



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida por MARCELO RENATO GUERINO e aprovada pela Comissão Julgada em 19 / 06 / 2001.
Orientador

[Handwritten signature]
Orientador

2001-7800

Efeitos da fotoestimulação com laser no processo inflamatório crônico da cartilagem articular

Marcelo Renato Guerino

Tese apresentada na Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do Título de Doutor em Engenharia Elétrica

Orientador: Prof. Dr. Vítor Baranauskas

Banca Examinadora:

- Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto
- Prof. Dr. Antonio Bucalon
- Prof. Dr. Ioshiaki Dói
- Prof. Dr. Sergio Mülhen
- Prof. Dr. Steven Frederick Durrant
- Prof. Dr. Vítor Baranauskas

[Handwritten signatures of the examiners]

Departamento de Semicondutores, Instrumentos e Fotônica
Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação
Universidade Estadual de Campinas
2001

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA	T/ UNICAMP
	G936e
V.	Ex.
IMP.	47777
PREV.	837/02
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREC.º	R\$ 11,00
DATA	14-02-02
N.º CPD	

CM00163476-1

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

G936e Guerino, Marcelo Renato.
Efeitos da fotoestimulação com laser no processo
inflamatório crônico da cartilagem articular / Marcelo
Renato Guerino. --Campinas, SP: [s.n.], 2001.

Orientador: Vítor Baranauskas.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação.

1. Artrite. 2. Lasers na medicina. 3. Inflamação. 4.
Cartilagem. I. Baranauskas, Vítor. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Elétrica e
de Computação. III. Título.

À DEUS...

...“Posso todas as coisas naquele que me fortalece”.

Filipenses 4:13

Aos meus pais, Antonio e Ana Maria pela dedicação e amor com que sempre participaram da minha formação, sendo os melhores pais do mundo. Às minhas irmãs Patricia pelo incentivo e Adriane pela imensa competência e auxílio na realização das imagens de microscopia eletrônica de varredura, com os quais desfruto de mais um momento feliz...

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço

ao meu orientador, Prof. Dr. Vitor Baranauskas, que me acolheu no laboratório do DSIF para a realização desta tese, que proporcionou condições para o desenvolvimento dos meus ideais e realização deste projeto;

ao Prof. Dr. Nivaldo Parizotto, do Depto. de Fisioterapia da UFSCAR – São Carlos sem o qual o caminho deste trabalho não seria encontrado, pelo apoio, ensinamentos transmitidos e pelas sugestões dadas no decorrer deste trabalho;

a Prof. Dra. Eliete Luciano, a qual permitiu a realização do experimento no Laboratório de Biodinâmica do Depto. de Ed. Física do IB - UNESP – Rio Claro, pelo positivismo, interesse, além de brindar-me com sua amizade;

ao Prof. Dr. Antonio Bucallon e a BIOSET – Industria de Tecnologia Eletrônica Ltda, pelo suporte técnico e científico; pela competência assim como a boa amizade;

a Profa. Dra. Mônica Cota, do Depto. de Física IFGW – UNICAMP – Campinas, pelos ensinamentos na operação do microscópio de força atômica, que permitiu a realização das imagens fundamentais para a conclusão deste trabalho;

ao Prof. Dr. Hernandes F. Carvalho, do Depto. de Biologia Celular IB - UNICAMP – Campinas, pela disposição na realização das dosagens de hidroxiprolina, discussão e sugestões dadas;

ao Laboratório de Investigações Mecânicas LIM-41 do Instituto de Ortopedia e Traumatologia da USP, na pessoa do Engenheiro Cesar Augusto Martins Pereira pela competência e auxílio na realização dos testes mecânicos;

ao Dr. Alfredo Peterlevitz do DSIF – FEEC - UNICAMP – Campinas, que sem sua colaboração, eu nunca teria concluído minha prestação, e daí seria a maior confusão;

ao Prof. Dr. Antonio Carlos Anaruma, do Laboratório de Biodinâmica do Depto. de Ed. Física do IB - UNESP – Rio Claro, pelo auxílio e ensinamentos para a realização da microscopia eletrônica de varredura;

ao Prof. Dr. Steven F. Durrant do DSIF – FEEC - UNICAMP– Campinas, pela colaboração e desenvolvimento de publicações do trabalho;

aos colegas de DSIF em especial ao Helder J. Ceragioli, e ao Marcelo Tosin, bem como todos aqueles que participaram de alguma forma direta ou indiretamente neste trabalho;

a Profa. Dra. Mirian Ribeiro Campos do Depto. de Biologia da UNIMEP - Piracicaba pelo incentivo, pela amizade, pelo carinho e pela confiança da “Minha Deusa”;

à amiga Luciana e Auro Maluf, que me abrigaram em sua casa como hóspede permanente, pela confiança, minha eterna gratidão;

à amiga Raquel Brito, pela presteza nas necessidades burocráticas, além da imensa capacidade de compreender, pelos inúmeros conselhos e almoços eternizados em minha memória, e pelo privilégio de sua amizade;

à Haline Nobre Franco, pelo amor, carinho e compreensão da mulher da minha vida!

à FAPESP – Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro.

...a todos, o meu muito obrigado.

Resumo

Este trabalho apresenta os efeitos da radiação laser no processo de cura da inflamação induzida por injeção intra-articular de adjuvante de Freund incompleto na cartilagem articular do joelho de cobaias. A radiação dos animais foi feita a partir do quinto dia da indução, com doses de 0,5, 7,0 e 50 J/cm² (laser de HeNe) e de 1,0, 5,0 e 25,0 J/cm² (laser de GaAs). As cartilagens foram analisadas 7, 14 e 21 dias após a indução, através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Microscopia de Força Atômica (MFA), teor de hidroxiprolina e Testes Mecânicos (rigidez). A MEV mostrou evidências de melhor organização na reparação da cartilagem articular dos animais tratados com o lasers de HeNe e GaAs em relação aos animais inflamados sem tratamento. As doses mais eficientes foram: 7,0 J/cm² (HeNe) e: 1,0 J/cm² (GaAs). O tratamento de HeNe, na MFA pôde identificar uma melhor organização das moléculas de colágeno, formação de feixes mais espessos, melhor direcionalidade e maior agrupamento das fibrilas que indicam uma atuação positiva do laser sobre o colágeno. Em relação ao teor de hidroxiprolina, o laser de HeNe pareceu ter efeito excitatório nas doses maiores e inibitório nas doses menores. Os maiores aumentos no teor de hidroxiprolina foram encontrados com a dose de 50,0 J/cm² (HeNe). Entretanto o laser de GaAs produziu efeito inibidor no processo de síntese de colágeno em quase todas etapas. O teste de indentação mecânica demonstrou uma tendência a aumento da rigidez pelos lasers quando comparados aos animais inflamados sem tratamento. A dose mais adequada foi de 7,0 J/cm² com o laser de HeNe.

Palavras chaves: artrite, laser, inflamação, cartilagem

Abstract

This work presents the effects of laser irradiation on the curing process of inflammation induced in the articular cartilage of Guinea Pigs's knee. The inflammation was induced by intra-articular injection of incomplete Freund's Adjuvant. Irradiation of the animals was undertaken from the fifth day of induction, with doses of 0.5, 7.0 and 50 J/cm² (HeNe) and of 1.0, 5.0 and 25.0 J/cm² (GaAs). The cartilages were analysed at 7, 14 and 21 days after induction, Scanning Electron Microscopy (SEM), Atomic Force Microscopy (AFM), concentration of Hydroxyprolyne and Mechanical Tests (rigidity). SEM showed evidence of better organization in the repair of the articular cartilage of the animals treated with the HeNe and GaAs lasers in relation to the untreated animals. The most efficient doses were: 7.0 J/cm² (HeNe) and 1.0 J/cm² (GaAs). Following the laser treatment of HeNe, AFM better organization of the molecules of collagen, formation of thicker bunches, better direction and larger grouping of the fibrils, which indicate the positive effect of the laser on the collagen. In relation to the hydroxyprolyne concentration, the HeNe laser seemed to have a stimulating effect great doses and an inhibitory effect in smaller doses. The largest increases in the hydroxyprolyne concentration were found with the dose of 50.0 J/cm² (HeNe). However, the laser of GaAs produced an inhibitory effect the process of synthesis of collagen in almost all of stages. The mechanical indentation test, showed a tendency of increasing rigidity of the treated tissue, compared with the animals inflamed without treatment. The most effective dose was of 7.0 J/cm² (HeNe).

Keywords: arthritis, laser, inflammation, cartilage

CONTEÚDO

Capítulo I - Introdução à Tese	1
1.1. Preliminares sobre o Tema da Tese.....	1
1.2. Divisão dos Capítulos da Tese.....	3
1.3. Referências.....	3
Capítulo II - Processos decorrentes da inflamação na cartilagem articular	5
2.1. Considerações gerais sobre a cartilagem articular.....	5
2.2. Inflamação na cartilagem articular.....	9
2.3. O laser aplicado nos processos de reparo tecidual.....	15
2.4. Referências	19
Capítulo III - A hidroxiprolina e o colágeno na cartilagem articular	27
3.1. A hidroxiprolina e o colágeno.....	27
3.2. A hidroxiprolina em processos de artrite.....	29
3.3. Referências.....	32
Capítulo IV - Materiais e Métodos Utilizados	35
4.1. Introdução.....	35
4.2. Indução da artrite.....	36
4.3. Irradiação com laser.....	38
4.4. Análise bioquímica da dosagem de hidroxiprolina.....	39
4.5. Microscopia Eletrônica de Varredura.....	40
4.6. Microscopia de Força Atômica.....	40
4.7. Teste de resistência mecânica de compressão.....	41
4.8. Referências.....	42

Capítulo V - Resultados e discussões da microscopia eletrônica de varredura.....	46
5.1. Introdução.....	46
5.2. Grupo de controle (sem aplicação de laser) com cartilagem intacta e cartilagem com inflamação induzida.....	46
5.3. Grupos de animais que receberam a aplicação de Laser de HeNe.....	50
5.3.1. Grupo tratado com laser de HeNe na dose de 0,5 J/cm ²	50
5.3.2. Grupo tratado com laser de HeNe na dose de 7,0 J/cm ²	53
5.3.3. Grupo tratado com laser de HeNe na dose de 50 J/cm ²	56
5.4. Grupos de animais que receberam a aplicação de Laser de GaAs.....	58
5.4.1. Grupo tratado com laser de GaAs na dose de 1,0 J/cm ²	58
5.4.2. Grupo tratado com laser de GaAs na dose de 5,0 J/cm ²	61
5.4.3. Grupo tratado com laser de GaAs na dose de 25 J/cm ²	63
5.5. Conclusões.....	66
5.6. Referências.....	66
Capítulo VI - Resultados e discussões da microscopia de força atômica.....	73
6.1. Introdução.....	73
6.2. Resultados e Discussão.....	75
6.2.1. Grupos de controle sem inflamação.....	75
6.2.2. Grupos de controle com inflamação e sem aplicação de laser.....	76
6.2.3. Grupos de animais inflamados e com a aplicação de laser de HeNe.....	80
6.2.4. Grupos de animais inflamados e com a aplicação de laser de GaAs.....	89
6.3. Conclusões.....	98
6.4. Referências.....	99
Capítulo VII - Resultados da dosagem de hidroxiprolina nos animais submetidos à aplicação de lasers.....	104
7.1. Preliminares.....	104
7.2. Resultados e Discussões.....	104

7.2.1 Grupo de controle sem inflamação e grupo de controle inflamado mas sem aplicação de laser.....	104
7.2.2 Grupo com aplicação de laser de HeNe.....	107
7.2.3 Grupo com aplicação de laser de GaAs.....	111
7.3. Conclusões.....	115
7.4. Referências.....	116
Capítulo VIII - Resultados e discussão das análises biomecânicas.....	118
8.1. Introdução.....	118
8.2. Resultados e Discussões.....	121
8.3. Grupos de controle sem inflamação e, Grupos de controle com inflamação e sem aplicação de laser.....	121
8.4. Grupo com inflamação induzida e com aplicação de laser de HeNe.....	123
8.5. Grupo com inflamação induzida e com aplicação de laser de GaAs.....	127
8.6. Conclusões.....	130
8.7. Referências.....	131
Capítulo IX – Considerações Finais.....	134

Capítulo I

Introdução à Tese

1.1. Preliminares sobre o Tema da Tese

Os efeitos da radiação laser de baixa potência tem sido considerados terapeuticamente benéficos em vários tecidos biológicos, principalmente nas disfunções reumáticas como a artrite reumatóide, osteoartrite, periartrite e outras condições degenerativas. A osteoartrite é a doença mais comum no âmbito reumatológico e pode ser definida como uma condição degenerativa que afeta articulações sinoviais. A prevalência aumenta com a idade do indivíduo, mas a destruição da cartilagem articular pode ser iniciada por múltiplos fatores [1, 2], incluindo os fatores ocupacionais como a sustentação do peso corporal, os traumas e as atividades recreacionais [3].

Podem ocorrer grandes alterações na estrutura da cartilagem articular, como microfraturas, esclerose no osso subcondral e o desenvolvimento de osteófitos nas bordas articulares [4]. Estas alterações são associadas com o quadro clínico de dor e rigidez articulares. O quadro doloroso produzido pela degeneração da cartilagem e as alterações secundárias musculares, tendinosas e ligamentares são os maiores responsáveis pelas incapacidades funcionais [5].

Atualmente tem sido estudado algum mecanismo de interação do laser no processo de reparo tecidual, visando estimular, por exemplo, a produção de colágeno, efeitos antiinflamatórios, aumento da microcirculação local, e alívio de dor [6]. Experiências sobre os efeitos da terapia de laser de HeNe (dose de 8 J/cm^2 e comprimento de onda de 632,8 nm) e laser infravermelho (dose de 8 J/cm^2 e comprimento de onda de 904 nm) na inflamação articular de coelhos demonstraram ação antiinflamatória na cartilagem hialina e na fibrocartilagem, com aceleração do processo de regeneração articular [7]. A ação bio-

estimulante do laser na consistência e integridade da superfície da cartilagem articular também foi verificada através de testes de indentação, após longos períodos de imobilização articular [8]. Foi observado que o tratamento laser minimizou as mudanças biomecânicas produzidas pela imobilização na superfície da cartilagem.

Observando os efeitos da energia laser de baixa potência na membrana sinovial de pacientes com artrite reumatóide de joelho, Amano e colaboradores [9] verificaram uma maior mobilidade das células inflamatórias, do local inflamado, em indivíduos tratados com laser de arseneto de gálio-alumínio após 6 dias de tratamento. Os efeitos produzidos pela radiação laser parecem estar diretamente relacionado com o comprimento de onda, dose de exposição e espessura da cartilagem irradiada [10].

Os trabalhos realizados pela aplicação do laser no tratamento dos processos inflamatórios têm sido bastante promissores. Normalmente os resultados clínicos da terapia com laser encontrados na literatura referem-se aos sintomas de alívio de dor, aos efeitos antiinflamatórios e de cicatrização, que aceleram o processo de reparo. Entretanto os estudos clínicos e de modelos experimentais da terapia laser ainda são escassos [11], principalmente no que se refere aos prováveis mecanismos da ação do laser na recuperação da artrite degenerativa em cartilagens articulares.

Nesta tese realizamos um trabalho experimental para obter resultados sobre os possíveis efeitos da ação da radiação laser nos processos de regeneração tecidual da cartilagem articular inflamada. O estudo foi realizado utilizando-se *Guinea Pigs* como animais experimentais e as radiações foram aplicadas com lasers de HeNe (Hélio-Neônio) e de GaAs (Arseneto de Gálio), de baixa potência. A pesquisa analisou aspectos bioquímicos, morfológicos (microscopia eletrônica de varredura e microscopia de força atômica) com diferentes tempos de evolução e com diferentes doses. Estudamos também a ação das forças compressivas sobre a cartilagem articular através da aplicação de testes mecânicos de resistência.

As doses utilizadas em neste trabalho promoveram uma alteração na proliferação das células inflamatórias no tecido lesado, além de evidentes diferenças estruturais, em comparação com os animais que não receberam a terapia. Foram observadas alterações significativas no teor de hidroxiprolina, o que é consistente com o aumento de colágeno na superfície da lesão, além de alterações na rigidez da superfície da cartilagem articular.

1.2. Divisão dos Capítulos da Tese

Esta Tese teve como objetivo apresentar e discutir os resultados experimentais obtidos em nosso estudo dos efeitos do laser no processo inflamatório da cartilagem articular. Foi organizada em oito capítulos, sendo este (Capítulo I) o de Introdução.

O Capítulo II apresenta a descrição biológica da cartilagem articular, incluindo sua fisiologia, integridade e descrição de como o processo inflamatório atua na destruição da cartilagem. Discute-se como a deformidade progressiva e a perda da função provocada pela inflamação crônica articular tem sido abordada e tratada. Apresenta-se um resumo dos possíveis mecanismos de interação do laser com os tecidos vivos.

O Capítulo III focaliza as funções da hidroxiprolina na síntese do colágeno da cartilagem articular e também as alterações produzidas pelos processos degenerativos da cartilagem.

O Capítulo IV descreve os materiais e métodos de análise utilizados para o desenvolvimento deste trabalho, como a indução da inflamação, o tratamento com laser, os sacrifícios dos animais, a descrição da dosagem da hidroxiprolina, a microscopia eletrônica de varredura, a microscopia de força atômica e os testes biomecânicos.

Os resultados morfológicos observados na cartilagem devido ao tratamento da inflamação articular com lasers de HeNe e GaAs são discutidos no Capítulo V (microscopia eletrônica de varredura) e Capítulo VI (microscopia de força atômica). Os resultados da dosagem de hidroxiprolina e dos testes biomecânicos de resistência mecânica à compressão são apresentados nos Capítulos VII e VIII, respectivamente.

Finalmente, no Capítulo IX apresentamos nossas considerações finais.

1.3. Referências

[1] TANAKA, S., HAMANISHI, C., KIKUCHI, H., FUKUDA, K., Factors related to degradation of articular cartilage in osteoarthritis: A review. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, v.27 (6), p.392-399, 1998.

[2] CHIKANZA, I.C., FERNANDES, L. Novel strategies for the treatment of osteoarthritis. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, v.9 (7), p.1499-1510, 2000.

- [3] NUKI, G. Osteoarthritis: a problem of joint failure. *Zeitschrift fur Rheumatologie*, v.58 (3), p.142-147, 1999.
- [4] SETTON, L.A., ELLIOT, D.M., MOW, V.C. Altered mechanics of cartilage with osteoarthritis: human osteoarthritis and an experimental model of joint degeneration. *Osteoarthritis and Cartilage*, v.7 (1), p.2-14, 1999.
- [5] AROKOSKI, J.P.A., JURVELIN, J.S., VAATAINEM, U., HELMINEN, H.J. Normal and pathological adaptations of articular cartilage to joint loading. *Scandinavian Journal of Medicine & Science Sports*, v.10 (4), p.186-198, 2000.
- [6] REDDY, G.K., STEHNO-BITTEL, L., ENWEMEKA, C.S. Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit achilles tendons. *Lasers in Surgery and Medicine*, v.22 (5), p.281-287, 1998.
- [7] CALATRAVA, L.R., VALENZUELA, S.J.M., GOMEZ-VILLAMANDOS, R.J., REDONDO, J.L., GOMEZ-VILLAMANDOS, J.C., JURADO, A.I. Histological and clinical responses of articular cartilage to low-level laser therapy: Experimental study. *Lasers in Medical Science*, v.12 (2), p.117-121, 1997.
- [8] AKAI, M., USUBA, M., MAESHIMA, T., SHIRASAKI, Y., YASUOKA, S. Laser's effect on bone and cartilage change induced by joint immobilization: an experiment with animal model. *Lasers in Surgery and Medicine*, v.21 (5), p.480-484, 1997.
- [9] AMANO, A., MIYAGI, K., AZUMA, T., ISHIHARA, Y., KATSUBE, S., AOYAMA, I., SAITO, I. Histological studies on the rheumatoid synovial membrane irradiated with a low energy laser, *Lasers in Surgery and Medicine*, v.15, v.290-294, 1994.
- [10] SOBOL, E.N., KITAI, M.S., JONES, N., SVIRIDOV, A.P., MILNER, T., WONG, B.J.F. Heating and structural alterations in cartilage under laser radiation. *IEEE Journal of Quantum Electronics*, v.35 (4), p.532-539, 1999.
- [11] KLEBANOV, G.I., TESELKIN, Y.O., BABENKOVA, I.V., BASHKUJEVA, T.Y., CHICHUK, T.V., VLADIMIROV, Y.A. Low-power laser irradiation induces leukocyte priming. *General Physiology and Biophysics*, v.17 (4), p.365-376, 1998.

Capítulo II

Processos decorrentes da inflamação na cartilagem articular

2.1. Considerações gerais sobre a cartilagem articular

A cartilagem que reveste as extremidades articulares dos ossos é uma forma altamente especializada de tecido conjuntivo que tem consistência rígida, embora seja menos rígida do que o tecido ósseo. Sua superfície é ligeiramente elástica e muito lisa, facilitando os deslizamentos, além de desempenhar a função de suporte mecânico. A cartilagem articular também é essencial para a formação e o crescimento dos ossos longos [1, 2].

A cartilagem possui características bioquímicas e biofísicas singulares, bem adaptadas às suas funções fisiológicas, atuando como superfície amortecedora de choques e de apoio mecânico em articulações móveis [1]. As propriedades do tecido cartilaginoso dependem da estrutura da matriz do tecido, a qual é constituída por colágeno ou colágeno mais elastina, em associação com macromoléculas de proteoglicanos. A função das células que a compõem é produzir a matriz e mantê-la em estado normal, com renovação constante, embora muito lenta, e por isso a morte rápida das células pode levar à degeneração da matriz [1, 3].

Em seu estado normal, a cartilagem consiste de aproximadamente 70 % de água e o restante é aproximadamente dividido em partes iguais entre a substância fundamental e o colágeno. Os constituintes secundários incluem os condrócitos e as enzimas. Metade do peso seco da cartilagem hialina é composto de colágeno, ao passo que a outra parte é de polissacarídeos e de proteínas fixadas. Como o colágeno e a elastina são flexíveis, a consistência firme das cartilagens se deve às ligações eletrostáticas entre os

glicosaminoglicanos dos proteoglicanos e o colágeno, e a quantidade de moléculas de água presa aos glicosaminoglicanos [1-3].

Embora vasos sangüíneos estejam presentes, a cartilagem é essencialmente um tecido avascular e não há capilares intracartilaginosos que possam direcionar o suprimento nutricional para este tecido. Os metabólitos são transportados através do processo de difusão do líquido sinovial, em ambiente com pouca concentração de oxigênio. Estudos radiográficos mostram que a cartilagem da epífise imatura de crescimento ósseo recebe nutrientes do líquido sinovial como também dos vasos subcondrais [2, 3]. Quando a placa de crescimento epifisário é fechada, o líquido sinovial parece ser a única fonte de nutrição, sendo a difusão através da cartilagem reforçada pelo movimento articular. A manutenção da integridade estrutural superficial é essencial para a função de suporte de carga da cartilagem articular [4]. A substância fundamental da cartilagem é composta de polissacarídeos protéicos (PPSs, proteoglicanos) os quais possuem um núcleo protéico e uma cadeia polipeptídica, cuja composição em aminoácidos é variável e ampla. Existem também várias cadeias de sulfato de condroitina e sulfato de querantan, que se unem covalentemente com o núcleo protéico [5, 6]. Os proteoglicanos são macromoléculas constituídas de muitas cadeias polissacarídeas (GAGs) as quais possuem o papel fundamental de manutenção da consistência firme das cartilagens [2].

Na cartilagem, os proteoglicanos ocupam espaços entre uma rede emaranhada de fibrilas colágenas, sendo que a maioria desses proteoglicanos não está agregada covalentemente. Aproximadamente de 10 a 30 moléculas de proteoglicanos são unidas, através de uma glicoproteína, com cada cadeia de ácido hialurônico para produzir uma hipermolécula de cartilagem [7]. Esse agregado de proteoglicanos desempenha funções significantes na cartilagem como, por exemplo, estabilidade, definição de volume, e propriedades compressivas da matriz [2].

Como as cadeias moleculares dos agregados apresentam carga negativa elevada, ocorre repulsão mútua entre elas, tornando-as distribuídas sobre um grande domínio, limitado por uma rede relativamente rígida de fibras colágenas [3]. Aproximadamente um terço dos proteoglicanos está firmemente unido às fibrilas colágenas. Estudos relatam que a síntese dos proteoglicanos continua durante toda a vida [2]. Já a biossíntese é iniciada no

citoplasma do condroblasto ou condrócito e é transportada para completar-se fora da célula [8].

Segundo Harab e Mourão [9] em torno dos condrócitos existem zonas ricas em proteoglicanos e pobres em colágeno. Os proteoglicanos ligam-se quimicamente ao colágeno e esta associação é responsável pela resistência da cartilagem às pressões, que depende principalmente da interação entre o colágeno e os proteoglicanos, através das ligações entre os grupos sulfato dos glicosaminoglicanos e os grupos básicos de colágeno, além da intensa hidrofília dos glicosaminoglicanos. O alto teor de água ligada nos grupamentos negativos dos glicosaminoglicanos atua como uma mola biomecânica, amortecendo choques, o que é de grande importância funcional, especialmente em cartilagens articulares.

As fibras colágenas podem ser facilmente re-orientadas através das forças aplicadas nas superfícies articulares [10]. Sabe-se também [9] que a concentração total dos glicosaminoglicanos por unidade de peso seco de cartilagem, varia com a idade do indivíduo ou animal.

Todo terceiro aminoácido na cadeia polipeptídica do colágeno é glicina e, portanto, o colágeno pode ser considerado um polímero de unidades tri-peptídicas, cada uma das quais tendo a fórmula Gli-X-Y onde o aminoácido na posição X é freqüentemente a prolina e o terceiro aminoácido na posição Y é com freqüência a hidroxiprolina [1, 8, 9].

