

Universidade Brasil – Campus Itaquera
Instituto Científico e Tecnológico da Universidade Brasil
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica

***USO DO BIOPOLÍMERO DE FIBRINA HETERÓLOGO ASSOCIADO
OU NÃO À FOTOBIMODULAÇÃO NO PROCESSO DE REPARO
TENDÍNEO***

ENÉAS DE FREITAS DUTRA JUNIOR

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Carla Roberta Tim
Coorientador: Prof. Dr. Marcello Magri Amaral

São Paulo, SP
2020

***USE OF THE HETEROLOGIST FIBRINE BIOPOLYMER ASSOCIATED
OR NOT WITH PHOTOBIMODULATION IN THE TENDENOUS
REPAIR PROCESS***

ENÉAS DE FREITAS DUTRA JUNIOR

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Brasil, como parte dos requisitos necessários para obtenção de título de Doutor em Engenharia Biomédica.

**Orientadora: Prof.^a Dr^a Carla Roberta Tim
Coorientador: Prof. Dr. Marcello Magri Amaral**

**São Paulo, SP
2020**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

D974u Dutra Junior, Enéas de Freitas.

Uso do Biopolímero de Fibrina Heterólogo associado ou não à Fotobiomodulação no processo de reparo tendíneo / Enéas de Freitas Dutra Junior. – 2021.

61 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, 0, Fortaleza, 2021.

Orientação: Profa. Dra. Carla Roberta Tim.

Coorientação: Prof. Dr. Marcello Magri Amaral.

1. Lesão tendínea, Biopolímero de fibrina, Fotobiomodulação.. I. Título.

CDD

**TERMO DE APROVAÇÃO****ENÉAS DE FREITAS DUTRA JÚNIOR****“USO DO BIOPOLÍMERO DE FIBRINA HETERÓLOGO ASSOCIADO OU NÃO À FOTOBIMODULAÇÃO NO PROCESSO DE REPARO TENDÍNEO”**

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica** da Universidade Brasil, pela seguinte banca examinadora:



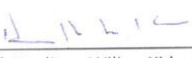
Prof(a). Dr(a) Carli Roberta Tim (presidente-orientadora)



Prof(a). Dr(a) Livia Assis Garcia (UNIVERSIDADE BRASIL)



Prof(a). Dr(a) José Carlos Cogo (UNIVERSIDADE BRASIL)



Prof(a). Dr(a) Hueliton Wiliam Kido (UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO)



Prof(a). Dr(a) Antônio Luiz Martins Maia Filho (UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ)

São Paulo, 30 de novembro de 2020.

Presidente da Banca Prof.(a) Dr.(a) Carli Roberta Tim

Houve alteração do Título: sim () não (x):



Termo de Autorização

Para Publicação de Dissertações e Teses no Formato Eletrônico na Página WWW do Respectivo Programa da Universidade Brasil e no Banco de Teses da CAPES

Na qualidade de titular(es) dos direitos de autor da publicação, e de acordo com a Portaria CAPES no. 13, de 15 de fevereiro de 2006, autorizo(amos) a Universidade Brasil a disponibilizar através do site <http://www.universidadebrasil.edu.br>, na página do respectivo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, bem como no Banco de Dissertações e Teses da CAPES, através do site <http://bancodeteses.capes.gov.br>, a versão digital do texto integral da Dissertação/Tese abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira.

A utilização do conteúdo deste texto, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, fica condicionada à citação da fonte.

Título do Trabalho: **“USO DO BIOPOLÍMERO DE FIBRINA HETERÓLOGO ASSOCIADO OU NÃO À FOTOBIMODULAÇÃO NO PROCESSO DE REPARO TENDÍNEO”**

Autor(es):

Discente: **Enéas de Freitas Dutra Júnior**

Assinatura: _____

Orientador(a): **Prof.(a) Dr.(a) Carla Roberta Tim**

Assinatura: _____

Coorientador(a): **Prof.(a) Dr.(a) Marcello Magri Amaral**

Assinatura: _____

Houve alteração do Título: sim () não (X):

Data: 30/11/2020

DEDICATÓRIA

A minha esposa Juliana, por ter permanecido ao meu lado, me incentivando a percorrer este caminho, por compartilhar angústias e dúvidas estendendo sua mão amiga em momentos difíceis.

A minha querida amiga e mentora Carmem Line Bomfim Deolindo (*in memoriam*), que foi tão importante na minha vida, me aconselhando e puxando minha orelha quando necessário.

Aos meus amados pais, Enéas de Freitas Dutra Neto (*in memoriam*) e Benedita Araújo de Sousa Freitas, por todo amor, carinho e compreensão, e por me proporcionarem a oportunidade de chegar até aqui.

A Deus, que guiou meus passos até este momento, me proporcionando saúde e sabedoria, guardando-me debaixo de seu poderoso amparo, protegendo-me do mal.

AGRADECIMENTOS

A MINHA ORIENTADORA, Prof^a. Dr^a. Carla Roberta Tim, um agradecimento carinhoso por todos os momentos de paciência, compreensão e competência, você foi fundamental para eu poder chegar até aqui.

Ao co-orientador, Prof^o. Dr. Marcello Magri Amaral, pelo seu incentivo, e apoio na elaboração deste trabalho.

Ao corpo docente e discente do Departamento de Engenharia Biomédica da UNIVERSIDADE BRASIL, pelo ambiente amigável e sempre de troca que mantêm lá. Centro de estudos de venenos em animais peçonhentos – CEVAP, da Universidade Estadual de São Paulo – UNESP de Botucatu.

Ao CENTRO UNIVERSITÁRIO UNINOVAFAPI pelo incentivo e apoio na formação continuada de seus professores através de bolsas de ensino e sem a qual minha caminhada seria bem mais difícil.

AO NÚCLEO DE PESQUISA EM BIOTECNOLOGIA E BIODIVERSIDADE da Universidade Estadual do Piauí, e todos os colaboradores do biotério, pelo fornecimento dos animais, por todo auxílio e disponibilidade durante a pesquisa.

A minha amiga Prof^a. Ms. Silvia Maria Cardoso Magalhães Hidd, grande parceira durante todo o processo de pesquisa, uma mulher guerreira, que sempre me motivou e que aprendi a respeitar muito.

Ao Prof^o. Dr. Antônio Luiz Martins Maia Filho, pelos momentos partilhados, sem esmorecimento. Obrigado por toda ajuda prestada, por sua disponibilidade, por sua confiança e respaldo em momentos difíceis.

Ao Prof^o. Dr. José Figueredo-Silva, pelo seu incentivo, disponibilidade e apoio que sempre demonstrou. Aqui lhe exprimo a minha gratidão.

Ao Prof^o. Dr. Evaldo Orsano, pelo apoio incondicional.

Ao amigo Prof^o. Me. Moisés Mendes, pelo apoio e prestatividade. Por ter indicado caminhos e aberto portas que viabilizaram a execução de minha pesquisa.

Aos membros da banca, Prof^a Dr^a. Livia Assis Garcia, Prof^o. Dr. José Carlos Cogo, Prof^o. Dr. Hueliton Wilian Kido e Prof^o Dr. Antônio Luiz M. Maia. Obrigado pelo privilégio ter a possibilidade de aprender com as suas ideias e reflexões.

A todos os amigos do Curso de Educação Física do Centro universitário Uninovafapi que de uma forma direta ou indireta, contribuíram, ou auxiliaram na elaboração da presente pesquisa, pela paciência, atenção e força que prestaram em momentos não tão bons. Opto aqui por não identificar, a fim de não correr o risco de não citar algum, no entanto, aqueles a quem este agradecimento se dirige saberão de minha gratidão.

A todos os meu mais sincero e profundo agradecimento.

O conhecimento produz as
contrações que nos fazem nascer de
novo, mantêm ativos os ciclos de
nossa evolução.

Portanto, quem nos mata não é a
morte, é a ignorância.

Pe. Fábio de Melo.

RESUMO

Introdução: Os tendões estão suscetíveis a lesões, sendo o tendão calcâneo frequentemente lesionado. No, entanto, há muita controvérsia sobre os tratamentos das lesões tendíneas. Nesta perspectiva, a utilização do biopolímero de fibrina heterólogo (BFH), um agente homeostático que vem sendo utilizado em diversos tipos de cirurgias é uma estratégia cirúrgica para o tratamento de lesão tendínea. Além disso, o tratamento não cirúrgico por meio da utilização da terapia por fotobiomodulação (TFBM) a laser tem demonstrado ser efetivo no processo de reparo. **Objetivo:** Avaliar o efeito do biopolímero de fibrina heterólogo associado, ou não, à fotobiomodulação no processo de reparo tendíneo. **Metodologia:** Foram utilizados 84 *Rattus norvegicus* pertencentes à linhagem *wistar*. Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos experimentais com N=21 animais em cada: Controle (GC); Biopolímero de fibrina heterólogo (BFH); Fotobiomodulação (FBM); Biopolímero de fibrina heterólogo + Fotobiomodulação (BFH + FBM). Os grupos foram subdividido em 3 períodos experimentais: 7, 14 e 21 dias. Os animais receberam o BFH imediatamente após a transecção parcial do tendão. A FBM iniciou 24 horas a indução da lesão e seguiu-se por 7, 14, 21 dias. Para a FBM foi utilizada o laser 660 nm, 40 mW, 0,23 J e 6 segundos. Foi avaliado o volume do edema, imediatamente antes da transecção tendínea; 24 horas após a transecção tendínea; no dia da eutanásia, seguindo seus respectivos períodos experimentais. A análise histopatológica descritiva e através da escala de Bonar na região tendínea transectada parcialmente e a quantificação de vasos sanguíneos foram realizadas através das lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina (HE). A quantificação de colágeno foi realizada através das lâminas coradas com Tricrômio de Masson. **Resultados:** Os resultados do volume do edema demonstraram que, após 24 horas da transecção parcial do tendão calcâneo, não houve diferença estatística entre os grupos experimentais. Após os três períodos experimentais, observou-se que os grupos de tratamento foram eficazes na redução do edema quando comparados ao controle. A análise histológica revelou que FBM teve uma lesão maior do tendão após 7 dias. Porém, nos períodos de 14 e 21 dias, a FBM teve um melhor processo de reparo em relação ao GC, enquanto o BFH e BFH + FBM tiveram um melhor processo de reparo quando comparado ao GC nos 3 períodos experimentais. A FBM apresentou maior número de vasos sanguíneos após 7, 14 e 21 dias. Na quantificação do colágeno, não houve diferença estatística entre os grupos, nos 3 períodos experimentais. **Conclusão:** Os achados sugerem que os tratamentos BFH e FBM, isolados ou associados, foram eficazes na redução do volume do edema, estimulando o processo de reparo. Porém, o uso de BFH sozinho foi mais eficaz na promoção do processo de reparo do tendão. Assim, este estudo consolida estudos anteriores de reparo de tendão com este novo BFH. Futuros ensaios clínicos serão necessários para validar esta proposta.

Palavras-chave: Lesão tendínea, Biopolímero de fibrina, Fotobiomodulação.

ABSTRACT

Introduction: The tendons are susceptible to injuries, and the calcaneal tendon is frequently injured. However, there is much controversy about the treatment of tendon injuries. In this perspective, the use of heterologous fibrin biopolymer (HFB), a homeostatic agent that has been used in several types of surgeries and a surgical strategy for the treatment of tendon injuries. In addition, non-surgical treatment using laser photobiomodulation therapy (PBMT) has been shown to be effective in the repair process. **Objective:** To evaluate the effect of heterologous fibrin biopolymer associated or not with photobiomodulation in the tendon repair process. **Methodology:** 84 *Rattus norvegicus* belonging to the *Wistar* strain were used. The animals were randomly divided into 4 experimental groups with N=21 animals in each: Control (CG); Heterologous fibrin biopolymer (HFB); Photobiomodulation (PBM); Heterologous fibrin biopolymer + Photobiomodulation (HFB + PBM). The groups were subdivided into 3 experimental periods: 7, 14 and 21 days. The animals received HFB immediately after partial tendon transection. PBM started the lesion induction for 24 hours and was followed for 7, 14, 21 days. For PBM, a 660 nm, 40 mW, 0.23 J and 6 second laser was used. The volume of the edema was evaluated, immediately before the tendon transection; 24 hours after tendon transection; on the day of euthanasia, following their respective experimental periods. The descriptive histopathological analysis and through the Bonar scale in the partially transected tendon region and the quantification of blood vessels were performed using slides stained with Hematoxylin and Eosin (HE). Collagen quantification was performed using slides stained with Masson's trichrome. **Results:** The results of the edema volume showed that, 24 hours after partial transection of the calcaneus tendon, there was no statistical difference between the experimental groups. After the three experimental periods, it was observed that the treatment groups were effective in reducing edema when compared to control. A histological analysis revealed that PBM had a major tendon injury after 7 days. However, in the periods of 14 and 21 days, the PBM had a better repair process compared to the GC, while the HFB and HFB + PBM had a better repair process when compared to the GC in the 3 experimental periods. PBM showing a greater number of blood vessels after 7, 14 and 21 days. In the quantification of collagen, there was no statistical difference between the groups, in the 3 experimental periods. **Conclusion:** The results obtained with the HFB and PBM treatments, granted or associated, were effective in reducing the volume of the edema, stimulating the repair process. However, the use of HFB alone is more effective in promoting the tendon repair process. Thus, this study consolidates previous studies of tendon repair with this new HFB. Clinical futures will be included to validate this proposal.

Keywords: Tendon injury, Fibrin biopolymer, Photobiomodulation.

DIVULGAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE CONHECIMENTOS

A pesquisa em questão teve como objetivo geral avaliar o efeito do biopolímero de fibrina heterólogo associado, ou não, à fotobiomodulação no processo de reparo tendíneo. Os resultados relacionados ao edema após 24 horas da cirurgia, não teve diferença estatística entre os grupos experimentais. Após 7, 14 e 21 dias observou-se que os grupos tratados com o biopolímero e a fotobiomodulação reduziram o edema comparado ao grupo controle. A análise histológica revelou que os animais que usaram o biomaterial tiveram melhor processo de reparo tendíneo nos 3 períodos experimentais. Na quantificação do colágeno, não houve diferença estatística entre os grupos, nos 3 períodos experimentais. Os achados sugerem que os tratamentos com biopolímero e fotobiomodulação, isolados ou associados, foram eficazes em reduzir o volume do edema, estimular o processo de reparo. No entanto, o uso do biopolímero isoladamente, teve a maior eficácia em promover o processo de reparo tendíneo.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Organização hierárquica do tendão.	19
Figura 2 - Estrutura do Fibrinogênio.	23
Figura 3 - Estrutura da Trombina.	25
Figura 4 - Biopolímero de Fibrina Heterológico: fibrinogênio, trombina e cloreto de cálcio.	35
Figura 5 - Pletismometro de pata e esquema representativo da análise do edema. .	36
Figura 6 - Volume de edema 24 horas após a transecção parcial do tendão nos subgrupos de 7, 14 e 21 dias.	39
Figura 7 - Avaliação do volume de edema após 7, 14 e 21 dias.	40
Figura 8 - Achados histológicos.	42
Figura 9 - Escore histológico de Bonar.	43
Figura 10 - Quantificação de vasos sanguíneos.	44
Figura 11 - Quantificação de colágeno.	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros dos instrumentos usados para a Fotobiomodulação.	35
Tabela 2 - Análise intragrupo do volume de edema.	40
Tabela 3 - Análise intragrupo do escore de Bonar.	43
Tabela 4 - Análise intragrupo do número de vasos sanguíneos.....	45
Tabela 5 - Análise intragrupo da quantidade de colágeno.	46

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivos Específicos	18
3 REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1 Lesão Tendínea	19
3.2 Biopolímero de Fibrina Heterólogo	22
3.3 Terapia por Fotobiomodulação	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 Animais	33
4.2 Transecção do Tendão Calcâneo	34
4.3 Protocolo de Terapia por Fotobiomodulação	35
4.4 Análises do Edema	36
4.5 Coleta das Amostras	36
4.6 Análises Histopatológica	36
4.7 Quantificação de Vasos Sanguíneos	37
4.8 Quantificação de Colágeno	37
4.9 Análises Estatísticas	38
5 RESULTADOS	38
5.1 Volume de Edema	38
5.2 Análise Histopatológica	40
5.3 Quantificação de Vasos Sanguíneos	44
5.4 Quantificação de Colágeno	45
6 DISCUSSÃO	46
7 CONCLUSÕES	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
ANEXO 1	60

1 INTRODUÇÃO

As lesões musculoesqueléticas causam um ônus significativo para a sociedade e podem ter um impacto considerável na morbimortalidade do paciente. As lesões nos tecidos moles, incluindo tendão e ligamentos, representam 50 % dessas lesões (JAMES et al., 2008). Os tendões são estruturas alongadas, formadas por tecido conjuntivo denso e modelado que transmitem força de contração muscular ao tecido ósseo para que ele possa produzir o movimento ou simplesmente manter sua postura. Este tecido é formado predominantemente de colágeno, do tipo I, produzidos por tenócitos e apresentam a estrutura de hélice tripla que se alonga quando é submetida à força tênsil (resistência ao estiramento), ofertando ao tendão as suas propriedades mecânicas (FRAUZ et al., 2019; VOLPI, 2016).

