



Universidade Brasil – Campus Itaquera

Instituto Científico e Tecnológico da Universidade Brasil

Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica

**Rauena Souto Diogo Lopes Silva**

**Efeitos da fotobiomodulação por laser de baixa intensidade associado ou não ao extrato vegetal *Abelmoschus Esculentus Linn* sobre a inflamação aguda do tendão calcâneo induzida por colagenase em ratos *Wistar***

São Paulo/SP

2020

**Rauena Souto Diogo Lopes Silva**

**Efeitos da fotobiomodulação por laser de baixa intensidade associado ou não ao extrato vegetal *Abelmoschus Esculentus Linn* sobre a inflamação aguda do tendão calcâneo induzida por colagenase em ratos *Wistar***

Tese de Doutorado apresentado ao programa de pós-graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Brasil, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Engenharia Biomédica.

**Orientador:** Prof. Dr. Cleber Ferraresi.

**Co-orientador:** Raurys Alencar de Oliveira

São Paulo/SP

2020

## 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: **“EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO POR LASER DE BAIXA INTENSIDADE ASSOCIADO OU NÃO AO EXTRATO VEGETAL ABELMOSCHUS ESCULENTUS LINN SOBRE A INFLAMAÇÃO AGUDA DO TENDÃO CALCÂNEO INDUZIDA POR COLAGENASE EM RATOS WISTAR”**

#### Autor(es):

Discente: **Rauena Souto Diogo Lopes Silva**

Assinatura: RauenaSouto

Orientador(a): **Prof.(a) Dr.(a) Cleber Ferraresi**

Assinatura: Cleber Ferraresi

Coorientador(a): **Prof.(a) Dr.(a)**

Assinatura: \_\_\_\_\_

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

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Data: 07/12/2020

## TERMO DE APROVAÇÃO

**RAUENA SOUTO DIOGO LOPES SILVA**

**“EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO POR LASER DE BAIXA INTENSIDADE ASSOCIADO OU NÃO AO EXTRATO VEGETAL ABELMOSCHUS ESCULENTUS LINN SOBRE A INFLAMAÇÃO AGUDA DO TENDÃO CALCÂNEO INDUZIDA POR COLAGENASE EM RATOS WISTAR”**


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) Cleber Ferraresi (presidente-orientador)



Prof(a). Dr(a) Nivaldo Antonio Parizotto (UNIVERSIDADE BRASIL)



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



Prof(a). Dr(a) Raiurys Alencar de Oliveira (UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ)



Prof(a). Dr(a) José Carlos Tatmatsu Rocha (UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ)

São Paulo, 07 de dezembro de 2020.

Presidente da Banca Prof.(a) Dr.(a) Cleber Ferraresi

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

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da Universidade Brasil,  
com os dados fornecidos pelo (a) autor (a).

S583e SILVA, Rauena Souto Diogo Lopes Silva.

Efeitos da fotobiomodulação por laser de baixa intensidade associado ou não ao extrato vegetal *Abelmoschus Esculentus* Linn sobre a inflamação aguda do tendão calcâneo induzida por colagenase em ratos Wistar / Rauena Souto Diogo Lopes Silva. -- São Paulo: Universidade Brasil, 2020.

97 p.: il. color.

Tese de Doutorado defendida no Programa de Pós-graduação do Curso de Engenharia Biomédica da Universidade Brasil.

Orientação: Prof. Dr. Cleber Ferraresi.

Coorientação: Prof. Dr. Raurys Alencar de Oliveira.

1. Fotobiomodulação. 2. Extrato. 3. Tendinite. 4. Células Inflamatórias. 5. Fibras Colágenas. I. Ferraresi, Cleber. II. Oliveira, Raurys Alencar de. III. Título.

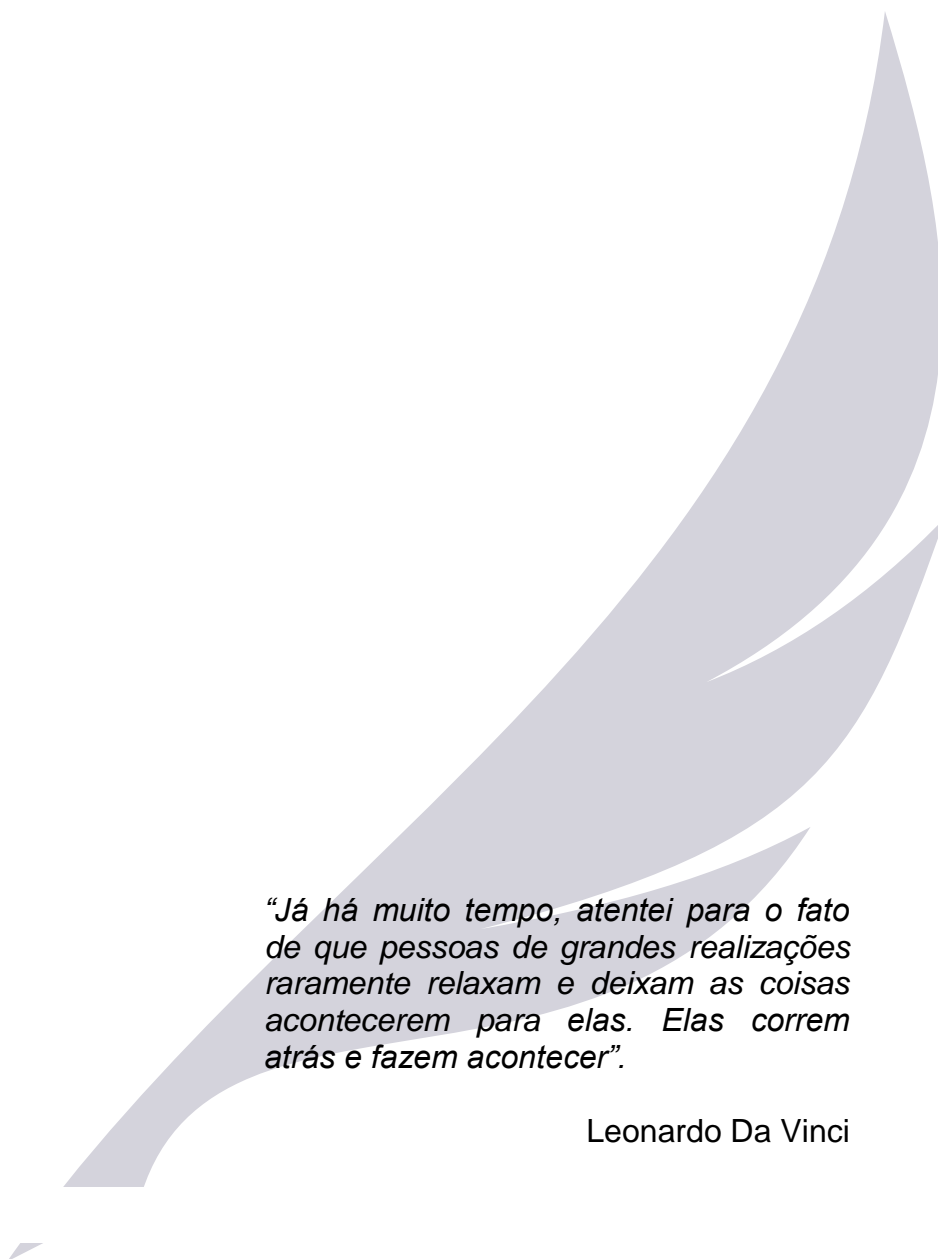
CDD 620.82

## DEDICATÓRIA

A Deus que sempre iluminou meus caminhos, me fortalecendo e me transformando a cada dia a dia.

Ao meu esposo, Klaus Avelino, amigo e pai presente que sempre está por perto quando eu mais preciso, pronto para me servir, confortar e fortalecer nos momentos mais complicados e cansativos. Aos meus filhos, Miguel e Marina por tanta compreensão da minha ausência. Aos meus pais pela força, torcida e orações.

Ao amigo Diego Rodrigues Pessoa pelas contribuições, compartilhamentos, atividades conjuntas, apoio incondicional e principalmente por nunca deixar de acreditar em mim. Agradeço a Deus por você na minha vida.



*“Já há muito tempo, atentei para o fato de que pessoas de grandes realizações raramente relaxam e deixam as coisas acontecerem para elas. Elas correm atrás e fazem acontecer”.*

Leonardo Da Vinci

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me permitir concluir esta etapa tão importante da minha vida e ter me guiado nos inúmeros momentos de dificuldades e obstáculos.

Ao Prof. Dr. Cleber Ferraresi, os meus maiores e sinceros agradecimentos pela gentileza, orientação, atenção e disposição dispensada apesar da distância e de todas as suas atividades. Aqui registro o meu respeito e admiração.

Ao Prof. Dr. Raurys Alencar de Oliveira pelo sempre pronto atendimento, dedicação e valiosas contribuições adicionadas.

A Professora Dra. Andrea Conceição Gomes Lima pela orientação inicial e apoio no momento mais delicado.

Aos Prof. Dr. Nivaldo Parizotto, prof. Dr. Carlos Tatmatsu e a profa. Dra. Lívia Assís valiosas contribuições adicionadas, valorização e disponibilidade.

Ao Prof. Dr. Davidson Ribeiro Costa pelas contribuições, atenção e dedicação.

Ao Centro Universitário Santo Agostinho (UNIFSA) seus colaboradores, por permitir que a realização da pesquisa e incentivo constante. Pela sua eficiência e boa vontade.

As minhas alunas Rafaely da Silva Moura Soares e Cimocácia Castro dos Santos que me apoiaram intensamente no período do experimento, ficando após o horário para acompanhar o desenvolvimento deste estudo e a não desanimar com todo o trabalho.

A Universidade Estadual do Piauí pelo apoio.

A minha amiga Joseana Leitão por presença constante a auxílio de todas as horas.

Ao professor Manoel Moura de Jesus por seu o maior incentivador desse trabalho, pela amizade iluminada e seus ensinamentos.

E todos aqueles que direto ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** Na literatura vigente a associação entre os recursos eletromagnéticos (fotobiomodulação (FBM) por laser de baixa intensidade (LBI) e/ou por luz diodo emissor (LED) no espectro eletromagnético do infravermelho e extratos vegetais (pomadas/géis) no tratamento da tendinite ainda são escassos, entretanto, acredita-se que ambos possam auxiliar na resolutividade do processo inflamatório.

**OBJETIVO:** Avaliar os efeitos da fotobiomodulação (FBM) por laser de baixa intensidade (LBI) associada ou não ao extrato “Abelmoschus Esculentus Linn”, no tratamento da tendinite do tendão calcâneo experimentalmente induzida via colagenase em ratos Wistar. **METODOLOGIA:** 40 ratos Wistar machos submetidos ao modelo experimental de tendinite via aplicação de colagenase na pata direita. Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais: grupo controle (GC), extrato (EX), fotobiomodulação (FBM) e o grupo com o tratamento combinado (FBM + EX), os quais foram tratados de forma controlada durante o período experimental de 7 e 14 dias. As variáveis estudadas neste estudo foram: células inflamatórias, contagem de fibroblastos e a porcentagem das fibras colágenas (tipo I e III). **RESULTADOS:** Foi observado no estudo na contagem de células inflamatórias que os grupos FBM (0,010) e AS (0.043) apresentaram redução significativa no número de células inflamatórias na análise intragrupos. Em relação aos achados na contagem de fibroblastos, foi comprovado na análise intragrupos que o GC (0.0035) apresentou aumento significativo no número de fibroblastos, enquanto que o grupo FBM (0,013) evidenciou uma redução significativa na proliferação de fibroblastos. Já na análise intergrupo, os grupos experimentais (EX, FBM e AS), apresentaram aumento significativo na proliferação de fibroblastos quando comparado ao GC nos tempos experimentais estudados. Por fim, na análise do percentual de fibras colágenas, foi verificado que o grupo FBM apresentou os melhores resultados sobre a proliferação de colágeno (tipo I e III). **CONCLUSÃO:** Conclui-se que o extrato Abelmoschus Esculentus Linn, quando aplicado de forma isolada não otimiza a proliferação do colágeno tipo I na fase esperada do processo de reparo do tendão calcâneo. Entretanto, foi demonstrado que a FBM é capaz de auxiliar a proliferação de fibroblastos e induzir a proliferação de colágeno do tipo I, reduzindo a proliferação do colágeno tipo III na fase tardia (14 dias).

**Palavras-chave:** fotobiomodulação; extrato; tendinite; células inflamatórias; fibras colágenas e fibroblastos

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** In the current literature, the association between electromagnetic resources (photobiomodulation (FBM) by low intensity laser (LBI) and / or by emitting diode light (LED) in the infrared electromagnetic spectrum and plant extracts (ointments / gels) in the treatment of tendinitis are still scarce, however, it is believed that both can help in resolving the inflammatory process **OBJECTIVE:** To evaluate the effects of low intensity laser photobiomodulation (FBM) with or without the “*Abelmoschus Esculentus* Linn” extract, in treatment of calcaneus tendon tendonitis experimentally induced via collagenase in Wistar rats **METHODOLOGY:** 40 male Wistar rats submitted to the experimental model of tendinitis via collagenase application on the right paw. The animals were divided into 4 experimental groups: control group (GC), extract (EX), photobiomodulation (FBM) and the combined treatment group (FBM + EX), which were treated in a controlled manner during the period experimental period of 7 and 14 days. The variables studied in this study were: inflammatory cells, fibroblast count and the percentage of collagen fibers (types I and III). **RESULTS:** It was observed in the study in the inflammatory cell count that the FBM (0.010) and AS (0.043) groups showed a significant reduction in the number of inflammatory cells in the intragroup analysis. Regarding the findings in the fibroblast count, it was proved in the intragroup analysis that the CG (0.0035) showed a significant increase in the number of fibroblasts, while the FBM group (0.013) showed a significant reduction in the proliferation of fibroblasts. In the intergroup analysis, the experimental groups (EX, FBM and AS), showed a significant increase in the proliferation of fibroblasts when compared to the CG in the experimental times studied. Finally, in the analysis of the percentage of collagen fibers, it was found that the FBM group had the best results on collagen proliferation (types I and III). **CONCLUSION:** It is concluded that the extract *Abelmoschus Esculentus* Linn, when applied in isolation, does not optimize the proliferation of type I collagen in the expected phase of the calcaneus tendon repair process. However, it has been shown that FBM is able to assist the proliferation of fibroblasts and induce the proliferation of type I collagen, reducing the proliferation of type III collagen in the late phase (14 days).

**Keywords:** photobiomodulation; extract; tendonitis; inflammatory cells; collagen fibers and fibroblasts

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Indução experimental da tendinite via colagenase no tendão da pata direita dos ratos.....	37
Figura 2: Aparelho de FBM por LBI empregado no presente estudo.....	38
Figura 3: Demonstração da intervenção baseada na FBM por LBI nos animais submetidos ao tratamento do laserterapêutico.....	40
Figura 4: Demonstração da intervenção baseada na aplicação tópica do EX (AEL) nos animais submetidos pela proposta intervencional proposta.....	41
Figura 5: Demonstração da remoção do tendão calcâneo dos animais após a eutanásia.....	42
Figura 6 - Fotomicrografias dos aspectos histológicos das imagens coradas com HE dos animais submetidos a indução experimental de tendinite por colagenase.....	47
Figura 7. Análise intergrupos sobre a contagem de células inflamatórias.....	49
Figura 8. Análise intergrupos sobre a proliferação de fibroblastos.....	51
Figura 9 - Análise morfométrica dos cortes histológicos corados com picrossirius red obtidos do tendão calcâneo para análise das fibras colágenas tipo I e III.....	53
Figura 10. Análise intergrupos sobre a proliferação das fibras colagenas tipo I.....	56
Figura 11. Análise intergrupos sobre a proliferação das fibras colagenas tipo III.....	58
Figura 12: Análise da substituição das fibras colagenas III em fibras colagenas I....	59

## Lista de tabela

Tabela 1: Delineamento detalhado dos grupos experimentais do presente estudo..	36
Tabela 2. Parâmetros da FBM que foram empregados no presente estudo.....	39
Tabela 3. Avaliação intragrupos (média e erro-padrão).....	48
Tabela 4. Avaliação intragrupos (média e erro-padrão).....	50
Tabela 5. Avaliação intragrupos (média e erro-padrão).....	54



## Lista de abreviaturas

- AEL - *Abelmoschus esculentus* Linn
- AS - Associado
- ATP - adenosina trifosfato
- COX-2 - ciclooxigenase-2
- EX – Extrato
- FBM – Fotobiomodulação
- GC – grupo controle
- IL-1- interleucina
- IL-10 - interleucina-10
- IL-1 $\beta$  - interleucina-1 beta;
- IL-6 - interleucina-6;
- i-NOS - sintase de óxido nítrico induzida
- LBI - laser de baixa intensidade
- LED - Luz Diodo Emissor (LED)
- MEC – matriz extracelular
- MMP-1 - metaloproteinase-1 da matriz
- MMP13 - metaloproteinase-13 da matriz
- MMP-3 -metaloproteinase-3 da matriz
- MMP-9 - metaloproteinase-9 da matriz
- MMPs - metaloproteinases
- OTG'S – Órgãos tendinosos de golgi
- PDGF - fator de crescimento derivado de plaquetas
- PGE2 - prostaglandina E2
- PRISMA - Preferred Reporting Items for Meta-Analysis*
- TGF- $\beta$  fator de crescimento transformador beta



TGF- $\beta$ - fator de crescimento transformador  $\beta$

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

UST – ultrassom terapêutico

VEGF - fator de crescimento do endotélio vascular



## Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	20
<b>3. REFERÊNCIAL TEÓRICO</b> .....	22
<b>3.1 Estrutura dos tendões</b> .....	22
<b>3.2 Função dos tendões</b> .....	23
<b>3.3 Tendão calcâneo</b> .....	24
<b>3.5 Lesões do tendão calcâneo e suas denominações</b> .....	25
<b>3.6 Reparo tecidual</b> .....	26
<b>3.7 Métodos de tratamentos empregados no reparo tecidual</b> .....	29
<b>3.9 Fitoterapia</b> .....	30
<b>3.10 <i>Abelmoschus esculentus linn</i> (quiabo)</b> .....	31
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	34
<b>4.1 Objetivo geral</b> .....	34
<b>4.2 Objetivos específicos</b> .....	34
<b>5. METODOLOGIA</b> .....	35
<b>5.1 Aspectos éticos e legais</b> .....	35
<b>5.2 Local do estudo</b> .....	35
<b>5.3 Animais</b> .....	35
<b>5.4 Grupos experimentais</b> .....	35
<b>5.5 Modelo experimental de tendinite</b> .....	37
<b>5.6 Intervenção terapêutica experimental</b> .....	38
<b>5.7 Equipamentos</b> .....	38
<b>5.8 Fotobiomodulação (FBM) por Laser de Baixa Intensidade</b> .....	38
<b>5.9 Preparação e aplicação do extrato <i>Abelmoschus Escullents Linn</i></b> .....	40
<b>5.10 Eutanásia dos animais</b> .....	41
<b>5.11 Análise histológica</b> .....	41
<b>5.12 Análise morfométrica dos tipos de colágeno (I e III)</b> .....	43
<b>5.12 Análise estatística</b> .....	44
<b>6. RESULTADOS</b> .....	45
<b>6.1 Avaliação histológica e histomorfométrica</b> .....	45
<b>6.2 Número de células inflamatórias: análise intragrupos</b> .....	48
<b>6.3 Número de células inflamatórias: análise intergrupos</b> .....	48
<b>6.4 Número de Fibroblastos: análise intragrupos</b> .....	50
<b>6.5 Número de Fibroblastos: análise intergrupos</b> .....	50

<b>6.6 Análise das fibras colágenas tipo I e III</b> .....	52
<b>6.7 Fibras colágenas (I e III): análise intragrupos</b> .....	54
<b>6.8 Fibras colágeno tipo I: análise intergrupos</b> .....	54
<b>6.9 Fibras colágeno tipo III: análise intergrupos</b> .....	57
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	69
<b>ANEXO 1 – Aprovação do comitê de ética em pesquisa com animais</b> .....	77
<b>ANEXO 2 – CERTIFICADO DE CALIBRAÇÃO</b> .....	78



## 1 INTRODUÇÃO

O tendão calcâneo é considerado o mais forte, o mais espesso (cerca de 6,5 ± 0,8 mm com variação de 25%) e o mais comprido (cerca de 3 a 15 cm) do corpo humano, formado por tecido conjuntivo denso modelado, que tem como função principal, transmitir força para propiciar o movimento articular (JUNIOR e barbosa, 2016; SINGH, 2017). As lesões do tendão calcâneo são consideradas um grave problema de origem ortopédico e traumatológico, o qual está associado ao envelhecimento da população e as demandas de sobrecargas esportivas, as quais se estima que 30 a 50% dessas lesões são oriundas de práticas esportivas (GABLER et al. 2018; Kernozek et al. 2018).

A tendinite é uma resposta inflamatória oriunda de um trauma ou esforço repetitivo sobre o tendão, de modo que este não consegue mais suportar a tensão e o estresse mecânico, e pode apresentar dificuldades em seu processo de reparação tecidual, impactando negativamente a reabilitação dos indivíduos (FARCIC et al. 2013; MAGNAN et al. 2014). O processo de reparação tecidual é constituído por três fases: inflamatória, proliferativa e a remodeladora (HOPE e SAXBY, 2007; VOLETI et al. 2012).

A fase inflamatória é caracterizada pela ruptura vascular no sitio da lesão, com extravasamento de fluidos teciduais, onde ocorrerá o aumento da permeabilidade capilar, imigração dos granulócitos e monócitos para o tecido (HOPE e SAXBY, 2007; VOLETI et al. 2012). A fase proliferativa é marcada por proliferação de fibroblastos, miofibroblastos e células endoteliais, as quais estimulam fatores de crescimento mediados por plaquetas e macrófagos, os quais auxiliarão para a estimulação da produção de colágeno (HOPE e SAXBY, 2007; VOLETI et al. 2012). A fase de remodelamento é marcada pela reconstrução da morfologia tecidual, nesta fase ocorre a formação de colágeno I, visto que nessa fase é necessário fornecer maior funcionalidade aos tecidos lesionados pela recuperação e/ou substituição por células do mesmo tipo quando a mesma obteve a lesão inicial (HOPE e SAXBY, 2007; VOLETI et al. 2012)

Atualmente, na prática clínica fisioterapêutica, os recursos mecânicos e eletromagnéticos vêm sendo amplamente estudados para estimular o processo de reparação do tendão calcâneo, dentre eles, destaca-se a fotobiomodulação (FBM) por laser de baixa intensidade (LBI) (LARAIA et al. 2012; de JESUS et al. 2014;

ALIODOUST et al. 2014; de JESUS et al. 2015; ALLAHVERDI et al. 2016 e GOMES et al. 2017). Além da FBM, Ricoldy et al. (2010), Maia-Filho et al. (2010) e Leal et al. (2016) evidenciaram que a interação de extratos vegetais associados à recursos fisioterapêuticos, como o ultrassom terapêutico (UST), promovem efeitos positivos quanto ao processo de reparação tecidual.

A FBM por LBI emite radiação dentro espectro eletromagnético do vermelho (visível) ao infravermelho (invisível), os quais apresentam propriedades físicas próprias, tais como: monocromaticidade (banda espectral muito estreita), coerência (ondas em fase) e colimação (ondas em paralelo) (MOURA-JUNIOR et al. 2014; MOURA-JUNIOR et al., 2015). Os efeitos da fotobiomodulação ocorrem através do estímulo metabólico após a absorção da energia eletromagnética da luz por estruturas celulares chamadas de cromóforos, como a citocromo C oxidase, que por sua vez podem estimular a cadeia respiratória mitocondrial, aumentar a vascularização periférica local e aumentar o suprimento de oxigênio para as células hipóxicas, promovendo respostas fotobiomoduladoras (LOPES-SILVA et al. 2020)

Além da fotobiomodulação, outros recursos como os fitoterápicos à base de extratos vegetais vêm sendo amplamente utilizados pela população mundial, em virtude de seu baixo custo, para estimular o processo de reparo tecidual (ARO et al. 2015; VIEIRA et al., 2016; SOEMARIE, 2016; LUTHFI et al. 2020 e LUTHFI; JULIASTUTI e RISKY et al. 2020). Como exemplo, podemos citar o quiabo (*Abelmoschus esculentus Linn*) (AEL) pertencente à família Malvaceae, que é comumente cultivado nas planícies da Índia como uma cultura vegetal. De acordo com estudos prévios (de SOUSA et al. 2012; GEMEDE et al. 2014; SOLIMAN e EL-MOHAMEDY, 2017; MOREIRA et al. 2020) o extrato vegetal AEL apresenta propriedades anti-inflamatórias devida a sua constituição rica em componentes polifenólicos (flavonóides, taninos, antraceno, esteróis e/ou triterpenos), propriedades neuroprotetoras (quercetina e rutina), precursoras de radicais livres e quimioprotetoras (inibindo a produção das enzimas  $\alpha$ -glicosidase e  $\alpha$ -amilase) (ARO et al. 2015; VIEIRA et al., 2016; SOEMARIE, 2016).

Apesar da FBM e pomadas/géis baseados em extratos vegetais serem utilizadas em processos inflamatórios, como tendinites, ainda não existem pesquisas na literatura atual sobre possíveis efeitos sinérgicos ou complementares entre essas duas terapias. Assim, o presente estudo teve por objetivo investigar os efeitos

isolados e combinados do extrato vegetal AEL e da FBM na melhora da resposta inflamatória aguda e subaguda, e cicatricial (colágenos tipos I e III) do tendão calcâneo de ratos submetidos à tendinite experimentalmente induzida por colagenase.



## 2. JUSTIFICATIVA

As lesões em tendões são comuns na população, especialmente no esporte devido ao aumento repentino de estresse no local. Diversos recursos da fisioterapia têm sido utilizados com a finalidade de reparar o tecido lesado, dentre eles, destaca-se a LBI. Os fitoterápicos ultimamente são utilizados a fim de acelerar o processo de reparação do tecido lesionado, onde podem ser associados com recursos da termofototerapia.

Atualmente a reparação tecidual tem sido amplamente estudada e abordada em diferentes linhas de pesquisa com o objetivo de aperfeiçoá-las, abrangendo aspectos como, por exemplo, fisiopatologia, fatores de risco, drogas anti-inflamatórias e substâncias químicas que possam influenciar na cicatrização. Em geral, no contexto clínico, a FBM tem sido amplamente indicada para estimular o processo de reparação tecidual, pois quando empregada na dose adequada (comprimento de onda, potência, energia e tempo de irradiação) estimula a proliferação celular e a proliferação de colágeno, fatores essenciais no processo de cicatrização tecidual (LOPES-SILVA et al. 2020).

O presente estudo está inserido no contexto que ainda não existem evidências científicas sobre a comparação dos efeitos da radiação eletromagnética (FBM) isolada, ou combinada ao fitoterápico "*Abelmoschus Esculentus Linn*". A FBM por LBI quando aplicada sem interação farmacológica favorece a proliferação celular, produção de colágeno e proteínas, reparação tecidual, indução da atividade mitótica das células epiteliais e dos fibroblastos, assim como redução da inflamação e edema e o controle da dor devido a inibição secretória de alguns mediadores químicos, além do estímulo à microcirculação local. Como relatado pela literatura, a FBM por LBI apresenta 2 comprimentos de onda distintos: vermelho (visível) e infravermelho (invisível) (MOURA-JUNIOR et al. 2015)

Neste estudo, foi adotado a utilização da FBM por LBI no espectro eletromagnético do infravermelho, devido os reais efeitos comprovados pela literatura vigente, pela sua capacidade de penetração e interação aos tecidos biológicos, assim como, uma revisão preliminar publicada por Lopes-Silva et al. (2020) demonstraram efeitos satisfatórios sobre a reparação tecidual quando empregada com parâmetros dosimétricos adequados. Em relação a dose aplicada nesse estudo (4 joules) foi estabelecida devido essa dosimetria estar dentro da

janela terapêutica, promovendo os efeitos: circulatórios, anti-inflamatórios, anti-edematoso e cicatricial.

Recentemente as lesões musculares, como a tendinite encontram-se entre as patologias mais predominantes na população em geral e atingem igualmente uma elevada prevalência em contexto laboral, podendo em algumas situações, limitar as atividades laborais dos seus portadores, uma vez que, os seus casos aumentam com a idade, sendo, no entanto, os microtraumatismos e a sobrecarga profissional e/ou desportiva importantes causas em qualquer faixa etária. Diante disso, o consumo de medicamentos, tais como analgésicos e antiinflamatórios, entretanto alguns medicamentos podem ocasionar inúmeros efeitos colaterais e muitas das vezes, não auxiliar no processo de recuperação do paciente. Nessa perspectiva, acredita-se que o uso de extratos vegetais, como o *Abelmoschus Esculentus Linn* possa favorecer na redução dos quadros de tendinite, devido seus efeitos importantes sobre a redução do estresse oxidativo, além disso, podemos destacar o baixo custo de um medicamento e, se seus efeitos forem satisfatórios poderá ser um recurso de grande acesso a população, além de ser isento de efeitos adversos locais (LUTHIFI et al.2020).

O motivo de realização deste estudo é devido que atualmente existem tratamentos de elevado custos para a tendinite, portanto, espera-se com a realização deste estudo que seja possível comprovar os efeitos isolados ou associados entre os extratos vegetais e a FBM, visto que isso poderia baratear o tratamento da patologia, os quais poderiam ser ofertados para indivíduos com menor poder aquisitivo. Diante disto, torna-se necessária a realização de estudos que investiguem os efeitos entre a FBM por LBI associada ou não ao extrato “*Abelmoschus Esculentus Linn*” no processo de reparação do tendão calcâneo em ratos submetidos ao processo de tendinite induzida via colagenase.

### 3. REFERÊNCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Estrutura dos tendões

Os tendões são componentes cilíndricos e alongados, revestidos por tecido conjuntivo denso não modelado, separados por fibroblastos e matriz extracelular (MEC), os quais são constituídos principalmente por proteínas fibrosas de colágeno (28%), que promovem a resistência e força tênsil do tendão, fibras elásticas (2%), que permitem a elasticidade da estrutura, e água (70%), que fornece capacidade de deformação elástica, além de glicoproteínas, proteoglicanos e mucopolissacarídeos (MARQUES et al. 2016; ORTAÇ et al. 2018; NASCIMENTO et al. 2019). Os tendões apresentam baixa demanda metabólica, são pouco vascularizados e não sofrem hemorragia quando seccionados, visto que esta característica pode possibilitar que a recuperação em um processo de cicatrização se torne inevitavelmente lenta (MARQUES et al. 2016; ORTAÇ et al. 2018; NASCIMENTO et al. 2019)

Os tendões em avaliações macroscópicas exibem componentes com textura fibroelástica de coloração branca e com brilho, oriundo da organização das fibras colágenas existentes no tecido, o qual é composto por duas junções: miotendínea e osteotendínea (ARO et al. 2015). O tecido tendíneo distingue-se dos diferentes tecidos do corpo em virtude da pequena proporção de células em relação a quantidade de MEC presente. Nestas células, existem componentes denominados tenoblastos e tenócitos, os quais são responsáveis pela produção de colágeno (tipo I e III), principal constituinte da MEC em tendões (NASCIMENTO et al. 2020).

