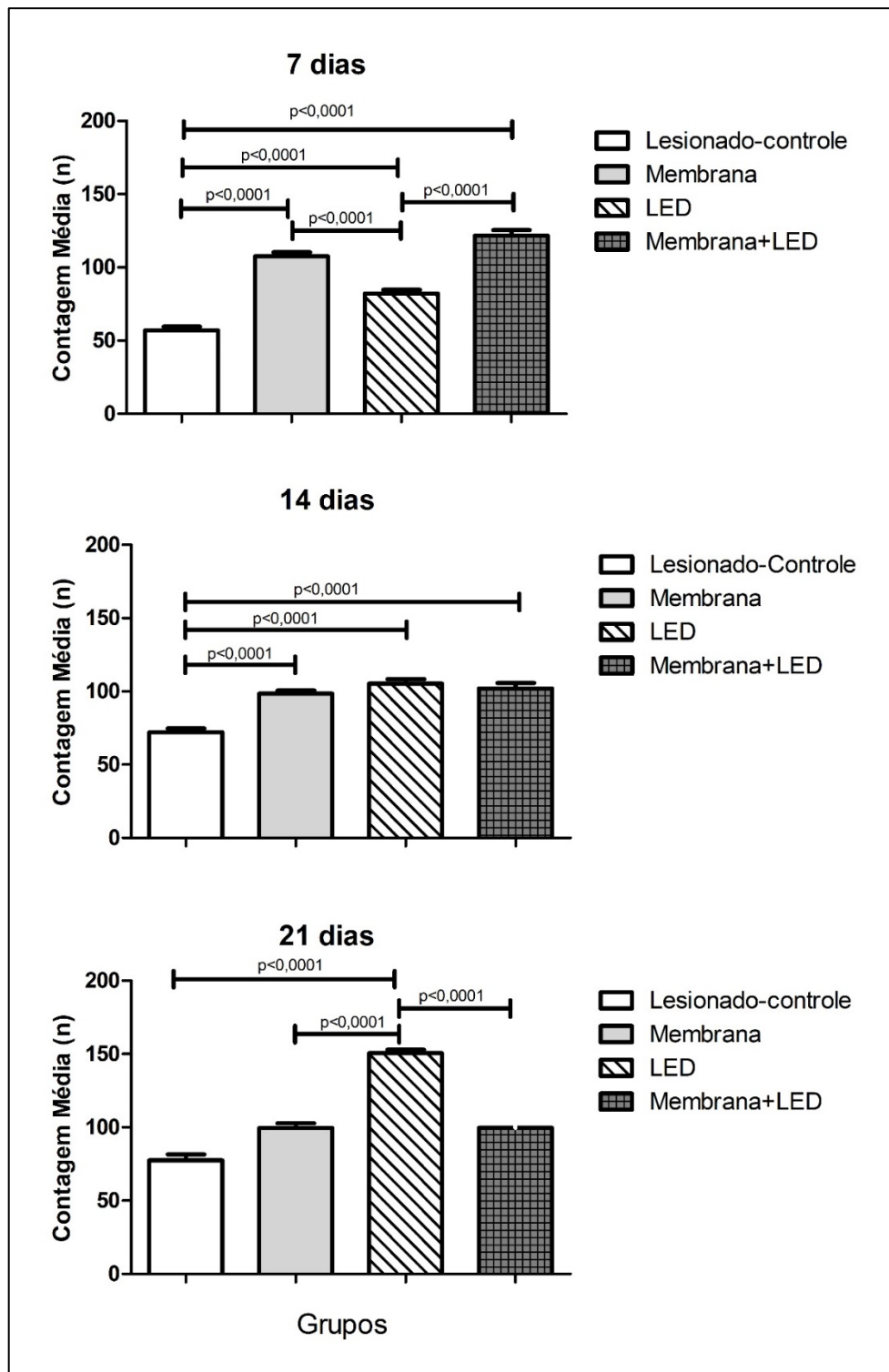
Tabela 2. Avaliação intragrupos da contagem de Fibroblastos (média e \pm erro-padrão).

Grupos	Período (dias)			AIG		
	7	14	21	p (7-14)	p (7-21)	p (14-21)
Lesionado-controle	55,96 \pm 2,64	72,00 \pm 2,67	77,4 \pm 4,18	*0,02	*0,0002	ns
Membrana	107,60 \pm 2,64	98,46 \pm 2,16	99,55 \pm 3,20	*0,004	*0,004	ns
LED	82,00 \pm 2,75	105,3 \pm 3,11	150,6 \pm 2,36	*<0,0001	*<0,0001	*<0,0001
Membrana+LED	121,6 \pm 4,03	101,9 \pm 3,77	99,72 \pm 3,74	*0,001	*0,001	ns

Legenda: **AIG**= Avaliação intragrupo; * = Diferença significativa; **ns**= Diferença não significativa.

Pela análise intergrupos foi possível verificar que o grupo Membrana+LED, seguido do grupo Membrana, evidenciaram o maior número de fibroblastos nos primeiros 7 dias, apresentando diferença significativa em relação aos grupos Lesionado-controle e LED ($p<0,0001$). Após duas semanas (14 dias) foi observado que o grupo LED apresentava o maior número de fibroblastos, seguido pelos grupos Membrana e Membrana+LED, e foi constatado que os três grupos apresentavam diferença significativa em relação ao Lesionado-controle ($p<0,0001$). Aos 21 dias foi observado que o grupo LED apresentou a maior média, evidenciando diferença significativa ($p<0,0001$) em relação aos demais grupos (Lesionado-controle, LED e Membrana+LED) (figura 10).

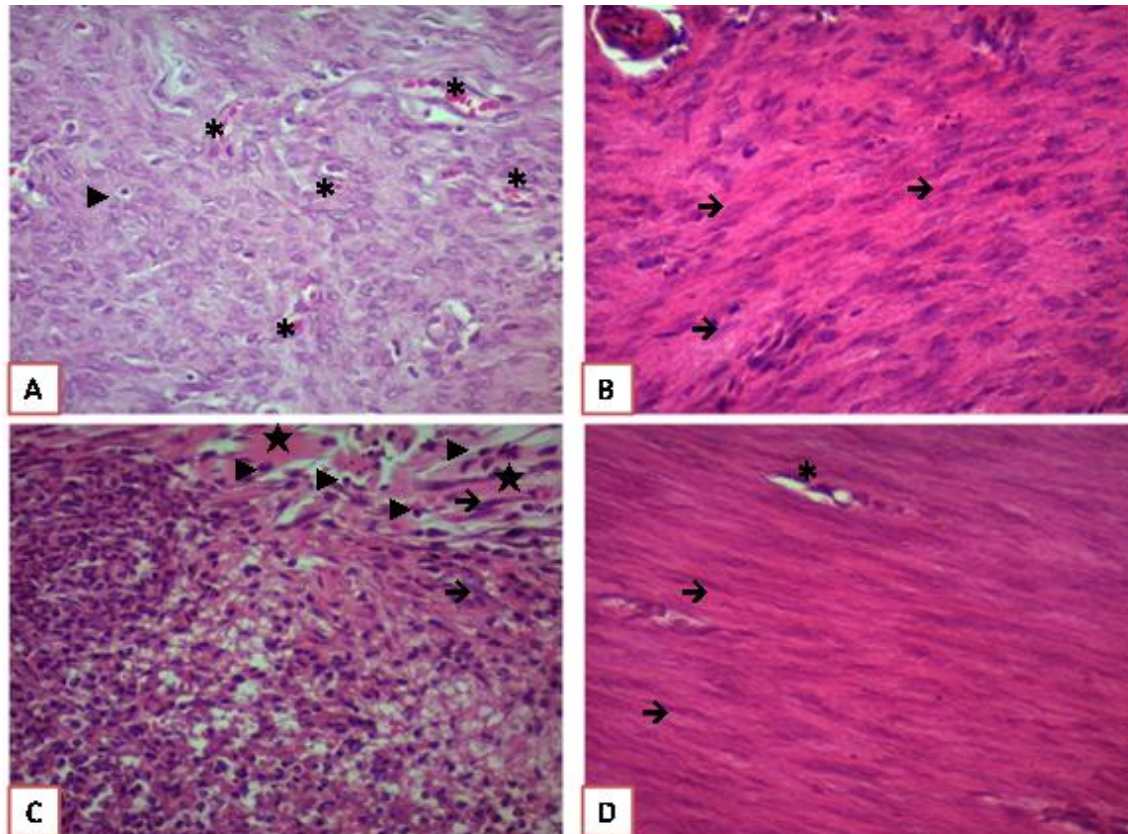
Figura 9. Análise intergrupos do número médio de Fibroblastos.



Legenda: **MNo**= Grupo Membrana; **MNo+LED**=Grupo Membrana+LED; *****LC**= Diferença significativa em relação ao Lesionado-controle ($p < 0,0001$); *****LED**= Diferença significativa em relação ao grupo LED($p < 0,0001$). *****MNo**= Diferença significativa em relação ao grupo Membrana($p < 0,0001$); *****MNo+LED**= Diferença significativa em relação ao grupo Membrana+LED($p < 0,0001$).