Devido sua complexa estrutura altamente organizada, os tendões são capazes de suportar grandes cargas e estresse (THORPE et al., 2016). Os grandes tendões que apresentam uma alta demanda de carga, como o tendão calcâneo, normalmente são os mais acometidos e estas lesões tendíneas estão entre os problemas ortopédicos mais comuns (KARAASLAN et al., 2016). Essa organização permite o tendão calcâneo carrear a força de tensão do músculo gastrocnêmio e sóleo até o osso calcâneo realizando o movimento de flexão plantar. Durante a realização de um esforço físico essa tensão é multiplicada e podem provocar lesão (BOGAERTS et al., 2016; EGGER; BERKOWITZ, 2017). Assim, as evidências sugerem que o tendão é suscetível a diversos traumas como as micro lesões ou *overuse* (traumas de baixa energia) ou macros lesões (traumas de alta energia) por que podem acarretar a lesões agudas, crônicas e/ou ruptura parcial/total (KRAEMER et al., 2012).

O tratamento de lesões em tendão, por muito tempo foi fundamentado em técnicas cirúrgicas, sejam elas por técnicas minimamente invasiva ou aberta e em técnicas não cirúrgicas (conservadoras). O tratamento cirúrgico é a técnica mais escolhida, pela maioria dos especialistas, por apresentar uma menor taxa de reincidência da lesão, contudo as intervenções cirúrgicas tornam possível o risco de infecção, formação de quelóide e lesão nervosa (DENG et al., 2017; MEULENKAMP et al., 2018; STAVENUITER et al., 2019).

Nesta perspectiva, diversas estratégias têm sido estudadas, com a finalidade de acelerar o reparo tendíneo, dentre eles, a utilização de um biopolímero de fibrina, que é um agente hemostático que pode ser utilizado em vários tipos de operações e tem a capacidade de promover a adesão, estabilidade tecidual, aceleração da cicatrização do tecido e controle de sangramento durante cirurgias, dentre outros (DE BARROS et al., 2016).

O biopolímero de fibrina heterólogo (BFH) é composto por um crioprecipitado extraído do sangue de búfalo (*Bubalus bubalis*) associado a uma enzima tipo trombina, chamada protease serino protease extraída do veneno de cobra cascavel (*Crotalus durissus terrificus*). Sabe-se que a enzima do tipo trombina, na presença de cálcio, atua sobre a molécula de fibrinogênio transformando-o em monômeros de fibrina, formando um coágulo estável com efeitos adesivo, hemostático e selante (FERREIRA et al., 2017; FRAUZ et al., 2019; KRYUKOVA et al., 2018).

O selante de fibrina heterólogo pode ser utilizado em procedimentos cirúrgicos como um método eficiente para substituir as suturas convencionais, tornando o processo menos invasivo e ainda pode controlar o sangramento, logo pode diminuir o tempo de recuperação e aumentar a taxa de sucesso (FERREIRA et al., 2017; HE et al., 2013). Sua eficácia tem sido demonstrada em diversos tecidos como, por exemplo, no reparo de feridas cirúrgicas (PERES, 2014), cartilagem (DE BARROS et al., 2016), na redução de hematoma e complicações em lifting facial (GIORDANO et al., 2017), no tratamento do sistema nervoso após lesões e doenças (BISCOLA et al., 2017) e no tratamento de transecção do tendão (FRAUZ et al., 2019).

Um recurso que vêm amplamente sendo investigado e têm demonstrado resultados efetivos é a terapia por fotobiomodulação (TFBM). Esta terapia pode ser definida como o uso de fontes de luz não ionizantes para fins terapêuticos (VAGHARDOOST et al., 2018). A ação da TFBM é baseada na absorção da luz pelos tecidos, o que resulta em uma expressão aumentada de trifosfato de adenosina (ATP), produção de oxigênio molecular e fatores de transcrição (DE FREITAS; HAMBLIN, 2016). Esses efeitos podem aumentar a síntese de DNA, RNA e proteínas reguladoras do ciclo celular, promovendo a proliferação celular (HAMBLIN, 2018). Além disso, a TFBM modula a expressão de alguns mediadores inflamatórios, estimula fatores angiogênicos e a produção de colágeno, desempenhando assim, um papel essencial no processo de reparo (TIM et al.,

2016a). Assim, essa modalidade terapêutica tem sido utilizada para estimular o reparo tendíneo (DE MATTOS et al., 2014; NATERSTAD et al., 2018).

Apesar dos dados encorajadores sobre os efeitos potenciais da TFBM e do BFH no reparo tecidual, o tratamento de ruptura de tendão ainda não é totalmente compreendido. Assim, o presente estudo hipotetizou que a utilização do biopolímero de fibrina heterólogo associado ou não a aplicação de terapia por fotobiomodulação atuam de forma positiva no processo de reparo tendíneo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do biopolímero de fibrina heterólogo associado ou não à fotobiomodulação no processo de reparo tendíneo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

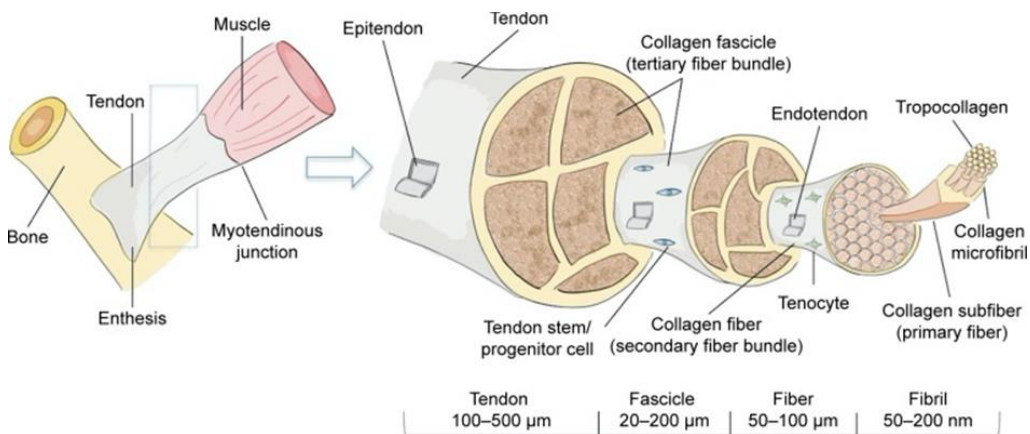
- Verificar a eficácia dos tratamentos, biopolímero de fibrina heterólogo e Fotobiomodulação, isolados ou associados, na redução do edema após lesão parcial do tendão calcâneo;
- Quantificar colágeno total nos tendões tratados com biopolímero de fibrina heterólogo, fotobiomodulação e associação dos tratamentos;
- Quantificar vasos sanguíneos nos diferentes grupos;
- Avaliar alterações morfológicas no local da lesão;
- Avaliar a influência dos tratamentos na cinética de reparo tendíneo.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Lesão Tendínea

A composição dos tendões é bastante organizada, a fim de permitir que forças de grande magnitude possam convergir do músculo para os ossos e assim possam gerar movimentos ou permanecem estáticos. Sua organização (Figura 1) se deve a ação mutua entre as células locais e a matriz extracelular (MEC), que por sua vez é composta de fibroblastos (células que sintetizam as proteínas de colágeno e elastina), água (70%), colágeno tipo I (entre 90% e 95%), colágeno tipo III (entre 1% e 5%) e elastina. Os tecidos conjuntivos epitenônio e endotenônio, agrupam e circundam as fibras dos tendões, a fim de permitir que ocorra movimento sem atrito entre elas, além do que fornecem vasos sanguíneos, nervos e vasos linfáticos para as estruturas mais profundas do tendão, desta forma suas propriedades mecânicas são preservadas e previnem lesões (LIN; CARDENAS; SOSLOWSKY, 2004).

Figura 1 - Organização hierárquica do tendão.



Notas: O alinhamento do colágeno é baseado na organização em fascículos, fibras e fibrilas. Os tenócitos, diferenciados terminalmente dos tenoblastos, são o principal componente celular dos tendões. Fonte: Docheva et al. (2015) e Nourissat; Berenbaum; Duprez (2015).

As lesões tendíneas podem ocorrer em consequência de traumas repetitivos, devido ao atrito anormal contra superfícies ósseas, podem ser provenientes de traumas contundentes, por exemplo, em decorrência de acidentes, além de lesões por infecções, esses traumas podem provocar uma ruptura parcial ou total do tendão

caracterizando-se por inflamação e alterações degenerativas (BOGAERTS et al., 2016). As lesões mais frequentes ocorrem no manguito rotador, o tibial posterior, tendão patelar e tendão calcâneo (DOCHEVA et al., 2015). As lesões tendíneas podem gerar uma incapacidade de vários meses na área afetada e resultar em uma estrutura mais fraca posteriormente a lesão e, portanto ficar susceptíveis a reincidências (NOURISSAT; BERENBAUM; DUPREZ, 2015).

Vários são os fatores que influenciam na predisposição das lesões tendíneas, idade, sexo, doenças, fatores hereditários, além é claro do alto estresse provocado durante a prática de exercícios (DOCHEVA et al., 2015). Além do impacto emocional e na redução de qualidade de vida provocados por este tipo de lesão, no que se refere a impossibilidade de realizar as atividades da vida diária (AVDs), existe também o aspecto financeiro, que deve ser levando em conta, uma vez que esse acometimento constantemente leva ao afastamento do trabalho, perda de produtividade, seguido de custos elevados no tratamento, levando-se em conta custos médicos e ambulatoriais, sessões de fisioterapia, aplicação de corticoides entre outros, gerando elevado gasto, entre £ 20.000,00 e 30.000,00 em libras esterlinas, durante o período da realização da pesquisa (HOPKINS et al., 2016).

As lesões tendíneas podem ser provenientes de micro lesões, traumas contusos ou uma combinação entre os dois (THOMOPOULOS et al., 2015). As micro lesões são decorrentes de micro traumas repetitivos e prejudica a estrutura do tendão, uma vez que, não dá tempo o suficiente para que ocorra o mecanismo de reparo e podem ser induzidos por constante ativação muscular e produção de força não uniforme. As alterações degenerativas causadas por micro traumas pode ser um agravante no caso de ocorrência de traumas contusos (NAKAMA, et al., 2007).

Embora o reparo tendíneo esteja relacionado à localização e gravidade da lesão, a regeneração do tecido tendíneo envolvem várias etapas de cura e envolve a produção de fatores múltiplos de crescimento celular (LIN; CARDENAS; SOSLOWSKY, 2004). Logo após a lesão aguda dos tendões ocorre à liberação de moléculas sinalizadoras das células intrínsecas e a formação de hematoma. Com isso vai haver a liberação de citosinas pró-inflamatórias que vão atrair as células inflamatórias para a lesão a fim de quebrar o coágulo sanguíneo e o tecido necrosado.

Após a lesão também ocorre à aglomeração de células sanguíneas chamadas neutrófilos, que são responsáveis pela defesa do organismo no caso de infecções ou inflamações. Os macrófagos se responsabilizam por fazer a remoção das células circundantes (fagocitose), além de auxiliar na proliferação de fibroblastos e angiogênese, que sintetizarão e entregarão DNA, Colágeno tipo III e assim dar início a geração de uma nova matriz extracelular. Neste momento os macrófagos e neutrófilos liberam novamente citosinas que fazem a transição desta primeira fase para a próxima fase (SHARMA; MAFFULLI, 2005; WOO, 2009).

A segunda fase, chamada de proliferativa, se caracteriza por uma desorganização do tecido depositado e uma maior concentração de colágeno tipo III, DNA, proteínas, que tem o papel de regular a angiogênese, a migração celular, promover a neovascularização e a diferenciação de células-tronco, preparando toda a estrutura para a fase subsequente. Nesta segunda fase, especificamente em relação ao tendão, ocorre a proliferação dos tenócitos do epitendão e do endotendão. A partir do terceiro até o sétimo dia após a lesão tendínea, a proliferação se mantém elevadas devido a migração de células intrínsecas. Os tenoblastos, células que darão origem aos tenócitos, localizadas no epitendão, iniciam o processo de reparação. Ostenócitos também contribuem na proliferação através da produção de fibras de colágeno mais larga. A produção de diferentes tipos de colágeno e a função dos tenócitos é influenciada de acordo com o tipo de lesão, sua localização anatômica e de acordo com a presença de membrana sinovial (YOUNGSTROM; BARRETT, 2016; WALDEN et al., 2017).

A terceira fase é a da remodelação, que pode levar anos, e caracteriza-se pela transição do colágeno tipo III para o tipo I através dos fibroblastos, regulação da proteinase, degradação e reorganização do colágeno (SHARMA; MAFFULLI, 2005). Nesta última fase será gerado um tendão estruturalmente semelhante ao original, no entanto, mecanicamente terá desempenho inferior e maior possibilidade de sofrer novas lesões, se comparado ao original (MOLLOY; WANG; MURRELL, 2003).

O tendão calcâneo, assim como os demais é composto hierarquicamente de fascículos, fibras e fibrilas, sua capacidade depende da direção em que for medida, mas é o mais resistente e vulnerável do nosso corpo, podendo suportar uma tensão, durante as atividades, cargas superiores a 356,9 Kg (FREEDMAN; GORDON; SOSLOWSKY, 2014) ou de 5,1 a 10,2 Kg/mm de tração (VIIDIK, 1969). O tendão

calcâneo possui cerca de 15 cm de comprimento, se origina no meio da panturrilha e se insere no osso calcâneo, formando-se pela união dos dois tendões do músculo sóleo e do tendão do músculo gastrocnêmio. Mesmo com toda a capacidade de suportar grandes tensões, o tendão calcâneo é frequentemente afetado por lesões, sendo na maioria das vezes (75%) durante a prática de exercícios físicos, em homens entre 30 e 40 anos (LONGO et al., 2013; PEEK; MALAGELADA; CLARK, 2016).

Assim como os demais tendões, o calcâneo pode apresentar lesões ou rupturas, de forma aguda (micro lesões) com capacidade de recuperação mais curta ou crônica (macro lesões) quando o tempo de recuperação é maior que 6 semanas (SHARMA; MAFFULLI, 2005). As formas de tratamento do tendão calcâneo devem ser de acordo com as características individuais do paciente e levando em consideração seu estilo de vida, podendo ser cirúrgico e não cirúrgico, não havendo consenso entre a melhor forma de tratamento (KARAASLAN et al., 2016).