A formação da fibra do colágeno é complexa, e modificações em qualquer fase da síntese podem ser decorrentes de vários fatores, sendo com freqüência, determinada por fatores genéticos [11]. Estudos estruturais na cartilagem articular de bovinos verificaram uma alta especificidade nas interações individuais nas cadeias α dos colágenos do tipo IX e XI, que fazem uma proteólise seletiva como modulador potencial da arquitetura da cadeia de colágeno e não apenas pontes cruzadas do colágeno tipo II, com orientação anti-paralela locais e específicas [12].

Além disso, a cartilagem hialina parece inicialmente suprir as necessidades de vascularização e ossificação estimuladas pela proliferação dos condrócitos [1, 2, 7]. A interação das células com as fibrilas de colágeno pode modular a adesão e a mobilidade intracelular, mas estes mecanismos ainda são pouco conhecidos [8]. Com aplicação de tensões mecânicas pela compressão na articulação, o alongamento das fibras colágenas e a

reversibilidade são quase sempre alcançados [13-15]. Este comportamento pode estar associado ao arranjo helicoidal das fibras colágenas [16-20].

A reação de uma articulação aos traumatismos e infecções, produz modificações no líquido sinovial da cartilagem articular, onde muitos mecanismos estão envolvidos. A inflamação pode produzir perda de proteoglicano e como conseqüência, a cartilagem perde seu brilho, tomando-se macia e fibrilada. Ocorre assim uma degeneração articular progressiva. Quando já ocorreu a deterioração [1, 21], também são observadas microfraturas, cistos e esclerose no osso subcondral, proliferação celular intensa, e formação de osteófitos nas bordas da articulação [6, 21, 22].

A artrite está associada com dor e rigidez articular, deformidade e progressiva perda da função, afetando o indivíduo em múltiplas dimensões [21, 22]. A etiologia da artrite não é bem conhecida, mas está relacionada com cargas excessivas e microtraumas repetitivos associados a tarefas ocupacionais, e fatores hereditários, metabólicos e endócrinos [1, 23].

Em condições normais há um equilíbrio entre as pressões de filtração e reabsorção mantendo a homeostase da cartilagem articular. No processo inflamatório a pressão hidrostática se eleva e a pressão coloidosmótica do sangue se abaixa, formando o edema [1]. Neste momento a degeneração é manifestada por uma fibrilação profunda envolvendo um terço da espessura da cartilagem. A deterioração da cartilagem, mesmo nesta magnitude, não é possível de ser observada sem a utilização de métodos não invasivos, como radiografias e tomografias computadorizadas [24].

O processo de reparo tecidual acontece como conseqüência da destruição produzida pela inflamação. O organismo tenta realizar ações no sentido de reconstituir a morfologia dos tecidos envolvidos para elevar o nível de funcionalidade aos tecidos [1, 7, 24]. Há respostas diferentes aos distintos graus com que a lesão é produzida. Uma das formas de dar funcionalidade aos tecidos atingidos é a recuperação por células do mesmo tipo das que existiam antes da lesão.

Foram observados efeitos positivos da radiação laser de pequena potência sobre o processo inflamatório crônico da cartilagem articular de disfunções reumáticas [25], no tratamento de casos de tendinites [26], assim como efeitos analgésicos, antiinflamatórios e vasculares [27, 28]. Efeitos positivos também foram observados com a regeneração de fibroblastos e maior resposta dos macrófagos do sistema imunológico [29].

O laser emite fótons que podem produzir reações fototérmicas ou fotoquímicas, como é o caso com a luz convencional (não coerente). Entretanto, a radiação laser tem características importantes de monocromaticidade, coerência e alta intensidade. Estes mecanismos estão relacionados com as vias de comunicação intracelular e intercelular, através de vários tipos de substâncias. O efeito terapêutico desejado pode ser induzido diretamente através de processos fotobioquímicos primários [29] ou de outros processos secundários (bioelétricos).

Estudos sobre os efeitos da radiação laser de HeNe no processo inflamatório da cartilagem articular mostraram que a radiação laser promove uma redução na proliferação das células inflamatórias na área da lesão além de induzir a formação de pontes de cartilagem, favorecendo o reparo da superfície cartilaginosa [28, 29].

2.2. Inflamação na cartilagem articular

A artrite é uma doença degenerativa que atinge as articulações sinoviais e caracteriza-se por apresentar alterações na cartilagem articular, dando origem a zonas de fibrilação e fissuração, o que provoca incrementos excessivos nas forças de contato entre os ossos. A cartilagem torna-se progressivamente mais mole e mais delgada, até sua completa deterioração [3]. Estas alterações são associadas com o quadro clínico de dor e de rigidez articulares. A insuficiência estrutural afeta primariamente a rede colágena superdistendida [24, 30]. Por exemplo, uma carga de grande intensidade pode produzir forças de tensão suficientemente grandes para fraturar a rede polimérica, ou seja, a pressão resultante no gel aquoso do proteoglicano provocada pelo desbalanceamento das forças de tensão da rede sólida da cartilagem, pode romper o tecido [3].

A cartilagem articular (vide Figura 2.1) é um tecido isolado, aneural, alinfático e não tem contato direto com o sistema vascular. Sua nutrição depende de um sistema pelo qual os nutrientes devem passar através de duas barreiras de difusão para alcançar a célula. No adulto, todos os nutrientes podem difundir-se primeiramente para fora do plexo vascular

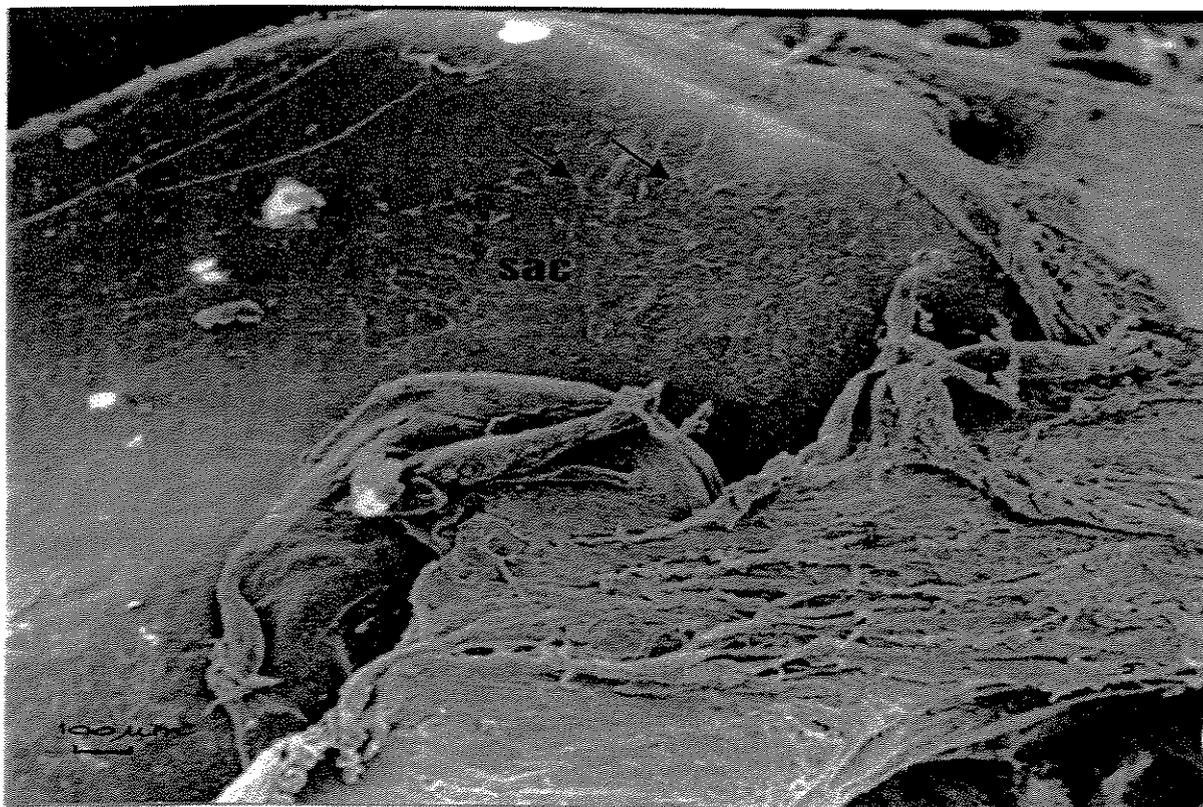


Figura 2.1. Microscopia eletrônica de varredura da superfície da cartilagem articular (SAC). Observar a falta de rugosidade (setas) e a ausência de estruturas celulares na cartilagem sem lesão (60 X).

A permeabilidade da matriz cartilaginosa para a passagem dos nutrientes é orientada em grande parte pelas altas concentrações de glicosaminoglicanos (GaGs) polianiónicos [9]. Lohmander e colaboradores [31], relataram que na matriz extracelular, além do colágeno, existe um complexo macromolecular no qual tomam parte os proteoglicanos e as glicoproteínas. A síntese e a degradação do colágeno em animais adultos é normalmente muito lenta, sendo a meia vida do colágeno calculada em meses ou anos [32-35].

A cartilagem articular é uma fina camada de cartilagem hialina que cobre a superfície articular lisa dos ossos [33]. Qualquer modificação na densidade ou orientação das fibras se reflete em características tensoriais.

A maior parte da água na cartilagem articular está unida sob a forma de um gel de proteoglicano-colágeno e é livremente intercambiável com o líquido sinovial [34]. O gel da cartilagem é super-hidratado e o teor aquoso é importante para manter a elasticidade cartilaginosa e lubrificação da superfície articular [1]. Quando um estado mórbido está associado com a redução no teor aquoso, essas propriedades podem ser modificadas levando a prejuízos na função articular. A propriedade formadora de gel não é exclusiva do proteoglicano [33, 34].

A cartilagem artrítica apresenta diminuição no teor de polissacarídeos da matriz sem modificação do colágeno, aumento na velocidade da síntese de polissacarídeos e aumento simultâneo na atividade de degradação e velocidade de replicação das células acima da cartilagem articular normal [34].

A ruptura dos vasos subcondrais e a hemorragia dentro da cavidade articular, os fragmentos teciduais, e a deposição de cristais, favorecem o desenvolvimento das reações inflamatórias e conseqüentemente da dor. As respostas vasoativas normais da cartilagem articular são abolidas na articulação cronicamente inflamada [36]. A cartilagem articular é altamente dependente da formação do líquido sinovial para sua própria nutrição pois segundo Lam e Ferrell [37], a perda do controle neurovascular da microcirculação sinovial pode contribuir para mudanças degenerativas na superfície da cartilaginosa.

O componente do líquido sinovial responsável por sua viscosidade é um hialuronato polissacarídeo, denominado ácido hialurônico (HA) [18]. O líquido sinovial possui uma propriedade característica, denominada tixotropia, que é a propriedade de tornar-se menos viscoso na medida que aumenta a velocidade de seu fluxo, ou a velocidade do seu cisalhamento [38]. Esta propriedade é atribuída às grandes moléculas de hialuronato. Um líquido menos viscoso não suporta uma película líquida tão espessa da mesma forma que um líquido mais viscoso. Portanto as moléculas de hialuronato, fonte da viscosidade do líquido sinovial, não são eficazes como lubrificantes para apoio de cartilagem sobre cartilagem. É necessária uma lubrificação adicional, a qual é fornecida através de uma fração glicoprotéica livre de hialuronato do líquido sinovial [39].

De acordo com Kang e colaboradores [39], as moléculas de hialuronato aderem firmemente nas superfícies sinoviais e fornecem um tipo limítrofe de lubrificação que mantém as superfícies sinoviais afastadas. A lubrificação do tecido sinovial não depende

da viscosidade, visto que as soluções viscosas sem hialuronato não lubrificam de forma adequada as superfícies sinoviais [37]. O aumento da pressão sinovial ou a irritação química vascular, promovida pela inflamação, altera as estruturas peri-articulares associadas com as instabilidades na articulação, criando uma situação de sobrecarga nos ligamentos, tendões e bursas, além da tensão produzida pelo inchaço na matriz sólida da cartilagem na ausência de aplicação de cargas externas [3].

Quando a cartilagem perde sua elasticidade a exudação diminui e conseqüentemente a resistência e o desgaste por atrito aumentam. Nas articulações animais normais, o coeficiente de atrito diminui com o aumento de carga, devido a oxidação e lubrificação de reforço [40].

Segundo Simha e colaboradores [41], a deformação da cartilagem articular produz uma mudança no contorno da rede de colágeno, mas não no seu volume. Este resultado é devido principalmente ao movimento conjunto das fibras da matriz de colágeno e, secundariamente, do fluxo de água através da matriz. Depois do início, a cartilagem tende a deformar-se cada vez mais com o tempo e, embora a pressão aplicada seja mantida constante, a mesma pode produzir fadiga e levar à fratura da cartilagem.

A insuficiência estrutural da cartilagem afeta primariamente a rede colágena superdistendida [42]. O envolvimento mecânico dos condrócitos na cartilagem articular é fundamental à manutenção da matriz extracelular. Isto ocorre através do balanço da atividade anabólica e catabólica, que são reguladas por fatores como estresse mecânico, programação genética, mediadores solúveis (fatores de crescimento e citosinas), e composição da matriz [43, 44].

A aplicação contínua de uma carga muito elevada produz uma considerável perda de água do tecido, com uma conseqüente grande deformação compressiva. Essa compressão prolongada aplicada na articulação pode produzir a degeneração da cartilagem e necrose dos condrócitos [45, 46].

Na artrite a superfície da cartilagem articular apresenta-se altamente desorganizada (vide Figura 2.2). Com isso, a perda da matriz expõe as fibras colágenas não apoiadas, ou horizontalmente dispostas. Os condrócitos deixam de proliferar e não amadurecem para se tornarem hipertróficos, aglomerados ou distribuídos em colunas longitudinais, o que conseqüentemente leva às perdas dos padrões de ossificação subcondral [1, 46]. Como os

processos intracitoplasmáticos são suprimidos, ocorre uma redução de síntese protéica com supressão da captação de sulfato, induzindo uma menor síntese de proteoglicanos. Os grânulos de RNA são reduzidos e há uma proliferação inflamatória extensa que envolve leucócitos polimorfonucleares (glicogênio e lipídios). Estes elementos se acumulam dentro das células cartilaginosas onde ocorre uma diminuição progressiva de organelas intracitoplasmáticas (retículo endoplasmático, mitocôndrias, aparelho de Golgi) e uma diminuição linear do teor de proteoglicanos. Existe ainda uma diminuição de teor colágeno (como é indicado pela concentração de hidroxiprolina) [1, 47].

Embora os mecanismos envolvidos na formação da artrite ainda sejam desconhecidos, sabe-se que o excesso de sustentação do peso corporal [48], assim como aplicação de tensão mecânica anormal ou mesmo fatores genéticos [49], induzem a esta patologia.

Os modelos experimentais de indução da artrite são feitos através de métodos bioquímicos (adjuvante de Freund) [50]. Entretanto, segundo Lam e Ferrel [37] cada caso de inflamação aguda, apresenta um componente neurogênico significativo, o qual diferencia os modelos das substâncias que estão envolvidas no processo degenerativo.

Najafipour e Ferrell [40] citaram que estruturas avasculares, como a cartilagem articular, são criticamente dependentes do oxigênio presente no fluido sinovial. Em seus experimentos no modelo de joelho de coelhos, administrando carriginina para promover o processo inflamatório, este aspecto foi claramente verificado, confirmando assim os achados anteriores de Levick [51] sobre as alterações na perfusão capilar de O₂ no líquido sinovial induzido pela artrite.

Diversos modelos experimentais de indução de inflamação da cartilagem articular, bem como de sinovite crônica tem sido desenvolvidos com injeção intra-articular ou sistêmica do adjuvante de Freund, que produzem uma resposta imunológica satisfatória, principalmente em relação a mobilização dos leucócitos [52, 53, 54].

Yoshino e Yoshino [55], estudando células de defesa pela ação do adjuvante de Freund incompleto na cartilagem articular, verificaram que a inflamação intensa promovida por este tipo de indução ocorria a partir do sexto dia, e atingia o pico máximo de inflamação severa, aos 21 dias após a indução.

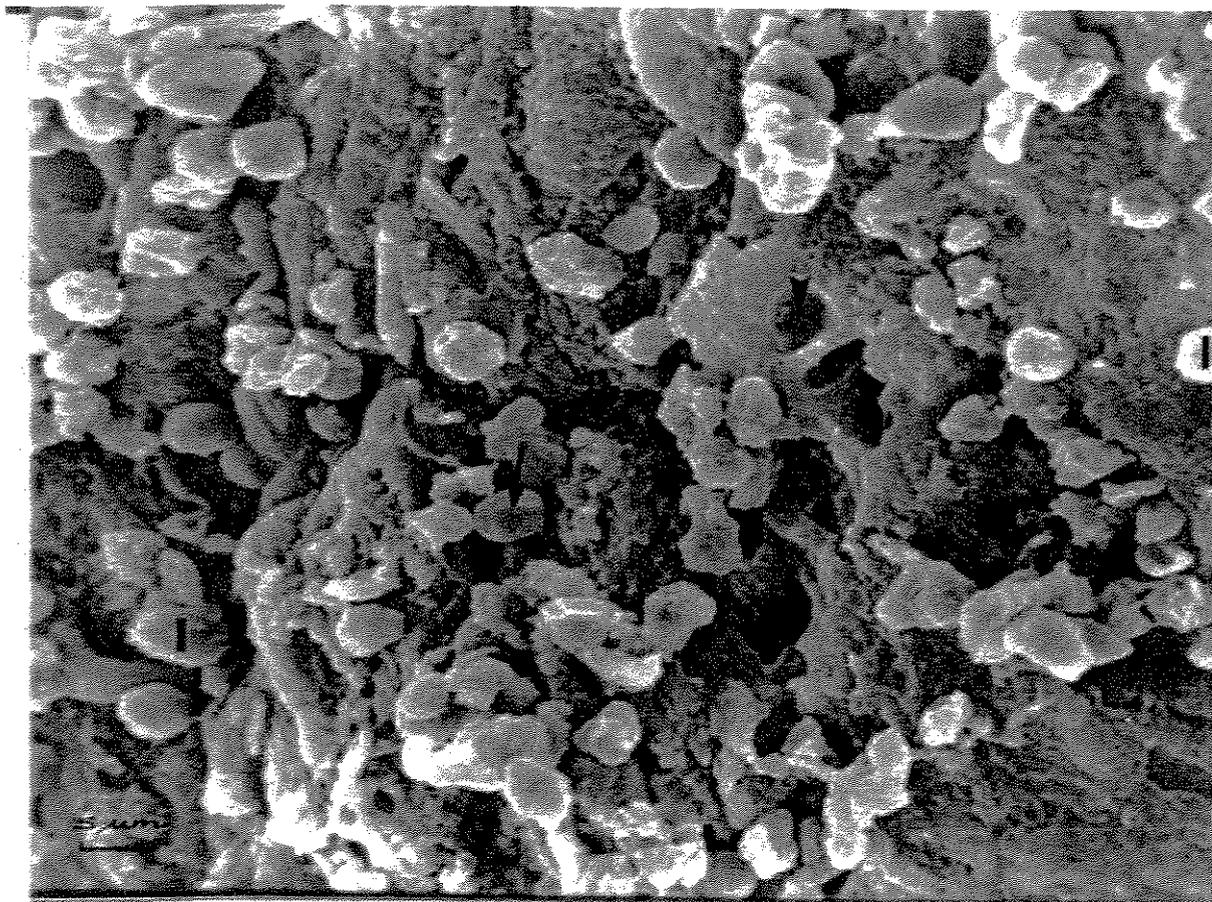


Figura 2.2. Microscopia eletrônica de varredura da cartilagem articular, com inflamação crônica aos 14 dias após sofrer indução da artrite com adjuvante de Freund. Observar a rugosidade da superfície articular, a grande quantidade de células sangüíneas (seta), leucócitos (I) e os orifícios na superfície da cartilagem (1600 X).

McDougall e colaboradores [36] afirmaram que a cartilagem articular é dependente da perfusão sinovial, e que mudanças no fluxo sangüíneo articular promovem a alteração da integridade articular, levando este tecido a uma degeneração ou deterioração. Citaram também que a inflamação induzida pelo adjuvante promove a abolição de estímulos simpáticos de vasoconstrição e de vasodilatação, e que estas alterações permanecem estáveis até 3 semanas após a indução. Estudos sobre a indução de artrite articular de joelho em ratos demonstraram que os primeiros danos foram vistos na superfície da cartilagem uma hora depois da indução [56]. Concluíram que os sinais precoces eram devidos à diminuição da capacidade de reter elétrons na densa camada superficial da

cartilagem, bem como uma perda progressiva de proteoglicanos na matriz cartilaginosa da superfície articular.

Quando a inflamação articular está caracterizada, a cartilagem articular se torna erosiva, desenvolvendo alterações no osso subcondral, principalmente nos condrócitos [57]. A perda no equilíbrio da organizada rede colagenosa e a excessiva desagregação dos proteoglicanos levam ao inchaço, o qual produz a debilidade da matriz cartilaginosa [58, 59].

2.3. O laser aplicado nos processos de reparo tecidual

A radiação laser aplicada no tratamento de disfunções reumáticas apresenta aspectos interessantes. A terapia de laser tem efeitos positivos em casos de tendinites [60], em artrite reumatóide [61], assim como efeitos analgésicos, antiinflamatórios [62, 63] e vasculares [64]. Também foram observados efeitos positivos envolvendo a regeneração dos fibroblastos e na produção dos macrófagos [65].

Reddy e colaboradores [66] observaram os efeitos da aplicação de laser de HeNe em inflamação pós-cirúrgica de tendão de aquiles em coelhos. Observaram que o grupo tratado com a dose de 1.0 J/cm^2 apresentou um significativo aumento na liberação de fatores de crescimento dos fibroblastos e melhora no processo de cura, quando comparado aos animais que não receberam nenhum tratamento. Outros estudos histológicos analisando a aplicação de laser de HeNe nos processos de recuperação inflamação da cartilagem hialina de fêmur de coelhos, verificaram que doses de 8 J/cm^2 , promoveram um efeito anti-inflamatório bem evidente e com rápida regeneração da cartilagem articular [67].

Comparando a eficácia da aplicação de laser HeNe nos aspectos dolorosos na artrite em articulação temporo-mandibular, Dorta [68] verificou a diminuição da inflamação, diminuição da dor e melhora na amplitude temporo-mandibular nos indivíduos que receberam o tratamento com laser. Já Johannsen e colaboradores [61] não verificaram nenhum efeito da aplicação de laser de Arseneto de Gálio Alumínio (Ga-Al-As) no tratamento de artrite reumatóide com relação aos parâmetros de alongamento, flexibilidade, sedimentação de eritrócitos, proteína-C reativa e dor. Nos pacientes tratados com laser

esses aspectos foram minoritários. Esses resultados também estão de acordo com os resultados obtidos por Smith e colaboradores [69]. Entretanto, estudos recentes sobre os efeitos da terapia com laser de Ga-Al-As *in vitro*, com células de cartilagem humana, relatam efeitos positivos deste tipo de laser, como a bioestimulação, sem dano celular [70].

Aparentemente a ação antiinflamatória e antiedematosa do laser de Ga-Al-As se exerce através da aceleração da microcirculação, originando alterações na pressão hidrostática capilar, com reabsorção do edema e eliminação do acúmulo de catabólitos intermediários, como o ácido pirúvico e lático, induzindo uma melhor utilização do oxigênio e glicose pela célula [71, 72]. Dentre os trabalhos que se destacam estão os modelos experimentais envolvendo o colágeno [73, 74]. Pesquisando os efeitos atribuídos ao laser de GaAs de baixa densidade de energia, Michlovitz [75] cita que ocorre aceleração na síntese de colágeno, com aumento na vascularização, levando à cicatrização tecidual pelo decréscimo na produção de microorganismos, concomitantemente com a redução da dor. No entanto, o processo de cicatrização pode ser aparentemente alterado em vários tecidos, como os dos vasos sangüíneos, tecidos ósseos e sinoviais [76-77]. Além dos trabalhos com modelos experimentais *in vitro*, Bogoch e colaboradores [78] utilizando modelos *in vivo* com células de cartilagem do joelho de cachorros, demonstraram alterações em fibroblastos, precursores de colágeno.

Há consenso na literatura de que a ação da radiação laser nos tecidos depende da dosimetria empregada, especialmente nos processos de cicatrização [79-80], assim como do comprimento de onda, tempo de exposição, profundidade do tecido tratado e espessura cartilaginosa [81].

Brosseau e colaboradores [82] estudando os efeitos anti-inflamatórios do laser de HeNe e de GaAs em pacientes com artrite reumatóide nas articulações falangeanas durante três meses, não observaram modificações da temperatura tecidual, mas concluíram que os efeitos antiinflamatórios do laser foram totalmente dependentes de quatro fatores: comprimento de onda, duração do tratamento, dose e local de aplicação.

Do ponto de vista microscópico, os processos fototérmicos originados na zona de absorção dos tecidos produzem vibrações moleculares e baixo nível de excitação celular [83]. A seleção do comprimento de onda influencia as propriedades do espalhamento e absorção do meio, e em consequência, o nível de penetração. Todavia, os efeitos térmicos

característicos podem ser controlados pela água, hemoproteínas, pigmentos como a melanina ou outras moléculas.

Reed e colaboradores [84] citam que dentro do conjunto de efeitos térmicos há o efeito citotóxico. A elevação de temperatura favorece as reações citotóxicas a partir das substâncias que tenham absorção específica no comprimento de onda da radiação incidente. Estudando a estimulação leucocitária da radiação do laser de HeNe, Klebanov e colaboradores [85] verificaram que o efeito estimulatório em uma célula isolada foi muito pequeno, sendo o efeito fotosintetizador o mais evidenciado nas etapas iniciais de tratamento.

Embora os mecanismos moduladores do processo de reparo tecidual não sejam conhecidos, Honmura e colaboradores [76] verificaram uma melhora de 30 % na redução da inflamação em ratos que sofreram a aplicação de laser de Ga-Al-As, quando comparados com animais tratados somente através de medicamentos anti-inflamatórios.

