



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO - UFPE
REDE NORDESTINA DE BIOTECNOLOGIA - RENORBIO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO – Nível Doutorado
BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

MÁRCIO ALMEIDA BEZERRA

ANÁLISE DO EFEITO DA LASERTERAPIA SOBRE AS PROPRIEDADES
BIOMECÂNICA, ESTRUTURAL E HISTOLÓGICA DO TENDÃO CALCÂNEO DE
RATOS DIABÉTICOS

Recife / 2017

MÁRCIO ALMEIDA BEZERRA

**ANÁLISE DO EFEITO DA LASERTERAPIA SOBRE AS PROPRIEDADES
BIOMECÂNICA, ESTRUTURAL E HISTOLÓGICA DO TENDÃO CALCÂNEO DE
RATOS DIABÉTICOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) na área de concentração de Biotecnologia em Saúde.

Discente: Márcio Almeida Bezerra

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

Catálogo na fonte

Elaine Barroso

CRB 1728

Bezerra, Márcio Almeida

Análise do efeito da laserterapia sobre as propriedades biomecânica, estrutural e histológica do tendão calcâneo de ratos diabéticos. / Recife: O Autor, 2017.

89 folhas: fig., tab.

Orientadora: Sílvia Regina Arruda de Moraes

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Biotecnologia, Recife, 2017.

Inclui referências e anexos

- 1. Diabetes 2. Lasers 3. Biomecânica I. Moraes, Sílvia Regina Arruda de (orient.) II. Título**

616.462

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017- 634

MÁRCIO ALMEIDA BEZERRA

**ANÁLISE DO EFEITO DA LASERTERAPIA SOBRE AS PROPRIEDADES
BIOMECÂNICAS, ESTRUTURAL E HISTOLÓGICA DO TENDÃO DO CALCÂNEO
DE RATOS DIABÉTICOS**

DATA DA APROVAÇÃO: 30 de agosto de 2017

Tese apresentada para a obtenção do título de
Doutor em Biotecnologia pela Rede Nordeste de
Biotecnologia (RENORBIO) com ponto focal na
Universidade Federal de Pernambuco.

Aprovado por:

Prof^a. Dr^a. Silvia Regina Arruda de Moraes

Prof^a. Dr^a. Ana Paula de Lima Ferreira

Prof^a. Dr^a. Maria das Graças Wanderley de Sales Coriolano

Prof. Dr. Vitor Caiaffo Brito

Prof. Dr. Rodrigo Ribeiro de Oliveira

Com amor e carinho, dedico esta Tese:

À minha linda esposa, Rayane Nascimento Almeida.

Aos meus Pais Raimundo Leidimar Bezerra e Sheila Dalva Almeida Bezerra que me instruíram com retidão por todas as etapas de minha vida;

Aos meus irmãos Lígia Almeida Bezerra e Leidimar Almeida Bezerra;

AGRADECIMENTOS

À Deus, fonte de toda sabedoria e amor, que me proporcionou força suficiente para não fraquejar.

À Minha namorada, companheira e esposa, Rayane Nascimento Almeida, pela compreensão durante estes dois últimos anos. Pelas renúncias e orações pelas quais fez para que esse sonho se realizasse. Te amo!

Aos meus pais, Raimundo Leidimar Bezerra e Sheila Dalva Almeida Bezerra, meus irmãos Lígia Almeida Bezerra e Leidimar Almeida Bezerra, a meu cunhado “Biró” e cunhada Júlia, pelas orações e momentos de descontração vividos nesse período me lembrando sempre a importância de ter os familiares sempre por perto.

À Prof^a. Dr^a Silvia Regina Arruda de Moraes, pelo exemplo de professora e orientadora, pelo entendimento e paciência em aceitar meu distanciamento do laboratório no início do doutorado e, principalmente, saber os momentos certos para exigir o máximo de seus alunos. Meu muito obrigado pelos anos de convivência e experiências iniciados no mestrado e que se consolidaram em uma amizade no decorrer dos tempos. Obrigado minha “mãe-científica”!

Ao Programa de doutorado da Rede Nordestina de Biotecnologia – RENORBIO, pelo apoio e amparo durante os anos de doutoramento.

À Prof^a Dr^a. Teresinha Gonçalves da Silva, coordenadora atuante do ponto focal da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, que munida de muita compreensão e paciência atendeu e facilitou todo o desenrolar burocrático nestes anos de estudo.

Ao Departamento de Engenharia Química, no nome do Engenheiro Me. Magno Felipe Holanda Barboza Inácio Teixeira, por toda a disposição e alegria na qual nos recebia para os ensaios mecânicos, por todos os ensinamentos biomecânicos e, principalmente pela amizade construída;

Ao Núcleo de Estudos em Microscopia e Processamento de Imagem – NEMPI da Universidade Federal do Ceará-UFC, no nome da Prof^a. Dr^a Gerly Anne de Castro Brito, por permitir o processamento e análise dos dados histológicos desta pesquisa.

Ao Biotério de Criação do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, por possibilitar a execução desta Tese fornecendo os animais necessários para a Pesquisa;

A todos que compõem o Laboratório de Plasticidade Neuromuscular – LAPLAN do Departamento de Anatomia da Universidade Federal de Pernambuco –UFPE, sem vocês não poderia ter concluído esta tese. Serei eternamente grato a todos vocês.

Ao grupo que esteve diretamente vinculado a este trabalho, Ana Camila, Marina Lira, Cybelle Nery, Waydja, não tenho palavras para agradecer a ajuda, disciplina, desprendimento e entrega para a conclusão deste trabalho. Agradeço todos os ensinamentos que cada um me proporcionou. Estarei sempre a disposição para o que precisarem!

Aos amigos Olávio Campos e Anderson Silva, pesquisadores natos que me ensinaram muito sobre a pesquisa experimental e histologia;

Ao “Japa”, Dr. Anselmo, figura inexorável, obrigado pelas conversas e acolhida em sua morada;

Ao Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal do Ceará – UFC, por permitir meu afastamento para a conclusão desta tese;

Aos amigos do Gabinete 4 do Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal do Ceará – UFC, muito obrigado pela torcida de todos!

Agradeço a toda minha família e meus amigos pela torcida, incentivos, amizade e confiança. Valeu galera!

“Minha vida é andar por esse país
Pra ver se um dia descanso feliz
Guardando as recordações
Das terras onde passei
Andando pelos sertões
E dos amigos que lá deixei”
(A Vida do Viajante – Luiz Gonzaga)

RESUMO

As complicações causadas pelas alterações metabólicas no Diabetes Mellitus (DM), principalmente pelos elevados níveis de glicose circulante, contribuem para o surgimento de alterações no tecido tendíneo, que podem cursar com degeneração e ruptura. Duas possíveis formas de reestabelecer a estrutura tendínea seria identificar gênese da disfunção e a utilização de laserterapia de forma contínua para o tratamento. Assim, realizamos o estadiamento dos acometimentos micro e macroscópicos do tendão do calcâneo de modelos experimentais de diabetes e avaliar o efeito do tratamento de laserterapia sobre as propriedades biomecânicas e estruturais destes tendões. Foram utilizados 80 ratos da linhagem *Wistar*, mantidos em condição padrão de biotério e submetidos a ciclos claro/escuro invertido de 12 horas, ração e água *ad libitum*. O protocolo experimental foi dividido em duas etapas. Na primeira foram utilizados 40 animais (100 dias de vida) distribuídos aleatoriamente em Grupo Controle (20 animais saudáveis) e Grupo Diabético (20 animais induzidos ao diabetes). A partir do 100º dia de vida, a cada semana, cinco animais selecionados aleatoriamente foram eutanasiados para a coleta dos tendões do calcâneo e realização do ensaio biomecânico de tração para identificar o período de início da tendinopatia diabética. A segunda etapa teve início após o término do estadiamento da tendinopatia diabética, sendo utilizados 40 animais distribuídos em quatro grupos: Grupo controle *Sham* (GCS=10 animais saudáveis); Grupo diabético *Sham* (GDS =10 animais induzidos ao diabetes aos 100 dias; Grupo diabético LASER (GDL= 10 animais induzidos ao diabetes e submetidos a laser terapia a partir do surgimento da tendinopatia identificada na primeira etapa; e Grupo controle LASER (GCL= 10 animais submetidos apenas a laser terapia no mesmo período). Os animais do GDS e GDL foram induzidos ao DM experimental por dose única de estreptozotocina (55mg/kg, SIGMA®) via peritoneal. Durante o período de tratamento, o GCL e GDL receberam uma densidade de energia de 3J/ em 12 sessões seguidas, pelo método de contato, usando uma caneta com diodo de AsGa função contínua com comprimento de onda de 808nm e potência de pico de 100W, no terço médio do tendão do calcâneo. Ao final do tratamento, os animais foram eutanasiados e o tendão do calcâneo coletado para as análises. No tendão esquerdo foi realizado o ensaio mecânico de tração e o tendão direito foi encaminhado à microscopia para análise das propriedades histomorfométricas. A análise dos dados foi realizada através do

software SPSS versão 17 adotando o índice de 95% de confiabilidade. A partir do estadiamento identificamos modificações nas propriedades tendíneas logo na segunda semana pós indução, as quais se tornaram mais evidentes na quarta semana com a redução da área de secção transversa e aumento da Tensão máxima e Módulo Elástico. O tratamento com Laserterapia não mostrou restabelecer as propriedades biomecânicas nem promoveu modificações na histologia dos modelos diabéticos experimentais. Portanto, a Laserterapia não promoveu alterações nas propriedades estruturais e histomorfométricas no tendão de modelos experimentais de diabetes. Contudo, o protocolo de laserterapia utilizado em associação com o diabetes promoveu um aumento significativo no módulo de elasticidade tendínea.

PALAVRAS-CHAVE: Terapia a Laser. Tendões. Diabetes Mellitus. Fenômenos Biomecânicos.

Assesment of Laser Therapy on the biomechanical, structural and histological properties of the calcaneal tendon of diabetic mice

ABSTRACT

Diabetes Mellitus is a metabolic syndrome with alarming prevalence rates in the general population. The complications generated by metabolic changes, mainly by high levels of glucose, favor changes in the muscle-tendon system structures, which can progress to degeneration and rupture. However, one possible procedure to restore the architecture and the biomechanical properties of the tendon is to use laser therapy in order to realign the collagen fibers, increase the type 1 collagen expression and delaying the degenerative process caused in the collagenous tissues. In this proposed study, we aimed to evaluate the staging of micro and macroscopic onsets calcaneal tendon of rats induced to experimental diabetes and the effect of photobiomodulation treatment on the improvement of biomechanical and structural properties of the calcaneal tendon. 80 rats, Wistar lineage, were kept under standard vivarium conditions and subjected to inverted light/dark 12 hours cycles, appropriate feed and water ad libitum. This study was divided in two stages. The first presented 40 animals randomly divided into Control Group (n=20) containing healthy animals, and Diabetic Group (n=20) with animals induced to diabetes at 100 days of life. After 100 days of life, every week, five animals randomly selected were euthanized and the calcaneal tendon collected and analyzed by biomechanical testing to identify the beginning of the period of diabetic tendinopathy. The second stage began after the result of the staging of diabetic tendinopathy, which presented 40 animals divided into four groups, Control Group F2, consisting of 10 healthy animals; Diabetic Group F2, containing 10 animals induced to diabetes in 100 days; Diabetic Laser Group, containing 10 animals induced to diabetes and underwent laser therapy from the outset of tendinopathy identified in the first stage; and Control Laser Group, containing 10 healthy animals submitted to laser therapy in the same period. After treatment, the animals were euthanized and the calcaneal tendon collected and analyzed. The mechanical testing was performed in a conventional testing machine EMIC (model 500 DL, Brazil) by self-locking claws and fixed to the metal connectors (2.5 x 3.5 cm). The left calcaneal tendon was pulled to the point of failure, and the graphic stress vs strain, was extracted biomechanical data. The right calcaneal tendon was submitted to microscopy analysis of anisotropic

properties. Data analysis was performed using software SPSS version 17 and adopting 95% of confidence index. The results of this study will elucidate the onset period for the micro- and macro-structural changes diabetic tendon, and promote the use of new technology in the treatment of diabetic tendinopathy.

KEYWORDS: Laser Therapy. Tendon. Diabetes *Mellitus*. Biomechanical Phenomena.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura hierárquica tendínea	24
Figura 2. Curva Tensão x Deformação, comportamento biomecânico tendíneo	25
Figura 3: Componentes essenciais do LASER	29
Figura 4. Organograma descrevendo a primeira etapa do projeto	37
Figura 5. Organograma da segunda etapa do projeto	38
Figura 6: Administração de STREPTO por via intraperitoneal	38
Figura 7. Corte histológico do tendão do calcâneo da pata direita de ratos saudáveis	41
Figura 8. Ensaio mecânico do tendão do calcâneo da pata esquerda. Acoplamento do tendão as garras de pressão (A) e máquina de ensaio mecânico da marca EMIC® (B)	42
ARTIGO 1 - Figure 1. Monitoring of experimental groups	56
ARTIGO 1 - Figure 2. Staging of variables Elastic Modulus, Cross-Sectional Area and Maximum Stress in Diabetic Group	57
ARTIGO 2 - Figure 1. Follow-up of the experimental process.	73
ARTIGO 2 - Figure 2. Proportion of tendinous cells evaluated in the experimental groups.....	76
ARTIGO 2 - Figure 3. Structural and biomechanical properties of the experimental groups evaluated	77

LISTA DE TABELAS

Artigo 1 - Table 1. Clinical parameters of the experimental groups according to the time of induction of diabetes	58
Artigo 1 - Table 2. Biomechanical properties of the experimental groups according to the time of induction of diabetes	59
Artigo 2 - Table1. Biomechanical and Histomorphometric Properties of the Calcaneal Tendon of Experimental Groups	75
Artigo 2 - Table2. Between-Group Diff	75

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1	Aspectos gerais do Diabetes <i>Mellitus</i> (DM) .	19
2.2	Diabetes Experimental	21
2.3	Organização e Comportamento Biomecânico do tendão	22
2.4	Disfunção Tendínea	25
2.5	LASER	27
2.6	Tendinopatia Diabética vs Laserterapia	31
3	JUSTIFICATIVA	32
4	HIPÓTESE	33
5	OBJETIVOS	34
5.1	Objetivo Geral	34
5.2	Objetivos Específicos	34
6	MATERIAIS E MÉTODOS	35
6.1	Local do Estudo	35
6.2	Amostra	35
6.3	Organograma do Estudo	35
6.4	Indução do Diabetes	36
6.5	Avaliação da Glicemia	37
6.6	Tratamento com LASER	37
6.7	Coleta do Material e Eutanásia	38
6.8	Processamento Histológico	38
6.9	Análise Histomorfométrica	39
6.10	Ensaio Biomecânico	39
6.11	Análise Estatística	40
6.12	Aspectos Éticos	41
7	RESULTADOS	42
7.1	Artigo 1 (Diabetic Tendinopathy: when does tendon fragility occur?)	42
7.2	Artigo 2 (Lasertherapy (810nm) was not enough to reduce the complications of diabetic tendinopathy)	58

8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	77
8.1	Limitações do estudo	78
	REFERÊNCIAS	79
	ANEXO A – Parecer da comissão de ética	87
	ANEXO B – Comprovação de submissão do Artigo 1	88
	ANEXO C – Comprovação de submissão do Artigo 2	89

1 INTRODUÇÃO

O sedentarismo associado aos hábitos da sociedade pós-moderna tem se tornado fator desencadeante para inúmeras doenças crônicas degenerativas (MORAES et al., 2010). Dentre estas, o Diabetes *Mellitus* (DM) tem apresentado um aumento de sua prevalência alcançando 336 milhões de diabéticos pelo mundo e projeção para 2030 de alarmantes 552 milhões de indivíduos acometidos (WHITING et al., 2011).

O quadro crônico de hiperglicemia gerado pelo diabetes desencadeia uma série de complicações fisiológicas que afetam o adequado funcionamento do aparelho locomotor associadas direta ou indiretamente às complicações vasculares e/ou neurológicas comumente observadas nessa enfermidade (CHAMMAS et al., 1995; KOESTER, GEORGE, KUHN, 2005; Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2008; ROLIM et al., 2009).

O diabetes promove alterações nos processos de angiogênese (LEEPER, COOKER, 2011), e de proliferação celular, além de distúrbios na matriz celular, principalmente na síntese do colágeno (REDDY, 2004) que ocasionam a longo prazo distúrbios mecânicos do tendão.

Estudos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa (OLIVEIRA et al., 2011; DE OLIVEIRA et al., 2012; BEZERRA et al., 2016), constatou sinais de fragilidade tendínea em animais com diabetes crônica experimental não-controlada, a partir da análise das características biomecânicas do tendão, que demonstraram normalização de alguns parâmetros após a implementação de treinamento físico aeróbico em esteira, assim como a estabilização da evolução da patologia tendínea em animais que realizaram treinamento aquático antes e após o surgimento da diabetes.

Mediante constatação da efetividade do treino físico na melhora ou estabilização das complicações biomecânicas do tendão diabético, surgiu, em seguida, o questionamento do exato momento em que tais comorbidades tendíneas se tornariam evidentes ou biomecanicamente prejudiciais do ponto de vista funcional, e se intervenções que não modificassem o sistema metabólico/energético do diabético (como acontece com o exercício físico) poderiam proteger o tendão em situações de

maior gravidade diabética (tendinopatia confirmada com descompensação glicêmica sem aplicação de regulador glicêmico - como a insulina).

Sendo assim, inicialmente foi realizado um estadiamento biomecânico do tendão do calcâneo para identificar o momento no qual o processo de degeneração tendínea já estivesse instalado em decorrência do diabetes. Dos resultados obtidos desse estadiamento originou-se o primeiro artigo original intitulado "Diabetic tendinopathy: when does tendon fragility occur? ".

A partir desse estadiamento, foi elaborado um protocolo experimental com o intuito de avaliar o efeito da terapia de fotobiomodulação, através do LASER de baixa intensidade, em tendões de animais diabéticos sem controle insulínico pois tínhamos como hipótese inicial que o LASER poderia proteger ou melhorar a condição patológica em que o tendão se encontrava sem a necessidade de impor nenhum protocolo de treinamento físico e, desta forma, não ter o viés metabólico promovido pelo exercício físico em nossos achados.

A fotobiomodulação, através da aplicação da laserterapia, tem demonstrado um efeito no crescimento de células fibroblásticas, na expressão do colágeno tipo 1 e de proteoglicanos (decorin) (CHEN et al., 2009), podendo promover uma reorganização do tecido com subsequente otimização das propriedades tendíneas pelo realinhamento das fibras de colágeno, que se encontram desestruturadas em decorrência do diabetes. Um estudo que utilizou a laserterapia em tendões que sofreram reparo cirúrgico após ruptura, demonstrou realinhamento das fibras colágenas e, conseqüentemente, uma maior resistência ao teste biomecânico (EWAKIL, 2007), o que poderia favorecer a recuperação das propriedades biomecânicas alteradas pelo diabetes.

Baseado nesses achados foi formulada a hipótese de que a fotobiomodulação, através da aplicação do Laser, poderá promover alterações micro e macroestruturais tendíneas que favorecerá a estabilização/redução dos processos bioquímicos desencadeados pelo diabetes proporcionando a reorganização das fibras colágenas e, conseqüentemente, melhorar a biomecânica tendínea retardando o processo degenerativo do tendão observado no diabetes.

Esta Tese faz parte de uma linha de pesquisa desenvolvida no Laboratório de Plasticidade Neuro-Muscular - Departamento de Anatomia da UFPE, que se dedica

ao estudo das comorbidades resultantes do diabetes sobre as estruturas do aparelho locomotor, mediante experimentações com modelos animais e se encontra organizada segundo às normas vigentes do Programa de Pós-Graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) para a elaboração da TESE e estruturada como se segue:

Capítulo 1: Introdução

Capítulo 2: Revisão da Literatura

Capítulo 3: Justificativa

Capítulo 4: Hipóteses

Capítulo 5: Objetivos

Capítulo 6: Materiais e Métodos

Capítulo 7: Resultados – apresentados no formato de dois artigos originais:

Artigo Original 1, intitulado – “Diabetic tendinopathy: when does tendon fragility occur?”, teve como objetivo avaliar as propriedades biomecânicas do tendão de ratos diabéticos e saudáveis de forma prospectiva no intuito de verificar o início do comprometimento do tecido tendíneo. Foi submetido ao periódico *Muscle Ligament and Tendon Journal - MLTJ* Conceito A2 na área de Biotecnologia.