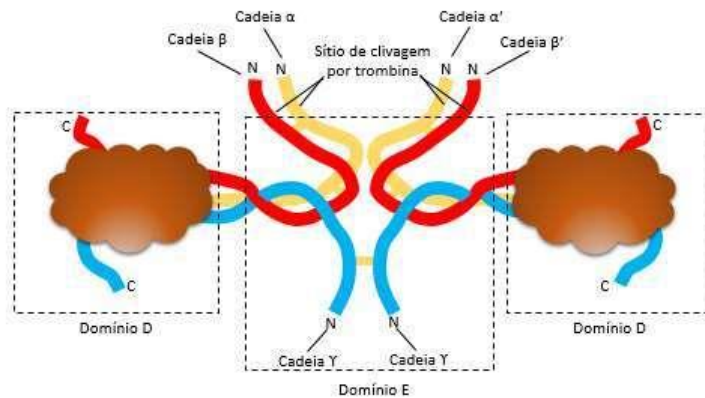
Os tratamentos não cirúrgicos consistem na imobilização do tendão calcâneo até a cicatrização, no entanto esse tipo de tratamento está associado a uma maior taxa de re-ruptura, cerca de 13% (HUTCHISON et al., 2015). No que refere ao tratamento cirúrgico, ocorre menos atrofia da panturrilha, além de melhor desempenho e uma taxa de re-ruptura menor. Um fator negativo relacionado ao tratamento cirúrgico está associado a um risco aumentado de provocar avarias superficiais na pele e problemas de ferimentos, que por sua vez podem se minimizados com aplicação de medicamentos superficiais, seguidos de reabilitação superficial (VOLPI, 2016).

3.2 Biopolímero de Fibrina Heterólogo

O selante de fibrina trata-se de um composto de fibrinogênio e trombina, usado primeiramente como hemostático em 1909 na Alemanha por Bergel, posteriormente em 1940 foi usado por Young e Medawar como adesivo associando fibrinogênio autólogo e trombina. Em 1972, Matras usou o fibrinogênio (Figura 2) concentrado como adesivo (BUCHAIM et al., 2019; SPOTNITZ, 2014). Por ser homeostático o

selante de fibrina tem a capacidade de coagular o sangue, também consegue atuar como barreiras de contenção impedindo o vazamento de líquidos de uma estrutura por ser selante, e considerado adesivo cirúrgico, já que consegue unir tecidos (SPOTNITZ, 2010).

Figura 2 - Estrutura do Fibrinogênio.



Fonte: TROVATTI *et al.*, 2016. Biopolímeros: aplicações farmacêutica e biomédica. **Eclética Química Journal**, vol. 41, 1-31, 2016.

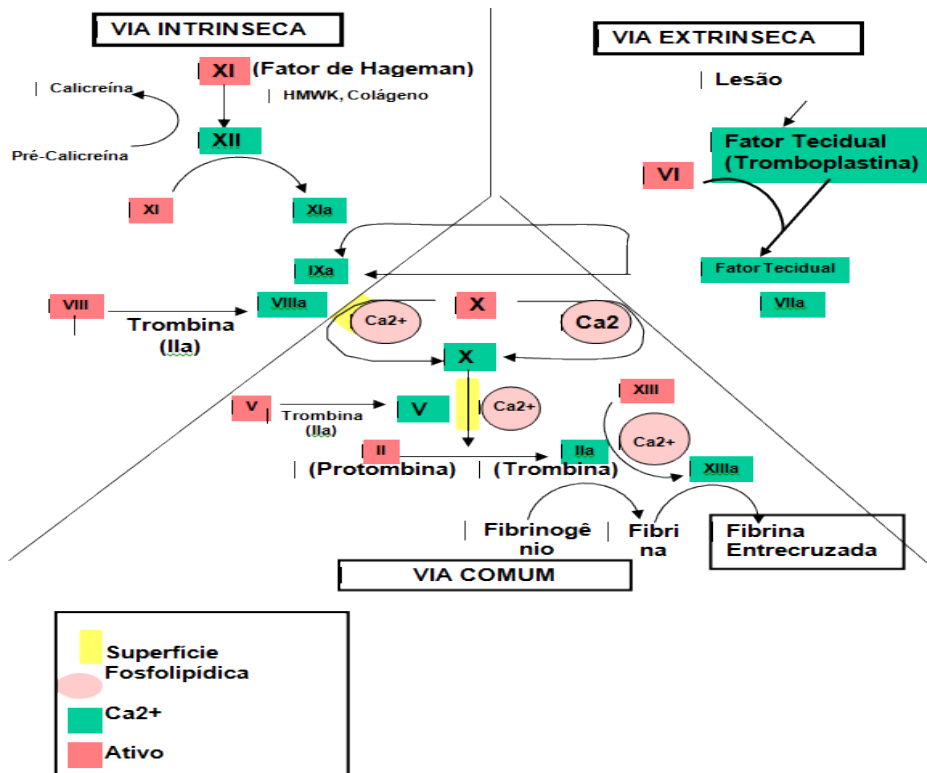
O uso do selante de fibrina mencionado até então, tem como composição uma mistura de fibrinogênio humano e trombina que era aplicada a qualquer área afetada. Em 1970, os princípios básicos para a extração dos componentes crioprecipitados ricos em fibrinogênio já eram conhecidos e comercializados, passando a ter como composição o crioprecipitado humano rico em fibrinogênio, trombina bovina e como diluente o cloreto de cálcio. No entanto, no fim da década de 1978 a agência federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos, o *Food and Drug Administration (FDA)*, responsável pela administração de alimentos e medicamentos suspendeu a comercialização do produto por conta da possibilidade de transmissão de doenças infectocontagiosas, isso devido ao composto fibrinogênio ser de origem humana (FERREIRA *et al.*, 2017). Entretanto, em 1998, duas formas de selantes foram novamente licenciadas no mercado americano. Assim, os selantes comerciais passam por um tratamento para inativar vírus e evitar transmissão de doenças, como a pasteurização, aquecimentos a vapor e solventes. Contudo, o uso de solventes pode não ser efetivo naqueles vírus que não possuam lipídio no seu envelope (SPOTNITZ, 2010).

O selante de fibrina é um biomaterial que mimetiza o final da cascata de coagulação, assim como todo biomaterial eles podem ser classificados em autólogo, obtidos do próprio doador. Este pode ser o mais indicado, pois não há risco de transmissão de doença. Porém, é inviável em cirurgias emergenciais, e a necessidade da autodoação alguns dias prévios ao seu uso pode aumentar a possibilidade de transfusão sanguínea no momento do procedimento operatório. Tal situação poderia ser solucionada utilizando o selante homólogo, ou seja, obtidos de indivíduos da mesma espécie do receptor. No entanto, este tipo de selante é extensivamente testado pela possibilidade de transmissão viral. Desta maneira, apesar de cuidados na inativação viral em sua produção, ainda permanece o risco de transmissão de doenças. Por fim, o selante de fibrina pode ser de origem heterólogo, obtidos de espécie diferente do receptor (LE NIHOJANNEN et al., 2006).

Diante do exposto e com o intuito de resolver o problema de transmissão de doenças observada nos selantes de fibrina autólogo e homólogo o Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP), pertencente à Universidade do Estado de São Paulo (UNESP) começaram os estudos para o desenvolvimento de um novo selante com diferentes elementos, mas ainda com a finalidade de acelerar o reparo tecidual (FERREIRA et al., 2017).

Este selante de fibrina heterólogo imita a etapa final da cascata de coagulação, devido a sua composição possuir uma enzima chamada serino protease, incluindo a gioxina semelhante à trombina (Figura 3), que pode ser extraída do veneno de serpente da espécie *Crotalus durissus terrificus*, essa enzima atua sobre a molécula do fibrinogênio que na presença do cálcio são transformadas em monômeros de fibrina, essa ação promove a formação de um coágulo estável e produz efeito selante, adesivo e homeostático. Além do mais, tem uma concentração rica de fibrinogênio em diferentes formas (fator VIII, fator de *Willebrand*, fator XIII e fibronectina) extraído do sangue de Búfalo *Bubalino Bubalus*. Ainda, é importante destacar que o criopreceptado extraído do sangue de búfalo apresenta os maiores níveis de fibrinogênio quando comparado aos de humanos, bovinos, ovinos e equinos, tornando o selante de fibrina heterólogo um produto muito mais seguro, além de ser também mais barato (BUCHAIM et al., 2019; FERREIRA, 2014; FERREIRA et al., 2017; GOGULANATHAN et al., 2015; SPOTNITZ, 2014).

Figura 3 - Estrutura da Trombina.



Fonte: <http://www.hepcentro.com.br/images/coag.gif>.

Sua vasta aplicação clínica deve-se basicamente às suas propriedades químicas, com destaque para sua capacidade de adesão, biodegradabilidade e biocompatibilidade. Considerando todas as propriedades descritas para este bioproduto, que vai além da capacidade adesiva, o nome “selante” foi reconsiderado e foi recentemente chamado "Biopolímero de fibrina" (BUCHAIM et al., 2019).

O primeiro estudo que utilizou o biopolímero de fibrina heterólogo (BFH), produzido pelo CEVAP, foi um experimento desenvolvido em laboratório por Luan et al., (1995). Os autores atestam a eficiência deste biopolímero no tratamento de nervos periféricos, contribuindo para sua melhor aderência e regeneração. Ainda, investigando os efeitos do BFH em nervos periféricos, Biscola et al. (2017), através de uma revisão de literatura, sobre as múltiplas utilizações do biopolímero de fibrina heterólogo no reparo do sistema nervoso demonstraram que ambos os biopolímeros foram excelentes para promover a coaptação dos nervos periféricos, assim promoveram a neuroproteção e regeneração de axônios motores e sensoriais. No entanto, os autores destacam que o biopolímero de fibrina heterólogo, do CEVAP,

tenha apresentado ser mais fácil de manusear no momento da cirurgia. Da mesma forma, Leite et al. (2019) em seus experimentos observaram que o BFH pode ser uma opção de tratamento na reconstrução nervosa, após lesão do nervo periférico. Uma vez que, demonstraram que o uso do biopolímero de fibrina heterólogo associado a sutura convencional promoveu o restabelecimento do impulso nervoso, além da regeneração axonal. Ainda, os autores sugerem que esta terapia pode reduzir o número de pontos de sutura, reduzindo assim trauma causado pela agulha do fio de sutura, que consequentemente pode acelerar a prática cirúrgica.

Os efeitos do biopolímero de fibrina heterólogo em lesões de pele também foram investigado. Rahal et al., (2004) realizaram enxerto de pele (4 x 4 cm) em cães. Então, os autores dividiram os enxertos em dois grupos: apenas suturados com muitos pontos de suturas e enxerto que receberam biopolímero de fibrina heterólogo em seu leito receptor e receberam apenas 8 pontos de suturas para fixar o enxerto. O enxerto que recebeu BFH mostrou características histológicas semelhantes ao enxerto suturado. No entanto, o reparo tecidual no segundo grupo, foi mais pronunciado, além de apresentar mais células e um maior número de fibras colágenas na camada papilar da derme. Seu uso também teve um importante efeito na redução do tempo de cirurgia, pois minimizou a uso de materiais de sutura, o que é uma vantagem especialmente para pacientes com alto risco cirúrgico.

Menezes et al., (2015) avaliaram o reparo de defeitos cranianos, após aplicação de enxerto e adição com biopolímero de fibrina heterólogo e hidroxiapatita em ratos. Assim os animais foram divididos em quatro grupos, o primeiro sem enxerto, o segundo tratado com hidroxiapatita, o terceiro com BFH e um quarto grupo associando hidroxiapatita e BFH. O resultado demonstrou que o biopolímero de fibrina heterólogo é biocompatível com o tecido ósseo, pois não foi observada inflamação e houve uma integração entre o tecido vivo e o implante, já que o biopolímero é formado por uma rede de fibrilas interpostas e porosas.

O potencial osteogênico do biopolímero de fibrina heterólogo é destacado no tratamento de defeitos ósseos. Cassaro et al., (2019) avaliaram o potencial de reparo do fosfato de cálcio em conjunto com o biopolímero de fibrina associado ou não às células tronco mesenquimais em ratos submetidos a defeito ósseo femoral. Todos os animais foram submetidos a um defeito ósseo de 5 mm no femur. Em seguida, foram divididos em cinco grupos aleatorizados, grupo controle, grupo fosfato

de cálcio biofásico, grupo biopolímero de fibrina + fosfato de cálcio biofásico, grupo biopolímero de fibrina + células tronco mesenquimais e grupo biopolímero de fibrina + fosfato de cálcio biofásico + células tronco mesenquimais. Após 30 e 60 dias, os animais foram submetidos a tomografia computadorizada e após serem eutanasiados foi realizada uma análise por microscopia eletrônica de varredura e análise histológica. Os autores, concluíram que o biopolímero de fibrina é um excelente candidato para arcabouços em terapia de reparo ósseo, por ser de fácil aplicação, biocompatibilidade, biodegradabilidade e possuir propriedades bioativas.

Pesquisando sobre o tratamento de defeitos ósseos, De Oliveira et al., (2020), avaliaram o efeito do biopolímero de fibrina associada com enxerto ósseo em tibiás de ratos. Em seu estudo os animais foram divididos em 4 grupos com 10 animais em cada grupo e em cada animal foi realizado um defeito ósseo de 2 mm no terço proximal da tibia. Os grupos foram distribuídos como grupo controle, animais tratados com biopolímero de fibrina, tratados com enxerto autólogo e tratados com biopolímero de fibrina e enxerto autólogo. Após análise macroscópica, tomografia computadorizada e densitometria mineral óssea, concluiu-se que o uso do biopolímero de fibrina heterólogo estimulou o crescimento ósseo, aumentou a densidade óssea e o conteúdo mineral, além da boa interação com o enxerto ósseo autólogo.

Foi sugerido o uso do biopolímero de fibrina heterólogo como arcabouço para células troncos. Em um estudo *in vitro*, demonstrou-se que este biopolímero é capaz de manter a viabilidade celular sem interferir na sua diferenciação (GASPAROTTO et al., 2014). Então, em um estudo *in vivo*, Orsi et al., (2017) avaliaram o desempenho do biopolímero de fibrina heterólogo como um arcabouço, ou seja, para carrear células-tronco mesenquimais em defeitos críticos de fêmur de ratas osteoporóticas. Nesse estudo, os resultados demonstraram que os defeitos ósseos que receberam o arcabouço de biopolímero de fibrina heterólogo com células apresentaram maior formação óssea no local, quando comparado ao controle. Sugerindo que o biopolímero de fibrina heterólogo serviu de suporte e carreador as células até o local da lesão.

O biopolímero de fibrina heterólogo também teve seu efeito pesquisado no tratamento de lesão tendínea, sendo utilizado apenas o selante ou associado a células tronco. Dois estudos publicados no mesmo ano, ambos de Ferraro et al.,

(2005)a e Ferraro et al., (2005)b, avaliaram o efeito do biopolímero de fibrina heterólogo no tendão de cães. O primeiro avaliou a força do tecido reparado tendíneo e o segundo estudo verificou a sua capacidade de promover reparo. Em ambos os estudos os animais foram divididos em três grupos avaliados após 7, 15 e 30 dias. No que se refere a força de do tecido tendíneo neoformado as propriedades biomecânicas avaliadas foram, limites de elasticidade, carga máxima, rigidez e resiliência. O resultado demonstrou que o biopolímero impediu a formação excessiva de aderência e permitiu um aumento progressivo da resistência para obtenção de força máxima e tração e deformações permanentes. No segundo estudo foi detectado que o uso do biopolímero modula a inflamação após 7 dias, facilitando os estágios de maturação do processo de reparo do tendão.

Frauz et al., (2019) investigaram o biopolímero de fibrina heterólogo no tratamento de tendão lesionado parcialmente associado, ou não, a células tronco. Os autores observaram que o biopolímero de fibrina heterólogo é uma boa opção de uso como arcabouço no tratamento de lesão tendínea, pois foi mais eficiente em promover o reparo tecidual, seguindo pelo arcabouço de biopolímero associado a células tronco. Assim, os autores sugerem que mais pesquisas são necessárias para investigar se esta organização tecidual encontrada no arcabouço de biopolímero de fibrina heterólogo irá melhorar a biomacânica dos tendões em longo prazo.