Segundo Mester e colaboradores [86] a radiação laser de HeNe em ratos levou a um aumento na capacidade da célula em sintetizar substâncias como a valina, uridina e timidina, elementos que são componentes formadores do RNA e DNA, potencializando a replicação celular. Já Kelley e colaboradores [87] provocaram uma lesão em células capilares de camundongos *in vitro* e através da irradiação com laser de GaAs e verificaram regeneração das células por cultura de 3H-timidina.

Mester e colaboradores [86] citaram que as alterações na enzima AMPc produzidas pelo laser de GaAs, são de importância indiscutível em todos os mecanismos de ação que intervêm nos processos celulares, pois atuam como segundo mensageiro na multiplicação celular, bem como na resposta hormonal. Relatam ainda que os aumentos na produção do ATP mitocondrial, induzidos pela radiação laser, favorecem inúmeras reações que intervêm no metabolismo celular. Walker e colaboradores [88] utilizando aplicações de laser de HeNe em pacientes com artrite reumatóide, citam que foi constatado o aumento das β -endorfinas nos processos analgésicos. Já a capacidade imunossupressora da radiação laser é obtida mediante estimulação da formação de linfócitos por mitoses, com o aumento da capacidade de aderência dos macrófagos ou linfócitos, além de alterações na imunidade humoral e celular [73, 89].

Enwemeka e colaboradores [90] realizaram estudos morfométricos das fibrilas de colágeno em tendão de coelho estimulado por laser de HeNe, confirmando trabalhos anteriores que apresentavam modificações da organização na polimerização de fibrilas na matriz no processo de remodelação, por intermédio da elevação dos níveis de RNAm dos procolágenos e do aumento na síntese de ATP. Este processo acelera os tempos de mitose, favorecendo a síntese de DNA e RNA, sem alterar as características genéticas e histo-funcionais da célula.

Num estudo envolvendo ratos *Wistar*, Ülçöl e colaboradores [91], promoveram a indução da artrite por adjuvante de Freund e trataram com o fármaco *Tenoxicam* em combinação com a irradiação de laser de HeNe. Os resultados obtidos foram considerados favoráveis com relação à diminuição do edema e do processo inflamatório no grupo que recebeu a terapia laser, quando comparados com o controle sem tratamento ou somente com a aplicação do fármaco. Padua e colaboradores [92] observam ainda que o tratamento a laser demonstrou ser positivo nas etapas em que a inflamação era aguda ou crônica, além de promover efeitos analgésicos.

Soffa e colaboradores [93] estudando o efeito da artrite e inflamação sinovial em coelhos verificaram que a aplicação de laser de YAG com várias densidades de energia, diminuiu os efeitos negativos da hemorragia sinovial, da debridação mecânica, da dilatação capilar, da infiltração de linfócitos e dos defeitos da cápsula articular nos animais que sofreram a aplicação de laser.

Fulga e colaboradores [94] desenvolveram um estudo clínico sobre o efeito da aplicação de laser de GaAs (comprimento de onda entre 940-980 nm e potência de 50 mW) em 136 pacientes com disfunções reumáticas degenerativas, verificando resultados muito satisfatórios nos indivíduos tratados com relação aos parâmetros de dor, contratura muscular, edema e mobilidade articular. Citaram ainda que nos casos de osteoartrite de ombro, tornozelo e joelho no período compreendido entre 6 e 9 dias de aplicação do laser ocorreu uma reincidência da dor, embora tivesse ocorrido uma melhora na amplitude de movimento articular. Demonstraram também [95] que no caso da inflamação plantar induzida com carriginina em ratos *Wistar*, a irradiação com laser reduziu o volume de inflamação em mais de 85 % dos animais depois de 6 dias de aplicação quando comparado

com o grupo controle sem tratamento (22 % de regressão inflamatória), além da diminuição da necrose tecidual.

2.4. Referências

- [1] MOW, V.C., RATCLIFFE, A., POOLE, A.R., Cartilage and diarthrodial joint as paradigms for hierarchical materials and structures, *Biomaterials*, v.13 (2), p.67-97, 1992.
- [2] GANEY, T.M., OGDEN, J.A., SASSE, J., NEAME, P.J., HILBELINK, D.R., Basement membrane composition of cartilage canals during development and ossification of the epiphysis, *The Anatomical Record*, v.241, p.425-437, 1995.
- [3] NARMONEVA, D.A., WANG, J.Y., SETTON, L.A., Nonuniform swelling-induced residual strains in articular cartilage, *Journal of Biomechanics*, v.32, p. 401-408, 1999.
- [4] JURVELIN, J.S., MUELLER, D.J., WONG, M., STUDER, D., ENGEL, A., HUNZIKER, E.B., Surface and subsurface morphology of bovine humeral articular cartilage as assessed by atomic force and transmission electron microscopy, *Journal of Structural Biology*, v.117, p.45-54, 1996.
- [5] TUREK, S.L., *Ortopedia: Princípios e sua Aplicação*, 4. ed., São Paulo:Editora Manole, p.250-257, 1991.
- [6] MILES, A.M., BREW, S.A., INGHAM, K.C., SMITH, R.L., Photoinduced structural changes in the collagen/gelatin binding domain of fibronectin, *Biochemistry*, v.34, p.6941-6946, 1995.
- [7] ARCHER, C.W., MORRISON, H., PITSILLIDES, A.A., Cellular aspects of the development of diarthrodial joints and articular cartilage, *Journal of Anatomy*, v.184, p.447-456, 1994.
- [8] McCARTHY, J.B., VACHHANI, B., LIDA, J., Cell adhesion to collagenous matrices, *Biopolymers*, v.40, 371-381, 1996.
- [9] HARAB, R.C, MOURÃO, P.A.S., Increase of chondroitin 4-sulfate concentration in the endochondral ossification cartilage of normal dogs, *Biochimica et Biophysica Acta*, v.992, p.237-240, 1989.
- [10] RASPANTI, M., ALESSANDRINI, A., GOBBI, P., RUGGERI, A., Collagen fibril surface: TMAFM, FEG-SEM and freeze-etching observations, *Microscopy Research and Technique*, v.35, p. 87-93, 1996.

- [11] KADLER, K.E., HOLMES, D.F., TROTTER, J.A., CHAPMAN, J.A., Collagen fibril formation, *Biochemical Journal*, v.316, p.1-11, 1996.
- [12] EYRE, D.R., WU, J.J., Collagen structure and cartilage matrix integrity, *The Journal of Rheumatology*, v.22, n.1, s.43, p.82-85, 1995.
- [13] VASILEV, V., ANDREEV, D., KÜHNEL, W., Scanning electron microscopy of the endomysial collagen in the rat paravertebral musculature, *Annals of Anatomy*, v.177, p.85-87, 1995.
- [14] CRIBB, A.M., SCOTT, J.E., Tendon response to tensile stress: an ultrastructural investigation of collagen: proteoglycan interactions in stressed tendon, *Journal of Anatomy*, v.187, p.423-428, 1995.
- [15] GRAY, H., GOSS, G.M. Gray's anatomy: Anatomical basis of medicine and surgery, 38 ed., London: Churchill Livingstone, 1389p., 1995.
- [16] VAEZY, S., SMITH, L.T., MILANINIA, A., CLARK, J.I., Two-dimensional fourier analyses of electron micrographs of human skin for quantification of the collagen fiber organization in dermis, *Journal of Electron Microscopy*, v.44, p.358-364, 1995.
- [17] BIRK, D.E., HAHN, R.A., LINSENMAYER, C.Y., ZYCBAND, E.I., Characterization of collagen fibril segments from chicken cornea, dermis and tendon, *Matrix Biology*, v.15, p.111-118, 1996.
- [18] ADACHI, E., TAKEDA, Y., NAKAZATO, K., MURAOKA, M., IWATA, M., SASAKI, T., IMAMURA, Y., Isolated collagen IV retains the potencial to form an 18 - nm sided polygonal meshwork of the lamina densa, *Journal of Electron Microscopy*, v.46, p.233-241, 1997.
- [19] KUO, H.J., KEENE, D.R., GLANVILLE, R.W., The macromolecular structure of type-VI collagen formation and stability of filaments, *European Journal of Biochemistry*, v.232, p.364-372, 1995.
- [20] CARVALHO, H.F., TOBOGA, S.R., VILAMAIOR, P.S.L., Collagen type VI is a component of the extracellular matrix microfibril network of the prostatic stroma, *Tissue & Cell*, n.29, p.163-170, 1997.
- [21] MICHET, C.J., Osteoarthritis, *Primary Care*, v.20, p.815-826, 1993.
- [22] SACK, K.E., Osteoarthritis, *West Journal of Medicine*, v.163, p.579-586, 1995.
- [23] GARDNER, D.L., Problems and paradigms in joint pathology, *Journal of Anatomy*, v.184, p.465-476, 1994.
- [24] THRELKELD, J.A., CURRIER, D.P. Effects on synovial joint tissues, *Physical Therapy*, v.68(3), p.364-370. 1988.

- [25] INOUE, K., NISHIOKA, J., HUKUDA, S. Suppressed tuberculin reaction in guinea pigs following laser irradiation. *Lasers in Surgery and Medicine*, v.9, p.271-275, 1989.
- [26] GOATS, G.C., HUNTER, J.A., FLETT, E., STIRLING, A., Low intensity laser and phototherapy for rheumatoid arthritis, *Physiotherapy*, v.82, p.311-320, 1996.
- [27] WALKER, J.B., AKHANJEE, L.K., COONEY, M.M., GOLDSTEIN, J., TAMAYOSHI, S., SEGAL-GIDAN, F., Laser therapy for pain of rheumatoid arthritis, *The Clinical Journal of Pain*, v.3, p.54-59, 1987.
- [28] JOHANNSEN, F., HAUSCHILD, B., REMVIG, L., JOHNSEN, V., PETERSEN, M., BIELER, T., Low energy laser therapy in rheumatoid arthritis, *Scandinavian Journal of Rheumatology*, v.23, p.145-147, 1994.
- [29] ENWEMEKA, C.S., Morphometrics of collagen fibril populations in He:Ne laser photostimulated tendons, *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, v.6, p.47-52, 1990.
- [30] LI, B.H., MARSHALL, D., ROE, M., ASPDEN, R.M., The electron microscope appearance of the subcondral bone plate in the human femoral head in osteoarthritis and osteoporosis, *Journal of Anatomy*, v.195, p.101-110, 1999.
- [31] LOHMANDER, L.S., IONESCU, M., JUGESSUR, H., POOLE, A.R., Changes in joint cartilage aggrecan after knee injury and in osteoarthritis, *Arthritis and Rheumatism*, v.42(3), p.534-544, 1999.
- [32] BARANAUSKAS, V., VIDAL, B.C., PARIZOTTO, N.A., Observation of geometric structure of collagen molecules by atomic force microscopy, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.69, p.91-97, 1997
- [33] MAYO, K.H., NMR and X-Ray studies of collagen model peptides, *Biopolymers*, v.40, p.359-370, 1996.
- [34] BRODSKY, SHAH, N.K., The triple-helix motif in proteins, *FASEB Journal*, v.9, p.1537-1546, 1995.
- [35] KARVONEN, R.L., NEGENDANK, W.G., TEITGE, R.A., REED, A.H., MILLER, P.R., MADRID, F.F., Factors affecting articular cartilage thickness in osteoarthritis and aging, *The Journal of Rheumatology*, v.21(7), p.1310-1318, 1994.
- [36] McDOUGALL, J.J., KARIMIAN, S.M., FERREL, W.R., Prolonged alteration of vasoconstrictor and vasodilator responses in rat knee joint by adjuvant monoarthritis, *Experimental Physiology*, v.80, 349-357, 1995.
- [37] LAM, F.Y., FERREL, W.R., Acute inflammation in the rat knee joint attenuates sympathetic vasoconstriction but enhances neuropeptide-mediated vasodilatation assessed by laser doppler perfusion imaging, *Neuroscience*, v.52, p.443-449, 1993.

- [38] DAHLBERG, L., Medical treatment of chondral damage, *Sports Medicine and Arthroscopy Review*, v.6(1), p.25-30, 1998.
- [39] KANG, Y., EGER, W., KOEPP, H., WILLIAMS, J.M., KUETTNER, K.E., HOMANDBERG, G.A., Hyaluronan suppresses fibronectin fragment-mediated damage to human cartilage explant cultures by enhancing proteoglycan synthesis, *Journal of Orthopaedic Research*, v.17(6), p.858-869, 1999.
- [40] NAJAFIPOUR, H., FERRELL, W.R., Comparison of synovial Po₂ and sympathetic vasoconstrictor responses in normal and acutely inflamed rabbit knee joints, *Experimental Physiology*, v.80, p.209-220, 1995.
- [41] SIMHA, N.K., FEDEWA, M., LEO, P.H., LEWIS, J.L., OEGEMA, T., A composites theory predicts the dependence of stiffness of cartilage culture tissues on collagen volume fraction, *Journal of Biomechanics*, v.32, p.503-509, 1999.
- [42] CHAN, S.C.N., SEEDHOM, B.B., 'Equivalent geometry' of the knee and the prediction of tensions along the cruciates: an experimental study, *Journal of Biomechanics*, v.32, p.35-48, 1999.
- [43] JONES, W.R., TING-BEALL, H.P., LEE, G.M., KELLEY, S.S., HOCMUTH, R.M., GUILAK, F., Alterations in the Young's modulus and volumetric properties of chondrocytes isolated from normal and osteoarthritic human cartilage, *Journal of Biomechanics*, v.32, p.119-127, 1999.
- [44] Di CESARE, P.E., FANG, C., LESLIE, M.P., DELLA VALLE, C.J., GOLD, J.M., TULLI, H., PERRIS, R., CARLSON, C.S., Localization and expression of cartilage oligomeric matrix protein by human rheumatoid and osteoarthritic synovium and cartilage, *Journal of Orthopaedic Research*, v.17(3), p.437-445, 1999.
- [45] WU, J.Z., HERZOG, W., EPSTEIN, M., Modelling of location- and time-dependent deformation of chondrocytes during cartilage loading, *Journal of Biomechanics*, v.32, p.563-572, 1999.
- [46] TOYODA, T., SAITO, S., INOKUCHI, S., YABE, Y., The effects of tensile load on the metabolism of cultured chondrocytes, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, v.359, p.221-228, 1999.
- [47] EPPLEN, C., SANTOS, E.J.M., MAUELER, W., VAN HELDEN, P., EPPLEN, J.T., On simple repetitive DNA sequences and complex diseases, *Electrophoresis*, v.18(9), p.1577-1585, 1999.
- [48] SHARMA, J., LOU, C., CAHUE, S., DUNLOP, D.D., The mechanism of the effect of obesity in knee osteoarthritis – The mediating role of malalignment, *Arthritis and Rheumatism*, v.43(3), p.568-575, 2000.

- [49] NUKI, G., Osteoarthritis: a problem of joint failure, *Zeitschrift für Rheumatologie*, v.58(3), p.142-147, 1999.
- [50] PEARSON, C., Experimental models in rheumatoid disease, *Arthritis and Rheumatism*, v.7, p.80-86, 1964.
- [51] LEVICK, J.R., Hypoxia and acidosis in chronic inflammatory arthritis; relation to vascular supply and dynamic effusion pressure, *Journal of Rheumatology*, v.17, p.579-582, 1990.
- [52] HOF LAND, L.J., LAMBERTS, S.W.J., HAZENBERG, M.P., Somatostatin receptor subtype expression in cells of the rat immune system during adjuvant arthritis, *Journal of Endocrinology*, v.161, p.167-175, 1999.
- [53] MOLLER, K.O., WETHLING, H., ABEL, H.H., LIND, B.M., KARCHER, K., SCHRAMM, U. HOHLBACH, G., Studies on an immunologically induced synovitis model in pigs and sheep, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, v.361, p.228-236, 1999.
- [54] CREMER, M.A., YE, X.J., TERATO, K. GRIFFITHS, M.M., WATSON, W.C., KANG, A.H., Immunity to type IX collagen in rodents: a study of type IX collagen for autoimmune and arthritogenic activities, *Clinical and Experimental Immunology*, v.112(3), p.375-382, 1998.
- [55] YOSHINO, S., YOSHINO, J., Recruitment of pathogenic T-cells to synovial tissues of rats injected intraarticularly with nonspecific agents, *Cellular Immunology*, v.158(2), p.305-313, 1994.
- [56] HENZGEN, S., PETROW, P.K., THOSS, K., BRAUER, R., Degradation of articular cartilage during the progression of antigen-induced arthritis in mice: A scanning and transmission electron microscopic study, *Experimental and Toxicologic Pathology*, v.48, p.255-263, 1996.
- [57] NAKANO, T., AHERNE, F.X., Articular cartilage lesions in female breeding swine, *Canadian Journal Animal Science*, v.73, p.1005-1008, 1993.
- [58] BENDELE, WHITE, S.L., HULMAN, J.F., Osteoarthrosis in Guinea Pigs: histopathologic and scanning electron microscopic features, *Laboratory Animal Science*, v.39 (2), p.115-121, 1989.
- [59] McCARTHY, J.B., VACHHANI, B., LIDA, J., Cell adhesion to collagenous matrices, *Biopolymers*, v.40, 371-381, 1996.
- [60] ENGLAND, S. Low power laser therapy of shoulder tendonitis, *Scand. J. Rheumatol.*, v.18, p.427-432, 1989.

- [61] JOHANNSEN, F., HAUSCHILD, B., REMVIG, L., JOHNSEN, V., PETERSEN, M., BIELER, T. Low energy laser therapy in rheumatoid arthritis, *Scandinavian Rheumatology Research*, v.23, p.145-7, 1994.
- [62] BIAN, X.P. The experiment studies of semiconductor GaAs-laser points irradiation the analgesic effect. *Chen. Tzu Yen Chiu*, v.14, p.379-385, 1989.
- [63] KING, C.E., CLELLAND, J.A., KNOWLES, C.J., JACKSON, J.R. Effect of helium-neon laser auriculotherapy on experimental pain threshold, *Physical Therapy*, v.70, p.24-30, 1990.
- [64] MORDON, S., DESMETTRE, T., DEVOISSELLE, J.M., MITCHELL, V. Selective laser photocoagulation of blood vessels in a hamster skin flap model using a specific ICG formulation, *Lasers in Surgery and Medicine*, v.21, p.365-373, 1997.
- [65] YOUNG, S., BOLTON, P., DYSON, M., HARVEY, W., DIAMANTOPOULOS, C. Macrophage responsiveness to light therapy, *Lasers Surgery Medicine*, v.9, p.497-503, 1989.
- [66] REDDY, G.K., STEHNO-BITTEL, L., ENWEMEKA, C.S. Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit achilles tendons. *Lasers in Surgery and Medicine*, v.22(5), p.281-287, 1998.
- [67] CALATRAVA, I.R., VALENZUELA, J.M.S., GOMEZ VILLAMANDOS, R.J., JURADO, I.A. Histological and clinical responses of articular cartilage to low-level laser therapy: Experimental study, *Lasers in Medical Science*, v.12(2), p.117-121, 1997.
- [68] DORTA, P.M.R.. Laser terapia en artritis temporomandibulares. Evaluacion gammagrafica, *Acta Odontológica Venezolana*, v.33, p.21-23, 1995.
- [69] SMITH, R.J., BIRNDORF, M., GLUCK, G., HAMMOND, D., MOORE, W.D. The effect of low-energy laser on skin-flap survival in the rat and porcine animal models, *Plastic and Reconstructive Surgery*, v.89, p.306-310 1992.
- [70] MORRONE, G., GUZZARDELLA, G.A., TORRICELLI, P., ROCCA, M., TIGANI, D., BRODANO, G.B., FINI, M., GIARDINO, R. Osteochondral lesion repair of the knee in the rabbit after low-power diode Ga-Al-As laser biostimulation: An experimental study, *Artificial Cells Blood Substitutes and Immobilization Biotechnology*, v.8 (4), p321-336, 2000.
- [71] HONMURA, A., YANASE, M., OBATA, J., HARUKI, E. Therapeutic effect of Ga-Al-As diode Laser irradiation on experimentally induced inflammation in rats, *Lasers in Surgery and Medicine*, v.12, p.441-449, 1992.
- [72] HONMURA, A., ISHII, A., YANASE, M., OBATA, J., HARUKI, E. Analgesic effect of Ga-Al-As diode Laser irradiation on hyperalgesia in carrageenin-induced inflammation, *Lasers in Surgery and Medicine*, v.13, p.463-469, 1993.

- [73] MINTERTAG, J. Física Aplicada do Laser. In: PIMENTA, L.H.M. Laser em Medicina e Biologia, São Paulo: Roca, v.1, p.6-8, 1990.
- [74] ATHANASIOU, K.A., FISCHER, R., NIEDERAUER, G.G., PUHL, W.. Effects of excimer Laser on healing of articular cartilage in rabbits, Journal of Orthopaedic Research, v.13, p.483-494, 1995.
- [75] MICHLOVITZ, S.L. Thermal Agents in Rehabilitation, 2nd ed., Philadelphia: F.A. Davis Company, p. 200-218, 1990.
- [76] REINDEL, E.S., AYROSO, A.M., CHEN, A.C., CHUN, D.M., SCHINAGL, R.M., SAH, R.L. Integrative repair of articular cartilage in vitro: Adhesive strength of the interface region, Journal of Orthopaedic Research, v.13, p.751-760, 1995.
- [77] HARDIE, E.M., CARSON, C.S., RICHARDSON, D.C. Effect of Nd:YAG Laser energy on articular cartilage healing in the dog, Lasers in Surgery and Medicine, v.9, p.595-601, 1989.
- [78] BOGOCH, E.R., MORAN, E., CROWE, S., FORNASIER, V. Arthritis not immobilization causes bone loss in the carrageenan injection model of inflammatory arthritis, Journal of Orthopaedic Research, v.13, p.777-782, 1995.
- [79] GOATS, G.C., HUNTER, J.A., FLETT, E., STIRLING, A. Low intensity Laser and phototherapy for rheumatoid arthritis, Physiotherapy, v.82, p.311-320, 1996.
- [80] APFELBERG, D.B. et al.. Study of carcinogenic effects on in vitro argon laser exposure of fibroblasts, Plastic and Reconstructive Surgery, v.71, p.92-97, 1983.
- [81] SCHULTZ, R.J., KRISHNAMURTHY, S., THELMO, W., RODRIGUEZ, J.E., HARVEY, G. Effects of varying intensities of laser energy on articular cartilage, Lasers in Surgery and Medicine, v.5, p.577-588, 1985.
- [82] BROSSEAU, L., WELCH, V., WELLS, G., TUGWELL, P., de BIE, R., GAM, A., HARMAN, K., SHEA, B., MORIN, M. Low level laser therapy for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: A metaanalysis. Journal of Rheumatology, v.27 (8), p.1961-1969, 2000.
- [83] SOBOL, E.M., KITAI, M.S., JONES, N., SVIRIDOV, A.P., MILNER, T., WONG, B.J.F. Heating and structural alterations in cartilage under laser radiation, IEEE Journal of Quantum Electronics, v.34 (4), p. 532-539, 1999.
- [84] REED, S.C., JACKSON, R.W., GLOSSOP, N., RANDLE, J. An in vivo study of the effect of excimer laser irradiation on degenerate rabbit articular cartilage, Arthroscopy, v.10, p.78-84, 1994.

- [85] KLEBANOV, G.L., TESELKIN, Y.O., BABENKOVA, I.V., BASHKUJEVA, T.Y., CHICHUCK, T.V., VLADIMIROV, Y.A. Low-power laser irradiation induces leukocyte priming, *General Physiology and Biophysics*, v.17(4), p.365-376, 1998.
- [86] MESTER, E., MESTER, A.F., MESTER, A.. The biomedical effects of laser applications, *Lasers in Surgery and Medicine*, v.5, p.31-39, 1985.
- [87] KELLEY, M.W., TALREJA, D.R., CORWIN, J.T. Replacement of hair cells after Laser microbeam irradiation in cultured organs of corti from embryonic and neonatal mice, *The Journal of Neuroscience*, v.15, p.3013-3026, 1995.
- [88] WALKER, J. Relief from chronic pain by low power laser irradiation, *Neurosci. Lett.*, v.43, p.339-344, 1983.
- [89] OST, V., NEUKAMMER, J., RINNEBERG, H. Flow cytometric differentiation of erythrocytes and leukocytes in dilute whole blood by light scattering, *Cytometry*, v.32 (3), p.191-197, 1998.
- [90] ENWEMEKA, C.S., RODRIGUEZ, O.O., GALL, N.G., WALSH, N.E. Morphometrics of collagen fibril populations in He:Ne Laser photostimulated tendons, *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, v.6, p.47-52, 1990.
- [91] ULUGÖL, A., ÜNALAN, H., DÖKMECI, I., KOKINO, S. Comparison of the effects of tenoxicam and mid-laser irradiation on chronic adjuvant arthritis in rats, *Clinical and Experimental Rheumatology*, v.15, p.83-86, 1997.
- [92] PADUA, L., PADUA, R., MORETTI, C., NAZZARO, M., TONALI, P. Clinical outcome and neurophysiological results of low-power laser irradiation in carpal tunnel syndrome, *Lasers in Medical Science*, v.14 (3), p.196-202, 1999.
- [93] SOFFA, A.J., MARKEL, M.D., CONVERSE, L.J., MASSA, K.L., BOGDANSKE, J.J., DILLINGHAM, M.F. Treatment of inflammatory arthritis by synovial ablation: a comparison of the holmium: YAG laser, electrocautery, and mechanical ablation in a rabbit model, *Lasers in Surgery and Medicine*, v.19, p.143-151, 1996.
- [94] FULGA, C., FULGA, I.G., PREDESCU, M., Clinical study of the effect of laser therapy in rheumatic degenerative diseases, *Rev. Roum. Méd. Int.*, v.32, p.227-232, 1994.
- [95] FULGA, C., FULGA, I.G., PREDESCU, M. Effect of laser therapy on experimental inflammation in rats, *Rev. Roum. Méd. Int.*, v.33 (3-4), p.257-261, 1995.