O colágeno é o componente básico do tendão, o qual representa até 95% de seu peso, constituídos em sua maior proporção com cerca de 85% de colágeno tipo I e 10% de colágeno tipo III (NASCIMENTO et al. 2020).. O colágeno do tipo I é responsável pela resistência e tração, assim como a resistência à deformação, enquanto o colágeno tipo III propicia a durabilidade mecânica das estruturas de suporte (NASCIMENTO et al. 2020).

A inervação do tendão é realizada pelos nervos dos músculos anexos, assim como, pelos fascículos oriundos dos nervos cutâneos (nervo sural). Os terminais nervosos podem ser classificados em quatro categorias (corpúsculos de Ruffini; corpúsculos de Vater-Pacini, órgãos tendinosos de Golgi (OTG'S) e terminações nervosas livres) em que ressalta-se que o corpúsculos de Ruffini e OTG'S, estão

situados superfície externa dos tendões, convertendo estímulos de pressão ou tensão em sinais nervosos aferentes, ou seja, mecanorreceptores com diferentes patamares de sensibilidade, enquanto que as terminações nervosas livres são responsáveis pela transmissão do impulso doloroso. Por fim, o corpúsculo de Vater-Pacini tem como finalidade captar os estímulos de origem táteis e vibratórios (GASIOR-GLOGOWSKA et al. 2010)

O tecido tendíneo é envolvido por bainhas de tecido conjuntivo. Os tendões, apresentam uma divisão morfológica de feixes de fibras tendíneas (feixes primários, secundários e terciários) os quais podem ser endotendão, paratendão e epitendão (peritendão) (WU et al. 2015; NOURISSAT; BERENBAUM e DUPREZ et al., 2015)

O endotendão é localizado entre feixes tendíneo, formado principalmente por colágeno tipo III, tendo como função principal nutrir e inervar o tendão, assim como, revestir as fibras colágenas, promovendo a união das mesmas. O paratendão é composto por colágenos tipos I e III, além de fibras elásticas e é revestido na face interna por células sinoviais, tendo como finalidade revestir o endotendão. O epitendão, reveste o feixe de fibras colágenas, com fibrilas longitudinais, oblíquas e transversais, sendo revestidos pelo paratendão juntamente com as bainhas externas do paratendão, formam o peritendão, o qual permite a movimentação do tendão (WU et al. 2015; NOURISSAT; BERENBAUM e DUPREZ et al., 2015)

Quando ocorre uma deformação dos tendões, inicialmente há um processo denominado desorganização das fibras tendíneas em forma de ondulações que favorece as modificações nas curvas de tensão de deformação, ocorre a deformação elástica do tendão, que dependendo do seu grau de deformação destas fibras, poderá ocasionar em ruptura total do tendão (WU et al. 2015; NOURISSAT; BERENBAUM e DUPREZ et al., 2015)

### **3.2 Função dos tendões**

Os tendões desempenham funções importantes, tais como: favorecer a inserção das fibras musculares nas regiões de proeminências ósseas, transmitir as forças advindas da contração muscular para o osso, resistir a forças de tensão, armazenar energia propulsora, funcionar como um dissipador de energia e possibilitar que o músculo realize o movimento articular (WU et al. 2015; NOURISSAT; BERENBAUM e DUPREZ et al., 2015)

### 3.3 Tendão calcâneo

O tendão calcâneo situa-se no compartimento superficial posterior da perna, constituído pela junção tendínea dos músculos do gastrocnêmio e sóleo, sendo o mais espesso e forte do corpo humano, o qual é composto por 70% de água. Em geral o tendão calcâneo tem como a principal finalidade direcionar a força transmitida pelos músculos gastrocnêmio e sóleo, além de realizar o movimento de flexão plantar do tornozelo (del SOL; JUNGE, 2011; DAYTON, 2016)

A região proximal do tendão calcâneo é constituída por uma estrutura típica do tendão e apresenta a função de resistir às forças de tração, enquanto que a região distal é constituída por fibrocartilagem que suporta compressão, tensão mecânica e estão sujeitas a possíveis lesões como as entesopatias (THORPE et al., 2015)

A vascularização do tendão calcâneo é realizada pela artéria fibular (porção lateral) e pela artéria tibial posterior (medialmente), assim como, pelos ramos da artéria poplítea (MOURA JUNIOR et al., 2015). Chen et al. (2009) ressaltaram em seu estudo que a remoção do paratendão ocasionaria uma falta de vascularização no tecido tendíneo.

### 3.4 Células do tendão

As células do tendão são constituídas principalmente por fibroblastos (tenoblastos e tenócitos), os quais se situam entre as fibras de colágeno e são os grandes responsáveis pela integridade da MEC. Os tenoblastos são células que apresentam características arredondas, dispostas com núcleo oval e ricas em organelas citoplasmáticas, enquanto que os tenócitos encontram-se dispostos em filas paralelas acompanhados de fibras de colágeno e uma morfologia alongada típica. Ao nível microscópico, células tendíneas, representam cerca de 90 a 95% dos aspectos celulares do tendão, os outros 5% a 10% compreendem os condrócitos em regiões de compressão e inserção, células sinoviais da bainha e células vasculares no endotenônio e no paratenônio (YU et al. 2013).

Os fibroblastos (tenoblastos e tenócitos) são caracterizados por intensa atividade sintética, demonstrada na ultraestrutura pela presença de retículo endoplasmático rugoso, complexo de Golgi, ribossomos livres e numerosas vesículas periféricas, com a maturidade essas células apresentam-se

metabolicamente menos ativas, alongadas e com poucos prolongamentos (YU et al. 2013).

Em tendões jovens, os tenócitos são mais numerosos e estão situados próximos às fibras colágenas e organizados longitudinalmente; os quais estão ativos na produção de energia, proliferação das fibras colágenas e de todos os elementos da matriz extracelular (KJÆR, 2004). São responsáveis por formar uma rede de comunicação celular permitindo uma reação coesa do tecido a forças externas, conseqüentemente, apresentando função importante sobre as ações mecânicas (KJÆR, 2004).

Os tenoblastos são células que variam de tamanho e forma, estão dispostos em fileiras fazendo conexões entre si e possuem numerosas organelas citoplasmáticas, favorecendo intensa atividade metabólica, durante o processo de remodelação tecidual (KJÆR, 2004.).

### **3.5 Lesões do tendão calcâneo e suas denominações**

Tendinopatia é um termo que se refere a uma desordem musculoesquelética que atinge os tendões do corpo humano (patelar, calcâneo, manguito rotador e os tecidos adjacentes) (CHEN et al. 2009; WOLF et al. 2012). Na prática baseada em evidências podemos encontrar três termos distintos (tendinite e tendinose).

O termo tendinite caracterizado pela presença de inflamações do tecido próprio dos tendões, com ou sem degeneração de suas fibras, a qual apresenta elementos celulares próprios, tais como de linfócitos e neutrófilos (KHAN et al. 2002) Já a tendinose caracteriza-se como processo degenerativo quando falha a reparação do tendão depois de um trauma ou de microtrauma crônicos marcados pela presença de fibroblastos ativos e hiperplasia vascular (KRAUSHAAR; NIRSCHL, 1998).

Estudos epidemiológicos publicados por Kearney et al. (2011); Krapf; Kaipel e Majewski (2012), Wilkins e Bisson (2012); Thevendran et al. (2013) e Del Buono et al. (2014), estimaram a incidência de tendinopatias, onde ressaltou-se que esta varia em torno de 6 a 18 casos por 100.000 habitantes, tornando-a uma condição patológica muito comum nas últimas 2 décadas. A etiologia é multifatorial e os seus sinais e sintomas incluem dor à palpação, dor ao movimento, alteração de sensibilidade focal, edema, fraqueza e restrição de mobilidade no sitio da lesão (DEL

BUONO et al. 2014)

A carga mecânica dissipada ao longo da jornada diária, bem como, o uso excessivo em atividades distintas associadas com a redução do suprimento sanguíneo na região do tendão, pode tornar o tendão mais susceptível a lesões por esforços, fazendo com que este esteja mais propício a apresentar uma reabilitação demorada, podendo variar de semanas até meses, impactando negativamente a qualidade de vida dos indivíduos (THORPE et al. 2015)

### **3.6 Reparo tecidual**

A compreensão dos mecanismos básicos em decorrência da aplicação dos recursos terapêuticos utilizados com o intuito de acelerar a cura e o reparo tendíneo em modelos animais tem sido alvo constante de investigação científica. O processo de reparo tecidual é um evento biológico complexo que desencadeia uma série de eventos fisiológicos no intuito de favorecer a cicatrização dos tecidos injuriados. A reparação tecidual é constituída por 3 fases: inflamatória (0-3 dias), proliferativa (4-14 dias) e remodeladora (21-28 dias até anos) (MILLAR; MURRELL; MCLNNES, 2013; THOMOPOULOS et al. 2015)

Nesse processo, há uma ativação de vários mediadores específicos com o intuito de promover o reparo adequado das estruturas envolvidas (plaquetas, mastócitos, neutrófilos e macrófagos). A inflamação aguda inicia-se com uma cascata de eventos por mediação das citocinas e quimiocinas, as quais atraem as células imunes, principalmente os neutrófilos a infiltrarem ao tecido danificado. Esse processo é normalmente auto-limitante porque ocorre a produção de citocinas pró-inflamatórias, seguido da produção das anti-inflamatórias as quais irão contribuir no processo de reparação tecidual. O processo inflamatório pode ser marcado por três fases distintas: inflamatória, proliferativa e remodeladora (MILLAR; MURRELL; MCLNNES, 2013; THOMOPOULOS et al. 2015)

A fase inflamatória inicia-se logo após a lesão, agindo como uma reação natural do organismo em relação a uma condição de agressão, a qual ocasiona a ruptura dos vasos sanguíneos, permitindo o preenchimento da área lesionada com plasma, fluidos e elementos celulares, principalmente plaquetas, ocasionando a vasoconstrição, agregação plaquetária e deposição de fibrina para a formação do coágulo, nessa etapa também ocorre a participação de mediadores químicos essenciais para o desenvolvimento desta etapa (MILLAR; MURRELL; MCLNNES,

2013; THOMOPOULOS et al. 2015)

Os neutrófilos são as primeiras células a migrarem ao sítio da lesão, sendo que o seu maior aglomerado pode ser encontrado entre 1 a 2 dias da lesão tecidual, o qual desempenha função de proteção contra eventos bacterianos (infecção), uma vez que estes produzem proteases e substâncias bioativas, que convertem citocinas que atuam na lesão de forma ativa ou inativa, podendo interferir no processo de reparo. Posteriormente os macrófagos, principal tipo celular da fase inflamatória, atuam de forma ativa sobre o processo de cicatrização por meio do incremento de citocinas e fatores de crescimento que contribuem na angiogênese, fibroplasia e síntese da MEC, componentes essenciais para desempenhar a transição para a fase proliferativa [60-62]. Qualquer inibição na função dos macrófagos retarda o processo de reparo, podendo haver o atraso na proliferação de fibroblastos, angiogênese, gerando uma fibrose inadequada. O resultado da fase inflamatória é o controle da inflamação, fase que dura aproximadamente 3 dias (CHEN et al. 2014; CHILDS e MURTHY, 2017).

A fase proliferativa ocorre a partir do 4<sup>o</sup> ao 21<sup>o</sup> dia, sendo representada principalmente pela angiogênese, formação de MEC e re-epitelização. Nesta fase, ambiente celular e as células inflamatórias, inicialmente presentes na matriz provisória, são substituídas por fibroblastos e células endoteliais, a partir da produção do TGF- $\beta$  e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que auxiliam a formação de novos vasos sanguíneos na região da lesão (CHEN et al. 2014; CHILDS e MURTHY, 2017).

Posteriormente, os fibroblastos vão se proliferando e migrando para a MEC provisória proveniente dos fibroblastos presentes nos tecidos adjacentes ou nas células indiferenciadas da região ao redor que, influenciadas por citocinas, como as PDGF e TGF- $\beta$ , as quais auxiliarão na produção de fibronectina que ajudarão a construir uma nova matriz (tecido de granulação), dando suporte na migração celular, sendo de extrema importância para o processo de reparação (WANG et al. 2017).

Os fibroblastos se proliferam e produzem proteínas da MEC (fibronectina, ácido hialurônico, colágeno e proteoglicanos), no intuito destes ajudarem a construir uma nova MEC dando suporte à migração celular, essencial para o processo de cicatrização. É de suma importância considerar que na fase proliferativa há uma

constante deposição de matriz, composta principalmente por colágeno do tipo III, tornando as fibras mais finas que o colágeno do tipo I, e suas fibrilas formam uma rede irregular e desorganizada no local da lesão. É importante ainda que nessa fase ocorra a formação dos novos capilares sanguíneos a partir da angiogênese, sendo responsável pelo fornecimento de oxigênio, especialmente na produção de energia por meio de ATP e nutrientes necessários ao metabolismo celular no local (CHILDS e MURTHY, 2017 e WANG et al. 2017).

A fase de remodelamento é a última fase do processo de reparo, a qual tem início cerca de 21º dia, podendo durar meses ou anos. Nesta fase, ocorre a redução da celularidade, seguida da diminuição da síntese da MEC e colágeno tipo III. O colágeno tipo III é substituído por colágeno tipo I, em um período de semanas a meses, o qual é mediado por um conjunto de metaloproteinasas (MMPs), que favorecem a degradação e remodelamento da MEC, incluindo colágenos fibrilares [60-63]. Durante a fase tardia, ocorre o aumento das ligações cruzadas entre as fibrilas de colágeno. Fibroblastos e fibras de colágeno tornam-se gradualmente alinhadas na direção de tensão, com formação de um tecido cicatricial mais maduro, o qual pode demorar um ano ou mais para finalização da fase (CHILDS e MURTHY, 2017 e WANG et al. 2017).

Na inflamação crônica o tecido apresenta caracteristicamente um infiltrado constituído por células mononucleares (monócitos, macrófagos e linfócitos), enquanto que inflamação aguda os monócitos diferenciam-se em macrófagos e cumprem papéis fisiológicos importantes, fagocitando patógenos, detritos celulares ou contribuindo para o reparo tecidual através da liberação de citocinas que induzem revascularização ou recrutamento de fibroblastos com formação da matriz extracelular (MILLAR; MURRELL; MCLNNES, 2013; THOMOPOULOS et al. 2015)

A ativação plaquetária favorece a liberação de grânulos alfa, responsáveis por secretarem fatores de crescimento: fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento básico de fibroblastos (bFGF), fator de crescimento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), sendo que este último junto com a interleucina (IL-1) promovem a quimiotaxia de neutrófilos para as áreas lesionadas (MILLAR; MURRELL; MCLNNES, 2013; THOMOPOULOS et al. 2015).

### 3.7 Métodos de tratamentos empregados no reparo tecidual

Atualmente, os principais estudos científicos publicados acerca da reparação tecidual têm buscado investigar, de forma incessante, as principais modalidades terapêuticas utilizadas com intuito de favorecer a reparação do tendão calcâneo em modelos experimentais (ratos), analisando-se a evolução em diferentes tempos experimentais, e testando diferentes dosimetrias da terapia empregada. Acredita-se que a utilização da FBM (uso do LBI e LEDs de baixa intensidade) (LARAIA et al. 2012; de JESUS et al. 2014; ALIODOUST et al. 2014; de JESUS et al. 2015; ALLAHVERDI et al. 2016 e GOMES et al. 2017) e extratos vegetais (fitoterapia) [ARO et al. 2015; VIEIRA et al., 2016; SOEMARIE, 2016; LUTHFI et al. 2020 e LUTHFI; JULIASTUTI e RISKY et al. 2020) quando administrados de maneira adequada, estimulam favoravelmente a reparação tecidual, diminuindo o tempo de cicatrização, uma vez que os recursos que emitem ondas mecânicas, como UST e os eletromagnéticos (LBI e LED) promovem aumento da circulação sanguínea local favorecendo a angiogênese, incrementando a reparação dos tecidos moles e regeneração tissular através da maior proliferação proteica por ativação da bomba de cálcio. Porém, os resultados acerca da utilização de extratos vegetais (fitoterapia) não apresentam ainda na literatura resultados acerca dos seus principais mecanismos de ação e indução da resposta inflamatória.

### 3.8 Fotobiomodulação por Laser de Baixa Intensidade

O emprego da FBM por LBI tem sido estudado há aproximadamente 45 anos, visto que a FBM é considerada alternativa terapêutica eficaz para induzir respostas quanto a neovascularização e a indução do processo de cicatrização. A FBM vem sendo utilizada para acelerar o processo de reparo de diferentes tecidos, incluindo tecido muscular, promovendo um aumento no número de mitose e o desenvolvimento de células epiteliais que resulta em aumento da vascularização e proliferação de colágeno pelos fibroblastos nos sítios da lesão (TORRES-SILVA et al., 2014). Pessoa et al. (2018) estabelecem em seu estudo de revisão que as fontes emissoras de luz do tipo laser (*light amplification by stimulated emission of radiation*) emitem radiação eletromagnética, as quais apresentam características próprias (monocromática, coerente e colimada) que as diferem de outras fontes de luz convencionais.

A emissão de ondas eletromagnéticas pela FBI pode ser classificada em vermelho (visível) e infravermelho (invisível). A irradiação no espectro eletromagnético do visível varia em torno de 600 a 690 nanômetros (nm), a qual tem por finalidade favorecer a proliferação e diferenciação celular, apresentando coeficiente de absorção de até 1 mm, sendo indicado, principalmente para o tratamento de lesões superficiais, enquanto que o laser no infravermelho varia entre 700 a 904 nm, possui um coeficiente de absorção de 3 mm e na prática clínica é utilizado para o tratamento de tecidos biológicos profundos (BENSADOUN; NAIR, 2015).

Xavier et al. (2012) enfatizaram em sua pesquisa que a FBM promove efeitos biológicos nos tecidos através do fornecimento de energia luminosa que é metabolizada pelas células produzindo efeitos diretos, indiretos e terapêuticos gerais (analgésico, anti-inflamatório e antiedematoso) mediante à maior síntese de ATP e também ativação da microcirculação periférica, que resulta em alterações na pressão hidrostática capilar, reduzindo o edema e eliminando o acúmulo de metabólitos intermediários.

A FBM é capaz de interagir com fotorreceptores encontrados nas mitocôndrias, visto que essas organelas possuem a enzima citocromo-c oxidase, que é responsável pelo transporte de elétrons e síntese de ATP (KARU; PYATIBRAT; AFANASYEVA, 2005; KARU et al., 2014). A síntese de ATP ocorre a partir da modulação enzimática da citrato sintase, a qual atua sob o ciclo de Krebs, promovendo o aumento da produção de ATP (FERRARESI et al., 2015). Associada ao aumento da função mitocondrial e da perfusão sanguínea, em virtude da inibição do ácido araquidônico, seguido da redução na expressão da enzima cicloxigenase-2 (COX-2) e produção de prostaglandina E2, a fototerapia pode regular os fatores de modulação ligados ao mRNA de citocinas pró-inflamatórias (ALBERTINI et al., 2007), evitando o processo de isquemia local por meio da liberação temporária de óxido nítrico, promovendo a resposta anti-inflamatória (LEAL JUNIOR et al., 2009).

### **3.9 Fitoterapia**

Os fitoterápicos são recursos vegetais padronizados constituídos por misturas de uma ou mais substâncias presentes na planta que são preparados adequadamente e posteriormente prescritos em obediência à legislação vigente. De

modo geral, os compostos fitoterápicos podem ser utilizados em diferentes formulações, tais como: cápsulas, comprimidos, géis, pomadas, soluções aquosas, soluções hidroalcoólicas e infusões (MACHADO e OLIVEIRA, 2014)

Na população brasileira observa-se que houve um crescimento na utilização de fitoterápicos, onde os avanços ocorridos na área científica que permitiram o desenvolvimento de recursos vegetais reconhecidamente seguros e eficazes pode justificar esse crescimento. A ênfase nos estudos das plantas medicinais e sua influência na manutenção da saúde têm canalizado esforços para a comprovação da ação terapêutica (BRUNING, MOSEGUI; VIANNA, 2012)

A literatura vem demonstrando que o número de pesquisas experimentais vem sendo amplamente empregadas com intuito de investigar os reais efeitos dos extratos vegetais no tratamento da reparação tecidual. Aiyegbusi et al. (2010) investigaram os efeitos do extrato aquoso da planta do abacaxi na proliferação de tenoblasto do tendão no estágio inicial de cicatrização em uma lesão por esmagamento no tendão de Aquiles, onde foi comprovado que os constituintes antioxidantes estão concentrados na polpa, enquanto que as extrações em forma de gel devido a extração da casca têm potencial para promover a cicatrização, estimulando a proliferação de tenoblastos.

Já Maia-Filho et al. (2010) compararam o uso tópico de gel de Aloe vera, ultrassom em modo pulsado (US) e fonoforese de Aloe vera em pata de rato com tendinite induzida por collagenase. Foi possível evidenciar que o extrato de Aloe vera potencializou a ação do gel reduzindo o edema e o número de células inflamatórias, promovendo o rearranjo das fibras de colágeno e promovendo também a recuperação da resistência à tração e elasticidade do tendão inflamado para recuperar seu estado normal pré-lesão.

Aro et al. (2013) avaliaram o potencial farmacológico da Aloe vera sobre o conteúdo e arranjo dos glicosaminoglicanos (GAGs) durante a cicatrização do tendão, que foi baseado na eficácia de A. vera na organização do colágeno. Neste estudo não foram encontrados efeitos significativos não foram observadas diferenças no número de fibroblastos, células inflamatórias e vasos sanguíneos entre os grupos.

### **3.10 *Abelmoschus esculentus* linn (quiabo)**

A espécie *Abelmoschus Esculentus Linn* (*A. esculentus* L), popularmente conhecido como quiabeiro, é a planta responsável pela produção do quiabo, uma hortaliça importante da culinária brasileira, pertencente à família *Malvaceae*. Acredita-se que o quiabeiro tenha origens de cultivado na África tropical, embora haja outras hipóteses como o Egito, onde o rio Nilo poderia ter proporcionado o desenvolvimento da planta. No Brasil, sugere-se que o estado da Bahia, na região nordeste permitiu a disseminação da planta pelo país [105]. Atualmente, é cultivado principalmente na Ásia, no oriente médio e no sul dos EUA (MAIRUAE et al. 2015)

O quiabeiro é uma espécie originária de clima quente, por isso não suporta baixas temperaturas, e seu cultivo apresenta melhores resultados na época quente e chuvosa do ano. Em geral o cultivo do quiabo apresenta um período de cultura de 60 a 75 dias na estação de primavera-verão e, de 90 a 110 dias, no outono-inverno (LUTHFI, JULIASTUTI, RISKY, 2020 e MOREIRA et al. 2020).

A ingestão do quiabo na dieta da população propicia inúmeros benefícios, uma vez que o mesmo apresenta fontes de proteínas, açúcares solúveis, polissacarídeos como amido, a celuloses e hemiceluloses, fibras, gorduras e minerais, vitamina A, B1, C e possui ainda em sua composição minerais como o cálcio e o ferro, contribuindo para o bom funcionamento do sistema digestivo por apresentar polissacarídeos de cadeia longa. Além disso, o mesmo apresenta propriedades medicinais, dentre as quais se destacam a ação antidiabética e atividade antioxidante, visto que a semente de quiabo é rica em vários flavonóides, incluindo a quercetina e rutina (MAIRUAE et al. 2015; TONGJAROENBUAM et al. 2011).

Vários estudos foram realizados acerca das principais particularidades do *A. esculentus* L, tais como: caracterizações químicas e físico-químicas (KONTOGIORGOS et al., 2012; ALAMRI; MOHAMED; HUSSAIN, 2013) aplicações farmacêuticas (ALAMRI; MOHAMED; HUSSAIN, 2013; DURAZZO et al. 2018) modificações estruturais (MISHRA; CLARCK; PAL, 2008) e bio-floculantes (LEE et al. 2015). Ressalta-se também vantagens pelo fato de serem biodegradáveis, biocompatíveis, não-tóxicas (LI et al. 2019).

Em aplicações biomédicas alguns estudos enfatizam o emprego do extrato *Abelmoschus Esculents Linn* na redução do processo inflamatório, sobre a dor e a proliferação de fibras colágenas. Wahyuningsih et al. (2020) determinaram os efeitos do extrato de *Abelmoschus esculentus* L. contra a toxicidade do acetato de chumbo

em rim de camundongos, onde observou-se, extrato de metanol tem um efeito antioxidante muito forte e pode reduzir a influência da toxicidade induzida. Tang et al. (2017) investigaram o efeito do *Abelmoschus esculentus* linn na capacidade angiogênica em camundongos e, comprovaram que o extrato pode aumentar a capacidade angiogênica nos sítios de lesão, sendo indicado para cicatrização de feridas e lesões isquêmicas/reperfusão.



## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da fotobiomodulação (FBM) por laser de baixa intensidade (LBI) associada ou não ao extrato “*Abelmoschus Esculentus Linn*”, no tratamento da tendinite do tendão calcâneo experimentalmente induzida via colagenase em ratos *Wistar*.

### 4.2 Objetivos específicos

- Avaliar qualitativamente e quantitativamente o número de células inflamatórias na fase inicial (fase aguda) e tardia (subaguda) da reparação tecidual nos animais submetidos ao procedimento experimental de tendinite via colagenase e, tratados com a FBM por LBI associada ou não ao extrato “*Abelmoschus Esculentus Linn*”.
- Investigar quantitativamente a proliferação de fibroblastos na fase inicial (fase aguda) e tardia (subaguda) da reparação tecidual nos animais submetidos ao procedimento experimental de tendinite via colagenase.
- Investigar qualitativamente e quantitativamente a porcentagem média das fibras colágenas (I e III) presentes fase inicial (fase aguda) e tardia (subaguda) dos animais submetidos a lesão.

## 5. METODOLOGIA

### 5.1 Aspectos éticos e legais

Este trabalho foi realizado em modelo *in vivo* (modelo animal). Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os padrões estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e através das recomendações das diretrizes nacionais para o tratamento animais em laboratórios. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Pesquisa em Animais (CEUA), do UNIFSA, através do protocolo (nº11.533/19).

### 5.2 Local do estudo

A pesquisa foi realizada no laboratório de Fisiologia do UniFSA, situado na avenida Walter Alencar, nº665, bem como, no laboratório de análises clínicas e ciências farmacêuticas do anexo I do UniFSA, ambos localizados no bairro São Pedro em Teresina – Piauí.

### 5.3 Animais

Para essa experimentação animal, foram utilizados 40 ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) com massa corporal de  $235 \pm 8,3$  g e com 3 meses de idade, sendo distribuídos em 4 grupos iguais. Cada grupo (n=10) foi avaliado nos momentos 7 dias (n=5) e 14 dias (n=5). Os animais foram oriundos do biotério do UNIFSA, alojados em gaiolas padrão de polipropileno (cinco por gaiola) e receberam alimentação a base de ração (Presence Ratos e Camundongos, Invivo Nutrição e Saúde Animal Ltda., Paulínia, SP, Brasil) e água *ad libitum*, sob ciclo claro escuro de 12h/12h, com temperatura controlada de 24 °C. Foi respeitado, antes que se iniciasse a pesquisa, um período de ambientalização de 7 dias.

### 5.4 Grupos experimentais

Antes da indução da tendinite, 40 animais foram distribuídos aleatoriamente em 8 gaiolas distintas, devidamente por meio de códigos de randomização (as gaiolas receberam padronização numérica específica) e o avaliador cego (não teve envolvimento com trabalho) realizou o sorteio, por meio de 2 envelopes (um continha

as numerações das gaiolas e no outro continha as denominações dos tratamentos a serem aplicados.

Os animais foram mantidos em gaiola de polipropileno sendo assim, foram organizados nos seguintes grupo: grupo controle (GC), grupo extrato (*Abelmoschus Esculentus* Linn), grupo fotobiomodulação e grupo associado (FBM + extrato). Como procedimento padrão antes de qualquer manipulação com os animais, a pata direita passava por um processo de limpeza com álcool iodado a 2% (Rio Químico Ltda., São José do Rio Preto, SP, Brasil), uma vez que crostas poderiam ser formadas mediante aplicação do extrato vegetal e por isso, essa conduta serviu como base para todas as manipulações com os animais. Abaixo estão descritos os grupos experimentais que foram estudados:

Tabela 1: Delineamento detalhado dos grupos experimentais do presente estudo

Grupo	Intervenção	Eutanásia
Grupo controle (GC)	10 animais foram submetidos a injeção de colagenase, os quais estavam mantidos em gaiolas individuais não recebendo qualquer tipo de intervenção.	7 e 14 dias
Associado (laser + extrato) (AS)	10 animais foram submetidos a injeção de colagenase, os quais estavam mantidos em gaiolas individuais recebendo o tratamento por meio da FBM por LBI associada aplicação tópica do extrato AEL.	7 e 14 dias
Extrato (EX)	10 animais foram submetidos a injeção de colagenase, os quais estavam mantidos em gaiolas individuais, recebendo a terapêutica tópica do extrato AEL.	7 e 14 dias
Fotobiomodulação (FBM)	10 animais foram submetidos a injeção de colagenase, os quais estavam mantidos em gaiolas individuais recebendo o tratamento por meio da FBM por LBI associada aplicação tópica do extrato AEL.	7 e 14 dias

Fonte: Autor, 2020

## 5.5 Modelo experimental de tendinite

Os animais receberam um tratamento pré-anestésico com sulfato de atropina, 0.25 mg/mL (Atrifarma®, Indústria Química Farmacêutica Cearense Ltda., Barbalha, Ceará (CE), Brasil) na dose de 0,04 mL/100 g do peso corporal, administrada por via subcutânea para evitar edema pulmonar. Esperou-se em torno de 15 minutos para realização da conduta anestésica usando 10% de cloridato de cetamina (Cetamin® 10%, Rhobifarma Indústria Farmacêutica Ltda., Hortolândia, São Paulo, Brasil) e 2% de cloridato de Xilazina (Xilazin® 2% Rhobifarma Indústria Farmacêutica Ltda., Hortolândia, São Paulo, Brasil) na concentração de 0,1 mL/100 g por via intraperitoneal (TORRES-SILVA et al. 2015; NATERSTAD et al. 2018).

A tendinite experimental foi realizada na pata direita dos animais, mediante injeção intratendinosa de 10 µL de colagenase (10 mg/mL<sup>-1</sup>; SIGMA C6885®, Sigma Pharma Indústria Farmacêutica Ltda, São Paulo, Brasil). A colagenase (10 mg) foi dissolvida em uma solução salina estéril tamponada com fosfato (1 mL) (TORRES-SILVA et al. 2015; NATERSTAD et al. 2018).

Figura 1: Indução experimental da tendinite via colagenase no tendão da pata direita dos ratos



Fonte: Laboratório de fisiologia do UniFSA.

## 5.6 Intervenção terapêutica experimental

O tratamento de cada animal teve início 24 horas após indução da tendinite via colagenase em cada grupo experimental. As intervenções experimentais foram instituídas a cada 24 horas (após a primeira sessão), cuidando-se para que todos tivessem a mesma manipulação diária em mesmo horário. Para a realização do procedimento terapêutico, os ratos foram mantidos em decúbito ventral, em uma bancada devidamente padronizada com tecido não texturizado, onde houve, a imobilização da pata direita do animal para aplicação dos recursos propostos (TORRES-SILVA et al. 2015; NATERSTAD et al. 2018)..