Artigo Original 2, intitulado – “Lasertherapy (810nm) was not enough to reduce the complications of diabetic tendinopathy”, teve como objetivo avaliar o efeito do tratamento com laserterapia sobre propriedades biomecânicas e histomorfométricas no tendão de animais induzidos ao diabetes experimental. Foi submetido ao periódico *Diabetes and its Complications*, Conceito A2 na área de Biotecnologia.

Capítulo 8: Considerações Finais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Aspectos gerais do Diabetes *Mellitus* (DM)

Nos primórdios do século 21, foram atribuídos 2,7% de todos os óbitos do mundo ao diabetes, o que torna essa doença metabólica a oitava principal causa de morte (WHO 2014). Estratificando em faixas etárias, os óbitos atribuídos ao grupo de pessoas com 35-64 anos foram de 6-27% (ROGLIC et al., 2005). No Brasil, estimou-se que aproximadamente nove milhões de pessoas tenham diabetes, destes 3,5 milhões possuem mais de 65 anos (ISER et al., 2015).

Para o confronto desta Pandemia, os americanos têm gasto anualmente 245 bilhões de dólares, sendo estes custos distribuídos nos cuidados em internamentos, medicamentos e redução da produtividade dos funcionários afastados (ADA, 2013). Em países em desenvolvimento, como o Brasil, as cifras gastas por pessoa chegam a 2108 dólares por ano, sendo 1335 dólares relacionados a custos diretos com o paciente (medicação, testes, procedimentos, consultas médicas, etc.) e 773 dólares com custos indiretos (gastos com alimentação, transportes e cuidadores) (BAHIA et al., 2011).

Segundo a Organização Mundial de Saúde e a *American Diabetes Association* (ADA, 2015) o DM é considerado uma síndrome metabólica caracterizada pelo aumento da glicemia circulante (hiperglicemia) resultante da deficiência da secreção de insulina, da ação da mesma ou de ambos. Segundo critérios clínicos, o DM possui quatro formas diferenciadas de apresentação: DM tipo 1, DM tipo 2, DM gestacional e outros tipos específicos de DM.

- a) O DM tipo 1 consiste na destruição das células beta pancreáticas responsáveis pela produção de insulina no corpo. A insulina, por sua vez, possui a importante função de carrear a glicose no organismo para dentro das células onde pode ser metabolizada;
- b) O DM tipo 2 é o mais predominante, sendo caracterizado por problemas na ação e/ou secreção de insulina. Normalmente, pacientes com este estado clínico apresenta-se com sobrepeso sem apresentar distinção de idade para o seu desenvolvimento;

- c) O DM gestacional, refere-se à intolerância a insulina desenvolvida durante o período gestacional e que na maioria dos casos retornam a normalidade após o parto;
- d) Outras formas de DM podem ser desenvolvidas por alteração genética na função das células beta pancreáticas ou na própria insulina, disfunções endócrinas, alterações do pâncreas exócrino, ações adversas de medicamentos, infecções, entre outras.

Alguns sinais e sintomas característicos podem ser identificados nesta síndrome metabólica, tais como poliúria, o aumento na produção de urina; polidipsia, definido como um aumento excessivo da sensação de sede; e a perda da massa corporal (em diabéticos do tipo 1), e que, isoladamente não determinam o estado diabético.

Para a comprovação da síndrome diabética, alguns exames laboratoriais que adotam como parâmetros os níveis glicêmicos são utilizados, tais como a análise glicêmica plasmática de jejum e a avaliação de hemoglobina glicada (HbA1c) (SACKS et al., 2011; WHO 2014).

A Sociedade Brasileira de Diabetes, em suas diretrizes 2014-2015, apoiam a *American Diabetes Association*, os quais enfatizam a constatação de pelo menos um dos seguintes métodos de avaliação de diabetes (SBD 2015): I) os sintomas clínicos de poliúria, polidipsia e perda ponderal acrescida de avaliação glicêmica plasmática casual maior que 200 mg/dL; II) Glicemia plasmática de jejum maior ou igual a 126 mg/dL (7mmol/L), devendo ser repetido em outro dia caso pequenas oscilações sejam encontradas; e III) Glicemia de duas horas pós-sobrecarga de 75g de glicose maior que 200mg/dL.

A hiperglicemia, quando não controlada, pode desencadear um processo metabólico chamado glicosilação não-enzimática. Este processo promove alterações das propriedades bioquímicas, gera radicais livres, formam ligações cruzadas com proteínas ou conduz interações com células, que resultam em estresse oxidativo, alterações morfofuncionais e expressão inflamatória aumentada (BARBOSA, OLIVEIRA, SEARA 2008).

Este rol de alterações e modificações bioquímicas podem ser o cerne dos diversos processos clínicos patológicos que se manifestam de maneira crônica como retinopatias (YAMAGISHI, MATSUI 2011), nefropatias (BEISSWENGER et al., 2013), doenças vasculares (YAMAGISHI 2011) e lesões musculoesqueléticas (REDDY 2003; DE OLIVEIRA et al., 2011; BEZERRA et al., 2016).

2.2 Diabetes Experimental

Para o estudo das repercussões do estado diabético, muitos modelos foram desenvolvidos com animais de diversos portes, além de inúmeras formas de indução ao diabetes no intuito de mimetizar, o máximo possível, o estado patológico ao qual o humano é submetido (REES, ALCOLADO, 2005).

Procedimentos cirúrgicos como a pancreatectomia (resecção parcial ou total do pâncreas), modificação genética, indução através de vírus (imunologia) e utilização de substâncias citotóxicas, todos são exemplos de métodos utilizados para a reprodução desta síndrome (KING, 2012).

Destes, a utilização de substâncias citotóxicas como a estreptozotocina (STREPTO) e aloxanas são as mais utilizadas na experimentação animal, principalmente pela facilidade de indução em animais de pequeno porte como os roedores (cobaias, camundongos e ratos) (RADENKOVIĆ, STOJANOVIĆ, PROSTRAN, 2016).

A STREPTO é um agente antimicrobiano que posteriormente demonstrou efeito adverso nas ilhotas pancreáticas, com alta toxicidade, promovendo a destruição das células beta do pâncreas. O GLUT2 (*Glucose Transporter 2*), transportador localizado na membrana plasmática responsável por carrear a glicose, localizado no pâncreas, exerce função importante no processo diabetogênico, visto que a STREPTO precisa ser transportada para dentro das células para completa atuação. Células que não possuem GLUT2 são resistentes a esta substância. Dentro das células beta, o processo de alquilação, promovido pela STREPTO, resulta na fragmentação do DNA e consequentemente na necrose (LENZEN, 2008).

Para a indução, a droga deve ser inoculada no modelo animal e desta forma promover seu efeito diabetogênico. Algumas vias de inoculação como a endovenosa (veia sublingual e caudal) e a via intraperitoneal foram testadas, mostrando

efetividade na indução, transformando o animal saudável em diabético por longa duração (DELFINO et al., 2002).

A quantidade específica de STREPTO necessária para a indução apresenta uma dose que pode variar de acordo com o tipo de modelo, porte e peso do animal. Em roedores, especificamente em ratos, a dose mínima para a indução ao diabetes do tipo 1 é de 45mg de STREPTO para cada quilograma/peso do animal. Esta dose é capaz de produzir alteração do peso corporal e elevar o índice glicêmico entre 300 e 400mg/dL. Contudo, doses acima de 70 mg/Kg podem ser letais ao animal (GOYAL et al., 2016).

2.3 Organização e comportamento biomecânico do tendão

Apresentando uma aparência esbranquiçada e brilhante, o tendão realiza a ligação entre o tecido muscular e a estrutura óssea promovendo transmissão de energia e movimento corporal iniciado no músculo sendo, desta forma, conhecido por apresentar grande resistência à tração (WANG, 2006).

O tendão é um tecido conjuntivo denso modelado que apresenta uma organização estrutural hierarquizada e delimitada por camadas de tecidos conectivos denominados endotendão, epitendão e paratendão (Figura 1). O endotendão, camada mais interna do tendão, envolve as fibras de colágeno e as agrupam em fascículos, e posteriormente em feixes, conduzindo pequenos vasos sanguíneos, linfáticos e nervos. O terceiro feixe de fibras é envolto pelo epitendão que apresenta uma estrutura mais densa além de um contínuo entre sua camada mais interna e o endotendão. A última camada, paratendão, é composta por tecido frouxo que envolve todo o tendão e permite o movimento entre a estrutura tendínea e outras adjacentes, evitando atrito e possíveis lesões (KANNUS, 2000).

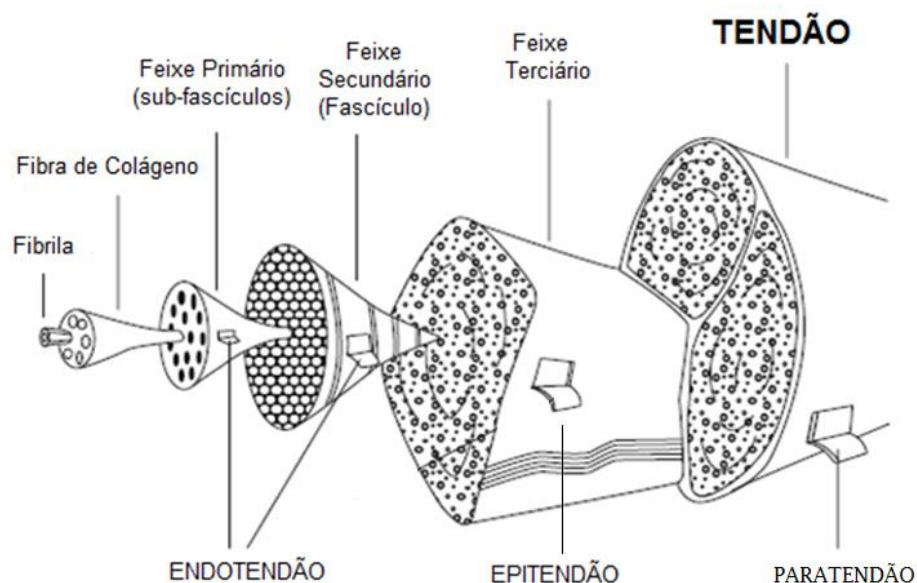


Figura 1. Estrutura hierárquica tendínea (Adaptado de Kannus 2000).

Estes pacotes fasciais delimitam espaços constituídos por 30% de fibras colágenas e de matriz extracelular composta por 68% de água e células tendíneas que se alinham para definir o comportamento biológico e estrutural tendíneo. Além disto, as fibras de colágeno correspondem entre 65-80% do peso seco tendíneo, além de representar a principal fonte da força mecânica deste tecido conectivo (MAFFULLI, RENSTROM, LEADBETTER, 2004).

A família de proteínas de colágeno está presente em diversos tecidos, principalmente o conectivo. Vários tipos de colágeno (tipo I, II, III, IV, etc) já foram identificados e sua formação, através procolágenos até a estrutura de fibra colagenosa, é bem descrita na literatura. No tecido tendíneo há a predominância do colágeno do tipo I. Este por sua vez é formado por três cadeias polipeptídicas α , com aproximadamente 300nm, que se arranjam no formato de tripla hélice, ao qual se atribui à resistência característica de suas fibras (CANTY, KADLER, 2002).

As fibras de colágeno estão imersas em uma matriz, na forma de um gel, composta por proteoglicanos (PGs), glicosaminoglicanos (GAGs), glicoproteínas e outras pequenas moléculas (THORPE et al., 2013).

Os proteoglicanos, proteínas ligadas a GAGs, apresentam papel importante na estrutura tendínea e conseqüentemente em sua biomecânica (ROBSON et al., 2005; CORPS et al., 2006; GORDON et al., 2015). Especificamente nos locais onde existem

forças de tração longitudinal, ocorre à expressão de *Small-Leucine-Rich Proeogycans* (SLRPs), principalmente Decorinas, que participam da ligação entre colágenos fibrilares e na estrutura de matriz extracelular (REES, DENT, CATERSON 2009).

Os Fibroblastos (tenoblastos), células predominantes no tendão, apresentam-se organizadas em uma espécie de fileira longitudinal e são estimuladas pelas cargas de forças as quais são submetidas. Os Tenoblastos são células jovens que se comunicam com outras células através de junções do tipo *gap*, regulando e produzindo componentes da matriz extracelular e colágeno (KJAER, 2004). Quando a atividade metabólica do tenoblasto é diminuída, tornando-se quiescente, este recebe a denominação de tenócito.

Como estrutura biomecânica, o tendão não apresenta apenas a função de resistir e/ou transmitir forças de tração. Este apresenta também a capacidade de absorver e retransmitir energia armazenada durante o movimento musculoesquelético. Desta forma, para verificar esta capacidade e funcionalidade biomecânica, estudos em animais são realizados até o ponto de falha (ou ruptura) tendínea e através da análise dos dados encontrados, poder definir os parâmetros biomecânicos básicos para a estrutura tendínea (MULLER et al., 2004).

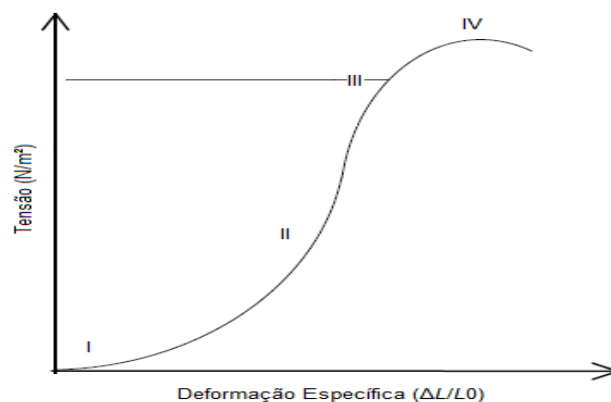


Figura 2. Curva Tensão x Deformação, comportamento biomecânico tendíneo. (N – Newton; M – metros; ΔL – Variação do comprimento; L_0 – Comprimento inicial; I – *toe region*; II – fase elástica; III – Início da fase plástica; IV – Ponto de maior tensão)

A figura 2 ilustra uma curva de comportamento biomecânico, formada pela tensão e deformação do tendão tracionado até o ponto de falha. Este comportamento apresenta uma estrutura não linear, representada por sua viscoelasticidade, na qual

estruturas são distendidas e/ou rompidas, simultaneamente, a depender da exigência de forças impostas ao material tendíneo. Na Fase I ou *toe region*, as fibras de colágeno são distendidas a medida que a força aplicada no tecido é aumentada assim como seu deslocamento sem nenhum aumento abrupto da tensão. Ao final da fase I, tem-se início a fase elástica com a distensão das fibras sem provocar rupturas (Fase II). A partir do ponto III, acontecem pequenas rupturas de fibras as quais impedem o tendão de retornar ao estado inicial (antes do tracionamento), caracterizando uma fase plástica tendínea. Por fim, no ponto IV encontramos o ponto de maior tensão e carga tendínea, analisada como ponto de ruptura, na qual o tendão não consegue mais se contrapor a carga imposta pela tração (WANG, 2006).

Da curva força versus deslocamento e tensão versus deformação, extraímos os seguintes parâmetros utilizados para caracterizar o perfil biomecânico e estrutural do tendão: A) Força máxima: resistência máxima alcançada pelo tendão ao ser tracionado até o ponto de falha; B) deformação específica ($\Delta L/L_0$): corresponde a proporção de deformação alcançada pelo tendão até que o mesmo alcance a força máxima de resistência; C) Energia/área: quantidade de energia acumulada por unidade de medida da espessura tendínea; D) Tensão máxima ($F_{\text{máx}}/A$): que reproduz a quantidade de tensão que está sendo produzida no tendão; e E) Módulo de elasticidade: calculado e representado pela máxima inclinação encontrada na curva tensão x deformação, a qual representa parte da viscoelasticidade tendínea ou “rigidez” representativa do material biológico tendíneo (JUNG, FISHER, WOO, 2009).

2.4 Disfunção tendínea

A disfunção tendínea é uma condição comum na população geral, principalmente em atletas, sem distinção quanto à faixa etária, apresentando aumento em sua incidência com o avançar da idade (TEUNIS et al., 2014).

Por muitos anos as disfunções do tendão foram identificadas, indiscriminadamente, como tendinites, relacionando a presença do processo inflamatório que envolveria a cicatrização tecidual; tendinoses, advindo da degeneração tendínea sem sinais clínicos ou histológicos de inflamação; e paratendinites, que se caracteriza por edema e hiperemia do paratendão. Contudo, alguns pesquisadores avocaram a utilização do termo “Tendinopatia” como um

descriptor que representasse as lesões tendíneas às quais fossem identificados edema, dor e desempenho prejudicado, sem o exame de biópsia analisado por patologista (MAFFULLI, KHAN, PUDDU, 1998).

A tendinopatia pode apresentar uma causa/gênese única primária, como acontecem em traumas agudos, gerando lesão, por exemplo, ou umnexo causal multifatorial, envolvendo a capacidade e a demanda de carga suportada pelo tendão, associados a fatores intrínsecos, extrínsecos e patológicos (HAYEM, 2001)

Atualmente, acredita-se que a sobrecarga no tendão possa propiciar falhas estruturais contínuas, principalmente na matriz extracelular, sem a capacidade plástica necessária para o retorno ao estado normal, saudável. Desta forma, um ciclo de falhas, tanto na matriz extracelular como na recuperação do tendão, tende a evoluir negativamente com fases reativas de inflamação e culminar com a degeneração do tendão, caso a sobrecarga não seja retirada em tempo hábil à adaptação (COOK, PURDAM, 2009).

Vários fatores podem estar relacionados ao surgimento da tendinopatia. Predisposição genética com a presença de genes que causem um desequilíbrio na homeostase da matriz extracelular (RALEIGH et al., 2009), alteração postural resultando em maior estresse tendíneo (WALDECKER, HOFMANN, DREWITZ, 2012), alteração de flexibilidade (MALLIARAS, COOK, KENT, 2006; BACKMAN, DANIELSON, 2011), maus hábitos como o fumo e obesidade (RECHARDT et al.; 2010), utilização de medicamentos que possam apresentar efeitos colaterais, resultando em disfunção tendínea e doenças que promovem alterações hormonais e/ou metabólicas que resultem no surgimento de tendinopatias, como a diabetes (OLIVIA et al., 2016).

Fortes evidências têm demonstrado a relação do diabetes *mellitus* com a tendinopatia (DE OLIVEIRA et al., 2011; RANGE et al., 2016). Contudo, a patogênese desta disfunção ainda não está elucidada.

Utilizando animais experimentais foi possível detectar um aumento no número de células no tendão associados com o aumento da densidade de fibrócitos, uma quantidade quatro vezes maior de mastócitos em animais diabéticos e maior densidade de colágeno do tipo 1 associado a uma maior desorganização da matriz (OLIVEIRA et al., 2013), o que pode caracterizar uma degeneração tendínea.

O estado hiperglicêmico apresentado no quadro diabético pode promover uma redução nos níveis proteoglicanos concomitantemente à redução na absorção de água para dentro do tendão. Esta diminuição hídrica pode alterar as propriedades visco-elásticas do tendão aumentando a “rigidez” tendínea (BURNER et al., 2012).

Alguns pesquisadores seguem o raciocínio que o acúmulo de açúcares no organismo, comum em diabéticos, sem a devida metabolização, pode promover uma série de associações e ligações secundárias que encontram uma maior estabilidade entre as fibras de colágeno. Estas associações resultam em processos bioquímicos, culminando em uma glicação não-enzimática (Advanced glycation end-products) de tecidos conectivos e promovendo uma alteração da estrutura do colágeno prejudicam a biomecânica tendínea (TURK et al., 1999; REDDY, 2004).

A repercussão destas alterações pode afetar a função basal tendínea de transmissão de força, comprometendo a biomecânica natural e modificando propriedades como o módulo de elasticidade (FOX et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011; CONNIZZO et al., 2014) e a área de secção transversa tendínea (OLIVEIRA et al., 2011; CONNIZZO et al., 2014).

2.5 LASER

LASER é um acrônimo para a expressão em inglês “*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*” que significa “Amplificação de Luz por Emissão Estimulada de Radiação”. O primeiro aparelho de LASER produzido, com cristais de Rubi, foi elaborado pelo Dr. Theodore H. Maiman (1960) e apresentava luz vermelha dentro do espectro luminoso (MAIMAN, 1960). Contudo, apenas em 1967 surgiram as publicações com a investigação do efeito terapêutico do LASER no crescimento de pelos em ratos (MESTER, SZENDE, GARTNER, 1968)

No decorrer dos anos, o LASER recebeu diversas denominações, “Laser frio”, “LASER suave”, “LASER de baixa energia”, “LASER de baixa força”, “fotobiomodulação” e “bioestimulação”. Não obstante, para a comunidade científica em geral, a utilização do termo *low-level LASER therapy* - LLLT (Terapia por LASER de baixo nível, tradução literal) é amplamente utilizada por refletir a característica principal dos princípios físicos inerente a terapêutica, ou seja, a transmissão óptica de

baixa energia para os tecidos irradiados (OHSHIRO, CALDERHEAD 1988; HAMBLIN 2006).