Capítulo III

A hidroxiprolina e o colágeno na cartilagem articular

3.1. Hidroxiprolina e colágeno

O colágeno é a proteína estrutural extracelular mais abundante nos mamíferos, sendo o principal componente fibroso na formação da pele, dos ossos, dos tendões, cartilagens, dentes, etc. O colágeno é formado por um entrelaçamento de três cadeias polipeptídicas, sendo cada uma constituída com aproximadamente 1000 aminoácidos de comprimento [1, 2]. A seqüência de três aminoácidos (glicina (Gli), Prolina (Pro) e hidroxiprolina (Hip)) se repete com grande freqüência [1, 3]. A prolina e a hidroxiprolina fazem a estabilização da hélice [4 - 6].

Mow e colaboradores [7] observaram que o colágeno é uma molécula em forma de bastão, com cerca de 3000 Å de comprimento e 15 Å de diâmetro e que as pontes de hidrogênio dentro do filamento estão ausentes, sendo que cada uma das três hélices do colágeno é estabilizada pela repulsão elétrica dos anéis de pirrolidona provenientes das cadeias laterais de prolina e hidroxiprolina (vide a Figura 3.1).

Os aminoácidos como a prolina e a hidroxiprolina estão freqüentemente presentes em altas proporções na tripla hélice, sendo entremeadas com sucessões que contêm menos aminoácidos. Cada cadeia forma uma poliprolina II semelhante à hélice, permitindo a formação de três resíduos ao redor [3, 9]. Os anéis de pirrolidona se mantêm afastados um do outro quando a cadeia peptídica assume essa forma helicoidal, que é muito mais aberta que a estrutura firmemente enrolada da α -hélice. As três fitas se enrolam, uma em torno da outra, formando um cabo superhelicoidal (vide a Figura 3.2). Como há três aminoácidos em torno da hélice, um aminoácido de três em três tem de ser repetidamente a glicina. Os

aminoácidos de cada lado da glicina se localizam no exterior, onde há espaço para anéis volumosos como os da prolina e da hidroxiprolina [2, 4, 9].

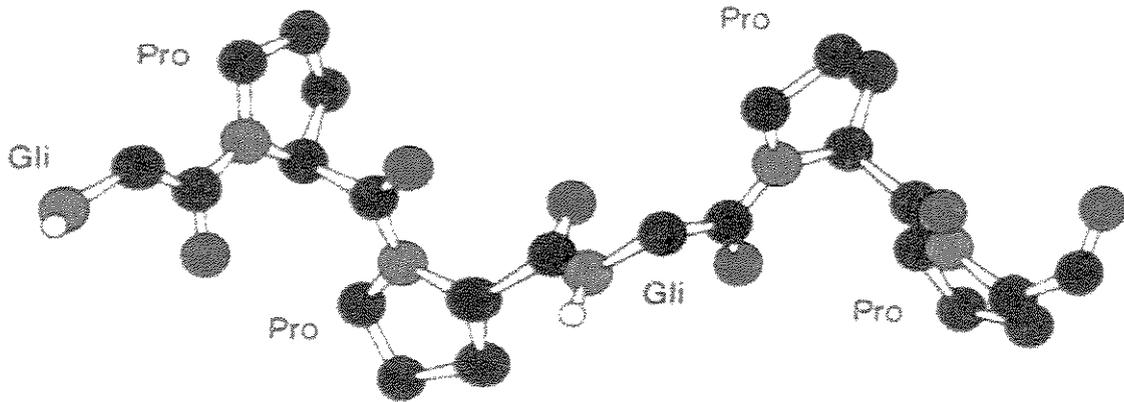


Figura 3.1. Conformação de um filamento único da tríplice hélice do colágeno. A seqüência nesta ilustração é Gli-Pro-Pro-Gli-Pro-Pro [8].

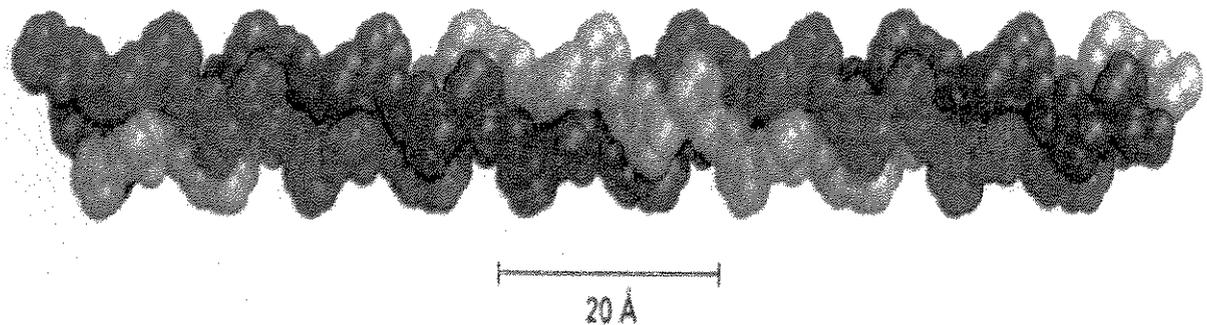


Figura 3.2. Modelo compacto da tríplice hélice do colágeno. As três cadeias polipeptídicas (filamentos) são pintadas em cores diferentes [8].

3.2. A hidroxiprolina em processos de artrite

Takahashi e colaboradores [10] realizaram estudos evolutivos em joelhos de pacientes com osteoartrite utilizando substâncias marcadoras. Após a extração do material, fizeram a hidrólise de amostras de tecido sinovial, e através da dosagem de hidroxiprolina, obtiveram equivalência desta dosagem com a quantidade de produção de colágeno na articulação inflamada. Moskowitz [11] também trabalhando com pacientes de osteoartrite de joelho e quadril verificou que, com a ingestão diária de 10 g de colágeno hidrolisado farmacologicamente em forma de gelatina, ocorreu aumento na concentração de hidroxiprolina no sangue, acompanhada de redução da dor.

Kadler e colaboradores [4], com a utilização de substâncias marcadoras radioativas, mostraram que as prolinas localizadas no lado amínico das glicinas, nas cadeias nascentes de colágeno, tornam-se hidroxiladas. Citaram ainda que a hidroxiprolina estabiliza a tripla hélice do colágeno por formar pontes de hidrogênio intercadeias, pois o colágeno, insuficientemente hidroxilado induz a má formação, fragilidade e lesões na constituição das fibras. Li e colaboradores [12], estudando fatores determinantes da patogenia das disfunções de reabsorção óssea e cartilaginosa, citaram que o condroitim sulfato aumentou a produção da enzima catepsina K, que levou à liberação de hidroxiprolina, aumentando sua concentração no líquido sinovial do joelho de pacientes com artrite. Este mecanismo enzimático ocorreu no sentido de regular a atividade de crescimento ósseo e cartilaginosa, principalmente, pelas mudanças significativas na concentração dos glicosaminoglicanos da matriz extracelular, produzidos pela doença.

Arborelius e colaboradores [13] observaram que na cartilagem artrítica ocorre uma diminuição significativa no teor de polissacarídeos da matriz, sem modificação no colágeno. Relataram ainda que a replicação das células continua em velocidade acima da cartilagem articular madura normal. A síntese de RNA não é alterada, mas que há aumento na síntese de DNA e de hidroxiprolina. O aumento da síntese de DNA é um indicador do aumento da reprodução celular, e o aumento da síntese de hidroxiprolina é um indicador do aumento da reabsorção óssea.

Um dos principais problemas observados com o avanço da idade dos indivíduos é o aparecimento de lesões na cartilagem articular, como a osteoartrite [14]. Estas mudanças

degenerativas atingem primeiramente as superfícies articulares, desenvolvendo-se posteriormente em profundas ulcerações e, eventualmente, levando a cartilagem para a destruição, com a disfunção articular [15, 16] e a perda de massa óssea [17]. Os agentes erosivos da cartilagem articular, provenientes da artrite, vêm acompanhados de dor e incapacidade funcional [18]. Como a cartilagem articular só pode ser observada por métodos invasivos, é oportuno o desenvolvimento de processos de análise dos componentes da matriz extracelular que possam estar relacionados com a síntese ou a destruição do colágeno, como por exemplo, os glicosaminoglicanos ou a hidroxiprolina [19]. Moro e colaboradores [19] verificaram também que as concentrações destes componentes diferem de acordo com a função com que cada tipo de cartilagem articular exerce.

Segundo Larbre e colaboradores [16] as principais diferenças dos tipos de artrite estão diretamente relacionadas aos aspectos bioquímicos. Utilizando ratos *Wistar*, os autores observaram as diferenças das superfícies da cartilagem articular entre os sexos e verificaram que as fêmeas apresentaram maior susceptibilidade para a formação de granulomas na superfície articular e maior produção de hidroxiprolina que os animais machos. Karran e colaboradores [18] desenvolveram um modelo experimental de artrite em ratos *in vivo* e concluíram que a degradação da matriz cartilaginosa está diretamente relacionada com a síntese de proteoglicanos e síntese de hidroxiprolina.

Nas lesões osteocondrais, Altman e colaboradores [20] estudando o reparo da cartilagem articular degenerada em cães, observaram através de análise histológica, que após seis meses do início da lesão, houve pequena concentração de proteoglicanos e alta concentração de hidroxiprolina no local afetado. Citam ainda que os níveis elevados de hidroxiprolina foram favoráveis para a formação da cartilagem hialina e para a composição da regeneração do colágeno. O processo de reparo tecidual acontece como consequência da destruição produzida pela inflamação. O organismo tenta realizar ações no sentido de reconstituir a morfologia dos tecidos envolvidos e dar maior nível de funcionalidade para estes tecidos [21].

Estudando os efeitos das diferentes funções do colágeno nas epífises e diáfises dos ossos longos em ratos, Moro e colaboradores [19] afirmaram que a composição da matriz cartilaginosa é expressa pela razão molar de hidroxiprolina e que esta razão molar difere

nas diferentes regiões do esqueleto. Por exemplo, Froimson e colaboradores [22], verificaram que a cartilagem patelar apresenta maior rigidez cartilaginosa e menor conteúdo de hidroxiprolina, quando comparada com a cartilagem femoral, em humanos. Price e colaboradores [23] citaram que a análise da síntese do colágeno pela dosagem de hidroxiprolina no líquido sinovial do joelho de coelhos foi um fator importante no processo de análise de formação do colágeno. As concentrações altas de hidroxiprolina encontradas nas cartilagens articulares com degeneração podem ser consideradas favoráveis, como indicação da possível defesa contra o sistema degenerativo cartilaginoso e redução do quadro patológico [24-27].

A presença de outros tipos de células no líquido sinovial articular, como por exemplo, os leucócitos, podem ser uma fonte de enzimas proteolíticas ao redor da cartilagem articular [28, 29]. Portanto, há respostas diferentes aos distintos graus de lesão produzidos na articulação. Normalmente existe um equilíbrio entre a formação de colágeno e a sua degradação [30].

De acordo com Geetha e Varalakshmi [31], a dosagem de hidroxiprolina em modelos animais experimentais, através da indução da artrite pela injeção de adjuvante, tem sido uma técnica muito positiva para observação dos padrões de desenvolvimento e análise dos processos inflamatórios articulares. Reedy e Dhar [32] pesquisando as alterações metabólicas na matriz do tecido cartilaginoso em ratos, através da indução da artrite por adjuvante de Freund, observaram que a dosagem de hidroxiprolina no colágeno foi drasticamente reduzida no local, enquanto que a excreção urinária apresentava valores significativamente elevados, indicando possivelmente o aumento na degradação do colágeno produzido pela patologia.

As técnicas de dosagem de hidroxiprolina através da hidrólise do tecido cartilaginoso articular desenvolvidas por Stegman e Stalder [33] foram aprimoradas por Edwards e O'Brien [34] o que permitiu reduzir o tempo de análise para 4 horas.

Nesta tese utilizamos o adjuvante de Freund para a indução de artrite em cobaias (Guinea Pigs) e realizamos o controle do processo através da dosagem de hidroxiprolina, conforme a técnica de Edwards e O'Brien [34].

3.3. Referências

- [1] BRODSKY, B., SHAH, N.K., The triple-helix motif in proteins, *The FASEB Journal*, v.9, p.1537-1546, 1995.
- [2] KIELISZEWSKI, M.J., ONEILL, M., LEYKAN, J., ORLANDO, R. Tandem mass spectrometry and structural elucidation of glycopeptides from hydroxyproline-rich plant cell wall glycoprotein indicate that contiguous hydroxyproline residues are the major sites of hydroxyproline o-arabinosylation, *The Journal of Biological Chemistry*, v.270, p.2541-2549, 1995.
- [3] MAYO, K.H. NMR and X-ray studies of collagen model peptides, *Biopolymers*, v.40, p.359-370, 1996.
- [4] KADLER, K.E., HOLMES, D.F., CHAPMAN, J.A. Collagen fibril formation, *Biochemical Journal*, v.316, p.1-11, 1996.
- [5] ARBORELIUS Jr., M., KONTTINEN, Y.T., NORDSTROM, D.C., SOLOVIEVA, S.A. Gly-X-Y repeat sequences in the treatment of active rheumatoid arthritis, *Rheumatology International*, v.18 (4), 129-135, 1998.
- [6] BANN, J.G., BACHINGER, H.P. Glycosylation/hydroxylation-induced stabilization of the collagen triple helix – 4-trans-hydroxyproline in the Xaa position can stabilize the triple helix, *Journal of Biological Chemistry*, v.275 (32), p.24466-24469, 2000.
- [7] MOW, V.C., RATCLIFFE, A., POOLE, A.R., Cartilage and diarthrodial joint as paradigms for hierarchical materials and structures, *Biomaterials*, v.13 (2), p.67-97, 1992.
- [8] STRYER, L. Bioquímica, Capítulo 2, Estrutura e Função das Proteínas 4ª ed, Guanabara Koogan, p.30, 1996.
- [9] LIVNE, E. In vitro response of articular cartilage from mature mice to human transforming growth factor beta, *Acta Anat.*, v.149, p.185-194, 1994.
- [10] TAKAHASHI, M., KUSHIDA, K. HOSHINO, H., SUZUKI, M., SANO, M., MIYAMOTO, S., INOUE, T., Concentration of pyridinoline and deoxypyridinoline in joint from patients with osteoarthritis or rheumatoid arthritis, *Annals of Rheumatic Diseases*, v.55 (55), 324-327, 1996.
- [11] MOSKOWITZ, R.W. Role of collagen hydrolysate in bone joint disease, *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, v.30 (2), v.87-99, 2000.
- [12] LI, Z.Q., HOU, W.S., BROMME, D. Colagenolytic of cathepsin K is specifically modulated by cartilage-resident chondroitin sulfates, *Biochemistry*, v.39 (3), 529-536, 2000.

- [13] ARBORELIUS, M. Jr., KONTTINEN, Y.T., NORDSTROM, D.C., SOLOVIEVA, S.A. Gly-X-Y repeat sequences in the treatment of active rheumatoid arthritis, v.18 (4), p.129-135, 1998.
- [14] GOLDBERG, M.E. Correlation of histopathology and sulfated proteoglycans in human osteoarthritic hip cartilage, *J. Orthop. Res.*, v.1, p.302-312, 1984.
- [15] SANDY, BARRACH, H.J., FLANNERY, C.R., PLAAS, A.H.K. The biosynthetic response of the mature chondrocyte in early osteoarthritis, *J. Rheumatol.*, v.14, p.16-18, 1987.
- [16] LARBRE, J.P., Da SILVA, J.A.P., MOORE, L.T., JAMES, I.T., SCOTT, D.L., WILLOUGHBY, D.A. Cartilage contribution to gender differences in joint disease progression. A study with rat articular cartilage, *Clinical and Experimental Rheumatology*, v.12 (4), p.401-408, 1994.
- [17] CORTET, B. FLIPO, R.M., DUQUESNOY, B., DELCAMBRE, B. Bone tissue rheumatoid-arthritis. 2. Pathophysiologic data, pathological findings, and therapeutic implications, *Revue du Rhumatisme*, v.62 (3), 205-211, 1995.
- [18] KARRAN, E.H., YOUNG, T.J., MARKWELL, R.E., HARPER, G.P. In vivo model of cartilage degradation – effects of a matrix metalloproteinase inhibitor, *Annals of the Rheumatic Diseases*, v.54 (8), p.662-669, 1995.
- [19] MORO, L., ROMANELLO, M., FAVIA, A., LAMANNA, M.P., LUZOPONE, E. Posttranslational modifications of bone collagen type I are related to the function of rat femoral regions, *Calcified Tissue International*, v.66 (2), p.151-156, 2000.
- [20] ALTMAN, R.D., KATES, J., CHUN, L.E., DEAN, D.D., EYRE, D. Preliminary-observations of chondral abrasion in a canine model, *Annals of the Rheumatic Diseases*, v.51 (9), p.1056-1062, 1992.
- [21] SETTON, L.A., ELLIOTT, D.M., MOW, V.C. Altered mechanics of cartilage with osteoarthritis: human osteoarthritis and an experimental model of joint degeneration, *Osteoarthritis and cartilage*, v.7 (1), p.2-14, 1999.
- [22] FROMSON, M.I., RATCLIFFE, A., GARDNER, T.R., MOW, V.C. Differences in patellofemoral joint cartilage material properties and their significance to the etiology of cartilage surface fibrillation, *Osteoarthritis and Cartilage*, v.5 (6), p.377-386, 1997.
- [23] PRICE, F.M., LEVICK, J.R., MASON, R.M. Glycosaminoglycan concentration in synovium and other tissues of rabbit knee in relation to synovial hydraulic resistance, *Journal of Physiology-London*, v.495 (3), p.803-820, 1996.
- [24] KOCAMIS, H, YENI, Y.N., BROWN, C.U., KENNEY, P.B., KIRKPATRICK-KELLER, D.C., KILLEFER, J., Effect of in ovo administration of insulin-like growth

- factor-I on composition and mechanical properties of chicken bone, *Poultry Science*, v.79 (9), 1345-1350, 2000.
- [25] De NANTEUIL, G., PORTVIN, B., FRADIN, A., BONNET, J. 5-imidazol-1yl-1H-benzimidazoles as interleukin-1 inhibitors: a key approach in the search of new treatment for osteoarthritis, *Actualite Chimique*, v.7-8, p.48-54, 2000.
- [26] PAZZANO, D., MERCIER, K.A., MORAN, J.M., FONG, S.S., DiBIASIO, D.D., RULFS, J.X., KOHLES, S.S., BONASSAR, L.J. Comparison of chondrogenesis in static and perfused bioreactor culture, *Biotechnology Progress*, v.16 (5), p.893-896, 2000.
- [27] OTTERNESS, I.G., CHANG, M., BURKHARDT, J.E., SWEENEY, F.J., MILICI, A.J. Histology and tissue chemistry of tidemark separation in hamsters, *Veterinary Pathology*, v.36 (2), p.138-145, 1999.
- [28] AMAN, S., RISTELI, J., LUUKKAINEN, R., RISTELI, L., KAUPPI, M., NIEMINEN, P. HAKALA, M. The value of synovial fluid analysis in the assessment of knee joint destruction in arthritis in a three year follow up study, *Annals of The Rheumatic diseases*, v.58 (9), p.559-562, 1999.
- [29] MEYER, P. BURKHARDT, H., PALOMBO-KINNE, E., GRUNDER, W., BRAUER, R., STILLER, K.J., KALDEN, J.R., BECKER, W., KINNE, R.W. I-123-antileukoproteinase scintigraphy reveals microscopic cartilage alterations in the contralateral knee joint of rats with "monarticular" antigen-induced arthritis, *Arthritis and Rheumatism*, v.43 (2), p.298-310, 2000.
- [30] TANAKA, S., HAMANISHI, C., KIKUCHI, H., FUKUDA, K. Factors related to degradation of articular cartilage in osteoarthritis: A review, *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, v.27 (6), p.392-399, 1998.
- [31] GEETHA, T., VARALAKSHMI, P. Effect of lupeol and lupeol linoleate on lysosomal enzymes and collagen in adjuvant-induced arthritis in rats, *Molecular and Cellular Biochemistry*, v.201 (1-2), p.83-87, 1999.
- [32] REDDY, G.K., DHAR, S.C. Metabolic studies on connective-tissue collagens in bone and tendon of adjuvant arthritic rat, *Calcified Tissue International*, v.50 (4), 320-326, 1992.
- [33] STEGMAN, H. STALDER, K. Determination of hydroxyproline, *Clinica Chimica Acta*, v.18, p.267-273, 1967.
- [34] EDWARDS, C.A., O'BRIEN, W.D. Jr. Modified assay for determination of hydroxyproline in a tissue hydrolyzate, *Clinical Chemistry Acta*, v.104 (2), p.161-167, 1980.

Capítulo IV

Materiais e Métodos Utilizados

4.1. Introdução

Utilizamos animais do tipo cobaia - *Cavia porcellus*, com aproximadamente 60 dias de idade, machos, e massa corporal média de 550g. Os animais foram provenientes do Biotério Central da UNICAMP. Foram mantidos no Biotério do Laboratório de Biodinâmica do Departamento de Educação Física, do Instituto de Biociências da UNESP - Campus de Rio Claro, onde foram manipulados. Durante as experiências os animais foram alimentados com ração balanceada tipo padrão para roedores (Purina), com suplementação de forrageira gramínea (*Brachiaria decumbens*) e água *ad libitum*, e permaneceram em gaiolas coletivas em ambiente com temperatura controlada de 25° C e foto-período claro/escuro de 12 horas. Nenhum dos animais foi utilizado para mais de uma experiência.

Os animais (menos os de controle) foram submetidos à indução de artrite pela injeção de adjuvante de Freund, conforme será descrito nos próximos parágrafos. A irradiação dos animais foi feita com dois tipos diferentes de lasers (laser de HeNe e laser de GaAs). Deve ficar claro que os dois tipos de laser foram aplicados em grupos independentes, isto é, os animais que receberam a irradiação com laser de HeNe não receberam a irradiação com laser de GaAs. Os animais que não foram sujeitos à indução ou a radiação com laser foram manipulados no mesmo local e aproximadamente no mesmo horário dos animais tratados.

A escolha da indução da artrite pelo adjuvante de Freund deve-se ao fato deste procedimento ser um modelo experimental já bem analisado e discutido na literatura como um modelo de artrite em animais [1-3].

A escolha dos lasers deveu-se principalmente ao fato dos lasers operarem em diferentes regiões espectrais (laser de HeNe no visível e laser de GaAs no infravermelho

próximo), além de sua disponibilidade. Detalhes dos procedimentos de irradiação serão discutidos nos próximos parágrafos.

A escolha do sacrifício aos 7, 14 e 21 dias após a indução é devida ao fato da inflamação já estar caracterizada a partir de 5 dias após a indução, sendo que o pico do processo inflamatório ocorre após 20 dias da indução [1–5].

A Tabela 4.1 sumariza a divisão dos grupos de animais e em relação aos procedimentos.

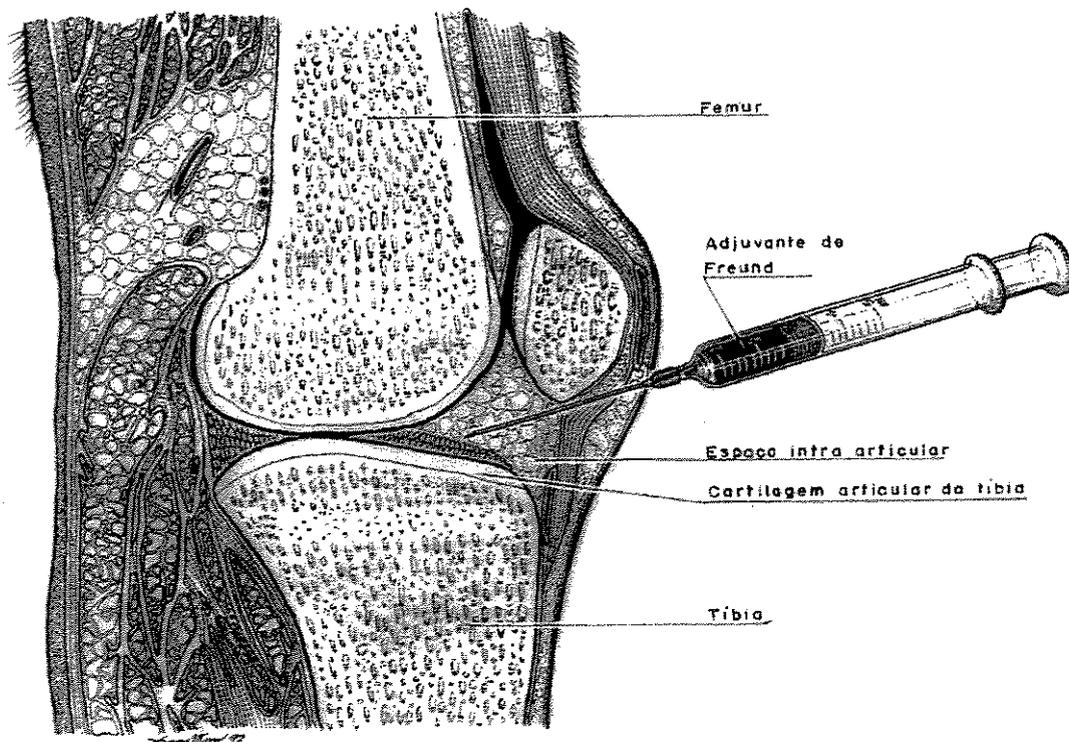
Tabela 4.1. Esquema dos grupos de animais que foram utilizados na experiência, respectivos dias de sacrifício após a indução, densidade de energia aplicada por dia em J/cm², tipo de laser utilizado e número de animais (n)

GRUPOS	7 dias	14 dias	21 dias
1. Placebo	n = 25		
2. Artrite sem Laser	Apenas inflamação n = 60	Apenas inflamação n = 60	Apenas inflamação n = 60
3. Artrite com Laser HeNe	0,5, 7, 50 J/cm ² 2 dias de aplicação n = 60	0,5, 7, 50 J/cm ² 9 dias de aplicação n = 60	0,5, 7, 50 J/cm ² 16 dias de aplicação n = 60
4. Artrite com Laser GaAs	1,0, 5, 25 J/cm ² 2 dias de aplicação n = 60	1,0, 5, 25 J/cm ² 9 dias de aplicação n = 60	1,0, 5, 25 J/cm ² 16 dias de aplicação n = 60

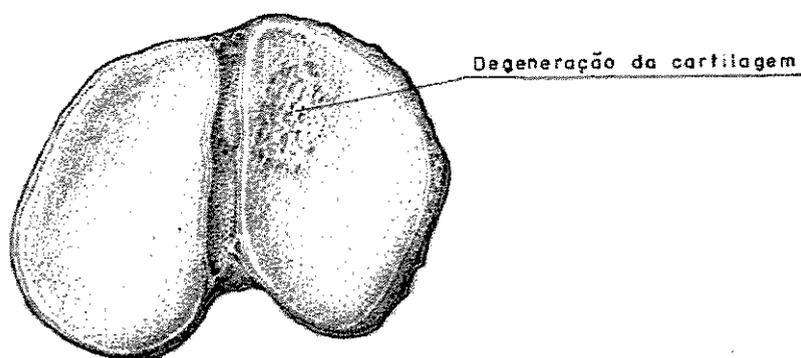
4.2. Indução da artrite

Os procedimentos foram realizados com técnicas assépticas. A anestesia dos animais foi feita por inalação de éter etílico. Os animais foram presos a uma prancha cirúrgica para não se movimentarem durante todo o procedimento. Após a realização de uma tricotomia no joelho da pata posterior direita, foi realizada uma de injeção articular com 0,1 ml de adjuvante de Freund incompleto (vide a Figura 4.1). O joelho esquerdo não sofreu nenhuma espécie de indução ou tratamento. Cinco dias após a realização da

indução, a inflamação articular podia ser perfeitamente diagnosticada tanto pelo inchaço da região como pelo comportamento do animal de proteger a pata correspondente do apoio ao chão.