Seguem abaixo imagens ilustrativas de fotomicrografias do tendão calcâneo em todos os tempos experimentais:

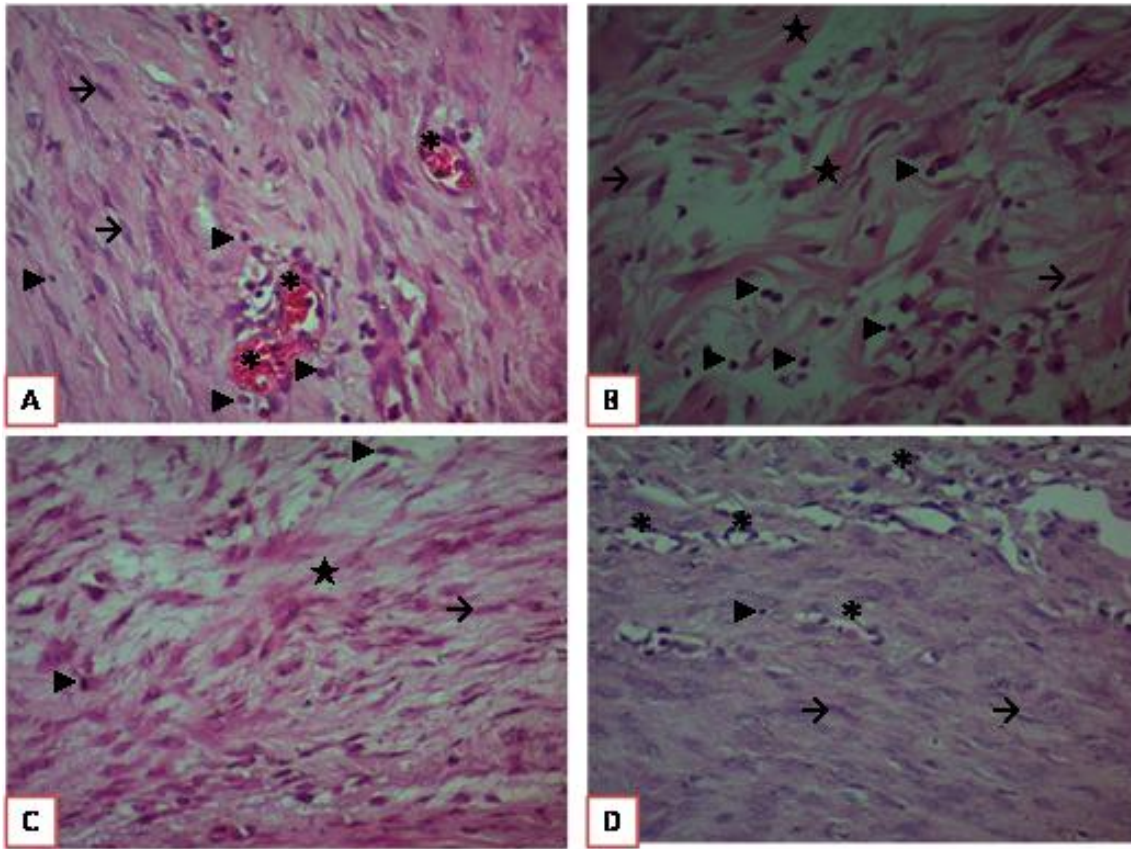
Figura 10. Grupo Lesionado-controle (A). Grupo Membrana (B). Grupo LED (C). Grupo Membrana + LED (D). Tempo experimental de 7 dias. H.E (400x).



Legenda: (*) indica vaso sanguíneo; (→) indica fibroblasto; (▶) indica célula inflamatória; (★) indica fibra colágena.

Fonte: A Autora

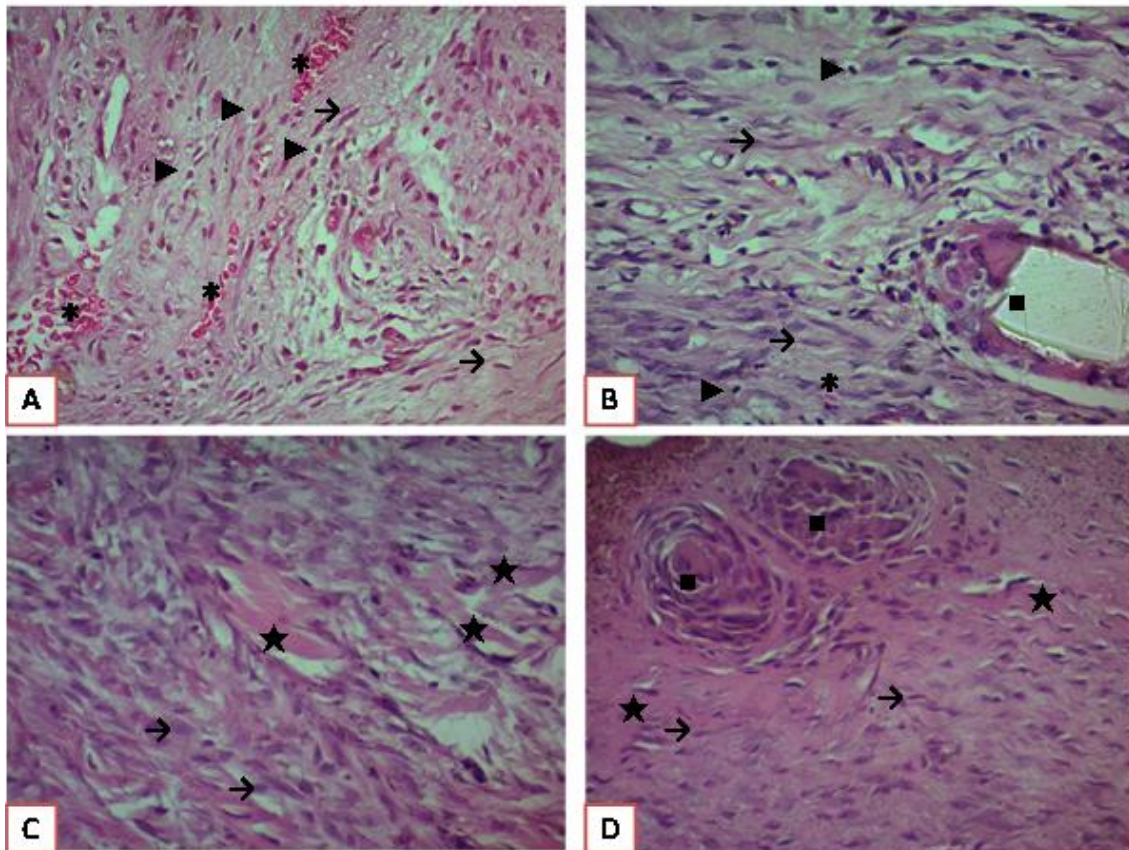
Figura 11. Grupo Lesionado-control (A). Grupo Membrana (B). Grupo LED (C). Grupo Membrana + LED (D). Tempo experimental de 14 dias. H.E (400x).



Legenda: (*) indica vaso sanguíneo; (→) indica fibroblasto; (▶) indica célula inflamatória; () indica fibra colágena.

Fonte: A Autora

Figura 12. Grupo Lesionado-controle (A). Grupo Membrana (B). Grupo LED (C). Grupo Membrana + LED (D). Tempo experimental de 21 dias. H.E (400x).



Legenda: (*) indica vaso sanguíneo; (→) indica fibroblasto; (▴) indica célula inflamatória; (○) indica fibra colágena; (■) indica granuloma.

Fonte: A Autora

6.1.3 Colágeno

Na análise intragrupo do Lesionado-controle foi verificado um aumento da porcentagem das fibras de colágeno do tipo I e uma diminuição das fibras do tipo III, sendo evidenciada diferença significativa no período de 7- 21 dias, tanto no aumento das fibras do tipo I ($p=0,0012$) como na diminuição das fibras do tipo III ($p=0,0029$). No grupo Membrana foi observado o aumento das fibras do tipo I e a diminuição do tipo III no período de 7-14, no entanto, não foi evidenciada diferença significativa. No grupo LED foi verificado aumento significativo das fibras do tipo I nos períodos de 7- 21 ($p=0,0020$) e 14-21 ($p=0,0020$) e diminuição significativa das fibras do tipo III nos períodos 7-14 e 7-21 dias com $p=0,0020$. Já no grupo Membrana+LED não houve nenhuma diferença significativa (Tabela 4).

Tabela 4 – Avaliação intragrupos do percentual de Colágenos (média e \pm erro-padrão).

Grupos / TC (%)		Período (dias)			AIG		
		7	14	21	p (7-14)	p (7-21)	p (14-21)
Lesionado- controle	CTI	2,66 \pm 0,65	20,49 \pm 6,19	32,73 \pm 7,54	ns	*0,0012	ns
	CTIII	95,08 \pm 2,32	79,51 \pm 6,19	67,27 \pm 7,54	ns	*0,0029	ns
Membrana	CTI	25,71 \pm 6,28	51,35 \pm 9,37	41,70 \pm 5,98	ns	ns	ns
	CTIII	70,09 \pm 7,17	49,19 \pm 9,19	57,17 \pm 6,26	ns	ns	ns
LED	CTI	9,47 \pm 2,68	39,22 \pm 7,03	47,11 \pm 8,42	ns	*0,0020	*0,0020
	CTIII	90,53 \pm 2,68	60,78 \pm 7,03	52,89 \pm 8,42	*0,0020	*0,0020	ns
Membrana+LED	CTI	37,99 \pm 8,45	49,55 \pm 10,20	24,98 \pm 9,05	ns	ns	ns
	CTIII	62,01 \pm 8,45	50,45 \pm 10,20	75,03 \pm 9,05	ns	ns	ns

Legenda: **TC**= Tipos de colágeno; **CTI**= Colágeno tipo I; **CTIII**= Colágeno Tipo III; **AIG**= Avaliação intragrupo; *= Diferença significativa; **ns**= Diferença não significativa.