## 5.7 Equipamentos

Com intuito de estimular a reparação do tendão calcâneo dos animais, foi utilizado um equipamento de Laser que emite radiação no espectro eletromagnético do infravermelho próximo (830 nm).

Figura 2: Aparelho de FBM por LBI empregado no presente estudo



Fonte: Google imagens

## 5.8 Fotobiomodulação (FBM) por Laser de Baixa Intensidade

A FBM foi realizada usando um laser de baixa potência de arseneto de gálio e alumínio (AsGaAl) (Ibramed®, Laserpulse, ANVISA: 10360310030, São Paulo, Brasil), devidamente calibrado (Anexo 2). A cada sessão a pata do animal era limpa

com aplicação de álcool a 70%, visto que essa medida era necessária para que não houvesse formação de barreiras para aplicação da FBM por LBI.

Para este estudo foram adotadas as seguintes dosimetrias: comprimento de onda de 830 nm, potência de 50 mW, área do feixe de 0,11 cm<sup>2</sup>, densidade de potência 0,45 W/cm<sup>2</sup>, tempo de irradiação de 80 segundos, energia 4 J por ponto, densidade de energia de 36,3 J/cm<sup>2</sup>.

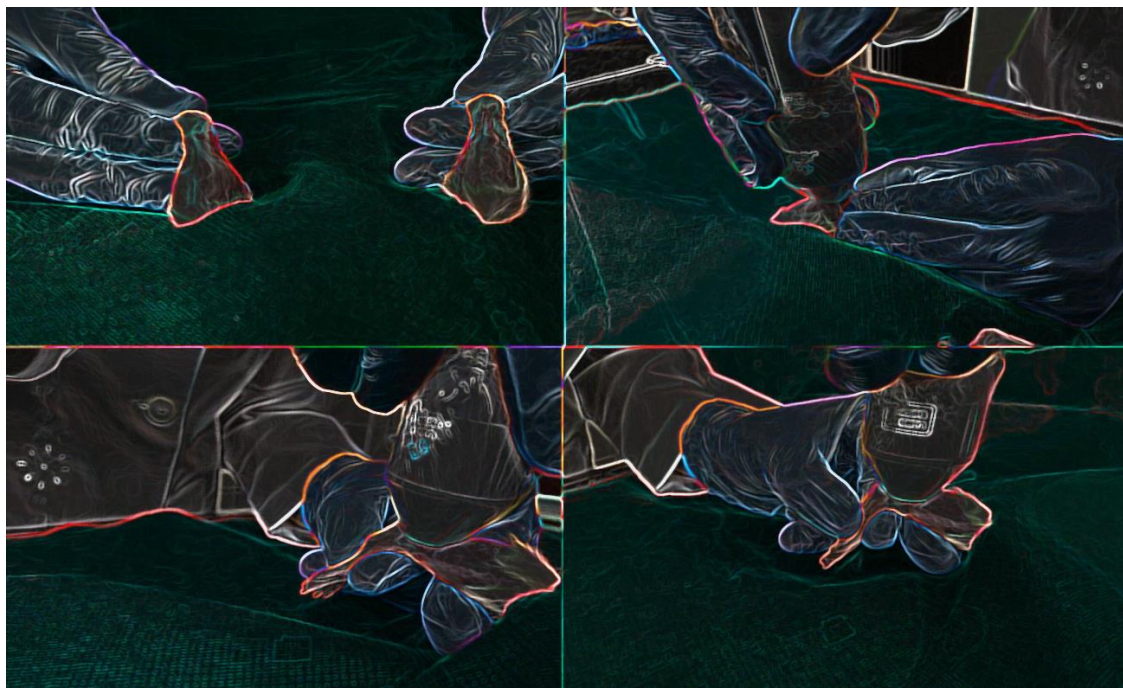
Tabela 2. Parâmetros da FBM que foram empregados no presente estudo

<b>Parâmetros</b>	<b>Valores</b>
Potência (mW)	50
Área do Feixe (cm <sup>2</sup> )	0,11
Diodo semicondutor	AsGaAl
Comprimento de onda (nm)	830
Energia (J)	4
Densidade de energia (J/cm <sup>2</sup> )	36,3
Densidade de Potência (W/cm <sup>2</sup> )	0,45
Tempo de Irradiação (s)	80
Número de Pontos	01
Técnica de contato com leve pressão	

Fonte: Autores, 2020.

Os ratos foram posicionados em decúbito ventral com imobilização manual da pata direita para aplicação da terapêutica indicada em contato direto com a área a ser tratada. A aplicação da FBM se deu de forma pontual, aparelho posicionado a 90° do eixo tendíneo, e o feixe de luz emitido cobriu por inteiro o sítio da lesão.

Figura 3: Demonstração da intervenção baseada na FBM por LBI nos animais submetidos ao tratamento.



Fonte: Laboratório de Fisiologia do UniFSA

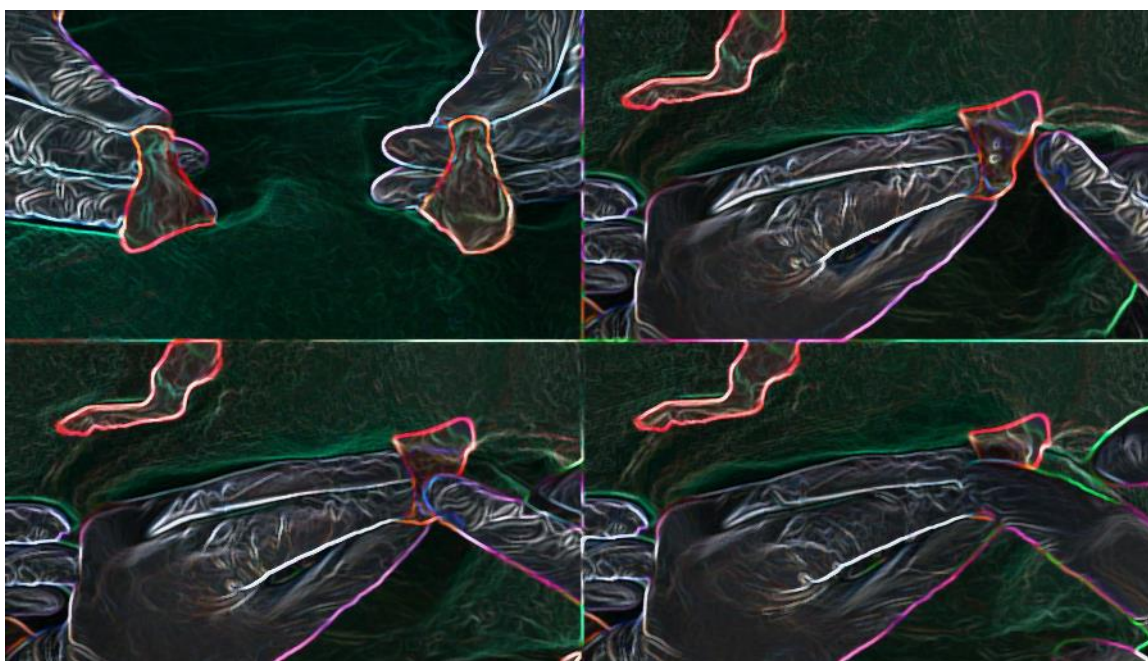
### 5.9 Preparação e aplicação do extrato *Abelmoschus Escullents Linn*

Para o preparo do extrato *Abelmoschus Escullents Linn*, seguiu-se a padronização proposta por Luthfi et al. (2020) e Luthfi et al (2020). As frutas frescas de quiabo adquiridas na cidade de Teresina – Piauí foram lavadas com água corrente, trituradas em liquidificador e armazenadas em frasco de vidro fechado por 24 horas. A mistura foi agitada a 50 rotações por minutos (rpm), filtradas e, posteriormente coletada em um tubo de ensaio. O extrato líquido foi evaporado em evaporador rotativo por 90 minutos e armazenado. Os ingredientes básicos para compor o gel de AEL foram Carboxil Metil Celulose Natrium (CMC-Na) 3% (Fochem, Shanghai, China). O pó de CMC-Na 3% foi diluído em 100 mL de água morna a 28°C. Esse pó foi adicionado gradualmente à água para facilitar a dispersão. A mistura foi deixada por 10-15 minutos até formar um gel suave e transparente e foi posteriormente misturada através de um backer até ficar homogêneo, adicionando água lentamente para obter o volume de 100 mL. Por fim, para se obter a fruta de quiabo na forma de gel na concentração de 30%, até 3 mL de extrato foram misturados com 7 mL de CMC-Na 3%. Todos os procedimentos foram realizados na clínica escola de Farmácia do UniFSA.

A aplicação do extrato foi realizada de forma tópica no tendão da pata direita do animal, onde os animais aguardaram cerca de 15 minutos pós-aplicação para

que os mesmos retornassem para a gaiola. Para aplicação do extrato por via tópica adotou-se o volume necessário para recobrir a área do tendão lesionado. Ainda sobre aplicação do extrato é de suma importância considerar que aplicação da FBM por LBI foi a primeira terapia a ser institucionalizada, após um tempo de 10 minutos, realizou-se aplicação do extrato vegetal.

Figura 4: Demonstração da intervenção baseada na aplicação tópica do EX (AEL) nos animais submetidos pela proposta intervencional proposta.



Fonte: Laboratório de Fisiologia do UniFSA

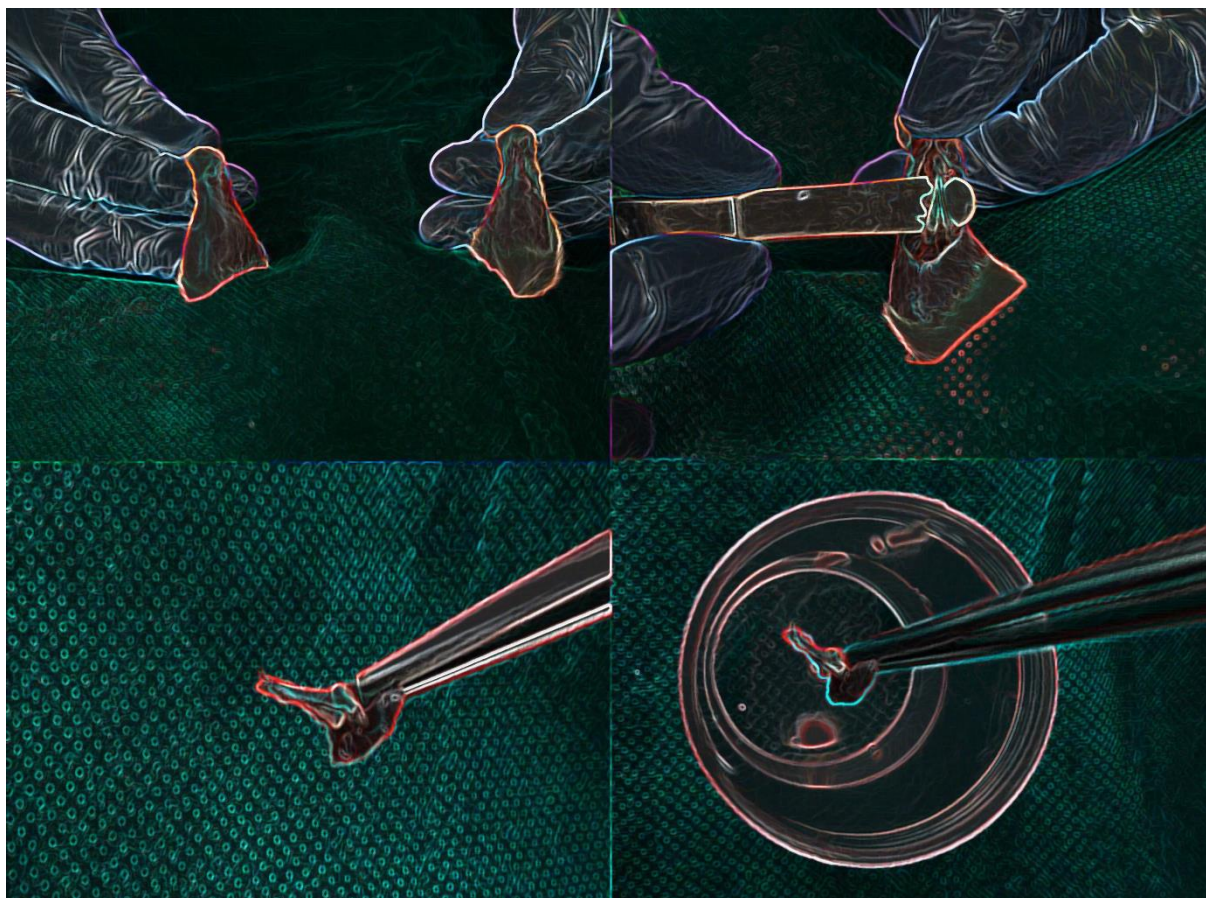
### 5.10 Eutanásia dos animais

A eutanásia dos animais foi realizada a partir de uma sobre dosagem anestésica intraperitoneal de 150 mg/kg de tiopental de sódio (Thiopentax®, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos. Ltda., São Paulo, SP, Brasil), nos respectivos períodos experimentais (7 e 14 dias) (TORRES-SILVA et al. 2015; NATERSTAD et al. 2018).

### 5.11 Análise histológica

O tendão calcâneo da pata direita dos animais foi desidratado em soluções crescentes de álcool e diafanizados em Xilol e, então, incluídos em solução de formaldeído (10%) (MOURA JUNIOR et al., 2015).

Figura 5: Demonstração da remoção do tendão calcâneo dos animais após a eutanásia.



Fonte: Laboratório de Fisiologia do UniFSA.

Posteriormente, foram realizados quatro cortes semi-seriados com 5  $\mu\text{m}$  de espessura por animal em um micrótomo (modelo 820®, American Optical Co., Nova York, NY, EUA), corados com hematoxilina e eosina (HE) para avaliar células inflamatórias (totais) e fibroblastos, assim como parte do material foi corado com picrossírius red para avaliar as fibras -colágenas (I e III). O material foi examinado em um microscópio trinocular (modelo Eclipse E200®, Nikon do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil), com objetivas plana cromáticas, com uma câmera digital (modelo Coolpix 5400®, Nikon do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil) com resolução de 2592 x 1944 pixels acoplada ao microscópio. Para contagem manual das células inflamatórias, realizou-se o reconhecimento morfológico delas, diferenciando-as de outros tipos celulares presentes nos cortes (MOURA JUNIOR et al., 2015)

As fotomicrografias foram realizadas em um aumento de 400x, com três capturas em campos aleatórios diferentes e, por fim, armazenadas no formato

JPEG. As imagens foram digitalizadas para a análise quantitativa das células inflamatórias e avaliadas a partir do programa de análise computacional de imagens Image J® (versão 1,32 para Windows, National Institute of Health, Bethesda, MD, EUA). Para contagem manual das células inflamatórias foram utilizados os seguintes comandos: “file”, “open” (arquivo com imagem da lâmina), “edit”, “selection”, “specify”, “image”, “crop” (especificar o tamanho da imagem a ser analisada), “plugin”, “analyze”, “cellcounter”, em seguida foi determinado um número para cada tipo de célula. Findada a contagem e clicando em “results”, obteve-se a quantidade de cada célula na imagem analisada (MOURA JUNIOR et al., 2015).

A análise histológica foi realizada através da microscopia de luz e os resultados registrados por uma análise quantitativa das células inflamatórias e fibroblastos [49]. As células inflamatórias foram identificadas de acordo com suas características histológicas (células pequenas com núcleo fortemente basófilo), assim como, os fibroblastos (células fusiformes com a presença de núcleos ovoides). Para interpretação dos achados histopatológicos adotou-se a metodologia acerca da contagem total de todas as células inflamatórias (sem delimitação dos seus tipos), assim como foi realizada com a mensuração dos fibroblastos (contagem dos tenocitos e tenoblastos).

### **5.12 Análise morfométrica dos tipos de colágeno (I e III)**

A análise morfométrica foi realizada através da captura de imagens e a análise computacional, por meio do programa processamento de imagens (Image Pro Plus 4.5). Para quantificar as fibras de colágeno tendíneo, foram observados três campos por lâmina usando um microscópio de luz polarizada (Carl Zeiss, PolInterferential Photomicroscope, Alemanha), acoplado a uma câmera CMOS colorida com resolução de 1280 × 1024 pixels e ampliação de 400x (Thorlabs GmbH, Alemanha), conectado a um microcomputador equipado com uma placa de vídeo. Todas as imagens foram digitalizadas antes do processo de quantificação, padronizando a intensidade da luz do microscópio e a altura do condensador (MARQUES et al. 2016).

As áreas de colágeno foram separadas na imagem, usando a distribuição de cores como parâmetro discriminante. Para análise da quantificação das fibras colágenas, os espécimes foram corados com *Picrosirius red*, um composto aniônico

que distingue a espessura e a densidade das fibras colágenas sob luz polarizada. Para análise do colágeno tipo III foram visualizadas e quantificadas as fibras com coloração esverdeadas, enquanto as fibras colágenas do tipo I, apresentaram a coloração vermelho (MARQUES et al., 2016).

Para análise por meio do programa *Image Pro Plus* foram utilizados os seguintes comandos: Abrir a pasta e selecionar a imagem. Em seguida, as imagens foram padronizadas em um tamanho de 50 X, seguida dos comandos “*Measure*” e “*Select Measurement*”, onde as imagens foram padronizadas em um campo de totalidade de 1.000.000. Após a padronização do campo da imagem, adotou-se a padronização das cores em vermelho (colágeno I) e verde (colágeno III) nas imagens analisadas e, a leitura das fotomicrográfiás, pelo programa, clicou-se no comando “*range statistic*” para apresentação dos resultados encontrados em porcentagem (colágeno I e III).

### 5.12 Análise estatística

Os dados foram avaliados quanto ao coeficiente de variação e a distribuição amostral para a determinação do teste estatístico. Realizou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov para a análise da distribuição dos dados. Devido a apresentação não paramétrica foi aplicado o teste *Wicoxon* na análise intragrupos. Para a comparação entre os grupos foi aplicado *Kruskal-Wallis test* com *post hoc* de *Dunn's Multiple Comparison Test* (comparações múltiplas – análise intergrupo). Foi considerando intervalo de confiança de 95% e nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Avaliação histológica e histomorfométrica

A figura 6 apresenta as fotomicrografias dos GC (A e B), AS (C e D), EX (E e F) e FBM (G e H). No GC (7 dias) foi encontrado fragmentos de tecido fibroconjuntivo, muscular esquelético e adiposo apresentando processo inflamatório linfo-monocitário (seta) discreto. Em tecido fibroconjuntivo em transição com tecido muscular esquelético observou-se foco de células macrofágicas xantomizadas (cabeça de seta) com moderada proliferação fibroblástica. Já nas micrografias do GC (14 dias) houve a presença fragmentos de tecido fibroconjuntivo, muscular esquelético e adiposo apresentando processo inflamatório linfocitário moderado (seta) em tecido conectivo com foco de degeneração de fibras colágenas e musculares associado (\*) a reatividade e proliferação fibroblástica periférica e intratecidual moderada (cabeça de seta).

No grupo EX (7 dias) verificou-se tecido tendinoso de morfologia típica exibindo fibroblastos ativados (cabeça de seta) (com núcleos estrelados e citoplasma escasso). Também se observa raros focos de neoformação vascular (\*). Não se observa infiltrado inflamatório significativo. Já ao 14<sup>o</sup> dia observa-se Tecido tendinoso dentro apresentando focos de atipia fibroblastica reacional (cabeça de seta) (núcleos ovalados, citoplasma escasso e rarefação de fibras colágenas). Frequentes focos de neoformação vascular associada (\*). Ausência de inflamação significativa.

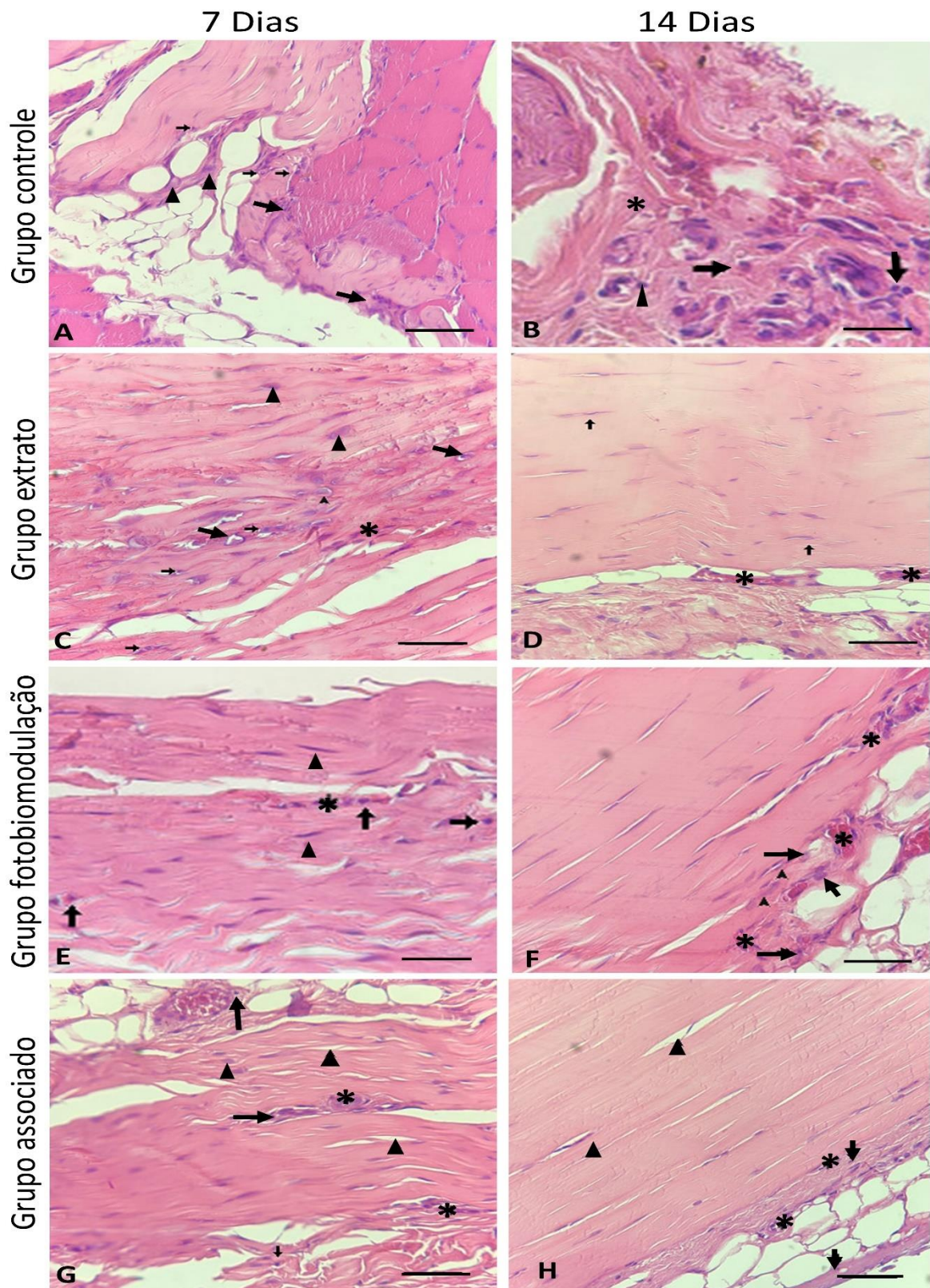
No grupo FBM (7 dias) foi identificado a presença de tecido tendinoso composto por fibroblastos fusiformes com núcleos ovalados (cabeça de seta) e apresentando focos de neoformação vascular (\*). Infiltrado linfomonocitário escasso (seta). Ao 14<sup>o</sup> dia, verificou-se tecido tendinoso apresentando fibroblastos de morfologia ativa, com frequentes mitoses (atipia reativa) (cabeça de seta), com núcleos ovalados e nucléolos evidentes. Observa-se moderada neoformação vascular (\*). Infiltrado linfomonocitário multifocal (seta).

No grupo AS (7 dias) verificou tecido tendíneo exibindo fibras colágenas fragmentadas (cabeça de seta), associado a focos de atipia fibroblastica exuberante (células de núcleos amplos, nucléolos evidentes e figuras de mitose ocasionais), moderada neoformação vascular (\*) e moderado infiltrado inflamatório linfo-

monocitário associado (seta). Já nas micrografias do AS (14 dias) observou-se tecido tendinoso majoritariamente preservado, apresentando focos de fragmentação de fibras colágenas (cabeça de seta) e atipia fibrobástica reativa discreta. Nestas áreas há moderada neoformação vascular (\*) e escasso infiltrado inflamatório linfomonocitário associado (seta).

**Figura 6** - Fotomicrografias dos aspectos histológicos das imagens coradas com HE dos animais submetidos a indução experimental de tendinite por collagenase.





**Legenda:** CG (grupo controle); EX (extrato); FBM (Fotobiomodulação); AS (associado). HE (hematoxilina e eosina). H&E, x400.

## 6.2 Número de células inflamatórias: análise intragrupos

Na análise intragrupo para o período estudado de 7-14 dias (tabela 7), é possível verificar que os grupos AS ( $p=0,043$ ) e FBM ( $p=0,010$ ) apresentaram resultados significativos sobre a redução de células inflamatórias, enquanto o grupo GC e EX não apresentaram resultados significativos.

Tabela 3. Avaliação intragrupos (média e erro-padrão).

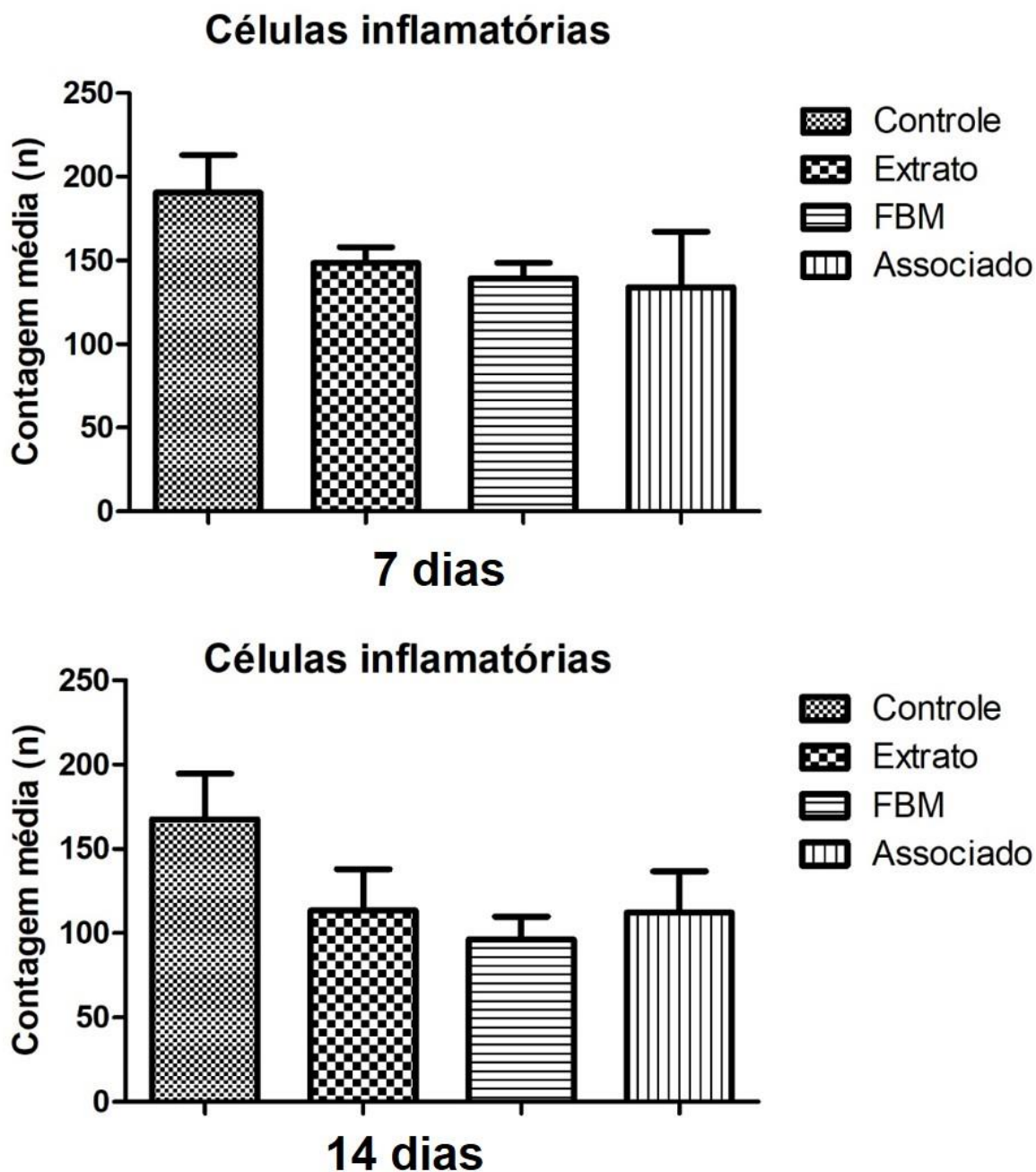
Grupos	Período (dias)		Análise (AIG)
	7	14	p (7-14)
<b>Controle (GC)</b>	190,6 ± 22,4	167,6 ± 27,1	0,056
<b>Extrato (EX)</b>	148,4 ± 9,68	113,4 ± 24,6	0,061
<b>FBM</b>	139,4 ± 9,30	96,4 ± 13,5	0,010*
<b>Associado (AS)</b>	134,0 ± 33,2	112,2 ± 24,6	0,043*

Legenda: **AIG**= Avaliação intragrupo; \*= Diferença significativa.

## 6.3 Número de células inflamatórias: análise intergrupos

Para análise da quantificação das células inflamatórias, optou-se por realizar a contagem manual de todos os tipos de células inflamatórias nas fotomicrografias analisadas (não havendo a discriminação de células inflamatórias específicas). A figura (7A e 7B) apresenta os resultados obtidos na análise intergrupos nos períodos estudados (7 e 14 dias). Foi observado que os grupos tratados não foram diferentes em relação ao GC quanto ao número de células inflamatórias. Para o período de 7 dias: GC *versus* AS ( $p=0.321$ ), GC *versus* EX ( $p=0.242$ ), GC *versus* FBM ( $p=0.058$ ); AS *versus* EX ( $p=0.694$ ), AS *versus* FBM ( $p=0.890$ ); EX *versus* FBM ( $p=0.572$ ). Para o período de 14 dias: GC *versus* AS ( $p=0.292$ ), GC *versus* EX ( $p=0.258$ ), GC *versus* FBM ( $p=0.071$ ); AS *versus* EX ( $p=0.975$ ), AS *versus* FBM ( $p=0.468$ ); EX *versus* FBM ( $p=0.641$ ).

**Figura 7.** Análise intergrupos sobre a contagem de células inflamatórias.



**Legenda:** Os gráficos representam a valores médios obtidos na análise da contagem de células inflamatórias nos tempos experimentais (7 e 14 dias). A análise intergrupo é representada pelos valores de  $p$  (neste resultado não observa-se resultados significativos) em comparação ao grupo controle, usando o teste *Kruskal-Wallis test* com *post hoc* de *Dunn's Multiple Comparison Test*. Os dados são

apresentados como média  $\pm$  DP.