Conforme exposto acima, foram realizadas experiências em diferentes tecidos e animais. Assim, o biopolímero de fibrina heterólogo vem sendo amplamente pesquisado em diversas áreas e demonstrando bons resultados (SARTORI FILHO *et al.*, 1998; LEITE *et al.*, 2000; CHALHOUB *et al.*, 2000; RAHAL *et al.*, 2004; de BARROS, *et al.*, 2016; FLORIANO *et al.*, 2016; ORSI *et al.*, 2017; SPEJO *et al.*, 2018).

Além da aplicação em modelos animais, ensaios clínicos utilizando o biopolímero de fibrina heterólogo foram iniciados em 1999. A primeira aplicação do biopolímero de fibrina heterólogo em humanos comparou sua efetividade com a sutura convencional na região nasolabial. O enxerto de pele da prega nasolabial direita foi realizado utilizando biopolímero de fibrina heterólogo, enquanto que a dobra nasolabial esquerda foi suturada. A avaliação comparativa de ambas as áreas no mesmo paciente mostrou eritema e edemas nas áreas suturadas, enquanto deiscência e exsudação foram observadas nas áreas que receberam o selante 48

horas após a cirurgia. A avaliação estética da formação de cicatriz foi excelente para a área que recebeu selante e bom para a área suturada. Assim, os autores demonstraram, a capacidade adesiva e de reparação deste biopolímero (STOLF *et al.*, 1999).

Ensaio clínico realizado por Gatti, (2009) utilizou o biopolímero de fibrina heterólogo, pela primeira vez, para tratar úlceras venosas crônicas. Os pesquisadores avaliaram o processo de reparo cutâneo e concluíram que a aplicação de biopolímero de fibrina heterólogo pode contribuir para o processo de reparo de feridas. Em, Abbade *et al.*, (2015), utilizaram o biopolímero de fibrina heterólogo em uma fase de ensaio clínico I / II, tratando 31 pacientes com feridas venosas. Eles concluíram que o biopolímero era seguro para o tratamento de feridas venosas crônicas.

O biopolímero de fibrina heterólogo também tem sido utilizado na área odontológica. Barbosa; Gregh; Passanezi, (2007) estudaram 15 pacientes não fumantes que precisavam enxertos gengivais bilaterais ao redor da área mandibular. Eles concluíram que o biopolímero é uma alternativa ao adesivo de fibrina tradicional e pode representar uma alternativa às suturas em cirurgia periodontal. Além disso, Chiquito (2007) comparou o biopolímero de fibrina heterólogo e sutura convencional em defeitos gengivais. Os achados demonstraram que o biopolímero é tão eficiente quanto o tratamento tradicional.

Diante do exposto, o biopolímero de fibrina heterólogo apresenta uma ampla aplicabilidade na prática médica (BARROS *et al.*, 2009), odontologia (BUCHAIM *et al.*, 2016), medicina veterinária (DE BARROS *et al.*, 2016; DE OLIVEIRA *et al.*, 2020; DE OLIVEIRA ROSSO *et al.*, 2020). Além disso, o biopolímero de fibrina heterólogo apresenta várias vantagens tais como: não apresentar risco de transmissão viral, processo de produção rápido; embora não esteja sendo comercializado ainda, devido a matéria prima, apresenta baixo custo em relação biomaterial comercializado (Tissucol Tissel Duo - 2ml), que é vendido por R\$ 657,84; potencial para agir como biomateriais e/ou um arcabouço para células e/ou como um novo sistema de entrega de medicamento (FERREIRA *et al.*, 2017; GASPAROTTO *et al.*, 2014). Esses resultados evidenciam o potencial uso do biopolímero de fibrina heterólogo no tratamento de diversas condições, especialmente no que se refere, no seu potencial para promover o reparo tecidual.

3.3 Terapia por Fotobiomodulação

O físico Theodore Maiman criou o primeiro laser em 1960, e três anos depois o médico Leon Goldman foi o primeiro a usar em lesões de pele. Então, em 1964 Endre Mester professor e presidente do 2º Departamento Cirúrgico da Faculdade de Medicina de Budapeste na Hungria, hoje conhecido como o pai da fotobiomodulação, se interessou na aplicação clínica para tratamento do melanoma. No entanto, o tratamento com a utilização do laser de rubi, realizado por Mester em um paciente com melanoma, já em estado avançado, não obteve bons resultados. A partir daí, Mester passou a investigar os efeitos colaterais do laser de baixa potência, quando aplicados na pele, comprovando que não há relação entre a aplicação do laser e efeito carcinogênico. Mester também foi o primeiro a documentar os efeitos estimulantes e inibitórios do laser. Ele realizou a aplicação repetida de laser de rubi com baixa potência na pele depilada de rato. Surpreendentemente, o pelo do animal começou a crescer mais rápido na área irradiada da pele em comparação com a pele não irradiada. No entanto, quando a irradiação com laser foi aplicada na pele, com uma potência mais elevada, o pelo não cresceu mais, em contrapartida na área não irradiada foi observado o crescimento normal do pelo (DE FREITAS; HAMBLIN, 2016; MESTER; MESTER, 2017).

O termo Laser é um acrônimo para Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation e tem como significado Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação. A luz Laser apresenta características especiais que as diferenciam de outras fontes luminosas e que estão relacionadas ao processo de sua produção, ou seja, emissão estimulada de radiação, tais como coerência e colimação (DE MATTOS et al., 2014). O laser apresenta seus fótons organizados e assim emitem apenas um comprimento de onda, permitindo que haja coerência, ou seja, os fótons que emanam dele têm a mesma amplitude e frequência. Além disso, o laser possui colimação, sendo assim a divergência de luz é insignificante e seus feixes são paralelos e seguem em uma única direção. Com relação à potência os lasers se dividem em alta intensidade que são os lasers cirúrgicos e tem a característica de produzir efeitos térmicos diante dos tecidos, realizando cortes precisos. Os lasers de baixa potência, também conhecidos como lasers terapêuticos, não produzem aumento

de temperatura e atuam em vários mecanismos de ação (BRICEÑO CASTELLANOS; GAVIRIA BEITIA; CARRANZA RODRÍGUEZ, 2016).

Desde a década de 60 o laser tem sido amplamente estudado e diversas nomenclaturas são utilizadas para se referir ao uso terapêutico do laser, sendo LLLT do inglês low level laser therapy a mais utilizada. No entanto, outras fontes de luz com objetivos terapêuticos semelhantes ao laser foram descobertas e exploradas, como o LED (Light-emitting diode). O LED diferentemente do laser não produz uma luz coerente e colimada devido a uma diferença de cavidade de ressonância por onde são irradiados os fótons que formam o feixe de luz. Assim, diversos estudos constataram que a coerência do laser não é o parâmetro de maior relevância, já que o LED, uma luz não coerente também tem demonstrado efeitos positivos no tratamento dos tecidos. Sendo assim houve uma alteração na terminologia, que a partir de 2016 seria adotado o termo terapia por fotobiomodulação (TFBM), e não mais LLLT que era utilizado na grande maioria das citações. A padronização deste termo busca reduzir e eventualmente eliminar a confusão no campo literário científico e leigo. Isso garante um sistema unificado e gera maior credibilidade e solidez ao mostrar as aplicações clínicas que a TFBM pode oferecer para as mais variadas áreas da medicina (DE FREITAS; HAMBLIN, 2016; HASLERUD et al., 2017a).

Com relação aos mecanismos de ação, estudos apontam que a fotobiomodulação pode tanto estimular como também inibir processos celulares, sendo necessário o conhecimento dos parâmetros (DE FREITAS; HAMBLIN, 2016; ENWEMEKA, 2011). De acordo com Karu, (1999) a energia emitida pelo laser, quando alcança a mitocôndria reage com o Citocromo c Oxidase (CcO) que estimulam o transporte de elétrons na mitocondrial iniciando uma série de reações citoplasmáticas ou de membrana celular (AVCI *et al.*, 2013; HEISKANEN; HAMBLIN, 2018), que levam a alterações no potencial da membrana, consumo de O₂ e síntese de DNA e RNA (PRINDEZE *et al.*, 2012). Essas alterações moleculares aceleram o processo de diferenciação e proliferação celular (GUPTA *et al.*, 2014), aumenta a proliferação de fibroblastos aumentando assim a síntese de colágeno (ENWEMEKA et al., 2004) e aumentam a síntese de proteínas (VLADIMIROV; OSIPOV; KLEBANOV, 2004), levando aos principais efeitos terapêuticos da TFBM: analgésico, modulador de processos inflamatórios e reparo tecidual (KARU;

KOLYAKOV, 2005; DE FREITAS; HAMBLIN, 2016). A TFBM também está relacionada a redução do edema, através da estimulação do sistema linfático.

A fotobiomodulação vem sendo amplamente utilizada demonstrado ser capaz de estimular o reparo de feridas cutâneas em pés diabéticos (FEITOSA et al., 2015), agem de forma eficiente no controle da dor (LIMA et al., 2016), promove deposição de colágeno na fase inicial de reparo tendíneo (NATERSTAD et al., 2018) e modular o processo inflamatório acelerando o processo de consolidação óssea (TIM et al., 2016b). Assim, a aplicação da TFBM tem sido amplamente estudada, a fim de otimizar o processo de reparo do tendão do calcâneo, pois é um tratamento terapêutico muito promissor por modular processos inflamatórios.

Da Ré Guerra et al., (2016) investigaram os efeitos da TFBM na modulação do processo inflamatório em ratos submetidos à indução de tendinite por collagenase. Os resultados apontaram uma redução significativa na citosina pró-inflamatória IL-1 β no quarto dia após a lesão. Da mesma forma, De Jesus et al., (2014) mostraram que a TFBM diminuiu o processo inflamatório ao reduzir a produção da citosina IL-1 β ao usar o comprimento de onda com infravermelho próximo (780 nm) e potência de 70 mW para o tratamento de lesão parcial no tendão calcâneo. Ainda, Xavier et al., (2010) concluíram que a TFBM foi capaz de reduzir os sinais de inflamação, como a redução do número de células inflamatórias e diminuição da expressão de citocinas pró-inflamatórias, principalmente IL-1 β .

Lucke et al., (2019) por sua vez investigaram se os efeitos da combinação de células tronco e da TFBM, no processo de reparo tendíneo e concluiu que o grupo TFBM foi o mais eficaz na reorganização do colágeno, seguido por sua combinação com células tronco.

Por todos esses motivos a fotobiomodulação vem sendo amplamente utilizada em estudos sobre o reparo de lesões tendíneas (ALLAHVERDI et al., 2015; CORRIGAN; CORTES; GRÄVARE SILBERNAGEL, 2019; DE CARVALHO et al., 2016; DE OLIVEIRA et al., 2019; GOMES et al., 2017; HASLERUD et al., 2017b; LUCKE et al., 2019b; MARQUES et al., 2016; NATERSTAD et al., 2018; SCHERER et al., 2019; CHANG et al., 2015).

Conforme exposto acima, a TFBM é um recurso terapêutico não invasivo promissor no tratamento de lesão tendínea. Sua associação ao biopolímero de fibrina heterólogo também tem sido investigado. O biopolímero de fibrina heterólogo

já foi associado à fotobiomodulação para estimulação do reparo morfofuncional do nervo facial (ROSSO et al., 2017) e durante a reconstrução de lesões em ossos longos (DE OLIVEIRA GONÇALVES et al., 2016; DE OLIVEIRA ROSSO et al., 2020). Os autores demonstraram o grande potencial da associação do biopolímero de fibrina heterólogo e fotobiomodulação para auxiliar no processo de reparo do nervo periférico assim como na reconstrução óssea.

Conforme exposto acima, a TFBM e o biopolímero de fibrina heterólogo apresenta um alto potencial reparativo, no entanto, ainda não sabemos quais são os mecanismos de ação e as interações biológicas que ocorrem durante a associação da TFBM e do biopolímero de fibrina heterólogo no tecido tendíneo uma vez que não se tem conhecimento de estudos utilizando esta associação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados 84 *Rattus norvegicus*, fêmeas, pertencentes à linhagem Wistar, obtidas no biotério do Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia e Biodiversidade, da Universidade Estadual do Piauí (UESPI) Teresina – Piauí, esse número de animais foi baseado em cálculo amostral com dados da literatura. Com cerca de 60 dias de idade e peso $202,8 \pm 27,2$ g e então submetidos cirurgicamente à secção transversal parcial do tendão calcâneo direito. Os animais foram mantidos em fotoperíodo claro/escuro de 12 horas, com temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$, com livre acesso a água e ração. Foi feita a ambientação de todos os animais junto ao pesquisador e ao ambiente onde iria ser realizada o experimento. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do do Piauí - UESPI (0326/2019).

Os 84 animais foram separados aleatoriamente em 04 (quatro) grupos experimentais, Contendo 21 animais em cada grupo:

Controle (GC): animais foram submetidos a transecção parcial no tendão calcâneo direito e não receberam nenhum tratamento;

Biopolímero de fibrina heterólogo (BFH): animais foram submetidos a transecção parcial no tendão calcâneo direito e receberam tratamento com biopolímero de fibrina heterólogo;

Fotobiomodulação (FBM) animais foram submetidos a transecção parcial no tendão calcâneo direito e receberam tratamento com a fotobiomodulação a laser;

Biopolímero de fibrina heterólogo + Fotobiomodulação (BFH + FBM) animais foram submetidos a transecção parcial no tendão calcâneo direito e receberam tratamento com biopolímero de fibrina heterólogo associado a fotobiomodulação a laser.

Os grupos foram subdividido em 3 períodos experimentais: 7, 14 e 21 dias.

4.2 Transecção do tendão calcâneo

Para o procedimento cirúrgico os animais foram previamente anestesiados com injeção intraperitoneal de cloridrato de ketamina 80 mg/kg e cloridrato de xilazina a 10 mg/kg, ambas da marca Ceva. Então, foi realizada a tricotomia e assepsia com álcool 70 % na pata inferior direita de cada animal. Em seguida, uma incisão longitudinal de aproximadamente 3-5 mm foi realizada na pele do animal, para exposição do tendão calcâneo (CASALECHI et al., 2009). Logo após, com microscópio cirúrgico foi realizada uma transecção parcial no tendão (DIETRICH, 2012). Imediatamente após a indução da lesão tendínea, nos animais dos grupos BFH e BFH + FBM, foi realizada a aplicação de 9 µL de biopolímero de fibrina heterólogo. Em seguida os animais foram suturados e alocados em suas gaiolas e levados de volta ao biotério.

O composto de Biopolímero de Fibrina foi fornecido pelo Centro de Estudos de Venenos em Animais Peçonhentos – CEVAP, da Universidade Estadual de São Paulo – UNESP, Campus de Botucatu. O material é disponibilizado em três micro tubos (Figura 4). Para a aplicação do biopolímero, utilizou-se duas seringas de 1 mL, misturando as frações, (300 µL de crioprecipitado em uma das seringas e 250 µL de cloreto de cálcio e 50 µL de fração semelhante à trombina na outra seringa).

Figura 4 - Biopolímero de Fibrina Heterólogo: fibrinogênio, trombina e cloreto de cálcio.



Fonte: (BUCHAIM et al., 2019)

4.3 Protocolo de Terapia por Fotobiomodulação

A Fotobiomodulação aplicada nos grupos FBM e BFH + FBM foi realizada com o equipamento Laser (InGaAlP), MMOptics™. O dispositivo foi calibrado adequadamente pelo fornecedor. As aplicações da TFBM a laser foram realizadas da seguinte forma: 24 horas após o procedimento cirúrgico e a cada 24 horas, totalizando 7, 14 ou 21 aplicações com a caneta do laser foi posicionada a 90 graus sobre o tendão e foi utilizada a técnica pontual com contato, seguindo os parâmetros da tabela 1 (DE SOUZA et al., 2015; SANTOS et al., 2018).