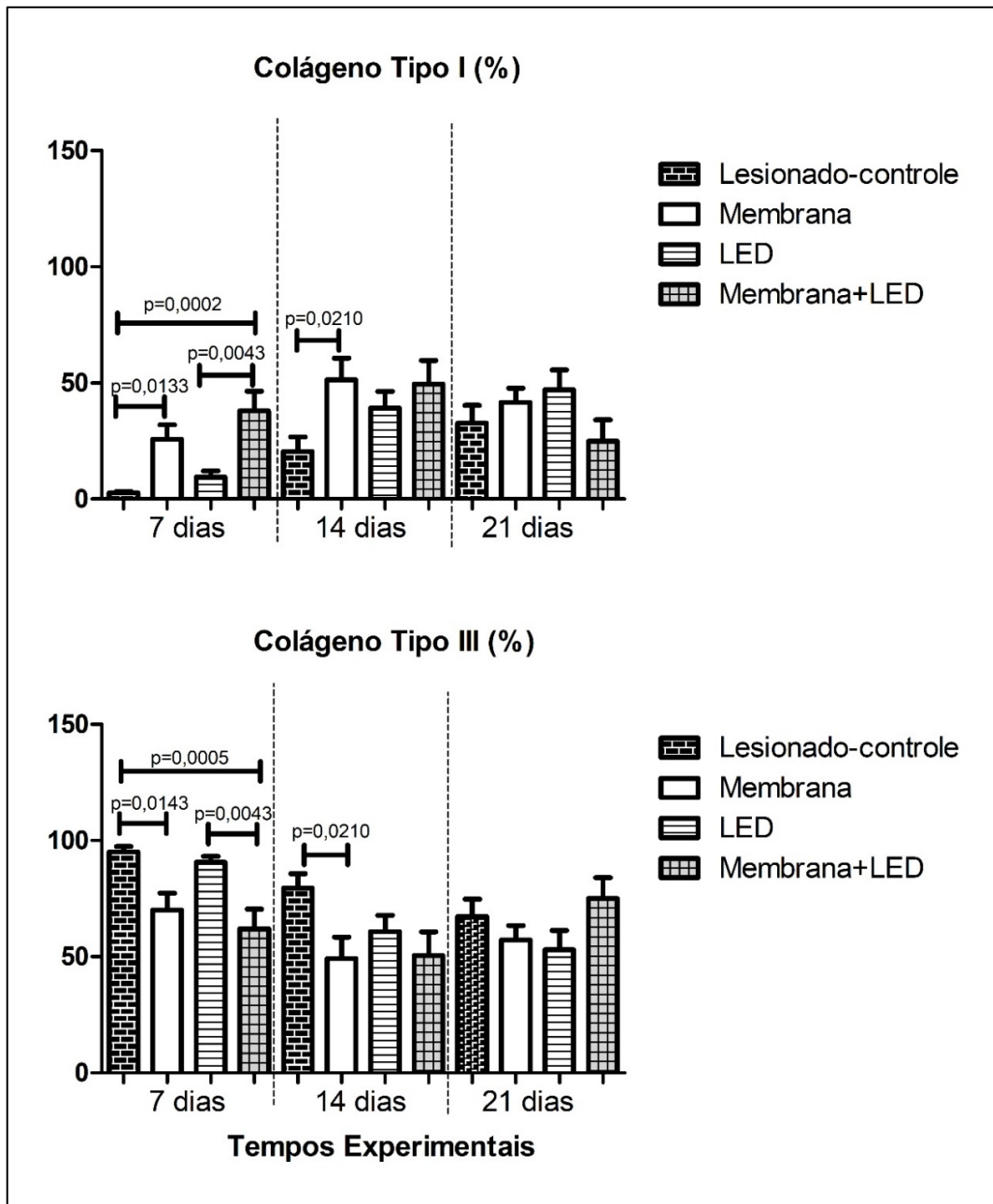
Observa-se na figura 14 a análise intergrupos da variação das fibras de colágeno do tipo I e III (%) nos períodos de 7, 14 e 21 dias. Na análise do colágeno do tipo I nos 7 dias foi possível verificar que o grupo Membrana+LED evidenciou a maior média e apresentou diferença significativa em relação aos grupos Lesionado-controle ($p=0,0002$) e LED ($p=0,004$). O grupo Membrana também apresentou aumento significativo em relação ao Lesionado-controle ($p=0,013$). Aos 14 dias foi verificada uma maior média no grupo Membrana, seguido pelo grupo Membrana+LED, sendo constatadas diferenças significativas entre os grupos Membrana e Lesionado-controle ($p=0,021$). Aos 21 dias foi verificado que o grupo LED evidenciou a menor média em relação aos demais grupos, entretanto, não foi possível observar diferença significativa.

Na avaliação das fibras de colágeno do tipo III foi observado aos 7 dias que os grupos Lesionado-controle e LED apresentaram as maiores médias, sendo que na comparação do Lesionado-controle com os grupos Membrana ($p=0,014$) e Membrana+LED ($p=0,0005$) foi verificada diferença significativa. Na comparação do LED com o grupo Membrana+LED também foi verificada diferença significativa ($p=0,004$).

Nos grupos de 14 dias a maior média foi verificada no grupo Lesionado-controle, seguida do LED. Na comparação entre os grupos Lesionado-controle e

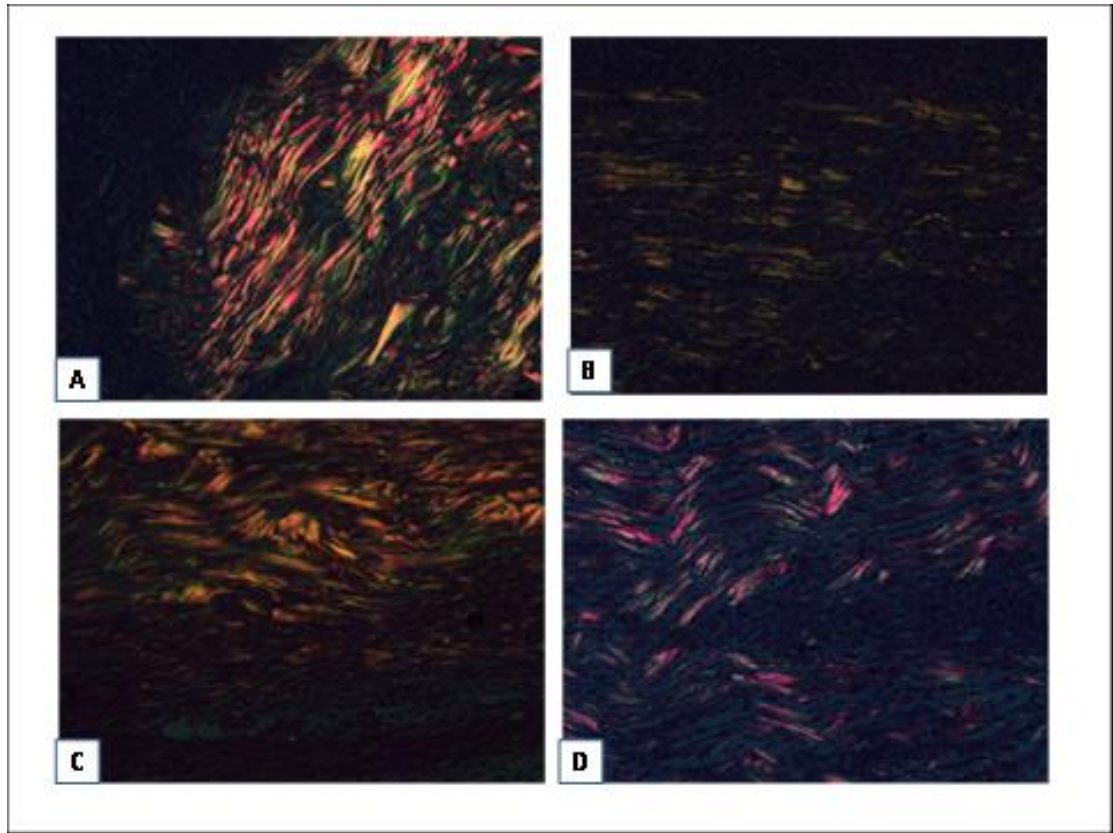
Membrana foram evidenciadas diferenças significativas ($p=0,021$). No último período analisado não foi possível observar nenhuma diferença significativa.

Figura 13. Análise intergrupos do colágeno formado.



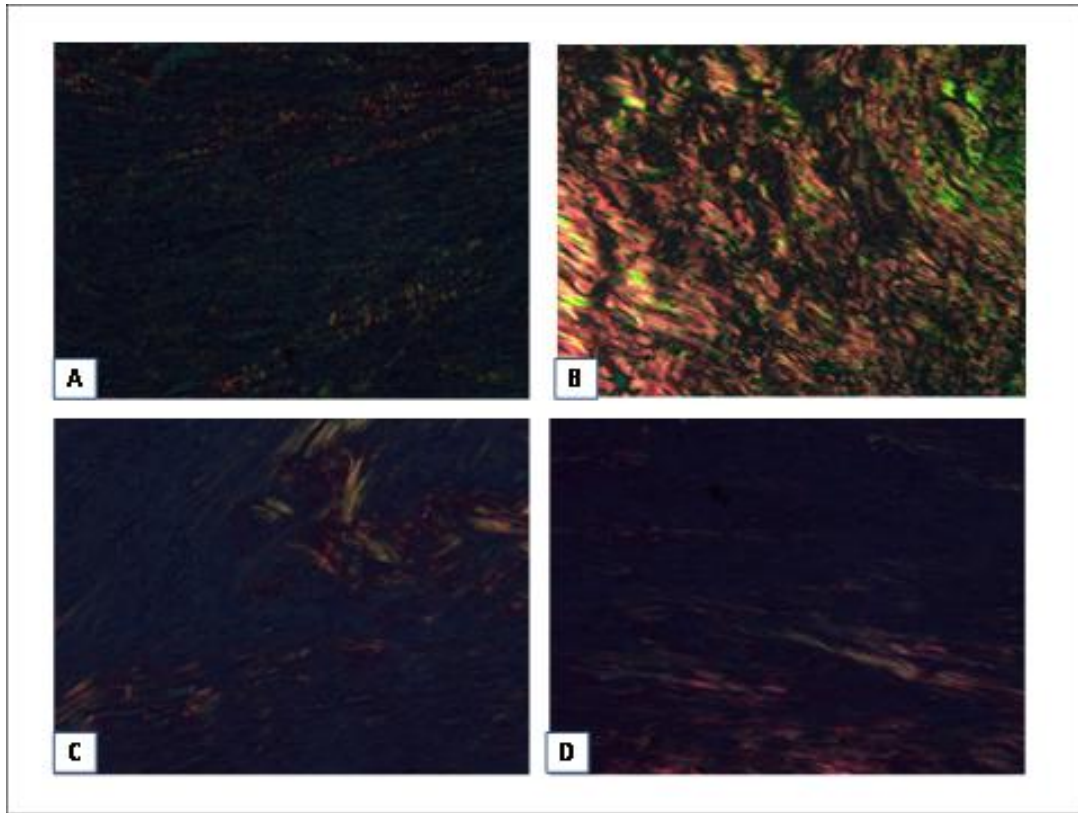
Seguem abaixo imagens ilustrativas de fotomicrografias do tendão calcâneo corado com *Picrosirius red*, em todos os tempos experimentais, em que as fibras esverdeadas representam o colágeno tipo III e as fibras avermelhadas representam o colágeno tipo I:

Figura 14. Fibras de colágeno nos grupos Lesionado-controle (A), Membrana (B), LED (C) e Membrana+LED (D) aos 7 dias, corados com *Picrosirius red* (400x).