Os equipamentos básicos do LASER (Figura 3) apresentam em sua constituição três componentes essenciais (FELICE 2010):

- 1) Uma fonte de energia que normalmente é elétrica;
- 2) Um meio de ganho que possibilita determinar o comprimento de onda no espectro de luz polarizada. Este meio pode ser sólido, líquido, gás ou semicondutor (diodos); e
- 3) Ressonador óptico, constituído por dois aparatos reflexíveis (nos mais simples, espelhos) que amplificam os feixes de fótons.

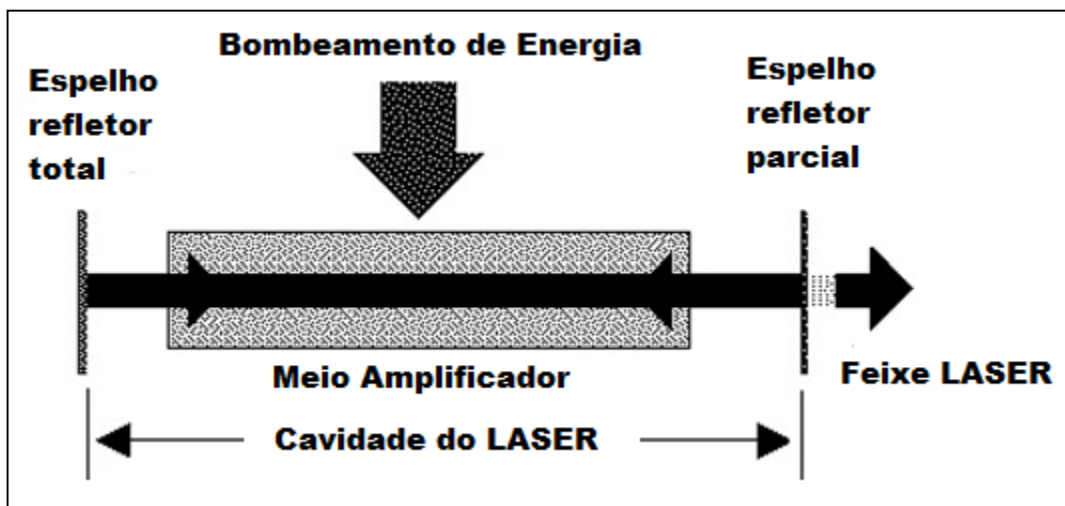


Figura 3: Componentes essenciais do LASER (Adaptado de FELICE 2010)

Este instrumento terapêutico apresenta características intrínsecas à emissão desta energia que influenciam diretamente em suas funções terapêuticas: monocromaticidade, ou seja, apresenta cor única referente ao seu comprimento de onda; colimação, fótons praticamente em paralelo e quase sem divergência de radiação emitida com a distância; e coerência temporal e espacial, apresentando as depressões e picos de ondas que se combinam perfeitamente (KITCHEN, 2003).

O LASER pode ser classificado como de alta, média e baixa intensidade, os quais determinam faixas de densidades de energias que correspondem a sua utilização na ablação, incisão, coagulação ou método terapêutico, sendo a faixa de baixa intensidade a utilizada pela fisioterapia na prática clínica.

Para a prática clínica fisioterapêutica, o LASER de baixa densidade de energia (LLLT) refere-se à terapia de luz monocromática que possui saída de luz óptica maior que 1mW, pertencentes as classes III e IIIa (WALT 2006), que pode ser adaptada segundo as seguintes opções a depender do tecido ou estrutura alvo de tratamento: potência de saída entre 0,001-0,1watts; comprimento de onda no intervalo de 300-10600 nm; taxa de variação de pulso até 5000 hertz (contínuo), intensidade entre 0,01-10 w/cm² e dose de energia que pode variar entre 0,01 a 100J/cm² (FARIVAR, MALEKSHAHABI, SHIARI 2014).

Os tecidos humanos e animais (experimentais) apresentam uma “janela óptica” referente ao comprimento de onda específico no qual o estímulo luminoso captado por receptores fotossensíveis corporais possa coordenar de forma eficiente as alterações celulares e metabólicas desejáveis (KARU, KOLYAROV 2005).

Para o LLLT vermelho e infravermelho próximo, o citocromo c oxidase (CCO) foi apresentado como cromóforo primário responsável pelo disparo das vias metabólicas celulares. O CCO está presente nas cristas mitocôndriais como quarto complexo proteico no transporte de elétrons da cadeia respiratório celular. A absorção de fótons pelo CCO promove um aumento na produção de ATP para a célula (CHEN et. al., 2009).

O aumento metabólico celular, pela maior eficiência na produção de energia pela célula, promove, concomitantemente, um aumento na produção de espécies reativas do oxigênio, visto que a respiração mitocondrial é oxigênio dependente. Esta concentração aumentada do subproduto respiratório altera o ambiente redox da célula que podem ser específicos para promoverem proliferação e acelerar os mecanismos antioxidantes, como acontecem em situações pró-inflamatórias (inflamação crônica) (TAFUR, MILLS 2008).

Além disto, o ambiente redox produzido pelo aumento do subproduto da respiração celular pode disparar a atividade do fator nuclear *kappa beta* (NF- κ B) estimulando a expressão de genes anti-apoptose e pró-sobrevivência que poderiam explicar alguns efeitos clínicos do LLLT (CHEN et al., 2011).

O LLLT tem sido bastante pesquisado para o tratamento de tendinopatias. Em uma recente revisão sistemática de estudos clínicos foi identificado uma forte

evidência da relação entre a utilização de dosagens recomendadas do LASER e desfechos positivos no tratamento de tendinopatias (TUMILTY et al., 2010).

Na lesão tendínea, o LLLT apresenta duas supostas linhas de atuação que repercurtem na melhoria dos desfechos clínicos. A primeira seria a estimulação dos tenoblastos e depósito de colágeno contribuindo na melhoria da matriz extracelular, e a segunda seria a atenuação do processo inflamatório através da inibição da atividade da ciclooxigenase 2 e, por conseguinte, redução da concentração de prostaglandinas E₂ (LOPES-MARTINS, 2014).

Durante o processo inflamatório, várias modificações bioquímicas e estruturais acontecem para que o tecido, ora lesionado, possa se remodelar e retornar aos parâmetros normais. Mediadores químicos são acionados, células são direcionadas para o local lesionado e sinais clínicos como dor, edema e vermelhidão são identificados no local lesionado (VIEIRA et al. 2012).

O LLLT demonstrou acelerar o processo cicatricial promovendo redução no aporte de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α , além da diminuição da ativação de i-NOS (GUERRA et al. 2016); regulação da expressão de MMP-3, MMP-9 e VEGF (MARQUES et al. 2016); além do aumento do estímulo de segundos mensageiros capazes que atuam direto e indiretamente na proliferação celular e produção de colágeno (CHEN et al. 2015). Estas modificações podem atuar diminuindo a alodinia que possa ser gerada na transmissão de forças pelo tendão.

Nas tendinopatias, o LLLT vem sendo incorporado nos tratamentos para redução da sensação dolorosa (DOYLE, LAUBER, SABINE 2016), como por exemplo, nas tendinopatias do ombro, onde a utilização do LLLT unicamente ou em associação com outros métodos terapêuticos (como exercícios) pode reduzir a dor referida e acelerar a recuperação funcional (HASLERUD et al., 2015).

A partir de estudos experimentais, que utilizaram LLLT como recurso terapêutico, pesquisadores conseguiram identificar melhora na resistência máxima de tendões submetidos ao processo de tendinopatia quando comparados ao controle sem tratamento (MARCOS et al., 2012). Na pesquisa, a utilização do LLLT com 1 Joule de energia apresentou melhor resultado do que o tratamento com 3 Joules de energia. Há evidência que o aumento na produção de colágeno do tipo 1 em tendões

submetidos a lesão e tratados, em suas fases iniciais, com LLLT pode ser o responsável pelo aumento da resistência biomecânica (WOOD et al., 2010).

Efeito similar foi encontrado por Jesus et al. (2014), em estudo experimental, no qual avaliaram o alinhamento das fibras e a deposição do colágeno dos tipos 1 e 3 em tendões do calcâneo parcialmente lesionados e tratados com LLLT com 0,7J. Os animais foram avaliados após 1, 3 e 7 dias e comparados com grupos de LLLT *sham*. Não foi observada diferença em relação ao alinhamento das fibras entre os grupos. Contudo, a LLLT aumentou a proliferação do colágeno tipo 1 e, desta forma, melhorou o processo de tratamento do tendão.

2.6 Tendinopatia diabética vs Laserterapia

O diabetes *mellitus* desencadeia no tendão alteração dos processos de angiogênese (LEEPER, COOKER, 2011), inflamatório e de proliferação celular, além de promover distúrbios da matriz celular (redução da quantidade de proteoglicanos), principalmente desorganização da matriz e fibras colágenas (REDDY 2004) que a longo prazo acarreta distúrbio biomecânico funcional.

Apesar da constatação da eficácia da LLLT nas tendinopatias, nenhum estudo até o presente momento avaliou a ação da laserterapia nas tendinopatias causadas pelo diabetes exclusivamente.

Apenas duas pesquisas avaliaram a ação cicatricial e reparadora do LASER em animais diabéticos submetidos a tenotomia para o desenvolvimento da tendinopatia. Estes estudos mostraram melhora no processo inflamatório após cinco dias da laserterapia e aumento da expressão gênica de TGF- β 1 (responsável pelo início da cicatrização) (ALIODOUST et al., 2014), além da melhora no comportamento biomecânico promovendo aumento na força a tração e na carga tensiva dos tendões tenotomizados (NOURUZIAN et al., 2013).

Dessa forma, acreditamos que o LLLT possa beneficiar a função tendínea promovendo melhora na estrutura da matriz extracelular com o realinhamento das fibras de colágeno e evitando as alterações celulares e biomecânicas ocasionadas pelo diabetes no tendão.

3 JUSTIFICATIVA

Em estudos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa, foram observados sinais de fragilidade tendínea em animais com diabetes crônica experimental não-controlada, a partir da avaliação do comportamento biomecânico do tendão do calcâneo, seguida da normalização de alguns parâmetros após a implementação de um exercício físico aeróbio em esteira.

Contudo, a prática de exercício físico moderado gera um esforço repetitivo sobre a estrutura tendínea que, somado a fragilidade da estrutura promovida pelo diabetes, pode ocasionar microrrupturas antes de alcançar os efeitos benéficos da atividade.

Desta forma, a utilização de intervenções terapêuticas que viabilizem a melhora da estrutura tendínea do quadro diabético, como a melhora da resistência a carga e a normalização da tensão máxima no tendão, sem causar riscos adicionais pode vir a ser uma alternativa viável no processo de tratamento da tendinopatia diabética.

Nessa perspectiva, elaboramos um estadiamento biomecânico para a identificação do momento exato do surgimento das alterações biomecânicas e sabermos o momento exato para iniciar a intervenção terapêutica. Acreditamos que a terapia de fotobiomodulação através do LASER de baixa intensidade, aplicado nessas condições, poderá proporcionar ao tendão, fragilizado pelo diabetes, resistência tendínea, adaptando-o para suportar as cargas iniciais necessárias para o processo de reabilitação e início de uma rotina de vida saudável.

4 HIPÓTESE

H₀- O LLLT não é capaz de promover alterações na microestrutura do tendão do calcâneo de ratos induzidos quimicamente ao diabetes tipo 1;

H₁- O LLLT é capaz de alterar a microestrutura do tendão do calcâneo de ratos induzidos quimicamente ao diabetes tipo 1, resultando em alterações nas propriedades estruturais e biomecânicas como a área de secção transversa, força máxima, tensão máxima e módulo de elasticidade;

5 OBJETIVO

5.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do tratamento de Laserterapia de Baixa Intensidade sobre o comportamento das propriedades biomecânica, estrutural e histológica do tendão do calcâneo de ratos induzidos ao diabetes experimental.

5.2 Objetivos específicos

- Realizar o estadiamento do tendão do calcâneo de ratos induzidos ao diabetes experimental através da determinação do surgimento das alterações biomecânicas tendíneas;
- Avaliar o efeito do tratamento com Laserterapia de Baixa Intensidade sobre a força máxima passiva, tensão máxima, área de secção transversa, módulo de elasticidade e deformação específica do tendão do calcâneo de ratos induzidos ao diabetes;
- Analisar a influência da Laserterapia sobre a organização tecidual tendínea, densidade celular e presença de vasos no tendão do calcâneo de ratos induzidos ao diabetes;

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Local do estudo

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Plasticidade Neuromuscular (LAPLAN) do Departamento de Anatomia – Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, onde acontecia o manejo dos animais.

Dois procedimentos do experimento foram realizados em parcerias com outros laboratórios: 1) execução do ensaio biomecânico dos tendões que foi realizado em parceria com o Laboratório de Materiais Poliméricos e Caracterização (LMPC) do Departamento de Engenharia Química da UFPE, e 2) realização dos procedimentos histológicos em parceria com o Núcleo de Estudos em Microscopia e Processamento de Imagem – NEMPI da Universidade Federal do Ceará-UFC.

6.2 Animais experimentais

A amostra foi composta por 80 ratos da espécie *Rattus Novergicus Albinus*, da linhagem *Wistar*, mantidos no Biotério de experimentação do Departamento de Anatomia da UFPE, em gaiolas de prolipropileno de tamanho 41x34x16 cm em grupos de três animais e submetidos a ciclos claro/escuro invertido de 12 horas e temperatura de 22 graus $\pm$ 1 graus. Os ratos receberam dieta (Labina® - Purina) e água *ad libitum*.

6.3 Organograma do estudo

A pesquisa foi estruturada em duas etapas consecutivas e independentes.

Na primeira etapa, 40 animais foram agrupados aleatoriamente em: Grupo Controle (GC=20) e Grupo Diabético (GD=20). Aos 100 dias de vida os animais do GD foram induzidos ao diabetes enquanto o GC foi submetido a um estresse semelhante à indução. A partir da indução, cinco animais de cada grupo foram escolhidos aleatoriamente e eutanasiados a cada semana de forma consecutiva e os tendões coletados e submetidos à avaliação biomecânica no intuito de determinar o período médio da origem da fragilidade tendínea apresentada na tendinopatia diabética (ETAPA 1) (Figura 4).

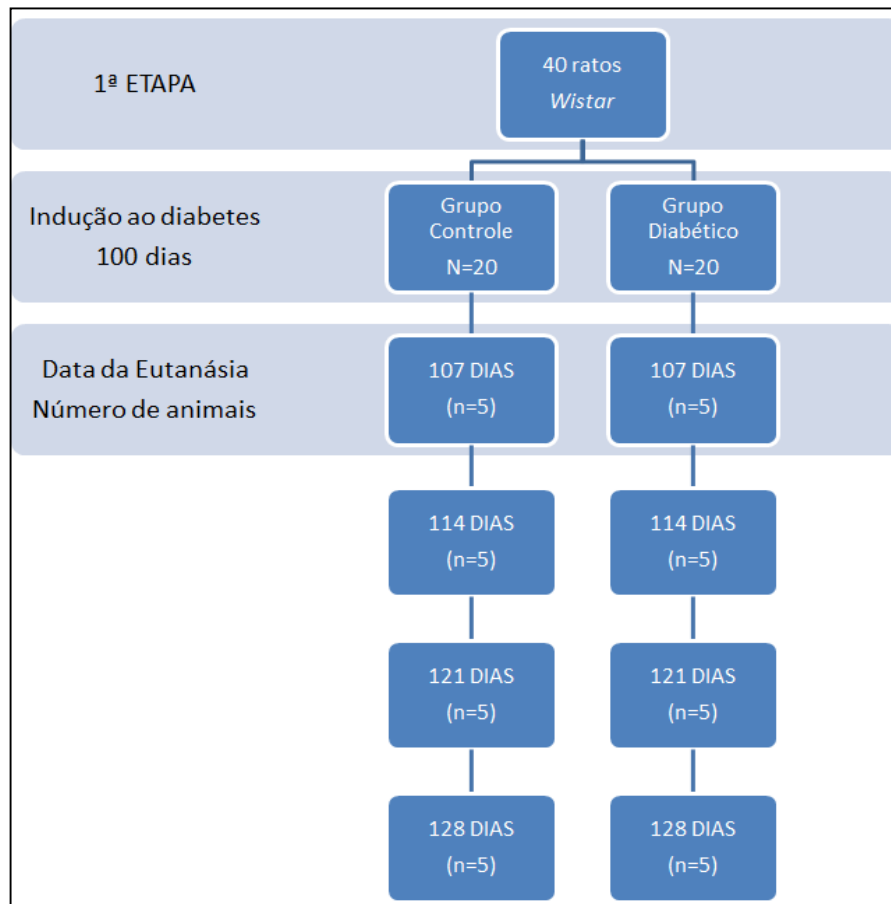


Figura 4. Organograma descrevendo a primeira etapa do projeto.

Na segunda etapa, 40 animais, 100 dias de vida, foram separados aleatoriamente em quatro grupos: grupo controle *sham*, constituído por ratos saudáveis (GcS=10); grupo diabético *sham* (GdS=10) constituído por ratos induzidos ao diabetes *mellitus* experimental; Grupo Controle LASER (GcL=10), animais saudáveis submetidos ao tratamento com LLLT a partir do período de surgimento da tendinopatia determinada na etapa 1; e Grupo Diabético LASER (GdL= 10), constituído por animais induzidos ao diabetes e submetidos ao LLLT a partir do período de surgimento da tendinopatia determinada na etapa 1 (Figura 5).

Ao final da segunda etapa, os animais foram submetidos à avaliação biomecânica do tendão do calcâneo da pata posterior esquerda e a pata posterior direita foi encaminhada para processamento histológico e submetida à avaliação Histomorfométrica.

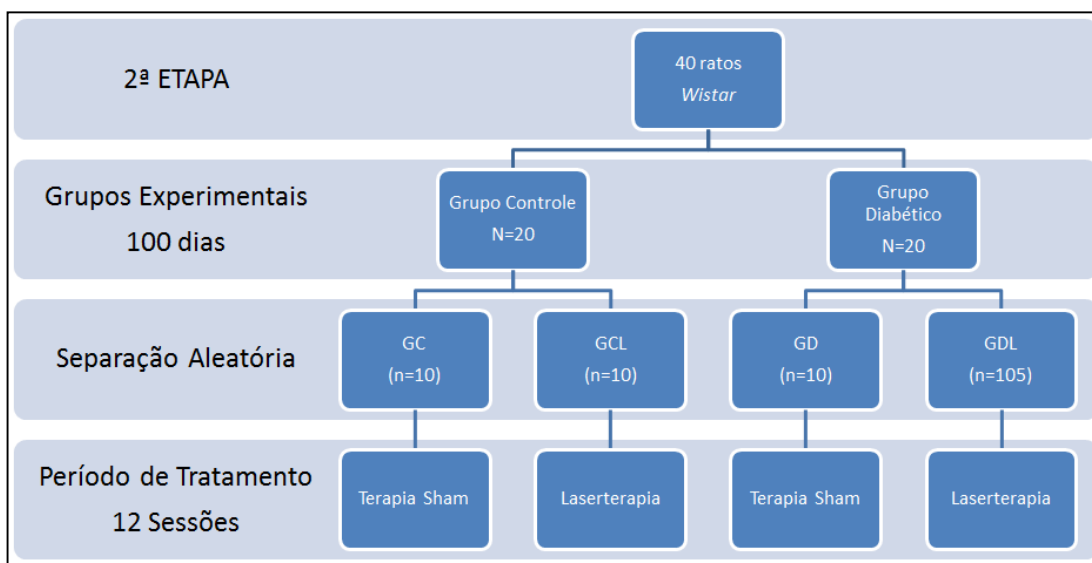


Figura 5. Organograma da segunda etapa do projeto. (GC –grupo controle com terapia *sham*; GCL – grupo controle com aplicação de LASER; GD- Grupo diabético com terapia *sham*; GDL – Grupo diabético com aplicação de LASER)

6.4 Indução do diabetes

Para a indução do diabetes foi utilizada uma solução de STREPTO (Sigma ChemicalCo., USA) infundida por via intraperitoneal dos ratos (Figura 6).



Figura 6: Administração de STREPTO por via intraperitoneal (Fonte: arquivo pessoal do autor).