(a)



(b)

Figura 4.1- (a) Esquema ilustrativo da vista lateral da articulação do joelho da cobaia sendo submetida a injeção de adjuvante de Freund. - (b) Vista superior da tibia da cobaia indicando o local onde tipicamente ocorre a inflamação degenerativa da cartilagem (artrite).

4.3. Irradiação com laser

Os procedimentos de irradiação do laser foram os seguintes. Os animais foram anestesiados e sofreram uma tricotomia no joelho da pata posterior direita antes de serem expostos a radiação dos lasers. Foram utilizados lasers de Hélio Neônio (HeNe) e de Arseneto de Gálio (GaAs). Os animais foram fixados em uma prancha cirúrgica e o laser foi montado conforme o esquema ilustrativo apresentado na Figura 4.2. O laser foi fixado a 0,5 mm de distância da pele do animal através de um suporte.

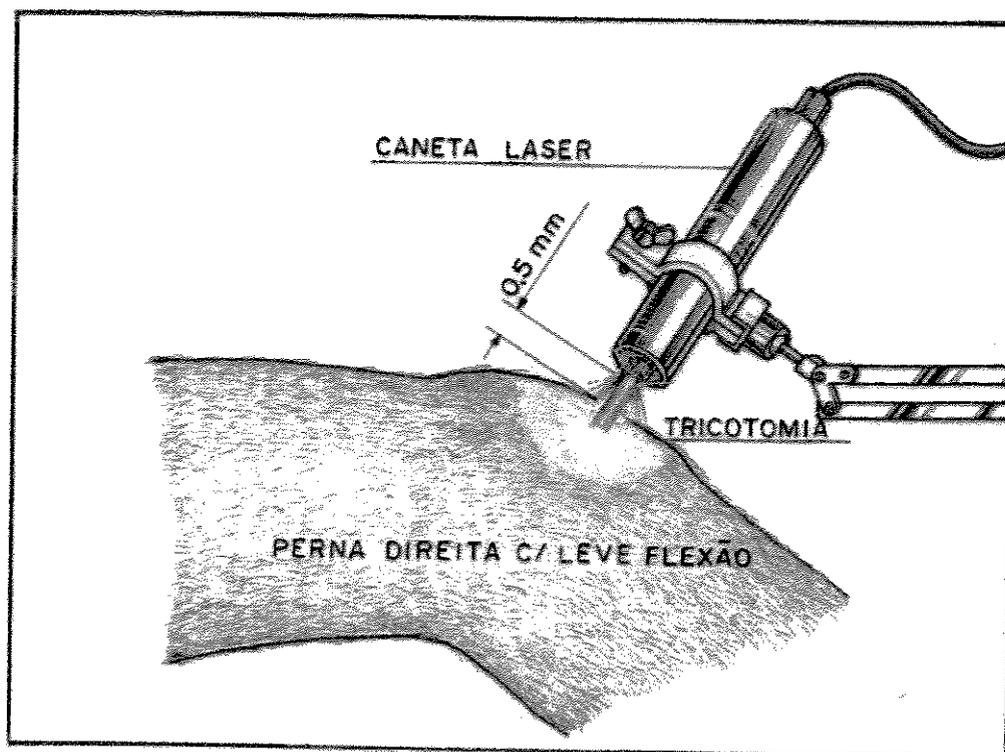


Figura 4.2. Esquema ilustrativo da irradiação com laser na pata dos animais experimentais.

Utilizamos um laser de HeNe ($\lambda = 632,8 \text{ nm}$) com potência contínua de 6 mW, diâmetro do feixe de 2 mm e com emissão contínua. Foram realizadas aplicações diárias nos períodos de 2 segundos, 37 segundos e 95 segundos, que correspondem aproximadamente às doses com densidades de energia de 0,5, 7,0 e 50 J/cm². Estas doses

foram calculadas supondo uma distribuição uniforme com o diâmetro do feixe de laser de 2 mm.

Utilizamos também um laser de GaAs ($\lambda = 904$ nm) da BIOSSET – Indústria de Tecnologia Ltda, com potência de pico de 20 W, frequência de 2 kHz, largura de pulso de 0,2 μ s e potência média de 45 mW. Foram realizadas aplicações diárias nos períodos de 23 segundos, 115 segundos e 575 segundos, que correspondem aproximadamente às doses com densidade de energia média de 1,0, 5,0 e 25,0 J/cm². Estas doses foram calculadas uma distribuição uniforme com o diâmetro do feixe de laser de 5 mm.

Deve-se observar que apesar das densidades de energia média serem próximas, as intensidades reais são bem diferentes. No caso do laser de HeNe a densidade de energia é constante e igual a média e no caso do laser de GaAs a densidade de energia é o valor médio entre o a largura do pulso e a frequência de pulsos.

4.4. Análise bioquímica da dosagem de hidroxiprolina

A dosagem de hidroxiprolina é de interesse quando há suspeita de modificações na bioquímica natural do colágeno [6-12]. As dosagens foram realizadas segundo o método de Stegeman e Stalder [13] com cloramina -T, aperfeiçoado pelo processo de hidrólise de Edwards e O'Brien [14]. Para a realização deste trabalho recebemos a orientação profissional e os protocolos de execução do Prof. Dr. Hernandes F. Carvalho, do Departamento de Biologia Celular do IB da UNICAMP.

A cartilagem articular foi extraída dos animais e imersa em acetona durante 24 h e em seguida seca em estufa a 37 °C (24 h). Em seqüência, o material foi pesado, hidrolisado em ácido clorídrico (6N), mantido em ampolas de vidro seladas, conservadas na estufa a 130 °C por quatro horas, sendo posteriormente filtrado. A oxidação da hidroxiprolina foi realizada pela cloramina-T, com a adição de um composto de coloração vermelha (4P-dimetilaminobenzaldeído). A determinação da concentração de hidroxiprolina foi feita pela comparação da absorção óptica espectral da solução colorida com soluções padrões de hidroxiprolina.

4.5. Preparação das Amostras para Microscopia Eletrônica de Varredura

Para os procedimentos de microscopia eletrônica de varredura, que visavam principalmente a avaliação morfológica do arranjo, orientação e continuidade das fibrilas de colágeno [15, 16], as amostras (cartilagens articulares da tibia) foram inicialmente dissecadas e fixadas em Karnowsky por 72 horas em geladeira. Logo após, foram desidratadas em um série de etanóis com concentrações crescentes (70 a 100%), passando em seguida por uma mistura de etanol e acetona (1:1), e dois banhos de acetona (100 PA), com duração de 10 minutos para cada banho. Em seguida, o material foi levado ao ponto crítico (Balzers CPD/030) para completa secagem. Finalmente, as amostras foram coladas em suportes de alumínio com fita adesiva dupla face e revestidas com filme fino de ouro em pulverizadora (sputtering) Balzers. Foi utilizado um Microscópio Eletrônico de Varredura modelo JSM – P15 Stereoscan.

4.6. Preparação das Amostras para Microscopia de Força Atômica

As cartilagens foram extraídas e preparadas seguindo os mesmos procedimentos utilizados na preparação das amostras para a microscopia eletrônica de varredura, com exceção do processo de “sputtering”. As amostras foram colocadas no porta-amostras do microscópio de força atômica em áreas de no máximo $1 \times 1 \text{ cm}^2$. As análises foram feitas no sentido longitudinal, para facilitar as possíveis observações da ordem molecular de organização das fibras. As varreduras foram realizadas nas regiões mais planas da amostra, para permitir observar as estruturas das regiões superficiais da cartilagem, caracterizando assim as condições de organização interna das fibras e microfibrilas do colágeno.

Foi utilizado um MFA da empresa Topometrix. Foram escolhidas as regiões menos irregulares das amostras para que não houvesse comprometimento da qualidade da análise. Foram respeitados os procedimentos necessários no sistema de isolamento contra ruídos e vibrações induzidas por fatores externos no equipamento [17-24].

4.7. Teste de resistência mecânica de compressão

As tíbias direita e esquerda das cobaias foram extraídas, limpas dos tecidos moles e conservadas em congelador a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ [25] até a realização do teste de resistência de compressão mecânica. O material foi transportado, em recipiente isolante térmico, até o Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. Após o descongelamento por um período de 1 hora, foram observados aspectos macroscópicos do material para a comprovação de sua integridade, como coloração do tecido e ausência de estruturas sobre a superfície da cartilagem articular.

O teste de indentação mecânica é o método mais utilizado para análise das propriedades biomecânicas da cartilagem articular [26-33]. Os testes foram feitos em uma máquina universal de ensaios mecânicos Kratos K5002 utilizando célula de carga 100 kgf/mm^2 , velocidade de aplicação de carga de 20 mm/min , acompanhada por registrador gráfico. Na realização dos ensaios, foi desenvolvida uma ponteira para melhorar a precisão das medidas e limitar a área de análise da cartilagem articular, de modo a não acometer o osso subcondral de maneira significativa. Foi desenvolvida uma ponteira de 4 mm de diâmetro com angulação de 120° até sua extremidade. Para a obtenção dos resultados dos testes de indentação mecânica, os seguintes parâmetros de análise foram avaliados: o “ Δ (delta) – penetração” ou “D-penetração”, que nos mostra a distância percorrida pelo punção (mm) desde o primeiro contato com a cartilagem até o máximo de carga (Pico de Carga em N (Newtons)). A carga de equilíbrio, que ocorre no curto espaço de tempo em que ocorre a compressão com deslocamento dos líquidos da cartilagem até atingir um patamar de equilíbrio, “ Δ pico-equilíbrio” (ou D-pico-equi), que serve como parâmetro de padronização do ensaio pois atua sempre dentro da fase elástica. Medimos também o “ Δ (Deslissamento)” que é o tempo desde o momento em que o punção toca a cartilagem até o final da aplicação de carga. Estas medidas foram representadas em gráficos pelo computador acoplado ao equipamento e coletados, fornecendo o valor final da rigidez.

Os testes foram realizados com a superfície da cartilagem dividida em duas regiões (Platô Tíbia Medial e Platô Tíbia Lateral) para se observar diferenças eventuais entre as áreas lesadas. Foram utilizadas as cartilagens da tíbia direita e da tíbia esquerda do mesmo animal, sendo que a Tíbia esquerda foi sempre utilizada como controle intacto, isto é, sem

inflamação e sem aplicação de lasers. Foram aplicados testes estatísticos de variância simples (ANOVA (3 caminhos) e Bonferroni) entre as tíbias direita e esquerda.

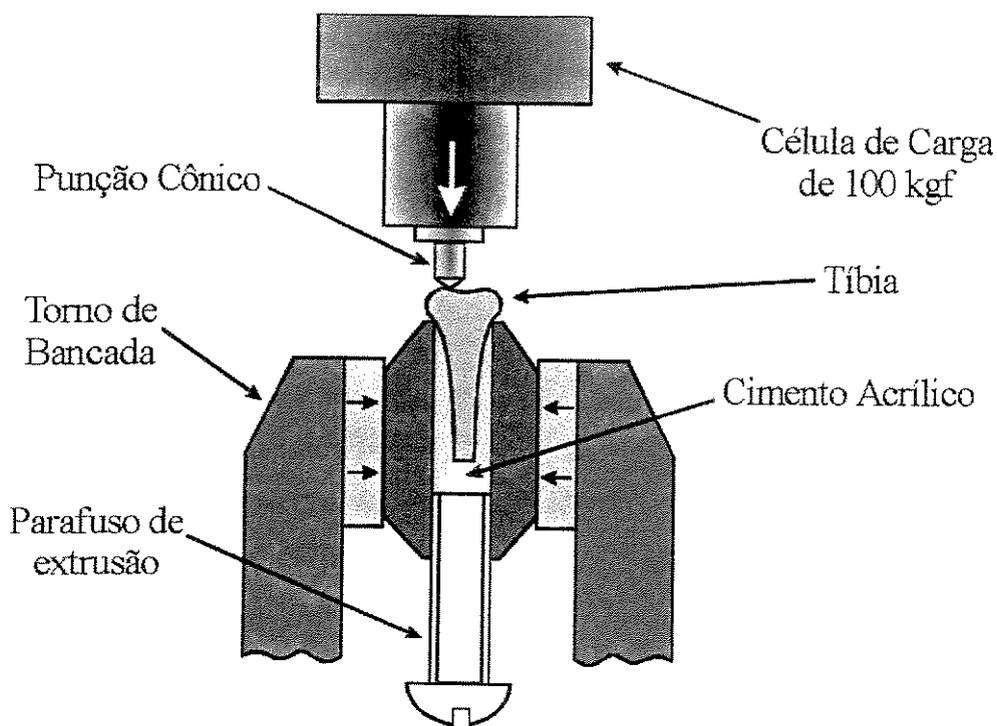


Figura 4.3. Esquema ilustrativo da realização dos testes de compressão mecânica (indentação) das cartilagens articulares das cobaias. A parte inferior das tíbias foi fixada em cimento acrílico, sendo testados os platôs tibiais lateral e medial.

4.8. Referências

- [1] HENZGEN, S., PETROW, P.K., THOSS, K., BRAUER, R. Degradation of articular cartilage during the progression of antigen-induced arthritis in mice: A scanning and transmission electron microscopic study, *Experimental and Toxicological Pathology*, v.48 (4), p.255-263, 1996.
- [2] CREMER, M.A., YE, X.J., TERATO, K., GRIFFITHS, M.M., WATSON, W.C., KANG, A.H. Immunity to type IX collagen in rodents: a study of type IX collagen for autoimmune and arthritogenic activities, *Clinical and Experimental Immunology*, v.112 (3), p.375-382, 1998.

- [3] SATO, M.I., KOSHINO, T., TAKAGI, T. CD44 expression on chondrocytes in knees of DBA/1 mice with type II collagen-induced arthritis, *Clinical and Experimental Rheumatology*, v.17 (2), p.185-190, 1999.
- [4] TEM BOKUM, A.M.C., KALIGIS, E.G.R.L., MELIEF, M.J., VAN KOETSVELD, P.M., BRUNS, C., VAN HAGEN, P.M., HOFLAND, L.J., LAMBERTS, S.W.J., HAZENBERG, M.P. Somatostatin receptor subtype expression in cells of the rat immune system during adjuvant arthritis, *Journal of Endocrinology*, v.161 (1), p.167-175, 1999.
- [5] MOLLER, K.O., WETHLING, H., ABEL, H.H., LIND, B.M., KARCHER, K., SCHRAMM, U., HOHLBACH, G. Studies on an immunologically induced synovitis model in pigs and sheep, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, v.361, p.228-236, 1999.
- [6] KIELISZEWSKI, M.J., ONEILL, M., LEYKAN, J., ORLANDO, R. Tandem mass spectrometry and structural elucidation of glycopeptides from hydroxyproline-rich plant cell wall glycoprotein indicate that contiguous hydroxyproline residues are the major sites of hydroxyproline o-arabinylation, *The Journal of Biological Chemistry*, v.270, p.2541-2549, 1995.
- [7] MAYO, K.H. NMR and X-ray studies of collagen model peptides, *Biopolymers*, v.40, p.359-370, 1996.
- [8] KADLER, K.E., HOLMES, D.F., CHAPMAN, J.A. Collagen fibril formation, *Biochemical Journal*, v.316, p.1-11, 1996.
- [9] ARBORELIUS Jr., M., KONTTINEN, Y.T., NORDSTROM, D.C., SOLOVIEVA, S.A. Gly-X-Y repeat sequences in the treatment of active rheumatoid arthritis, *Rheumatology International*, v.18 (4), 129-135, 1998.
- [10] BANN, J.G., BACHINGER, H.P. Glycosylation/hydroxylation-induced stabilization of the collagen triple helix – 4-trans-hydroxyproline in the Xaa position can stabilize the triple helix, *Journal of Biological Chemistry*, v.275 (32), p.24466-24469, 2000.
- [11] MOSKOWITZ, R.W. Role of collagen hydrolysate in bone joint disease, *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, v.30 (2), v.87-99, 2000.
- [12] LI, Z.Q., HOU, W.S., BROMME, D. Colagenolytic of cathepsin K is specifically modulated by cartilage-resident chondroitin sulfates, *Biochemistry*, v.39 (3), 529-536, 2000.
- [13] STEGEMAN, H. STALDER, K. Determination of hydroxyproline, *Clinica Chimica Acta*, v.18, p.267-273, 1967.
- [14] EDWARDS, C.A., O'BRIEN, W.D. Jr. Modified assay for determination of hydroxyproline in a tissue hydrolyzate, *Clinical Chemistry Acta*, v.104 (2), p.161-167, 1980.

- [15] RASPANTI, M., GUIZZARDI, S., STROCCHI, R., RUGGERI, A. Collagen fibril patterns in compact bone: Preliminary Ultrastructural Observations, *Acta Anatomica*, v.155, p.249-256, 1996.
- [16] KIM, H.A., LEE, Y.J., SEONG, S.C., CHOE, K.W., SONG, Y.W. Apoptotic chondrocyte death in human osteoarthritis, *Journal of Rheumatology*, v.27 (2), p.455-462, 2000.
- [17] CHERNOFF, E.A.G. CHERNOFF, D.A. Atomic force microscope images of collagen fibers, *Journal Vacuum Technology*, v.10, p.596-599, 1992.
- [18] ARAGNO, I., ODETTI, P., ALTAMURA, F., CAVALLERI, O., ROLANDI, R. Structure of rat tail tendon collagen examined by atomic force microscopy, *Experientia*, v.51, p.1063-1067, 1995.
- [19] FUJITA, Y., KOBAYASHI, K., HOSHINO, T. Atomic force microscopy of collagen molecules. Surface morphology of segment-long-spacing (SLS) crystallites of collagen, *Journal of Electron Microscopy*, v.46, p.321-326, 1997.
- [20] PARIZOTTO, N. Ação do laser Hélio-Neônio sobre o processo de reparo tecidual: Um estudo do colágeno por microscopia eletrônica de varredura, microscopia de força atômica e espectroscopia por infravermelho, Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, UNICAMP, Campinas, 181 p., 1998.
- [21] HULMES, D.J.S, WESS, T.J., PROCKOP, D.J., FRATZL, P. Radial packing, order, and disorder in collagen fibrils *Biophysical Journal*, v.68, p.1661-1670, 1995.
- [22] BARANAUSKAS, V., VIDAL, B.C., PARIZOTTO, N.A. Observation of geometric structure of collagen molecules by atomic force microscopy, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.69, p.91-97, 1998.
- [23] KURE, M., ARAKI, K., OGATA, T. Scanning tunneling microscopic study of osmium collagen, *Journal of Electron Microscopy*, v.44, p.207-211, 1995.
- [24] JURVELIN, J.S., MULLER, D.J., WONG, M., STUDER, D., ENGEL, A., HUNZIKER, E.B. Surface and subsurface morphology of bovine humeral articular cartilage as assessed by atomic force and transmission electron microscopy, *Journal of Structural Biology*, v.117, p.45-54, 1996.
- [25] VAHEY, J.W., LEWIS, J.L., VANDERBY, J.R. Elastic moduli, yield stress, and ultimate stress of cancellous bone in the canine proximal femur, *Journal of Biomechanics*, v.20 (1), p.29-33, 1987.
- [26] SUH, J.K., SPILKER, R.L. Indentation analysis of biphasic articular cartilage-nonlinear phenomena under finite deformation, *Journal of Biomechanical Engineering-Transactions of the ASME*, v.116 (1), p.1-9, 1994.

- [27] KOVACH, I.S., ATHANASIOU, K.A. Small-angle HeNe laser light scatter and the compressive modulus of articular cartilage, *Journal of Orthopaedic Research*, v.15 (3), p.437-441, 1997.
- [28] AKAI, M., USUBA, M., MAESHIMA, T. SHIRASAKI, Y., YASUOKA, S. Laser's effect on bone and cartilage change induced by joint immobilization: Na experiment with animal model, *Lasers in Surgery and Medicine*, v.21 (5), p.480-484, 1997.
- [29] COHEN, N.P., FOSTER, R.J., MOW, V.C. Composition and dynamics of articular cartilage: Structure, function, and maintaining healthy state, *Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy*, v.28 (4), p.203-215, 1998.
- [30] MOW, V.C., WANG, C.C.B. Some bioengineering considerations for tissue engineering of articular cartilage, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, v.367 S, p.204-223, 1999.
- [31] NUKI, G. Osteoarthritis: a problem of joint failure. *Zeitschrift fur Rheumatologie*, v.58 (3), p.142-147, 1999.
- [32] CHEN, C.T., BURTON-WURSTER, N., BANK, R.A., TEKOPPELE, J.M. Compositional and metabolic changes in damage cartilage are peak-stress, stress-rate, and loading-duration dependent, *Journal of Orthopaedic Research*, v.17 (6), p.870-879, 1999.
- [33] COSTA, K.D., YIN, F.C.P. Analysis of indentation: Implications for measuring mechanical properties with atomic force microscopy, *Journal of Biomechanical Engineering-Transactions of the ASME*, v.121 (5), p.462-471, 1999.

Capítulo V

Resultados e discussões da microscopia eletrônica de varredura

5.1. Introdução

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma técnica muito poderosa para análise ultra-estrutural da superfície de diversos materiais. Neste tipo de técnica a preparação das amostras requer cuidados específicos na fixação do material (no caso de materiais biológicos), na desidratação (para que a amostra não seja destruída no vácuo) e na metalização (se a amostra não for boa condutora elétrica).

Neste capítulo serão descritos os resultados e discussões, obtidas através da análise das cartilagens pela MEV.

5.2. Grupo de controle (sem aplicação de laser) com cartilagem intacta e cartilagem com inflamação induzida.

Em todas as etapas realizadas através da análise de MEV foram utilizados 3 animais de cada grupo ($n = 3$). A Figura 5.1 apresenta uma imagem de MEV típica da superfície da cartilagem articular se apresenta íntegra, isto é, sem nenhum acometimento patológico ou processo regenerativo. Pode-se observar a homogeneidade do tecido, assim como, a ausência de depressões, rugosidades e diferentes tipos celulares em sua superfície, conforme é a descrição morfológica das cartilagens integras [1, 2].

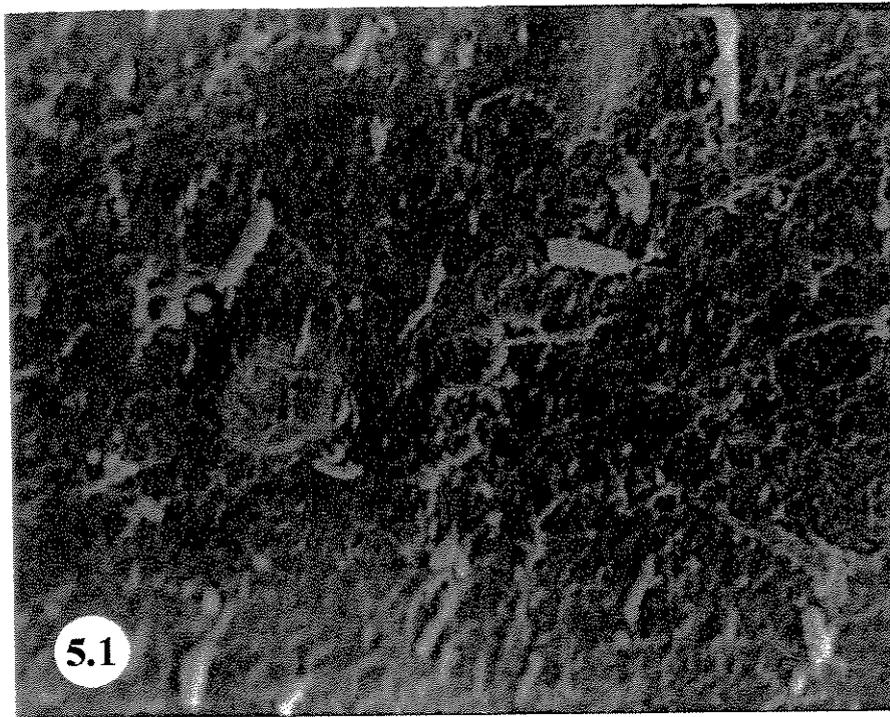


Figura 5.1. Imagem típica de Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da superfície de uma cartilagem articular sem lesão. A superfície tem uma morfologia plana, com pouco material aderido (4.000 X).

A Figura 5.2 (a, b, c) mostra uma seqüência evolutiva de micrografias obtidas pela MEV do processo inflamatório induzido na cartilagem pela injeção sinovial do adjuvante de Freund. A seqüência (a, b, c) mostra a evolução do estágio agudo (a) para o estágio crônico (c).