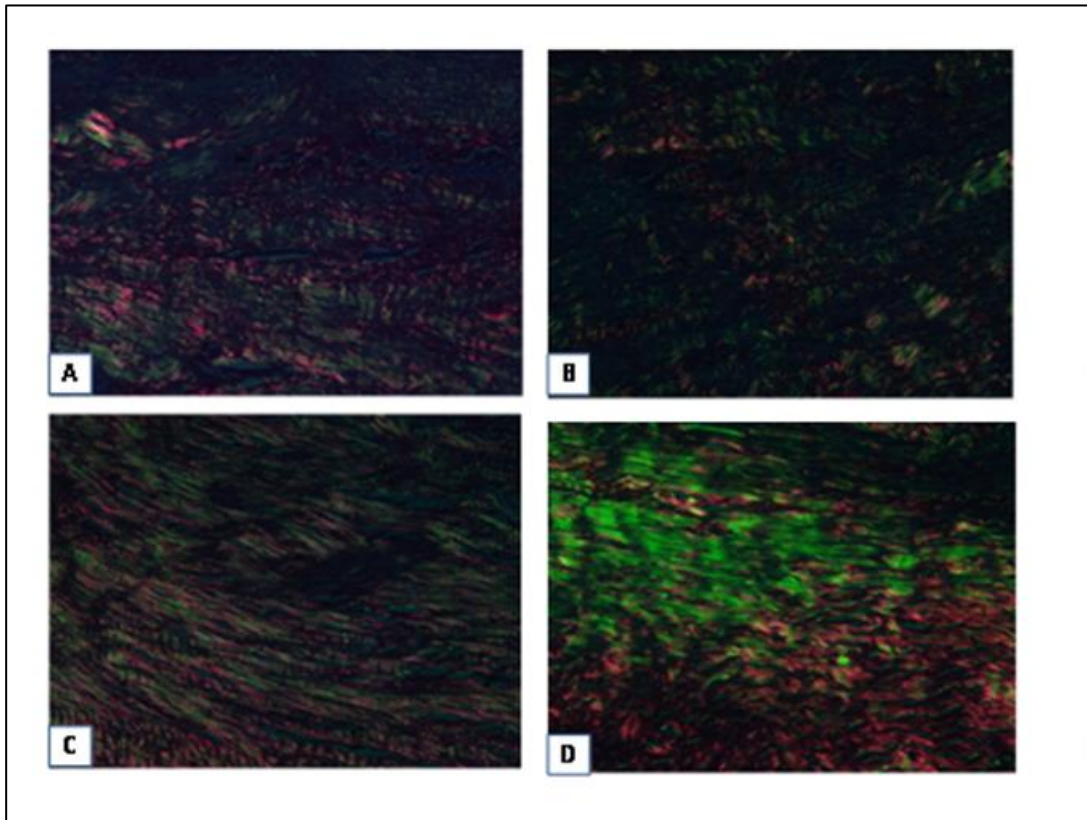
Fonte: A Autora

Figura 15. Aspectos histológicos das fibras de colágeno nos grupos Lesionado-controle (A), Membrana (B), LED (C) e Membrana+LED (D) aos 14 dias, corados com *Picrosirius red* (400x).



Fonte: A Autora

Figura 16. Fibras de colágeno nos grupos Lesionado-controle (A), Membrana (B), LED (C) e Membrana+LED (D) aos 21 dias, corados com *Picrosirius red* (100x).



Fonte: A Autora

7 DISCUSSÃO

A elevação da incidência de lesões crônicas do tendão calcâneo observado nas últimas décadas vem constituindo objeto de motivação para estudos que abordem protocolos terapêuticos com a finalidade de melhorar e/ou acelerar o reparo dessa condição (LIU *et al.*, 2016), uma vez que essa lesão pode resultar em grave impedimento funcional, levando a uma drástica redução da qualidade de vida (AL-MOUAZZEN *et al.*, 2015).

As características dos biomateriais contituíntes da membrana de PHB à base de norbixina aliadas ao sucesso da terapia LED no tratamento de lesões tendíneas, demonstrado na literatura, estimularam a verificação da efetividade de sua interação no processo de reparação do tendão calcâneo de ratos, nos períodos de 7, 14 e 21 dias. Estes tempos experimentais foram eleitos considerando que o metabolismo do rato ocorre de maneira mais rápida do que em seres humanos. Os ratos utilizados em experimentos são muito semelhantes à espécie humana, tanto do ponto de vista anatômico como fisiológico, permitindo a reprodução de lesões induzidas e a avaliação histopatológica do tendão, ainda que as fases inflamatória, proliferativa e de remodelação ocorram com maior rapidez (BOTTAGISIO; LOVATI, 2017; NASCIMENTO *et al.*, 2019).

Os resultados apresentados neste estudo mostram que o processo inflamatório agudo no grupo Lesionado-controle ocorreu de maneira mais acentuada do que nos grupos tratados. Já nos demais grupos (MNo, LED e MNo+LED) foi verificada uma importante ação anti-inflamatória, especialmente no grupo Membrana+LED, corroborando estudos onde foi demonstrado que a norbixina (*Bixa orellana* L) pode apresentar propriedades medicinais, que incluem a diminuição da resposta inflamatória (VILAR *et al.*, 2014; VIANA *et al.*, 2018), do estresse oxidativo (LIMA *et al.*, 2001; FERREIRA *et al.*, 2012; ROEHRS *et al.*, 2017; TEIXEIRA DA SILVA; DOBRANSZKI; RIVERA-MADRID, 2018) e baixa citotoxicidade (YUSÁ-MARCO *et al.*, 2008; MAGESTE *et al.*, 2012; ZHANG; ZHONG, 2013; MUTHUKUMAR *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2014; SOUSA *et al.*, 2016), assim como a terapia com LED que também possui eficiente propriedade anti-inflamatória (XAVIER *et al.*, 2014; HELRIGLE *et al.*, 2015; MARTINAGNAGO *et al.*, 2019).

Devido à menor quantidade de células inflamatórias (grupo MNo+LED) que os grupos MNo e LED isolados apresentaram, supõe-se que houve interação entre os

dois elementos terapêuticos (membrana e LED), sendo essa interação responsável pela redução do processo inflamatório. De acordo com Alaseirli *et al.* (2005), Nicodemo *et al.* (2017), Park *et al.* (2017) e Misir, Kizkapan e Arikan (2019), a redução de células inflamatórias nos estágios iniciais do reparo em lesões tendíneas melhora a qualidade do tendão. Assim, comparando o perfil inflamatório intergrupos, e a partir dessa premissa, pode-se inferir que o reparo os tendões do grupo MNo+LED apresentaram maior qualidade que os outros grupos estudados.

Corroborando os resultados dessa pesquisa, Capella *et al.* (2016) constataram expressiva ação pró-inflamatória com o uso de extrato oleoso de urucum (*Bixa orellana* L.), demonstrando que apesar da elevada concentração de células inflamatórias no início dos experimentos, o resultado foi favorável ao processo cicatricial da lesão epitelial, pois apresentou aos 7 dias menor concentração dessas células que os demais grupos comparativos. Isso ocorreu devido aos ácidos graxos (linoleico e oleico), presentes no extrato oleoso da semente de urucum, com propriedades quimiotáticas para células poli e mononucleares, acelerando o processo cicatricial, evidenciado pela maior formação de crostas e epitelização em menor tempo. Além disso, os ácidos graxos facilitam a ação de fatores de crescimento, umidificando o meio e estimulando a formação de tecido de granulação que acelera o processo cicatricial.

Um achado importante observado nas imagens (Figura 13B e 13D), no último período de tempo do estudo, foi a formação de granuloma nos grupos MNo3 e MNo+LED3. Mariani *et al.* (2019) afirmam que essa reação de corpo estranho é uma inflamação crônica, composta principalmente por células gigantes multinucleadas e pode ocorrer em resposta a implantação de um biomaterial. Entretanto, não se pode afirmar que o granuloma observado neste estudo seja produzido por características da membrana ou por respostas imunológicas dos animais que a receberam, uma vez que, estranhamente, essas formações não foram detectadas nos grupos MNo e MNo+LED aos 7 e 14 dias de experimento. De qualquer forma, o fato de formar granuloma, ainda que tenha sido em apenas uma amostra no grupo MNo3 e em uma amostra do grupo MNo+LED3, merece atenção e desenvolvimento de mais estudos durante períodos mais prolongados que comprovem se a membrana de PHB à base de norbixina provoca ou não esse tipo de reação.

Ergin, Demirel e Ozmen (2017) mostraram em seu estudo de caso a ocorrência de um granuloma formado pelo fio de seda da sutura da pele muitos anos após a cirurgia de reparo do tendão calcâneo, e Henry *et al.* (2018) reportaram um caso de formação granulomatosa tardia após o uso de ligamento LARS (Sistema de Reconstrução Avançada de Ligamentos) na reconstrução de tendão calcâneo em humano, demonstrando que biomaterias de alta confiabilidade em uso clínico, mesmo que raramente, também podem induzir a formação de granulomas (NASCIMENTO *et al.*, 2019) (ANEXO C).

No tocante aos fibroblastos, o grupo LC apresentou a menor quantidade, ainda que tenha havido um aumento gradual ao longo dos períodos experimentais, demonstrando a baixa capacidade de reparação do tecido tendíneo em decorrência de sua má vascularização, resultando em baixa nutrição e oxigenação (MATTOS *et al.*, 2015), além disso, deve-se levar em consideração que os cotos tendíneos não possuíam qualquer estrutura unindo-os e, portanto, favorecendo a reparação.

Nos grupos Membrana e Membrana+LED ocorreu o declínio gradativo de fibroblastos nos intervalos de tempo observados, demonstrando inibição relativa da fase proliferativa. A fase de proliferação celular é caracterizada pelo aumento na produção de fibroblastos, importantes para a posterior formação de colágeno e, conseqüentemente, reparação tecidual, tendo em vista que o tendão é constituído em maior parte por colágeno (THOMOPOULOS *et al.*, 2014; WALDEN *et al.*, 2016). Possivelmente a redução gradativa de fibroblastos nesses grupos (MNo e MNo+LED) se deva à presença da membrana, estimulando a produção do colágeno tipo III, porém retardando a remodelação do tecido, haja visto que não houve no intervalo de 21 dias predomínio da quantidade de colágeno tipo I em nenhum dos dois grupos.