Para o procedimento a STREPTO é devidamente pesada em uma Balança de precisão (BS3000A) e diluída em uma solução tampão de Citrato de sódio a 10 mM e

pH 4,5, em dose única de 55mg/Kg de peso animal após jejum de 12 horas (BEZERRA et al., 2016).

O grupo controle foi submetido ao mesmo procedimento (estresse da indução), apenas com a solução de tampão de citrato de sódio sem a STREPTO.

Ao final, 30 minutos após a indução, todos os animais foram alimentados.

Os animais que obtiveram glicemia acima de 200mg/dl quarenta e oito horas após a indução foram considerados diabéticos (CARVALHO, CARVALHO, FERREIRA, 2003).

6.5 Avaliação da glicemia

Durante o experimento foi realizada a aferição dos níveis glicêmicos dos animais com o intuito de constatar o quadro de hiperglicemia característico do diabetes *mellitus*.

Na primeira etapa, as aferições foram realizadas após um jejum de 12 horas a partir do 93º dia de vida dos animais (uma semana antes da indução), no dia da indução (100º dia), 48 horas após a indução e no 107º, 114º, 121º e 128º dia de vida do animal.

Na segunda etapa, as aferições foram realizadas no dia da indução, 48 horas após a indução, no 107º, 114º, 121º e 128º dia de vida do animal. Em seguida, os animais começavam o tratamento *Sham* ou com o LASER e apenas ao final do experimento, no dia da eutanásia, foi realizado a última aferição glicêmica.

Em todas as verificações foram utilizadas fitas reagentes (Accu-ChekActiv) para dosagem da glicose sanguínea a partir de uma gota de sangue extraída da cauda do animal (Bezerra et al. 2016)

6.6 Tratamento com LASER

Para a Laserterapia foi utilizado um aparelho *Photon Laser III* da marca DMC®, com dose de 3J por ponto, aplicados em 12 sessões pelo método do contato, utilizando uma caneta com diodo de GaAs que opera na função contínua com comprimento de onda de 808nm e potência de pico de 100W, no terço médio do tendão do calcâneo de ratos (MARCOS et al., 2012)

Neste procedimento, um pesquisador imobilizou o animal manualmente enquanto um segundo pesquisador aplicou de maneira direta a 90° de inclinação à terapia no tendão do calcâneo direito e esquerdo das patas posteriores.

Na terapia Sham, os animais passaram pelo mesmo procedimento que os animais submetidos a laserterapia, porém a caneta de aplicação do LASER não estava conectada ao aparelho. Desta forma, não ocorreu transmissão de energia, mas o animal foi submetido ao mesmo estresse de aplicação e sonoro do equipamento.

Após o período de tratamento os animais foram eutanasiados e os tendões coletados e analisados.

6.7 Coleta do material e eutanásia

Todos os animais ao final do período de tratamento foram anestesiados com uma dosagem de anestésicos Xilazina (Rompum® - Bayer) (10mg/Kg) e Cloridrato de Ketamina (Ketalar®) (25mg/kg), 0,10 ml para cada 100g de peso. Em seguida foi realizada a retirada dos tendões calcâneos da pata esquerda e direita do animal. Após a retirada dos tendões, o animal foi eutanasiado com uma superdose de anestésicos (Xilazina e Ketamina). A análise do tendão calcâneo esquerdo foi realizada de imediato, para tanto a amostra anatômica foi umedecida com soro fisiológico e encaminhada ao Laboratório de Engenharia química em uma caixa térmica para análise biomecânica.

O tendão calcâneo da pata direita foi dissecado e armazenado em formoldeído a 10% para ser realizada a histologia.

6.8 Processamento histológico

Foram selecionados aleatoriamente cinco animais de cada grupo experimental da segunda etapa, dos quais o tendão do calcâneo direito foi lavado com soro fisiológico e fixado numa imersão por 48 horas em uma solução de formoldeído a 10%. Em seguida, as amostras foram desidratadas e embebidas em parafina em forma de cubos, para serem seccionadas longitudinalmente na espessura de 5µm. Após os cortes, as amostras foram montadas em lâminas e coradas com Hematoxilina/Eosina (HE).

6.9 Análise histomorfométrica

A Análise histomorfométrica do material foi realizada em cortes histológicos longitudinais do tendão corados em HE. Para as análises foram capturadas, através de fotografia, dez campos microscópicos por lâmina utilizando uma objetiva de 40x de aumento. Foi realizada a análise quantitativa referente a densidade celular e organização do tecido (Figura 7). Além disto, foi realizada a análise qualitativa do tecido quando a presença de infiltrados inflamatórios, celularidade, presença de vasos e organização da matriz tendínea.

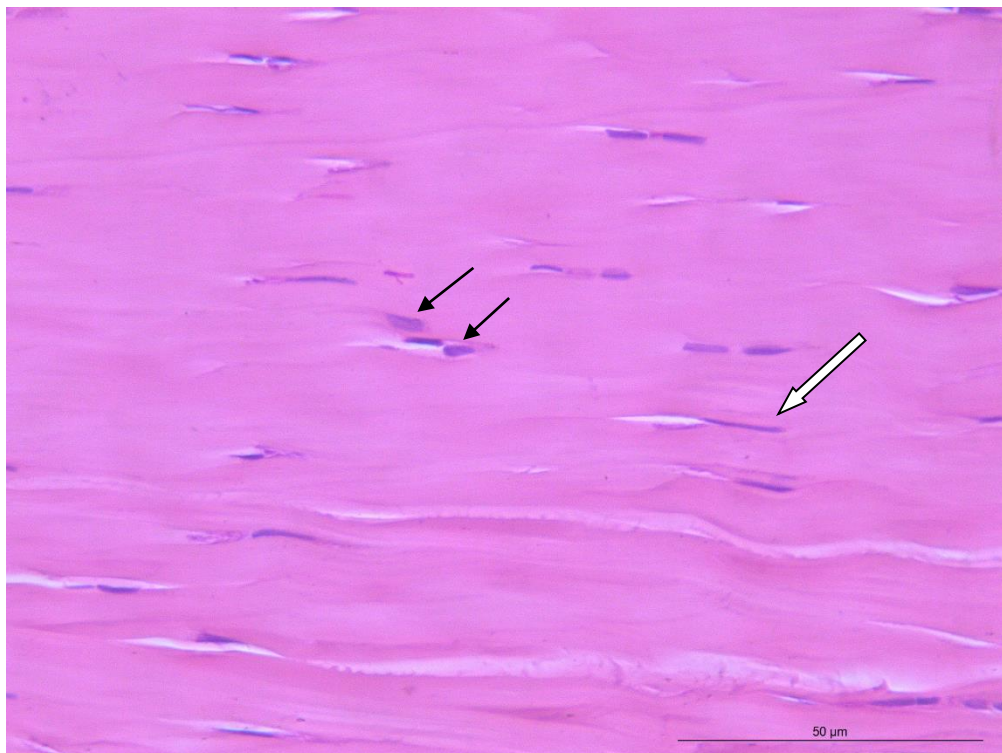


Figura 7. Corte histológico do tendão do calcâneo da pata direita de ratos saudáveis. Tenoblastos imersos na matriz tendínea bem organizada (seta preta) e tenócitos quiescentes (seta branca). (Fonte: Autor)

6.10 Ensaio biomecânico

O tendão do calcâneo da pata esquerda foi dissecado e acoplado em dois conectores de metal (2,5 x 3,5 cm) um em cada extremidade. Em seguida foi utilizada a fórmula da elipse para mensurar a área da secção transversa do tendão (SILVEIRA e NERY, 1999). A amostra (conector + tendão) foi conectada em uma máquina de

ensaio mecânico convencional EMIC (modelo DL 500, Brasil) através de garras auto travantes, sendo em seguida aferido o comprimento da amostra para o ensaio (Figura 8).

As amostras tendíneas foram tracionadas até o ponto de falha do corpo de prova, em velocidade de 0,1 mm/s, com célula de carga de 5000 N. As variáveis estudadas foram módulo elástico (MPa), tensão força máxima (MPa), Deformação Específica Força Máxima (mm), Força máxima (N) e Área de secção transversa (mm²).



Figura 8. Ensaio mecânico do tendão do calcâneo da pata esquerda. Acoplamento do tendão as garras de pressão (A) e máquina de ensaio mecânico da marca EMIC® (B) (Fonte: arquivo pessoal do autor).

6.11 Análise estatística

Para a análise estatística dos dados foi utilizado o software SPSS versão 17. Na primeira etapa, utilizou-se o teste de normalidade de *Kolmogorov-Smirnov* nos grupos experimentais, seguido pelo teste ANOVA one-way com *post-hoc* de Bonferroni para a avaliação intra-grupos do estadiamento biomecânico. Para a avaliação inter-grupos de cada etapa do estadiamento, os testes *Student-t* e *Willcoxon* foram utilizados.

Durante a segunda etapa, os dados foram avaliados pelo teste de normalidade de *Kolmogorov-Smirnov*. Os dados encontrados foram em seguida avaliados pelo teste ANOVA-one way com o *post-hoc* de Bonferroni.

A apresentação dos dados nas duas etapas foi de maneira descritiva e inferencial, com nível de significância de 0,05.

6.12 Aspectos éticos

Foram respeitados os aspectos éticos referentes à pesquisa em animais de laboratório preconizados pelo Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e pelas Diretriz Brasileira para o Cuidado e a utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA 2013) além de estar de acordo com o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEa) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) protocolo nº 23076.021333/2013-17 (ANEXO A).

7 RESULTADOS

7.1 Artigo 1 (ANEXO B)

Diabetic tendinopathy: when does tendon fragility occur?

Msc. Márcio Almeida Bezerra*

Department of Physiotherapy, Ceara Federal University – UFC, Fortaleza-CE
Neuromuscular Plasticity Laboratory – LAPLAN

Msc. Cybelle da Silva Nery

Neuromuscular Plasticity Laboratory – LAPLAN, Pernambuco Federal University – UFPE

Ana Camila Nobre Lacerda de Brito

Neuromuscular Plasticity Laboratory – LAPLAN, Pernambuco Federal University – UFPE

Marina Lira Cavalcante

Neuromuscular Plasticity Laboratory – LAPLAN, Pernambuco Federal University – UFPE

PhD. Silvia Regina Arruda de Moraes

Department of Anatomy, Pernambuco Federal University - UFPE
Neuromuscular Plasticity Laboratory – LAPLAN

***AUTHOR FOR CORRESPONDENCE:**

Márcio Almeida Bezerra
Rua Crisanto Moreira da Rocha, 1909
60.822-305 Fortaleza CE – Brazil
Telephone +55 (83) 3333-2995
Cell phone +55 (83) 99352-3204
E-mail address: malmeidab.ufc@gmail.com (BEZERRA MA)
Laboratory of Neuromuscular Plasticity – LAPLAN

ABSTRACT

Background: Diabetes mellitus can cause disturbances in the structure of tissues rich in collagen, thereby promoting degeneration as in diabetic tendinopathy. However, the period for the consolidation of these changes is unknown. Thus, this study aims to evaluate the staging of diabetic tendinopathy in the calcaneal tendon of Wistar rats experimentally induced to diabetes. **Methods:** 40 male-Wistar-rats, 100 days of age, were divided into two groups: diabetic group (DG), animals induced to experimental diabetes by a single dose of streptozotocin; and Control Group (CG), animals subjected to stress induced by injection of citrate buffer. After that procedure, 5 animals from each group (DG and GC) were killed every week by overdose of anesthetic for four weeks, and the Achilles tendons were removed for biomechanical analysis of traction. **Results:** In the DG analysis, changes were observed starting at the second week with smaller values of the cross-sectional area (CSA) ($p = 0.031$), increased values of the Maximum Stress in the third week ($p = 0.031$) and Elastic Modulus increased in the fourth week ($p = 0.031$). Comparing the groups according to induction time, the fourth week showed significant alterations to DG including smaller CSA ($p < 0.001$) and higher values for Maximum Stress ($p < 0.001$), Energy/Area absorbed ($p = 0.021$) and Elastic Modulus ($p = 0.018$). **Conclusions:** Biomechanical alterations present in rats induced to experimental type 1 diabetes mellitus, without the use of glycemic control, were observed in the DG after the second week of induction. But when the DG was compared to the CG, these results became significant during the fourth week, suggesting that this is the period for the consolidation of degenerative changes in the tendon.

Keywords: animals, biomechanics, diabetes mellitus, tendons.

BACKGROUND

The extracellular matrix (EM) of tendons, rich in collagen and proteoglycans, has a great ability to adapt to different situations to which it is exposed, increasing or not the rate of protein synthesis in this tissue¹. These adjustments may either enhance the biomechanical ability of the tendon, resulting in better transmission of force², or promote fragility when the tendon is subjected to disorders or conditions that affect the macro- or micro-structural composition of the extracellular matrix.

Among the causes that can affect the EM, it has been demonstrated that hyperglycemia promotes structural changes in collagen, causing a cascade of reactions called non-enzymatic glycation, which result in structural and biomechanical changes³.

A continuous hyperglycemic state can be triggered by endocrine and metabolic changes resulting from the non-production of insulin or resistance to its production (diabetic syndrome)⁴, which can trigger musculoskeletal disorders in diabetic subjects⁵, making it a strong risk factor for tendinopathy⁶.

To analyze the myotendinous changes resulting from diabetes, studies using experimental animals have been carried out through the use of substances that destroy the beta cells of the pancreas^{7,8} or by the use of genetically modified animal models⁹. Among the available substances, streptozotocin is widely used for triggering a clinically relevant diabetic state with a reduced mortality rate¹⁰. Streptozotocin inhibits insulin secretion promoted by sensitivity to glucose¹¹ and promotes the destruction of pancreatic beta cells, creating a study model similar to type 1 diabetes mellitus.

Specifically in tendons, type 1 diabetes, without glycemic control, can result in changes in the elastic modulus and deformation⁷, increased collagen production¹², and an increase in the end products of glycation that can promote microstructural modifications of the tendon's hierarchical structure¹³, resulting in diabetic tendinopathy.

Despite evidence of significant changes in tendon structure, the time after induction (time-response) for the emergence of these structural and/or biomechanical changes has not yet been investigated. Currently, research considering time-response

show results which can vary from a few days after induction to more chronic situations with eight weeks of diabetes.

Considering the presence of this time gap, the need to analyze tendons serially at different times from induction to diabetes, and aiming to investigate changes in the appearance of tendinopathy, we decided to evaluate the staging of diabetic tendinopathy in the calcaneal tendon of Wistar rats induced experimentally to diabetes.

METHODS

Animals

Forty male Wistar Rats (*Rattus Novergicus Albinus*) from the vivarium of the Department of Nutrition (Universidade Federal de Pernambuco), weighing 345.3 ± 31 g and aged 100 days, were kept in polypropylene cages of size 41x34x16 cm (three animals per cage), in an air-conditioned environment ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), with an inverted light/dark light cycle of 12 h and free access to ration (Labina® - Purina) and water.

All the procedures of handling and care of the animals are *according to international standards and as required by the principles and recommendations of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. This study was approved by the Committee of Ethics in Animal Experimentation at the Universidade Federal de Pernambuco – UFPE - protocol # 23076.021333/2013-17.

Experimental Group and Diabetes Induction

Upon completing 100 days of life and after a fast of 14 h, the animals of DG (n=20) were induced to experimental diabetes (type 1) through intraperitoneal injection of streptozotocin (Sigma Chemical Co., USA), diluted in 10 mM sodium citrate buffer at pH 4.5, using a single dose (55 mg/kg of animal weight). The animals of the CG (n=20) received the same dose of only sodium citrate buffer solution to reproduce the same stress of induction. Thirty minutes after the induction, all animals had free access to ration and water ⁸.

All the animals who reached glycemic levels above 200 mg/dl were considered diabetic ¹⁴.

From induction, five animals from each group were selected randomly and consecutively euthanized each week. The tendons collected underwent biomechanical evaluation.

Glycemic Analysis

All animals were submitted to analysis of glycemic control during the experiment through the extraction of a drop of blood from the animals' tails. The glycemic levels of the animals was assessed on the day of induction, 48 hours after induction and weekly until the day of tendon collection, after performing a fast of 12 hours. For the measurement of glucose, an Accu-Chek Active brand monitoring kit and reagent strips compatible with the machine were used.

Anesthesia and Collection of Tendons

For collection of the calcaneal tendon, the animals were anesthetized with a xylazine (Rompum® - Bayer) (10mg/kg) and ketamine (Ketalar®) (25mg/kg) solution, 0.10 ml per 100g animal weight. Then, the left hind limb of the animal was removed and dissected, allowing for the removal of the calcaneal tendon. The material was moistened with physiological saline and sent under refrigeration to the Chemical Engineering Laboratory – Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) for mechanical assay. After removal of the tendon, the animal was euthanized by an overdose of anesthetic (ketamine and xylazine anesthesia).

Biomechanical Test

To carry out the mechanical test, the tendon was attached to a mechanical testing machine EMIC® (Model DL 500, Brazil) as shown in Bezerra et al (2013) ¹⁵.

Tendinous samples were tractioned to the point of failure, at a speed of 0.1 mm/s and 500 N load cell. The load-deformation curve was obtained from the tests, which made it possible to analyze the structural properties: maximum strength (N), maximum load supported by the piece; maximum deformation (mm), maximum deformation reached by testing, as well as parameters such as Cross-Sectional Area (CSA) (mm²) and initial length of the tendon (mm). After normalizing strength by the CSA and deformation by the initial length, the stress × strain curve was obtained, from

which the following tendinous biomechanical characteristics were assessed: elastic modulus (MPa), represented by the tangent of the angle formed by the more linear, positive-sloping portion of the graph; tension at maximum strength (MPa), calculated by the ratio of the maximum load supported by the anatomical specimen by its CSA; and specific deformation (%), represented by the ratio between the base length and maximum deformation multiplied by 100.

Statistical Analysis

The statistical analysis of the results was carried out with the software SPSS, version 17. The Shapiro-Wilk normality test was applied to the groups and one-way ANOVA (intra-group), *post-hoc* Bonferroni, Student-t and Wilcoxon (inter-group) tests were used to study the variables at each stage of diabetes. A 5% significance level was employed.

RESULTS

Of the 40 animals that started the experiment, only 33 were included in the analysis of research (Figure 1). Clinical data of each experimental group are shown in Table 1.

In the intragroup evaluation, we observed that in DG the elastic modulus demonstrated a statistically significant increase in value in the fourth week after induction of diabetes ($p = 0.031$), and higher values for maximum stress in the third week after induction and persisted at fourth week ($p = 0.031$; $p = 0.007$; respectively), while the CSA showed decreases from the second week after induction, which also persisted to the fourth week ($p = 0.031$; $p = 0.01$, respectively) (Table 2 and Figure 2).

Comparing the biomechanical properties between DG and CG, using the induction time as baseline (Table 2), there was an increased value in the specific deformation of the DG (45.54%, $p = 0.042$) and a 93% increase ($p = 0.022$) in energy absorbed in DG two weeks after induction of diabetes. In the fourth week, the animals of DG showed lower values of CSA ($p < 0.001$), higher maximum stress ($p < 0.001$), higher energy/area absorbed ($p = 0.021$) and a higher elastic modulus ($p = 0.018$).

DISCUSSION

Staging is a useful research method, which aims to assess sequential changes caused by a specific disease in a specific tissue to identify the emergence of the disturbance process and/or the stages of its evolution ¹⁶. To date, our study seems to be the only one that has investigated the onset time of biomechanical changes, widely described in the literature ^{5,7,8}, observed in the calcaneal tendon of rats induced to experimental diabetes.

The evaluation of the biomechanical properties of tendons through a mechanical assay is useful because it explains in part the behavior of the tendon in the development of tendinopathy through acute stretching. In this study, we aimed to prospectively assess the impact of the diabetic syndrome on tendons experimentally induced to diabetes, which revealed that diabetes without insulin control can promote tendon changes from the second week after the induction process. However, when comparing the diabetic group to a healthy control, the changes become more apparent from the fourth week with lower values of the cross-sectional area (41.26%) and greater values of maximum stress (107, 62%), energy/area (99.29%) and Elastic Modulus (over 400% average) in the diabetic group.

In a characteristic stress x strain curve, the elastic modulus is represented by the slope of the part of the curve showing the elastic phase of tendon stretching. This numerical and mathematical representation has a basis in such biological complexity that it has not been possible to elucidate precisely the origin of biomechanical changes. However, it is known that diabetes can reduce the number of proteoglycans and glycosaminoglycans in the structure of tendons¹⁷ and increase the amount of non-enzymatic glycation that results in an increase of side covalent linkage, changing the viscoelasticity of the tendon ¹⁸.