A Figura 5.2 (a) corresponde a MEV típica da cartilagem dos animais ($n = 3$ animais) depois de 7 dias da indução da inflamação. Pode-se observar alterações significativas na superfície cartilaginosa quando comparados com o grupo de controle sem inflamação (Figura 5.1). Pode-se observar claramente na Figura 5.2 (a) a descolação e o dobramento de uma camada delgada da superfície articular descolada, o que é um dos indicadores para a caracterização do processo inflamatório, com a cartilagem mostrando aspectos de ulceração. Estes resultados foram coerentes com os verificados por diversos autores [3-7] que também observaram ulcerações cartilaginosas provocadas pela aplicação do adjuvante ocorrem entre o quinto e o sétimo dia após a indução. Henzgen e colaboradores [4] relataram através da MEV, que a inflamação através da indução articular de adjuvante de Freund incompleto, têm início na primeira hora após ser injetado, e que, em

apenas um dia as fibras de colágeno sofrem ruptura. Os condrócitos na camada superficial da cartilagem tornam-se necrosados, e entre o quinto e sétimo dia ocorrem alterações consideradas agudas da artrite, na superfície da cartilagem [5-7].

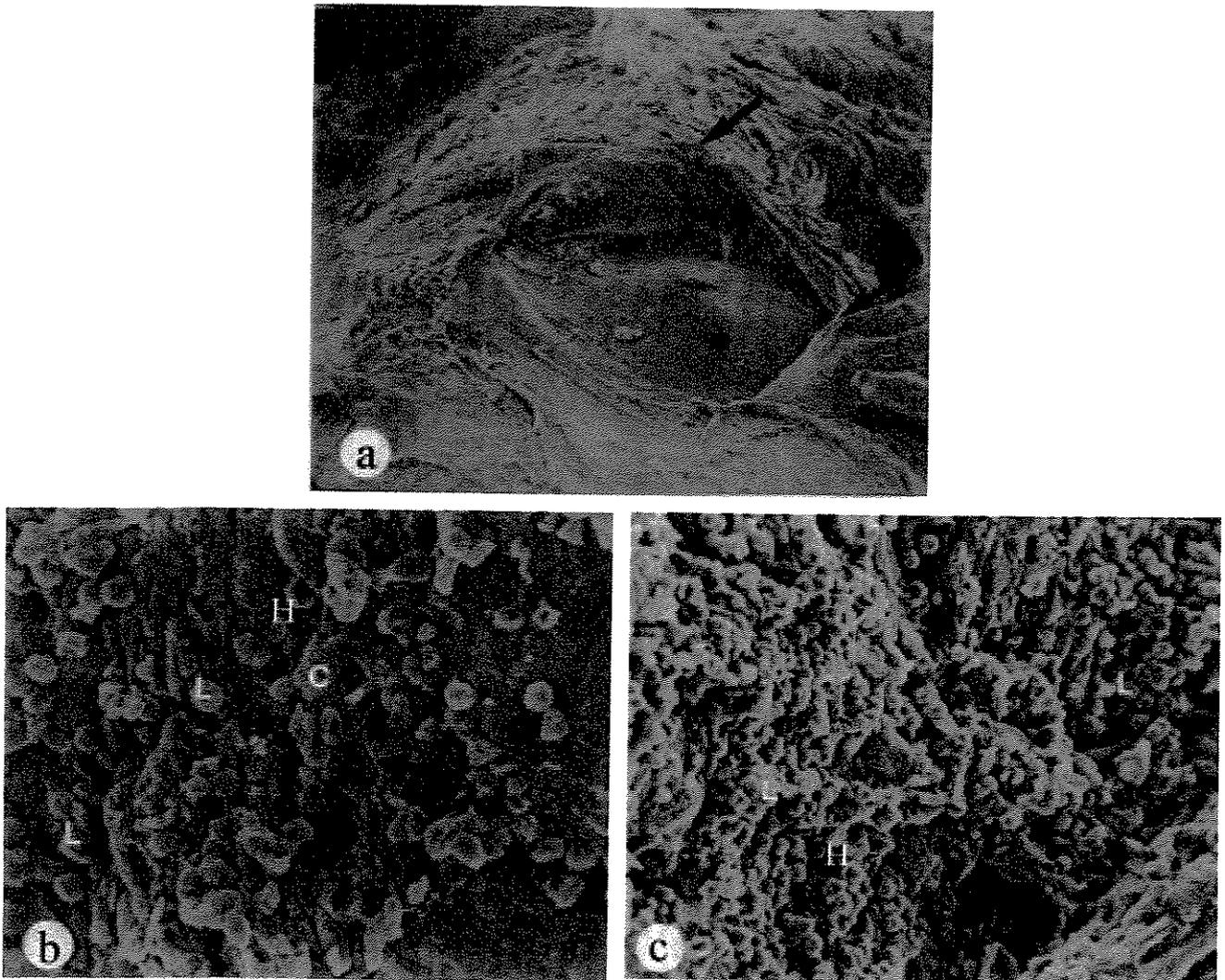


Figura 5.2. (a, b, c). Micrografias de MEV mostrando a superfície da cartilagem articular inflamada sem aplicação de laser. **(a)** Inflamação após 7 dias da indução. Notar a superfície articular deslocada e rebatida (setas) mostrando aspectos de ulceração (*) (60 X). Notar, também a irregularidade na superfície da cartilagem. **(b)** Inflamação após 14 dias da indução. Detalhe do aspecto da cartilagem (C) mostrando grande número de células sanguíneas, onde L = leucócitos e H = hemácias. Notar que a superfície é bastante irregular, com saliências e reentrâncias (setas) (1.600 X). **(c)** Inflamação após 21 dias da indução. É possível observar nesta imagem a fase crônica da inflamação onde células sanguíneas são abundantes (L e H) e a superfície da cartilagem apresenta depressões (D) com diferentes profundidades (1.600 X).

Nos animais com 14 dias de inflamação (Figura 5.2b), foi possível constatar grande alteração na superfície cartilaginosa articular. Observou-se que a inflamação promoveu o aparecimento de um grande número de tipos celulares. Quando comparado: o aspecto da superfície cartilaginosa, neste momento, com a de controle (Fig. 5.1) sem a lesão, a quantidade de células sanguíneas presentes (leucócitos e hemácias) foi bastante significativa e a superfície cartilaginosa apresentou uma forma muito irregular, indicando a acentuação do processo inflamatório.

Os leucócitos são células relacionadas à defesa do organismo, o que justifica sua presença no processo inflamatório. São células, aparentemente esféricas, porém capazes de tomar aspecto amebiforme, ou seja, emitir prolongamentos citoplasmáticos, como aparentemente é possível se ver nos detalhes apresentados nas figuras 5.3 (b) e 5.3 (c) [4]. Esses prolongamentos conferiram um aspecto rugoso na superfície celular dos leucócitos. Já as hemáceas são células anucleadas e têm a forma de um disco bicôncavo. Possuem também uma superfície lisa, diferentemente dos leucócitos [8]. Essas células estão envolvidas no processo de transporte de gases e não de defesa, mas por se apresentarem em maior número no sistema sanguíneo se fazem presentes nos processos inflamatórios [9]. A presença de hemáceas no momento da lesão pode estar relacionada com o extravasamento de sangue provocado pela vasodilatação em resposta a inflamação. Isto está de acordo com Najafipour e Ferrell [10], os quais verificaram um grande aumento no fluxo sanguíneo articular após indução da inflamação através de carriginina e associaram este resultado ao efeito vasoconstritor provocado pela inflamação.

Os animais com 21 dias de inflamação (vide a Figura 5.2 (c)) apresentaram tipicamente uma superfície cartilaginosa articular altamente desorganizada, com saliências e reentrâncias, dando aspecto de depressões com diferentes profundidades. Ocorreu também um grande número de leucócitos envolvendo toda a superfície articular, indicando a presença de um estado crônico da inflamação. Talvez nesse estágio, a presença de muitos leucócitos, também pode indicar que o organismo esteja no auge de produção de células de defesa, para tentar sanar o agente agressor desencadeado pelo processo inflamatório. Estes resultados são similares aos encontrados por Athanasiou e colaboradores [11], que observaram que a indução de uma lesão cirúrgica na cartilagem articular do fêmur depois de três semanas da indução produz grandes lesões. Os resultados também foram

compatíveis aos estudos de McDougall e colaboradores [12], que demonstraram a indução da artrite crônica em joelhos de ratos tem o pico de cronicidade da inflamação caracterizada aos 21 dias após a administração de adjuvante de Freund incompleto.

Segundo Bendele e colaboradores [13] a degeneração da cartilagem provém da perda dos proteoglicanos e fibrilação da superfície. Muitas lacunas e depressões são formadas nos condrócitos que revestem a cartilagem articular provinda da inflamação, desenvolvendo defeitos profundos na superfície cartilaginosa, com grande aderência celular de linfócitos, macrófagos e outras células do sistema imunológico [4, 8, 14, 15]. Com o passar do tempo, a inflamação produz processos destrutivos que são indicados pela proliferação celular como um sinal de tentativa de reparo da cartilagem hialina, o que também está de acordo com os resultados encontrados neste trabalho.

5.3. Grupos de animais que receberam a aplicação de Laser de HeNe

5.3.1. Grupo tratado com laser de HeNe na dose de $0,5 \text{ J/cm}^2$.

Com relação ao tratamento de laser de HeNe com doses de $0,5 \text{ J/cm}^2$ não se verificou melhora na lesão, ou seja, o processo inflamatório continuou o seu curso degenerativo. A Figura 5.3 apresenta micrografias de MEV típicas deste grupo.

A Figura 5.3 (a) mostra o estágio da cartilagem articular aos 2 dias de tratamento com laser (7 dias após indução). Observa-se que a cartilagem apresenta uma superfície muito irregular, com rupturas e reentrâncias na superfície da cartilagem lesionada. Nesta etapa, não foi possível constatar tecido de renovação da cartilagem, mas apenas a presença da inflamação, embora não tão acentuada como no grupo inflamado sem tratamento aos 7 dias após a indução (Figura 5.3 (a)).

Aos 9 dias de tratamento ou 14 dias após a indução da inflamação verifica-se (vide a Figura 5.3 (b)) que o aspecto da superfície articular não apresentou melhora visível comparada à etapa anterior. Observou-se também a continuidade de irregularidade do tecido cartilaginoso, ainda com várias depressões e com a presença de leucócitos por toda a superfície da lesão. A presença dessas células sanguíneas no local indica que, a potência do laser utilizada nesta etapa, talvez não tenha produzido uma alteração na mobilidade deste

tipo celular. Não foi possível observar, prováveis pontes de renovação da cartilagem lesionada, mas a superfície articular continuou apresentando depressões de diferentes profundidades, demonstrando uma desordem.

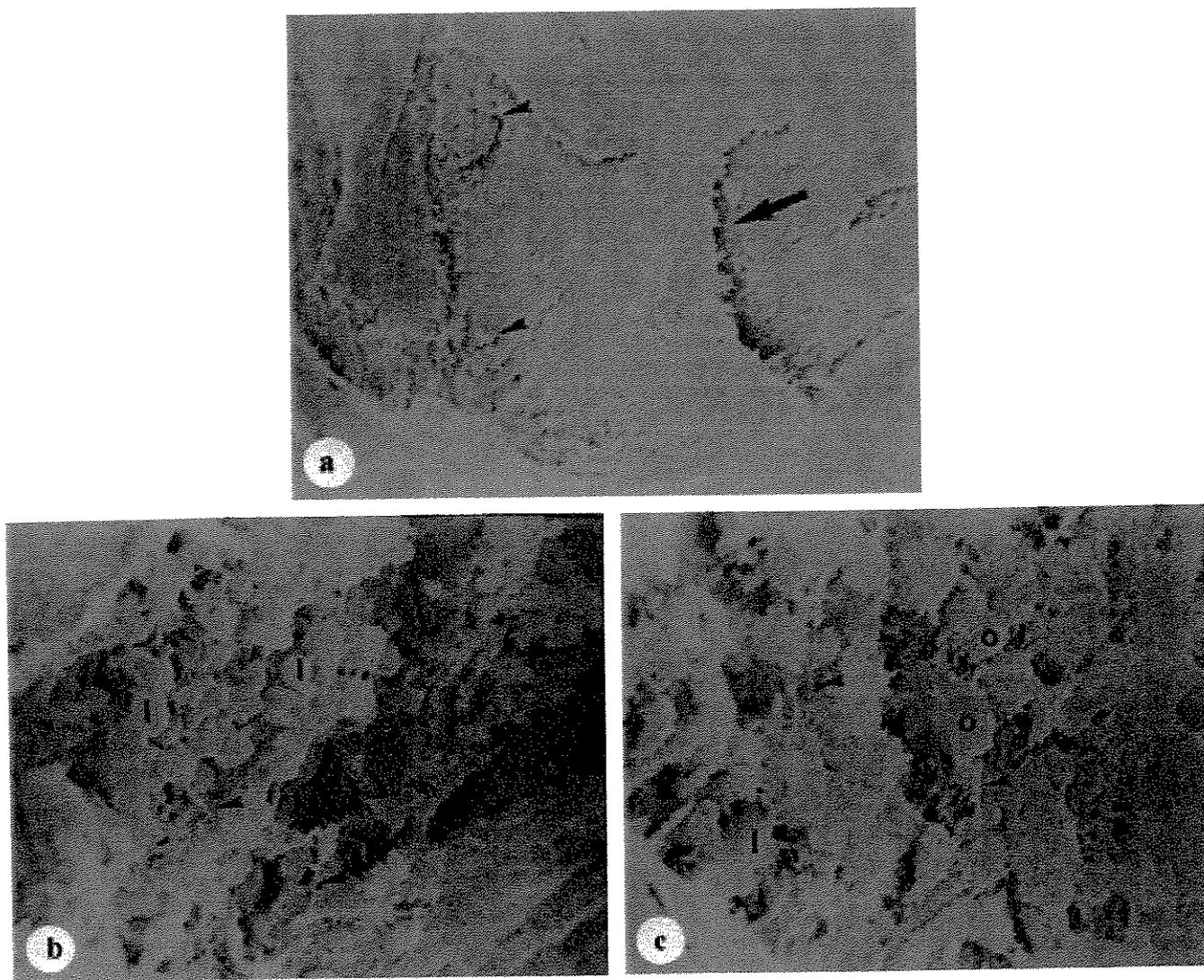


Figura 5.3. (a, b, c). Imagens típicas de MEV da superfície da cartilagem articular inflamada depois da aplicação de laser de HeNe com a dose de $0,5 \text{ J/cm}^2$. **(a)** 2 dias de tratamento: a seta indica o local principal da lesão mostrando uma ruptura da cartilagem, porém sem aspecto de ulceração. As cabeças de seta indicam a grande quantidade de leucócitos (200 X). **(b)** 9 dias de tratamento – é possível notar a presença de leucócitos por toda a superfície da lesão. Notar a superfície bastante danificada (C). A cabeça de seta indica prolongamentos citoplasmáticos dos leucócitos com aspecto amebiforme (1.600 X). **(c)** 16 dias de tratamento – superfície articular bastante heterogênea, coberta por leucócitos (L) e por osteoclastos (os). As cabeças de setas indicam prolongamentos citoplasmáticos (1.600 X).

A Figura 5.3 (c) indica que mesmo depois de 16 aplicações diárias de laser (21 dias depois da lesão) a superfície articular ainda era bastante heterogênea, mas a superfície menos vazada, ou seja, coberta por células sanguíneas (leucócitos) e por grande quantidade de células absorvedoras de tecido ósseo (osteoclastos). A presença dessas células, os osteoclastos, nesta região, pode significar um processo remodelagem ou de absorção da cartilagem da superfície articular, bem como, a formação de um novo tecido [16]. Neste momento, a ruptura e a destruição tecidual na superfície cartilaginosa está no estágio crônico da lesão, e é bem provável que tanto a cartilagem como o tecido subcondral, já foram bastante acometidos pela inflamação.

A aplicação da radiação do laser em diferentes tecidos tem sido considerada terapeuticamente benéfica [17-19]. O laser de HeNe parece agir na mobilização celular, evidenciando o efeito anti-inflamatório [17]. Devido a fibrilação da superfície da cartilagem inflamada, Athanasiou e colaboradores [11] mostraram que o aspecto da superfície lisa da cartilagem, quando é rompida, induz uma inflamação sinovial generalizada, e que as análises por MEV da cartilagem irradiada com laser apresentaram um melhor agrupamento das fibrilas de colágeno. Enwemeka [18] também demonstrou um aumento nas dimensões e na quantidade das fibras de colágeno em animais tratados com laser de HeNe.

Iwanaga e colaboradores [20] relatam que na inflamação sinovial crônica desenvolvida pela artrite ocorre predominantemente dois tipos de células, os macrófagos (tipo A) e fibroblastos (células tipo B). Os macrófagos são células móveis capazes de fagocitar o material debridado livre sobre a superfície cartilaginosa. Os fibroblastos são caracterizados pela capacidade de formação e manutenção da rede estrutural da cartilagem. O laser de HeNe parece agir no processo de orientação das fibras de colágeno por ação nos fibroblastos [21], em sua deposição ao longo da região em processo de reparo. Enwemeka [18] observou em seu trabalho que a presença dos fibroblastos no processo de regeneração ocorria apenas nos animais que sofreram a irradiação por laser de HeNe e não nos animais de controle.

Klebanov e colaboradores [22] estudando os efeitos do laser de HeNe nos leucócitos do sangue em humanos observaram que o laser, inicialmente, potencializava a concentração de leucócitos, classificando-a como uma ação primária e forte, mas logo em seguida, ocorria um decréscimo significativo em sua concentração. Este fato pode estar relacionado

diretamente com a densidade de energia aplicada em nosso trabalho. Nas etapas iniciais de tratamento (vide a Figura 5.3 (a) e (b)), a presença de leucócitos foi evidente, enquanto que na etapa posterior (Figura 5.3 (c)), apresentou diminuição na concentração de leucócitos na superfície da cartilagem. Observou-se ainda, aparentemente, a presença de células de remodelagem óssea, o que poderia caracterizar uma redução no tempo de maturação da lesão, provocada pela radiação laser.

5.3.2. Grupo tratado com laser de HeNe na dose de $7,0 \text{ J/cm}^2$.

A Figura 5.4. (a, b, c) apresenta imagens de MEV típica das cartilagens tratadas com doses de $7,0 \text{ J/cm}^2$.

Aos 2 dias de tratamento (7 dias após a indução), a cartilagem articular apresenta superfície bastante rugosa no local lesionado (vide a Figura 5.4 (a)). Pode-se observar que a superfície lesionada (inflamada) apresenta rupturas em comparação com a cartilagem íntegra apresentada na Figura 5.1. No local da ruptura não foi possível verificar pontes de renovação de cartilagem, e no interior da ruptura, foram encontrados orifícios de diferentes tamanhos com espaços não preenchidos. A cartilagem não apresentou aspecto de ulceração. Esta característica não aconteceu no grupo inflamado sem tratamento (7 dias após indução) onde uma fina camada da cartilagem se deslocou da superfície da cartilagem (vide a Figura 5.2 (a)), demonstrando assim que a ação do laser talvez não permita que ocorra um descolamento por completo da cartilagem. A superfície cartilaginosa fraturada apresenta grande presença de granulações. Os orifícios observados, sem a presença de células sanguíneas, dão a impressão de serem de um tecido em reparo com células aparentemente fundidas.

No décimo quarto dia após a indução da artrite (9 dias de tratamento) a superfície apresentou menos granulações que no estágio anterior. O aspecto da lesão aparenta ser constituído de partes deslocadas com ligação através de pontes de cartilagem. A região agravada pela inflamação da superfície aparentava rompimento. Os prolongamentos da cartilagem aparentemente tendem para a cicatrização da ruptura provocada pela lesão, como observado nos estágios anteriores. Nesta fase, a presença de prováveis restos de

células sangüíneas, juntamente com os orifícios de diferentes tamanhos e profundidade indica aparentemente que os orifícios estão sendo preenchidos por um novo tecido.

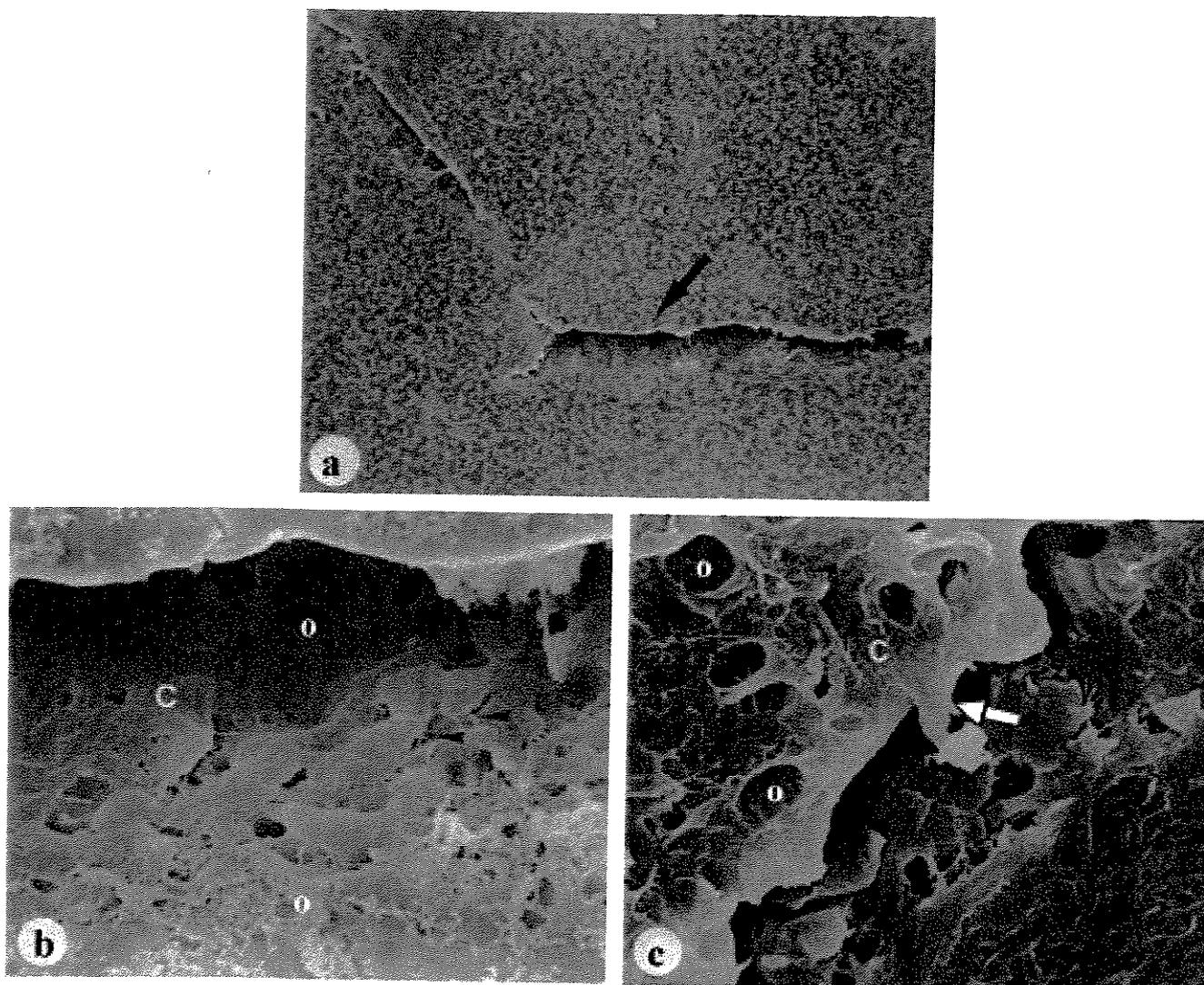


Figura 5.4. (a, b, c). Micrografias de MEV mostrando superfícies típicas da cartilagem articular inflamada depois da aplicação do laser de HeNe com doses de $7,0 \text{ J/cm}^2$. **(a)** 2 dias de aplicação de laser – a seta indica a ruptura da cartilagem formando um molde com a porção descolada. Não é possível notar tipos celulares característicos de inflamação nesta etapa (200 X). **(b)** 9 dias de aplicação de laser – a superfície (C) apresenta-se com pouca granulação. No entanto é possível notar inúmeros orifícios (o) com diferentes tamanhos e profundidades (1.600 X). **(c)** 16 dias de aplicação de laser – Nesta fase a superfície da cartilagem apresenta com menos granulações, tendendo ao aspecto normal do grupo de controle. É possível notar osteoclastos aderidos na superfície (cabeça de seta) e pontes de cartilagem entre as duas partes do molde que havia sido separado. Não é possível observar células sangüíneas em nenhuma das fases (1.600 X).

Estes resultados estão em conformidade com os obtidos por Labajos e colaboradores [23], que citaram que a estimulação com laser de HeNe promovia alterações positivas em

relação ao aspecto estrutural da cartilagem inflamada em comparação ao grupo inflamado sem a terapia com laser. A ausência de leucócitos e células inflamatórias no local da lesão parece estar em concordância com Mintertag [24] e Honmura e colaboradores [25], que concluíram que a estimulação com laser de HeNe, estimula a microcirculação e elimina acúmulo de catabólitos no local da área tratada.

A Figura 5.4 (c) mostra a cartilagem após 16 dias de aplicação de laser com a dose diária de $7,0 \text{ J/cm}^2$. A superfície da cartilagem apresenta menos granulações, tendendo ao aspecto normal do grupo de controle (vide a Figura 5.1). Neste estágio, é possível notar que as regiões onde se instalou a lesão estavam praticamente coladas. Observa-se também a tendência de coalescência entre as partes da cartilagem separadas, levando talvez à cicatrização e ao preenchimento dos orifícios.

A radiação laser parece promover um decréscimo no processo inflamatório da cartilagem articular também em humanos, como foi observado por Amano e colaboradores [26]. Walker e colaboradores [19] citaram ainda que, o laser de HeNe promove um efeito fotosensível sobre o sistema nervoso periférico em humanos, pois o tratamento produz significativa redução na dor produzida pela artrite nas articulações.