Diferentemente dos demais, no grupo tratado somente com irradiação por LED houve um expressivo aumento de fibroblastos ao longo do estudo, corroborando com o estudo de Moura Júnior *et al.* (2015), onde foi observado aumento do número de fibroblastos nas duas primeiras semanas pós-lesão, mesmo com diferente dosagem aplicada (4 J/cm^2). Os resultados do presente estudo, no entanto, divergem dos obtidos no estudo realizado por Casalechi *et al.* (2009), realizado com mesmo intervalo de tempo e dosagem, onde foi observada redução gradativa de fibroblastos ao longo dos 21 dias, apontando, porém, para uma otimização da fase de remodelação com maior síntese de colágeno.

Entre os grupos estudados as maiores diferenças encontradas em relação ao número de fibroblastos aparecem quando se compara o grupo LC1 com o grupo MNo+LED1 e o grupo LC3 com o grupo LED3. No grupo MNo+LED1 supõe-se a prevalência das características bioativas da membrana, conforme relatadas em estudos prévios (SANTOS *et al.*, 2014; VILAR *et al.*, 2014; CAPELLA *et al.*, 2016), ligeiramente potencializadas pelo uso do LED. Este resultado, no entanto, discorda do estudo realizado por Alves *et al.* (2018) sobre reparo ósseo com uso de membrana de poli(estireno) com norbixina e colágeno associado ao laser de baixa intensidade, pois concluiu-se que a norbixina pode ter sofrido degradação oxidativa após interação com o laser, não melhorando as propriedades bioativas da estrutura da membrana utilizada.

Em relação ao colágeno, verificou-se nos grupos LC1, LED1 maior quantidade de colágeno tipo III quando comparado aos demais grupos. Entretanto, sua substituição gradativa pelo colágeno tipo I não atingiu uma proporcionalidade necessária para que se configurasse efetiva a reparação no tendão, tendo em vista que aos 21 dias ainda havia maior quantidade de fibras colágenas do tipo III, sugerindo que em intervalo de tempo maior possivelmente o resultado inverso seria obtido, ou seja, a substituição do colágeno imaturo pelo colágeno maduro.

Nos grupos MNo e MNo+LED, os resultados demonstraram que nas duas primeiras semanas a quantidade de colágeno tipo I foi maior do que nos demais grupos comparativos. No entanto, após esse período de tempo as fibras colágenas do tipo III indicaram crescimento no seu percentual. De acordo com Muller *et al.* (2015), para otimização e rápida cicatrização dos tendões, uma alta expressão do colágeno tipo I é extremamente importante, o que não ocorreu nos grupos MNo3 e MNo+LED3 deste estudo em nenhum período do experimento, quando comparado com a concentração do colágeno imaturo.

Walden *et al.* (2016) e Snedeker e Foolen (2017) afirmam que o tecido tendíneo produzido após a cicatrização com abundância do colágeno tipo III é muito menos organizado, resultando em perda de estrutura e diminuição da resistência mecânica. Os autores acreditam que o aumento na produção de colágeno tipo III, em relação ao tipo I, na fase de remodelação, possa levar a formação de locais de adesão caracterizada por lubrificação inadequada entre o tendão e os tecidos circundantes, causando atrito e dor, limitando o deslizamento do tendão e reduzindo a mobilidade.

Além disso, a concentração maior de colágeno tipo III aumenta o risco de recidiva da ruptura, uma vez que está relacionado com a redução da força mecânica.

Ainda sobre o aumento do colágeno tipo III nos grupos Membrana (MNo3) e Membrana+LED (MNo+LED3) no 21º dia de experimento é importante lembrar que ocorreu a formação de granulomas de corpo estranho, alterando a fase final do processo de reparação do tecido tendíneo, com provável formação de cicatriz. Baker *et al.* (2011) destacam que a proliferação de fibroblastos e a produção de colágeno são marcas registradas de tecido fibrótico em reações a implantes de biomateriais e que os fibroblastos quando ativados são responsáveis pelo aumento da produção de colágeno, secreção da matriz extracelular e encapsulamento do implante.

Notadamente o grupo LED2 apresentou maior quantidade de colágeno tipo I do que os demais grupos, levando a inferência de que a associação entre a membrana de PHB com norbixina e a terapia com LED não favoreceu a reparação tendínea no intervalo de tempo esperado. Contudo, essa não otimização dos efeitos terapêuticos no grupo associado (MNo+LED) pode não ser devido à degradação oxidativa da norbixina após a interação com a irradiação eletromagnética promovida pela terapia LED, pois os tendões em tratamento com o mesmo biomaterial sem a fotobiomodulação apresentaram características semelhantes, ou seja, a irradiação com o LED não causou influências sobre as propriedades bioativas da membrana.

Destaca-se que o estudo em questão não analisou o uso da membrana de PHB sem a norbixina para fins comparativos e de verificação da capacidade da membrana, sem o componente bioativo, de estimular o reparo do tendão calcâneo. É importante ressaltar a necessidade de estudos com tempos mais curtos, em longo prazo, usando protocolos diferentes de terapia com LED, além da realização de testes dinâmicos a fim de que sejam observados mais detalhes sobre a interação da membrana e do tecido tendíneo, visando uma futura indicação para testes clínicos desse biomaterial em lesões teciduais agudas, associado ou não à terapia LED.

8 CONCLUSÃO

O emprego da membrana de PHB à base de norbixina associada à terapia LED de baixa intensidade no tratamento de tenotomia total calcânea de ratos reduziu os níveis de infiltrado inflamatório na lesão, favoreceu a proliferação de fibroblastos nas duas primeiras semanas, porém não otimizou a formação de colágeno tipo I no estágio esperado do processo de reparação, indicando que houve pouca efetividade no uso simultâneo dos dois elementos terapêuticos.

REFERÊNCIAS

- AARTHI, N.; RAMANA, K. V. Identification and Characterization of Polyhydroxybutyrate producing *Bacillus cereus* and *Bacillus mycoides* strains. **International Journal of Environmental Sciences**, v. 1, n. 5, p. 744-756, 2011.
- ALASEIRLIS, D.A. *et al.* Decreasing inflammatory response of injured patellar tendons results in increased collagen fibril diameters. **Connective Tissue Research**, v. 46, n. 1, p. 12-7, 2005.
- ALIODOUST, M. *et al.* Evaluating the effect of low-level laser therapy on healing of tentomized Achilles tendon in streptozotocin-induced diabetic rats by light microscopical and gene expression examinations. **Lasers in Medical Science**, v. 29, n. 4, p. 1495-1503, 2014.
- AL-MOUAZZEN, L. *et al.* Percutaneous repair followed by accelerated rehabilitation for acute Achilles tendon ruptures. **Journal of Orthopaedic Surgery**, v. 3, p. 352-356, 2015.
- ALTSCHULER, E. L. Mirror therapy for rehabilitation following Achilles tendon rupture. **Medical Hypotheses**, v. 96, n. 34, 2016.
- ALVES, A. M. M. *et al.* Evaluation of bone repair after application of a norbixin membrane scaffold with and without laser photobiomodulation (λ 780 nm). **Lasers in Medical Science**, v. 33, n. 7, p. 1493-1504, 2018.
- ALZYOUD J. A. M. *et al.* Effect of light-emitting diodes, platelet-rich plasma, and their combination on the activity of sheep tenocytes. **Lasers in Medical Science**, v. 34, n. 4, p. 759-766, 2019.
- ANDARAWIS-PURI, N.; FLATOW E. L.; SOSLOWSKY, L. J. Tendon Basic Science: Development, Repair, Regeneration and Healing. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 33, n. 6, p. 780-784, 2015.
- ARMITAGE, P.; BERRY, G. The planning of statistical investigations. **Statistical methods in medical research**. 2. ed. Oxford: Blackwell, 1987. p.179-8
- ARNAL-BURRÓA, J. *et al.* Tratamiento quirúrgico de La tendinopatía aquilea crónica no insercional en corredores mediante el uso de radiofrecuencia. **Revista Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología**, v. 60, n. 2, p. 125-132, 2015.
- BAKER, D. *et al.* Fibroblast/fibrocyte: surface interaction dictates tissue reactions to micropillar implants. **Biomacromolecules**, v.12, n.4, p. 997–1005, 2011.
- BASTOS, J. L. N.; LIZARELLI, R. F. Z.; PARIZOTTO, N. A. L. Comparative study of laser and LED systems of low intensity applied to tendon healing. **Laser physics**, v. 19, n. 9, p. 1925-1931, 2009.

BOTTAGISIO, M.; LOVATI, A. B. A review on animal models and treatments for the reconstruction of Achilles and flexor tendons. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 28, n. 45, 2017.

BRASIL. Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008. Presidência da República Casa Civil- Subchefia para Assuntos Jurídicos. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2008.

CAPELLA, S. O. *et al.* Potencial cicatricial da Bixa orellana L. em feridas cutâneas: estudo em modelo experimental. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 1, p. 104-112, 2016.

CASALECHI, H. L. *et al.* Analysis of the effect of phototherapy in model with traumatic Achilles tendon injury in rats. **Lasers in Medical Science**, v. 29, n. 3, p. 1075-1081, 2013.

CASALECHI, H. L. *et al.* The effects of low-level light emitting diode on the repair process of Achilles tendon therapy in rats. **Lasers in Medical Science**, v. 24, p. 659–665, 2009.

CASSEL, M. *et al.* Prevalence of Achilles and patellar tendinopathy and their association to intratendinous changes in adolescent athletes. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 25, n. 3, p. 310-318, 2014.

CHAVES, M. E. A. *et al.* Effects of low-power light therapy on wound healing: LASER x LED*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89, n. 4, p. 616-23, 2014.

CHISTÉA, R. C. *et al.* Simultaneous extraction and analysis by high performance liquid chromatography coupled to diode array and mass spectrometric detectors of bixin and phenolic compounds from annatto seeds. **Journal of Chromatography A**, v.1218, p. 57-63, 2011.

CLAESSEN, F. M. P. *et al.* Predictors of Primary Achilles Tendon Ruptures. **Sports Medicine**, v. 44, n. 9, p. 1241-1259, 2014.

CURY, D. P. *et al.* Structural and Ultrastructural Characteristics of Bone-Tendon Junction of the Calcaneal Tendon of Adult and Elderly Wistar Rats. **Plos One**, v. 11, n. 4, 2016.

DALL AGNOL, M. A. *et al.* Comparative analysis of coherent light action (laser) versus non-coherent light (light-emitting diode) for tissue repair in diabetic rats. **Lasers in Medical Science**, v. 24, p. 909–916, 2009.