Our research showed a progressive increase in the elastic modulus, becoming significant after the fourth week of induction, corroborating previous findings of our research group⁸. Some studies have demonstrated that diabetes causes changes in the micro-structure of the collagenous tissue, increasing the number of cross-links (fiber-to-fiber collagen interaction) resulting in increased tendon rigidity and making for a more friable tendon ^{13,19}. However, different from our results, some studies have shown a decrease in the elastic modulus when induced to diabetes by streptozotocin

^{7,20}, while another study showed no biomechanical change in chronic diabetes¹². Perhaps, these results could be explained through the different acquisition method of biomechanical values (type of mechanical testing machine, the speed traction to rupture, method for setting the tendon ends, etc.)²¹ or the kind of animal used (male Sprague-Dawley, Wistar or Lewis rats).

Unlike the increasing elastic modulus, CSA showed a progressive reduction in values during the development of diabetes. Among the diabetic animals, the CSA decreased at the third week and remained low during the fourth. The weight loss of the animals associated with nephrotoxicity caused by induction (due to the dose of streptozotocin used)¹⁰ and the net loss from polyuria, can directly influence tendon volume⁷. When compared to GC, the diabetic animals showed significant differences at the fourth week.

Analyzing the tendon as a biological and non-linear material, the reduction of CSA could influence the intrinsic stress to which the tendon is subjected when pulled by external forces, since the maximum stress is directly influenced by the ratio between the maximum strength and CSA²². In our findings, the maximum strength showed no changes during the study period, but the maximum stress did increase, becoming more evident during the fourth week.

Similar to the increase in maximum stress, in the fourth week, the energy per area showed increased values in the DG as compared to the CG. Theoretically, increasing the energy absorption per area would make the tendon more efficient because it would bear higher energy accumulation in a smaller CSA²³. Nevertheless, this increase in energy per area does not mean that energy will be fully transmitted to the bone structure in a functional activity. In biomechanical assays, the energy is measured indirectly from the area below the stress-strain curve, these data have been influenced by the increased elastic modulus and maximum stress as mentioned above.

CONCLUSION

The staging of biomechanical behavior evaluated in the calcaneal tendon of rats experimentally induced to type 1 diabetes mellitus, without glycemic control, revealed early disturbance of biomechanical behavior in the second week post-induction,

demonstrated by the increasing strain of the tendon and increased energy absorption, furthermore these lesions became more aggravated around the fourth week, indicated by the reduced cross-sectional area of the tendon, increased stress tendon, increased elastic modulus and energy per area. This demonstrates that the tendon lesions caused by diabetes mellitus arise early and develop over time.

REFERENCES

1. HEINEMEIER KM, KJAER M. In vivo investigation of tendon responses to mechanical loading. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2011; 11:115-23.
2. BEZERRA MA, SANTOS DE LIRA KD, COUTINHO MPG et al. Biomechanical and structural parameters of tendons in rats subjected to swimming exercise. *Int J Sports Med* 2013; 34:1070-1073.
3. REDDY, G.K. Cross-linking in Collagen by Nonenzymatic Glycation Increases the matrix stiffness in rabbit Achilles Tendon. *Experimental Diabetes Research* 2004; 5:143-53.
4. ADA – AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care* 2016; 39 (supplement 1): s13-s22.
5. DE OLIVEIRA, RR; LEMOS, A; DE CASTRO SILVEIRA, PV; DA SILVA, RJ; DE MORAES SR. Alterations of tendons in patients with diabetes mellitus: a systematic review. *Diabet Med.* 2011; 28(8): 886-95.
6. RANGE, T.A.; WONG, A.M.Y.; COOK, J.L.; GAIDA, J.E. Is there an association between tendinopathy and diabetes mellitus? A systematic review with meta-analysis. *Br J Sports Med*, 2015; 50(16): 982-9.
7. OLIVEIRA, R.R.; LIRA, K.D.S.; SILVEIRA, P.V.C.; COUTINHO, M.P.G.; MEDEIROS, M.N.; TEIXEIRA, M.F.H.B.I.; MORAES, S.R.A. Mechanical Properties of

Achilles Tendon in Rats Induced to Experimental Diabetes. *Annals of Biomedical Engineering* 2011; 39(5):1528-34.

8. BEZERRA, MA; NERY, CS; SILVEIRA, PVC; MESQUITA, GN; FIGUEIREDO, TG; TEIXEIRA, MFHBI; MORAES, SRA. Previous physical exercise slow down the complications from experimental diabetes in the calcaneal tendon. *Muscles, Ligaments and Tendons Journal* 2016; 6(1): 97-103.

9. CONNIZZO, BK; BHATT, PR; LIECHTY, KW; SOSLOWSKY, LJ. Diabetes Alters Mechanical Properties and Collagen Fiber Re-Alignment in Multiple Mouse Tendons. *Annals of Biomedical Engineering* 2014; 42(9): 1880–8.

10. GOYAL, SN; REDDY, NM; PATIL, KR; KARTIK, T; NAKHATE, KT; OJHA, S; PATIL, CR; AGRAWAL, YO. Challenges and issues with streptozotocin-induced diabetes – A clinically relevant animal model to understand the diabetes pathogenesis and evaluate therapeutics. *Chemico-Biological Interactions* 2016; 244: 49-63.

11. LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 2008; 51: 216-26.

12. VOLPER, BD; HUYNH, RT; ARTHUR, KA; NOONE, J; GORDON, BD; ZACHERLE, EW; MUNOZ, E; SØRENSEN, MA; SVENSSON, RB; BRODERICK, TL; MAGNUSSON, SP; HOWDEN, R; HALE, TM; CARROLL, CC. Influence of acute and chronic streptozotocin-induced diabetes on the rat tendon extracellular matrix and mechanical properties. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2015; 309: R1135–R1143.

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

14. CARVALHO, E.N.; CARVALHO, N.A.S.; FERREIRA, L.M. Experimental model of induction of diabetes mellitus in rats. *Acta Cir Bras* 2003; 18: 60-4.

15. BEZERRA, MA; SANTOS DE LIRA, KD; COUTINHO, MPG; MESQUITA, GN; NOVAES, KA; SILVA, RTB; NASCIMENTO, AKB; INACIO TEIIXEIRA, MFHB; MORAES, SRA. Biomechanical and structural parameters of tendons in rats subjected to swimming exercise. *Int J Sports Med* 2013; 34: 1070-1073.

16. INSEL, RA; DUNNE, JL; ATKINSON, MA; CHIANG, JL; DABELEA, D; PETER A. GOTTLIEB, PA; GREENBAUM, CJ; HEROLD, KC; JEFFREY P. KRISCHER, JP; LERNMARK, A; RATNER, RE; REWERS, MJ; SCHATZ, DA; SKYLER, JS; SOSENKO, JM; ZIEGLER, AG. Staging Presymptomatic Type 1 Diabetes: A Scientific Statement of JDRF, the Endocrine Society, and the American Diabetes Association. *Diabetes Care* 2015; 38: 1964–1974.

17. BURNER, T.; GOHR, C.; MITTON-FITZGERALD, E.; ROSENTHAL, A.K. Hyperglycemia reduces proteoglycan levels in tendons. *Connective Tissue Research* 2012; 53(6): 535-41.

18. SNEDEKER, J.G; GAUTIERI, A. The role of collagen crosslinks in ageing and diabetes - the good, the bad, and the ugly. *Muscles, Ligaments and Tendons Journal* 2014; 4(3): 303-308.

19. REDDY, G.K. Cross-linking in Collagen by Nonenzymatic Glycation Increases the matrix stiffness in rabbit Achilles Tendon. *Experimental Diabetes Research* 2004; 5: 143-53.

20. FOX, A.J.S.; BEDI, A.; DENG, X.H.; YING, L.; HARRIS, P.E.; WARREN, R.F.; RODEO, S.A. Diabetes Mellitus Alters the Mechanical Properties of the Native Tendon in an Experimental Rat Model. *J Orthop Res* 2011; 29: 880–5.

21. BEZERRA, MA; LEMOS, A; LIRA, KDS; SILVEIRA, PVC; COUTINHO, MPG; MORAES, SRA. Does aerobic exercise training promote changes in structural and biomechanical properties of the tendons in experimental animals? a systematic review. *Biology of Sport* 2012; 29: 249-54.
22. JUNG, H-J; FISHER, M.B.; WOO, S.L-Y. Role of biomechanics in the understanding of normal, injured, and healing ligaments and tendons. *Sports Medicine, Arthroscopy, Rehabilitation, Therapy & Technology* 2009; 1(9).
23. MÜLLER, S.S.; SILVARES, P.R.A.; PEREIRA, H.R.; SILVA, M.A.M.; SARDENBERG, T.; LEIVAS, T.P. Comparative analysis of the mechanical properties of the patellar ligament and calcaneus tendon. *Acta Ortop Bras* 2004; 12(3): 134-40.

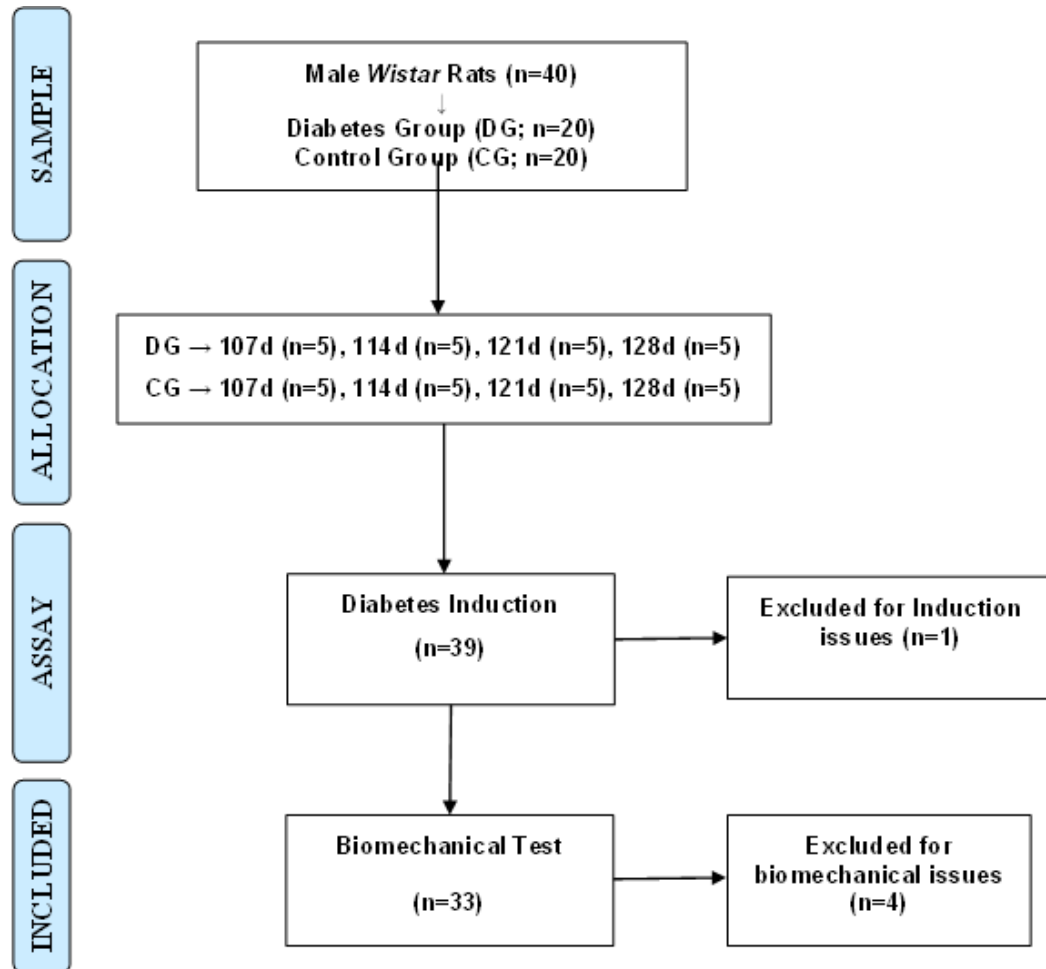


Figure 1. Monitoring of experimental groups.

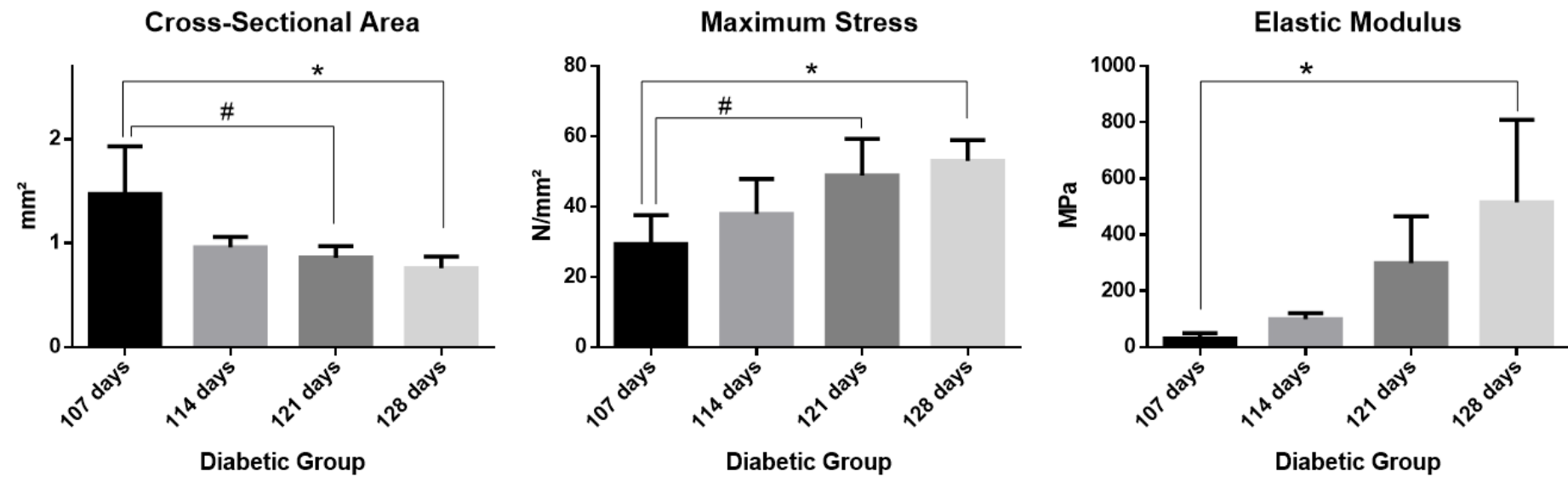


Figure 2. Staging boxplot of variables Cross-Sectional, Maximum Stress and Elastic Modulus in the Diabetic Group.

Table 1. Clinical parameters of the experimental groups according to the time of induction of diabetes.

CONTROL GROUP	107 (n=5)	114 (n=4)	121 (n=4)	128 (n=5)
WEIGHT (grams)	350.4 ± 30.89	316.5 ± 33.75	373.5 ± 13.98	405.2 ± 56.94
GLYCEMIA (mg/dL)	90.4 ± 4.61	73.5 ± 9.46	81.75 ± 5.18	79.2 ± 4.76
DIABETIC GROUP	107 (n=5)	114 (n=4)	121 (n=4)	128 (n=3)
WEIGHT (grams)	304 ± 21.11	297.5 ± 26.5	262 ± 14.87	245.33 ± 49.97
GLYCEMIA (mg/dL)	377.6 ± 34.37	471.25 ± 116.08	464.75 ± 88.8	448.33 ± 130.21

Mg/dL – milligram by deciliters

Table 2. Biomechanical and structural properties of the experimental groups according to the time of induction of diabetes.

CONTROL GROUP	107 (n=5)	114 (n=4)	121 (n=4)	128 (n=5)
CSA (mm²)	1.24 ± 0.17	1.21 ± 0.18	0.98 ± 0.08	1.26 ± 0.04
Maximum Strength (N)	28.18 ± 4.94	30.82 ± 13.5	35.09 ± 10.6	32.51 ± 4.59
Maximum Stress (MPa)	22.85 ± 4.79	24.54 ± 7.03	36.56 ± 14.43	25.7 ± 4.04
Strain (%)	53.65 ± 19.38	53.68 ± 5.81	53.16 ± 4.09	50.62 ± 6.92
Energy / Area (N.mm/mm²)	33.73 ± 7.76	44.6 ± 15.63	64.10 ± 35.62	43.97 ± 11.17
Elastic Modulus (MPa)	53.22 ± 40.37	75.26 ± 20.17	109.46 ± 45.34	105.2 ± 41.91
DIABETIC GROUP	107 (n=5)	114 (n=4)	121 (n=4)	128 (n=3)
CSA (mm²)	1.47 ± 0.46	0.96 ± 0.1	0.86 ± 0.11	0.76 ± 0.11 #
Maximum Strength (N)	41.3 ± 4.4	35.96 ± 6.21	41.29 ± 4.33	40.82 ± 10.55
Maximum Stress (MPa)	29.4 ± 8.2	37.87 ± 10.03	48.91 ± 10.38	53.0 ± 5.98 #
Strain (%)	77.04 ± 14.67	78.13 ± 18.01 *	54.72 ± 6.16	49.02 ± 14.88
Energy / Area (N.mm/mm²)	61.20 ± 25.87	86.08 ± 21.92 *	95.19 ± 26,7	81.54 ± 35.10 *
Elastic Modulus (MPa)	30.82 ± 19.91	99.45 ± 21.55	299.07 ± 166.44	515.53 ± 294.26 *

CSA - Cross-Sectional Area; mm - millimeters; N- Newton; MPa- mega Pascal; % - percentage; * - p<0.05 (Diabetes Group – Control Group); # -

p<0.001 (Diabetes Group – Control Group)

7.2 Artigo 2 (ANEXO C)

LASERTHERAPY (810NM) WAS NOT ENOUGH TO REDUCE THE COMPLICATIONS OF DIABETIC TENDINOPATHY

Márcio Almeida Bezerra*

Laboratório de Plasticidade Neuromuscular - Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal do Ceará – UFC;

Marina Lira Cavalcante

Laboratório de Plasticidade Neuromuscular - Universidade Federal de Pernambuco - UFPE;

Cybelle da Silva Nery

Laboratório de Plasticidade Neuromuscular - Universidade Federal de Pernambuco - UFPE;

Waydja Lânia Virgínia de Araújo Marinho

Laboratório de Plasticidade Neuromuscular – Universidade Federal de Pernambuco – UFPE;

Magno Felipe Holanda Barboza Inácio Teixeira

Curso de Pós-graduação em Engenharia Química – Universidade Federal de Pernambuco - UFPE;

Silvia Regina Arruda de Moraes

Laboratório de Plasticidade Neuromuscular - Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Departamento de Anatomia da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE;

*** CORRESPONDING AUTHOR:**

Márcio Almeida Bezerra

Rua Crisanto Moreira da Rocha, 1909

60822-305 Campina Grande PB – Brazil

Telephone +55 83 3333 2995

Cell phone +55 83 9352 3204

E-mail address: malmeidab.ufc@gmail.com

ABSTRACT

Aims: evaluate the effect of the lasertherapy in the alterations of the biomechanical properties and microstructures of the diabetic calcaneal tendon. **Methods:** Forty wistar rats, 100 days, were randomly distributed in four experimental groups: Sham Control Group (SCG), healthy animals submitted to lasertherapy sham; Sham Diabetic Group (SDG), streptozotocin-induced diabetic rats submitted to lasertherapy sham; Laser Control Group (GCL), healthy animals submitted to lasertherapy; and Laser Diabetic Group (GDL), streptozotocin-induced diabetic rats submitted to lasertherapy. After 4 weeks of induction, lasertherapy started with 3J dose in 12 consecutive sessions. Then, the rats were anesthetized and the left hind paw tendon collected and submitted to the traction biomechanical test and the right hind paw tendon forwarded to the histomorphometric study. **Results:** the diabetic groups (SDG, $p=0.001$ and LDG, $p=0.021$) presented lower values of tenoblast than LCG. The laser therapy associated with Diabetes Mellitus presented a higher value in the tendinous viscoelasticity compared to the control group without this characteristics (SCG= 60.53 ± 28.66 , LDG= 128.98 ± 55.1 , $p=0.022$). **Conclusion:** lasertherapy was not able to promote biomechanical improvements in the calcaneal tendon of diabetic rats. However, the association of Diabetes Mellitus and lasertherapy promoted an increase in the Elastic Modulus of tendon.