Possivelmente, os mecanismos de modulação do sistema imunológico devem ser ativados não somente na cartilagem articular e nos tecidos sinoviais, mas também no líquido sinovial e nos ossos desde que irradiados [27]. Goldman e colaboradores [28] sugerem que a radiação de laser de HeNe possibilita ação imuno-supressivas e imuno-estimulantes, evidenciando este efeito na ação dos linfócitos T e B. Afirmaram também que o laser tem efeito sistêmico, através da produção de fatores de crescimento ou a estimulação da capacidade fagocítica dos leucócitos após irradiação. Klebanov e colaboradores [22] observaram que a estimulação da liberação de fatores de crescimento ocorre tanto em situações *in vivo* como em cultura. Estas observações colaboraram para explicar, através de mecanismos celulares e moleculares, os efeitos observados de cicatrização e inibição da inflamação observada nas cartilagens irradiadas com laser de HeNe nesta dose. Esses resultados quando comparados com os resultados negativos do grupo anterior (doses de $0,5 \text{ J/cm}^2$) parecem estar relacionados com a dose aplicada ($7,0 \text{ J/cm}^2$). Estes resultados indicam que a dose utilizada é um fator importante especialmente nos processos de cicatrização e reparo tecidual [29-31].

5.3.3. Grupo tratado com laser de HeNe na dose de 50 J/cm².

A Figura 5.5 (a, b, c) apresenta os resultados morfológicos observados pela MEV em diferentes estágios após a irradiação de laser de HeNe com doses de 50,0 J/cm². Observa-se genericamente em todas as imagens a ausência de células sangüíneas típicas, porém a presença de uma grande quantidade de células absorvedoras de tecido ósseo.

Ao segundo dia de tratamento (7 dias após a indução) a cartilagem articular apresentou a superfície irregular com uma grande presença de células espalhadas no local onde foi provocada a lesão e tratamento subsequente (vide a figura 5.5 (a)). Neste estágio as rupturas provocadas pela lesão estavam presentes e não apresentaram tecidos considerados de renovação da cartilagem.

A Figura 5.5 (b) mostra a micrografia de MEV da cartilagem no nono dia de aplicação de laser com dose diária de 50 J/cm² (14 dias após a indução). Não se verificou melhora no o aspecto da cartilagem em relação ao estágio anterior. Pode-se observar, que o número de células que cobre o tecido superficial é menos acentuado do que no grupo controle inflamado no mesmo período (vide a Figura 5.2 (b)). Nesta etapa, fica evidente a maior quantidade de osteoclastos no local da lesão. Verifica-se também a união parcial destas células na lesão, indicando, provavelmente que o tratamento não produziu uma boa organização deste tipo de célula embora apresente pontes de renovação da cartilagem lesionada. Foi observado, ainda, que a organização promovida com emissão de 50,0 J/cm² aos 14 dias de inflamação, é semelhante com os resultados obtidos na etapa final (21 dias) de tratamento com a dose de 0,5 J/cm² (vide a Figura 5.3c).

A Figura 5.5 (c) mostra a morfologia da cartilagem após 16 dias de aplicação de laser na dose diária de 50 J/cm² (21 dias após a indução da lesão). Verifica-se que a superfície articular ainda apresentava-se de forma bastante irregular, com as áreas de ruptura minimizadas. Observou-se uma porosidade aumentada nesta superfície, sem a presença de células absorvedoras de tecido ósseo, que eram predominantes nos estágios anteriores. A ausência de osteoclastos e a desorganização da superfície articular provavelmente indica que o tecido subcondral teria sido acometido durante o estágio crônico da lesão.

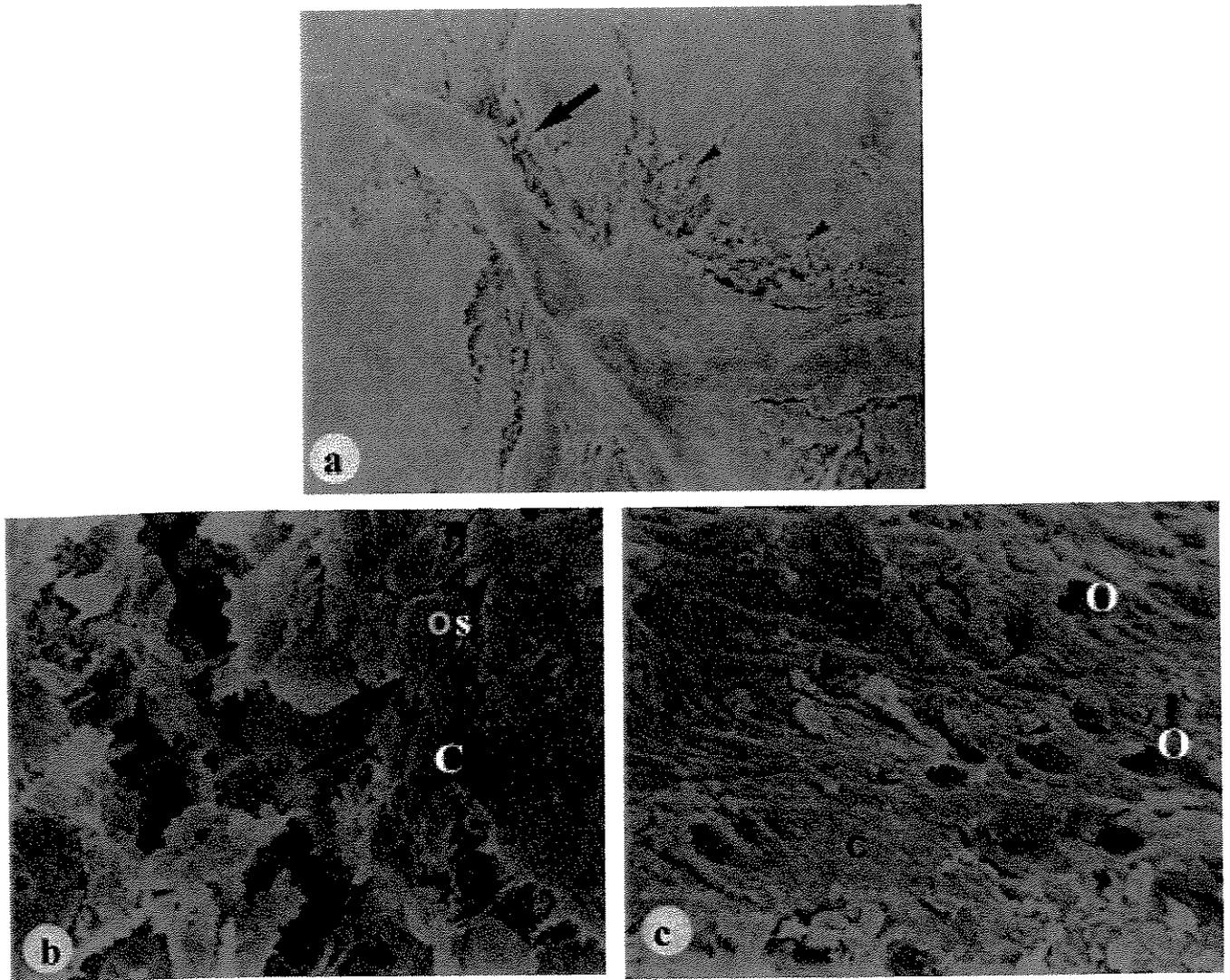


Figura 5.5. (a, b, c). Micrografias de MEV mostrando a superfície de cartilagens articulares inflamadas após a aplicação de laser de HeNe com doses diárias de 50 J/cm^2 . **(a)** 2 dias de aplicação de laser – a superfície (C) se apresenta totalmente irregular e as setas e cabeças de seta mostram a grande quantidade de células espalhadas no local da lesão (200 X). **(b)** 9 dias de aplicação de laser – a cartilagem (C) continua bastante irregular e totalmente recoberta por osteoclastos (OS). A seta mostra prolongamentos citoplasmáticos (1.600 X). **(c)** 16 dias de aplicação de laser – a superfície articular (C) ainda é bastante irregular e com orifícios (O) de diferentes dimensões. Nesta fase há ausência de osteoclastos e células sanguíneas típicas. É possível notar alguns restos celulares (*) (1.600 X).

Há evidências de uma grande variedade de mecanismos biológicos que podem ser estimulados pela irradiação do laser, em função da dose utilizada [31-35]. O efeito mais relatado é a proliferação celular, especialmente dos fibroblastos [36-38]. Schultz e

colaboradores [39] mostraram que as células cartilagenosas apresentam um potencial de regeneração somente com a produção de um estímulo apropriado. Citaram, ainda, que altas doses de laser não promovem estímulos eficientes para regeneração da cartilagem articular. Karu [40] cita que no aspecto metabólico, a irradiação em mitocôndrias induz a modificações na homeostasia celular, desencadeando uma série de reações. Lerma e colaboradores [35] sugerem que a ativação da cadeia respiratória pela estimulação com laser produz um aumento na síntese de DNA, o que modula a atividade proliferativa celular. Quando ocorre uma lesão na cartilagem estas vias são ativadas e estimulam o sistema imunológico.

Calatrava e colaboradores [17] mostraram modificações na orientação macromolecular da superfície articular durante o processo de reparo da cartilagem com laser de HeNe, pela formação de um tecido de granulação similar a fibrocartilagem. Estes resultados parecem estar de acordo com os encontrados neste trabalho, principalmente os resultados relativos à eficiência da dose utilizada. Parece existir uma dosagem ótima, a partir da qual o aumento da dose tende a ter menor eficiência, isto é, inibir a regeneração do tecido cartilagenoso.

5.4. Grupos de animais que receberam a aplicação de Laser de GaAs

5.4.1. Grupo tratado com laser de GaAs na dose de $1,0 \text{ J/cm}^2$.

A Figura 5.6. (a, b, c) apresenta os resultados típicos da MEV das cartilagens dos animais submetidos à aplicação de laser de GaAs com doses diárias de $1,0 \text{ J/cm}^2$ com diferentes períodos de aplicação.

A Figura 5.6 (a) apresenta os resultados obtidos para os animais que receberam dois dias de aplicação de laser (7 dias depois da injeção articular). Observa-se que o tecido cartilagenoso apresenta várias rupturas distribuídas por toda a região da lesão. Fica evidente também a presença de células características do processo inflamatório, aderidas na superfície da cartilagem articular. A quantidade de células nesta fase da experiência parece ser inferior as encontradas nos animais inflamados que não receberam

nenhum tipo de aplicação de laser (vide a Figura 5.2). Por outro lado, a morfologia da superfície articular aparece bastante degenerada. Verifica-se a presença de prolongamentos de fibras colágenas em grande extensão, cruzando as rupturas no tecido articular causadas pela inflamação.

Com relação ao grupo com 9 dias de tratamento (14 dias após a indução), a irregularidade do tecido cartilaginoso provocado pela lesão continuou de forma intensa, conforme ilustrado na Figura 5.6 (b). Ocorreu uma grande quantidade de rupturas, com maior profundidade e porosidade do tecido, com uma extensa rede de fibrilas colágenas distribuídas praticamente sobre toda a superfície. Houve também ausência de tipos celulares sobre a região da lesão. A aplicação de laser pode talvez ter contribuído para a migração celular, mas a morfologia bastante rugosa do tecido cartilaginoso indica que a aplicação do laser parece não ter contribuído para a regeneração da lesão.

No grupo com 16 dias de aplicação de laser (21 dias após a indução), verifica-se que a área da lesão ainda é bastante acentuada (vide a Figura 5.6 (c)). Observa-se a presença de leucócitos juntamente com uma pequena melhora do tecido cartilaginoso em relação às rupturas da cartilagem.

Na lesão do tecido cartilaginoso, imediatamente ocorre a necessidade de reparo, e há informação genética para procedimentos do organismo neste sentido [13]. Inoue e colaboradores [41] afirmam que as células do sistema imunológico quando irradiadas com laser de Ga-Al-As, interagem com um grande número de mediadores químicos, receptores de membrana promovendo alterações funcionais na membrana celular. Honmura e colaboradores [42] demonstraram evidências na inibição da permeabilidade vascular e no tecido de granulação da cartilagem articular inflamada de animais irradiados com laser de Ga-Al-As, principalmente na fase crônica da inflamação.

Padua e colaboradores [43] relataram que a irradiação com laser de GaAs no processo inflamatório é considerada benéfica, mas tem um efeito transitório e temporário. Estes achados parecem ser coerentes com os encontrados neste trabalho, pois o tratamento a $1,0 \text{ J/cm}^2$ apresentou uma mobilização celular quando comparado com o grupo inflamado sem tratamento, embora fortes evidências da presença da lesão permaneça na cartilagem. A interferência eletromagnética gerada pela radiação com o laser interage com a atividade enzimática dos tecidos e das moléculas, dando evidências que a quantidade de carga

aplicada nas membranas e nas biomoléculas modificam a eficiência dessa interação [40, 47-51].

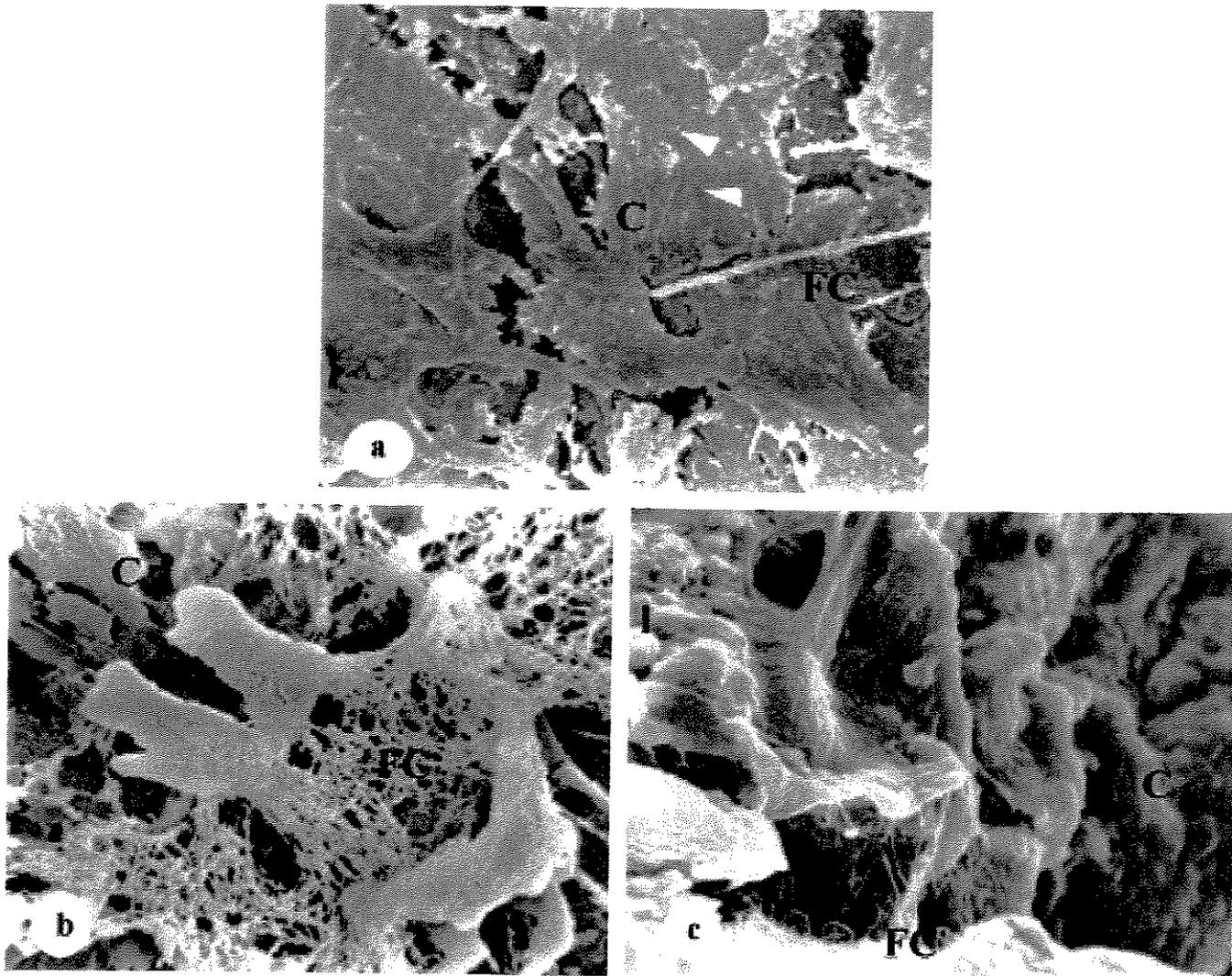


Figura 5.6. (a, b, c). Imagens de MEV mostrando a superfície da cartilagem articular inflamada após a aplicação de laser de GaAs com dose diária de $1,0 \text{ J/cm}^2$. **(a)** 2 dias de aplicação de laser – a superfície da cartilagem (C) apresenta-se muito danificada, poucas células sanguíneas são notadas (cabeça de seta). É possível notar a presença de fibras colágenas cruzando o local de ruptura (FC) (200 X). **(b)** 9 dias de aplicação de laser – o material (C) neste tratamento apresenta-se totalmente danificado, a rede de fibras colágenas (FC) chama atenção. Não é possível notar tipos celulares (1.600 X). **(c)** 16 dias de aplicação de laser – nesta fase a superfície da cartilagem (C) não se apresenta tão danificada como nas etapas anteriores. É possível notar células sanguíneas (l) e também fibras colágenas (FC) (1.600 X).

5.4.2. Grupo tratado com laser de GaAs na dose de 5,0 J/cm²

A Figura 5.7. (a, b, c) apresenta os resultados típicos da MEV das cartilagens das cobaias que receberam aplicação de laser de GaAs com densidade de energia de 5,0 J/cm², com diferentes períodos de aplicação.

A Figura 5.7. (a) apresenta a superfície da cartilagem articular dos animais que tiveram dois dias de aplicação do laser (7 dias após a indução). Observa-se que a área da lesão continua sendo grande e com superfície irregular, com proliferação celular e orifícios no local da lesão.

Com relação aos animais com 9 dias (14 dias após a indução da artrite) pode-se observar (vide a Figura 5.7 (b)) que o tecido continua inflamado com a área de lesão ainda bem acentuada. Na região periférica da lesão nota-se fibrilas de colágeno formando pontes de cicatrização da cartilagem.

Observou-se também orifícios em toda a superfície cartilaginosa, circundada por células sangüíneas e restos celulares. Os orifícios na superfície da lesão, parecem estar sendo preenchidos por células ou algum material celular. Esses resultados são equiparáveis aos achados de Honmura e colaboradores [25], que citaram que o tratamento com este tipo de laser reduzia em 30% a inflamação induzida em cartilagem articular de ratos.

A Figura 5.7. (c) apresenta a morfologia da cartilagem com 16 dias de aplicação do laser (21 dias após a indução da artrite). A superfície da cartilagem apresentou uma evolução positiva, em relação aos períodos anteriores. Observa-se interdigitações entre as partes da cartilagem lesionada, mas ainda é possível encontrar intensa quantidade de células sangüíneas. Aparentemente há uma textura de rede na superfície articular, com várias ligações filamentosas ligando as partes anteriormente descoladas, principalmente na região dos orifícios. Há consenso entre os pesquisadores quanto à atuação do laser estar relacionada com a potência utilizada, a densidade de energia e a dosimetria, para estimular os processos envolvidos no processo cicatrização [25, 28, 40, 50, 52-55], principalmente pela ação no gradiente iônico da membrana celular, evidenciado nas fases iniciais da adesão celular, especialmente nos fibroblastos e condroblastos [56, 57]. Estes relatos dão suporte a idéia de que métodos que alteram transporte iônico através da membrana celular, podem

modular ou influir na adesão e, portanto na sedimentação celular, nitidamente observados neste trabalho.

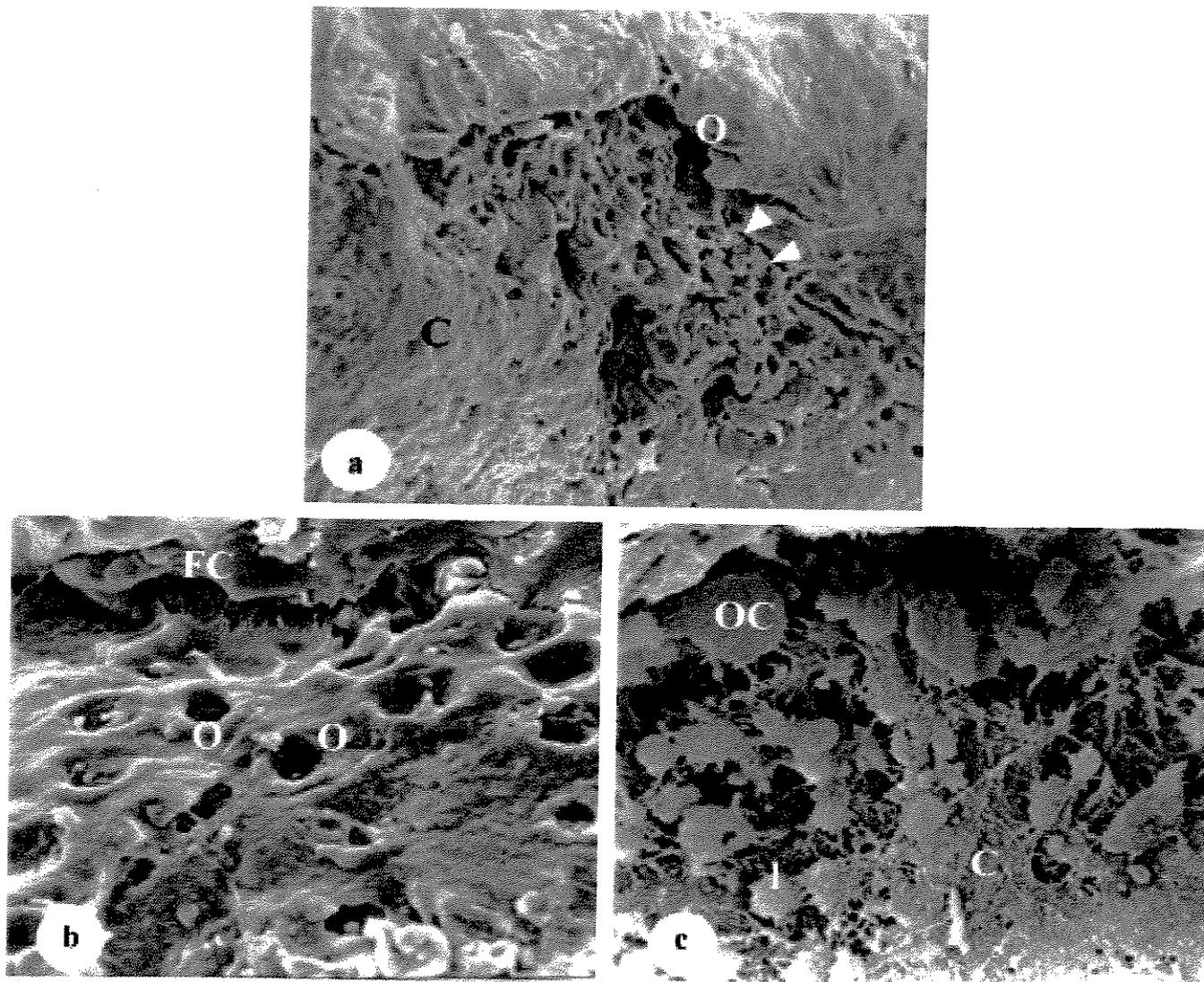


Figura 5.7. (a, b, c). Imagens de MEV da superfície da cartilagem articular inflamada após a aplicação de laser de GaAs com dose diária de $5,0 \text{ J/cm}^2$, em diferentes períodos. **(a)** 2 dias de aplicação de laser – é possível notar a superfície da cartilagem (C) bastante irregular com inúmeras células sanguíneas (cabeça de seta) e vários orifícios (O) no local da lesão (200 X). **(b)** 9 dias de aplicação de laser – é possível notar os orifícios (O) em maior número, porém com reduzido número de tipos celulares. Notar a presença de fibras colágenas (FC) (1.600 X). **(c)** 16 dias de aplicação de laser – superfície (C) menos irregular que as anteriores, apresentando leucócitos (l), osteoclastos (OC), além de fibras colágenas (FC). Os orifícios não são nítidos nesta fase (1.600 X).

5.4.3. Grupo tratado com laser de GaAs na dose de 25 J/cm² .

A Figura 5.8 (a, b, c) resume os resultados da análise de MEV dos animais tratados com laser de GaAs a 25 J/cm² em diversos períodos.

Na Figura 5.8 (a) temos os resultados típicos após dois dias de aplicação de laser (7 dias após a indução da artrite). Verifica-se uma intensa proliferação de células recobrando praticamente toda a superfície lesionada. Entretanto, não se observam rupturas. Além da grande quantidade de células inflamatórias como leucócitos e também de osteoclastos (células de remodelagem e absorção óssea), a superfície da cartilagem articular sob as células também apresenta intensa porosidade. A profundidade dos orifícios e das depressões na cartilagem é aparentemente mais suave do que as apresentadas no estágio anterior a aplicação do laser.

No caso dos animais onde a aplicação do laser foi feita em 9 dias (14 dias após a indução) a cartilagem ainda apresenta a área de lesão com bastante evidência (vide a Figura 5.8 (b)). Observam-se células aderidas no tecido lesado, e intensa rede de fibras colágenas dispostas sobre a superfície da articulação, a qual ainda mantém grande porosidade.

Nos animais com 16 dias de aplicação de laser (21 dias após a indução da artrite) observa-se a ocorrência ainda de intensa proliferação celular na região da lesão, conforme ilustrado na micrografia apresentada na Figura 5.8 (c). Nota-se a continuidade da aderência e grande quantidade de osteócitos, que podem estar relacionados com a degeneração ou regeneração cartilaginosa. Os osteócitos são células achatadas em forma de amêndoa, os quais são essenciais para a manutenção da matriz óssea e sua morte é seguida por reabsorção da matriz [26]. Quando comparamos este grupo irradiado aos animais inflamados que não sofreram nenhuma espécie de tratamento, nota-se que a rugosidade da cartilagem articular apresenta melhora, embora apresente ainda grande porosidade e uma extensa rede de fibras em toda a superfície da lesão. O processo resultante do aumento da degeneração articular promove a destruição completa dos condrócitos e da matriz intracelular, o que justificaria a presença destes tipos celulares [6, 7, 44, 58, 59]. Já o aspecto poroso permanente na cartilagem articular em todas as fases, deve estar relacionado com o acometimento de tecidos subseqüentes ao cartilaginoso [60, 61]. O efeito antiinflamatório do laser em patologias como a artrite e outros processos regenerativos

favorecendo o reparo tecidual vem sendo evidenciado tanto clinicamente como em laboratório [34, 44, 62-67].