DALMAU-PASTOR, M. *et al.* Anatomy of the Triceps Surae: A Pictorial Essay. **Foot and Ankle Clinicals**, v. 19, n. 4, p. 603-635, 2014.

DEVRIES, J. G.; SCHARER, B. M.; SUMMERHAYS, B. J. Acute Achilles Rupture Percutaneous Repair Approach, Materials, Techniques. **Clinics in Podiatric and Medicine in Surgery**, v. 34, p. 251–262, 2017.

DIETRICH, F. **Efeito do plasma rico em plaquetas no reparo do tendão de Aquiles em ratos**. 2017. Tese (Doutorado em Medicina e Ciências da Saúde) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

DOCHEVA, D. *et al.* Biologics for tendon repair. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 84, p. 222–239, 2015.

DONG, J.; XIONG, D. Applications of Light Emitting Diodes in Health Care. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 45, n. 11, p. 2509-2523, 2017.

DOURADO, K. B. V. *et al.* LEDTERAPIA – Uma nova perspectiva terapêutica ao tratamento de doenças da pele, cicatrização de feridas e reparação tecidual. **Ensaio e Ciência – Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde**, v. 15, n. 6, p. 231-248, 2011.

DUEK, J. R. *et al.* Membrana de PLDLA-TMC como Protetor na Regeneração do Tendão Calcâneo. Estudo *in Vivo* em Coelhos. **Polímeros**, v. 24, n. 3, p. 360-366, 2014.

ERGIN, O. N.; DEMIREL, M.; ÖZMEN, E. An Exceptional Case of Suture Granuloma 30 Years Following an Open Repair of Achilles Tendon Rupture: A Case Report. **Journal of Orthopaedic Case Reports**, v. 7, n. 3, p. 50-53, 2017.

FEDERER, A. E. *et al.* Tendonitis and Tendinopathy What Are They and How Do They Evolve. **Foot and Ankle Clinics of North America**, v. 22, n. 4, p. 665-676, 2017.

FERREIRA, C. L. R. *et al.* Efeito da terapia LED ($\lambda = 945 \pm 20$ nm) de baixa intensidade sobre tecido epitelial de ratos diabéticos em processo de reparo. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**, v. 29, n. 4, 2013.

FERREIRA, J. M. *et al.* Effects of Bixa orellana L. Seeds on Hyperlipidemia. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 1, p. 144-147, 2012.

FONTINELE L. P. *et al.* Norbixin extracted from urucum (Bixa orellana L.) for the formation of conductive composites with potential applications in electrochemical sensors. **Surfaces and Interfaces**, v. 13, p. 92-100, 2018.

FRANCK, P.; HENDERSON, P. W.; ROTHUS, K. O. Basics of Lasers History, Physics, and Clinical Applications. **Clinics in Plastic Surgery**, v.43, p. 505–513, 2016.

FREITAS, L. F.; HAMBLIN, M. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. **Journal of Selected Topics in Quantum Electronics**, v. 22, n. 3, 2016.

- GOMES, C. A. F. P. *et al.* Effects of low-level laser therapy on the modulation of tissue temperature and hyperalgesia following a partial Achilles tendon injury in rats. **Journal of Cosmetic and Laser Therapy**, v. 19, n. 7, p. 391-396, 2017.
- GROSS, C. E.; NUNLEY, J. A. Acute Achilles Tendon Ruptures. **Foot & Ankle International**, v. 37, p. 233–239, 2016.
- HASLERUD, S. *et al.* Low-Level Laser Therapy and Cryotherapy as Mono- and Adjunctive Therapies for Achilles Tendinopathy in Rats. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 35, n. 1, 2017.
- HELRLIGLE, C. *et al.* Effects of low-intensity non-coherent light therapy on the inflammatory process in the calcaneal tendon of ovariectomized rats. **Lasers in Medical Science**, v. 31, n. 1, p. 33-40, 2015.
- HENRY, J. *et al.* Foreign body reaction with granuloma following Achilles tendon reconstruction with the LARS ligament. **Journal of Surgical Case Reports**, v. 1, p. 1–4, 2018.
- HERPICH, C. M. *et al.* Effects of phototherapy on muscle activity and pain in individuals with temporomandibular disorder: a study protocol for a randomized controlled trial. **Trials (London)**, v. 15, p. 491, 2014.
- HO, G. *et al.* Increasing age in Achilles rupture patients over time. **Injury**, v. 48, p. 1701-1709, 2017.
- HSU, A. R. *et al.* Clinical Outcomes and Complications of Percutaneous Achilles Repair System Versus Open Technique for Acute Achilles Tendon Ruptures. **Foot & Ankle International**, v. 36, n. 11, p. 1279-86, 2015.
- HUTTUNEN, T. T. *et al.* Acute Achilles Tendon Ruptures - Incidence of Injury and Surgery in Sweden Between 2001 and 2012. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 42, n. 10, p. 2419-2423, 2014.
- JAMES, R. *et al.* Tendon: Biology, Biomechanics, Repair, Growth Factors, and Evolving Treatment Options. **Journal of Hand Surgery**, v. 33, n. 1, p. 102-112, 2008.
- KADIR, D. *et al.* A Study on the Structure and Morphologic Development of Calcaneal Tendon and Triceps Surae Muscle in Human Fetuses during the Fetal Period and the Evaluation of Clinical Importance of Calcaneal Tendon. **International Journal of Morphology**, v. 33, n. 3, p. 920-929, 2015.
- KANNUS, P. Structure of the tendon connective tissue. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 10, p. 312–320, 2000.
- KAUWE, M. Acute Achilles Tendon Rupture - Clinical Evaluation, Conservative Management, and Early Active Rehabilitation. **Clinics in Podiatric Medicine and Surgery**, v. 34, n. 2, p. 229-243, 2017.

KIM, W. S.; CALDERHEAD, R. G. Is light-emitting diode phototherapy (LED-LLLT) really effective? **Laser Therapy**, v. 20, n. 3, p. 205–215, 2011.

KRAPF, D.; KAIPEL, M.; MAJEWSKI, M. Structural and Biomechanical Characteristics After Early Mobilization in an Achilles Tendon Rupture Model: Operative Versus Nonoperative Treatment. **Feature Article**, v. 35, n. 9, 2012.

LAWRENCE, J. E. *et al.* Functional outcomes of conservatively managed acute ruptures of the Achilles tendon. **The Bone & Joint Journal**, v. 99-B, n. 1, 2017.

LEMME, N. J. *et al.* Epidemiology and Video Analysis of Achilles Tendon Ruptures in the National Basketball Association. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 20, n. 10, 2019.

LIMA, A. M. C. T.; SERGIO, L. P. S.; FONSECA, A. S. Photobiomodulation via multiple-wavelength radiations. **Lasers in Medical Science**, v. 35, n. 2, p. 307-316, 2019.

LIMA, L. R. P. *et al.* Bixina, Norbixina e Quercetina e seus efeitos no metabolismo lipídico de coelhos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 4, p. 196-200, 2001.

LIN, Y. *et al.* Surgical Strategy for the Chronic Achilles Tendon Rupture. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1-8, 2016.

LIU, Y. *et al.* No midterm advantages in the middle term using small intestinal submucosa and human amniotic membrane in Achilles tendon transverse tenotomy. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 11, n. 1, 2016.

LORETI, E. H. *et al.* Use of Laser Therapy in the Healing Process: A Literature Review. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 33, n. 2, 2015.

MAGESTE, A. B. *et al.* Thermodynamics and optimization of norbixin transfer processes in aqueous biphasic systems formed by polymers and organic salts. **Separation and Purification Technology**, v. 98, p. 69–77, 2012.

MARCOS, R. L. *et al.* Biomechanical and biochemical protective effect of low-level laser therapy for Achilles tendinitis. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 29, p. 272–285, 2014.

MARIANI, E. *et al.* Biomaterials: Foreign Bodies or Tuners for the Immune Response? **International Journal of Molecular Science**, v. 20, n. 636, 2019.

MARTIGNAGO, C. C. S. *et al.* Effects of red and near-infrared LED light therapy on full-thickness skin graft in rats. **Lasers in Medical Science**, v. 35, n. 1, p. 157-164, 2019.

- MATTOS, L. H. L. *et al.* Effect of phototherapy with light-emitting diodes (890 nm) on tendon repair: an experimental model in sheep. **Lasers in Medicine Science**, v. 30, p. 193-201, 2015.
- MAYER, A. *et al.* Desequilíbrios musculares entre flexores dorsais e plantares do tornozelo após tratamento conservador e acelerado da ruptura do tendão calcâneo. **Fisioterapia e Pesquisa**, v. 17, n. 2, p. 108-13, 2010.
- MCELROY, L. M.; WEBB, T. P. **Surgery Review Illustrated**. 2nd. ed. McGraw-Hill Education, 2020. Disponível em: <https://accesssurgery.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1939§ionid=142769767>. Acesso em: 17 mar. 2020.
- MELO, J. D. D. *et al.* A biodegradable composite material based on polyhydroxybutyrate (PHB) and carnauba fibers. **Composites: Part B**, v. 43, p. 2827-2835, 2012.
- MIN, P. K.; GOO, B. L. 830 nm light-emitting diode low level light therapy (LED-LLLTT) enhances wound healing: a preliminary study. **Laser Therapy**, v. 1, n. 22, p. 43-49, 2013.
- MISIR, A.; KIZKAPAN, T. B.; ARIKAN, Y. Repair within the first 48 h in the treatment of acute Achilles tendon ruptures achieves the best biomechanical and histological outcomes. **Knee Surgery Sports Traumatology Arthroscopy**, 2019.
- MONTE, S. M. *et al.* Genotoxicity Evaluation of Polystyrene Membrane with Collagen and Norbixin by Micronucleus Test and Comet Assay. **International Journal of Pharmaceutical Science Invention**, n. 5, p.7-11, 2016.
- MORAES, S. A. S. *et al.* Local NO synthase inhibition produces histological and functional recovery in Achilles tendon of rats after tenotomy - Tendon repair and local NOS inhibition. **Cell and Tissue Research**, v. 353, n. 3, p. 457-463, 2013.
- MOURA JÚNIOR, M. J. *et al.* Assessing the biochemical changes of tendons of rats in an experimental model of tenotomy under therapeutic ultrasound and LEDs (625 and 945 nm) by near-infrared Raman spectroscopy. **Lasers in Medical Science**, v. 30, p. 1729-1738, 2015.
- MULLER, S. A. *et al.* Tendon healing: an overview of physiology, biology, and pathology of tendon healing and systematic review of state of the art in tendon bioengineering. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, v. 23, p. 2097–2105, 2015.
- MUTHUKUMAR, T. *et al.* Preparation, characterization, and in vitro bioactivity of *Bixa Orellana* extract-impregnated collagen microspheres. **Journal of Material Science**, v. 49, p. 5730-5737, 2014.
- NASCIMENTO, L. D. *et al.* Effects of therapy with light emitting diode (led) in the calcaneal tendon lesions of rats: a literature review. **The Scientific World Journal**, v. 2019, 2019.