Tabela 1 - Parâmetros dos instrumentos usados para a Fotobiomodulação.

Parâmetros	
Comprimento de onda (nm)	660
Densidade de Energia (J/cm ²)	6
Energia (J)	0,23
Potência (W)	0,04
Área transversa (cm ²)	0,04
Tempo de irradiação (s)	6
Densidade de potência (W/cm ²)	1,05
Tempo de tratamento por ponto (s)	6
Número de pontos	1
Frequência tratamento	24 horas
Número total de sessões	7, 14 ou 21 dias

Autor: SANTOS, J. et al. Effects of low-power light therapy on the tissue repair process of chronic wounds in diabetic feet. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 36, n. 6, p. 298-304, 2018.

4.4 Análises do Edema

4.5 Coleta das Amostras

Após cada período experimental, 7, 14 e 21 dias, os animais foram eutanasiados por sobredose de anestesia ketamina (CEVA) (240 mg/Kg) e xilazina (XILAZIN 2%) (CEVA) (30 mg/kg), para posterior dissecação do tendão calcâneo. As amostras de tendão foram lavadas de 3 a 4 vezes em solução salina. Após a limpeza, foi feita a remoção de qualquer tipo de tecido periférico e demais artefatos visíveis.

Após a coleta, as peças permaneceram em soluções de formaldeídos a 10% para a fixação durante 24 horas. Em seguida elas foram lavadas em água corrente por 24 horas. Na sequência, passaram por desidratação em solução crescente de álcool etílico a 70 %, 90 % e 100 %. Após os banhos de desidratação, foi iniciada a diafanização das peças em solução de álcool/xilol (1:1) e, a seguir, em 2 banhos de xilol puro. Em seguida, as peças foram incluídas em parafina e cortadas por meio de um micrótomo rotativo, Spencer – 820 com cortes seriados com 5 µm de espessura. Os cortes foram realizados no plano longitudinal. Dos cortes obtidos, foram confeccionadas lâminas coradas com Hematoxilina-Eosina (HE) para realização da análise histopatológica; tricrômio de masson para quantificar fibras colágenas.

4.6 Análises histopatológica

A análise histopatológica da região da transecção parcial no tendão calcâneo foi realizada através das lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina. Por meio de um microscópio de luz (Olympus, Optical Co. Ltd, Tokyo, Japan) 100X. As lâminas foram avaliadas por um patologista quanto às seguintes alterações: presença de fibroblastos, processo inflamatório, tecido fibrinóide, organização da matriz extracelular (MEC) e a vascularização.

Ainda, as lâminas foram classificadas de acordo com o escore de Bonar, adaptando as recomendações de Fearon et al., (2014). Assim, foram avaliados os parâmetros: arranjo das fibras colágenas, morfologia celular, celularidade, vascularização e acúmulo de matriz extracelular. Cada parâmetro foi classificado em

uma escala de 4 pontos (de 0 a 3), sendo: 0 = normal; 1 = ligeiramente anormal; 2 = anormal; e 3 = marcadamente anormal. A classificação da alteração tecidual do tendão calcâneo de cada animal foi considerada como a somatória dos escores de cada uma das quatro categorias avaliadas. Consequentemente, o maior valor possível do escore é 12 (doze) para um tendão com alterações patológicas máximas.

4.7 Quantificação de vasos sanguíneos

A quantificação de vasos sanguíneos da região da transecção tendínea foi realizada através das lâminas coradas com hematoxilina-eosina. Foram fotografados doze campos distintos da lesão, por meio de um microscópio óptico (Olympus, Optical Co. Ltd, Tokyo, Japan) com uma câmera digital acoplada (Sony DSCs75, Tokyo, Japão) em um aumento de (100x).

As imagens foram analisadas no software Image J, no qual foram considerados todos os vasos sanguíneos. A quantificação foi realizada por dois avaliadores e os resultados foram comparados e foi obtida a média de vasos sanguíneos.

4.8 Quantificação de colágeno

A quantificação de colágeno foi realizada através das lâminas coradas com Tricrômio de Masson. Para isso, a região da transecção tendínea foi fotografada em 6 campos distintos, por meio de um microscópio óptico (Olympus, Optical Co. Ltd, Tokyo, Japan). As imagens foram obtidas em um aumento de 100 x com uma câmera digital acoplada ao microscópio (Sony DSCs75, Tokyo, Japão).

A análise foi adaptada de Quinn et al., (2015). Primeiramente, as imagens foram carregadas no software Matlab e separada em seus três canais de cor (Vermelho - R, Verde - G e Azul - B). A razão entre os canais Azul e Vermelho (B/R) e Verde e Vermelho (G/R) foram computadas. Foram geradas duas máscaras a partir do limiar de 15 % da maior intensidade observada no canal Azul. As duas máscaras foram então combinadas utilizando-se lógica AND, assim a região branca representa áreas de colágeno em preto o fundo.

Em seguida, o número de pixels brancos em cada imagem foi usado para calcular a porcentagem da área da imagem que correspondia ao colágeno. O número de pixels foi determinado e expresso em porcentagem total de colágeno.

4.9 Análises Estatísticas

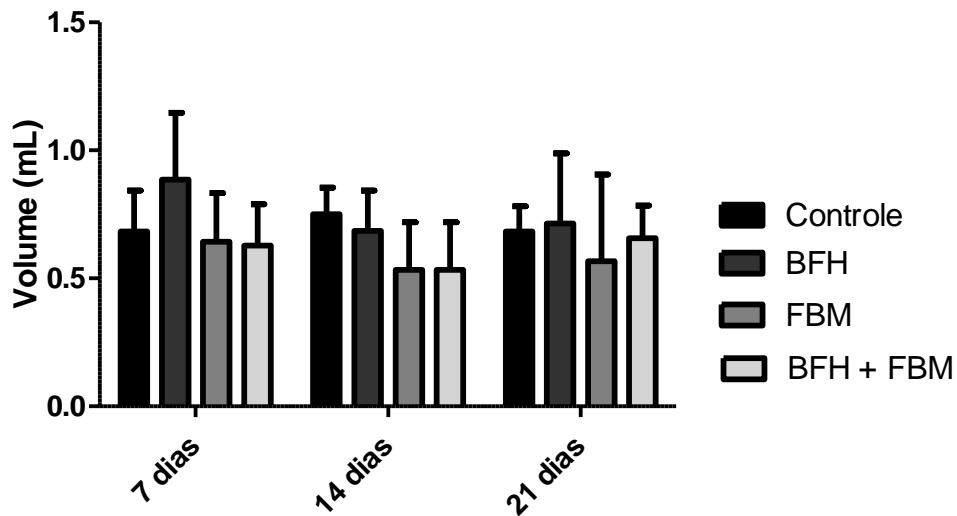
Os resultados estão descritos em valores de médias e desvio padrão e apresentados em tabelas e gráficos. A normalidade dos dados foi testada com o teste de KS e a Homogeneidade com o teste de Levene. Para a variável de edema Inicial foi testada a diferença entre os grupos com o teste de One-Way ANOVA com pos hoc de Tukey, com o intuito de comprovar a igualdade entre eles. Para a comparação entre os grupos e o tempo e verificar se houve interação entre o grupo e tempo, às demais variáveis foram testadas com Anova Two way e pós hoc de Bonferroni. Para a diferença estatística foi adotado um valor de significância de 5%. A análise estatística foi realizada com auxílio do programa SPSS 26 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 Volume de edema

Os resultados da análise de edema estão demonstrados nas Figuras 6 e 7. A análise estatística evidencia que não houve diferença nos valores de edema após 24 horas para todos os grupos submetidos à indução da lesão.

Figura 6 - Volume de edema 24 horas após a transecção parcial do tendão nos subgrupos de 7, 14 e 21 dias.

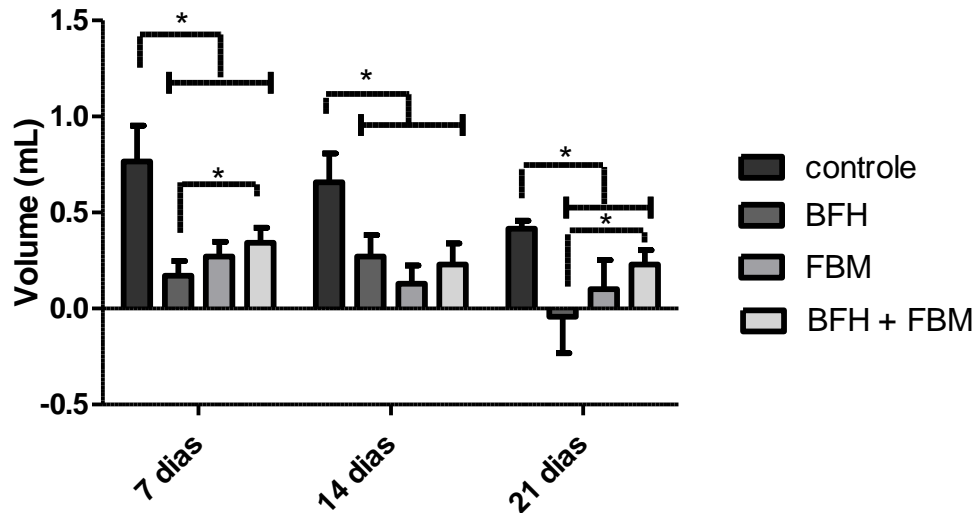


Legenda: Controle = sem tratamento; BFH = biopolímero de fibrina heterólogo; FBM = fotobiomodulação; BFH + FBM = biopolímero de fibrina heterólogo associado a fotobiomodulação. Fonte: autor.

A análise de volume de edema, após os períodos experimentais, ou seja o volume final de edema após 7, 14 e 21 dias, apontou que ocorreu a interação entre os tratamentos e os períodos experimentais ($p=0,003$), assim como também houve diferença entre os tratamentos ($p<0,001$) e os períodos experimentais ($p<0,001$) (Figura 7). Pode-se observar que o grupo controle apresentou maior volume de edema que os demais grupos, nos três períodos avaliados (7, 14 e 21 dias). Ademais, a análise estatística revelou que o grupo BFH + FBM exibiu maior volume de edema comparado ao grupo BFH após 21 dias (Figura 7).

Quando avaliamos os diferentes períodos, foi observado uma diferença significativa nos grupos GC e BFH, ou seja, o volume de edema no 7º e 14º dia estavam maiores quando comparados ao período de 21 dias. Para o grupo FBM, é possível verificar que ocorreu uma diminuição significativa de edema apenas quando comparado os períodos 7 e 21 dias. No grupo BFH + FBM não foi observado diferenças estatísticas quando avaliado os diferentes períodos experimentais (Tabela 3).

Figura 7 - Avaliação do volume de edema após 7, 14 e 21 dias.



Legenda: Controle = sem tratamento; BFH = biopolímero de fibrina heterólogo; FBM = fotobiomodulação; BFH + FBM = biopolímero de fibrina heterólogo associado a fotobiomodulação. Fonte: autor.

Tabela 2 - Análise intragrupo do volume de edema.

Grupos	7 dias (ml)	14 dias (ml)	21 dias (ml)
Controle	0,70 ± 0,24 ^a	0,65 ± 0,15 ^a	0,41 ± 0,04
BFH	0,17 ± 0,07 ^a	0,27 ± 0,11 ^a	-0,04 ± 0,19
FBM	0,27 ± 0,07 ^a	0,12 ± 0,09	0,10 ± 0,15
BFH + FBM	0,34 ± 0,07	0,22 ± 0,11	0,22 ± 0,07

^a vs 21 dias. Controle = sem tratamento; BFH = biopolímero de fibrina heterólogo; FBM = fotobiomodulação; BFH + FBM = biopolímero de fibrina heterólogo associado a fotobiomodulação. Média ± desvio padrão. Fonte: autor.

5.2 Análise Histopatológica

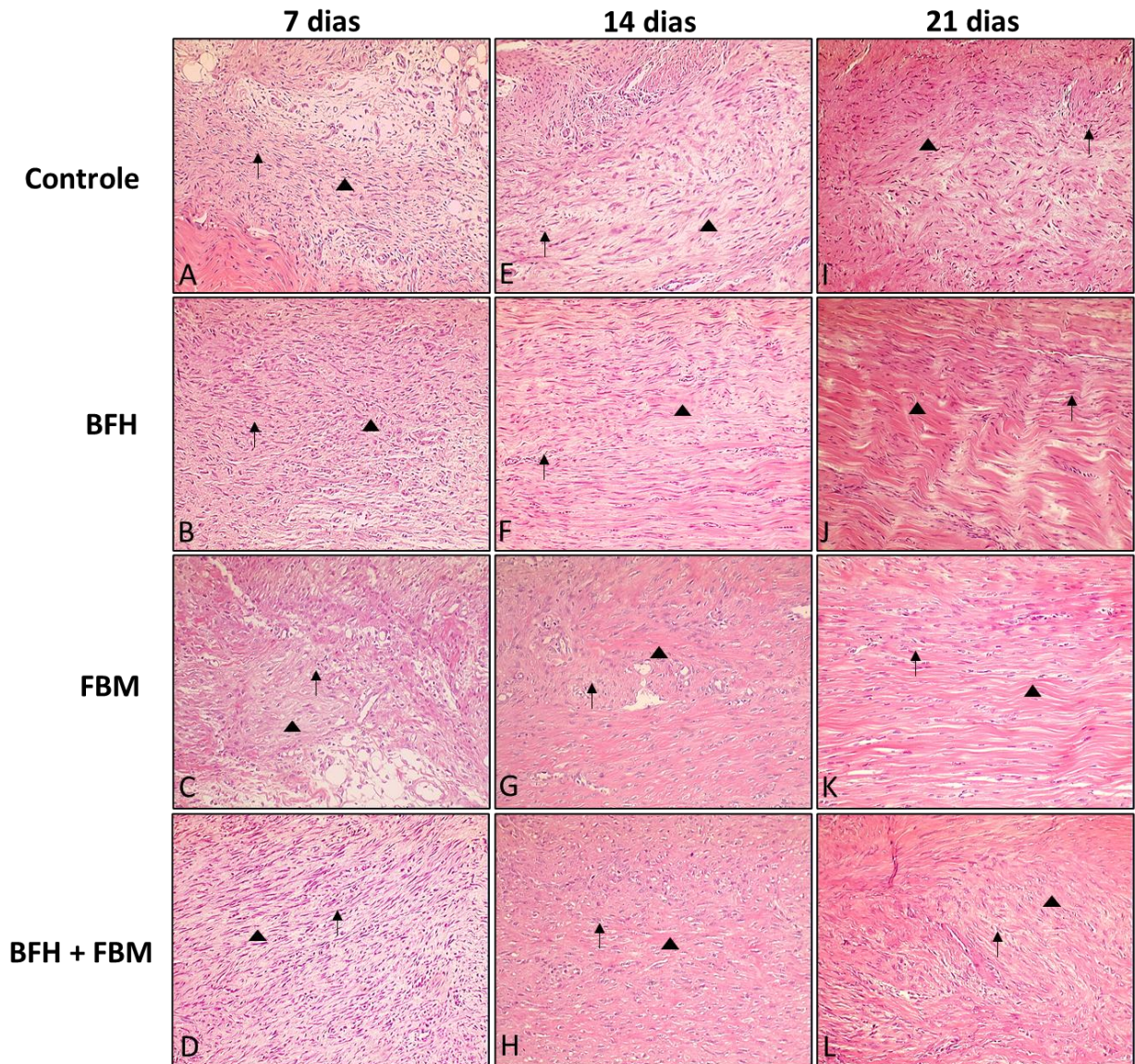
Os achados histopatológicos demonstraram que após 7 dias o grupo controle apresentou uma matriz extracelular (MEC) edemaciada, contendo poucos vasos sanguíneos neoformados e moderado infiltrado inflamatório, composto predominantemente por macrófagos. Os fibroblastos se agruparam em feixes dispostos aleatoriamente em diferentes orientações (Fig. 8A). No grupo BFH também observou a MEC edemaciada com leve presença de células inflamatórias e com fibroblastos dispostos em feixes pouco organizados e poucos vasos sanguíneos neoformados (Fig. 8B). O grupo FBM apresentou MEC edemaciada com muitos

vasos sanguíneos neoformado e intensa presença de células inflamatórias e fibroblastos dispostos aleatoriamente (Fig. 8C). O grupo BFH + FBM demonstrou a MEC edemaciada com poucos vasos sanguíneos neoformados, células inflamatórias e fibroblastos dispostos em feixes paralelos ao grande eixo do tendão (Fig. 8D).