#### 6.4 Número de Fibroblastos: análise intragrupos

Na análise intragrupo para o período de 7-14 dias (tabela 8), é possível verificar que o grupo GC aumentou o número de fibroblastos ( $p=0,0035$ ); e os grupos EX ( $p=0,172$ ) e AS ( $p=0,064$ ) diminuíram o número de fibroblastos sem significância estatística. Apenas o grupo FBM diminuiu significativamente o número de fibroblastos ( $p=0,013$ ).

Tabela 4. Avaliação intragrupos (média e erro-padrão).

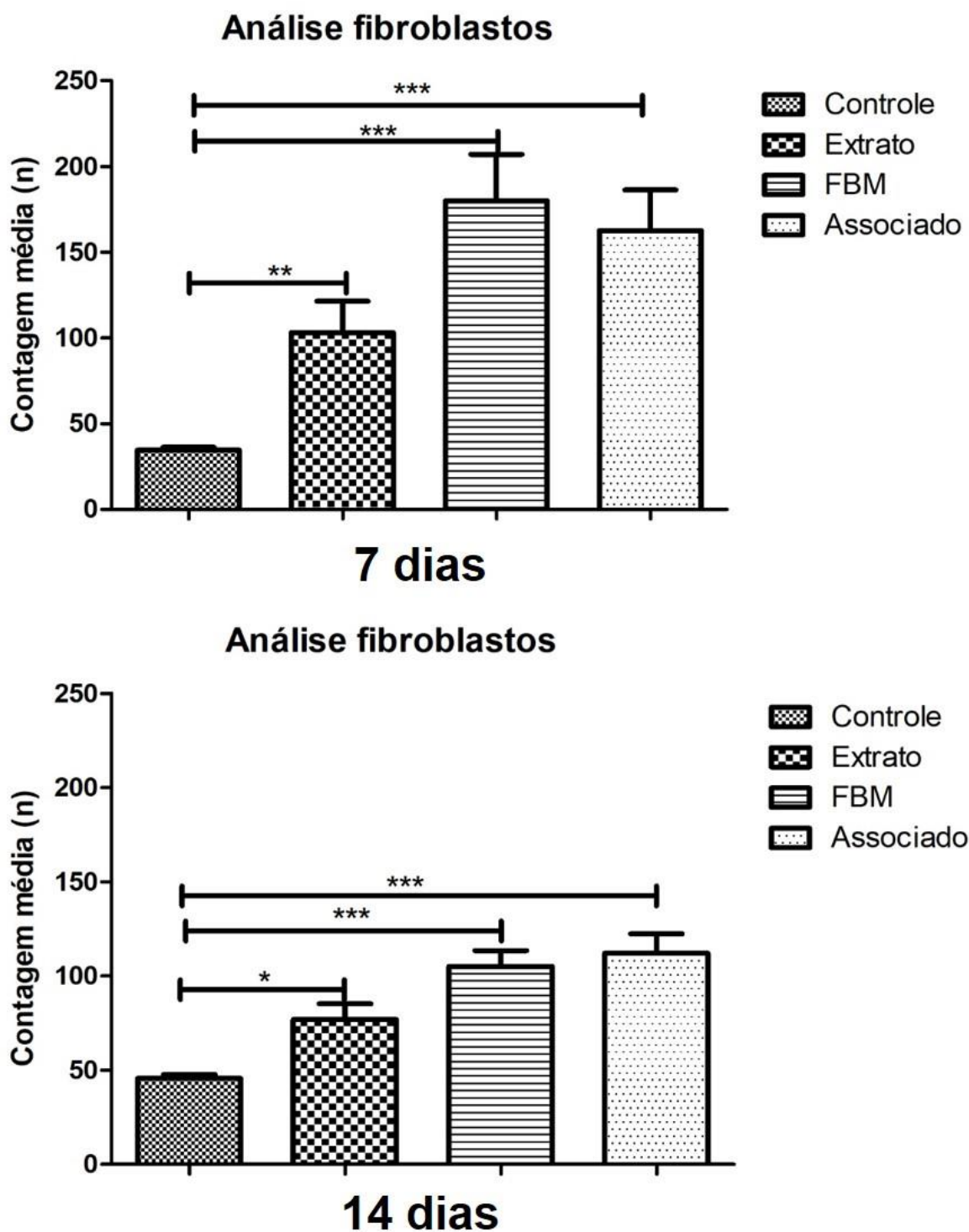
Grupos	Período (dias)		Análise (AIG)
	7	14	p (7-14)
<b>GC</b>	34,53 $\pm$ 1,61	45,73 $\pm$ 1,96	0,0035*
<b>EX</b>	103,2 $\pm$ 14,5	76,8 $\pm$ 8,3	0,172
<b>FBM</b>	180,1 $\pm$ 27,1	105,2 $\pm$ 8,2	0,013*
<b>AS</b>	162,7 $\pm$ 23,6	112,1 $\pm$ 10,3	0,064

Legenda: **AIG**= Avaliação intragrupo; \*= Diferença significativa.

#### 6.5 Número de Fibroblastos: análise intergrupos

Na análise intergrupos para os grupos tratados no 7º dia foi possível evidenciar que os grupos EX ( $p<0,001$ ), FBM ( $p<0,0001$ ) e AS ( $p<0,0001$ ) aumentaram significativamente a proliferação de fibroblastos em relação ao grupo controle (Figura 8A). Já ao 14º dia, foi possível evidenciar que o grupo FBM ( $p<0,0001$ ), AS ( $p<0,0001$ ) e EX ( $p<0,05$ ) mantiveram um maior número de fibroblastos quando comparados ao grupo controle em relação a proliferação de fibroblastos (Figura 8B).

Figura 8. Análise intergrupos sobre a proliferação de fibroblastos.



**Legenda:** Os gráficos representam a valores médios obtidos na análise da contagem de fibroblastos nos tempos experimentais (7 e 14 dias). A análise intergrupo é representada pelos valores de p (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*  $p < 0,0001$ )

em comparação ao grupo controle, usando o teste *Kruskal-Wallis test* com *post hoc* de *Dunn's Multiple Comparison Test*. Os dados são apresentados como média  $\pm$  DP.

### 6.6 Análise das fibras colágenas tipo I e III

A figura 9 apresenta os resultados obtidos nas fotomicrografias da análise das fibras colágenas pela microscopia de luz polarizada dos espécimes corados com picrossírius red.

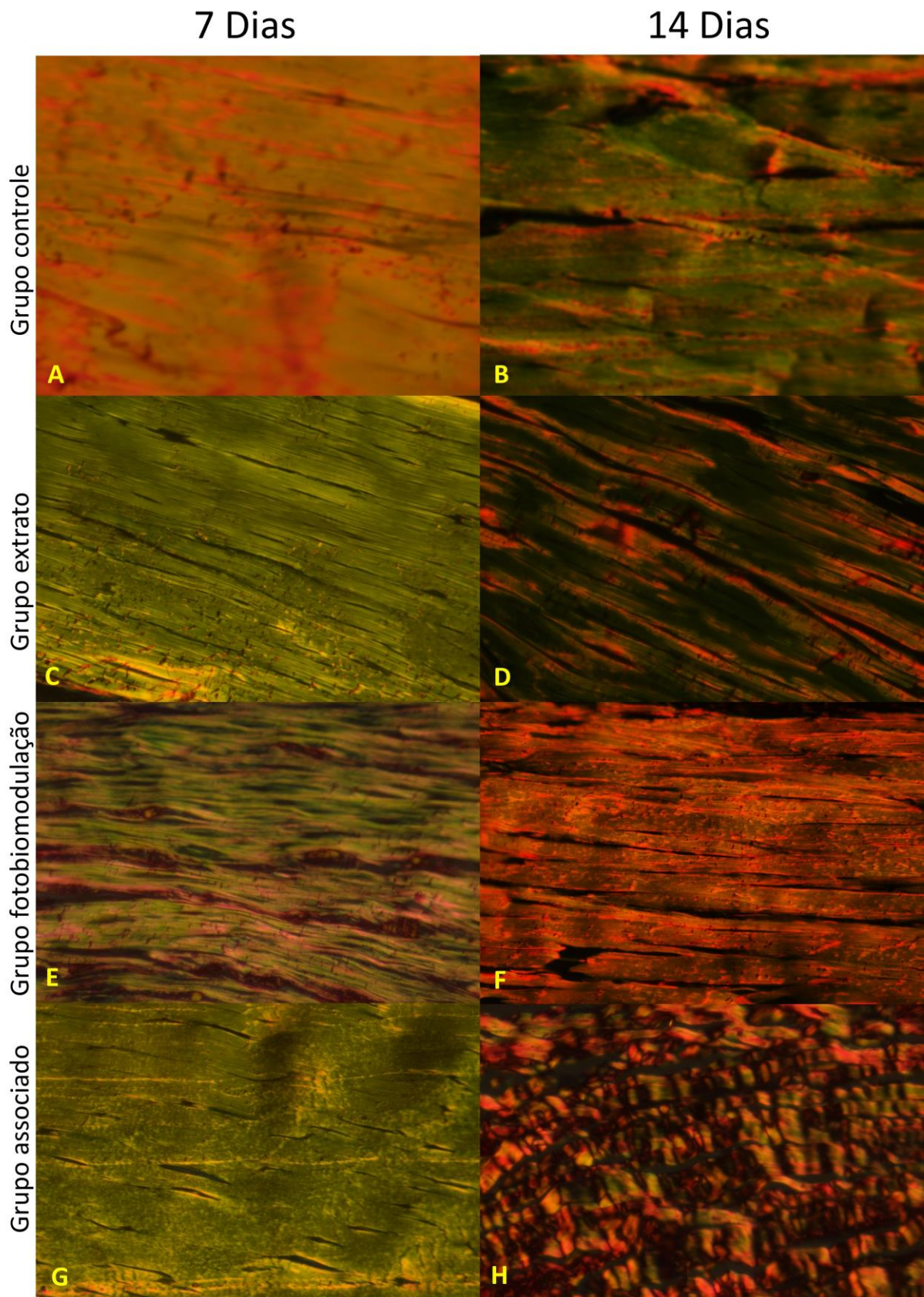
As figuras 9A (7° dia) e 9B (14° dia) para o GC mostraram a presença dos dois tipos de fibras de colágeno tipo I (vermelho) e III (verde), com predomínio do colágeno tipo III tanto no 7° dia quanto no 14° dia.

As figuras 9C (7° dia) e 9D (14° dia) para o grupo EX mostraram que no tempo experimental de 7 dias houve uma predominância de fibras colágeno tipo III. Entretanto é possível verificar que no 14ª dia houve uma proliferação mínima de fibras colágenas do tipo I para os animais tratados com o extrato. Nesse grupo também é notada falta de alinhamento das fibras colágenas acentuadamente no período de 14 dias.

AS figuras 9E (7° dia) e 9F (14° dia) apresentam maior proliferação das fibras colágenas do tipo III ao 7° dia no grupo FBM. No 14ª dia houve uma maior proliferação das fibras colágenas tipo I e uma redução considerável da proliferação das fibras colágenas do tipo III.

Por fim, as figuras 9G (7° dia) e 9H (14° dia) demonstraram que ao 7° dia houve maior proliferação de fibras colágenas do tipo III, enquanto que no 14° dia houve maior proliferação de fibras colágenas do tipo I associada à redução das fibras do tipo III nos animais tratados no grupo AS. Nesse grupo também é notada falta de alinhamento das fibras colágenas acentuadamente no período de 7 dias, e melhor alinhamento no período de 14 dias.

**Figura 9** - Análise morfométrica dos cortes histológicos corados com picrossírius red obtidos do tendão calcâneo para análise das fibras colágenas tipo I e III.



**Legenda:** grupo controle (GC); extrato (EX); fotobiomodulação (FBM); associado

(AS). Ampliação  $\times 40$ ; barra de escala = 20  $\mu\text{m}$ .

### 6.7 Fibras colágenas (I e III): análise intragrupos

A tabela 9 evidencia os resultados obtidos acerca da quantificação das fibras de colágeno I e III nos grupos estudados. Em relação a comparação dos tempos experimentais (7 e 14 dias), foi possível observar que houve uma proliferação efetiva das fibras colágenas (tipo I), nos grupos tratados com FBM ( $p=0,0043$ ), e associado ( $p=0,0249$ ), enquanto que no GC e EX não foi possível evidenciar resultados significativos. Em relação a análise do colágeno (tipo III) foi evidenciado que os grupos FBM ( $p=0,0043$ ) e AS ( $p=0,0277$ ) apresentaram resultados significativos quanto a diminuição da proliferação das fibras colágenas do tipo III. Entretanto, os grupos controle e extrato não apresentaram resultados significativos.

Tabela 5. Avaliação intragrupos (média e erro-padrão).

Grupos / TC (%)	Período (dias)			
	7	14	p (7-14)	
<b>GC</b>	CTI	14,53 $\pm$ 5,00	16,07 $\pm$ 4,09	0,6667
	CTIII	85,47 $\pm$ 5,00	83,93 $\pm$ 4,09	0,8035
<b>EX</b>	CTI	9,06 $\pm$ 3,02	28,73 $\pm$ 9,06	0,0556
	CTIII	90,20 $\pm$ 3,33	71,07 $\pm$ 9,05	0,0660
<b>FBM</b>	CTI	8,60 $\pm$ 4,64	44,13 $\pm$ 7,71	0,0043**
	CTIII	91,40 $\pm$ 4,64	55,67 $\pm$ 7,70	0,0043**
<b>AS</b>	CTI	12,20 $\pm$ 3,46	39,73 $\pm$ 8,46	0,0249*
	CTIII	87,67 $\pm$ 3,45	60,27 $\pm$ 8,46	0,0277*

Legenda: **TC**= Tipos de colágeno; **CTI**= Colágeno tipo I; **CTIII**= Colágeno Tipo III; **AIG**= Avaliação intragrupo; \*= Diferença significativa; **ns**= Diferença não significativa. GC = grupo controle; EX = extrato; FBM = fotobiomodulação; AS = associado.

### 6.8 Fibras colágeno tipo I: análise intergrupos

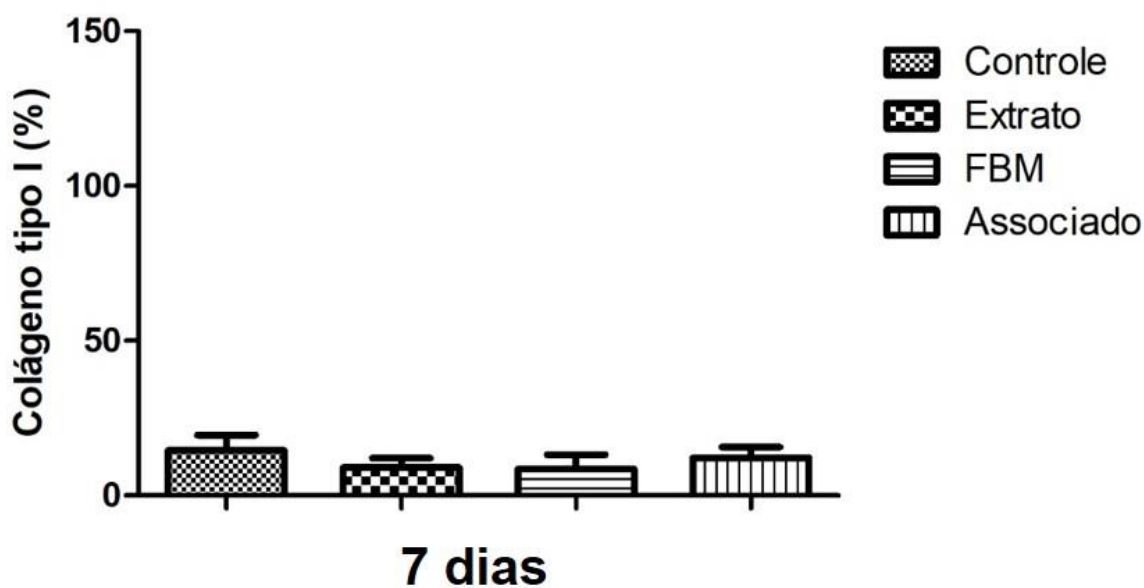
A figura 10 apresenta os resultados obtidos acerca da quantificação das fibras colágenas (tipo I) nos respectivos períodos experimentais (7 e 14 dias). Ao 7º dia não foi observado alterações significativa entre os grupos estudados em

comparação ao GC. Para o período de 7 dias: GC *versus* AS ( $p=0.667$ ), GC *versus* EX ( $p=0.382$ ), GC *versus* FBM ( $p=0.419$ ); AS *versus* EX ( $p=0.540$ ), AS *versus* FBM ( $p=0.560$ ); EX *versus* FBM ( $p=0.902$ ). Já ao 14<sup>o</sup> dia foi possível verificar que os grupos AS ( $p<0.05$ ) e FBM ( $p<0.001$ ) apresentaram aumento significativo na produção de fibras colágenas quando comparados ao GC. Para o período de 14 dias: GC *versus* AS ( $p=0.05$ ), GC *versus* EX ( $p=0.114$ ), GC *versus* FBM ( $p=0.001$ ); AS *versus* EX ( $p=0.408$ ), AS *versus* FBM ( $p=0.743$ ); EX *versus* FBM ( $p=0.172$ ).

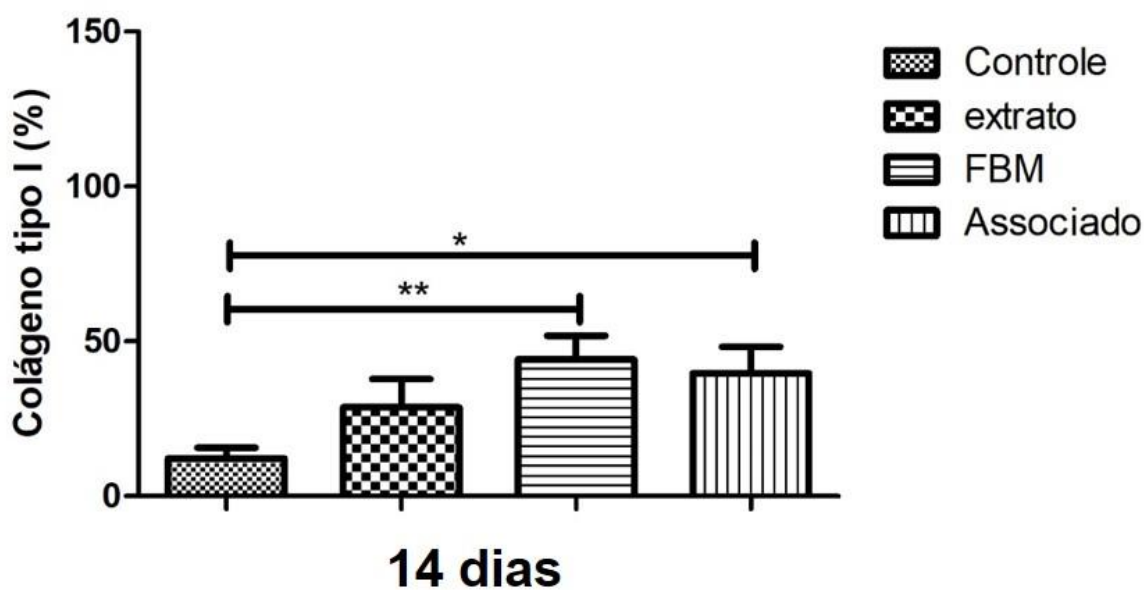
**Figura 10.** Análise intergrupos sobre a proliferação das fibras colágenas tipo I



## Colágeno I



## Colágeno I

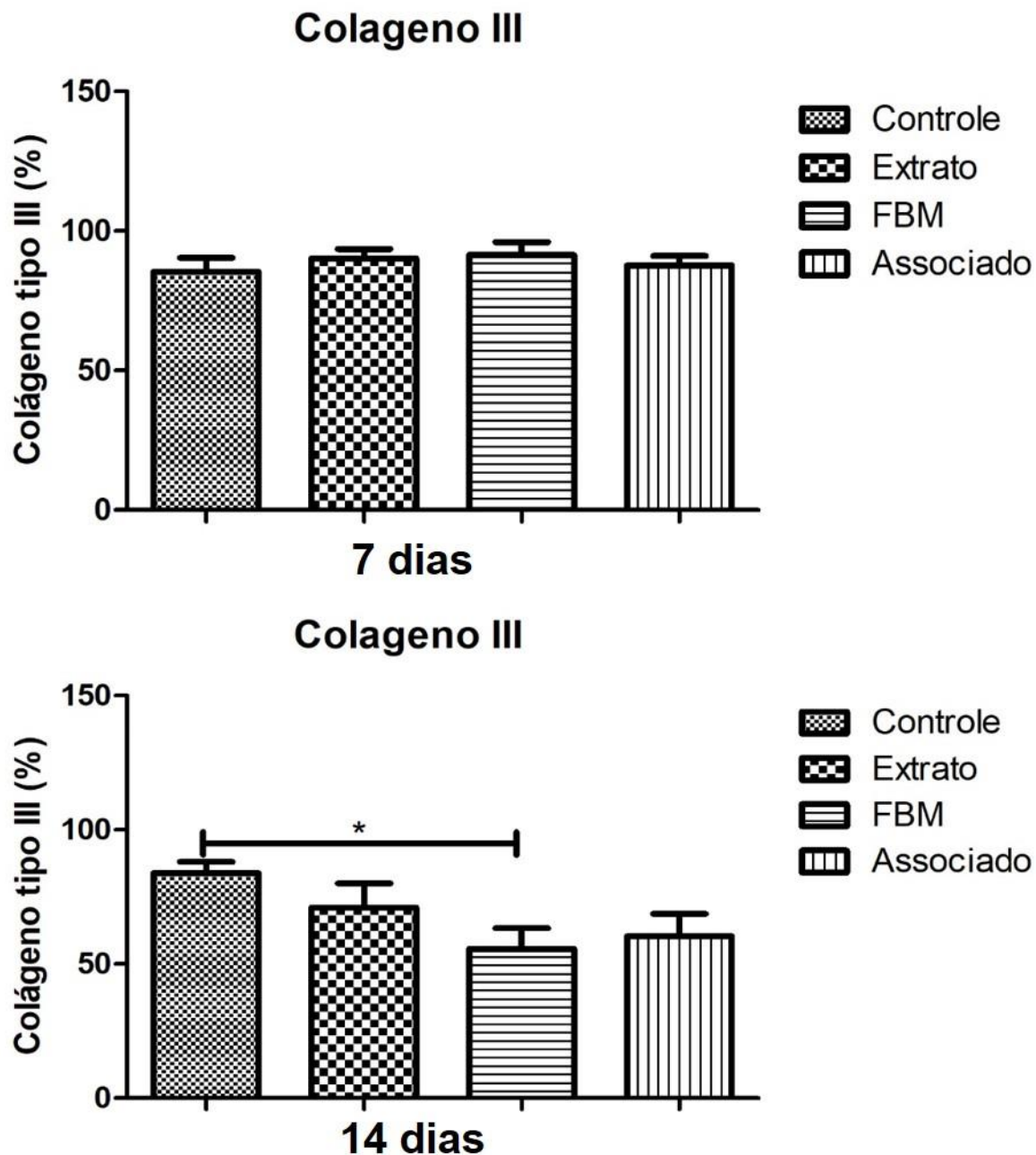


**Legenda:** Os gráficos representam a valores médios obtidos na análise da porcentagem de fibras colagenas tipo I no tempo experimental (7 e 14 dias). A análise intergrupo é representada pelos valores de p (\* p < 0,05, \*\* p < 0,001 e \*\*\* p < 0,0001) em comparação ao grupo controle, usando o teste *Kruskal-Wallis test* com *post hoc* de *Dunn's Multiple Comparison Test*. Os dados são apresentados como média ± DP.

### 6.9 Fibras colágeno tipo III: análise intergrupos

A figura 6 apresenta os resultados acerca da quantificação das fibras colágenas do tipo III (7 e 14 dias). É possível evidenciar que ao 7º dia nenhum dos grupos apresentou diferenças significativas. Para o período de 7 dias: GC *versus* AS ( $p=0,685$ ), GC *versus* EX ( $p=0,465$ ), GC *versus* FBM ( $p=0,418$ ); AS *versus* EX ( $p=0,637$ ), AS *versus* FBM ( $p=0,555$ ); EX *versus* FBM ( $p=0,747$ ). No 14º dia foi possível verificar que grupo FBM reduziu significativamente ( $p=0,05$ ) a proliferação das fibras colágenas tipo III quando comparado ao GC. Para o período de 14 dias: GC *versus* AS ( $p=0,053$ ), GC *versus* EX ( $p=0,214$ ), GC *versus* FBM ( $p=0,050$ ); AS *versus* EX ( $p=0,415$ ), AS *versus* FBM ( $p=0,732$ ); EX *versus* FBM ( $p=0,172$ ).

Figura 11. Análise intergrupos sobre a proliferação das fibras colagenas tipo III

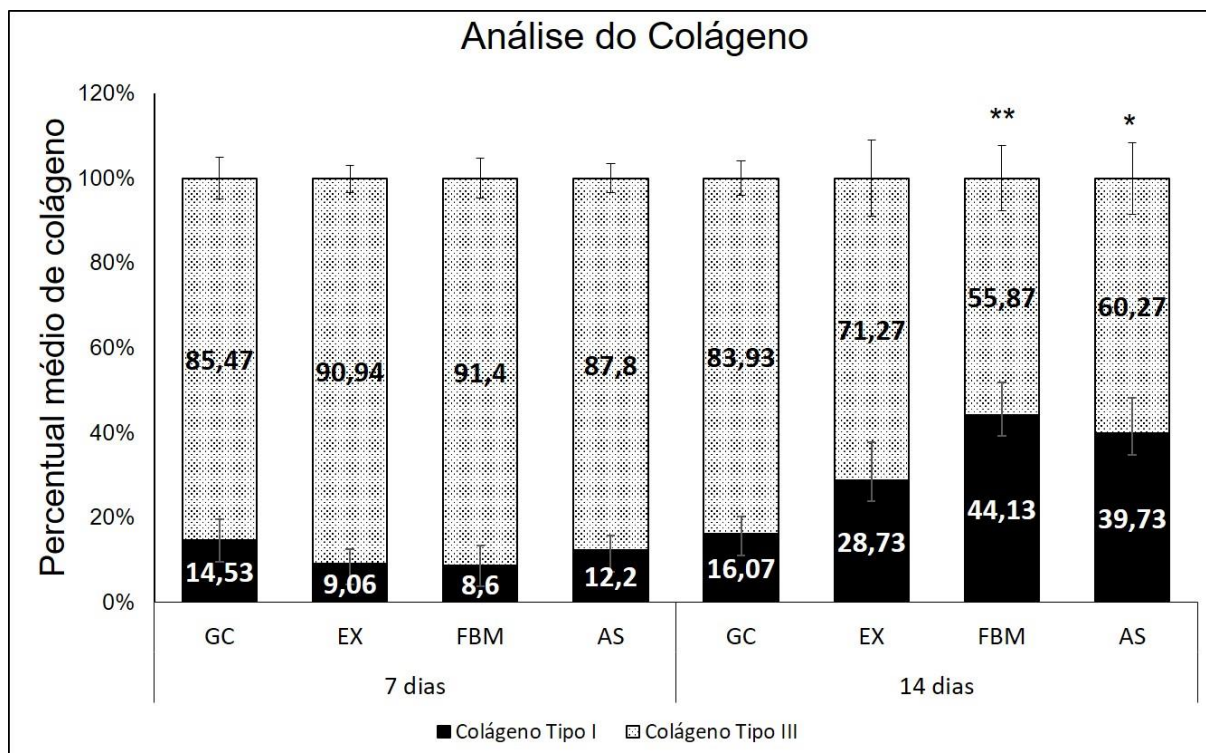


**Legenda:** O gráfico apresenta os valores médios obtidos na análise da porcentagem de fibras colagenas do tipo III no tempo experimental (7 e 14 dias). A análise intergrupo é representada pelos valores de  $p$  (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*  $p < 0,0001$ ) em comparação ao grupo controle, usando o teste *Kruskal-Wallis test* com *post hoc* de *Dunn's Multiple Comparison Test*. Os dados são apresentados como

média  $\pm$  DP.

A figura 12 demonstra a proliferação das fibras colagenas I e III. Podemos observar que houve quando comparado o tempo experimental de 7 e 14 dias nota-se uma efetiva substituição do colágeno III em I nos grupos FBM e AS.

Figura 12: Análise da substituição das fibras colagenas III em fibras colagenas I



**Legenda:** O gráfico apresenta os valores médios obtidos na análise da porcentagem de fibras colagenas do tipo III no tempo experimental (7 e 14 dias). A análise intergrupo é representada pelos valores de  $p$  (\*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,001$ ) em comparação ao grupo controle, usando o teste *Kruskal-Wallis test* com *post hoc* de *Dunn's Multiple Comparison Test*. Os dados são apresentados como média.

## 7 DISCUSSÃO

Neste estudo investigamos o processo inflamatório, reparo e a proliferação de fibras colágenas mediados pela FBM, extrato AEL e a associação de ambos em um modelo experimental de tendinite do tendão calcâneo induzida por colagenase. A tendinite é caracterizada histopatologicamente pela interrupção da proliferação de fibroblastos e apoptose com arranjos e a proliferação de vasos e nervos contendo elementos sensoriais, nociceptivos e autonômicos. Neste estudo foi observado os seguintes achados: redução do processo inflamatório agudo (AS e FBM), proliferação de fibroblastos (EX, FBM e FBM) e fibras colágenas (III em I) nos grupos tratados com FBM e AS.

### 7.1 Células inflamatórias

A inflamação é a resposta primária do hospedeiro à infecção, mas também é um componente essencial da resposta à maioria das outras formas de lesão. Uma consequência do recrutamento de células inflamatórias é a geração de grandes quantidades de radicais livres derivados e espécies reativas de oxigênio, citocinas, fatores de crescimento e enzimas degradativas também são produzidos e liberadas no ambiente extracelular por células inflamatórias (MILLER; ZACHARY, 2017).

Diversos estudos reportaram os efeitos de fitoterápicos sobre a redução do processo inflamatório. Maia Filho et al. (2010) comprovaram que o extrato de Aloe vera possibilitou a redução do quadro inflamatório no tendão calcâneo em ratos, no tempo experimental de 7 e 14 dias. Já Leal et al. (2016) comprovaram que após o tratamento com o extrato de Ximenia. Americana (X. americana) houve a redução do quadro inflamatório agudo do tendão calcâneo em ratos. Os resultados obtidos pelo presente estudo não corroboram com os achados da literatura acerca na redução no número de células inflamatórias.

Segundo a literatura em outros modelos experimentais atribui-se os efeitos do Abelmoschus Esculentus Linn a presença de flavonoides e catequinas os quais podem inibir a proliferação de prostaglandinas reduzindo o processo inflamatório, fato que não foi verificado no presente estudo por Ortaç et al. (2018); Luthfi et al. (2020) e Luthfi; Juliasti; Risky. (2020). Já Moreira et al. (2020) reafirmam que ação dos flavonóides contidos no quiabo auxiliam na redução da liberação de prostaglandinas e mediadores pró-inflamatórios por meio da inibição da enzima

ciclooxigenase (COX-2). Além disso, os flavonóides também podem reduzir estresse oxidativo pela regulação da atividade do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), de modo que o aumento das citocinas pró-inflamatórias pode ser reduzido (LUTHFI et al. 2020).