NASCIMENTO, L. D. *et al.* Effect of norbixin-based poly(hydroxybutyrate) membranes on the tendon repair process after tenotomy in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 34, n.10, 2019.

NATIVIDAD, L. R.; RAFAEL, R. R. Carotenoid Analyses and Antibacterial Assay of Annatto (*Bixa orellana* L.), Carrot (*Daucus carota* L.), Corn (*Zea mays* L.) and Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Extracts. **Research Journal of Recent Sciences**, v. 3, n. 3, p. 40-45, 2014.

NEVES, M. A. I. *et al.* Different Power Settings of LLLT on the Repair of the Calcaneal Tendon. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 29, n. 10, p. 663-668, 2011.

NICODEMO, M. C. *et al.* Amniotic membrane as an option for treatment of acute Achilles tendon injury in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 125-139, 2017.

NOBACK, P. C. *et al.* Risk factors for achilles tendon rupture: A matched case control study. **Injury**, v. 48, n. 10, p. 2342-2347, 2017.

NOURISSAT, G.; BERENBAUM, F.; DUPREZ, D. Tendon injury: from biology to tendon repair. **Nature Reviews Rheumatology**, v.11, p. 223–233, 2015.

OCHEN, Y. *et al.* Operative treatment versus nonoperative treatment of Achilles tendon ruptures: systematic review and meta-analysis. **BMJ**, v. 364, p. 1-13, 2018.

PARENTE, M. P. *et al.* Análise do efeito da LED (light emitting diode) terapia em tendinopatia traumática em ratos. **ConScientiae Saúde**, v. 12, n. 1, p. 28-34, 2013.

PARAFIORITI, A. *et al.* Single injection of platelet-rich plasma in a rat Achilles tendon tear model. **Muscles, Ligaments and Tendons Journal**, v. 1, n. 2, p. 1-47, 2011.

PARK, Y. H. *et al.* How early must an acute Achilles tendon rupture be repaired? **Injury**, v. 48, n. 3, p. 776-780, 2017.

PRINDEZE, N. J.; MOFFAT, L. T.; SHUPP, J. W. Mechanisms of action for light therapy: a review of molecular interactions. **Experimental Biology and Medicine**, n. 237, p. 1241–1248, 2012.

REIS, E. C. C. *et al.* Desenvolvimento e Caracterização de Membranas Rígidas, Osteocondutoras e Reabsorvíveis de Polihidroxibutirato e Hidroxiapatita para Regeneração Periodontal. **Polímeros**, v. 22, n. 1, p. 73-79, 2012.

ROEHRS, M. *et al.* Annatto carotenoids attenuate oxidative stress and inflammatory response after high-calorie meal in healthy subjects. **Food Research International**, v. 100, n.1, p. 771-779, 2017.

ROMPE, J. D.; FURIA, J. P.; MAFFULLI, N. Mid-portion Achilles tendinopathy – current options for treatment. **Disability and Rehabilitation**, v. 30, n. 20-22, p. 1666-1776, 2008.

RUSHTON, P. R. P.; SINGH, A. K.; DESHMUKH, R. G. A Case of “Fresh Rupture” after Open Repair of a Ruptured Achilles Tendon. **The Journal of Foot & Ankle Surgery**, v. 51, p. 95-98, 2012.

SEO, Y. K.; KIM, J. H.; EO, S. R. Co-effect of silk and amniotic membrane for tendon repair. **Journal of Biomaterials Science Polymer Edition**, v. 27, p.1232-1247, 2016.

SILVA, J. M. N.; CARVALHO, J. P.; MOURA JÚNIOR, M. J. Estudo morfométrico da terapia LED de baixa potência em tendinite de ratos. **Fisioterapia e Pesquisa**, v.18, n.4, p. 365-70, 2011.

SANTOS, J. A. A. *et al.* Avaliação histomorfométrica do efeito do extrato aquoso de urucum (norbixina) no processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, p. 637-643, 2014.

SHARMA, P.; MAFFULLI, N. Tendon Injury and Tendinopathy: Healing and Repair. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 87-A, n. 1, p. 187-202, 2005.

SINHORETI, M. A. C.; VITTI, R. P.; CORRER-SOBRINHO, L. Biomateriais na odontologia: panorama atual e perspectivas futuras. **Revista da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas**, v. 67, p. 178-186, 2013.

SHETH, U. *et al.* The epidemiology and trends in management of acute Achilles tendon ruptures in Ontario, Canada - A population-based study of 27 607 patients. **The Bone & Joint Journal**, v. 99-B, n. 1, 2017.

SNEDEKER, J. G.; FOOLEN, J. Tendon injury and repair – A perspective on the basic mechanisms of tendon disease and future clinical therapy. **Acta Biomaterialia**, v. 63, p. 18-36, 2017.

SOMACAL, S. *et al.* The antiatherogenic effect of bixin in hypercholesterolemic rabbits is associated to the improvement of lipid profile and to its antioxidant and anti-inflammatory effects. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 403, n. 1-2, p. 243-253, 2015.

SOUSA, R. C. *et al.* Poly(hydroxybutyrate) and Norbixinas Biomaterials in Biological Applications. **Review on Advanced Materials Science**, v. 53, p. 218-225, 2018.

SOUSA, R. C. *et al.* Assessment of Genotoxicity PHB/Norbixin/Ethylene glycol Membrane by Micronucleus Test and Comet Assay. **Journal of Biotechnology and Biochemistry**, v. 2, p. 34-39, 2016.

SPIESZ, E. M. *et al.* Structure and collagen crimp patterns of functionally distinct equine tendons, revealed by quantitative polarised light microscopy (qPLM). **Acta Biomaterialia**, v. 70, p. 281-292, 2018.

SUCKOW, M. A. *et al.* Repair of experimental Achilles tenotomy with porcine renal capsule material in a rat model. **Journal of Material Science: Materials in Medicine**, v. 18, p. 1105–1110, 2007.

TAKHTFOOLADI, M. A. *et al.* Effects of light-emitting diode (LED) therapy on skeletal muscle ischemia reperfusion in rats. **Lasers in Medical Science**, v. 30, n. 1, p. 311-316, 2015.

TAN, E. W.; SCHON, L. C. Mesenchymal Stem Cell-Bearing Sutures for Tendon Repair and Healing in the Foot and Ankle. **Foot Ankle Clinicals**, v. 21, p. 885–890, 2016.

TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; DOBRANSZKI, J.; RIVERA-MADRID, R.. The biotechnology (genetic transformation and molecular biology) of *Bixa orellana* L. (achiote). **Planta**, v. 248, p. 267–277, 2018.

THOMOPOULOS, S. *et al.* Mechanisms of tendon injury and repair. **Journal of Orthopaedic Research**, n. 33, p. 832-839, 2014.

VAN STERKENBURG, M. N.; VAN DIJK C. N. Mid-portion Achilles tendinopathy: why painful? An evidence-based philosophy. **Knee Surgery Sports Traumatology, Arthroscopy**, v. 19, p. 1367–1375, 2011.

VIANA, J. L. *et al.* Hydroalcoholic Extract and Ethyl Acetate Fraction of *Bixa orellana* Leaves Decrease the Inflammatory Response to *Mycobacterium abscessus* Subsp. *Massiliense*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2018.

VILAR, D. A. *et al.* Traditional Uses, Chemical Constituents, and Biological Activities of *Bixa orellana* L.: A Review. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações farmacêuticas de polímeros, **Polímeros**, v. 20, p. 51-62, 2010.

WALDEN, G. *et al.* A Clinical, Biological and Biomaterials Perspective into Tendon Injuries and Regeneration. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 23, n. 1, p. 44-58, 2016.

WANG, D. *et al.* Operative versus non operative treatment of acute Achilles tendon rupture: An analysis of 12,570 patients in a large healthcare database. **Foot and Ankle Surgery**, v. 21, n. 4, p. 250-253, 2015.

WESTIN, O. *et al.* Cost-effectiveness analysis of surgical versus non-surgical management of acute Achilles tendon ruptures. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, v. 26, n. 10, p. 3074-3082, 2018.

WU, F.; NERLICH, M.; DOCHEVA, D. Tendon injuries: basic science and new repair Proposals. **EFORT Open Reviews**, v. 2, n. 7, p. 332-342, 2017.

XAVIER, M. *et al.* Anti-inflammatory effects of low-level light emitting diode therapy on Achilles tendinitis in rats. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 42, n. 6, p. 553-558, 2010.

XAVIER, M. *et al.* Low-level light-emitting diode therapy increases Mrna expressions of IL-10 and type I and III collagens on Achilles tendinitis in rats. **Lasers in Medical Science**, v. 29, n. 1, p. 85-90, 2014.

YANG, X. *et al.* Management of acute Achilles tendon ruptures. **Bone and Joint Research**, v. 7, p. 561–569, 2018.

YUSÁ-MARCO, D. J. *et al.* Characterization of colouring compounds in annato (*Bixa orellana* L.) used in historic textiles by means of UV-Vis spectrophotometry and FT-IR spectroscopy. **Publication del Instituto Universitario de Restauración Del Patrimonio de La UPV**, v. 3, p. 153-158, 2008.

ZABRZYŃSKI, J. *et al.* Tendon — function-related structure, simple healing process and mysterious ageing. **Folia Morphologica**, v. 77, n. 3, p. 416–427, 2018.

ZEIN, R.; SELTING, W.; HAMBLIN, M. R. Review of light parameters and photobiomodulation efficacy: dive into complexity, **Journal of Biomedical Optics**, v. 23, n. 12, 2018.