Após 14 dias da transecção parcial do tendão, o grupo controle apresentou uma redução acentuada da atividade inflamatória, alguns vasos sanguíneos neoformados e poucos fibroblastos estavam dispostos em feixes pouco organizados em uma MEC ainda frouxa e pouco edemaciada (Fig. 8E). O grupo BFH revelou MEC mais densa com vasos sanguíneos neoformados, ausência de células inflamatórias e intensa presença de fibroblastos organizados em feixes paralelos ao grande eixo do tendão (Fig. 8F). Da mesma forma, o grupo FBM apresentou MEC mais densa e com numerosos vasos sanguíneos neoformados e fibroblastos dispostos em feixes paralelos (Fig. 8G). Ainda, o grupo BFH + FBM demonstrou uma MEC densa com vasos sanguíneos neoformados e proliferação intensa de fibroblastos, dispostos em feixes paralelos ao grande eixo do tendão (Fig. 8H).

Após 21 dias de tratamento não observou a recuperação integral da estrutura histológica do tendão calcâneo. No grupo controle, numerosos fibroblastos ainda se encontraram dispostos em feixes com diferentes orientações e a MEC exibiu áreas de edema (Fig. 8I). Diferentemente, o grupo BFH revelou MEC densa com proliferação fibroblástica com melhor organização quando comparado ao GC (Fig. 8J). Da mesma forma, o grupo FBM exibiu a MEC densa com os fibroblastos dispostos em grupos paralelos e compactos (Fig. 8K). Ainda, no grupo BFH + FBM, a MEC densa apresentava presença de fibroblastos organizados em feixes paralelos (Fig. 8L).

Figura 8 - Achados histológicos.



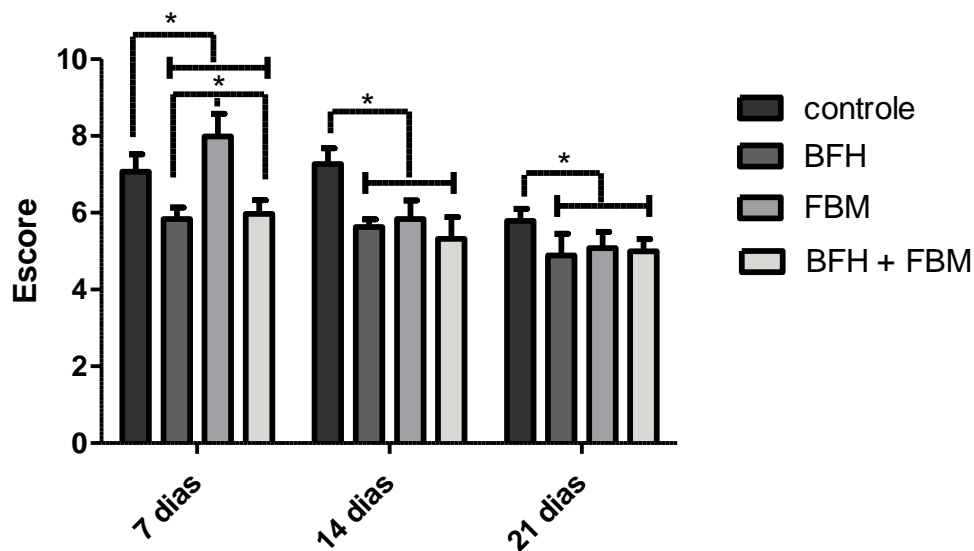
Legenda: matriz extracelular; (↑) tenócitos. Controle = sem tratamento; BFH = biopolímero de fibrina heterólogo; FBM = fotobiomodulação; BFH + FBM = biopolímero de fibrina heterólogo associado a fotobiomodulação. H.E., 100x.

De acordo com o exposto acima, quando aplicado o escore de Bonar observamos que ocorreu a interação entre os tratamentos e os períodos experimentais ($p < 0,0001$). Além disso, foi evidenciado que houve efeito dos tratamentos ($p < 0,0001$) e dos períodos experimentais ($p < 0,0001$). Vale ressaltar que quanto maior a pontuação atribuída no escore de Bonar sugere uma maior lesão. No 7º dia observou-se diferença estatística entre o grupo controle com todos os grupos tratados. Também foi possível observar que o FBM demonstrou maior escore quando comparado aos grupos BFH e BFH + FBM. Após 14 dias, o grupo controle

apresentou maior pontuação no escore Bonar comparado aos demais grupos. Entretanto, após 21 dias o grupo controle apresentou maior escore apenas quando comparado ao BFH e BFH + FBM (Figura 9).

Além disso, observando os diferentes períodos experimentais, notou-se que todos os grupos apresentaram diferença estatística quando comparamos o período de 7 e 21 dias. Adicionalmente, o grupo controle apresentou diferença estatística apenas quando comparamos o período de 14 e 21 dias. Ainda, os grupos FBM e BFH + FBM apresentaram a diminuição no escore Bonar, ou seja, score maior no 7° e 14° dia comparados ao 14° e 21° dia, respectivamente (Tabela 3).

Figura 9 - Escore histológico de Bonar.



Legenda: Controle = sem tratamento; BFH = biopolímero de fibrina heterólogo; FBM = fotobiomodulação; BFH + FBM = biopolímero de fibrina heterólogo associado a fotobiomodulação. Fonte: autor.

Tabela 3 - Análise intragrupo do escore de Bonar.

Grupos	7 dias	14 dias	21 dias
Controle	7,06 ± 0,45 ^a	7,27 ± 0,40 ^b	5,788 ± 0,31
BFH	5,83 ± 0,30 ^a	5,63 ± 0,20	4,88 ± 0,57
FBM	7,98 ± 0,59 ^{ac}	5,83 ± 0,20 ^d	5,07 ± 0,42
BFH + FBM	5,97 ± 0,36 ^{ac}	5,321 ± 0,56 ^d	5,00 ± 0,31

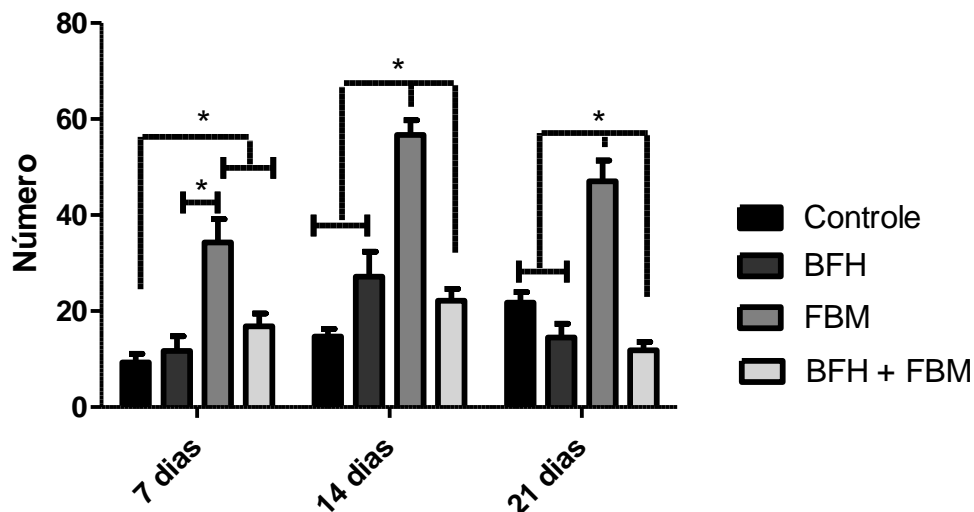
^a vs 21 dias; ^b vs controle 21 dias; ^c vs FBM e BFH + FBM 14 e 21 dias; ^d vs FBM e BFH + FBM 21 dias. Controle = sem tratamento; BFH = biopolímero de fibrina heterólogo; FBM = fotobiomodulação; BFH + FBM = biopolímero de fibrina heterólogo associado a fotobiomodulação. Média ± desvio padrão. Fonte: autor.

5.3 Quantificação de vasos sanguíneos

Na análise dos vasos sanguíneos pode-se notar que houve a interação entre os tratamentos e os períodos experimentais ($p= 0,002$). Da mesma forma, foi evidenciado o efeito dos tratamentos ($p<0,001$) e dos períodos experimentais ($p= 0,043$). Desta forma, detectou-se que o grupo controle apresentou menor número de vasos quando comparado aos grupos FBM e BFH + FBM, no período de 7 dias. Ainda, neste mesmo período experimental, evidenciou-se que o grupo FBM apresentou maior número de vasos sanguíneos comparado ao grupo BFH. Após 14 e 21 dias, a análise estatística demonstrou que o grupo FBM apresentou números de vasos sanguíneos estatisticamente maiores que os demais grupos (Figura 10).

Para a comparação dos grupos experimentais, os grupos BFH e FBM apresentaram diferenças estatísticas significativas entre 7 e 14 dias. Ainda, o grupo BFH + FBM apresentou maior número de vasos sanguíneos no 7º dia quando comparado a 21º dia.

Figura 10 - Quantificação de vasos sanguíneos.



Legenda: Controle = sem tratamento; BFH = biopolímero de fibrina heterólogo; FBM = fotobiomodulação; BFH + FBM = biopolímero de fibrina heterólogo associado a fotobiomodulação.
Fonte: autor. * $p<0,05$

Tabela 4 - Análise intragrupo do número de vasos sanguíneos.

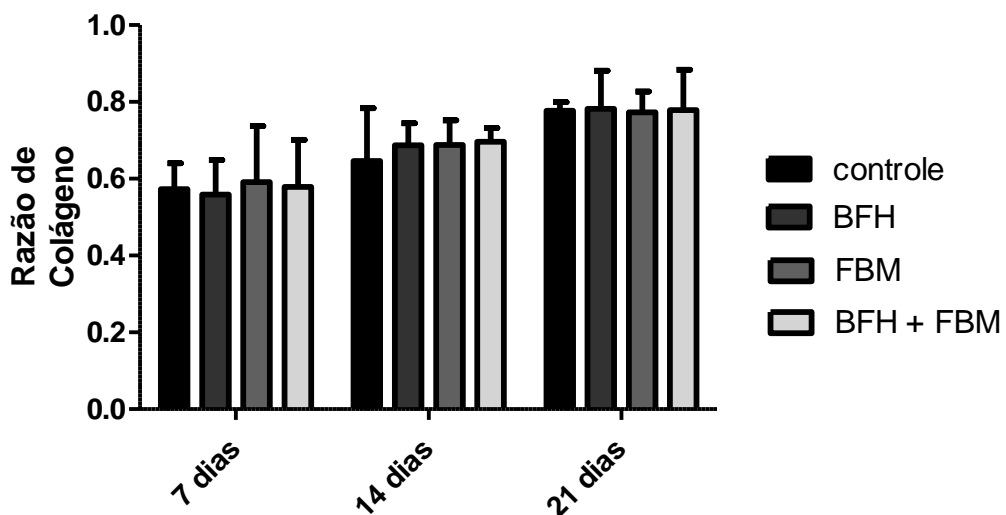
Grupos	7 dias	14 dias	21 dias
Controle	9,28 ± 1,79	14,67 ± 1,63	21,80 ± 2,16
BFH	10,71 ± 3,77 ^a	27,17 ± 5,23	14,50 ± 2,88
FBM	34,33 ± 4,84 ^a	56,71 ± 3,03	47,00 ± 4,33
BFH + FBM	16,83 ± 2,63 ^b	22,17 ± 2,48	11,83 ± 1,72

^a vs 14 dias; ^b vs BFH + FBM 21 dias. Controle = sem tratamento; BFH = biopolímero de fibrina heterólogo; FBM = fotobiomodulação; BFH + FBM = biopolímero de fibrina heterólogo associado a fotobiomodulação. Média ± desvio padrão. Fonte: autor.

5.4 Quantificação de colágeno

Na quantificação de colágeno não foi possível observar a interação entre os tratamentos e períodos experimentais ($p=0,956$), assim como, não encontramos diferença entre os tratamentos ($p=0,254$). Houve apenas a diferença entre os períodos experimentais avaliados ($p < 0,001$), como se pode perceber na Figura 11. É possível observar que o aumento de colágeno ocorreu independentemente do grupo, tais como aumento de colágeno de 7 para 14 e 21 dias ($p < 0,001$).

Figura 11 - Quantificação de colágeno.



Legenda: Controle = sem tratamento; BFH = biopolímero de fibrina heterólogo; FBM = fotobiomodulação; BFH + FBM = biopolímero de fibrina heterólogo associado a fotobiomodulação. Fonte: autor.

Tabela 5 - Análise intragrupo da quantidade de colágeno.

Grupos	7 dias	14 dias	21 dias
Controle	2,78 ± 0,33 ^a	3,68 ± 0,72 ^b	3,82 ± 1,01
BFH	2,79 ± 0,44 ^a	3,97 ± 0,57 ^b	4,04 ± 0,56
FBM	2,95 ± 0,73 ^a	4,08 ± 0,22 ^b	4,43 ± 0,40
BFH + FBM	2,89 ± 0,61 ^a	3,98 ± 0,26 ^b	4,44 ± 0,63

^a vs 14 dias e 21 dias; ^b vs 21 dias. Controle = sem tratamento; BFH = biopolímero de fibrina heterólogo; FBM = fotobiomodulação; BFH + FBM = biopolímero de fibrina heterólogo associado a fotobiomodulação. Média ± desvio padrão. Fonte: autor.

6 DISCUSSÃO

A ruptura do tendão do calcâneo é uma lesão frequente e de incidência crescente. A estratégia de tratamento ideal para ruptura aguda do tendão permanece controversa e os métodos cirúrgicos e não cirúrgicos apresentam vantagens e desvantagens distintas (DENG et al., 2017; KHAN; CAREY SMITH, 2010; WILKINS; BISSON, 2012). Assim, o presente estudo investigou a aplicação do BFH associado à TFBM, ou não, na transecção parcial do tendão calcâneo. Os resultados da avaliação do volume do edema mostraram que, 24 horas após a indução da lesão, não houve diferença estatística entre os grupos experimentais (Figura 6). Assim, podemos sugerir que a lesão promoveu processo inflamatório semelhante em todos os grupos experimentais. Dessa forma, são liberados mediadores inflamatórios como prostaglandinas, leucotrienos, bradicinina e outros e, conseqüentemente, há aumento da dilatação e da permeabilidade vascular, resultando em edema. Após uma lesão ou procedimentos cirúrgicos, espera-se uma resposta inflamatória na tentativa de realizar fagocitose local e reparar tecidos danificados (ALLER et al., 2006; ARIAS; ALLER; ARIAS, 2009).