De acordo com Park et al. (2017) e Misir et al. (2019) afirmaram que reduzir o processo inflamatório nos estágios iniciais de reparo em lesões tendíneas pode resultar em um reparo de melhor qualidade. Estudos anteriores comprovaram os efeitos da FBM sobre o processo de reparo do tendão calcâneo e descrevem um efeito importante sobre a redução de células inflamatórias. Como exemplo, Casalechi et al. (2013) observaram redução do número de células inflamatórias nos estágios iniciais da lesão e melhora na qualidade do reparo tecidual durante a cicatrização do tendão calcâneo em ratos pela aplicação do FBM (780 nm, 22 mW, 1.54 J, 7.5 J/cm<sup>2</sup> e 107 mW/cm<sup>2</sup>).

Bastos et al. (2009) encontraram efeitos semelhantes entre o LED visível (630 nm, 15 mW e 6 J/cm<sup>2</sup>) e LED invisível (880 nm, 15 mW e 6 J/cm<sup>2</sup>) e FBM vermelho (685 nm, 15 mW e 6 J/cm<sup>2</sup>) FBM infravermelho (830 nm, 15 mW e 6 J/cm<sup>2</sup>) no reparo do tendão calcâneo em ratos, melhorando a organização, agregação e alinhamento do colágeno, bem como, a redução do número de células inflamatórias. Moura Junior et al. (2015) investigaram o efeito da FBM no vermelho (645 nm, 33 mW, 1,98 J, 4 J/cm<sup>2</sup>) e infravermelho (945 nm, 33 mW, 1,98 J, 4 J/cm<sup>2</sup>) e concluíram que ambas terapias possibilitaram a redução no número de células inflamatórias em ambos períodos experimentais (7 e 14 dias). Nascimento et al. (2020) estudaram o efeito da FBM (660 nm, 3 J, 14 mW e 6 J/cm<sup>2</sup> de energia total) e comprovaram que após a lesão do tendão calcâneo em ratos, houve redução significativa sobre o número de células inflamatórias após os períodos experimentais propostos (7 e 14 dias).

Os resultados sobre a redução no número de células inflamatórias encontrados no grupo AS podem estar associados aos efeitos da FBM. A FBM tem o potencial de estimular a cadeia respiratória, precisamente a citocromo c oxidase, enzima terminal da cadeia respiratória que catalisa a redução de oxigênio para a formação de água metabólica e proliferação de ATP. Quanto maior for atividade da citocromo c oxidase, maior é o consumo de oxigênio e a proliferação de ATP que desencadeia sinalizações celulares em cascata que estimulam os efeitos

photobiomodulators such as angiogenesis, proliferation of collagen and reduction of inflammation (LOPES-SILVA et al. 2020)

## 7.2 Fibroblastos

Os fibroblastos são considerados células versáteis, sendo caracterizados por intensa atividade sintética. Essas células podem ser vistas em ultraestrutura pela presença de abundante retículo endoplasmático rugoso, complexo de Golgi, polissomos livres e numerosas vesículas periféricas (CARVALHO et al., 2020). No presente estudo, as análises intergrupos demonstraram que todos os tratamentos empregados neste estudo (EX, FBM e AS) estimularam o aumento do número de fibroblastos quando comparados ao GC, nos tempos experimentais de 7 e 14 dias.

Considerando o uso do extrato *Abelmoschus Esculentus* Linn, um estudo previo de Luthfi, et al. (2020) concluíram que após a indução de modelo experimental de extração dentaria em ratos, os seus resultados evidenciaram a partir da avaliação histológica, um aumento significativo do número de fibroblastos no grupo tratado com o extrato (*Abelmoschus Esculentus* Linn) nas fases iniciais do processo inflamatório (3º dia), em comparação, ao 5º e 7º dia. Nossos resultados na análise intragrupos não apresentaram diferenças significativas. Entretanto, nas comparações intergrupos, o tratamento com EX proporcionou aumento significativo de fibroblastos quando comparado ao grupo GC nos períodos de 7 e 14 dias. Já Bao et al. (2017) descobriram que os flavonóides em baixa dosagem sozinhos são capazes de estimular a expressão do fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ ), até o 7º dia, e auxiliar no processo de reparação tecidual, cujo qual apresenta uma finalidade de estimular a produção de fibroblastos.

Neste estudo foi observado que os animais tratados com a FBM apresentaram resultados significativos sobre a proliferação de fibroblastos, no tempo experimental (7 dias). Tais resultados corroboram com os achados propostos por Casalechi et al. (2009) e Guerra et al. (2013), os quais comprovaram que em fases iniciais de lesão ocorrem a proliferação de fibroblastos, inicialmente, para que em fases mais tardias de lesão ocorra o reparo do tendão de forma efetiva. Tais resultados podem ser justificados, pois acredita-se que o tratamento com a FBM estimulou a proliferação de fibroblastos acelerando a fase proliferativa da reparação do tendão a qual é responsável pela proliferação de colágeno (THOMOPOULOS et

al., 2015; WALDEN et al., 2017). Tanto o aumento do número de fibroblastos quanto a proliferação de colágeno estão intimamente relacionados ao processo de reparo tecidual (os quais serão reafirmados nos resultados da proliferação do colágeno), principalmente após a lesão do tendão calcâneo (THOMOPOULOS et al., 2015; WALDEN et al., 2017).

Os resultados benéficos obtidos pelo grupo AS (em ambos os tempos experimentais) podem estar mais associados à FBM, uma vez que acredita-se que este recurso tenha um potencial para realizar a modificação do desenvolvimento, proliferação e viabilidade celular, ocasionando efeitos positivos na proliferação e migração de fibroblastos e proliferação de colágeno, ou seja, quanto maior for a proliferação de fibroblastos, maior será a sintetização das fibras colágenas do tipo I nos estágios tardios de lesão (JERE; HOURELD; ABRAHAMSE, 2020)

### **7.3 Fibras colágenas (tipo I e III)**

A proliferação de colágeno (tipo III) é caracterizada uma das principais fases que envolvem os estágios iniciais do processo de reparo, seguindo a modelagem da matriz de fibronectina por fibroblastos do tendão. A presença aumentada de colágeno III é considerada uma característica da degeneração, com efeitos adversos refletidos em distúrbios do tecido e propriedades mecânicas reduzida (SNEDEKER; FOOLEN, 2017).

Os resultados do presente estudo evidenciaram que no tempo experimental de 7 dias, o grupo EX apresentou grande proliferação de fibras colágenas (tipo III). Tais achados corroboram com Luthfi et al. (2020) e Luthfi; Juliastuti e Risky (2020) demonstraram que em fases iniciais de lesão ocorre uma maior produção de colágeno III e, conseqüentemente, uma menor proliferação de colágeno I. Tais achados podem ser justificados em virtude do *Abelmoschus Esculentus* Linn apresentar em sua composição química, como os taninos, flavonoides alcaloides e saponinas que estimulam ação angiogênica e anti-inflamatória que por sua vez favorecem a inibição da fosfolipase e, assim, estimula a proliferação de colágeno do tipo III (TALUBMOOK; BUDDHAKALA, 2013).

Em relação as fibras colágenas do tipo III no grupo tratado com a FBM no tempo experimental de 7 dias, foi observado uma maior proliferação dessas fibras nas fases iniciais da lesão, o que pode ser corroborado com os estudos conduzidos

por Jesus et al. (2015), Torres-Silva et al. (2015), Lucke et al. (2019) e de Oliveira et al. (2019) os quais sugerem que após o tratamento com a FBM, o aumento na quantidade de colágeno tipo III no local da lesão é um fator crucial para fases iniciais da lesão, favorecendo a modulação precoce da liberação de mediadores pró-inflamatórios que favorecem a degradação do tecido e o controle da dor, sendo que em fases mais tardias da lesão, o colágeno (III) substituído por colágeno tipo I.

O colágeno (tipo I) constitui cerca de 95% do tendão normal, sendo considerado o mais abundante e o principal constituinte dos tecidos conjuntivos, e responsável pela formação de fibras espessas que dão resistência a esse tecido (BARBOSA et al. 2013; de CARVALHO et al. 2016; DÖNMEZ et al. 2016). Os achados deste estudo comprovaram que os grupos FBM e AS apresentaram alterações estatisticamente significativas em relação as modificações das fibras colágenas III em colágeno I, nos períodos experimentais propostos pelo estudo (7<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> dias) na análise intragrupos. Foi identificado também que quando comparado os grupos GC e EX, o grupo FBM se mostrou como um dos melhores recursos sintetizadores de fibras colágenas do tipo I.

Os resultados obtidos acerca do uso isolado do extrato vegetal (*Abelmoschus Esculentus* Linn) não corroboram o estudo desenvolvido por Moreira et al.<sup>38</sup>, onde foi identificado uma maior quantidade de colágeno tipo I durante o período experimental com diferença no 14<sup>o</sup> dia. Sugere-se que os efeitos anti-inflamatórios do *Abelmoschus Esculentus* Linn estejam associados aos flavonóides e taninos presentes nas folhas e flores desta espécie. A literatura aponta que em modelos experimentais o *Abelmoschus Esculentus* Linn apresenta características anti-inflamatórias, tais como a escopoletina, que estimula a formação de novos vasos dos vasos sanguíneos, bem como, indutores angiogênicos endógenos os quais podem favorecer para a proliferação das fibras colágenas (NESA et al., 2014).

Notavelmente, o grupo EX, exibiram uma quantidade menor de colágeno tipo I ao 14<sup>a</sup> dia em comparação aos grupos FBM e AS. A partir disso, é possível concluir que o uso do *Abelmoschus Esculentus* Linn, não favoreceu uma reparação do tendão calcâneo de forma eficaz e com qualidade e, diante disso, podemos levantar o pressuposto que os resultados obtidos pelo grupo AS foram otimizados pelos benefícios terapêuticos promovidos pela FBM.

Em relação a análise do tipo de colágeno, foi identificado que ao 14<sup>a</sup> dia

houve uma gradual redução das fibras colágenas do tipo III nos grupos tratados (FBM e AS). Os resultados deste presente estudo assemelham-se aos achados de Neves et al. (2011) que tiveram como objetivo avaliar o efeito da FBM por laser GaAIs com (830 nm; 40, 60, 80 e 100 mW; e 20 J/cm<sup>2</sup>) no reparo de lesões parciais de tendões de ratos.

Barbosa et al. (2013) investigaram os efeitos isolados e associados da FBM ao plasma rico em plaquetas na reparação do tendão calcâneo e, concluíram que a FBM quando administrada com a dosimetria adequada (830 nm; 100 mW; 7.0 J/cm<sup>2</sup>) favorecem a maior proliferação de fibras colágenas do tipo I em relação ao tipo III. Marques et al. (2016) identificaram que a FBM quando aplicada com a dosimetria (830 nm, 50 mW, 3 J, 107 J/cm<sup>2</sup> e 1.8 W/cm<sup>2</sup>), favoreceu uma melhor deposição das fibras colágenas do tipo I quando comparada com a deposição de colágeno tipo III, com diferenças significativas em relação ao grupo controle.

Moura Junior et al. (2015) descreveram que a produção e realinhamento das fibras de colágeno são necessários para favorecer a restauração de força do tendão, uma vez que, a FBM tende a estimular promoção da produção e degradação da matriz extracelular (MEC). Inicialmente, é de suma importância considerar que aplicação da colagenase foi eficaz em promover o desalinhamento das fibras colágenas e alterar a composição do colágeno (tipos I e III) do tendão calcâneo dos animais. Sendo assim, pressupõe que em fases mais tardias de lesão é esperado uma maior proporção de fibras colágenas do tipo I, pois modificações deste colágeno pode retardar o processo de reparo e também tornando o tendão lesionado suscetível à degeneração [(BARBOSA et al. 2013; de CARVALHO et al., 2016; DÖNMEZ et al. 2016; LUCKE et al. 2019; de OLIVEIRA et al., 2019).

De acordo com Muller et al. (2015) para a otimização e rápida cicatrização dos tendões, é extremamente importante uma alta expressão do colágeno tipo I. Pires et al. (2011) e Fukuda et al (2013) reportaram que a irradiação com a FBM no espectro eletromagnético do infravermelho próximo favorece a modulação do processo inflamatório, devido a modulação precoce da liberação de mediadores pró-inflamatórios e, conseqüentemente, degradação do tecido e controle da dor, facilitando a proliferação de colágeno tipo I. Diversos estudos prévios Oliveira et al. (2009); Xavier et al. (2010); Neves et al., 2011); Guerra et al. (2013); de Jesus et al., 2014; Moura Junior et al., (2015) apontaram que para um melhor processo de

reparação tecidual é extremamente importante uma alta expressão do colágeno tipo I cujas fibras são mais resistentes e orientadas longitudinalmente, conforme corroborado por recente revisão sistemática de Lopes Silva et al (2020)

Aparecida Da Silva et al. (2013) et al. concluíram em seu estudo que o aumento das fibras colágenas está associado a redução da proliferação das MMP-2 e MMP-9. Aro et al. (2013) observaram a presença de isoformas latentes e ativas de MMP-9 durante os primeiros 7 dias após a lesão do tendão. Este período é caracterizado por inflamação e a MMP-9 é predominantemente sintetizada por células inflamatórias a qual apresenta um papel importante na degradação do colágeno desnaturado e outros componentes da MEC. Casalechi et al (2013) investigaram o efeito da FBM por LBI no processo de reparação do tendão calcâneo. Para realização do trabalho utilizou-se as dosimetrias (780 nm, 22 mW, 1,54 J) sobre a expressão das metaloproteinases, onde se observou redução da expressão da MMP-1 nas fases iniciais de tratamento que favoreceu ao aumento do colágeno (I) em relação ao colágeno (III) nas fases de lesão. Tais resultados encontrados neste estudo podem ser justificados devido os níveis de MMP-2, MMP-3 e MMP-14 aumentam após a lesão. Diante disso, é possível salientar que aplicação da FBM por LBI possa atuar sobre a atenuação das MMP-9 e MMP-13 participam apenas da degradação do colágeno, enquanto MMP- 2, MMP-3 e MMP-14 participam tanto da degradação do colágeno quanto da remodelação do colágeno (MARQUES et al. 2016).

Em relação as limitações do estudo, destaca-se, inicialmente, a necessidade para futuros estudos envolvendo a associação da FBM aos extratos vegetais a realização das medidas de permeação, no intuito de avaliar se realmente a dose aplicada de extrato foi necessária para atingir os tecidos mais profundos, assim como, a necessidade da realização para as dosagens de citocinas, visando comprovar se os recursos podem gerar efeitos imunohistoquímicos, o número de animais incluídos nos grupos estudos, pois alguns resultados podem não ter se apresentados como satisfatórios em virtude do número de animais e, por fim, ausência da prospecção fitoquímica, já que a literatura ainda é escassa sobre os principais componentes do *Abelmoschus Escullents Linn*. Sugere-se para novos estudos nessa linha experimental a realização da contagem de células totais e células inflamatórias específicas do processo inflamatório no tendão, aplicação da

escala de bonar para avaliação dos achados histológicos, assim como, avaliação pela Espectroscopia Raman para melhores confirmação dos achados histopatológicos.



## 8. CONCLUSÃO

Por fim, os resultados do presente estudo mostraram diferenças significativas em relação a proliferação de fibroblastos (7 e 14 dias) nos animais tratados com (AS, EX e FBM) quando comparado ao GC. Considerando especificamente o tempo de 14 dias, foi observado uma melhor organização do processo de reparo pelo aumento da proliferação de colágeno I (fase tardia) e redução do colágeno III, nos grupos tratados (AS e FBM). Ainda, observou-se que o grupo FBM se mostrou como o melhor tratamento para o reparo tendíneo em relação GC. Em geral, resume-se que o extrato *Abelmoschus Esculentus Linn*, quando aplicado de forma isolada não otimiza a síntese do colágeno tipo I na fase esperada do processo de reparo do tendão calcâneo.

## REFERÊNCIAS

AIYEGBUSI, A. I. et al. The role of aqueous extract of pineapple fruit parts on the healing of acute crush tendon injury. *Nigerian quarterly journal of hospital medicine*, v. 20, n. 4, p. 223-227, 2010.

ALAMRI, Mohammed S.; MOHAMED, Abdellatif A.; HUSSAIN, Shahzad. Effects of alkaline-soluble okra gum on rheological and thermal properties of systems with wheat or corn starch. *Food Hydrocolloids*, v. 30, n. 2, p. 541-551, 2013.

ALBERTINI, R. et al. COX-2 mRNA expression decreases in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation after low level laser therapy. *Inflammation Research*, v. 56, n. 6, p. 228-229, 2007.

ALIODOUST, Morteza et al. Evaluating the effect of low-level laser therapy on healing of tentomized Achilles tendon in streptozotocin-induced diabetic rats by light microscopical and gene expression examinations. *Lasers in medical science*, v. 29, n. 4, p. 1495-1503, 2014.

ALLAHVERDI, Amin 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.

APARECIDA DA SILVA, Andreia et al. Wound-healing effects of low-level laser therapy in diabetic rats involve the modulation of MMP-2 and MMP-9 and the redistribution of collagen types I and III. *Journal of Cosmetic and Laser Therapy*, v. 15, n. 4, p. 210-216, 2013.

ARO, A. A. et al. *Arrabidaea chica* extract improves gait recovery and changes collagen content during healing of the Achilles tendon. *Injury*, v. 44, n. 7, p. 884-892, 2013.

ARO, A. A. et al. Effect of *C. alendula* *Officinalis* Cream on Achilles Tendon Healing. *The Anatomical Record*, v. 298, n. 2, p. 428-435, 2015.

ARO, A. A. et al. Structural and biochemical alterations during the healing process of tendons treated with Aloe vera. *Life sciences*, v. 91, n. 17-18, p. 885-893, 2012.

BAO, Dengke et al. Protective effect of quercetin against oxidative stress-induced cytotoxicity in rat pheochromocytoma (PC-12) cells. *Molecules*, v. 22, n. 7, p. 1122, 2017.

BARBOSA, Danillo et al. Low-level laser therapy combined with platelet-rich plasma on the healing calcaneal tendon: a histological study in a rat model. *Lasers in Medical Science*, v. 28, n. 6, p. 1489-1494, 2013.

BASTOS, J. L. N.; LIZARELLI, R. F. Z.; PARIZOTTO, N. A. Comparative study of laser and LED systems of low intensity applied to tendon healing. *Laser physics*, v.

19, n. 9, p. 1925-1931, 2009.

BENSADOUN, R. J; NAIR, R. G. Low-Level Laser Therapy in the Management of Mucositis and Dermatitis Induced by Cancer Therapy. *Photomedicine And Laser Surgery*, v. 33, n. 10, p.487-491, 2015

BRUNING, Maria Cecilia Ribeiro; MOSEGUI, Gabriela Bittencourt Gonzalez; VIANNA, Cid Manso deMelo. The use of phytotherapy and medicinal plants in primary healthcare units in the cities of Cascavel and Foz do Iguaçu-Paraná: the viewpoint of health professionals. *Ciencia & saude coletiva*, v. 17, n. 10, p. 2675, 2012.

CARVALHO, Angela AM et al. Swimming exercise changed the collagen synthesis and calcification in calcaneal tendons of mice. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 92, n. 1, 2020.

CASALECHI, Heliodora 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.

CASALECHI, Heliodora Leão et al. Low-level laser therapy in experimental model of collagenase-induced tendinitis in rats: effects in acute and chronic inflammatory phases. *Lasers in medical science*, v. 28, n. 3, p. 989-995, 2013.

CHEN, Tony M. et al. The arterial anatomy of the Achilles tendon: anatomical study and clinical implications. *Clinical Anatomy: The Official Journal of the American Association of Clinical Anatomists and the British Association of Clinical Anatomists*, v. 22, n. 3, p. 377-385, 2009.

CHEN, Yuanzheng et al. Improvement in the repair of defects in maxillofacial soft tissue in irradiated minipigs by a mixture of adipose-derived stem cells and platelet-rich fibrin. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 52, n. 8, p. 740-745, 2014.

CHILDS, Dylan R.; MURTHY, Ananth S. Overview of wound healing and management. *Surgical Clinics*, v. 97, n. 1, p. 189-207, 2017.

DAYTON, Paul. Anatomic, vascular, and mechanical overview of the Achilles tendon. *Clinics in podiatric medicine and surgery*, v. 34, n. 2, p. 107-113, 2017.

DE CARVALHO, Paula Kariluce 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 JESUS, Julio Fernandes et al. Low-level laser therapy (780 nm) on VEGF modulation at partially injured achilles tendon. *Photomedicine and laser surgery*, v. 34, n. 8, p. 331-335, 2016.

DE JESUS, Julio Fernandes et al. Low-level laser therapy in IL-1 $\beta$ , COX-2, and PGE2 modulation in partially injured Achilles tendon. *Lasers in medical science*, v. 30, n. 1, p. 153-158, 2015.

DE JESUS, Julio Fernandes et al. Low-level laser therapy on tissue repair of partially injured achilles tendon in rats. *Photomedicine and laser surgery*, v. 32, n. 6, p. 345-350, 2014.

DE OLIVEIRA, Anderson Rodrigues 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. e0211643, 2019.

DEL BUONO, Angelo; VOLPIN, Andrea; MAFFULLI, Nicola. Minimally invasive versus open surgery for acute Achilles tendon rupture: a systematic. *Br Med Bull*, v. 1, p. 14, 2013.

DÖNMEZ, Gürhan et al. Effects of immobilization and whole-body vibration on rat serum Type I collagen turnover. *Acta Orthopaedica et Traumatologica Turcica*, v. 50, n. 4, p. 452-457, 2016.

DURAZZO, Alessandra et al. *Abelmoschus esculentus* (L.): Bioactive Components' Beneficial Properties—Focused on Antidiabetic Role—For Sustainable Health Applications. *Molecules*, v. 24, n. 1, p. 38, 2019.

FARCIC, Thiago S. et al. Treatment time of ultrasound therapy interferes with the organization of collagen fibers in rat tendons. *Brazilian journal of physical therapy*, v. 17, n. 3, p. 263-271, 2013.

FERRARESI, Cleber et al. Time response of increases in ATP and muscle resistance to fatigue after low-level laser (light) therapy (LLLT) in mice. *Lasers in medical science*, v. 30, n. 4, p. 1259-1267, 2015.

FUKUDA, Thiago Y. et al. Infrared low-level diode laser on serum chemokine MCP-1 modulation in mice. *Lasers in medical science*, v. 28, n. 2, p. 451-456, 2013.

GABLER, CAROLIN et al. Comparison of different suture techniques for Achilles tendon repair in rat model using collagen scaffolds. *Acta of bioengineering and biomechanics*, v. 20, n. 2, 2018.

GAŞIOR-GŁOGOWSKA, MARLENA et al. Structural alteration of collagen fibres—spectroscopic and mechanical studies. *strain*, v. 19, p. 20, 2010.

GEMEDE, Habtamu Fekadu et al. Nutritional quality and health benefits of okra (*Abelmoschus esculentus*): A review. *J Food Process Technol*, v. 6, n. 458, p. 2, 2015.

GOMES, Cid André Fidelis de Paula 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.

GUERRA, Flávia Da Ré et al. LLLT improves tendon healing through increase of MMP activity and collagen synthesis. *Lasers in medical science*, v. 28, n. 5, p. 1281-1288, 2013.

JERE, Sandy W.; HOURELD, Nicolette N.; ABRAHAMSE, Heidi. Effect of photobiomodulation on cellular migration and survival in diabetic and hypoxic diabetic

wounded fibroblast cells. *Lasers in Medical Science*, 2020.

JUNIOR, Ernesto Cesar Pinto Leal et al. Effect of 830 nm low-level laser therapy in exercise-induced skeletal muscle fatigue in humans. *Lasers in medical science*, v. 24, n. 3, p. 425-431, 2009.

JUNIOR, Nelson Kautzner Marques; BARBOSA, Osmar. Lesão no tendão calcâneo de um atleta de voleibol: relato de experiência. *Revista Brasileira de Prescrição e Fisiologia do Exercício (RBPFE)*, v. 10, n. 57, p. 29-66, 2016.

KARU, Tiina I. Cellular and molecular mechanisms of photobiomodulation (low-power laser therapy). *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, v. 20, n. 2, p. 143-148, 2013.

KARU, Tiina I.; PYATIBRAT, Ludmila V.; AFANASYEVA, Natalia I. Cellular effects of low power laser therapy can be mediated by nitric oxide. *Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery*, v. 36, n. 4, p. 307-314, 2005.

KEARNEY, Rebecca S. et al. A systematic review of early rehabilitation methods following a rupture of the Achilles tendon. *Physiotherapy*, v. 98, n. 1, p. 24-32, 2012.

KERNOZEK, Thomas W. et al. The effects of habitual foot strike patterns on Achilles tendon loading in female runners. *Gait & posture*, v. 66, p. 283-287, 2018.

KHAN, Karim M. et al. Time to abandon the “tendinitis” myth: painful, overuse tendon conditions have a non-inflammatory pathology. *BMJ*. 2002.

KJÆR, Michael. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiological reviews*, v. 84, n. 2, p. 649-698, 2004.

KONTOGIORGOS, Vassilis et al. Rheological characterization of okra pectins. *Food Hydrocolloids*, v. 29, n. 2, p. 356-362, 2012.

KRAPF, Daniel; KAIPEL, Martin; MAJEWSKI, Martin. Structural and biomechanical characteristics after early mobilization in an Achilles tendon rupture model: operative versus nonoperative treatment. *Orthopedics*, v. 35, n. 9, p. e1383-e1388, 2012.

KRAUSHAAR, Barry S.; NIRSCHL, Robert P. Current concepts review-tendinosis of the elbow (tennis elbow). clinical features and findings of histological, immunohistochemical, and electron microscopy studies. *JBJS*, v. 81, n. 2, p. 259-278, 1999.

LARAIA, Erica Martinho Salvador et al. Effect of low-level laser therapy (660 nm) on acute inflammation induced by tenotomy of Achilles tendon in rats. *Photochemistry and photobiology*, v. 88, n. 6, p. 1546-1550, 2012.

LEAL, Seania Santos et al. Phonophoresis effectiveness with ximenia americana I. In rats tendon inflammation. *REVISTA BRASILEIRA DE MEDICINA DO ESPORTE*, v. 22, n. 5, p. 355-360, 2016.

LEE, Chai Siah et al. Optimisation of extraction and sludge dewatering efficiencies of bio-flocculants extracted from *Abelmoschus esculentus* (okra). *Journal of*

environmental management, v. 157, p. 320-325, 2015.

SOARES, Geórgia de Sousa Ferreira et al. Purification and biological activities of *Abelmoschus esculentus* seed lectin. *The protein journal*, v. 31, n. 8, p. 674-680, 2012.

LOPES SILVA, Rauena Souto Diogo et al. Systematic review of Photobiomodulation Therapy (PBMT) on the experimental calcaneal tendon injury in rats. *Photochemistry and Photobiology*, 2020.

LUCKE, Letícia 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. e12580, 2019.

LUTHFI, Muhammad et al. Expression of fibroblast cells after extraction of wistar rat teeth after topical application of okra fruit (*Abelmoschus esculentus*) gel. *Infectious Disease Reports*, v. 12, n. 11, p. 40-43, 2020.

LUTHFI, Muhammad; JULIASTUTI, Wisnu Setyari; RISKY, Yuniar Aliyah. Angiogenesis of Extracted Tooth Wound on Wistar Rats After Application of Okra (*Abelmoschus esculentus*) Gel Extract. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada*, v. 20, 2020.

MACHADO, A. C.; OLIVEIRA, R. C. Medicamentos Fitoterápicos na odontologia: evidências e perspectivas sobre o uso da aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Allemão). *Revista Brasileira de Plantas Medicináveis*, v. 16, n. 2, p. 283-289, 2014.

MAGNAN, Bruno et al. The pathogenesis of Achilles tendinopathy: a systematic review. *Foot and Ankle Surgery*, v. 20, n. 3, p. 154-159, 2014.

MAIA FILHO, Antonio Luiz Martins et al. Comparative study of the topical application of Aloe vera gel, therapeutic ultrasound and phonophoresis on the tissue repair in collagenase-induced rat tendinitis. *Ultrasound in medicine & biology*, v. 36, n. 10, p. 1682-1690, 2010.

MAIRUAE, Nootchanat et al. The effects of okra (*Abelmoschus esculentus* Linn.) on the cellular events associated with Alzheimer's disease in a stably expressed HFE neuroblastoma SH-SY5Y cell line. *Neuroscience letters*, v. 603, p. 6-11, 2015.

MARQUES, Anna Cristina de Farias 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.

MILLAR, Neal L.; MURRELL, George AC; MCINNES, Iain B. Alarmins in tendinopathy: unravelling new mechanisms in a common disease. *Rheumatology*, v. 52, n. 5, p. 769-779, 2013.

MILLER, Margaret A.; ZACHARY, James F. Mechanisms and morphology of cellular injury, adaptation, and death. *Pathologic Basis of Veterinary Disease*, p. 2, 2017.

MISIR, Abdulhamit et al. Repair within the first 48 h in the treatment of acute Achilles tendon ruptures achieves the best biomechanical and histological outcomes. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, v. 28, n. 9, p. 2788-2797, 2020.

MOREIRA, Juliana AR et al. Application of *Solidago chilensis* and laser improved the repair of burns in diabetic rats. *Biomedical Journal*, 2020.

MOURA JÚNIOR, Manoel de Jesus et al. Assessing the biochemical changes of tendons of rats in an experimental model of tenotomy under therapeutic ultrasound and LEDs (625 and 945 nm) by near-infrared Raman spectroscopy. *Lasers in medical science*, v. 30, n. 6, p. 1729-1738, 2015.

MÜLLER, Sebastian A. et al. Tendon healing: an overview of physiology, biology, and pathology of tendon healing and systematic review of state of the art in tendon bioengineering. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy*, v. 23, n. 7, p. 2097-2105, 2015.

NASCIMENTO, Lízia Daniela e Silva et al. Effects of therapy with light emitting diode (LED) in the calcaneal tendon lesions of rats: a literature review. *The Scientific World Journal*, v. 2019, 2019.

NASCIMENTO, Lizia Daniela e Silva et al. Effect of low intensity photobiomodulation associated with norbixin-based poly (hydroxybutyrate) membrane on post-tenotomy tendon repair. In vivo study. *Acta Cirurgica Brasileira*, v. 35, n. 3, 2020.

NATERSTAD, Ingvill Fjell 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.

NESA, Mst Luthfun et al. Analgesic, anti-inflammatory and CNS depressant activities of the methanolic extract of *Abelmoschus esculentus* Linn. seed in mice. *Journal of Pharmaceutical Research International*, p. 849-860, 2014.

NEVES, Marco Aurelio Invaldi et al. Different power settings of LLLT on the repair of the calcaneal tendon. *Photomedicine and laser surgery*, v. 29, n. 10, p. 663-668, 2011.