Keywords: Low-level laser therapy, diabetes mellitus, Achilles Tendon, Rats

INTRODUCTION

Over the years, Diabetes *Mellitus* patients have been showing an increase of life expectancy, a phenomenon promoted by health treatments that directly affect the longevity of the patients (Miller et al, 2012). However, the higher is the life expectancy of the patients, the more complications on different body tissues appear due to the chronic aspect of the disease, resulting on the occurrence of retinopathies (Yamagishi & Matsui, 2011), nephropathies (Beisswenger et al, 2013), vascular diseases (Yamagishi, 2011) and musculoskeletal injuries (Lui, 2017).

The hyperglycemia, a characteristic of the diabetic state, may be the reason of the alteration on the tendon ultrastructure through the occurrence of non-enzymatic glycation, causing a decrease of proteoglycans concentrations (Burner et al, 2012) and reduction of the collagen fibers sliding (Li et al, 2013). These alterations can modify the energy transduction inside the extracellular matrix of the tendon and, consequently, cause an alteration on its biomechanical properties.

Recent studies demonstrated the existence of tendon fragility in animals experimentally induced to Diabetes *Mellitus* (Fox et al, 2011; Oliveira et al., 2011; Connizzo et al, 2014; Bezerra et al, 2016), when they confirmed the alterations on elastic modulus, cross sectional area and maximum tension, that could make the tendon become more friable, in other words, more prone to develop diabetic tendinopathy.

Concerning tendinopathies, a treatment form widely studied and used on clinical praxis is the LASER – “*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*” (Haslerud et al, 2015; Doyle, Lauber & Sabine, 2016). The Laser therapy is considered usable due to the good ratio of the wavelength emitted by the LASER (red and infrared) and its reception by the body photosensitive receptors, making the management of cellular and metabolic elements appropriately efficient to reach tendinous homeostasis (Karu & Kolyarov, 2005). Recently, a systematic review of clinical studies reinforced this theory, showing a strong evidence on the correlation of LASER utilization and positive outcomes on tendinopathy treatments (Tumilty et al, 2010).

Studies using animals experimentally induced to diabetes and submitted to chirurgical tendon injury, revealed improvements on the inflammatory process after 5 days of laser therapy and increase of genic expression of TGF- β 1 (responsible for the

beginning of the healing process) (Aliodoust et al, 2014). Moreover, enhancements of the biomechanical behavior occurred with the increase of the force, traction and tensile load of the tenotomized tendons (Nouruzian et al, 2013).

Nevertheless, the studies that demonstrated the use of laser therapy on injuries followed by diabetes *mellitus* are still rare and mainly related to tendon ruptures, existing no studies assessing the laser therapy on the treatment of tendinopathy related exclusively to diabetes (Fox et al, 2011; Oliveira et al, 2011; Connizzo et al, 2014).

Therefore, this study aims to evaluate the regenerative potential of the laser therapy in the alterations of the biomechanical properties and microstructures of the calcaneal tendon of rats chemically induced to Type 1 diabetes, in order to delay the degenerative processes or reestablish the capacities of a healthy tendon.

METHODS

Animals and Experimental Groups

During the research, 40 *Rattus Novergicus Albinus* of the *Wistar* lineage were kept on prolipropilen cages, sizing 41x34x16 cm (four animals per cage) under bioterium standard conditions (temperature $22^{\circ}\pm 1$), maintained on a 12-hour dark and light schedule and fed according to appetite (Labina® - Purina).

After 100 days of life, the animals were randomly distributed in four experimental groups: Sham Control group (SCG=10), composed by animals without diabetes and receiving laser therapy sham; Laser Control group (LCG=10), composed by animals without diabetes and receiving laser therapy; Sham Diabetic group (SDG=10), composed by diabetic animals and receiving laser therapy sham; Laser Diabetic group (LDG=10), composed by diabetic animals receiving laser therapy.

All the animals included on the research received adequate management and followed the rules of the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animal*, furthermore, the research was approved by the Ethical Committee of Animal Experimentation (CEEa) of the Federal University of Pernambuco (UFPE), protocol nº 23076.021333/2013-17.

Diabetes induction

After a 12 hours fasting period, the animals of the diabetic groups (SDG and LDG) were induced to experimental diabetes, analogous to diabetes type 1, through a single intraperitoneal injection (55 mg/kg body weight) of Streptozotocin (Sigma Chemical Co., USA) dissolved in sodium citrate solution of 10mM and pH 4,5. The control group animals (SCG and LCG) were submitted to the induction stress by a single dose of sodium citrate solution without Streptozotocin. Thirty minutes after the induction, all the animals had free access to food and water (Bezerra et al., 2016).

Rats with plasma glucose concentrations above 200 mg/dl after 48 hours of induction were considered diabetic (Carvalho, Carvalho & Ferreira, 2003).

Lasertherapy

After the diabetes induction, the animals were kept for four weeks without any therapeutic intervention aiming to wait the development of the diabetic tendinopathy. This time frame was identified as the tendon weakening period, caused by the diabetes chemical processes, recognized on a previous pilot study performed by our group.

Regarding to the laser therapy, a *Photon Laser III* equipment, brand DMC® was used with a dose of 3J per point, during 12 consecutive sessions, via the contact method, using a GaAs diode pen operating in the pulsed mode, with wavelength of 810 nm and peak power of 100W, over the calcaneal tendon of the rats.

In this procedure, one researcher manually immobilized the animal, while a second researcher applied the laser with a 90° inclination, directly on the calcaneal tendon from the right and left posterior paws.

On the Sham therapy, the animals did the same procedure described above, but the LASER pen was not connected to the equipment. Therefore, the energy transmission did not occur, but the animal felt the same stress of the laser application and the noise emitted by the machine.

After the treatment period, the animals were anesthetized and had their calcaneal tendons collected and analyzed.

Glycemic analysis

All the animals were submitted to glycemic control during the experiment through blood extraction from the animal's tail. The glycaemia was assessed on the

induction day; 48 hours after the induction, in order to confirm the diabetes; weekly, until the beginning of the laser therapy treatment and in the day of material extraction. All glycemic analysis were performed after 12 hours fast. For the glycaemia measurement, a monitoring kit from *Accu-Chek® Active* and Reagent Stripes compatible with the device were used.

Anesthesia and material extraction

For the calcaneal tendon extraction, the animals were anaesthetized with Xilazin (*Rompum®* - Bayer) (10mg/kg) and Ketamine hydrochloride (*Ketalar®*) (25mg/kg), 0,10 ml for each 100g of the animal's weight. After, the left posterior paw of the rat was detached for dissection and removal of the calcaneal tendon. The material was humidified on saline solution and sent, under refrigeration, to the Chemical Engineering Lab – UFPE in order to perform the mechanical test. Afterwards, the right posterior paw of the rat was detached for dissection, removal and storage of the calcaneal tendon, for a posterior histological analysis. After the tendon removal, the animal was sacrificed by means of an overdose of anesthetics (Xilazin and Ketamin).

Histological processing

Five animals of each experimental group were randomly selected, and the right calcaneal tendon was washed with saline solution and fixed by immersion for 48 hours in a 10% solution of formaldehyde. After, the samples were dehydrated and embedded in paraffin in the form of cubes, and then sectioned longitudinally in the thickness of 5µm. After the cuts, the samples were prepared in slides, subsequently stained with Hematoxylin/Eosin (HE) and finished with a glass slide and *ethelan*.

Regarding to the histomorphometric analysis, 10 microscopic fields per animal were captured, through photography, using a binocular microscope - Leica - DM 2000 model, and a digital camera with a resolution of 1.4 Mb - Leica - Model DFC 295 with lens of 40x magnification. Afterwards, a qualitative evaluation of the tendinous structure (presence of inflammatory infiltrates, cellular homogeneity, presence of vessels and organization of the tendinous matrix) was performed. Additionally, a quantitative analysis corresponding to cellular density was performed by two blinded researchers concerning to the therapy used and the presence of diabetes.

The cells were classified according to their shape and staining in tenoblasts, tenocytes and intermediate cells.

Biomechanical testing of the tendon

For the biomechanical testing, the tendon cross sectional area was measured using the ellipse formula and then, it was connected to a testing machine EMIC® (Model DL 500, Brasil) as showed on Bezerra et al (2013).

Once connected to the machine, the initial length of the tendon was measured and subsequently the sample was pulled out until the point of failure of the specimen, with velocity of 0.1 mm/s and load cell of 500 N. The tests provided the stress X strain graphics, in which the following tendinous biomechanical characteristics were evaluated: elastic modulus (MPa), represented by the tangent of the angle formed by the most linear portion of the graph ascendant curve; tension on maximum force (MPa), calculated by the quotient of the maximum load supported by the anatomical part and the cross-sectional area; and the specific deformation (%), represented by the quotient between the base length and the maximum deformation multiplied by 100.

Statistical analysis

The statistical analysis of the results was performed using the software SPSS® version 17. The Kolmogorov-Smirnov normality test was applied in the groups and for the variables assessment (biomechanical properties and Histological findings) the ANOVA test was used, with post hoc de Bonferroni. A significance level of 5% was considered.

RESULTS

40 animals started the research, but only 35 samples were collected in the end for the biomechanical test (Figure 1). Two animals did not develop diabetes and one animal died during the experiment due to the diabetes complications. During the biomechanical tests, one sample was lost because of a tendon sliding between the claws on the test machine and another sample was lost due to technical problems in the machine.

Histology

The calcaneal tendon presented similar characteristics among the experimental groups regarding to the qualitative aspects analyzed. In general, the tendons showed an organized shape, with homogeneous distribution of the tendinous cells. No sign of inflammatory infiltrate was identified, but some vessels of small and medium caliber were found surrounding the tendon.

Quantitatively, there was no difference in the total tendinous cellularity (total number of counted cells), amount of tenocytes or intermediate cells between the experimental groups (Table 1). However, a significant difference was found in the values of tenoblasts. The diabetic groups (SDG, $p = 0.001$ and LDG, $p = 0.021$) presented lower values than LCG (Figure 2).

Biomechanical test

The Table 1 shows the values of the biomechanical properties evaluated in the experimental groups. The results showed no modification of tensile strength in the experimental groups. Conversely, there was a decrease in the cross-sectional area of tendons in the diabetes-induced groups (SDG, $p = 0.001$ and LDG, $p = 0.001$) compared to SCG. Moreover, the maximum tension in SDG was higher than the SCG ($p = 0.013$) and LCG ($p = 0.015$) (Figure 3).

On the Elastic modulus evaluation, we found a smaller SCG value when comparing to all the others. However, only LDG showed a significant statistical difference for the increased value (SCG < LDG, $p = 0.022$) (Figure 3).

DISCUSSION

This study aimed to assess the laser therapy capacity on promoting alterations of the biomechanical properties, structure and histology of the calcaneal tendon of diabetes-induced animals, in an attempt to minimize or revert the alterations promoted by the chronic hyperglycemia. For this purpose, an experimental Streptozotocin-induced diabetes was performed, creating a trustable model of diabetes *mellitus* type 1, which demonstrated to be capable of generate the acute and chronic repercussions

on the calcaneal tendons of small animals (Oliveira et al, 2011; Volper et al, 2015; Bezerra et al, 2016).

Theoretically, the laser therapy can act by means of two mechanisms in the tendon: the first is the tenoblast stimulation and collagen deposit, contributing for improvements on the extracellular matrix; the second, is the attenuation of the inflammatory process through the inhibition of the cyclooxygenase2 activity and, subsequently, decreasing the concentration of E2 prostaglandins (Lopes-Martins, 2014).

In this study, no significant differences were observed in the total amount of cells verified in the groups. However, the ratio of tenoblasts on the LCG had a higher value when compared with the SDG. Possibly, the diabetes promoted a decrease of the tenoblast activation rate while the laser therapy caused a greater activation of the tenoblasts in the groups submitted to therapeutic intervention.

Conversely to our findings, that showed no difference on the amount of tenocytes between the groups, some researchers found a difference between the diabetic group and the healthy control group, as well as in the total amount of cells (Oliveira et al, 2013). A fact that could explain this difference is the reduced time of exposition to the diabetes (24 days), while in our study, the animals remained diabetic for more days (40 days).

Nevertheless, two points deserve special attention, although they do not present statistical difference. Firstly, the tenocytes ratio of the SDG is superior to the LCG ($p=0,059$), which can be interpreted as an inversion of the proportion of tenocytes and tenoblasts as a result of the laser therapy, once when we consider the tenoblasts, there is a significant difference. Secondly, the increase of tenoblasts ratio on the LDG, although it does not present a significant difference when compared to SDG, showing that the LASER can influence the proportion of tendinous cells.

Regarding the structural properties, the diabetic groups presented smaller values of cross-sectional area when compared to the control groups. These findings corroborate with previous studies that found diminished tendon cross-sectional area of diabetes-induced animals (Oliveira et al, 2011; Connizzo et al, 2014; Bezerra et al, 2016). It seems that even though there is an increase of tenoblast stimulation by the laser therapy, and theoretically an increase of collagen deposition, the tendon does

not modify its structure concerning the tendon diameter. This finding made us believe that this alteration in the tendon is characteristic of the metabolic disturbance promoted by the diabetes, of which the reestablishment probably can occur by the control of the metabolic syndrome, instead of the exclusive treatment of the structure itself.

The resistance to the passive load of the tendon, entitled in this study as maximum force, was not modified by the diabetes induction nor by the treatment of laser therapy applied to the calcaneal tendon. Nevertheless, the maximum tension, defined by the equation formed by the maximum force and the cross-sectional area showed a higher value on the SDG, when compared to the SCG and LCG. In this case, the decrease of the cross-sectional area directly influenced this parameter, making the tendon more susceptible to elevated stresses with smaller passive forces, which may cause ruptures if the load is increased.

Only one study evaluated the biomechanical properties of tendons of diabetic rats submitted to laser therapy. However, the study (Nouruzian et al, 2013) used tenotomy to characterize tendinopathy, which differs from our research, which waited four weeks after induction for the onset of diabetic tendinopathy. In this study, the author found higher values for both maximal tension and the maximum load supported on diabetic tendons that underwent laser therapy after tenotomy.

The elastic modulus characterizes the viscoelastic properties of the tendon as a biological material, whose the graphic representation is determined by the maximum inclination found in the tension versus deformation curve, generated by the biomechanical test (Jung, Fisher & Woo, 2009). In our study, all groups showed elastic modulus values higher than the SCG. Conversely, only the LDG showed statistical differences between the groups. Studies that assessed the elastic modulus on diabetic animals are contradictory. Oliveira et al (2011) and Fox et al (2001) found a decreased value of this parameter in sedentary diabetic animals, while other studies found increased values (Reddy 2004; Bezerra et al, 2016).

The increase of elastic modulus can be explained by a series of associations and secondary bonds that result in structural alterations on the collagen fibers when exposed to glucose-rich environments (hyperglycemia), non-enzymatic glycation (Turk et al, 1999; Reddy, 2004) or by the reduction of the proteoglycan levels and

concomitant reduction of the tendon water absorption commonly found in diabetic models, causing a “rigidity” in the tendon (Burner et al, 2012).

However, in our study, the application of laser therapy did not reduce this viscoelasticity. The LASER increased the elastic modulus making the tendon theoretically more rigid reflecting the significant difference found in the study.

CONCLUSION

In our study, the application of LASER (810nm) was not able to reestablish the normal pattern found in nondiabetic animals. The biomechanical and structural properties found in diabetic tendinopathy did not change, except for the elastic modulus that increased with the application of laser therapy.

REFERENCES

- Aliodoust, M., Bayat, M., Jalili, M.R., Sharifian, Z., Dadpay, M., Akbari, M., Bayat, M., Khoshvaghti, A., Bayat, H. (2014). 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*, 29, 1495–1503.
- Bezerra, M.A., Nery, C.S., Silveira, P.V.C., Mesquita, G.N., Figueiredo, T.G., Teixeira, M.F.H.B.I., Moraes, S.R.A. (2016). Previous physical exercise slow down the complications from experimental diabetes in the calcaneal tendon. *Muscles, Ligaments and Tendons Journal*, 6, 97-103.
- Bezerra, M.A., Santos de Lira, K.D., Coutinho, M.P.G., Mesquita, G.N., Novaes, K.A., Silva, R.T.B., Nascimento, A.K.B., Inacio Teixeira, M.F.H.B., Moraes, S.R.A. (2013). Biomechanical and structural parameters of tendons in rats subjected to swimming exercise. *International Journal of Sports Medicine*, 34, 1070-1073.
- Burner, T., Gohr, C., Mitton-Fitzgerald, E., Rosenthal, A.K. (2012). Hyperglycemia reduces proteoglycan levels in tendons. *Connective Tissue Research*, 53, 535-541.
- Burner, T., Gohr, C., Mitton-Fitzgerald, E., Rosenthal, A.K. (2012). Hyperglycemia reduces proteoglycan levels in tendons. *Connective Tissue Research*, 53, 535-541.
- Carvalho, E.N., Carvalho, N.A.S., Ferreira, L.M. (2003). Experimental model of induction of diabetes mellitus in rats. *Acta Cirurgica Brasileira*, 18, 60-64.
- Connizzo, B.K., Bhatt, P.R., Liechty, K.W., Soslowsky, L.J. (2014). Diabetes Alters Mechanical Properties and Collagen Fiber Re-Alignment in Multiple Mouse Tendons. *Annals of Biomedical Engineering*, 42, 1880–1888.

- Doyle, A.T., Lauber, C., Sabine, K. (2016). The Effects of Low-Level Laser Therapy on Pain Associated With Tendinopathy: A Critically Appraised Topic. *Journal of Sport Rehabilitation*, 25, 83-90.
- Fox, A.J.S., Bedl, A., Deng, X.H., Ying, L., Harris, P.E., Warren, R.F., Rodeo, S.A. (2011). Diabetes Mellitus Alters the Mechanical Properties of the Native Tendon in an Experimental Rat Model. *Journal of Orthopaedic Research*, 29, 880–885.
- Haslerud, S., Magnussen, L.H., Joensen, J., Lopes-Martins, R.A.B., Bjordal, J.M. (2015). The Efficacy of Low-Level Laser Therapy for Shoulder Tendinopathy: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Physiotherapy Research International*, 20, 108-125.
- Jung, H-J., Fisher, M.B., Woo, S.L-Y. (2009). Role of biomechanics in the understanding of normal, injured, and healing ligaments and tendons. *Sports Medicine, Arthroscopy, Rehabilitation, Therapy & Technology, SMART* 1, 9.
- Karu, T.I., Kolyarov, S.V. (2005). Exact action Spectra for cellular responses relevant to Phototherapy. *Photomedicine and Laser*, 23, 355-361.
- Li, Y., Fessel, G., Georgiadis, M., Snedeker, J.G. (2013). Advanced glycation end-products diminish tendon collagen fiber sliding. *Matrix Biology*. 32, 169-177.
- Lopes-Martins, R.A.B. (2014). Tendinitis, an open avenue for low-level laser therapy. *Photomedicine and Laser Surgery*, 32, 369-370.
- Lui, P.P.Y. (2017). Tendinopathy in diabetes mellitus patients—Epidemiology, pathogenesis, and management. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 27, 776-787.
- Miller, R.G., Secrest, A.M., Sharma, R.K., Songer, T.J., Orchard, T.J. (2012). Improvements in the Life Expectancy of Type 1 Diabetes The Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study Cohort. *Diabetes*, 61, 2987- 2992.
- Nouruzian, M., Alidoust, M., Bayat, M., Bayat, M., Akbari, M. (2013). Effect of low-level laser therapy on healing of tenotomized Achilles tendon in streptozotocin-induced diabetic rats. *Lasers in Medical Science*, 28, 399–405.
- Oliveira, R.R., Lira, K.D.S., Silveira, P.V.C., Coutinho, M.P.G., Medeiros, M.N., Teixeira, M.F.H.B.I., Moraes, S.R.A. (2011). Mechanical Properties of Achilles Tendon in Rats Induced to Experimental Diabetes. *Annals of Biomedical Engineering*, 39, 1528-1534.
- Oliveira, R.R., Martins, C.S., Rocha, Y.R., Braga, A.B.R., Mattos, R.M., Hecht, F., Brito, G.A.C., Nasciutti, L.E. (2013) Experimental Diabetes Induces Structural, Inflammatory and Vascular Changes of Achilles Tendons, *PLoS ONE*, 8, e74942.

Reddy, G.K. (2004). Cross-linking in Collagen by Nonenzymatic Glycation Increases the matrix stiffness in rabbit Achilles Tendon. *Experimental Diabetes Research*, 5, 143-153.

Tumilty, S., Munn, J., Mcdonough, S., Hurley, D.A., Basford, J.R., Baxter, G.D. (2010). Low level laser treatment of tendinopathy: a systematic review with meta-analysis. *Photomedicine and Laser Surgery*, 28, 3-16.