Quando investigado o efeito dos tratamentos na redução do edema, observou-se que os grupos BFH e FBM, utilizados isoladamente ou em combinação, foram eficazes na redução do edema quando comparados ao grupo controle, independentemente do período experimental. Ainda assim, o grupo BFH apresentou maior redução no volume do edema em relação ao grupo que associou BFH + FBM, após 21 dias (Figura 7). Os efeitos da TFBM na redução do edema podem estar relacionados à sua capacidade de ativar células como os linfócitos, estimular o fluxo

linfático e modular o processo inflamatório (AIMBIRE et al., 2005; ALBERTINI et al., 2004; BOSCHI et al., 2008). Além disso, o biopolímero de fibrina é um agente hemostático composto por fibrinogênio e trombina e sua interação mimetiza a cascata de coagulação, formando um coágulo estável e adesivo (LEE; PARK; LEE, 1991; ORSI et al., 2017). As propriedades hemostáticas, adesivas e de vedação do biopolímero de fibrina podem reduzir o sangramento pós-operatório e equimoses, selando capilares e reduzindo o inchaço pós-operatório (YU et al., 2018). Além disso, o biopolímero de fibrina forma uma complexa rede de fibrina que pode servir de arcabouço, uma vez que já demonstrou promover a migração celular sobre sua estrutura altamente reticulada, além de permitir a proliferação celular sem que ocorra deformação estrutural (YAMADA et al., 2003).

Vários estudos têm mostrado que o biopolímero de fibrina teve um efeito positivo no processo de reparo do tendão (FERGUSON; RINKER, 2006; FERRARO et al., 2005; SOLAKOĞLU et al., 2010). Usando, um novo biopolímero de fibrina heterólogo Frauz et al., (2019) demonstraram que essa terapia é uma boa opção de tratamento, devido à sua eficácia em promover o reparo tendíneo. Ainda, Ferraro et al., (2005a, 2005b) desenvolveram dois estudos em 2005, que avaliaram o efeito do biopolímero de fibrina heteróloga no tendão de cães. O primeiro avaliou a resistência do tecido tendinoso reparado e o segundo estudo verificou sua capacidade de promover o reparo. Em ambos os estudos os animais foram divididos em três grupos avaliados após 7, 15 e 30 dias. Em relação à resistência do tecido tendinoso neoformado e permitido um aumento progressivo da resistência para obter a força máxima e a tração e as deformações permanentes. No segundo estudo, verificou-se que o uso do biopolímero modula a inflamação após 7 dias, facilitando as etapas de maturação do processo de reparo do tendão.

Esses achados estão de acordo com os resultados do presente estudo, em que a análise histológica revelou que os grupos BFH e BFH + FBM apresentaram menor pontuação quando comparados ao grupo controle, nos três períodos experimentais, demonstrando um melhor processo de reparo tendíneo (Figura 8). Porém, quando avaliado o número de vasos sanguíneos, o grupo BFH não apresentou diferença estatística com o grupo controle, em nenhum período avaliado (Figura 10). Esses achados são corroborados pela literatura, ao contrário de outros tecidos altamente vascularizados, como pele ou osso, a neovascularização após

lesão não é necessariamente uma marca registrada do reparo funcional do tecido. Em vez disso, está associado à degeneração, pois os tendões saudáveis são geralmente pouco vascularizados, com relativamente poucas células incorporadas em uma matriz de colágeno abundante (TEMPFER; TRAWEGER, 2015). Assim, é possível sugerir que o biopolímero de fibrina heteróloga é capaz de estimular o reparo tendíneo.

Curiosamente, o grupo FBM apresentou achados histológicos compatíveis com maior lesão tendínea quando comparado aos demais grupos, após 7 dias de transecção tendínea. Porém, após 14 e 21 dias, o grupo FBM apresentou menor lesão tendínea quando comparado ao grupo controle. Da mesma forma, o grupo FBM apresentou maior número de vasos sanguíneos quando comparado aos demais grupos, nos 3 períodos avaliados. Diante desses resultados, é possível sugerir que os parâmetros utilizados para a fotobiomodulação não foram eficientes para promover o reparo tendíneo após 7 dias. Esses resultados são apoiados pela lei de *Arndt Schulz*, onde uma dose muito baixa de luz não tem efeito, uma dose ligeiramente mais alta tem um efeito positivo até que um platô seja atingido. No entanto, se a dose de luz for aumentada além desse ponto, o benefício diminuirá progressivamente, até que a linha de base seja alcançada (sem efeito), e aumentos adicionais começarão a ter efeitos inibitórios no tecido. Este comportamento da luz nos tecidos também é conhecido como efeito dependente da dose (HAMBLIN et al., 2011; ZEIN; SELTING; HAMBLIN, 2018).

Para Sommer et al., (2001) o efeito estimulante da fotobiomodulação em tecidos biológicos é dependente do comprimento de onda, energia, área de irradiação, tempo total de irradiação e densidade de energia. Assim, é possível sugerir que, nos parâmetros utilizados neste estudo, a fotobiomodulação promoveu um efeito dependente da dose e frequência do tratamento, ou seja, o efeito estimulador da fotobiomodulação só foi observado após 14 e 21 dias de tratamento. Esse efeito pode estar relacionado à baixa energia utilizada neste estudo, sendo necessárias várias sessões de tratamento para atingir o efeito estimulador. Similarmente, Martignago et al., (2019) demonstraram que os efeitos da fotobiomodulação eram dependentes do número de dias em que os animais receberam o tratamento, com 5 aplicações consecutivas de FBM não sendo

eficientes em promover a viabilidade do tecido, enquanto 8 aplicações consecutivas de FBM promoveram maior viabilidade do tecido.

Curiosamente, o grupo que associou os tratamentos, BFH + FBM, promoveu um melhor processo de reparo apenas quando comparado ao grupo controle. Quando o grupo BFH + FBM foi comparado ao uso de terapias isoladamente (BFH e FBM), não houve diferença estatística entre os grupos (Tabela 3). Assim, o presente estudo demonstrou que o BFH (associado ou não ao TFBM) foi capaz de estimular a reparação tendínea. Curiosamente, a adição de FBM ao uso de BFH no tratamento de lesões de tendão não otimizou o processo de reparo. Por outro lado, o biopolímero de fibrina heteróloga já foi associado à fotobiomodulação para estimular o reparo morfofuncional do nervo facial (ROSSO et al., 2017) e durante a reconstrução de lesões em ossos longos (DE OLIVEIRA GONÇALVES et al., 2016; DE OLIVEIRA ROSSO et al., 2020). Os autores demonstraram o grande potencial da associação do biopolímero de fibrina heteróloga e da fotobiomodulação para auxiliar no processo de reparo do nervo periférico e também na reconstrução óssea.

Em relação ao número de colágeno Tipo I e Tipo III e organização, os resultados percebemos em todos os grupos que houve um aumento na produção de colágeno e uma melhora em relação a organização, independentemente do tratamento, mas sim relacionado ao tempo de tratamento (Tabela 5). O processo de remodelamento do tendão envolve síntese e degradação de colágeno (ANDARAWIS-PURI; FLATOW; SOSLOWSKY, 2015). É bem conhecido que a resposta à lesão tendínea pode ser dividida em três estágios sobrepostos. Na fase inflamatória, um coágulo de fibrina é formado para fornecer suporte temporário onde às células inflamatórias fagocitam o local da lesão e os tenócitos são recrutados para a área lesada. No segundo estágio, conhecido como proliferativo ou de reparo, os tenócitos depositam uma matriz temporária mecanicamente inferior composta principalmente de colágeno III. Em seguida, no terceiro e último estágio, conhecido como fase de remodelação, a síntese de colágeno I começa a dominar e a matriz extracelular (MEC) torna-se mais alinhada. Esta fase começa 1-2 meses após a lesão e pode durar mais de um ano (VOLETI; BUCKLEY; SOSLOWSKY, 2012). Diante do exposto, é possível sugerir que o presente estudo investigou as fases inflamatória e proliferativa do processo de reparo, o que pode estar diretamente relacionado à quantidade de colágeno apresentada nos grupos experimentais.

Em conjunto, os resultados mostraram que o BFH, único biopolímero de fibrina produzido a partir de hemoderivados heterólogos, é um tratamento promissor para a ruptura aguda do tendão, por ser um produto que não apresenta risco de transmissão viral, um processo de produção rápida, baixo custo e permite reconstruções anatômicas com menor envolvimento de partes moles. A FBM também tem um potencial recurso terapêutico no tratamento de lesões tendíneas. No entanto, a combinação dos dois tratamentos não promoveu um efeito extra, significativo no tendão. Como este estudo se limitou a investigar as fases inflamatória e proliferativa, informações sobre a influência das terapias na fase de remodelação ainda não foram fornecidas. Além disso, outros parâmetros de fotobiomodulação devem ser investigados.

7 CONCLUSÕES

De acordo com a pesquisa os nossos achados sugerem que:

- 1- Os tratamentos com biopolímero de fibrina heteróloga e fotobiomodulação, isolados ou associados, foram eficazes na redução do volume do edema, prevenindo alterações morfológicas degenerativas do tendão.
- 2- O uso de biopolímero de fibrina heterólogo isoladamente foi mais eficaz na promoção do processo de reparo tendíneo. Esses dados consolidam estudos anteriores de reparo de tendão com este novo biopolímero de fibrina heterólogo.
- 3- Esta terapia para ser usada como estratégia terapêutica eficaz promissora para auxiliar no tratamento de lesão parcial do tendão calcâneo.
- 4- Futuros ensaios clínicos serão necessários para validar esta proposta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIMBIRE, F. et al. Effect of LLLT Ga-Al-As (685 nm) on LPS-induced inflammation of the airway and lung in the rat. **Lasers in Medical Science**, v. 20, n. 1, p. 11–20, 2005.
- ALBERTINI, R. et al. Effects of different protocol doses of low power gallium-aluminum-arsenate (Ga-Al-As) laser radiation (650 nm) on carrageenan induced rat paw oedema. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 74, n. 2–3, p. 101–107, 2004.
- ALLAHVERDI, A. et al. Evaluation of low-level laser therapy, platelet-rich plasma, and their combination on the healing of Achilles tendon in rabbits. **Lasers in Medical Science**, v. 30, n. 4, p. 1305–1313, 2015.
- ALLER, M. A. et al. The inflammatory response: An efficient way of life. **Medical Science Monitor**, v. 12, n. 10, p. 225–234, 2006.
- 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.
- ANTUNES, JULIANA SOBRAL ; LOVISON, KELI ; KARVAT, JHENIFER ; VIEIRA, LISYANA ; PERETTI, ANA LUIZA ; HIGUCHI, GUILHERME HIDEAKI ; BONFLEUR, MARIA LÚCIA [1] ; BRANCALHÃO, ROSE MEIRE COSTA ; RIBEIRO, LUCINÉIA DE FÁTIMA CHASKO ; BERTOLINI, G. R. F. Efeito do exercício resistido na redução do edema, nocicepção e regeneração nervosa em um modelo de compressão do nervo isquiático. v. 26, n. 3, 2016.
- ARIAS, J. I.; ALLER, M. A.; ARIAS, J. Surgical inflammation: A pathophysiological rainbow. **Journal of Translational Medicine**, v. 7, p. 1–15, 2009.
- BARBOSA, M. D. S.; GREGH, S. L. A.; PASSANEZI, E. Fibrin Adhesive Derived From Snake Venom in Periodontal Surgery. **Journal of Periodontology**, v. 78, n. 10, p. 2026–2031, 2007.
- BARROS, L. C. et al. A new fibrin sealant from crotalus durissus terrificus venom: Applications in medicine. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews**, v. 12, n. 8, p. 553–571, 2009.
- BISCOLA, N. P. et al. Multiple uses of fibrin sealant for nervous system treatment following injury and disease. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 23, n. 1, p. 1–11, 2017.
- BOGAERTS, S. et al. Strain mapping in the Achilles tendon - A systematic review. **Journal of Biomechanics**, v. 49, n. 9, p. 1411–1419, 2016.
- BOSCHI, E. S. et al. Anti-inflammatory effects of low-level laser therapy (660 nm) in the early phase in carrageenan-induced pleurisy in rat. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 40, n. 7, p. 500–508, 2008.

- BRICEÑO CASTELLANOS, J.; GAVIRIA BEITIA, D.; CARRANZA RODRÍGUEZ, Y. Láser en odontología: fundamentos físicos y biológicos. **Universitas Odontológica**, v. 35, n. 75, p. 2, 2016.
- BUCHAIM, D. V. et al. The new heterologous fibrin sealant in combination with low-level laser therapy (LLLT) in the repair of the buccal branch of the facial nerve. **Lasers in Medical Science**, v. 31, n. 5, p. 965–972, 2016.
- BUCHAIM, D. V. et al. Unique heterologous fibrin biopolymer with hemostatic, adhesive, sealant, scaffold and drug delivery properties: A systematic review. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 25, n. October 2019, p. 1–15, 2019.
- 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, n. 4, p. 659–665, 2009.
- CASSARO, C. V. et al. Fibrin biopolymer as scaffold candidate to treat bone defects in rats. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 25, n. November, p. 1–17, 2019.
- CHANG ET AL. Effects of therapeutic physical agents on Achilles tendon microcirculation. **Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy® Downloaded**, n. 201303086, 2015.
- CHIQUITO, G. C. M. Comparison Between Suture and Fibrin Adhesive Derived From. p. 17017, 2007.
- CORRIGAN, P.; CORTES, D. H.; GRÄVARE SILBERNAGEL, K. Immediate effect of photobiomodulation therapy on Achilles tendon morphology and mechanical properties: An exploratory study. **Translational Sports Medicine**, v. 2, n. 4, p. 164–172, 2019.
- DA RÉ GUERRA, F. et al. Low-level laser therapy modulates pro-inflammatory cytokines after partial tenotomy. **Lasers in Medical Science**, v. 31, n. 4, p. 759–766, 2016.
- DE BARROS, C. N. et al. A new heterologous fibrin sealant as a scaffold to cartilage repair—Experimental study and preliminary results. **Experimental Biology and Medicine**, v. 241, n. 13, p. 1410–1415, 2016.
- DE CARVALHO, P. K. et al. Analysis of experimental tendinitis in rats treated with laser and platelet-rich plasma therapies by Raman spectroscopy and histometry. **Lasers in Medical Science**, v. 31, n. 1, p. 19–26, 2016.
- DE FREITAS, L. F.; HAMBLIN, M. R. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. **IEEE Journal on Selected Topics in Quantum Electronics**, v. 22, n. 3, 2016.
- DE JESUS, J. F. et al. Low-level laser therapy in IL-1 β , COX-2, and PGE2 modulation in partially injured Achilles tendon. **Lasers in Medical Science**, v. 30, n. 1, p. 153–158, 2014.

- DE 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 Medical Science**, v. 30, n. 1, p. 193–201, 2014.
- DE OLIVEIRA, A. R. et al. Effect of photobiomodulation and exercise on early remodeling of the Achilles tendon in streptozotocin-induced diabetic rats. **PLoS ONE**, v. 14, n. 2, p. 1–16, 2019.
- DE OLIVEIRA, C. T. B. et al. Effects of fibrin sealant and bone fragments on defect regeneration performed on rat tibiae: An experimental study. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 104, n. June 2019, 2020.
- DE OLIVEIRA GONÇALVES, J. B. et al. Effects of low-level laser therapy on autogenous bone graft stabilized with a new heterologous fibrin sealant. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 162, p. 663–668, 2016.
- DE OLIVEIRA ROSSO, M. P. et al. Photobiomodulation therapy associated with heterologous fibrin biopolymer and bovine bone matrix helps to reconstruct long bones. **Biomolecules**, v. 10, n. 3, p. 1–17, 2020.
- DE SOUZA, M. V. et al. Histomorphometric analysis of the Achilles tendon of Wistar rats treated with laser therapy and eccentric exercise. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 35, p. 39–50, 2015.
- DENG, S. et al. Surgical Treatment Versus Conservative Management for Acute Achilles Tendon Rupture: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. **Journal of Foot and Ankle Surgery**, v. 56, n. 6, p. 1236–1243, 2017.
- DIETRICH, F. Comparação Do Efeito Do Plasma Rico Em Plaquetas E Fibrina Rica Em Plaquetas No Reparo Do Tendão De. p. 1–104, 2012.
- DOCHEVA, D. et al. Biologics for tendon repair. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 84, p. 222–239, 2015.
- EGGER, A. C.; BERKOWITZ, M. J. Achilles tendon injuries. **Current Reviews in Musculoskeletal Medicine**, v. 10, n. 1, p. 72–80, 2017.
- ENWEMEKA, C. S. et al. The efficacy of low-power lasers in tissue repair and pain control: A meta-analysis study. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 22, n. 4, p. 323–329, 2004.
- ENWEMEKA, C. S. The relevance of accurate comprehensive treatment parameters in photobiomodulation. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 29, n. 12, p. 783–784, 2011.
- FEARON, A. et al. The Bonar score revisited: Region of evaluation significantly influences the standardized assessment of tendon degeneration. **Journal of Science and Medicine in Sport**, v. 17, n. 4, p. 346–350, 2014.
- FEITOSA, M. C. P. et al. Effects of the low-level laser therapy (LLLT) in the process of healing diabetic foot ulcers. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 30, n. 12, p. 852–857, 2015.