NOURISSAT, Geoffroy; BERENBAUM, Francis; DUPREZ, Delphine. Tendon injury: from biology to tendon repair. *Nature Reviews Rheumatology*, v. 11, n. 4, p. 223, 2015.

OLIVEIRA, Flávia Schlittler et al. Effect of low level laser therapy (830 nm) with different therapy regimes on the process of tissue repair in partial lesion calcaneus tendon. *Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery*, v. 41, n. 4, p. 271-276, 2009.

ORTAÇ, Deniz et al. In vivo anti-ulcerogenic effect of okra (*Abelmoschus esculentus*) on ethanol-induced acute gastric mucosal lesions. *Pharmaceutical biology*, v. 56, n. 1, p. 165-175, 2018.

PARK, Young Hwan et al. How early must an acute Achilles tendon rupture be

repaired?. *Injury*, v. 48, n. 3, p. 776-780, 2017.

PESSOA, Diego Rodrigues et al. Association of facial massage, dry needling, and laser therapy in Temporomandibular Disorder: case report. In: *CoDAS. Sociedade Brasileira de Fonoaudiologia*, 2018.

PIRES, Débora et al. Low-level laser therapy (LLLT; 780 nm) acts differently on mRNA expression of anti-and pro-inflammatory mediators in an experimental model of collagenase-induced tendinitis in rat. *Lasers in medical science*, v. 26, n. 1, p. 85-94, 2011.

RICOLDY, Diego da Silva et al. Efeito do ultrassom associado ao gel de calêndula sobre a atividade reparadora em lesões musculares experimentais. *Acta Scientiarum. Health Sciences*, v. 32, n. 2, p. 135-140, 2010.

Singh D. Acute Achilles tendon rupture. *Br J Sports Med*. v.51, n.15, p.1158-1160, 2017

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

SOEMARIE, Yulistia Budianti. Uji aktivitas antiinflamasi kuersetin kulit bawang merah (*Allium cepa* L.) pada mencit putih jantan (*Mus musculus*). *Jurnal Ilmiah Ibnu Sina*, v. 1, n. 2, p. 163-172, 2016.

SOLIMAN, Mona H.; EL-MOHAMEDY, Riad SR. Induction of defense-related physiological and antioxidant enzyme response against powdery mildew disease in okra (*Abelmoschus esculentus* L.) plant by using chitosan and potassium salts. *Mycobiology*, v. 45, n. 4, p. 409-420, 2017.

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

THORPE, Chavaunne T. et al. The interfascicular matrix enables fascicle sliding and recovery in tendon, and behaves more elastically in energy storing tendons. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, v. 52, p. 85-94, 2015.

TONGJAROENBUANGAM, Walaiporn et al. Neuroprotective effects of quercetin, rutin and okra (*Abelmoschus esculentus* Linn.) in dexamethasone-treated mice. *Neurochemistry international*, v. 59, n. 5, p. 677-685, 2011.

TORRES-SILVA, Romildo et al. The low level laser therapy (LLLT) operating in 660 nm reduce gene expression of inflammatory mediators in the experimental model of collagenase-induced rat tendinitis. *Lasers in medical science*, v. 30, n. 7, p. 1985-1990, 2015.

VIEIRA, Cristiano Pedrozo et al. Green tea and glycine modulate the activity of metalloproteinases and collagen in the tendinitis of the myotendinous junction of the Achilles tendon. *The Anatomical Record*, v. 299, n. 7, p. 918-928, 2016.

WALDEN, Grace 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.

WOLFF, K. S. et al. The avascular plane of the Achilles tendon: a quantitative anatomic and angiographic approach and a base for a possible new treatment option after rupture. *European Journal of Radiology*, v. 81, n. 6, p. 1211-1215, 2012.

WU, Xiaochuan et al. Morphological study of mechanoreceptors in collateral ligaments of the ankle joint. *Journal of orthopaedic surgery and research*, v. 10, n. 1, p. 92, 2015.

XAVIER, Murilo et al. Anti-inflammatory effects of low-level light emitting diode therapy on achilles tendinitis in rats. *Lasers in surgery and medicine*, v. 42, n. 6, p. 553-558, 2010.

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

YU, Tung-Yang et al. Aging is associated with increased activities of matrix metalloproteinase-2 and-9 in tenocytes. *BMC musculoskeletal disorders*, v. 14, n. 1, p. 2, 2013.

## ANEXO 1 – Aprovação do comitê de ética em pesquisa com animais

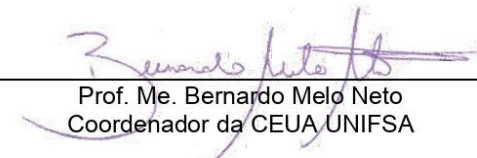


ASSOCIAÇÃO TERESINENSE DE ENSINO S/C LTDA – ATE  
CENTRO UNIVERSITÁRIO SANTO AGOSTINHO - UNIFSA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa **Efeitos da fotobiomodulação por laser de baixa intensidade associada ou não ao extrato de *Abelmoschus esculentus* Linn no tratamento da tendinite experimentalmente induzida em ratos: avaliação por achados histopatológicos**”, protocolo nº 2831/19 sob a responsabilidade de Rauena Souto Diogo Lopes Silva que envolve a manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo chordata, subfilo vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, da Portaria Nº 615, de 23 de julho de 2015 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO CENTRO UNIVERSITÁRIO SANTO AGOSTINHO (CEUA UNIFSA), em reunião de 22/03/2019.

Vigência	04/2019 à 12/2019
Espécie linhagem	<i>Rattus norvegicus</i>
Nº de animais	40 ratos
Peso/Idade	1/2 meses com 210-250 g
Sexo	Machos
Origem	Biotério do Centro Universitário Santo Agostinho



Prof. Me. Bernardo Melo Neto  
Coordenador da CEUA UNIFSA

## ANEXO 2 – CERTIFICADO DE CALIBRAÇÃO



**IBRAMED**  
Ibramed – Indústria Brasileira de Equipamentos Médicos

### CERTIFICADO DE CALIBRAÇÃO

---

**DADOS DO CLIENTE ou EMPRESA**

**Nome:** MARCOS MACIEL BATISTA DE SOUSA EIRELI  
**CPF ou CNPJ:** 26.883.111/0001-87  
**Endereço:** R. ANTONIO DE CASTRO FRANCO, 601 SL C  
**Bairro:** FATIMA  
**Cidade:** TERESINA/PI  
**CEP:** 64049-484

**Data da Calibração:** 03/07/2019

---

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERÍSTICAS**

**Equipamento:** Caneta Laser 830 nm  
**Modelo:** C-830  
**Número de Série:** 0556810013

---

**PADRÕES UTILIZADOS**

Instrumento	Fabricante	Modelo	Certificados	Nº de Série	Validade
Medidor Potência Laser	OPHIR	NOVA II	C 190230	636759 / 642313	09/04/2021

Os documentos relativos à rastreabilidade estão em nossos arquivos e disponíveis para consulta quando solicitado.  
 Este certificado é válido somente para o objeto ensaiado. Total ou parcial reprodução do mesmo somente com a autorização da IBRAMED.

---

**RESULTADOS DA CALIBRAÇÃO**

Características	Leitura Padrão	Leitura Verificada
Laser	27mW	33mW

**Observações:**

Executado por: Coordenador Técnico	Verificado por: Coordenador de Inspeção Final
<i>Alex Altomani Di Salvi</i> <b>Alex Altomani Di Salvi</b>	<i>Helton Carlos Ropelle</i> <b>Helton Carlos Ropelle</b>
<b>Data:</b> 03 / 07 / 19	<b>Data:</b> 03 / 07 / 19

---

Av. Dr. Carlos Burgos, 2900 / Bairro: Jardim Itália / Amparo - SP / Caixa postal 36/ CEP 13901-080  
 Telefone: (19) 3817-9633 - Fax: (19) 3817-9634  
 e-mail: [qualidade@ibramed.com.br](mailto:qualidade@ibramed.com.br) / site: [www.ibramed.com.br](http://www.ibramed.com.br)



Photochemistry and Photobiology, 20\*\*, \*\*: \*-\*

### Systematic Review of Photobiomodulation Therapy (PBMT) on the Experimental Calcaneal Tendon Injury in Rats

Rauena Souto Diogo Lopes Silva<sup>1,2</sup>, Diego Rodrigues Pessoa<sup>3</sup>, Rafaela Rodrigues Mariano<sup>4</sup>, Ana Beatriz Silva Castro<sup>4</sup>, Raurys Alencar de Oliveira<sup>1</sup> and Cleber Ferraresi<sup>2\*</sup> 

<sup>1</sup>Health Sciences Center, Universidade Estadual do Piauí, Teresina, Brazil

<sup>2</sup>Post-graduation program in Biomedical Engineering, Universidade Brasil, Sao Paulo, Brazil

<sup>3</sup>Piauí Higher Education Association (AESPI), Teresina, Brazil

<sup>4</sup>Centro Universitário Santo Agostinho, Teresina, Brazil

Received 18 November 2019, accepted 21 February 2020, DOI: 10.1111/php.13262

#### ABSTRACT

This systematic review analyzed the light parameters and the effects of photobiomodulation therapy (PBMT) through low-level laser therapy (LLLT) and/or LED (light-emitting diode) on tendon repair of rats submitted to calcaneal injury. This study was conducted in accordance with the guidelines of the Preferred Reporting Items for Meta-Analysis, and PubMed and MEDLINE databases were accessed to search eligible studies published in English. The search terms were as follows: "Achilles tendon" or "Calcaneal tendon" or "tendon injuries" or "soft tissue injuries" and "tendinopathy" or "tendinitis" and "low-level light therapy" or "low-level laser therapy" or "low intensity power therapy" or "light-emitting diode" or photobiomodulation." The SYRCLC (*Systematic Review Center for Laboratory animal Experimentation*) risks of bias was used to assess the risk of bias for selected studies. A total of 225 studies were found based on the descriptors used, and only 33 studies were eligible. Light parameters identified per point of irradiation were approximately 60 mW (continuous mode at infrared spectra), 2 W cm<sup>-2</sup>, 2 J and 45 J cm<sup>-2</sup>. Light parameters at red spectra, continuous versus pulsed mode, and PBMT combined or compared with other therapies such as ultrasound, and studies using unhealthy rats (ovariectomized and/or diabetic models) were also identified and grouped according to these similarities. The main effects found were decreased inflammatory markers and signs of inflammatory process. PBMT (laser/LED) has positive effects in reducing the inflammatory and time for tissue repair in animal models of tendon injury and/or tendinitis using parameters identified.

#### INTRODUCTION

The calcaneus tendon is considered the strongest, the thickest (about 6.5 ± 0.8 mm with a variation of 25%) and the longest (about 3–15 cm) of the human body, formed by connective and fibrous tissue, whose main function is to transmit force to promote joint movement (1,2).

Tendinitis is an inflammatory response resulting from repetitive strain on the tendon, which gradually loses its ability to withstand tension and mechanical stress. This continuous process of repetitive effort, gradual loss of its mechanical properties and difficulty in repair process, negatively impacts the rehabilitation of individuals (3,4). In this context, calcaneal tendon injuries are considered as serious orthopedic and traumatic problems, which are associated with the aging of the population and the demands of overloads during exercise. It is estimated that 30 to 50% of the occurrences of these injuries are due to sports practices (5,6).

The process of tissue repair consists of three phases: inflammatory, proliferative and remodeling (7–9). The inflammatory phase is initiated soon after the tissue injury and may last up to 48 h and includes the processes of local defense, tissue destruction and chemotaxis stimuli. The proliferative phase involves the formation of granulation tissue, in which the presence of angiogenesis, of large amount of fibroblasts and of epithelial cells is observed (7–9). The remodeling phase is marked by the reduction of cells involved in previous processes and cellular apoptosis, and the presence of large amount of collagen produced by fibroblasts and extracellular matrix proteins (8,9). These processes are generally studied in animal models using mice and rats, since clinical trials are limited to take tissue samples, analyze cell proliferation and migration, and synthesize collagen in several time windows.

Currently, in physiotherapeutic clinical practice, mechanical and electromagnetic resources have been widely studied to favor the process of calcaneal tendon repair, among them stands out the photobiomodulation therapy (PBMT) by low-level laser therapy (LLLT) and/or light-emitting diode (LED) (10–12).

PBMT by LLLT emits light within the visible (red) or invisible (infrared) electromagnetic spectrum, which differs from ordinary light exhibiting properties such as monochromaticity (wavelength with a narrow spectral band), coherence (phase waves) and collimation (parallel waves) (10–12). Moreover, light from light-emitting diodes has similar physics properties such as monochromaticity, and lesser coherence and collimation, but promotes similar effects on the tissue compared with LLLT (12,13). As one of the most reported mechanisms of action in the literature, Hamblin et al. (12) state that PBMT acts in biological tissues by stimulating the synthesis of adenosine triphosphate (ATP), which provides energy to tissues after the interaction

\*Corresponding author email: cleber.ferraresi@gmail.com (Cleber Ferraresi)  
© 2020 American Society for Photobiology

## 2 Rauena Souto Diogo Lopes Silva *et al.*

between the light beam and the active receptors found in mitochondrial ridges (cytochrome c oxidase), which helps transport electrons from the electron transport chain (14,15).

In view of the above, this study aimed to perform a systematic review of the main effects of PBMT by LLLT or LED on the process of tendon repair in rats submitted to calcaneal tendon injury or induced tendinitis. In addition, this study aimed to identify the light parameters such as power (mW), power density ( $W\text{ cm}^{-2}$ ), energy and energy density ( $J\text{ cm}^{-2}$ ) and then establish a dose-response of PBMT to accelerate the healing of injured tendons or tendinitis condition.

### MATERIALS AND METHODS

The present study was conducted according to the guidelines of the Preferred Reporting Items for Meta-Analysis (PRISMA) (16), as well as using the terms pre-established by the Cochrane Library Collaboration. Of the selected studies, those that investigated the effects of PBMT by LLLT and/or LED on the process of tissue repair in the calcaneus tendon of rats were used.

**Search strategy.** The following experimental studies were used: (1) studies published in the last 10 years (2009 to 2019); (2) those that emphasized calcaneal tendon injuries (tenotomy and/or intratendinous injection and/or rupture); and (3) those that assessed experimental times (from 0–48 h to 3–21 days, but not limited to 21 days). The following types of studies were excluded: clinical trials, review articles, editorials, case reports or case series and *in vitro* (i.e. cell culture) studies on animals other than rats.

The databases searched were PubMed and MEDLINE. The last update of the survey was carried out on 12 October 2019. Articles published in English were considered eligible. The search terms were as follows: "Achilles tendon" or "Calcaneal tendon" or "tendon injuries" or "soft tissue injuries" and "tendinopathy" or "tendinitis" and "low-level light therapy" or "low-level laser therapy" or "low intensity power therapy" or "light-emitting diode" or "photobiomodulation."

**Selection of the studies.** The selection was performed in two stages, both carried out by two researchers independently. Divergent opinions were resolved through the analysis of a third researcher. The first stage comprised database searches, and duplicate studies were excluded. Next, a preliminary reading of the title and the abstract of the selected articles was carried out, aimed at including only those studies that met the eligibility criteria. In the second stage, the articles selected in the first stage were read in full, and those that met the eligibility criteria were included in the study.

**Methodological quality.** The evaluation of the methodological quality of the included experimental studies was carried out by two researchers independently, and divergent opinions were resolved by an agreement between them. The risk-of-bias tool for experimental studies *Systematic Review Center for Laboratory animal Experimentation* (SYRCLE) (17) was used to evaluate the risk of bias in studies with animals. This tool contains the following evaluation categories: selection bias, performance bias, detection bias, friction bias, reporting bias and other sources of bias. Ten questions are applied to the articles included in the systematic review, whose answers may be "YES," indicating low risk of bias; "NOT," indicating high risk of bias; and "?," indicating uncertain risk of bias. It is not recommended to calculate the sum of each individual study by this tool.

Item 1 of this tool corresponds to the selection bias, composed of allocation sequence (question 1), same baseline characteristics (question 2) and allocation concealment of animal (question 3) (17).

Item 2 of the tool corresponds to the performance bias, composed of random housing of animal boxes in the animal house (question 4) and blinding regarding the therapy applied to the animals (question 5) (17).

Item 3 refers to friction bias. In this item, the nonrandom selection of animals for outcome evaluation is biased (question 6), and the nonblinding of the evaluators for the outcomes is also a bias (question 7) (17).

Item 4 refers to the declaration of incomplete results of the studied outcomes (question 8) (17). Item 5 refers to selective report of outcome (question 9) (17). Finally, item 6 refers to other sources of bias (question 10) (17).

**Light parameters.** The light parameters (wavelength, power, power density, energy and energy density) were identified in all included studies, and the average and median were calculated to identify also the dose-response of PBMT, except to wavelength.

### RESULTS

#### Search strategy and selection of the studies

A total of 225 studies were found based on the descriptors used, 171 were found in PubMed and 54 in MEDLINE. Initially, 174 studies were excluded for displaying duplicity in more than one database. The titles of 51 studies were read, and 8 were excluded after reading (these titles did not describe the use of PBMT in the treatment of the tendon of rats). The analysis of the abstracts and methodology of 43 studies was performed. Only 33 studies were considered eligible for the study and were then submitted to evaluation of methodological quality and inclusion criteria.

Furthermore, the selected studies were grouped according to the similarities in light parameters: photobiomodulation in the red spectra; photobiomodulation in the infrared spectra; photobiomodulation in the infrared spectra (pulsed mode); photobiomodulation in the infrared spectra (continuous versus pulsed mode); photobiomodulation in the infrared versus red spectra; and photobiomodulation combined or compared with other therapies. Finally, the studies were grouped according to the animal's condition, such as unhealthy rats (ovariectomized and/or diabetic models) (Figure 1).

Table 1 provides information on the studies selected for this review, addressing reference (author), objective, sample, intervention and duration of the experimental study. Table 2 provides information from the studies selected for this review, addressing reference (author), wavelength (nm), power (W), energy (J), energy density ( $W\text{ cm}^{-2}$ ), spot size ( $\text{cm}^2$ ), irradiation time (sec), mode/distance of irradiation and results found.

#### Methodological quality

Evaluation of the methodological quality and the risk of bias of the included studies was measured through the SYRCLE tool (17). It was identified in question 1 that there was random allocation of animals, which were categorized into irradiated groups (PBMT by LLLT and/or LED).

For question 2, all studies analyzed used the calcaneus tendon as the object of study and had the same baseline characteristics. Question 3 identified that all studies conducted the allocation concealment.

However, no study described the random allocation of animal boxes in the animal house (question 4), and no study described whether the researchers (except those who applied the therapies) were blinded to the treatments applied (question 5). Question 6 reported that no study described whether the evaluation of the outcome was performed randomly. No study reported whether the outcome evaluators were blinded to the therapies applied (question 7).

For question 8, three of the studies mentioned incomplete results or outcomes, and only eight studies showed selective report of outcomes (question 9). Finally, question 10 identified that four studies demonstrated other sources of bias. All these results are presented in Table 3.

**Table 1.** Studies included in the review, organized in chronological order of publication: authors/year, objective, sample (sample size of rats), intervention and intervention time.

Reference	Objective	Sample	Intervention	Experimental time
<b>Photobiomodulation in the red spectra</b>				
Casalechi et al. 2009 (18)	To evaluate the effect of PBMT by LED on the tissue repair process of the tendon, aiming at a low-cost alternative to LLLT in clinical treatments	30	C1: control (7 days) L1: LED (7 days) C2: control (14 days) L2: LED (14 days) C3: control (21 days) L3: LED (21 days)	Therapeutic procedure was started 1h after the surgery and repeated every 24h.
Laraia et al. 2012 (19)	To investigate the effects of PBMT by LLLT on levels of protein expression of inflammatory mediators after cutting Achilles tendon of rats	30	G1: control group (untreated 6h) G2: LLLT (6h) G3: control group (untreated 24h) G4: LLLT (24h) G5: control group (untreated 72h) G6: LLLT (72h)	Analysis at 6h, 24h and 72h Number of treatments G2, G4 and G6: 1, 2 and 4, respectively
Moura Junior Mde et al. 2014 (20)	To evaluate the anti-inflammatory response of PBMT by LED and ultrasound therapy (UST) and the quality and rapidness of tendon repair in an experimental model of tendinitis, employing histomorphometry and Raman spectroscopy	35	Group 1: tendinitis (TD) Group 2: ultrasound (US) Group 3: LED Group 4: healthy group (control) US and LED groups were treated in the following experimental periods (7 and 14 days)	The therapeutic procedure was started 1h after the surgery
Torres-Silva et al. 2015 (21)	To investigate the acute effects of PBMT by LLLT in an experimental model of tendinitis induced by collagenase injection on rats' Achilles tendon, verifying inflammatory markers (COX-2, TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-10) 2h after induced tendinitis	30	G1: control G2: nontreated G3: diclofenac G4: LLLT 1 Joule G5: LLLT 5 Joules	Analysis at 2h after induced tendinitis LLLT was applied 1h after collagenase injection Diclofenac 30 min after collagenase injection
<b>Photobiomodulation in the infrared spectra</b>				
Oliveira et al. 2009 (22)	To study the effect of PBMT by LLLT on the process of tissue repair in calcaneus tendon after undergoing a partial lesion.	60	Group 1: standard control Group 2: Sham Group 3: PBMT by LLLT (3 days) Group 4: PBMT by LLLT (5 days) Group 5: PBMT by LLLT (7 days)	The therapeutic procedure was started after injury
Xavier et al. 2010 (23)	To investigate the effect of PBMT by LED on collagenase-induced tendinitis in rats, on inflammatory mediators (interleukin IL-1 $\beta$ , interleukin IL-6 and cyclooxygenase-2 COX-2 factor) through the real-time polymerase chain reaction (RT-PCR)	56	G1: control group (7 days) G2: control group (14 days) G3: tendinitis group (7 days) G4: tendinitis group (14 days) G5: LED group (7 days) G6: LED group (14 days)	Analysis at 7 and 14 days LED irradiation started 12h after induced tendinitis and repeated every 48h
Pires et al. 2011 (24)	To investigate the modulations in the acute and chronic phases of experimentally induced tendinitis in rats after treatment with PBMT	42	G1: saline solution G2: PBMT by LLLT G3: collagenase 7 days G4: collagenase 14 days G5: PBMT + collagenase 7 days (4 treatments) G6: PBMT + collagenase 14 days (7 treatments)	Analysis at 7 and 14 days LLLT irradiation started at 12h after induced tendinitis
Marcos et al. 2011 (25)	To investigate whether PBMT by LLLT could reduce tendinitis inflammation, and whether the possible mechanism of action could be through inhibition of the two cyclooxygenase-2 (COX-2) isoforms in inflammation	36	Group 1: saline solution Group 2: collagenase Group 3: intramuscular diclofenac Group 4: PBMT by LLLT (1J) Group 5: PBMT by LLLT (3J) Group 5: PBM per LLLT (6J)	PBMT applied 1h after collagenase injection
Neves et al. 2011 (26)	To evaluate the effect of 830nm diode laser operating at 40, 60, 80 and 100 mW and energy density of 30 J cm <sup>-2</sup> on the repair of partial calcaneal tendon ruptures in rats	50	Group 1: control group Group 2: PBMT by LLLT (40 mW) Group 3: PBMT by LLLT (60 mW) Group 4: PBMT by LLLT (80 mW) Group 5: PBMT by LLLT (100 mW)	They were treated for 5 consecutive days after partial tendon rupture
Marcos et al. 2012 (27)	To investigate the short-term effects of PBMT by LLLT or sodium diclofenac treatments on biochemical markers and biomechanical properties of inflamed Achilles tendons of rats induced by collagenase	30	G1: control group G2: collagenase G3: diclofenac G4: LLLT 1 Joule G5: LLLT 3 Joules	Analysis at 2h after induced inflammation LLLT was applied 1h after collagenase injection Diclofenac 30 min before collagenase injection

(continued)

Table 1. (continued)

Reference	Objective	Sample	Intervention	Experimental time
Casalechi et al. 2013 (28)	To investigate whether LLLT modulates expression of MMP-13, MMP-1, VEGF and anti-inflammatory mediator (IL-10) in the acute and chronic phases of collagenase-induced tendinitis in rats	30	G1: control G2: collagenase acute phase G3: LLLT acute phase (4 treatments) G4: LLLT acute phase (7 treatments) G5: collagenase chronic phase G6: LLLT chronic phase	Analysis at 7 and 14 days Acute phase (12h) until 7 days (4 treatments with LLLT) Acute phase (12h) until 14 days (7 treatments with LLLT) Chronic phase (7 days) starting from 7 <sup>th</sup> day until 14 <sup>th</sup> day (4 treatments with LLLT)
Marcos et al. 2014 (29)	To compare the effects of PBMT by LLLT and the diclofenac (nonsteroidal anti-inflammatory drug) on the collagenase-induced Achilles tendinitis regarding mechanical and biochemical (MMP) analyses in rats	60	G1: no induction G2: tendinitis G3: diclofenac G4: LLLT 1 Joule G5: LLLT 3 Joules	Analysis at 2h after induced tendinitis (one treatment) Analysis at 7 days (after induced tendinitis, 6 treatments)
Xavier et al. 2014 (30)	To investigate the effects of PBMT by LED on the expression of IL-10, Type-I and Type-III collagen through RT-PCR in an experimental model of collagen-induced tendinitis in rats	30	G1: no induction G2: tendinitis control (7 days) G3: tendinitis control (14 days) G4: LED (7 days) G5: LED (14 days) G6: LED (14 days)	Analysis at 7 and 14 days LED irradiation was 12h after induced tendinitis and every 48h
Pinfildi et al. 2014 (31)	To quantify mast cells at different time intervals after partial Achilles tendon rupture in rats treated with PBMT by LLLT	60	Group 1: PBMT by LLLT (6h) Group 2: PBMT by LLLT (12h) Group 3: PBMT by LLLT (24h) Group 4: PBMT by LLLT (2 days) -Post-24h -Post-48h * Postlesion Group 5: PBMT by LLLT (3 days) -Post-24h -Post-48h -Post-72h * Postlesion Group 6: sham group (6h) Group 7: sham group (12h) Group 8: sham group (24h) Group 9: sham group (2 days) -Post-24h -Post-48h * Postlesion Group 10: sham group (3 days) -Post-24h -Post-48h Post-72h	Treatments were started immediately after 6 and 12h, and 2- and 3-days postlesion
de Jesus et al. 2014 (32)	To evaluate the effects of PBMT in the near-infrared region spectrum in the process of repair of calcaneal tendon injury	60	G1: sham for 1 day G2: LLLT for 1 day G3: Sham for 3 days G4: LLLT for 3 days G5: Sham 7 days G6: LLLT for 7 days	Analysis at 1, 3 and 7 days
de Jesus et al. 2016 (11)	To evaluate the modulation of IL-1 $\beta$ , COX-2 and PGE2 in partially injured calcaneal tendons treated with PBMT	30	G1: control G2: sham for 1 day G3: LLLT for 1 day G4: sham for 3 days G5: LLLT for 3 days G6: sham for 7 days G7: LLLT for 7 days	Analysis at 1, 3 and 7 days
Gomes et al. 2017 (33)	To evaluate the effects of PBMT at different experimental doses (1.4 and 2.1 J) on the inflammatory indicators in calcaneal tendon injury in rats	45	G1: control G2: PBMT (1.4 Joule) G3: PBMT (2.1 Joule)	Analysis at 6, 24 and 48 hours LLLT irradiation once a day
Naterstad et al. 2018 (34)	To compare the short- and medium-term effects of PBMT by LLLT, dexamethasone and diclofenac on inflammation and tendon tissue repair in collagenase-induced tendinitis in rats	205	G1: control G2: injury (no treatment) G3: injury + LLLT (7 treatments) G4: injury + diclofenac G5: injury + dexamethasone	Analysis at 12h, 24h, 48h and 72h; and 5, 7, 14, 21, 28 and 60 days

(continued)

Table 1. (continued)

Reference	Objective	Sample	Intervention	Experimental time
Fernandes de Jesus et al. 2019 (35)	To evaluate the modulatory effects of metalloproteinases (MMP-1, MMP-3 and MMP-13) after treatment with PBMT by LLLT in rats submitted to calcaneal tendon injury	65	G1: control G2: placebo (1 day) G3: PBMT (1 day) G4: placebo (3 days) G5: PBMT (3 days) G6: placebo (7 days) G7: PBMT (7 days)	Analysis at 1, 3 and 7 days LLLT irradiation once a day
<b>Photobiomodulation in the infrared spectra (pulsed mode)</b>				
Joensen et al. 2012 (36)	To investigate the effect of PBMT by LLLT administered 30 min after injury to the Achilles tendon	16	Group 1: PBMT by LLLT (pulsed) Group 2: PBMT BY LLLT (placebo)	The animals were treated 30 minutes after partial tendon rupture
<b>Photobiomodulation in the infrared spectra (continuous versus pulsed mode)</b>				
Fda et al. 2013 (37)	To investigate the effects of different regimens of PBMT by LLLT on partially tenotomized Achilles tendons of rats	140	G1: control animals (intact) G2: injured G3: injured + LLLT continuous G4: injured + LLLT 20Hz G5: injured G6: injured + LLLT continuous G7: injured + LLLT 20Hz plus 2KHz	Analysis at 8 and 15 days G2, G3 and G4: irradiation once a day for 8 days (total of 6 treatments) G5, G6 and G7: irradiation once a day for 15 days (total of 13 treatments)
Guerra Fda et al. 2014 (38)	to analyze the effects of different PBMT by LLLT protocols in the early phases of wound healing after tendon transection to determine the most appropriate postoperative protocol for tendon repair.	105	Group 1: intact Group 2: injured Group 3: injured + PBMT by LLLT ( $4 \text{ J cm}^{-2}$ continuous), Group 4: injured + PBMT by LLLT ( $4 \text{ J cm}^{-2}$ -20 Hz) Group 5: injured Group 6: injured + PBMT by LLLT ( $4 \text{ J cm}^{-2}$ continuous) Group 7: injured + PBMT per LLLT ( $4 \text{ J cm}^{-2}$ -20 Hz until the seventh day and 2 kHz from 8 to 14 days).	Treatment with LLLT started at the day after surgery and lasted until the day before euthanasia
Guerra et al. 2016 (39)	To evaluate the effects of PBMT in the investigation of molecular parameters in calcaneal tendon lesions in rats	85	G1: rats without lesions G2: control G3: lesion + PBMT (continuous) G4: lesion + PBMT (pulsed)	Analysis at 8 and 15 days LLLT was applied once a day
<b>Comparing photobiomodulation in the infrared versus red spectra</b>				
Barbosa et al. 2013 (40)	To investigate the effects of PBMT by LLLT (660 nm and 830 nm) alone or associated with platelet-rich plasma (PRP) on partial tenotomy of Achilles tendons of rats	54	G1: partial tenotomy G2: partial tenotomy + PRP G3: partial tenotomy + 660 nm G4: partial tenotomy + 830 nm G5: partial tenotomy + 660 nm + PRP G6: partial tenotomy + 830 nm + PRP	Analysis at 13 <sup>th</sup> day after partial tenotomy G2, G5 and G6: received once PRP is activated immediately after the injury G3, G4, G5 and G6: irradiated once a day until 13 <sup>th</sup> day
Ferreira et al. 2015 (41)	To evaluate the proximal, medial and distal vascularization of the calcaneus tendon after PBMT by LLLT in injured and noninjured tendons.	28	G1: no injury G2: lesion + LLLT simulated G2: lesion + LLLT 830 nm G3: lesion + LLLT 660nm	Analysis at 7 days LLLT irradiation started at 1 min after tendon lesion and for 4 days
<b>Comparing photobiomodulation with other therapies</b>				
Wood et al. 2010 (42)	The study was designed to provide some data on which therapy (the exclusive or combined use of UST and PBMT by LLLT) is the best option for the treatment of tendon injuries.	50	Group 1: control Group 2: UST Group 3: PBM by LLLT Group 4: UST + PBM by LLLT Group 5: PBM by LLLT + UST	They were treated for 5 consecutive days after partial tendon rupture
Moura Junior Mde et al. 2015 (43)	To compare the anti-inflammatory and healing effects of therapeutic ultrasound therapy (UST) and PBMT by LED in an experimental model of tenotomy using histomorphometry and Raman spectroscopy		Group 1: control (tenotomy) Group 2: UST (ultrasound therapy) Group 3: LED visible (LR) Group 4: LED invisible (LIR)	The therapeutic procedure was started 1h, and during 7 and 14 days
Haslerud et al. 2017 (44)	To investigate the interaction of two treatments (PBMT by LLLT and cryotherapy) on tendon inflammation and mechanical properties		Group 1: control group Group 2: injured nontreated group Group 3: PBMT by LLLT (LG) Group 4: cryotherapy (CG) Group 5: LG first and CG Group 6: CG first and LG	All treatments were performed 1h after the tendon trauma