Turk, Z., Misur, I., Turk, N., Benko, B. (1999). Rat tissue collagen modified by advanced glycation: correlation with duration of diabetes and glycemic control. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 37, 813-820.

Volper, B.D., Huynh, R.T., Arthur, K.A., Noone, J., Gordon, B.D., Zacherle, E.W., Munoz, E., Sørensen, M.A., Svensson, R.B., Broderick, T.L., Magnusson, S.P., Howden, R., Hale, T.M., Carroll, C.C. (2015). Influence of acute and chronic streptozotocin-induced diabetes on the rat tendon extracellular matrix and mechanical properties. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 309, R1135–R1143.

Yamagishi, S (2011). Role of advanced glycation end products (AGEs) and receptor for AGE's (RAGE) in vascular damage in diabetes. *Experimental Gerontology*, 46, 217-224.

Yamagishi, S., Matsui, T. (2011). Advanced glycation end products (AGEs), oxidative stress and diabetic retinopathy. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 12, 362-368.

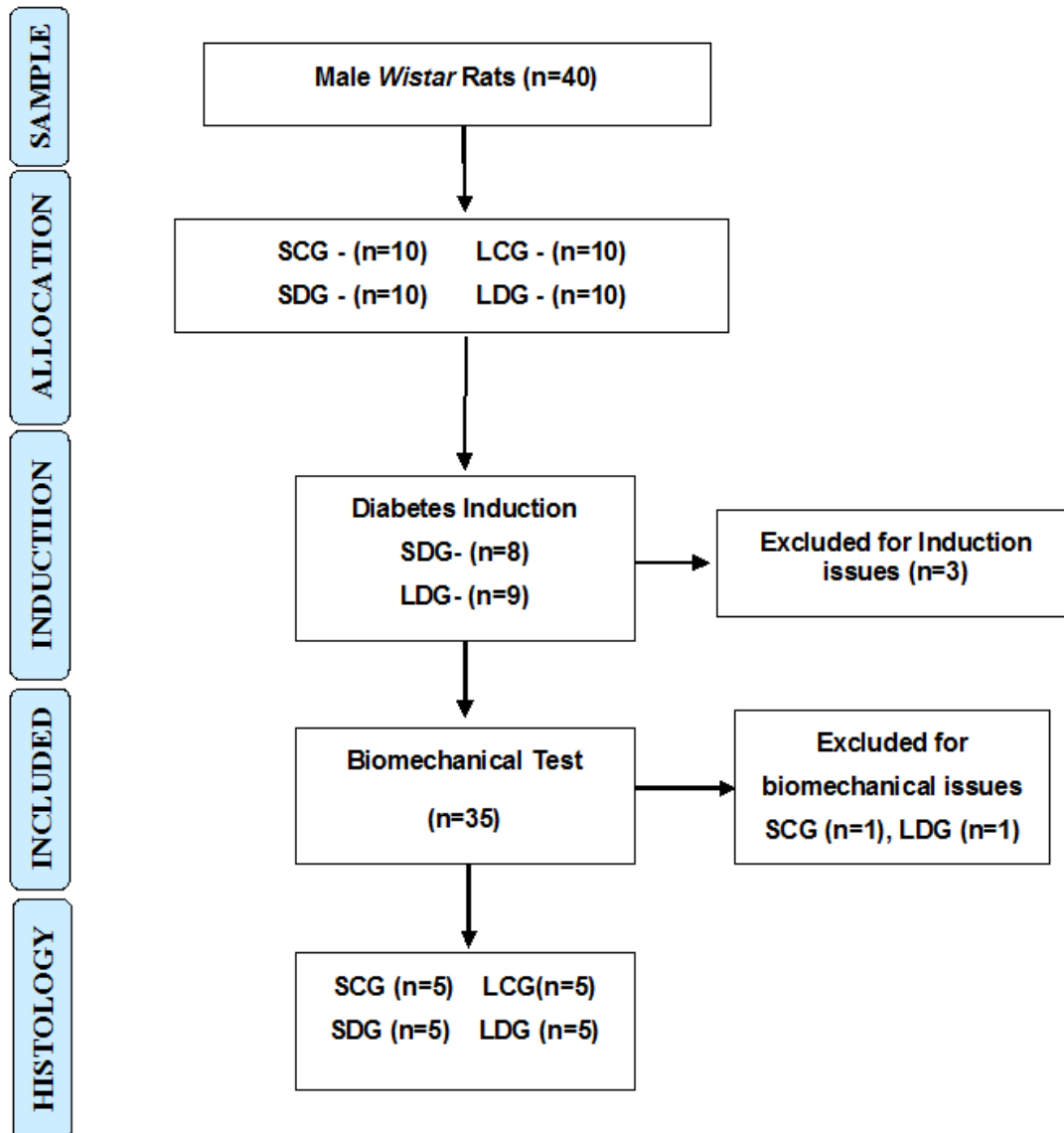


Figure 1. Follow-up of the experimental process. (SCG- sham control group, LCG- LASER Control Group, SDG- Sham Diabetic Group, LDG- LASER Diabetic Group)

Table1. Metabolic State, Biomechanical and Histomorphometric Properties of the Calcaneal Tendon of Experimental Groups.

OUTCOMES	GROUPS			
	Sham Control Group (Mean $\pm$ SD)	Sham Diabetic Group (Mean $\pm$ SD)	LASER Control Group (Mean $\pm$ SD)	LASER Diabetic Group (Mean $\pm$ SD)
Metabolic State				
Baseline Weight (g)	340 $\pm$ 41.06	311.2 $\pm$ 27.35	349 $\pm$ 52.11	326.5 $\pm$ 26.44
Euthanasia Weight (g)	396.6 $\pm$ 49.06	232.2 $\pm$ 56.22	396.6 $\pm$ 51.66	227 $\pm$ 51.29
Baseline Glycemia (mg/dL)	82.1 $\pm$ 5.34	85.2 $\pm$ 2.76	83.2 $\pm$ 12.16	90.3 $\pm$ 6.94
Euthanasia Glycemia (mg/dL)	77.3 $\pm$ 9.6	432 $\pm$ 101.9	87.7 $\pm$ 14.16	537.1 $\pm$ 68.16
Biomechanical Properties				
Cross-Section Area (mm ²)	0.939 $\pm$ 0.138	0.642 $\pm$ 0.062	0.940 $\pm$ 0.188	0.639 $\pm$ 0.75
Maximum Load (N)	28.897 $\pm$ 8.263	30.568 $\pm$ 8.970	29.067 $\pm$ 4.463	27.601 $\pm$ 5.423
Maximum Stress (N/mm ²)	30.886 $\pm$ 8.409	47.500 $\pm$ 13.280	31.652 $\pm$ 6.507	44.272 $\pm$ 12.179
Strain (%)	72.497 $\pm$ 18.331	63.678 $\pm$ 9.406	57.425 $\pm$ 16.666	61.745 $\pm$ 16.817
Elastic Modulus (Mpa)	60.535 $\pm$ 28.663	119.167 $\pm$ 47.112	105.766 $\pm$ 45.904	128.980 $\pm$ 55.1
Histomorphometry				
Tenocytes	135.7 $\pm$ 15.47	154.9 $\pm$ 27.57	116.3 $\pm$ 31.14	117.6 $\pm$ 50.9
Tenoblasts	18.5 $\pm$ 5.46	4.8 $\pm$ 2.41	29.6 $\pm$ 9.95	11.7 $\pm$ 11.7
Intermediate cells	54.6 $\pm$ 10.72	42.5 $\pm$ 16.6	63.4 $\pm$ 6.03	55 $\pm$ 25.54
Cellularity	208.8 $\pm$ 10.63	202.2 $\pm$ 14.85	209.3 $\pm$ 39.32	184.3 $\pm$ 34.95

g- gramas; mg – milligrams; dL – deciliters; mm- millimeter; N- Newton; %- percentage; MPa- Mega Pascal

Table2. Between-Group Diff.

OUTCOMES	<i>Between-group diff</i>			
	SCG - SDG	LCG - LDG	SCG - LCG	SDG - LDG
<i>Biomechanical properties</i>				
CSA (mm ²)	0,29(p=.00; .12 to .47)*	0,30(p=.00; .13 to .47)*	-0,001(p=1; -.16 to .16)	0,003 (p=1; -.17 to .18)
Maximum Load (N)	-1,67 (p=.96; -10.8 to 7.4)	1,46 (p=.97; -7.4 to 10.4)	-0,17 (p=1; -8.8 to 8.4)	2,96 (p=.82; -6.4 to 12,3)
Maximum Stress (N/mm ²)	-16,6 (p=.011; -30.5 to -3.1)*	-55,4 (p=.63; -25.7 to .49)	-32,7 (p=.99; -13.4 to 11.9)	-71,6 (p=.92; -10.6 to 17.0)
Strain (%)	8,8 (p=.66; -12.0 to 29.7)	-4,3 (p=.93; -24.7 to 16)	15 (p=.18; -4,6 to 34.8)	1,9(p=.99; -19.5 to 23.4)
Elastic Modulus (MPa)	-58,6 (p=.053; -117.7 to .5)	-23,2 (p=.69; -80.9 to 34.5)	-45,2 (p=.14; -101.1 to 10.6)	-9,8 (p=.97; -70.6 to 51)
<i>Histomorphometry</i>				
Tenocytes	-19,2 (p=1; -83.4 to 45.0)	-1,3 (p=1; -65.5 to 62.9)	19,4 (p=1; -44.8 to 83.6)	37,3 (p=.6; -26.9 to 101.5)
Tenoblast	13,7 (p=.11; -2.0 to 29.4)	17,9 (p=.02; 2.17 to 33.6)*	-11,1 (p=.29; -26.8 to 4.6)	-6,9 (p=1; -22.6 to 8.8)
Intermediate Cells	12,1 (p=1; -19.1 to 43.3)	8,4 (p=1; -22.8 to 39.6)	-8,8 (p=1; -40 to 22.4)	-12,5 (p=1; -43.7 to 18.7)
Cellularity	6,6 (p=1; -46.3 to 59.5)	25 (p=1; -27.9 to 77.9)	-0,5 (p=1; -53.4 to 52.4)	17,9 (p=1; -35 to 70.8)

* significant differences

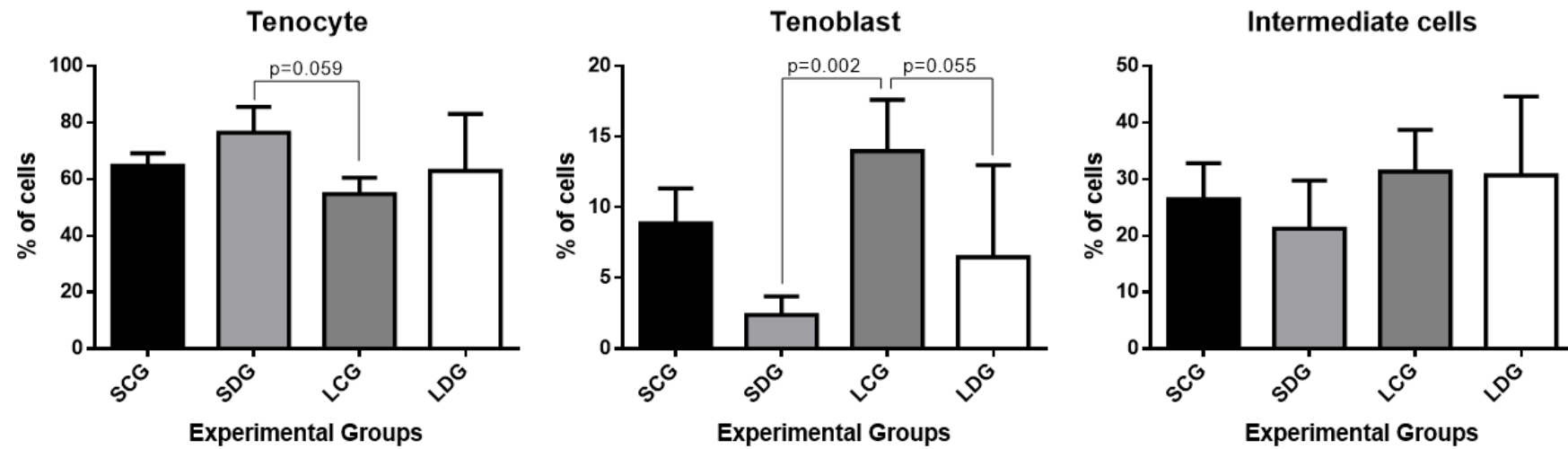


Figure 2. Proportion of tendinous cells evaluated in the experimental groups. (One-way Anova test, Post hoc Bonferroni, $p < 0.05$; mm – millimeter; MPa – Mega Pascal; SCG – sham control group; SDG – sham diabetic group; LCG – LASER control group; LDG – LASER diabetic group.

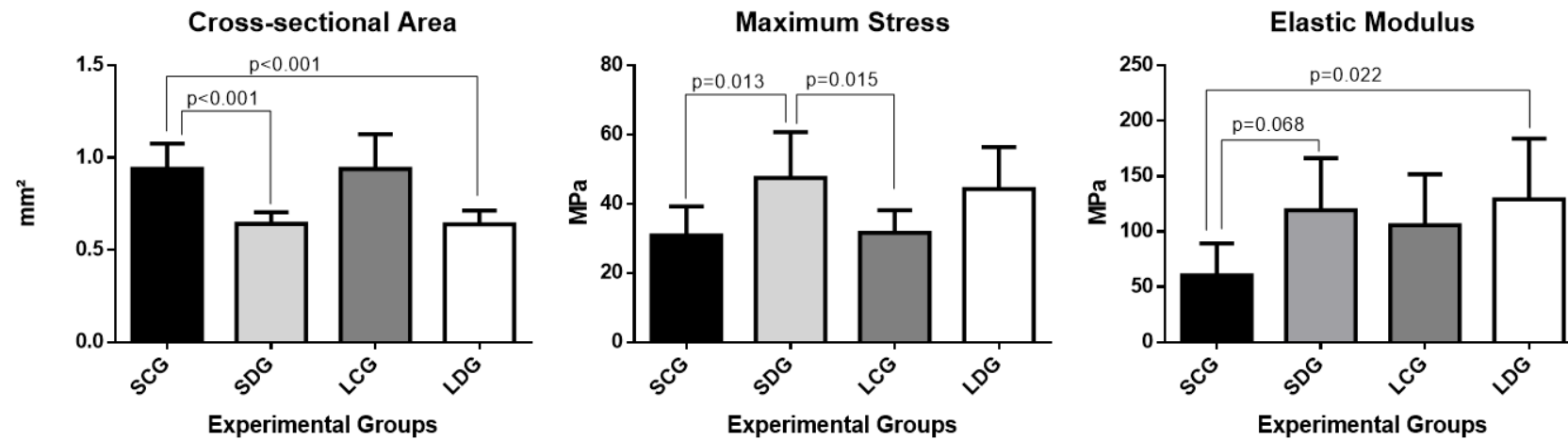


Figure 3. Structural and biomechanical properties of the experimental groups evaluated. (One-way Anova test, Post hoc Bonferroni, $p < 0.05$; mm – millimeter; MPa – Mega Pascal; SCG – sham control group; SDG – sham diabetic group; LCG – LASER control group; LDG – LASER diabetic group)

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- I. O diabetes tipo I, quimicamente induzido e não controlado, promoveu alterações precoce no comportamento biomecânico e estrutural do tendão calcâneo de modelos experimentais. A partir da segunda semana pós indução já foi possível identificar alterações na tensão máxima que posteriormente, na quarta semana, foram agravadas pela redução da área de secção transversa tendínea e aumento do módulo de elasticidade. O aumento da tensão no tendão com a imposição de cargas de menor intensidade associadas ao aumento do módulo de elasticidade e redução da área de seção transversa, podem desencadear, no diabético, uma ruptura tendínea precoce.
- II. Quanto ao tratamento com Laserterapia sobre o comportamento biomecânico e estrutural do tendão de modelos experimentais diabéticos, parece que a terapêutica utilizada (12 sessões consecutivas de 3J de densidade de energia, contínuo, com caneta de 808 nm) não foi capaz de restaurar ou normalizar os parâmetros alterados do tendão. Além disso, em relação ao módulo de elasticidade, a associação do diabetes com a laserterapia, em nosso estudo, promoveu um aumento significativo quando comparado ao animal controle sem diabetes experimental e com terapia *sham*.
- III. Em relação a influência da Laserterapia na microestrutura tendínea interferindo na densidade celular e organização da matriz extracelular, não observamos modificações na organização da matriz extracelular do modelo experimental diabético em nosso estudo. Logo a Laserterapia não promoveria modificações significativas. Contudo, no âmbito da densidade celular, os animais controles que foram submetidos a Laserterapia apresentaram diferença significativa quanto a proporção de tenoblastos presentes nos campos analisados quando comparados ao grupo diabético *sham*. Tanto o diabetes pode ter contribuído para a redução do número de tenoblastos quando a Laserterapia auxiliado na taxa de síntese de tenoblastos para que esse resultado tenha acontecido.

8.1 Limitações do estudo

A utilização de modelos experimentais de diabetes *mellitus*, sem o controle ou padronização da glicemia, podem ficar sujeitos a dois problemas que podem limitar a amostra da pesquisa: 1) o animal não se tornar diabético com a dose determinada no protocolo utilizado ou, 2) o animal não suportar o desequilíbrio metabólico gerado pela indução experimental que mimetiza a síndrome diabética do tipo 2. Perdemos alguns animais durante o experimento em decorrência destes fatores que poderiam propiciar uma estatística mais limpa nos artigos apresentados.

Além disso, problemas técnicos com filtro de birrefringência do microscópio no final do período do doutorado impediu a análise da quantidade de colágeno nos tendões submetidos ao tratamento com laserterapia e que poderia elucidar, de maneira mais precisa, a organização da matriz extracelular tendínea.

REFERÊNCIAS

ALIODOUST, M; BAYAT, M; JALILI, M.R.; SHARIFIAN, Z.; DADPAY, M.; AKBARI, M.; BAYAT, M.; KHOSHVAGHTI, A.; BAYAT, H. 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, p. 1495–1503, 2014.

American Diabetes Association - ADA. Economic costs of diabetes in the U.S. in 2012. **Diabetes Care**, v. 26, p.1033-46, 2013

American Diabetes Association - ADA. Microvascular Complications and Foot Care. **Diabetes Care**, v.38(Suppl. 1): S58–S66, 2015.

BACKMAN, L.J.; DANIELSON, P. Low range of ankle dorsiflexion predisposes for patellar tendinopathy in junior elite basketball players: a 1-year prospective study. **American Journal of Sports Medicine**., v. 39, n. 12, p. 2626-33, 2011.

BAHIA, L.R.; ARAUJO, D.V.; SCHAAN, B.D.; DIB, S.A.; NEGRATO, C.A.; LEAO, M.P.S.; RAMOS, A.J.; FORTI, A.C.; GOMES, M.B.; FOSS, M.C.; MONTEIRO, R.A.; SARTORELLI, D.; FRANCO, L.J. The costs of type 2 diabetes mellitus outpatient care in the Brazilian Public Health System. **Value in Health**, v. 14, p. s137-40, 2011.

BARBOSA, J.H.P.; OLIVEIRA, S.L.; SEARA, L.T. O papel dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, v.52, n.6, p.940-50, 2008.

BEISSWENGER, P.J.; HOWELL, S.K.; RUSSELL, G.B.; MILLER, M.E.; RICH, S.S.; MAUER, M. Early progression of diabetic nephropathy correlates with methylglyoxal-derived advanced glycation end products. **Diabetes Care**, v.36, p. 3234-9, 2013.

BEZERRA, MA; NERY, CS; SILVEIRA, PVC; MESQUITA, GN; FIGUEIREDO, TG; TEIXEIRA, MFHBI; MORAES, SRA. Previous physical exercise slow down the complications from experimental diabetes in the calcaneal tendon. **Muscles, Ligaments and Tendons Journal**, v. 6, n. 1, p.97-103, 2016

BURNER, T.; GOHR, C.; MITTON-FITZGERALD, E.; ROSENTHAL, A.K. Hyperglycemia reduces proteoglycan levels in tendons. **Connective Tissue Research**, v. 53, n. 6, p. 535-41, 2012.

CANTY, E.G.; KADLER, K.E. Collagen fibril biosynthesis in tendo: a review and recent insights. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A** v. 133, p. 979-85, 2002.