ZHANG, Y.; ZHONG, Q. Probing the binding between norbixin and dairy proteins by spectroscopy methods. **Food Chemistry**, v. 139, p. 611-616, 2013.

ZHAO, J. G. *et al.* Early functional rehabilitation versus traditional immobilization for surgical Achilles tendon repair after acute rupture: a systematic review of overlapping meta-analyses. **Scientific Reports**, n. 7, p. 1-7, 2017.

ANEXO A - DECLARAÇÃO CEUA-UESPI



GOVERNO DO ESTADO DO PIAUÍ
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ - UESPI
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA



DECLARAÇÃO CEUA-UESPI

Declaro que, o pesquisador, **LIZIA DANIELA E SILVA NASCIMENTO**, deu entrada sob no protocolo o N°14776/16 do Projeto intitulado **AVALIAÇÃO IN VIVO DA REPARAÇÃO TENDÍNEA COM MEMBRANA BIOLÓGICA A BASE DE POLIHIDROXIBUTIRATO E NORBIXINA ESTIMULADA COM LEB.**

O mesmo após a análise da Comissão teve o seguinte parecer:

APROVADO

Data do relatório final:30/12/2017

Teresina, 21 de novembro de 2016

Dr. Antônio Luiz Martins Maia Filho
Coordenador CEUA-UESPI
port. 1347


ANEXO B – ARTIGO 1

Hindawi
The Scientific World Journal
Volume 2019, Article ID 6043019, 7 pages
<https://doi.org/10.1155/2019/6043019>



Review Article

Effects of Therapy with Light Emitting Diode (LED) in the Calcaneal Tendon Lesions of Rats: A Literature Review

Lízia Daniela e Silva Nascimento ^{1,2,3,4,5}, Kárita Francisca e Silva Nascimento,^{6,7}
Diego Rodrigues Pessoa,^{8,9,10} and Renata Amadei Nicolau^{11,12,13,14,15}

¹ State University of Piauí (UESPI), Health Sciences Center (CCS), Physical Therapy Course, Kinesiology, Biomechanics and Prosthesis and Orthotics, Teresina, Piauí, Brazil

² PhD student in Biomedical Engineering, University of Vale do Paraíba (UNIVAP), São José dos Campos, São Paulo, Brazil

³ Master's Degree in Family Health, University Center UNINOVAFAPI, Teresina, Piauí, Brazil

⁴ Specialist in Physiotherapy in Re-Education of Motricity, University of Fortaleza (UNIFOR), Fortaleza, Ceará, Brazil

⁵ Physiotherapist, Municipal Health Foundation of Teresina, Piauí, Brazil

⁶ Speech and Hearing Therapist, Department of Social Assistance and Citizenship of the State of Piauí (SASC), Teresina, Piauí, Brazil

⁷ Specialist in Language, UNIFOR, Fortaleza, Ceará, Brazil

⁸ Bachelor in Physiotherapy, University Center of Santo Agostinho (UniFSA), Teresina, Piauí, Brazil

⁹ Master in Biomedical Engineering, UNIVAP, São José dos Campos, São Paulo, Brazil

¹⁰ Specialist in Teaching of Higher Education, UNINOVAFAPI University Center, Teresina, Piauí, Brazil

¹¹ University of Vale do Paraíba, Department of Dentistry, Subjects of Bucomaxillofacial Surgery, Traumatology, and Stomatology, São José dos Campos, São Paulo, Brazil

¹² Doctorate in Ciências Médicas Básicas, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain

¹³ PhD and Masters in Biomedical Engineering-Laser Therapy, University of Vale do Paraíba, São José dos Campos, São Paulo, Brazil

¹⁴ Specialist in Research in Experimental Sciences Applied to Biomedicine, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain

¹⁵ Specialist in Periodontics, Paulista Association of Dental Surgeons, São José dos Campos, São Paulo, Brazil

Correspondence should be addressed to Lízia Daniela e Silva Nascimento; liziadaniela@hotmail.com

Received 9 July 2018; Accepted 13 December 2018; Published 3 February 2019

Academic Editor: Bayram Unver

Copyright © 2019 Lízia Daniela e Silva Nascimento et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The objective of this review was to analyze original articles about the effects of therapy with LED in experimental models of calcaneal tendon lesions of rats. The search was performed in the period from February to May 2018, in the following electronic databases: MEDLINE, SciELO, and LILACS, besides the Google Scholar, using the descriptors "Achilles tendon", "Rats", "LED", "Tendinopathy", and "Low-level Light Therapy", as well as their matching parts in the Portuguese and Spanish languages, related to and in association with the relevant terms to the content sought. From the descriptors used 215 works were found. After application of eligibility criteria 8 works were selected, in which positive results were found after the application of the LED. Regarding the main results found with phototherapy, we observed a significant reduction in inflammation. Only one article mentioned little reduction of inflammation. In relation to the number of sessions, there was wide variation, with an average of approximately 5 sessions every 24 hours. Studies in this review pointed out, therefore, positive results in the repair of the calcaneal tendon after therapy with irradiation LED; however, carrying out more experimental studies that help the standardization of parameters to be used in this therapy for further clinical studies becomes necessary.

1. Introduction

Tendinopathy is defined as a clinical presentation of pain leading to a reduction of the functional capacity and can

be followed by the presence of signs as edema, pain, or thickening of the tendon. Many evidences have demonstrated that the lesion of the calcaneus tendon is the most common among athletes, besides being the most common target











ANEXO C – ARTIGO 2



ACTA CIRÚRGICA BRASILEIRA

ORIGINAL ARTICLE
Experimental Surgery

Effect of norbixin-based poly(hydroxybutyrate) membranes on the tendon repair process after tenotomy in rats¹

Lízia Daniela e Silva Nascimento^I , Renata Amadei Nicolau^{II} , Antônio Luiz Martins Maia Filho^{III} , José Zilton Lima Verde Santos^{IV} , Khetyma Moreira Fonseca^V , Dannel Cabral Leão Ferreira^{VI} , Rayssilane Cardoso de Sousa^{VII} , Vicente Galber Freitas Viana^{VIII} , Luiz Fernando Meneses Carvalho^{IX} , José Figueredo-Silva^X 

^I Fellow PhD degree, Postgraduate Program in Biomedical Engineering, Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), Sao Jose dos Campos-SP. Assistant Professor of Kinesiology, MSc, Health Sciences Center, Physical Therapy, Universidade Estadual do Piauí (UESPI), Teresina-PI, Brazil. Conception, design, intellectual and scientific content of the study; acquisition and interpretation of data; technical procedures; manuscript preparation.

^{II} PhD, Collaborator, Postgraduate Program in Biomedical Engineering of the Research and Development Institute, UNIVAP, Sao Jose dos Campos-SP, Brazil. Conception, design, intellectual and scientific content of the study; interpretation of data; critical revision.

^{III} Associate Professor of Physiology, Health Sciences Center, UESPI, Teresina-PI, Brazil. Technical procedures.

^{IV} MSc, Assistant Professor, Center of Health Sciences, Medicine and Physical Therapy, UESPI, Teresina-PI, Brazil. Histopathological examinations.

^V Fellow PhD degree, Postgraduate Program in Pharmacology, Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza-CE. MSc in Biotechnology, Northeast Biotechnology Network - RENORBIO, Teresina-PI, Brazil. Acquisition of data, statistical analysis.

^{VI} Fellow Master degree, Professional Master's Program in Human and Animal Biotechnology MPBiotec, UESPI, Teresina-PI, Brazil. Technical procedures.

^{VII} Fellow PhD degree, Postgraduate Program in Biotechnology, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina-PI, Brazil. Membrane production.

^{VIII} PhD, Associate Professor, Postgraduate Program in Material Engineering (PPGEM), Federal Institute of Education, Science and Technology of Piauí, IFPI, Teresina-PI, Brazil. Membrane production.

^{IX} PhD, Full Professor, Postgraduate Program in Material Engineering (PPGEM), Federal Institute of Education, Science and Technology of Piauí, IFPI, Teresina-PI, Brazil. Membrane production.

^X PhD, Associate Professor of Pathology, Health Sciences Center, UESPI, Teresina-PI, Brazil. Histopathological examinations, critical revision.

Abstract

Purpose: To determine the efficacy of norbixin-based poly(hydroxybutyrate) (PHB) membranes for Achilles tendon repair.

Methods: Thirty rats were submitted to total tenotomy surgery of the right Achilles tendon and divided into two groups (control and membrane; n = 15 each), which were further subdivided into three subgroups (days 7, 14, and 21; n = 5 each). Samples were analyzed histologically.

Results: Histological analysis showed a significant reduction in inflammatory infiltrates on days 7, 14 ($p < 0.0001$ for both), and 21 ($p = 0.0004$) in the membrane group compared to that in the control group. There was also a significant decrease in the number of fibroblasts in the control group on days 7, 14 ($p < 0.0001$), and 21 ($p = 0.0032$). Further, an increase in type I collagen deposition was observed in the membrane group compared to that in the control group on days 7 ($p = 0.0133$) and 14 ($p = 0.0107$).

Conclusion: Treatment with norbixin-based PHB membranes reduces the inflammatory response, increases fibroblast proliferation, and improves collagen production in the tendon repair region, especially between days 7 and 14.

Key words: Achilles Tendon. Collagen. Rats.

ANEXO D – ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO

De: Edna Montero <onbehalf@manuscriptcentral.com>

Enviado: domingo, 1 de março de 2020 22:45

Para: liziadaniela@hotmail.com; jrgranja@bol.com.br

Assunto: Acta Cirúrgica Brasileira - Decision on Manuscript ID ACB-2020-0014.R1

01-Mar-2020

Dear Prof. e Silva Nascimento:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "EFFECT OF LOW INTENSITY PHOTOBIMODULATION ASSOCIATED WITH NORBIXIN-BASED POLY (HYDROXYBUTYRATE) MEMBRANE ON POST-TENOTOMY TENDON REPAIR - IN VIVO STUDY" in its current form for publication in the Acta Cirúrgica Brasileira.

Our publishing team will contact you for further details before final publication.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Acta Cirúrgica Brasileira, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,
Prof. Edna Montero
Editor-in-Chief, Acta Cirúrgica Brasileira
actacirbras@gmail.com

Associate Editor
Comments to the Author:

Dear authors,

I am pleased to report that your manuscript has been evaluated by two of our reviewers. They considered it nicely accomplished and apt to be accepted for publication.