(continued)

Table 1. (continued)

Reference	Objective	Sample	Intervention	Experimental time
Lucke <i>et al.</i> 2019 (45)	To analyze the effects of the association of PBMT by LLLT (808 nm) to cell therapy with adipose-derived mesenchymal stem cells (ASCs), especially on remodeling genes and on the recovery of the collagen fibers, at the 14th day of the calcaneus tendon repair	90	Group 1: control Group 2: transected (T) Group 3: PBMT by LLLT (LLLT) Group 4: ASCs Group 5: PBMT by LLLT-associated ASCs	All treatments were performed 1h after administering the tendon trauma
<b>Photobiomodulation in the treatment of unhealthy rats</b>				
Nouruzian <i>et al.</i> 2013 (46)	To evaluate the effect of PBMT by LLLT on the Achilles tendon healing in streptozotocin-induced diabetic (STZ-D) rats via a biomechanical evaluating method	33	Group 1: PBMT by LLLT (not diabetic), with 2.9 J cm <sup>-2</sup> Group 2: PBMT by LLLT (not diabetic), with 11.5 J cm <sup>-2</sup> Group 3: control not diabetics (not PBMT by LLLT) Group 4: PBMT by LLLT (diabetic), with 2.9 J cm <sup>-2</sup> Group 5: PBMT by LLLT (diabetic), with 11.5 J cm <sup>-2</sup> Group 3: control diabetics (not PBMT by LLLT)	Treatments were started immediately after surgery and skin suturing
Aliodoust <i>et al.</i> 2014 (47)	To investigate the effects of PBMT by LLLT laser on inflammation and TGF-β1 gene expression in an experimental model of complete transected Achilles tendon in both healthy and diabetic rats	88	G1: control G2: LLLT G3: diabetic rats G4: diabetic rats + LLLT	Analysis at 5, 10 and 14 days LLLT irradiation was once a day
Helrigle <i>et al.</i> 2016 (48)	To analyze the effect of PBMT by LED on the calcaneus tendon lesion of ovariectomized rats (OVX)	35	G1: OVX without lesion and treatment. G2: OVX + LED G3: OVX (counter-lateral tendon) G4: No OVX, lesion and treatment.	Analysis at 3, 7 and 14 days LED irradiation started 12h after tendon lesion and every 48h
de Oliveira <i>et al.</i> 2019 (49)	To compare the treatment effects of PBMT by LLLT and aerobic exercise on the morphology, mechanical properties and gene and/or immunoeexpression of Type-I collagen (Col1) and Type-III collagen (Col3) and MMPs 2, 3, 9 and 13 after 3 weeks of Achilles tendon injury in chemically induced Type-I diabetes in rats	79	Group 1: injured nondiabetic Group 2: injured diabetic Group 3: injured diabetic plus PBMT by LLLT Group 4: injured diabetic plus aerobic exercise Group 5: injured diabetic plus aerobic exercise and PBMT by LLLT	All treatments were performed 1h after the tendon trauma

Abbreviations: ASCs, adipose-derived mesenchymal stem cells; COL1, Type-I collagen; COL3, Type-III collagen; COX-2, cyclooxygenase-2; IL-10, interleukin-10; IL-1β, interleukin-1 beta; IL-6, interleukin-6; i-NOS, induced nitric oxide synthase; J, Joule; LED, light-emitting diode; LLLT, low-level laser therapy; MMP-1, matrix metalloproteinase-1; MMP-13, matrix metalloproteinase-13; MMP-3, matrix metalloproteinase-3; OVX, ovariectomized rats; PBMT, photobiomodulation therapy; PGE2, prostaglandin E2; STZ-D, streptozotocin-induced diabetic; TGF-β, transforming growth factor beta; TNF-α, tumor necrosis factor alpha; UST, ultrasound therapy; VEGF, vascular endothelium growth factor.

### Light parameters

Firstly, all light parameters of the included studies were identified and are summarized in Table 2. Next, for the wavelength, the most common light identified in all studies selected was in infrared range (780, 808, 810, 830, 880 and 945 nm) with 23 investigations, followed by that in red range (632 and 660 nm) with seven investigations, and three studies compared red and infrared wavelengths (Table 2).

All studies were grouped according to the similarity of the light parameters used. In the red spectra (continuous mode), PBMT used a power of the light ranging from 30 to 100 mW (average of 80 mW and mean of 100 mW), energy from 1 to 12 Joules (average of 5.15 Joules and mean of 3.6 Joules), energy density from 4 to 214 J cm<sup>-2</sup> (average of 76 J cm<sup>-2</sup> and mean of 35.7 J cm<sup>-2</sup>), power density from 0.06 to 3.57 W cm<sup>-2</sup> (average of 1.85 W cm<sup>-2</sup> and mean of 1.88 W cm<sup>-2</sup>) and time of irradiation from 10 to 120 seconds (average of 68 seconds and mean of 60 seconds; Fig. 1).NO

In the infrared spectra (continuous mode), power of the light ranged from 22 to 100 mW (average of 63 mW and mean of 70 mW), energy ranged from 0.12 to 6 Joules (average of 1.9 Joules and mean of 1.4 Joules), energy density ranged from 4 to 214 J cm<sup>-2</sup> (average of 45.6 J cm<sup>-2</sup> and mean of 30 J cm<sup>-2</sup>), power density ranged from 0.04 to 3.57 W cm<sup>-2</sup> (1.94 W cm<sup>-2</sup> and mean of 1.75 W cm<sup>-2</sup>) and time of irradiation ranged from 3 to 170 s (average of 35 s and mean of 14 s). These averages and median were calculated to suggest possible ideal parameters and guide new studies in rats. All averages and median calculated are displayed in Table 4.

Finally, PBMT in pulsed mode, comparison between red and infrared wavelengths, combination of PBMT with other therapies, and PBMT applied in unhealthy animal models of tendonitis were also grouped according to these similarities.

### DISCUSSION

The application of PBMT by LLLT and/or LED has been widely studied in order to optimize the process of calcaneal tendon

**Table 2.** Articles included in the review, organized in chronological order of publication: author/year, informed parameters regarding wavelength (nm), power (W), power density ( $\text{W cm}^{-2}$ ), energy (J), energy density ( $\text{J cm}^{-2}$ ) and irradiation time (sec), and results found.

Reference	Wavelength (nm)	Power (W)	Energy (J)	Energy density ( $\text{J cm}^{-2}$ )	Power density ( $\text{W cm}^{-2}$ )	Spot size ( $\text{cm}^2$ )	Irradiation time (sec)	Mode/distance	Results
<b>Photobiomodulation in the red spectra</b>									
Casalechi et al. 2009 (18)	640 $\pm$ 20 nm	0.1	12	20	0.2 (Calculated)	0.5	120	Continuous/contact	The PBMT by LED was better than control group in all experimental phases, with significantly lower cellularity on the 7 days
Laraia et al. 2012 (19)	660	0.1	6	214	3.57	0.028	60	Continuous/contact	PBMT by LLLT reduced IL-1 $\beta$ and increased IL-10 at 6, 24 and 72h after tendon injury. IL-6 reduced with PBMT at 72h
Moura Junior Mde et al. 2014 (20)	640	0.03	3.6	4	0.06	0.5	120	Continuous/contact	Histomorphometric analysis showed lower number of fibroblasts on the 14 <sup>th</sup> day of therapy for the US-treated group, compared with the tendinitis and LED, indicating lower tissue inflammation
Torres-Silva et al. 2015 (21)	660	0.1	G4: 1 G5: 3	G4: 35.7 G5: 107.1	3.57	0.028	G4: 10 G5: 30	Continuous/contact	PBMT by LLLT 3 Joules was effective to reduce IL-6 and TNF- $\alpha$ compared with nontreated group Diclofenac and LLLT 1 Joule were not effective in reducing inflammatory mediators such as COX-2, TNF- $\alpha$ and IL-6
<b>Photobiomodulation in the infrared spectra</b>									
Oliveira et al. 2009 (22)	830	0.04	0.12	4.2	1.4	0.028	3	Continuous/contact	LLLT promoted in all groups (3, 5 and 7 days) increment in realignment of collagen fibers
Xavier et al. 2010 (23)	880 $\pm$ 10	0.022	3.74	7.5	0.044	0.5	170	Continuous/contact	PBMT by LED was able to reduce the signs of inflammation, the number of inflammatory cells and the expressions of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ and COX-2
Pires et al. 2011 (24)	780	0.022	1.65	7.7 (calculated 8.25)	0.110	0.2	75	Continuous/contact	PBMT by LLLT was able to decrease the expression of IL-6, COX-2 and TGF- $\beta$ in the acute and chronic phase of tendinitis in rats. LLLT did not modulate IL-1 $\beta$ expression in any time
Marcos et al. 2011 (25)	810	0.1	G4: 1 G5: 3 G6: 6	G4: 35.71 G5: 107.14 G6: 214.29	3.57	0.028	G4: 10 G5: 30 G6: 60	Continuous/contact	LLLT dose of 3 J significantly reduced inflammation through less COX-2-derived gene expression and PGE2 production, and less edema formation compared with nonirradiated controls

(continued)

Table 2. (continued)

Reference	Wavelength (nm)	Power (W)	Energy (J)	Energy density (J cm <sup>-2</sup> )	Power density (W cm <sup>-2</sup> )	Spot size (cm <sup>2</sup> )	Irradiation time (sec)	Mode/ distance	Results
Neves et al. 2011 (26)	830	G2: 0.04 G3: 0.06 G4: 0.08 G5: 0.1	G2: 0.84 G3: 0.84 G4: 0.84 G5: 0.84	30	G2: 1.4 G3: 2.14 G4: 2.8 G5: 3.5	0.028	G2: 21 G3: 14 G4: 10.5 G5: 8.4	Continuous/contact	PBMT by LLLT resulted in significantly greater amounts of Type-III collagen (output powers of 60 mW or more) and Type-I collagen (output power of 80 mW). However, no significant differences between groups were found in the realignment of collagen fibers.
Marcos et al. 2012 (27)	810	0.1	G4: 1 G5: 3	G4: 35.7 G5: 107.1	3.57	0.028	G4: 10 G5: 30	Continuous/contact	PBMT by LLLT (1 and 3 Joules) decreased COX-2, PGE2, TNF- $\alpha$ , MMP-3, MMP-9 and MMP-13 compared with the collagenase group. Biomechanical properties (force to rupture) were preserved with LLLT
Casalechi et al. 2013 (28)	780	0.022	1.54	7.5	0.107	0.205	70	Continuous/contact	PBMT by LLLT was able to modulate IL-10, VEGF, MMP-1 and MMP-13
Marcos et al. 2014 (29)	810	0.1	G4: 1 G5: 3	G4: 35.7 G5: 107.1	3.57	0.028	G4: 10 G5: 30	Continuous/contact	PBMT by LLLT decreased MMP-3, MMP-9 and MMP-13 compared with diclofenac PBMT 1 Joule recovered maximum force and stretch at maximum force compared with the diclofenac and PBMT 3 Joules groups.
Xavier et al. 2014 (30)	880 $\pm$ 10	0.022	3.7	7.5	0.044	0.5	170	Continuous/contact	PBMT by LED was able to increase IL-10 expression and Type-I and Type-III collagens.
Pinfieldi et al. 2014 (31)	830	0.08	1.12	40	2.8	0.028	14	Continuous/contact	LLLT increased the quantity of mastocytes in the assessment periods compared with the sham groups
de Jesus et al. 2014 (32)	780	0.07	0.7	17.5	1.75	0.04	10	Continuous/contact	PBMT (7 days) stimulated the cell proliferation of collagen Type I.
de Jesus et al. 2016 (11)	780	0.07	0.7	17.5	1.75	0.04	10	Continuous/contact	The PBMT by LLLT was able to modulate IL-1 $\beta$ , COX-2 and PGE2
Gomes et al. 2017 (33)	808	0.05	G2: 1.4 G3: 2.1	G2: 50 G3: 75	G2: 1.78 G3: 1.78	0.028	G2: 28 G3: 42	Continuous/contact	A 2.1 J dose of PBMT reduced tissue temperature and hyperalgesia at the site of injury in rats, mainly in 48 hours
Naterstad et al. 2018 (34)	810	0.1	G3: 3	107.1	3.57	0.028	30	Continuous/contact	PBMT by LLLT prevented hemorrhage, inflammation and preserved tendon morphology compared with other groups
Fernandes de Jesus et al. 2019 (35)	780	0.07	G1: 0.7 G2: 2.1 G3: 4.9	G1: 17.5 G2: 17.5 G3: 17.5	G1: 1.75 G2: 1.75 G3: 1.75	0.04	G1: 10 G2: 10 G3: 10	Continuous/contact	All groups of PBMT reduced the levels of MMP-1 and MMP-13 in injured calcaneal tendons in 1 day (G1), 7 days (G2) and 15 days (G3)

(continued)

Table 2. (continued)

Reference	Wavelength (nm)	Power (W)	Energy (J)	Energy density (J cm <sup>-2</sup> )	Power density (W cm <sup>-2</sup> )	Spot size (cm <sup>2</sup> )	Irradiation time (sec)	Mode/distance	Results
<b>Photobiomodulation in the infrared spectra (pulsed mode)</b>									
Joensen et al. 2012 (36)	904	0.06	3	7.89	0.158	0.38	50	Pulsed/contact	There were no significant differences in ultimate tensile strength (UTS) between laser-treated, placebo-treated and uninjured tendons
<b>Photobiomodulation in the infrared spectra (continuous versus pulsed mode)</b>									
Guerra Fda et al. 2013 (37)	830	0.04	0.64	G3: 4 G4: 4 G6: 4 G7: 4	0.25	0.16	16 32	Continuous/ Pulsed 50%/ contact	PBMT 20Hz increased collagen Type I and Type III PBMT 20Hz increased MMP-2 PBMT continuous and 20Hz increased MMP-9
Guerra Fda et al. 2014 (38)	830	0.04	0.64	G3: 4 G4: 4 G6: 4 G7: 4	0.25	0.16	G3: 16 G6: 16 G4: 32 G7: 32	Continuous/ Pulsed 50%/ contact	The glycosaminoglycan (GAG) level increased in all transected groups, except in G5. G6 and G7 had significant increase in GAG in relation to G5. Birefringence analysis showed improvement in collagen organization in G7
Guerra et al. 2016 (39)	830	0.04	G3: 0.64 G4: 1.28	G3: 4.0 G4: 4.0	G3: 2.5 G4: 1.25	0.116	G3: 16 G4: 32	Continuous/ Pulsed 50%/ contact	PBMT by LLLT (pulsed) enabled anti-inflammatory responses, the release of pro-inflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$ , and decreased i-NOS activity
<b>Comparing photobiomodulation in the infrared versus red spectra</b>									
Barbosa et al. 2013 (40)	830 660	0.1	0.2 x 3 points	0.7	0.35	0.28	20	Continuous/ contact	PBMT combined with PRP (G5 and G6) increased collagen Type I
Ferreira et al. 2015 (41)	830 660	0.06	1.14	40	2.14	0.028	18.6	Continuous/ contact	PBMT showed no effect on the vascularization of rats' calcaneus tendon
<b>Comparing photobiomodulation with other therapies</b>									
Wood et al. 2010 (42)	830	0.04	0.12	4.2	1.4	0.028	3	Continuous/ contact	There was a significantly higher organization of collagen fibers in group 2 (US, ultrasound, therapy). The amount of Type-1 collagen found in groups 2 (US), 3 (LLLT) and 5 (LLLT + US) was significantly higher than that in the control group with no significant differences.

(continued)

Table 2. (continued)

Reference	Wavelength (nm)	Power (W)	Energy (J)	Energy density ( $J\ cm^{-2}$ )	Power density ( $W\ cm^{-2}$ )	Spot size ( $cm^2$ )	Irradiation time (sec)	Mode/ distance	Results
Moura Junior Mde et al. 2015 (43)	625 ± 15 945 ± 20	0.033	2	G3: 4 G4: 4	0.066	0.5	60	Continuous/ Pulsed/ Contact	Ultrasound therapy decreased the number of inflammatory cells compared with the tenotomy group and LED at infrared spectrum. In relation to the group treated with LED at red spectrum, and the tenotomy group, there was no significant difference. Raman spectroscopy revealed that the group treated with LED at red spectrum presented an increased synthesis of collagen I compared with the other treatments and the tenotomy group at 14 <sup>th</sup> day
Haslerud et al. 2017 (44)	810	0.1	3	107.14	3.57	0.028	30	Continuous/ contact	LLLT group decreased IL-1 $\beta$ . Combined treatment groups decreased IL-1 $\beta$ and TNF- $\alpha$ , and increased IL-6. Cryotherapy followed by LLLT improved biomechanical parameters of force (N) and displacement at the tendon rupture
Lucke et al. 2019 (45)	808 nm	0.04	1.3	50	1.45	0.0275	70	Pulsated/ contact	PBMT was the most effective in the collagen reorganization, followed by its combination with adipose-derived mesenchymal stem cells (ASCs)
<b>Photobiomodulation in the treatment of unhealthy rats</b>									
Nouruzian et al. 2013 (46)	632.8	0.0072	G1: 0.014 G2: 0.057 G4: 0.014 G5: 0.021	G1: 2.9 G2: 11.5 G4: 2.9 G5: 4.3	1.4	0.00524	G1: 2 G2: 8 G4: 2 G5: 3	Continuous/ contact	LLLT at 2.9 $J\ cm^{-2}$ to the tenotomized Achilles tendons in the nondiabetic and diabetic rats significantly increased the strength and maximum stress of repairing Achilles tendons.
Aliodoust et al. 2014 (47)	632	0.0072	0.014 x 44 points	2.9	1.4	0.00524	2	Continuous/ contact	PBMT by LLLT reduced inflammation in diabetic and nondiabetic rats. PBMT increased TGF- $\beta$ in diabetic and nondiabetic rats
Helrigle et al. 2016 (48)	945 ± 10	0.032	3.84	3.84	0.032	1	120	Continuous/ contact	PBMT by LED promoted the reduction of IL-6 and TNF- $\alpha$ and the increase in IL-10 in calcaneus tendon injury

(continued)

Table 2. (continued)

Reference	Wavelength (nm)	Power (W)	Energy (J)	Energy density ( $J\ cm^{-2}$ )	Power density ( $W\ cm^{-2}$ )	Spot size ( $cm^2$ )	Irradiation time (sec)	Mode/distance	Results
de Oliveira et al. 2019 (49)	660	0.01	0.16	4	0.25	0.04	16	Continuous/contact	Results suggest a beneficial interaction of combining both treatment strategies, that is aerobic exercise and PBMT by LLLT, on the biomechanical properties, tissue morphology and the expression of matrix molecules in diabetic tendons

Abbreviations: COX-2, cyclooxygenase-2; IL-10, interleukin-10; IL-1 $\beta$ , interleukin-1 beta; IL-6, interleukin-6; i-NOS, induced nitric oxide synthase; LED, light-emitting diode; LLLT, low-level laser therapy; MMP13, matrix metalloproteinase-13; MMP-3, matrix metalloproteinase-1; MMP-3, matrix metalloproteinase-3; MMP-9, matrix metalloproteinase-9; PBMT, photobiomodulation therapy; PGE2, prostaglandin E2; TGF- $\beta$ , transforming growth factor beta; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor alpha; VEGF, vascular endothelium growth factor.

repair, since it is a very promising therapeutic modulator of inflammatory processes (27,32). Also, considering the mechanisms of action of PBMT, Hamblin et al. (12) report that PBMT acts on photoreceptor molecules (chromophores) of the cytochrome c oxidase complex (complex IV, cytochrome c oxidase), which plays an important role in energy metabolism, allowing stimulation of electron transport chain in mitochondria, leading to an increase in oxygen consumption and production of ATP, with the potential to modify a variety of biological processes.

The studies included in the present systematic review presented low risk of bias for the majority aspects assessed through the SYRCLE tool (17), as reported in Table 3. However, all studies had high risk of bias to the domain "performance of bias" regarding "random housing" and "blinding," meaning that animals were not randomly housed during the experiments, and all caregivers and/or researchers were not blinded to the intervention applied in the animals, respectively. Other high risk of bias was about the domain "detection bias" regarding "random outcome assessment" and "blinding," showing there was no random assessment of the animals to measure each outcome, as well as no blinding of the assessor (investigator/researchers) to perform the measure of the each outcome. These risks of bias reported above are important and reveal a common limitation when current literature of animal studies is compared with clinical trials that followed orientation from CONSORT (Consolidated Standards of Reporting Trials—[www.consort-statement.org](http://www.consort-statement.org)) and PEDro scale (Physiotherapy Evidence Database—<https://www.pedro.org.au/english/downloads/pedro-scale/>). These limitations should receive more attention in future studies.

Regardless of aforementioned limitations, the included studies investigated several inflammatory mediators, such as pro-inflammatory mediators (interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), cyclooxygenase-2 (COX-2), prostaglandin E2 (PGE2) and transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) (10–11,19,21,23–24,27,33,35,39,47–48,50–53), as well as anti-inflammatory mediator [interleukin-10 (IL-10)] (21,30,48), involved in tendon repair or tendinitis condition. Other inflammatory mediator factors were also studied such as vascular endothelium growth factor (VEGF), metalloproteinase-1 matrix (MMP1), metalloproteinase-2 matrix (MMP-2), metalloproteinase-3 matrix (MMP-3), metalloproteinase-9 matrix (MMP-

9), metalloproteinase-13 matrix (MMP13) and induced nitric oxide synthase (i-NOS) (10–11,28–29,34–35,37,39,54) that contribute to the understanding of how PBMT can benefited tendon repair or tendinitis condition. In this context, depending on wavelength, dose (Joule), treatment frequency and tendon repair phase, PBMT, either by LLLT or by LED, can modulate levels of gene expression (mRNA), enzymatic activity of metalloproteinases (MMPs) (11,27–28,35,39) and collagen synthesis (30,37).

IL-1 $\beta$  can act synergistically in different inflammatory conditions, being able to modulate cell migration and the release of chemical mediators in calcaneal tendon lesions, being a typical cytokine from the initial phase of inflammation, which is present from 4h until the fourth day after the lesion. Reinforcing these findings, Guerra et al. (39) and Pires et al. (24) investigated the modulation (acute and chronic) of the inflammatory process in rats submitted to tendinitis induction by collagenase and irradiated by LLLT. The results of these studies are contradictory since Guerra et al. (39) pointed to a significative reduction in IL-1 $\beta$  at the fourth day, while Pires et al. (24) did not find significative reduction. Corroborating Guerra et al. (39), de Jesus et al. (32) and de Jesus et al. (11) showed that PBMT benefited inflammatory modulation (IL-1 $\beta$ ) when using wavelength in the near-infrared region of the electromagnetic spectrum (780 nm) and power of 70 mW for the treatment of calcaneus tendon injury. Xavier et al. (23) concluded that LED-based PBMT was able to reduce the signs of inflammation, such as reduction in the number of inflammatory cells and decrease in the expression of pro-inflammatory cytokines, mainly IL-1 $\beta$ .

Some specific studies (18–19,55) found that PBMT by LLLT or LED can stimulate the regeneration phase according to the dosimetry parameters (wavelength and energy). Casalechi et al. (18) demonstrated a beneficial effect of PBMT by LED on the tendon regeneration process due to a significant decrease in the number of fibroblasts favoring the optimization of the tendon remodeling quality in all treated groups. In contrast, Moura Junior Mde et al. (20) demonstrated that the group treated with ultrasound therapy for 14 days showed better anti-inflammatory response than both groups treated with LED and control groups assessed through histomorphometry and counting of fibroblasts.

**Table 3.** Evaluation of the methodological quality of the included studies, according to the SYRCLE tool. "YES" means "low risk of bias" and "NO" means "high risk of bias."

Reference	Selection bias							Performance bias		Detection bias
	1	2	3	4	5	6	7	Reporting bias 8	Other sources of bias 9	10
<b>Photobiomodulation in the red spectra</b>										
Casalechi et al. 2009 (18)	YES	YES	YES	NO	NO	NO	NO	YES	YES	YES
Laraia et al. 2012 (19)	YES	YES	YES	NO	NO	NO	NO	YES	NO	YES
Moura Junior Mde et al. 2014 (20)	YES	YES	YES	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
Torres-Silva et al. 2015 (21)	YES	YES	YES	NO	NO	NO	NO	YES	YES	YES
<b>Photobiomodulation in the infrared spectra</b>										
Oliveira et al. 2009 (22)	YES	YES	YES	NO	NO	NO	NO	YES	YES	YES
Xavier et al. 2010 (23)	YES	YES	YES	NO	NO	NO	NO	YES	YES	YES
Pires et al. 2011 (24)	YES	YES	YES	NO	NO	NO	NO	YES	YES	YES
Marcos et al. 2011 (25)	YES	YES	YES	NO	NO	NO	NO	YES	YES	YES
Neves et al. 2011 (26)	YES	YES	YES	NO	NO	NO	NO	YES	YES	YES
Marcos et al. 2012 (27)	YES	YES	YES	NO	NO	NO	NO	YES	YES	YES
Casalechi et al. 2013 (28)	YES	YES	YES	NO	NO	NO	NO	YES	YES	YES
Marcos et al. 2014 (29)	YES	YES	YES	NO	NO	NO	NO	YES	NO	YES
Xavier et al. 2014 (30)	YES	YES	YES	NO	NO	NO	NO	YES	YES	YES
Pinfieldi et al. 2014 (31)	YES	YES	YES	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
de Jesus et al. 2014 (32)	YES	YES	YES	NO	NO	NO	NO	YES	YES	YES
de Jesus et al. 2016 (11)	YES	YES	YES	NO	NO	NO	NO	YES	YES	YES
Gomes et al. 2017 (33)	YES	YES	YES	NO	NO	NO	NO	YES	YES	YES
Naterstad et al. 2018 (34)	YES	YES	YES	NO	NO	NO	NO	YES	YES	YES
Fernandes de Jesus et al. 2019 (35)	YES	YES	YES	NO	NO	NO	NO	YES	YES	YES
<b>Photobiomodulation in the infrared spectra (pulsed mode)</b>										
Joensen et al. 2012 (36)	YES	YES	YES	NO	NO	NO	NO	YES	NO	NO
<b>Photobiomodulation in the infrared spectra (continuous versus pulsed mode)</b>										
Guerra Fda et al. 2013 (37)	YES	YES	YES	NO	NO	NO	NO	YES	YES	YES
Guerra Fda et al. 2014 (38)	YES	YES	YES	NO	NO	NO	NO	YES	NO	YES
Guerra et al. 2016 (39)	YES	YES	YES	NO	NO	NO	NO	YES	YES	YES
<b>Comparing photobiomodulation in the infrared versus red spectra</b>										
Barbosa et al. 2013 (40)	YES	YES	YES	NO	NO	NO	NO	YES	YES	YES
Ferreira et al. 2015 (41)	YES	YES	YES	NO	NO	NO	NO	YES	NO	YES
<b>Comparing photobiomodulation with other therapies</b>										
Wood et al. 2010 (42)	YES	YES	YES	NO	NO	NO	NO	YES	YES	YES
Moura Junior Mde et al. 2015 (43)	YES	YES	YES	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
Haslerud et al. 2017 (44)	YES	YES	YES	NO	NO	NO	NO	YES	YES	YES
Lucke et al. 2019 (45)	YES	YES	YES	NO	NO	NO	NO	YES	YES	YES
<b>Photobiomodulation in the treatment of unhealthy rats</b>										
Nouruzian et al. 2013 (46)	YES	YES	YES	NO	NO	NO	NO	YES	YES	YES
Aliodoust et al. 2014 (47)	YES	YES	YES	NO	NO	NO	NO	YES	YES	YES
Helgrigle et al. 2016 (48)	YES	YES	YES	NO	NO	NO	NO	YES	YES	YES
de Oliveira et al. 2019 (49)	YES	YES	YES	NO	NO	NO	NO	YES	YES	YES

Previous studies have investigated changes in the macrophage phenotype (inflammatory infiltrate) and the expression of pro-inflammatory cytokines and the remodeling of the extracellular matrix in models of tendon injuries in rats. The results showed that the gene expression of pro-inflammatory cytokines, including IL-6, is remarkably increased in the early stages of the lesion (53). However, PBMT is able to significantly reduce the expression of these inflammatory mediators, including IL-6, thus promoting an anti-inflammatory action (23–24,48).

TNF- $\alpha$ , an inflammation marker, is present mainly during the inflammatory phase of the tendon repair. In this context, Schulze-Tanzil et al. (52) demonstrated that active TNF- $\alpha$  promotes the release of cytokines that leads to the development of sympathetic hyperalgesia (the main factor responsible for poor healing), and its effects are similar to those of carrageenan (a known inflammatory agent). However, the results of previous studies (23,33,35,39) show that PBMT in the near-infrared

electromagnetic spectrum is effective in inducing a reduction in pro-inflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$ .