CARVALHO, E.N.; CARVALHO, N.A.S.; FERREIRA, L.M. Experimental model of induction of diabetes mellitus in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v.18, p.60-4, 2003

CHAMMAS, M.; BOUSQUET, P.; RENARD, E.; POIRIER, J.L.; JAFFIOL, C.; ALLIEU, Y. Dupuytren's disease, carpal tunnel syndrome, trigger finger, and diabetes mellitus. **The Journal of Hand Surgery**, v. 20, n. 1, p. 109-114, 1995.

CHEN, A.C.; ARANY, P.R.; HUANG, Y.Y.; TOMKINSON, E.M.; SHARMA, S.K.; KHARKWAL, G.B.; SALEEM, T.; MOONEY, D.; YULL, F.E.; BLACKWELL, T.S.; HAMBLIN, M.R. Low-level laser therapy activates NF-kB via generation of reactive oxygen species in mouse embryonic fibroblasts. **Plos One**, v.6, n.7, e22453, 2011.

CHEN, C.H.; TSAI, J.L.; WANG, Y.H.; LEE, C.L.; CHEN, J.K.; HUANG, M.H. Low-level laser irradiation promotes cell proliferation and mRNA expression of type 1 collagen and decorin in porcine Achilles tendon fibroblasts in vitro. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 27, p. 646-50, 2009.

CHEN, M-H.; HUANG, Y-C.; SUN, J-S.; CHAO, Y-H.; CHEN, M.G. Second messengers mediating the proliferation and collagen synthesis of tenocytes induced by low-level laser irradiation. **Lasers Medicine Science**, v.30, n.1, p. 263-72, 2015.

CONNIZZO, B.K.; BHATT, P.R.; LIECHTY, K.W.; SOSLOWSKY, L.J. Diabetes Alters Mechanical Properties and Collagen Fiber Re-Alignment in Multiple Mouse Tendons. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 42, n. 9, p. 1880–8, 2014.

COOK, J.L.; PURDAM, C.R. Is tendon pathology a continuum? A pathology model to explain the clinical presentation of load-induced tendinopathy. **British Journal of Sports Medicine**, n. 43, p. 409–416, 2009.

CORPS, A.N.; ROBINSON, A.H.; MOVIN, T.; COSTA, M.L.; HAZLEMAN, B.L.; RILEY, G.P. Increased expression of aggrecan and biglycan mRNA in Achilles tendinopathy. **Rheumatology**, v.45, p. 291–294. 2006.

DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Sociedade Brasileira de Diabetes**, 2008.

DE OLIVEIRA, RR; LEMOS, A; DE CASTRO SILVEIRA, PV; DA SILVA, RJ; DE MORAES SR. Alterations of tendons in patients with diabetes mellitus: a systematic review. **Diabetes Medicine**. v. 28, n. 8, p. 886-95, 2011.

DE OLIVEIRA, R.R.; BEZERRA, M.A.; DE LIRA, K.D.S.; NOVAES, K.A.; TEIXEIRA, M.F.H.B.I.; CHAVES, C.C.; MORAES, S.R.A. **Journal of Diabetes and Its Complications**, v. 26, n.3, p.163–168, 2012.

DELFINO, V.D.A.; FIGUEIREDO, J.F.; MATSUO, T.; FAVERO, M.E.; MATNI, A.M.; MOCELIN, A.J. Diabetes mellitus induzido por estreptozotocina: comparação em longo prazo entre duas vias de administração. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 24, n. 1, p. 31-6, 2002.

DOYLE, A.T.; LAUBER, C.; SABINE, K. The Effects of Low-Level Laser Therapy on Pain Associated With Tendinopathy: A Critically Appraised Topic. **Journal of Sport Rehabilitation**, v.25, p. 83-90, 2016.

FARIVAR, S.; MALEKSHAHABI, T.; SHIARI, R. Biological effects of Low-Level Laser Therapy. **Journal of Lasers in Medical Sciences**, v. 5, n.2, p. 58-62, 2014.

FELICE, E.D. Shedding light: Laser physics and mechanism of action. **Phlebology**, v. 25, n. 1, p.11-28, 2010.

FOX, A.J.S.; BEDI, A.; DENG, X.H.; YING, L.; HARRIS, P.E.; WARREN, R.F.; RODEO, S.A. Diabetes Mellitus Alters the Mechanical Properties of the Native Tendon in an Experimental Rat Model. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 29, p. 880–5, 2011.

GORDON, J.A.; FREEDMAN, B.R.; ZUSKOV, A.; IOZZO, R.V.; BIRK, D.E.; SOSLOWSKY, L.J.; Achilles tendons from decorin- and biglycan-null mouse models have inferior mechanical and structural properties predicted by an image-based empirical damage model. **Journal of Biomechanics**, v. 48, p. 2110–5, 2015.

GOYAL, S.N.; REDDY, N.M.; PATIL, K.R.; KARTIK, T.; NAKHATE, K.T.; OJHA, S.; PATIL, C.R.; AGRAWAL, Y.O. Challenges and issues with streptozotocin-induced diabetes – A clinically relevant animal model to understand the diabetes pathogenesis and evaluate therapeutics. **Chemico-Biological Interactions**, v. 244, p. 49-63, 2016.

GUERRA, F.R; VIEIRA, C.P.; OLIVEIRA, L.P.; MARQUES, P.P.; ALMEIDA, M.S.; PIMENTEL, E.R. Low-level laser therapy modulates pro-inflammatory cytokines after partial tenotomy. **Lasers Medicine Science**, v.31, n.4, p. 759-66, 2016.

HAMBLIN, M.R. Mechanisms for Low-Level Light Therapy. **Proceedings of SPIE**, v. 6140, 2006

HASLERUD, S.; MAGNUSSEN, L.H.; JOENSEN, J.; LOPES-MARTINS, R.A.B.; BJORDAL, J.M. The Efficacy of Low-Level Laser Therapy for Shoulder Tendinopathy: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. **Physiotherapy Research International**, v.20, n.2, p. 108-25, 2015.

HAYEM, G. Tenology: a new frontier. **Joint Bone Spine**, n. 68, p. 19-25, 2001.

ISER, B.P.M.; STOPA, S.R.; CHUELRL, P.S.; SZWARCOWALD, C.L.; MALTA, D.C.; MONTEIRO, H.O.C.; DUNCAN, B.B.; SCHMIDT, M.I. Self-reported diabetes prevalence in Brazil: results from National Health Survey 2013. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 24, n. 2, p. 305-314, 2015.

JESUS, J.F.; SPADACCI-MORENA, D.D.; RABELO, N.D.A.; PINFILDI, C.E.; FUKUDA, T.Y.; PLAPLER, H. Low-Level Laser Therapy on Tissue Repair of Partially

Injured Achilles Tendon in Rats. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.32, n.6, p. 1-6, 2014.

JUNG, H-J; FISHER, M.B.; WOO, S.L-Y. Role of biomechanics in the understanding of normal, injured, and healing ligaments and tendons. **Sports Medicine, Arthroscopy, Rehabilitation, Therapy & Technology**, v. 1, n. 9, 2009.

KANNUS, P. Structure of the tendon connective tissue. **Scandinavian Journal Medicine Science Sports**, v. 10, p. 312-20, 2000.

KARU, T.I.; KOLYAROV, S.V, Exact action Spectra for cellular responses relevant to Phototherapy. **Photomedicine and Laser**, v.23, n.4, p. 355-61, 2005.

KING, A.J.F. The use of animal models in diabetes research. **British Journal of Pharmacology**, v. 166, p. 877–894, 2012.

KITCHEN, S. Eletroterapia: Prática Baseada em Evidências. 2ª Edição. **Editora Manole**: São Paulo, 2003.

KJAER, M. Role of Extracellular Matrix in Adaptation of Tendon and Skeletal Muscle to Mechanical Loading. **Physiological Reviews**, v.84, p. 649-98, 2004.

KOESTER, M.; GEORGE, M.; KUHN, J. Shoulder impingement syndrome. **The American Journal of Medicine**, v. 118, n. 5, p. 452-455, 2005.

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

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, v. 51, p. 216-226, 2008.

LOPES-MARTINS, R.A.B. Tendinitis, an open avenue for low-level laser therapy. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.32, n.7, p. 369-70, 2014.

MAFFULLI, N.; KHAN, K.M.; PUDDU, G. Overuse Tendon Conditions: Time to Change a Confusing Terminology. Arthroscopy: **The Journal of Arthroscopic and Related Surgery**, v.14, n. 8, p. 840–843, 1998.

MAFFULLI, N.; RENSTROM, P.; LEADBETTER, W.B. Tendon Injuries: Basic science and clinical medicine. **Springer Ed.** 2004.

MAIMAM, T. Stimulated optical radiation in Ruby. **Nature**, v. 180, p. 493-94, 1960.

MALLIARAS, P.; COOK, J.L.; KENT, P. Reduced ankle dorsiflexion range may increase the risk of patellar tendon injury among volleyball players. **Journal of Science and Medicine in Sport**, v. 9, p. 304-309, 2006.

MARCOS, R.L.; LEAL-JUNIOR, E.C.; ARNOLD, G.; MAGNET, V.; RAHOUADJ, R.; WANG, X.; DEMEURIE, F.; MAGDALOU, J.; DE CARVALHO, M.H.; LOPES-MARTINS, R.Á. Low-level laser therapy in collagenase-induced Achilles tendinitis in rats: analyses of biochemical and biomechanical aspects. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 30, n. 12, p. 1945-51, 2012.

MARQUES, A.C.F.; ALBERTINI, R.; SERRA, A.J.; SILVA, E.A.P.; OLIVEIRA, V.L.C.; SILVA, L.M.; LEAL-JUNIOR, E.C.P.; CARVALHO, P.T.C. Photobiomodulation therapy on collagen type I and III, vascular endothelial growth factor, and metalloproteinase in experimentally induced tendinopathy in aged rats. **Lasers Medicine Science**, v.31, n.9, p.1915-23, 2016

MESTER, E.; SZENDE, B.; GARTNER, P. The effect of laser beams on the growth of hair in mice, **Radiobiology in Radiotherapy** v.9, p. 621-6, 1968.

MORAES, S.A.; FREITAS, I.C.M.; GIMENO, S.G.A.; MONDINI, L. Prevalência de diabetes mellitus e identificação de fatores associados em adultos residentes em área urbana de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, 2006: Projeto OBEDIARP. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 26, n. 5, p. 929-94, 2010.

MÜLLER, S.S.; SILVARES, P.R.A.; PEREIRA, H.R.; SILVA, M.A.M.; SARDENBERG, T.; LEIVAS, T.P. Análise comparativa das propriedades mecânicas do ligamento da patela e do tendão calcâneo. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 12, n. 3, p. 134-40, 2004.

NOURUZIAN, M.; ALIDOUST, M.; BAYAT, M.; BAYAT, M.; AKBARI, M. Effect of low-level laser therapy on healing of tenotomized Achilles tendon in streptozotocin-induced diabetic rats. **Lasers Medicine Science**, v. 28, p. 399–405, 2013.

OLIVA, F.; PICCIRILLI, E.; BERARDI, A.C.; FRIZZIERO, A.; TARANTINO, U.; MAFFULLI, N. Hormones and tendinopathies: the current evidence. **British Medical Bulletin**. v. 117, n. 1, p. 39-58, 2016.

OLIVEIRA, R.R.; LIRA, K.D.S.; SILVEIRA, P.V.C.; COUTINHO, M.P.G.; MEDEIROS, M.N.; TEIXEIRA, M.F.H.B.I.; MORAES, S.R.A. Mechanical Properties of Achilles Tendon in Rats Induced to Experimental Diabetes. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 39, n. 5, p. 1528-34, 2011.

OLIVEIRA, R.R.; MARTINS, C.S.; ROCHA, Y.R.; BRAGA, A.B.R.; MATTOS, R.M., HECHT, F.; BRITO, G.A.C.; NASCIUTTI, L.E. Experimental Diabetes Induces Structural, Inflammatory and Vascular Changes of Achilles Tendons, **PLoS ONE**, v. 8, n. 10: e74942., 2013.

OHSHIRO, T.; CALDERHEAD, R.G. The terminology of laser therapy. **Laser Therapy**, v.1, p.1, 1988.

RADENKOVIĆ, M.; STOJANOVIĆ, M.; PROSTRAN, M. Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 78, p. 13–31, 2016.

RALEIGH, S.M.; VAN DER MERWE, L.; RIBBANS, W.J.; SMITH, R.K.; SCHWELLNUS, M.P.; COLLINS, M. Variants within the MMP3 gene are associated with Achilles tendinopathy: possible interaction with the COL5A1 gene. **British Journal of Sports Medicine**, v. 43, n. 7, p. 514-520, 2009.

RANGE, T.A.; WONG, A.M.Y.; COOK, J.L.; GAIDA, J.E. Is there an association between tendinopathy and diabetes mellitus? A systematic review with meta-analysis. **British Journal of Sports Medicine**, v. 50, n. 16, p. 982-9, 2016.

RECHARDT, M.; SHIRI, R.; KARPPINEN, J.; JULA, A.; HELIÖVAARA, M.; VIKARI-JUNTURA, E. Lifestyle and metabolic factors in relation to shoulder pain and rotator cuff tendinitis: a population-based study. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 11, n.165, 2010.

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

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

REES, D.A.; ALCOLADO, J.C. Animal models of diabetes mellitus. **Diabetic Medicine**, v. 22, p. 359–370, 2005.

REES, S.G.; DENT, C.M.; CATERSON, B. Metabolism of proteoglycans in tendon. *Scand J Med Sci Sports*, v. 19, p. 470–478, 2009.

ROBINSON, P.S.; HUANG, T.F.; KAZAM, E.; IOZZO, R.V.; BIRK, D.E.; SOSLOWSKY, L.J. Influence of decorin and biglycan on mechanical properties of multiple tendons in knockout mice. **Journal of Biomechanical Engineering**, v. 127, n.1, p.181-5, 2005.

ROGLIC, G; UNWIN, N; BENNETT, PH; MATHERS, C; TUOMILEHTO, J; NAG, S; CONNOLLY, V; HILARY KING, H. The Burden of Mortality Attributable to Diabetes. **Diabetes Care**, V. 28, n. 9, p. 2130-5, 2005

ROLIM, L.C.; AS, J.R.; CHACRA, A.R.; DIB, S.A. Heterogeneidade clínica e coexistência das neuropatias diabéticas: diferenças e semelhanças entre diabetes melito tipos 1 e 2. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 53, n. 7, p. 818-824, 2009.

SACKS et al., Gluidelines and recommendations fo laboratory analysis in the diagnosis and management os diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v.34, p. e34-e99, 2011.

SILVEIRA, A.C.M. e NERY, C.A.S. Estudo macroscópico e morfométrico do tendão do músculo tibial posterior. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 34, nº 8, pag. 475-480, 1999.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2014-2015. Sao Paulo: **AC Farmaceutica**, 2015.

TAFUR, J.; MILLS, P.J. Low-Intensity Light Therapy: Exploring the role of redox mechanisms. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.26, n.4, p. 323-28, 2008.

TEUNIS, T.; LUBBERTS, B.; REILLY, B.T.; RING, D. A systematic review and pooled analysis of the prevalence of rotator cuff disease with increasing age. **Journal of Shoulder and Elbow Surgery**, v. 23, p. 1913-192, 2014.

THORPE, C.T.; BIRCH, H.L.; CLEGG, P.D.; SCREEN, H.R.C. The role of the non-collagenous matrix in tendon function. **Internacional Journal of Experimental Pathology**, v. 94, p. 248–259, 2013.

TUMILTY, S.; MUNN, J.; MCDONOUGH, S.; HURLEY, D.A.; BASFORD, J.R.; BAXTER, G.D. Low level laser treatment of tendinopathy: a systematic review with meta-analysis. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 28, n. 1, p. 3-16, 2010.

TURK, Z.; MISUR, I.; TURK, N.; BENKO, B. Rat tissue collagen modified by advanced glycation: correlation with duration of diabetes and glycemic control. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 37, n. 8, p. 813-20, 1999.

VIEIRA, C.P.; de ARO, A.A.; de ALMEIDA, M.S.; de MELLO, G.C.; ANTUNES, E.; PIMENTEL, E.R. Effects of acute inflammation induced in the rat paw on the deep digital flexor tendon. **Connective Tissue Research**, v.53, n.2, p. 160-68, 2012.

WALDECKER, U.; HOFMANN, G.; DREWITZ, S. Epidemiologic investigation of 1394 feet: Coincidence of hindfoot malalignment and Achilles tendon disorders. **Foot and Ankle Surgery**, v. 18, p. 119–123, 2012.

WANG, J.H.C. Mechanobiology of tendon. **Journal of Biomechanics**, v. 39, n. 9, p. 1563–1582, 2006.

WHITING, D.R.; GUARIQUATA, L.; WEIL, C.; SHAW, J. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of the prevalence of Diabetes for 2011 and 2030. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 29, n.3, p. 311-21, 2011.

WHO – World Health Organization. Use of glycated haemoglobin (HbA1c) in diagnosis of diabetes mellitus. Disponível em: www.who.int/diabetes/publications/report.hba1c_2011.pdf, 2014 (Acesso em: 08/05/2016).

WOOD, V.T.; PINFILDI, C.E.; NEVES, M.A.; PARIZOTO, N.A.; HOCHMAN, B.; FERREIRA, L.M. Collagen changes and realignment induced by low-level laser therapy and low-intensity ultrasound in the calcaneal tendon. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 42, n. 6, p. 559-65, 2010.

WALT - WORLD ASSOCIATION OF LASER THERAPY. Consensus Agreement on the Design and Conduct of Clinical Studies with Low-Level Laser Therapy and Light Therapy for Musculoskeletal Pain and Disorders. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 24, n.6, p. 761-2, 2006.

YAMAGISHI, S. Role of advanced glycation end products (AGEs) and receptor for AGEs (RAGE) in vascular damage in diabetes. **Experimental Gerontology**, v.46, n.4, p. 217-24, 2011.

YAMAGISHI, S.; MATSUI, T. Advanced glycation end products (AGEs), oxidative stress and diabetic retinopathy. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v.12, p. 362-68, 2011.

ANEXO A – Parecer da comissão de ética

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



Recife, 10 de julho de 2013.

Ofício nº 597/13

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof Silvia Regina Arruda de Moraes**
Departamento de Anatomia- CCB
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.021333/2013-17

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, **“Análise do estadiamento da tendinopati diabética experimental e do efeito biomodulador do laser de baixa intensidade sobre o reestabelecimento das propriedades biomcânicas e estruturais do tendão calcâneo de ratos”**.

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

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

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

Origem dos animais: biotério do Departamento de Nutrição/UFPE; Animais: ratos;; Idade: 100 dias; Peso: 250 a 350g; Sexo: machos; Nº total de animais: 120.

Atenciosamente,

 Profª Tania Rieger
Presidente do CEUA/CCB-UFPE
SIAPE 2306924

CCB: Integrar para desenvolver

ANEXO B - Comprovação de submissão do Artigo 1

Muscles, Ligaments and Tendons Journal: Submitted article MLTJ-2017-03735 Entrada x  

 **Muscles, Ligaments and Tendons Journal** 13:54 (Há 1 minuto)   
para mim 

 inglês ▾ > português ▾ [Traduzir mensagem](#) [Desativar para: inglês](#) x

Submitted article **Diabetic tendinopathy: when does tendon fragility occur?**

Thank you for having submitted your article

You can follow the revision process form the 'Submissions Being Processed' list.

We'll contact you as soon as we have news.

Best wishes

Muscles, Ligaments and Tendons Journal

author.mltj.org

ANEXO C – Comprovação de submissão do Artigo 2

Successfully received: submission LASERTHERAPY (810NM) WAS NOT ENOUGH TO REDUCE THE COMPLICATIONS OF DIABETIC TENDINOPATHY for Journal of Diabetes and Its Complications  

 **Journal of Diabetes and Its Complications** <Evisesupport@elsevier.com> 14:37 (Há 0 minutos) ☆  

para mim 

 inglês ▾ > português ▾ [Traduzir mensagem](#) [Desativar para: inglês](#) x

This message was sent automatically. Please do not reply.

Ref: JDC_2017_865
Title: LASERTHERAPY (810NM) WAS NOT ENOUGH TO REDUCE THE COMPLICATIONS OF DIABETIC TENDINOPATHY
Journal: Journal of Diabetes and Its Complications

Dear Dr. Bezerra,

Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in Journal of Diabetes and Its Complications. Your submission was received in good order.

To track the status of your manuscript, please log into EVISEs at: <http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.ispx?JRNLAACR=JDC> and locate your submission under the header 'My Submissions with Journal' on your 'My Author Tasks' view.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Journal of Diabetes and Its Complications

Have questions or need assistance?
For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISEs via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

Copyright © 2017 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No. 33156677.