- FERGUSON, R. E. H.; RINKER, B. The use of a hydrogel sealant on flexor tendon repairs to prevent adhesion formation. **Annals of Plastic Surgery**, v. 56, n. 1, p. 54–58, 2006.
- FERRARO G. C., MORAES J. R. E., PEREIRA G. T., MORAES F. R., B. D. C. M. H. July 29, 2004. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, v. V.11, n.4, p. 433–446, 2005.
- FERRARO, G. C. et al. Effect of snake venom derived fibrin glue on the tendon healing in dogs: clinical and biomechanical study. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 11, n. 3, p. 261–274, 2005.
- FERREIRA, R. S. Autologous or heterologous fibrin sealant scaffold: Which is the better choice? **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 20, n. 1, p. 1–2, 2014.
- FERREIRA, R. S. et al. Heterologous fibrin sealant derived from snake venom: From bench to bedside - an overview. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 23, n. 1, p. 1–12, 2017.
- FRAUZ, K. et al. Transected Tendon Treated with a New Fibrin Sealant Alone or Associated with Adipose-Derived Stem Cells. **Cells**, v. 8, n. 1, p. 56, 2019.
- FREEDMAN, B. R.; GORDON, J. A.; SOSLOWSKY, L. J. The Achilles tendon: Fundamental properties and mechanisms governing healing. **Muscles, Ligaments and Tendons Journal**, v. 4, n. 2, p. 245–255, 2014.
- GASPAROTTO, V. P. O. et al. A new fibrin sealant as a three-dimensional scaffold candidate for mesenchymal stem cells. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 5, n. 3, 2014.
- GATTI. TREATMENT OF VENOUS ULCERS WITH SURGICAL ADHESIVES DERIVED FROM SNAKE VENOM. **J Venom Anim Toxins incl Trop Dis.**, v. 15, n.2, p. n. 5, p. 255, 2009.
- GIORDANO, S. et al. Tissue sealants may reduce haematoma and complications in face-lifts: A meta-analysis of comparative studies. **Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery**, v. 70, n. 3, p. 297–306, 2017.
- GOGULANATHAN, M. et al. Evaluation of fibrin sealant as a wound closure agent in mandibular third molar surgery - A prospective, randomized controlled clinical trial. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 44, n. 7, p. 871–875, 2015.
- GOMES, C. A. F. DE 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.
- HAMBLIN, M. R. et al. Biphasic dose response in low level light therapy - an update. **Dose-Response**, v. 9, n. 4, p. 602–618, 2011.
- HAMBLIN, M. R. Mechanisms and Mitochondrial Redox Signaling in Photobiomodulation. **Photochemistry and Photobiology**, v. 94, n. 2, p. 199–212,

2018.

HASLERUD, S. et al. Achilles Tendon Penetration for Continuous 810 nm and Superpulsed 904 nm Lasers before and after Ice Application: An in Situ Study on Healthy Young Adults. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 35, n. 10, p. 567–575, 2017a.

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, p. 32–42, 2017b.

HE, M. et al. The effect of fibrin glue on tendon healing and adhesion formation in a rabbit model of flexor tendon injury and repair. **Journal of Plastic Surgery and Hand Surgery**, v. 47, n. 6, p. 509–512, 2013.

HOPKINS, C. et al. Critical review on the socio-economic impact of tendinopathy. **Asia-Pacific Journal of Sports Medicine, Arthroscopy, Rehabilitation and Technology**, v. 4, p. 9–20, 2016.

HUTCHISON, A. M. et al. The treatment of a rupture of the achilles tendon using a dedicated management programme. **Bone and Joint Journal**, v. 97-B, n. 4, p. 510–515, 2015.

IUAN, F. C. et al. Reparation of peripheral nerves with fibrin glue prepared from snake venom. Preliminary results. **São Paulo medical journal = Revista paulista de medicina**, v. 113, n. 5, p. 1000–1002, 1995.

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.

KARAASLAN, F. et al. Surgical versus conservative treatment following acute rupture of the Achilles tendon: Is there a pedobarographic difference? **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 12, p. 1311–1315, 2016.

KARU, T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 49, n. 1, p. 1–17, 1999.

KARVAT, J. et al. Effect of low-level LASER and neural mobilization on nociceptive threshold in experimental sciatica. **Revista Dor**, v. 15, n. 3, p. 207–210, 2014.

KHAN, R. J.; CAREY SMITH, R. L. Surgical interventions for treating acute Achilles tendon ruptures. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 9, 2010.

KRAEMER, R. et al. Analysis of hereditary and medical risk factors in Achilles tendinopathy and Achilles tendon ruptures: A matched pair analysis. **Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery**, v. 132, n. 6, p. 847–853, 2012.

KRYUKOVA, A. E. et al. Shape Determination of Bovine Fibrinogen in Solution Using Small-Angle Scattering Data. **Crystallography Reports**, v. 63, n. 6, p. 871–873, 2018.

LE NIHOJANNEN, D. et al. Micro-architecture of calcium phosphate granules and

fibrin glue composites for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 27, n. 13, p. 2716–2722, 2006.

LEE, K. C.; PARK, S. K.; LEE, K. S. **Neurosurgical application of fibrin adhesive.** *Yonsei medical journal*, 1991.

LEITE, A. P. S. et al. Heterologous fibrin sealant potentiates axonal regeneration after peripheral nerve injury with reduction in the number of suture points. **Injury**, v. 50, n. 4, p. 834–847, 2019.

LIMA, A. C. G. et al. Low-Level Laser and Light-Emitting Diode Therapy for Pain Control in Hyperglycemic and Normoglycemic Patients Who Underwent Coronary Bypass Surgery with Internal Mammary Artery Grafts: A Randomized, Double-Blind Study with Follow-Up. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 34, n. 6, p. 244–251, 2016.

LIN, T. W.; CARDENAS, L.; SOSLOWSKY, L. J. Biomechanics of tendon injury and repair. **Journal of Biomechanics**, v. 37, n. 6, p. 865–877, 2004.

LONGO, U. G. et al. Acute Achilles Tendon Rupture in Athletes. **Foot and Ankle Clinics**, v. 18, n. 2, p. 319–338, 2013.

LUCKE, L. D. et al. Low-level laser and adipose-derived stem cells altered remodelling genes expression and improved collagen reorganization during tendon repair. **Cell Proliferation**, v. 52, n. 3, p. 1–12, 2019a.

LUCKE, L. D. et al. Low-level laser and adipose-derived stem cells altered remodelling genes expression and improved collagen reorganization during tendon repair. **Cell Proliferation**, v. 52, n. 3, p. 1–12, 2019b.

MARQUES, A. C. DE F. et al. Photobiomodulation therapy on collagen type I and III, vascular endothelial growth factor, and metalloproteinase in experimentally induced tendinopathy in aged rats. **Lasers in Medical Science**, v. 31, n. 9, p. 1915–1923, 2016.

MARTIGNAGO, C. C. S. et al. Comparison of two different laser photobiomodulation protocols on the viability of random skin flap in rats. **Lasers in Medical Science**, v. 34, n. 5, p. 1041–1047, 2019.

MENEZES, F. A. et al. Hydroxyapatite and a New Fibrin Sealant Derived from Snake Venom as Scaffold to Treatment of Cranial Defects in Rats. **Materials Research**, v. 18, n. 1, p. 196–203, 2015.

MESTER, A.; MESTER, A. The History of Photobiomodulation: Endre Mester (1903-1984). **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 35, n. 8, p. 393–394, 2017.

MEULENKAMP, B. et al. Protocol for treatment of Achilles tendon ruptures; A systematic review with network meta-analysis. **Systematic Reviews**, v. 7, n. 1, p. 1–7, 2018.

MOLLOY, T.; WANG, Y.; MURRELL, G. A. C. The roles of growth factors in tendon and ligament healing. **Sports Medicine**, v. 33, n. 5, p. 381–394, 2003.

NAKAMA, RLH; KING, KB; ABRAHAMSSON, S. R. D. M. Effect of Repetition Rate

on the Formation of Microtears in Tendon in an In Vivo Cyclical Loading Model. **Anticancer research**, v. 11, n. 4, p. 1609–12, 2007.

NATERSTAD, I. F. et al. Comparison of Photobiomodulation and Anti-Inflammatory Drugs on Tissue Repair on Collagenase-Induced Achilles Tendon Inflammation in Rats. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 36, n. 3, p. 137–145, 2018.

NOURISSAT, G.; BERENBAUM, F.; DUPREZ, D. Tendon injury: From biology to tendon repair. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 11, n. 4, p. 223–233, 2015.

ORSI, P. R. et al. A unique heterologous fibrin sealant (HFS) as a candidate biological scaffold for mesenchymal stem cells in osteoporotic rats. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 8, n. 1, p. 1–14, 2017.

PEEK, A. C.; MALAGELADA, F.; CLARK, C. I. M. The Achilles tendon. **Orthopaedics and Trauma**, v. 30, n. 1, p. 1–7, 2016.

PERES, V. Efeito do selante de fibrina derivado de peçonha de serpente associado a células-tronco mesenquimais na cicatrização de ferida cirúrgica em ratos. **Aleph**, p. 73 f., 2014.

QUINN, K. P. et al. An automated image processing method to quantify collagen fibre organization within cutaneous scar tissue. **Experimental Dermatology**, v. 24, n. 1, p. 78–80, 2015.

RAHAL, S. C. et al. Effect of fibrin glue derived from snake venom on the viability of autogenous split-thickness skin graft. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 10, n. 2, p. 161–172, 2004.

ROSSO, M. P. DE O. et al. Stimulation of morphofunctional repair of the facial nerve with photobiomodulation, using the end-to-side technique or a new heterologous fibrin sealant. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 175, p. 20–28, 2017.

SANTOS, J. et al. Effects of low-power light therapy on the tissue repair process of chronic wounds in diabetic feet. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 36, n. 6, p. 298–304, 2018.

SCHERER, N. H. B. et al. Laser Photobiomodulation in the acute inflammatory response of the calcaneal tendon injury in rats exposed to cigarette smoke. **Fisioterapia e Pesquisa**, v. 26, n. 2, p. 164–169, 2019.

SHARMA, P.; MAFFULLI, N. Tendon Injury and Tendinopathy. **The Journal of Bone & Joint Surgery**, v. 87, n. 1, p. 187–202, 2005.

SOLAKOĞLU, C. et al. Fibrin sealant in the treatment of acute ruptures of the Achilles tendon: Long-term results. **Eklemler Hastalıkları ve Cerrahisi**, v. 21, n. 3, p. 124–129, 2010.

SOMMER, A. P. et al. Biostimulatory windows in low-intensity laser activation: Lasers, scanners, and NASA's light-emitting diode array system. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**, v. 19, n. 1, p. 29–33, 2001.

SPOTNITZ, W. D. Fibrin sealant: Past, present, and future: A brief review. **World**

Journal of Surgery, v. 34, n. 4, p. 632–634, 2010.

SPOTNITZ, W. D. Fibrin Sealant: The Only Approved Hemostat, Sealant, and Adhesive—a Laboratory and Clinical Perspective. **ISRN Surgery**, v. 2014, p. 1–28, 2014.

STAVENUITER, X. J. R. et al. Postoperative Complications Following Repair of Acute Achilles Tendon Rupture. **Foot and Ankle International**, v. 40, n. 6, p. 679–686, 2019.

TEMPFER, H.; TRAWEGER, A. Tendon vasculature in health and disease. **Frontiers in Physiology**, v. 6, n. NOV, p. 1–7, 2015.

THOMOPOULOS, S. et al. Mechanisms of tendon injury and repair. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 33, n. 6, p. 832–839, 2015.

THORPE, C. T. et al. Anatomical heterogeneity of tendon: Fascicular and interfascicular tendon compartments have distinct proteomic composition. **Scientific Reports**, v. 6, n. October 2015, p. 1–12, 2016.

TIM, C. R. et al. Effects of low level laser therapy on inflammatory and angiogenic gene expression during the process of bone healing: A microarray analysis. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 154, p. 8–15, 2016a.

TIM, C. R. et al. Low-level laser therapy induces an upregulation of collagen gene expression during the initial process of bone healing: a microarray analysis. **Journal of Biomedical Optics**, v. 21, n. 8, p. 088001, 2016b.

VAGHARDOOST, R. et al. Effect of low-level laser therapy on the healing process of donor site in patients with grade 3 burn ulcer after skin graft surgery (a randomized clinical trial). **Lasers in Medical Science**, v. 33, n. 3, p. 603–607, 2018.

VIIDIK, A. Tensile strength properties of achilles tendon systems in trained and untrained rabbits. **Acta Orthopaedica**, v. 40, n. 2, p. 261–272, 1969.

VLADIMIROV, Y. A.; OSIPOV, A. N.; KLEBANOV, G. I. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. **Biochemistry (Moscow)**, v. 69, n. 1, p. 81–90, 2004.

VOLETI, P. B.; BUCKLEY, M. R.; SOSLOWSKY, L. J. Tendon healing: Repair and regeneration. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 14, p. 47–71, 2012.

VOLPI, P. **Arthroscopy and sport injuries : applications in high-level athletes.** [s.l: s.n.].

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, 2017.

WILKINS, R.; BISSON, L. J. Operative versus nonoperative management of acute achilles tendon ruptures: A quantitative systematic review of randomized controlled trials. **American Journal of Sports Medicine**, v. 40, n. 9, p. 2154–2160, 2012.

WOO, S. L. Y. Tissue engineering: Use of scaffolds for ligament and tendon healing

and regeneration. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, v. 17, n. 6, p. 559–560, 2009.

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.

YAMADA, Y. et al. Bone regeneration following injection of mesenchymal stem cells and fibrin glue with a biodegradable scaffold. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 31, n. 1, p. 27–33, 2003.

YOUNGSTROM, D. W.; BARRETT, J. G. Engineering tendon: Scaffolds, bioreactors, and models of regeneration. **Stem Cells International**, v. 2016, 2016.

YU, M. S. et al. Aerosolized Fibrin Sealant Is Effective for Postoperative Edema and Ecchymosis in Open Rhinoplasty Without Osteotomy. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 76, n. 9, p. 2000.e1-2000.e8, 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, p. 1, 2018.

ANEXO 1



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




CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “EFEITO DO SELANTE DE FIBRINA DERIVADO DO VENENO DE SERPENTE ASSOCIADO À DIFERENTES TRATAMENTOS NO PROCESSO DE REPARO TENDINEO EM RATOS”. Protocolo número 0326/2019, sob responsabilidade de *Antonio Luiz Martins Maia Filho*, para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei número 11.794 de 08 de outubro de 2008, Decreto número 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **DEFERIDO**, pela Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA/UESPI) da Universidade Estadual do Piauí.

ESPÉCIE	LINHAGEM	SEXO	IDADE	PESO	VIGÊNCIA DO PROJETO	Nº DE ANIMAIS
RATO ISOGÊNICO	WISTAR	MACHO+ FÊMEA	3-4 MESES	180 E 230G	01 ANO E MEIO	168

TERESINA, 15 DE ABRIL DE 2019


Dr. Francisco Araújo
Sub-Coordenador CEUA/UESPI
Portaria Nº 1347 - 20/11/14
CRMV - 0415/17