The vascular endothelial growth factor (VEGF) is one of the most important factors involved in angiogenesis and can be found notably in Achilles tendon lesions. de Jesus et al. (11) concluded in their study that PBMT by LLLT did not favor an increase in VEGF levels, which the authors classified as a positive effect, since the increase in this mediator can cause complications in injured tendon tissues. According to the literature, when used in the treatment of calcaneus tendon lesions, PBMT acts in two ways: proliferative (regeneration and reorganization of collagen) and modulatory (controlling the inflammatory process). In addition to the regeneration and reorganization of collagen fibers and the control of the inflammatory process, the modulation of VEGF levels is also important. A large expression of VEGF may hinder and delay the healing process, inducing the expression of degradation factors of the tendinous tissue and

**Table 4.** Light parameters identified in all studies included.

Reference	Power (W)	Energy (J)	Energy density (J cm <sup>-2</sup> )	Power density (W cm <sup>-2</sup> )	Spot size (cm <sup>2</sup> )	Irradiation time (sec)
<b>Photobiomodulation in the red spectra</b>						
Casalechi et al. 2009 (18)	0.1	12	20	0.2 (Calculated)	0.5	120
Laraia et al. 2012 (19)	0.1	6	214	3.57	0.028	60
Moura Junior Mde et al. 2014 (20)	0.03	3.6	4	0.06	0.5	120
Torres-Silva et al. 2015 (21)	0.1	G4: 1 G5: 3	G4: 35.7 G5: 107.1	3.57	0.028	G4: 10 G5: 30
Average	0.08	5.12	76.16	1.85	0.264	68
Mean	0.1	3.6	35.7	1.88	0.264	60
<b>Photobiomodulation in the infrared spectra</b>						
Oliveira et al. 2006 (22)	0.04	0.12	4.2	1.4	0.028	3
Xavier et al. 2010 (23)	0.022	3.74	7.5	0.044	0.5	170
Pires et al. 2011 (24)	0.022	1.65	7.7 (calculated 8.25)	0.110	0.2	75
Marcos et al. 2011 (25)	0.1	G4: 1 G5: 3 G6: 6	G4: 35.71 G5: 107.14 G6: 214.29	3.57	0.028	G4: 10 G5: 30 G6: 60
Neves et al. 2011 (26)	G2: 0.04 G3: 0.06 G4: 0.08 G5: 0.1	G2: 0.84 G3: 0.84 G4: 0.84 G5: 0.84	30	G2: 1.4 G3: 2.14 G4: 2.8 G5: 3.5	0.028	G2: 21 G3: 14 G4: 10.5 G5: 8.4
Marcos et al. 2012 (27)	0.1	G4: 1 G5: 3	G4: 35.7 G5: 107.1	3.57	0.028	G4: 10 G5: 30
Casalechi et al. 2013 (28)	0.022	1.54	7.5	0.107	0.205	70
Marcos et al. 2014 (29)	0.1	G4: 1 G5: 3	G4: 35.7 G5: 107.1	3.57	0.028	G4: 10 G5: 30
Xavier et al. 2014 (30)	0.022	3.7	7.5	0.044	0.5	170
Pinfildi et al. 2014 (31)	0.08	1.12	40	2.8	0.028	14
de Jesus et al. 2014 (32)	0.07	0.7	17.5	1.75	0.04	10
de Jesus et al. 2016 (11)	0.07	0.7	17.5	1.75	0.04	10
Gomes et al. 2017 (33)	0.05	G2: 1.4 G3: 2.1 G3: 3	G2: 50 G3: 75 107.1	G2: 1.78 G3: 1.78 3.57	0.028	G2: 28 G3: 42 30
Naterstad et al. 2018 (34)	0.1	G3: 3	107.1	3.57	0.028	30
Fernandes de Jesus et al. 2019 (35)	0.07	G1: 0.7 G2: 2.1 G3: 4.9	G1: 17.5 G2: 17.5 G3: 17.5	G1: 1.75 G2: 1.75 G3: 1.75	0.04	G1: 10 G2: 10 G3: 10
Average	0.063	1.95	45.69	1.94	0.116	35.4
Mean	0.07	1.4	30	1.75	0.028	14
<b>Photobiomodulation in the infrared spectra (pulsed mode)</b>						
Joensen et al. 2012 (36)	0.06	3	7.89	0.158	0.38	50
Average	0.06	3	7.89	0.158	0.38	50
Mean	0.06	3	7.89	0.158	0.38	50
<b>Photobiomodulation in the infrared spectra (continuous versus pulsed mode)</b>						
Guerra Fda et al. 2013 (37)	0.04	0.64	G3: 4 G4: 4 G6: 4 G7: 4	0.25	0.16	16 32
Guerra Fda et al. 2014 (38)	0.04	0.64	G3: 4 G4: 4 G6: 4 G7: 4	0.25	0.16	G3: 16 G6: 16 G4: 32 G7: 32
Guerra et al. 2016 (39)	0.04	G3: 0.64 G4: 1.28	G3: 4.0 G4: 4.0	G3: 2.5 G4: 1.25	0.116	G3: 16 G4: 32
Average	0.04	0.8	4	1.06	0.145	24
Mean	0.04	0.64	4	0.75	0.16	24
<b>Comparing photobiomodulation in the infrared versus red spectra</b>						
Barbosa et al. 2013 (40)	0.1	0.2 x 3 points	0.7	0.35	0.28	20
Ferreira et al. 2015 (41)	0.06	1.14	40	2.14	0.028	18.6
Average	0.08	0.67	20.35	1.245	0.154	19.3
Mean	0.08	0.67	20.35	1.245	0.154	19.3
<b>Comparing photobiomodulation with other therapies</b>						
Wood et al. 2010 (42)	0.04	0.12	4.2	1.4	0.028	3
Moura Junior Mde et al. 2015 (43)	0.033	2	G3: 4 G4: 4	0.066	0.5	60
Haslerud et al. 2017 (44)	0.1	3	107.14	3.57	0.028	30
Lucke et al. 2019 (45)	0.04	1.3	50	1.45	0.0275	70
Average	0.053	1.60	33.86	1.621	0.145	40.7
Mean	0.04	1.65	4.2	1.425	0.028	45

(continued)

Table 4. (continued)

Reference	Power (W)	Energy (J)	Energy density (J cm <sup>-2</sup> )	Power density (W cm <sup>-2</sup> )	Spot size (cm <sup>2</sup> )	Irradiation time (sec)
<b>Photobiomodulation in the treatment of unhealthy rats</b>						
Nouruzian <i>et al.</i> 2013 (46)	0.0072	G1: 0.014 G2: 0.057 G4: 0.014 G5: 0.021	G1: 2.9 G2: 11.5 G4: 2.9 G5: 4.3	1.4	0.00524	G1: 2 G2: 8 G4: 2 G5: 3
Aliodoust <i>et al.</i> 2014 (47)	0.0072	0.014 x 44 points	2.9	1.4	0.00524	2
Helrigle <i>et al.</i> 2016 (48)	0.032	3.84	3.84	0.032	1	120
de Oliveira <i>et al.</i> 2016 (49)	0.01	0.16	4	0.25	0.04	16
Average	0.014	0.588	4.62	0.770	0.262	25.1
Mean	0.008	0.021	3.84	0.825	0.022	5.5

Abbreviations: J, Joule; sec, seconds; W, Watt.

increasing pain (stimulating the presence of new nerve bundles) during rehabilitation.

Prianti *et al.* (51) demonstrated in their study with inflammatory that COX-2 is quite expressed, producing pro-inflammatory

prostaglandins. Dourado *et al.* (50) showed that PBMT by LLLT modulated pro-inflammatory agents, reducing the expression of COX-2 mRNA and, consequently, the levels of PGE2, through decreased migration of neutrophils, mast cells and macrophages

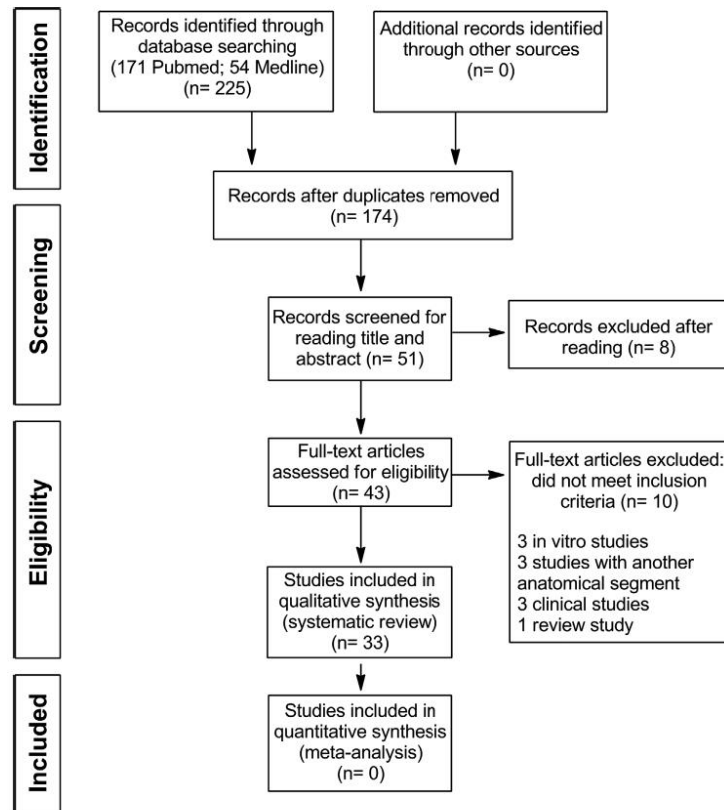


Figure 1. Flow diagram of the systematic review recommended by PRISMA.

in the injured tissue. These results corroborate the findings of Gomes et al. (33) that proved that irradiation in the near-infrared spectrum enabled the reduction of COX-2 at the lesion site. Reinforcing these results, other recent studies have also shown that PBMT favored the inflammatory modulation of COX-2 also when PBMT is used in the near-infrared light (11,32,35).

IL-10 accelerates the healing process by reducing inflammation and maintaining the mechanical and histological properties of the tissue. Helrigle et al. (48) observed that PBMT favored the increase in IL-10 release and, consequently, enabled the reduction of IL-6 release. It is known that IL-10, together with other cytokines, is involved in the suppression of pro-inflammatory events. In this sense, Torres-Silva et al. (21) emphasized that the balance between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines is of paramount importance, since the relationship between the amounts of IL-6 and IL-10 can reveal the direction of the inflammatory process, especially when the PBMT is used to raise the levels of IL-10 and promote an anti-inflammatory response. These results support the results of Xavier et al. (30) who concluded that PBMT improved the expression of IL-10 in the initial phase of tendon healing.

Fernandes de Jesus et al. (35) demonstrated that the presence of primary pro-inflammatory factors may induce increased levels of metalloproteinases (MMPs). The continuous presence of MMP-1, MMP-3 and MMP-13 tends to increase the degradation of the extracellular matrix, as well as the collagen of the calcaneal tendon, making its repair process more fragile and difficult. Based on this principle, irradiation with PBMT by LLLT or LED can favor the control of inflammatory process. In this sense, Casalechi et al. (28) concluded that PBMT by LLLT modulated the expression of MMP-1 and MMP-13. Marcos et al. (27) and Guerra et al. (39) showed that after irradiation by PBMT, there was a decrease in the levels of MMP-1 and MMP-13, corroborating with previous studies (10,35) that identified the reduction in levels of MMP-2, MMP-3, MMP-9 and MMP-13.

Xavier et al. (30) investigated the LED-based PBMT effect on Type-I and Type-III collagen levels in rats with tendinitis. The results showed that PBMT improved the expression of Type-I and Type-III collagens, which are the main components of the extracellular matrix. The expression of mRNA of collagens I and III in the tendon always depends on the phase of the repair process. In the proliferative phase, a greater expression of mRNA of collagen III is observed, because in this phase, the synthesis of this type of collagen is at its peak, and it later decreases in the remodeling phase, where there is realignment of the fibers and increased expression of mRNA of collagen I in the tendon.

Naterstad et al. (34) established in their study that neutrophils are the first cells to reach the site of injury (tendinitis) and other inflammatory cells, such as macrophages, migrate to the site of injury by chemotaxis, with increased levels of cytokines, reactive oxygen species and proteases. In this context, Enwemeka and Reddy (54) showed that 4 days after injury, there will be an increase in mRNA expression for all NOS isoforms, accentuating the inflammatory process, because the i-NOS peak occurs at the beginning of the inflammatory process, and subsequently, the levels of NO production are maintained by the other isoforms of NOS (39). However, PBMT can promote a decrease in i-NOS activity (33), favoring the reduction of the inflammatory process (39).

Finally, regarding the light parameters and dose-response of PBMT on calcaneal tendon repair, it was possible to identify a

range of the effective light doses and parameters used in the included studies of the present systematic review. Parameters found were wavelength mainly at infrared spectra, power of the light of ~ 60 mW (continuous mode), ~2 W cm<sup>-2</sup> and ~2 J or ~45 J cm<sup>-2</sup> per point of irradiation. It is important to have in mind that Achilles tendon in rats has an average cross-sectional area (mm<sup>2</sup>) of 4.27 ± 0.61 for noninjured tendons, and an increased area of 11.46 ± 4.69 for injured tendons (induced tendinopathy) due to hypercellularity, neovascularity, extracellular matrix degradation, rounding of cell nuclei and acquisition of chondrocyte phenotypes (56). Even with an increased cross-sectional area, the PBMT using the reported parameters was efficient to manage the inflammation process (decreased inflammatory mediators mainly) and stimulate the repair process (stimulated collagen Type I and Type III, reduced metalloproteinases MMP-1 and MMP-13) in tendons (see Table 2). Although Ferreira et al. (41) used 40 J cm<sup>-2</sup>, the authors did not find any result on tendon repair regarding vascularization stimuli. On the other hand, Pires et al. (24) did not find any modulation on IL-1β with an energy density of 7.7 J cm<sup>-2</sup> (supposedly low). We suggest that all parameters raised from the studies and calculated as average and median (Table 4) could be a possible guide for future studies that will investigate the PBMT effects on calcaneal tendon injury or tendinitis in rats.

We conclude that PBMT (LLLT/LED) has positive effects on the inflammatory response, reducing the duration of calcaneal tendon repair in rats submitted to injury or tendinitis. The range and possible effective light doses and parameters were identified.

**Acknowledgements**—We would like to acknowledge the Post-Graduation Program in Biomedical Engineering of the Universidade Brasil for the research support. The authors declare there was no financial support to this research.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## REFERENCES

- Singh, D. (2015) Acute Achilles tendon rupture. *BMJ* **351**, h4722.
- Júnior, M. D. J. M., A. L. M. Maia Filho, D. R. Pessoa, M. D. R. Alves, J. de Sousa Justino, M. dos Santos Andrade, A. M. G. Rebêlo, C. J. de Lima, A. L. B. Pinheiro and L. Silveira (2015) Assessing the biochemical changes of tendons of rats in an experimental model of tenotomy under therapeutic ultrasound and LEDs (625 and 945 nm) by near-infrared Raman spectroscopy. *Lasers Med. Sci.* **30**, 1729–1738.
- Farcic, T. S., C. S. Baldan, C. G. Cattapan, N. A. Parizotto, S. João and R. A. Casarotto (2013) Treatment time of ultrasound therapy interferes with the organization of collagen fibers in rat tendons. *Brazilian Journal of Physical Therapy* **17**, 263–271.
- Magnan, B., M. Bondi, S. Pierantoni and E. Samaila (2014) The pathogenesis of Achilles tendinopathy: a systematic review. *Foot and Ankle Surgery* **20**, 154–159.
- Gabler, C., J.-O. Saß, S. Gierschner, T. Lindner, R. Bader and T. Tischer. (2018) In vivo evaluation of different collagen scaffolds in an Achilles tendon defect model. *Biomed. Res. Int.* **2018**, 1–11.
- Kemozek, T. W., A. Knaus, T. Rademaker and T. G. Almonroeder (2018) The effects of habitual foot strike patterns on Achilles tendon loading in female runners. *Gait Posture*. **66**, 283–287.
- Darby, I. A., B. Laverdet, F. Bonté and A. Desmoulière (2014) Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* **7**, 301.

8. Wynn, T. A. and K. M. Vannella (2016) Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis. *Immunity* **44**, 450-462.
9. Vannella, K. M. and T. A. Wynn (2017) Mechanisms of organ injury and repair by macrophages. *Annu. Rev. Physiol.* **79**, 593-617.
10. de Jesus, J. F., D. D. Spadacci-Morena, N. D. dos Anjos Rabelo, C. E. Pinfildi, T. Y. Fukuda and H. Plapler (2015) Low-level laser therapy in IL-1 $\beta$ , COX-2, and PGE2 modulation in partially injured Achilles tendon. *Lasers Med. Sci.* **30**, 153-158.
11. de Jesus, J. F., D. D. Spadacci-Morena, N. D. dos Anjos Rabelo, C. E. Pinfildi, T. Y. Fukuda and H. Plapler (2016) Low-level laser therapy (780 nm) on VEGF modulation at partially injured Achilles tendon. *Photomedicine and Laser Surgery* **34**, 331-335.
12. Hamblin, M. R., C. Ferraresi, Y.-Y. Huang, L. F. Freitas and J. D. Carroll (2018) *Low-level light therapy: Photobiomodulation*. SPIE Press, Bellingham.
13. Anders, J. J., R. J. Lanzafame and P. R. Arany (2015) Low-level light/laser therapy versus photobiomodulation therapy. *Photomed Laser Surg* **33**, 183-184.
14. Ferraresi, C., M. V. de Sousa, Y. Y. Huang, V. S. Bagnato, N. A. Parizotto and M. R. Hamblin (2015) Time response of increases in ATP and muscle resistance to fatigue after low-level laser (light) therapy (LLLT) in mice. *Lasers Med Sci* **30**, 1259-1267.
15. Ferraresi, C., B. Kaippert, P. Avci, Y. Y. Huang, M. V. de Sousa, V. S. Bagnato, N. A. Parizotto and M. R. Hamblin (2015) Low-level laser (light) therapy increases mitochondrial membrane potential and ATP synthesis in C2C12 myotubes with a peak response at 3-6 h. *Photochem Photobiol* **91**, 411-416.
16. Moher, D., A. Liberati, J. Tetzlaff and D. G. Altman (2009) Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *Ann Intern Med* **151**(264-269), W264.
17. Hooijmans, C. R., M. M. Rovers, R. B. De Vries, M. Leenaars, M. Ritskes-Hoitinga and M. W. Langendam (2014) SYRCL's risk of bias tool for animal studies. *BMC Med. Res. Methodol.* **14**, 43.
18. Casalechi, H. L., R. A. Nicolau, V. L. Casalechi, L. Jr Silveira, A. M. De Paula and M. T. Pacheco (2009) The effects of low-level light emitting diode on the repair process of Achilles tendon therapy in rats. *Lasers Med Sci* **24**, 659-665.
19. Laraia, E. M., I. S. Silva, D. M. Pereira, F. A. dos Reis, R. Albertini, P. de Almeida, E. C. Leal Junior, P. de Tarso Camillo and de Carvalho, (2012) Effect of low-level laser therapy (660 nm) on acute inflammation induced by tenotomy of Achilles tendon in rats. *Photochem Photobiol* **88**, 1546-1550.
20. de Moura Junior, M., J. E. A. Arisawa, A. A. Martin, J. P. de Carvalho, J. M. da Silva, J. F. Silva and L. Silveira Jr. (2014) Effects of low-power LED and therapeutic ultrasound in the tissue healing and inflammation in a tendinitis experimental model in rats. *Lasers Med Sci* **29**, 301-311.
21. Torres-Silva, R., R. A. Lopes-Martins, J. M. Bjordal, L. Frigo, R. Rahouadj, G. Arnold, E. C. Leal-Junior, J. Magdalou, R. Pallotta and R. L. Marcos (2015) The low level laser therapy (LLLT) operating in 660 nm reduce gene expression of inflammatory mediators in the experimental model of collagenase-induced rat tendinitis. *Lasers Med Sci* **30**, 1985-1990.
22. Oliveira, F. S., C. E. Pinfildi, N. A. Parizoto, R. E. Liebano, P. S. Bossini, E. B. Garcia and L. M. Ferreira (2009) Effect of low level laser therapy (830 nm) with different therapy regimes on the process of tissue repair in partial lesion calcaneus tendon. *Lasers Surg Med* **41**, 271-276.
23. Xavier, M., D. R. David, R. A. de Souza, A. N. Arrieiro, H. Miranda, E. T. Santana, J. A. Jr Silva, M. A. C. Salgado, F. Aimbire and R. Albertini (2010) Anti-inflammatory effects of low-level light emitting diode therapy on achilles tendinitis in rats. *Lasers Surg. Med.* **42**, 553-558.
24. Pires, D., M. Xavier, T. Araújo, J. A. Silva, F. Aimbire and R. Albertini (2011) Low-level laser therapy (LLLT; 780 nm) acts differently on mRNA expression of anti-and pro-inflammatory mediators in an experimental model of collagenase-induced tendinitis in rat. *Lasers Med. Sci.* **26**, 85-94.
25. Marcos, R. L., E. C. Leal Junior, M. Messias Fde, M. H. de Carvalho, R. C. Pallotta, L. Frigo, R. A. dos Santos, L. Ramos, S. Teixeira, J. M. Bjordal and R. A. Lopes-Martins (2011) Infrared (810 nm) low-level laser therapy in rat achilles tendinitis: a consistent alternative to drugs. *Photochem Photobiol* **87**, 1447-1452.
26. Neves, M. A., C. E. Pinfildi, V. T. Wood, R. C. Gobatto, F. M. da Silva, N. A. Parizotto, B. Hochman and L. M. Ferreira (2011) Different power settings of LLLT on the repair of the calcaneal tendon. *Photomed Laser Surg* **29**, 663-668.
27. Marcos, R. L., E. C. Leal-Junior, G. Arnold, V. Magnenet, R. Rahouadj, X. Wang, F. Demeurie, J. Magdalou, M. H. de Carvalho and R. A. Lopes-Martins (2012) Low-level laser therapy in collagenase-induced Achilles tendinitis in rats: analyses of biochemical and biomechanical aspects. *J Orthop Res* **30**, 1945-1951.
28. Casalechi, H. L., E. C. P. Leal-Junior, M. Xavier, J. A. Silva, P. D. T. C. de Carvalho, F. Aimbire and R. Albertini (2013) Low-level laser therapy in experimental model of collagenase-induced tendinitis in rats: effects in acute and chronic inflammatory phases. *Lasers Med. Sci.* **28**, 989-995.
29. Marcos, R. L., G. Arnold, V. Magnenet, R. Rahouadj, J. Magdalou and R. A. Lopes-Martins (2014) Biomechanical and biochemical protective effect of low-level laser therapy for Achilles tendinitis. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **29**, 272-285.
30. Xavier, M., R. A. de Souza, V. A. Pires, A. P. Santos, F. Aimbire, J. A. Silva, R. Albertini and A. B. Villaverde (2014) Low-level light-emitting diode therapy increases mRNA expressions of IL-10 and type I and III collagens on Achilles tendinitis in rats. *Lasers Med. Sci.* **29**, 85-90.
31. Pinfildi, C. E., E. P. da Silva, R. A. Folha, P. C. Turchetto, P. P. Monteiro, A. Antunes and B. S. Hochman (2014) Mast cell curve-response in partial Achilles tendon rupture after 830 nm phototherapy. *Photomed Laser Surg* **32**, 88-92.
32. de Jesus, J. F., D. D. Spadacci-Morena, N. D. D. A. Rabelo, C. E. Pinfildi, T. Y. Fukuda and H. Plapler (2014) Low-level laser therapy on tissue repair of partially injured achilles tendon in rats. *Photomedicine and Laser Surgery* **32**, 345-350.
33. Gomes, C. A. F. D. P., A. V. Dibai-Filho, R. C. Pallotta, E. A. P. da Silva, A. C. D. F. Marques, R. L. Marcos, and P. D. T. C. de Carvalho (2017) 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* **19**, 391-396.
34. Naterstad, I. F., R. P. Rossi, R. L. Marcos, N. A. Parizotto, L. Frigo, J. Joensen, P. S. L. Lopes Martins, J. M. Bjordal and R. A. B. Lopes-Martins (2018) Comparison of photobiomodulation and anti-inflammatory drugs on tissue repair on collagenase-induced Achilles tendon inflammation in rats. *Photomedicine and Laser Surgery* **36**, 137-145.
35. Fernandes de Jesus, J., D. Denelle Spadacci-Morena, N. D. D. A. Rabelo, C. E. Pinfildi, T. Y. Fukuda and H. Plapler (2019) Photobiomodulation of matrix metalloproteinases in rat calcaneal tendons. *Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery* **37**, 421-427.
36. Joensen, J., N. R. Gjerdet, S. Hummelsund, V. Iversen, R. A. Lopes-Martins and J. M. Bjordal (2012) An experimental study of low-level laser therapy in rat Achilles tendon injury. *Lasers Med Sci* **27**, 103-111.
37. Guerra Fda, R., C. P. Vieira, M. S. Almeida, L. P. Oliveira, A. A. de Aro and E. R. Pimentel (2013) LLLT improves tendon healing through increase of MMP activity and collagen synthesis. *Lasers Med Sci* **28**, 1281-1288.
38. Guerra Fda, R., C. P. Vieira, M. dos Santos, L. P. de Almeida, A. C. Oliveira, G. F. Claro, A. L. de Simoes and Oliveira and E. R. Pimentel, (2014) Pulsed LLLT improves tendon healing in rats: a biochemical, organizational, and functional evaluation. *Lasers Med Sci* **29**, 805-811.
39. Guerra, F. D. R., C. P. Vieira, L. P. Oliveira, P. P. Marques, M. dos Santos Almeida and E. R. Pimentel (2016) Low-level laser therapy modulates pro-inflammatory cytokines after partial tenotomy. *Lasers Med. Sci.* **31**, 759-766.
40. Barbosa, D., R. A. de Souza, W. R. de Carvalho, M. Xavier, P. K. de Carvalho, T. C. Cunha, E. A. Arisawa, L. Jr Silveira and A. B. Villaverde (2013) Low-level laser therapy combined with platelet-rich plasma on the healing calcaneal tendon: a histological study in a rat model. *Lasers Med Sci* **28**, 1489-1494.
41. Ferreira, R., R. Silva, R. A. Folha, M. L. O. Polacow, R. M. Teodori and C. E. Pinfildi (2015) Achilles tendon vascularization of proximal, medial, and distal portion before and after partial lesion in rats

- treated with phototherapy. *Photomedicine and Laser Surgery* **33**, 579–584.
42. Wood, V. T., C. E. Pinfildi, M. A. Neves, N. A. Parizoto, B. Hochman and L. M. Ferreira (2010) Collagen changes and realignment induced by low-level laser therapy and low-intensity ultrasound in the calcaneal tendon. *Lasers Surg Med* **42**, 559–565.
  43. de Moura Junior, M. J., A. L. Maia Filho, D. R. Pessoa, M. D. Alves, S. J. de Justino, S. Andrade Mdos, A. M. Rebelo, C. J. de Lima, A. L. Pinheiro and L. Silveira Jr. (2015) Assessing the biochemical changes of tendons of rats in an experimental model of tenotomy under therapeutic ultrasound and LEDs (625 and 945 nm) by near-infrared Raman spectroscopy. *Lasers Med Sci* **30**, 1729–1738.
  44. Haslerud, S., R. A. Lopes-Martins, L. Frigo, J. M. Bjordal, R. L. Marcos, I. F. Naterstad, L. H. Magnussen and J. Joensen (2017) Low-level laser therapy and cryotherapy as mono- and adjunctive therapies for Achilles tendinopathy in rats. *Photomed Laser Surg* **35**, 32–42.
  45. Lucke, L. D., F. O. Bortolazzo, V. Theodoro, L. Fujii, A. L. Bombeiro, M. Felonato, R. A. Dalia, G. D. Carneiro, L. P. Cartarozzi, C. P. Vicente, A. L. R. Oliveira, F. A. S. Mendonca, M. A. M. Esquisatto, E. R. Pimentel and A. A. de Aro (2019) Low-level laser and adipose-derived stem cells altered remodelling genes expression and improved collagen reorganization during tendon repair. *Cell Prolif.* **52**, e12580.
  46. Nouruzian, M., M. Alidoust, M. Bayat and M. Akbari (2013) Effect of low-level laser therapy on healing of tenotomized Achilles tendon in streptozotocin-induced diabetic rats. *Lasers Med Sci* **28**, 399–405.
  47. Alidoust, M., M. Bayat, M. R. Jalili, Z. Sharifian, M. Dadpay, M. Akbari, A. Khoshvaghti and H. Bayat (2014) Evaluating the effect of low-level laser therapy on healing of tenotomized Achilles tendon in streptozotocin-induced diabetic rats by light microscopical and gene expression examinations. *Lasers Med Sci* **29**, 1495–1503.
  48. Helrigle, C., P. D. C. de Carvalho, H. L. Casalechi, E. C. P. Leal-Junior, G. H. C. Fernandes, P. A. Helrigel, R. L. Rabelo, I. de Oliveira Aleixo-Junior, F. Aimbire and R. Albertini (2016) Effects of low-intensity non-coherent light therapy on the inflammatory process in the calcaneal tendon of ovariectomized rats. *Lasers Med. Sci.* **31**, 33–40.
  49. de Oliveira, A. R., F. S. da Silva, R. H. Bortolin, D. Marques, G. V. Ramos, R. C. Marqueti, N. B. da Silva, K. C. P. Medeiros, M. A. Correa, J. Lima, A. A. de Rezende, P. W. Ackermann, B. J. Abreu and W. H. de Brito Vieira (2019) Effect of photobiomodulation and exercise on early remodeling of the Achilles tendon in streptozotocin-induced diabetic rats. *PLoS ONE* **14**, e0211643.
  50. Dourado, D. M., S. Fávero, R. Matias and P. d. T. C. Carvalho and M. A. da Cruz-Höfling, (2011) Low-level laser therapy promotes vascular endothelial growth factor receptor-1 expression in endothelial and nonendothelial cells of mice gastrocnemius exposed to snake venom. *Photochem. Photobiol.* **87**, 418–426.
  51. Prianti, A. C. G., J. A. Silva, R. F. dos Santos, I. B. Rosseti and M. S. Costa (2014) Low-level laser therapy (LLLT) reduces the COX-2 mRNA expression in both subplantar and total brain tissues in the model of peripheral inflammation induced by administration of carrageenan. *Lasers Med. Sci.* **29**, 1397–1403.
  52. Schulze-Tanzil, G., O. Al-Sadi, E. Wiegand, W. Ertel, C. Busch, B. Kohl and T. Pufe (2011) The role of pro-inflammatory and immunoregulatory cytokines in tendon healing and rupture: new insights. *Scand. J. Med. Sci. Sports* **21**, 337–351.
  53. Sugg, K. B., J. Lubardic, J. P. Gumucio and C. L. Mendias (2014) Changes in macrophage phenotype and induction of epithelial-to-mesenchymal transition genes following acute Achilles tenotomy and repair. *J. Orthop. Res.* **32**, 944–951.
  54. Enwemeka, C. S. and G. K. Reddy (2000) The biological effects of laser therapy and other physical modalities on connective tissue repair processes. *Laser therapy* **12**, 22–30.
  55. Torres-Silva, R., R. A. B. Lopes-Martins, J. M. Bjordal, L. Frigo, R. Rahouadj, G. Arnold, E. C. P. Leal-Junior, J. Magdalou, R. Pallotta and R. L. Marcos (2015) The low level laser therapy (LLLT) operating in 660 nm reduce gene expression of inflammatory mediators in the experimental model of collagenase-induced rat tendinitis. *Lasers Med. Sci.* **30**, 1985–1990.
  56. Lee, S. Y., H. F. Chieh, C. J. Lin, I. M. Jou, Y. N. Sun, L. C. Kuo, P. T. Wu and F. C. Su (2017) Characteristics of Sonography in a Rat Achilles Tendinopathy Model: Possible Non-invasive Predictors of Biomechanics. *Sci. Rep.* **7**, 5100.