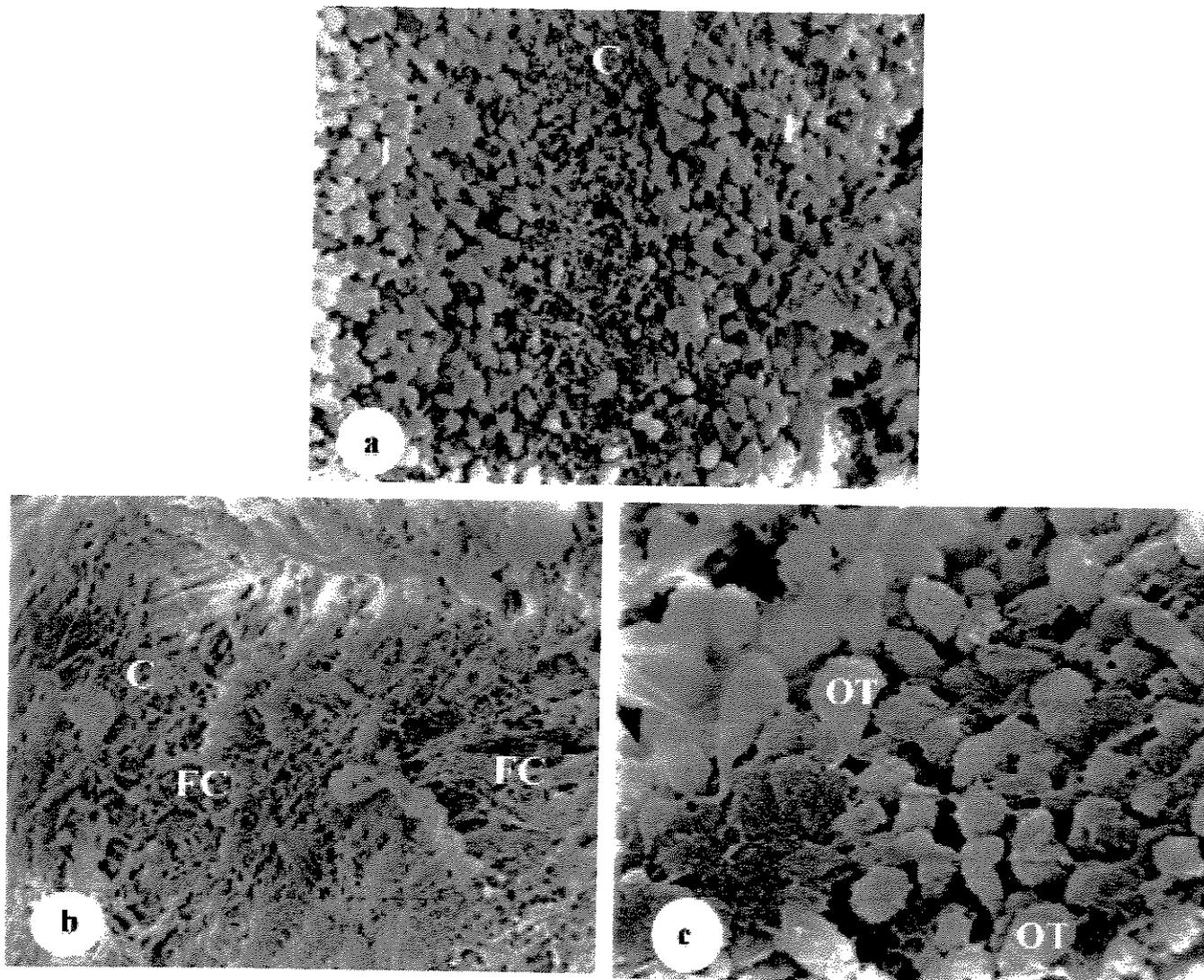


Figura 5.8. (a, b, c). Imagens morfológicas obtidas por MEV de cartilagens articulares inflamadas após a aplicação de laser de GaAs com doses diárias de 25 J/cm^2 , em diferentes períodos (a) 2 dias de aplicação de laser – a superfície da cartilagem (C) não é muito irregular, porém é totalmente coberta por células sangüíneas (l) (200 X). (b) 9 dias de aplicação de laser – nesta fase a cartilagem (C) possui uma textura de rede por causa da evidência das fibras colágenas (FC). Não é possível notar a presença de células sangüíneas (1.600 X). (c) 16 dias de aplicação de laser – nesta fase é possível observar a intensa proliferação de osteócitos (OT) sobre toda a superfície da cartilagem (1.600 X).

O efeito bioestimulante de fatores de crescimento parece estar envolvido tanto em situações *in vivo* como *in vitro* [40, 68]. Como o laser não produz aumento significativo da

temperatura no tecido tratado, os benefícios promovidos pela fotoestimulação são atribuídos a processos não térmicos, resultantes da interação ou absorção específica dos tecidos irradiados [69]. Plamgren e colaboradores [70] citaram que a estimulação dos macrófagos pela radiação com laser induz a excitação das células inflamatórias sinoviais, que resultam na remoção de células pelo complexo imunológico. As células irradiadas sofrem mudanças como achatamento epitelial, perda intracelular e decréscimo na atividade de infiltração das células inflamatórias [26], bem como na razão de sedimentação de eritrócitos [71]. Heussler e colaboradores [71], citam ainda que, o laser de GaAs, promove um mecanismo de reações fotoquímicas, particularmente nas mitocôndrias. Possivelmente, isto acontece por estimulação da respiração celular por oxidação dos fotoceptores [69]. Vários autores estudaram o efeito da radiação laser em laboratório e verificaram alterações nos índices de hemoglobina, plaquetas e células marcadoras de inflamação aguda [70, 72-74].

A Tabela 5.1 resume qualitativamente a presença dos diferentes tipos celulares encontrados nas amostras irradiadas com diferentes lasers e diferentes doses.

Tabela 5.1. Avaliação da quantidade de tipos celulares encontrados nas cartilagens, nos diferentes grupos após indução da inflamação, e após aplicação dos lasers de HeNe e GaAs em diferentes doses e períodos de aplicação.

<i>Tipo de laser</i>	Controle inflamado	HeNe 0,5 J/cm ²	HeNe 7,0 J/cm ²	HeNe 50 J/cm ²	GaAs 1,0 J/cm ²	GaAs 5,0 J/cm ²	GaAs 25 J/cm ²
<i>Dose diária</i>							
<i>2 dias (7 dias após a indução)</i>	+	++	+	+++	++	+++	+++
<i>9 dias (14 dia após a indução)</i>	++	+++	+	++	+	++	+
<i>16 dias (21 dias após a indução)</i>	+++	+++	+	+	+	++	+++
+	poucas células sanguíneas e ou osteoclastos						
++	quantidade intermediária de células						
+++	muitas células sanguíneas						

5.5. Conclusões

- 1) Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que, houve uma mobilização e modificação importante nas características celulares e estruturais da cartilagem lesada e tratada pelos dois tipos de laser, onde o processo de reparo foi alterado;
- 2) Houve uma evidente estimulação celular promovida pelo laser, principalmente, com relação as células inflamatórias de defesa, proporcionando um provável aumento no efeito imune no processo de reparo da cartilagem articular;
- 3) Os efeitos da radiação com laser estiveram diretamente relacionados com a dose e o tipo de laser aplicado;
- 4) O laser de HeNe pareceu ter efeito inibitório no processo de inflamação. Os melhores resultados foram obtidos nos animais tratados com doses de 7,0 J/cm²;
- 5) O laser de GaAs produziu efeito inibidor no processo inflamatório em algumas etapas apenas, dependendo da dose e do tempo de aplicação;

O laser HeNe mostrou-se mais eficaz no processo de reparo da cartilagem articular.

5.6. Referências

- [1] RASPANTI, M., GUIZZARDI, S., STROCCHI, R., RUGGERI, A. Collagen fibril patterns in compact bone: Preliminary ultrastructural Observations, *Acta Anatomica*, v.155, p.249-256, 1996.
- [2] ADACHI, E., KATSUMATA, O., YMASHINA, S., PROCKOP, D.J., FERTALA, A. Collagen II containing a Cys substitution for Arg- α 1-519. Analysis by atomic force microscopy demonstrates that mutated monomers alter the topography of the surface of collagen II fibrils, *Matrix Biology*, v.18, p.189-196, 1999.
- [3] PEARSON, C., Experimental models in rheumatoid disease, *Arthritis and Rheumatism*, v.7, p.80-86, 1964.
- [4] HENZGEN, S., PETROW, P.K., THOSS, K., BRAUER, R., Degradation of articular cartilage during the progression of antigen-induced arthritis in mice: A scanning and transmission electron microscopic study, *Experimental and Toxicologic Pathology*, v.48, p.255-263, 1996.

- [5] MANOLOPOULOS, V., MARSHALL, K.W., ZHANG, H., TROGADIS, J., TREMBLAY, L., DOHERTY, P.J. Factors affecting the efficacy of bovine chondrocyte transplantation in vitro, *Osteoarthritis and Cartilage*, v.7 (5), p.453-460, 1999.
- [6] GARDNER, D.L., SALTER, D.M., OATES, K. Advances in the microscopy of osteoarthritis, *Microscopy Research and Technique*, v.37 (4), p.245-270, 1997.
- [7] LI, B.H., MARSHAL, D., ROE, M., ASPDEN, R.M. The electron microscope appearance of the subchondral bone in the human femoral head in osteoarthritis and osteoporosis, *Jornal of Anatomy*, v.195, p.101-110, 1999.
- [8] TEM BOKUM, A.M.C., KALIGIS, E.G.R.L., MELIEF, M.J., VAN KOETSVELD, P.M., BRUNS, C., VAN HAGEN, P.M., HOFLAND, L.J., LAMBERTS, S.W.J., HAZENBERG, M.P. Somatostatin receptor subtype expression in cells of the rat immune system during adjuvant arthritis, *Journal of Endocrinology*, v.161 (1), p.167-175, 1999.
- [9] SATO, M.I., KOSHINO, T., TAKAGI, T. CD44 expression on chondrocytes in knees of DBA/1 mice with type II collagen-induced arthritis, *Clinical and Experimental Rheumathology*, v.17 (2), p.185-190, 1999.
- [10] NAJAFIPOUR, H., FERRELL, W.R., Comparison of synovial Po₂ and sympathetic vasoconstrictor responses in normal and acutely inflamed rabbit knee joints, *Experimental Physiology*, v.80, p.209-220, 1995.
- [11] ATHANASIOU, K.A., FISCHER, R., NIEDERAUER, G.G., PUHL, W.. Effects of excimer Laser on healing of articular cartilage in rabbits, *Journal of Orthopaedic Research*, v.13, p.483-494, 1995.
- [12] McDOUGALL, J.J., KARIMIAN, S.M., FERREL, W.R., Prolonged alteration of vasoconstrictor and vasodilator responses in rat knee joint by adjuvant monoarthritis, *Experimental Physiology*, v.80, 349-357, 1995.
- [13] BENDELE, A.M., WHITE, S.L., HULMAN, J.F. Osteoarthrosis in Guinea Pigs: Histopathologic and scanning electron microscopic features, *Laboratory Animal Science*, v.39 (2), p.115-121, 1989.
- [14] ERLANDSSON, H., MUSSENER, A., KLARESKOG, L., GOLD, D.P. Restricted T-cell receptor usage in DA rats during early collagen-induced arthritis, *European Journal of Immunology*, v.24 (8), p.1929-1932, 1994
- [15] MOLLER, K.O., WETHLING, H., ABEL, H.H., LIND, B.M., KARCHER, K., SCHRAMM, U., HOHLBACH, G. Studies on na immunologically induced synovitis model in pigs and sheep, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, v..361, p.228-236, 1999.
- [16] JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J. *Histologia Básica*, 7^a ed., Rio de Janeiro: Guanabara, p. 94-119, 1990.

- [17] CALATRAVA, I.R., VALENZUELA, J.M.S., GOMEZ VILLAMANDOS, R.J., JURADO, I.A. Histological and clinical responses of articular cartilage to low-level laser therapy: Experimental study, *Lasers in Medical Science*, v.12(2), p.117-121, 1997.
- [18] ENWEMEKA, C.S., RODRIGUEZ, O.O., GALL, N.G., WALSH, N.E. Morphometrics of collagen fibril populations in He:Ne Laser photostimulated tendons, *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, v.6, p.47-52, 1990.
- [19] WALKER, J.B., AKHANJEE, L.K., COONEY, M.M., GOLDSTEIN, J., TAMAYOSHI, S., SEGAL-GIDAN, F. Laser therapy for pain of rheumatoid arthritis, *The Clinical Journal of Pain*, v.3, p.54-59, 1987.
- [20] IWANAGA, T., SHIKICHI, M., KITAMURA, H., YANASE, H., NOZAWA-INOUE, K. Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint, *Archives of Histology and Cytology*, v.63 (1), p.17-31, 2000.
- [21] PARIZOTTO, N. Ação do laser Hélio-Neônio sobre o processo de reparo tecidual: Um estudo do colágeno por microscopia eletrônica de varredura, microscopia de força atômica e espectroscopia por infravermelho, Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, UNICAMP, Campinas, 181 p., 1998.
- [22] KLEBANOV, G.L., TESELKIN, Y.O., BABENKOVA, I.V., BASHKUJEVA, T.Y., CHICHUCK, T.V., VLADIMIROV, Y.A. Low-power laser irradiation induces leukocyte priming, *General Physiology and Biophysics*, v.17(4), p.365-376, 1998.
- [23] LABAJOS, M.T., GUZMAN, M.A., LABAJOS, M., MARTÍNES, M. Efectos de las irradiación láser de HeNe sobre el cartílago de crecimiento, *Rehabilitación*, v.24, p.211-214, 1990
- [24] MINTERTAG, J. Física Aplicada do Laser. In: PIMENTA, L.H.M. *Laser em Medicina e Biologia*, São Paulo: Roca, v.1, p.6-8, 1990.
- [25] HONMURA, A., YANASE, M., OBATA, J., HARUKI, E. Therapeutic effect of Ga-Al-As diode Laser irradiation on experimentally induced inflammation in rats, *Lasers in Surgery and Medicine*, v.12, p.441-449, 1992.
- [26] AMANO, A., MIYAGI, K., AZUMA, T., ISHIHARA, Y., KATSUBE, S., AOYAMA, I., SAITO, I. Histological studies on the rheumatoid synovial membrane irradiated with a low energy laser, *Lasers in Surgery and Medicine*, v.15, v.290-294, 1994.
- [27] GUERINO, M.R., BARANAUSKAS, V., GUERINO, A.C., PARIZOTTO, N., Laser treatment of experimentally induced chronic arthritis, *Applied Surface Science*, v.791, p. 1-4, 1999.
- [28] GOLDMAN, J.A., CHIAPPELLA, J., CASEY, H., BASS, N., GRAHAN, J., McCLATCHEY, W., DRONAVALLI, R.V., BROWN, R., BENNETT, W.J., MILLER,

S.B., WILSON, C.H. Laser therapy of rheumatoid arthritis, *Laser in Surgery Medicine*, v.1, p.93-101, 1980.

[29] KING, C.E., CLELLAND, J.A., KNOWLES, C.J., JACKSON, J.R., Effect of helium-neon laser auriculotherapy on experimental pain threshold, *Physical Therapy*, v.70, p.24-30, 1990.

[30] MORDON, S. Selective laser photocoagulation of blood vessels in a hamster skin flap model using a specific ICG formulation. *Lasers in Surgery and Medicine*, v.21, p.365-373, 1997.

[31] YOUNG, S., BOLTON, P., DYSON, M., HARVEY, W., DIAMANTOPOULOS, C. Macrophage responsiveness to light therapy, *Lasers in Surgery and Medicine*, v.9, p.497-503, 1989.

[32] ALLENDORF, J.D.F., BESSLER, M., HUANG, J., KAYTON, M.L., LAIRD, D., NOWYGRAD, R., TREAT, M.R. Helium-neon laser irradiation at fluences of 1, 2 and 4 J/cm² failed to accelerate wound healing as assessed by both wound contracture rate and tensile strength, *Lasers in Surgery and Medicine*, v.20 (3), p.340-345, 1997.

[33] RENKY, A., BEAUSENCOURT, E., ELSNER, A.E. Angioscotometry with the scanning laser ophthalmoscope: comparison of the effect of different wavelengths, *Investigate Ophthalmology and Visual Science*, v.37 (11), p.2350-2355, 1996.

[34] BASFORD, J.R. Low-energy laser treatment of pain and wounds: ype, hope or hokum, *Mayo Clinical Process*, v.61, p.671-675, 1986.

[35] LERMA, E., HEVIA, A., RODRIGO, P., GONZALEZCAMPORA, R., ARMAS, J.R., GALERA, H. The effect of HeNe laser radiation on the thyroid-gland of the rat, *International Journal of Experimental pathology*, v.72 (4), p.379-385, 1991.

[36] REDDY, , G.K., STEHNO-BITTEL, L, ENWEMEKA, C.S. Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit Achilles tendions, *Laser in Surgery and Medicine*, v.22 (5), p.281-287, 1998.

[37] VANGSNESS, C.T. Overview of treatment options for arthritis in the active patient, *Clinics in Sports Medicine*, v.18 (1), p.1-9, 1999.

[38] SOBOL, E.N., KITAI, M.S., JONES, N., SVIRIDOV, A.P., MILNER, T., WONG, B.J.F. Heating and structural alterations in cartilage under laser radiation. *IEEE Journal of Quantun Electronics*, v.35 (4), p.532-539, 1999.

[39] SCHULTS, R.J., KRISHNAMURTHY, S., THELMO, W., RODIRIGUES, J.E., HARVEY, G. Effects of varying intensities of laser energy on articular cartilage, *Lasers in Surgery and Medicine*, v.5, p.577-588, 1985.

- [40] KARU, T.I., TIPHLOVA, O., SAMOKHINA, M., DIAMANTOPOULOS, C., SARANTSEV, V.P., SHVEIKIN, V. Effects of near-infrared laser and superluminescent diode irradiation on escherichia coli division rate, *IEEE Journal of Quantum Electronics*, v.26 (12), p.2162-2165, 1990.
- [41] INOUE, K., NISHIOKA, J. HUKUDA, S. Supressed tuberculin reaction in guinea pigs following laser irradiation, *Lasers in Surgery and Medicine*, v.9, p.271-275, 1989.
- [42] HONMURA, A., ISHII, A., YANASE, M., OBATA, J., HARUKI, E. Analgesic effect of Ga-Al-As diode laser irradiation on hiperalgesia in carrageenin-induced inflammation, *Lasers in Surgery and Medicine*, v.13, p.463-469, 1993.
- [43] PADUA, L., PADUA, R., MORETTI, C., NAZZARO, M., TONALI, P. Clinical outcome and neurophysiological results of low-power laser irradiation in carpal tunnel syndrome, *Lasers in Medical Science*, v.14 (3), p.196-202, 1999.
- [44] GOATS, G.C., HUNTER, J.A., FLETT, E., STIRLING, A. Low intensity Laser and phototherapy for rheumatoid arthritis, *Physiotherapy*, v.82, p.311-320, 1996.
- [45] JOHANNSEN, F., HAUSCHILD, B., REMVIG, L., JOHNSEN, V., PETERSEN, M., BIELER, T. Low energy laser therapy in rheumatoid arthritis, *Scandinavian Rheumatology Research*, v.23, p.145-147, 1994.
- [46] USUBA, M., AKAI, M., SHIRASAKI, Y. Effect of low-level laser therapy (LLLT) on viscoelasticity of the knee joint: Comparison with whirlpool treatment in rats, *Lasers in Surgery and Medicine*, v.22 (2), p.81-85, 1998.
- [47] BULOW, P.M., JENSEN, H., DANNESKIOLDSAMSOE, B. Low-power Ga-Al-As laser treatment of painful osteoarthritis of the knee – a double-blind placebo-controlled study, *Scandinavian Journal of Rehabilitation Medicine*, v.26 (3), p.155-159, 1994.
- [48] KARU, T.I. Molecular mechanism of the therapeutic effect of low intensity laser irradiation, *Lasers Life Science*, v.2, p53-74, 1988.
- [49] KARU, T.I. Photobilogical fundamentals of low-power laser, *IEEE Journal of Quantum Electronics*, v.23 (10), 1987.
- [50] MORRONE, G., GUZZARDELLA, G.A., TIGANI, D., TORRICELLI, P., FINI, M., GIARDINO, R. Biostimulation of human chondrocytes with Ga-Al-As diode laser: 'In vitro' research, *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Immobilization Biotechnology*, v.28 (2), p.193-201, 2000.
- [51] HENDRICH, C., HUTTMANN, G., DIDDENS, H., SCARA, J., SEARA, J., SIEBERT, W.E. Experimental basis of photodynamic laser therapy for rheumatoid arthritis, *Orthopade*, v.25 (1), 30-36, 1996.

- [52] KARU, T.I., PYATIBRAT, L.V., KALENDO, G.S., ESENALIEV, R.O. Effects of monochromatic low-intensity light and laser irradiation on adhesion of HeLa cell *in vitro*, *Lasers in Surgery and Medicine*, v.18, 171-177, 1996.
- [53] AKAI, M., USUBA, M., MAESHIMA, T., SHIRASAKI, Y., YASUOKA, S. Laser's effect on bone and cartilage change induced by joint immobilization: An experiment with animal model, v.21 (5), p.480-484, 1997.
- [54] TAM, G. Low power laser therapy and analgesic action, *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, v.17 (1), p.29-33, 1999.
- [55] BROSSEAU, L., WELCH, V., WELLS, G., TUGWELL, P., de BIE, R., GAM, A., HARMAN, K., SHEA, B., MORIN, M. Low level laser therapy for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: A metaanalysis. *Journal of Rheumatology*, v.27 (8), p.1961-1969, 2000.
- [56] FULGA, C., FULGA, I.G., PREDESCU, M. Clinical study of the effect of laser therapy in rheumatic degenerative diseases, *Rev. Roum. Méd. Int.*, v.32, p.227-232, 1994.
- [57] FULGA, C., FULGA, I.G., PREDESCU, M. Effect of laser therapy on experimental inflammation in rats, *Ver. Roum. Méd. Int.*, v.33 (3-4), p.257-261, 1995.
- [58] DALBERG, L. Medical treatment of chondral damage, *Sports Medicine and Arthroscopy Review*, v.6 (1), p.25-30, 1998.
- [59] LOHMANDER, L.S., IONESCU, M., JUGESSUR, H., POOLE, A.R. Changes in joint cartilage aggrecan after knee injury and in osteoarthritis, *Arthritis and Rheumatism*, v.42 (3), p.534-544, 1999.
- [60] SARATHCHANDRA, P., POPE, F.M., KAYSER, M.V., ALI, S.Y. A light and electron microscopic study of osteogenesis imperfecta bone samples, with reference to collagen chemistry and clinical phenotype, v.192 (3), p.385-395, 2000.
- [61] O'DRISCOL, S.W. The healing and regeneration of articular cartilage, *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume*, v.80A (12), p.1795-1812, 1998.
- [62] McKIBBIN, L.S., PARASCHAK, D.M. A study of the effects of lasering on chronic bowed tendons at wheatley hall farm limited, *Lasers in Surgery and Medicine*, v.3, p.55-59, 1983.
- [63] BASFORD, J.R., SHEFFIELD, C.G., MAIR, S.D., ILSTRUP, D.M. Low-energy helium-neon laser treatment of thumb osteoarthritis, *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, v.68 (11), p.794-797, 1987.
- [64] BASFORD, J.R. Low-energy laser therapy: controversies and new research findings, *Lasers in Surgery and Medicine*, v.9, p.1-5, 1989.

- [65] ULUGÖL, A., ÜNALAN, H., DÖKMECI, I., KOKINO, S. Comparison of the effects of tenoxicam and mid-laser irradiation on chronic adjuvant arthritis in rats, *Clinical and Experimental Rheumatology*, v.15, p.83-86, 1997.
- [66] SOFFA, A.J., MARKEL, M.D., CONVERSE, L.J., MASSA, K.L., BOGDANSKE, J.J., DILLINGHAM, M.F. Treatment of inflammatory arthritis by synovial ablation: a comparison of the holmium: YAG laser, electrocautery, and mechanical ablation in a rabbit model, *Lasers in Surgery and Medicine*, v.19, p.143-151, 1996.
- [67] MORRONE, G., GUZZARDELLA, G.A., TORRICELLI, P., ROCCA, M., TIGANI, D., BRODANO, G.B., FINI, M., GIARDINO, R. Osteocondral lesion repair of the knee in the rabbit after low-power diode Ga-Al-As laser biostimulation: Na experimental study, *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Immobilization Biotechnology*, v.28 (4), p.321-336, 2000.
- [68] WONIAK, P., BRZESKI, W., CHYCZEWSKI, M., JALYNSNKI, M. The influence of limited strength laser radiation on the effective treatment of dogs with osteomyelitis, *Medycyna Weterynaryjna*, v.53 (11), p.665-668, 1997.
- [69] HALL, J., CLARKE, A.K., ELVINS, D.M., RING, E.F.J. Low level laser therapy is ineffective in the management of rheumatoid arthritic finger joints, *British Journal of Rheumatology*, v.33, p.142-147, 1994.
- [70] PALMGEN, N., JENSEN, G.F., KAAE, K., WINDELIN, M., COLOV, H.C. Low-power laser therapy in rheumatoid arthritis, *Lasers in Medicine Science*, v.4, p.193-196, 1989.
- [71] HEUSSLER, J.K., HINCHEY, G., MARGIOTTA, E., QUINN, R., BUTLER, P., MARTIN, J., STURESS, A.D. A double blind randomised trial of low power laser treatment in rheumatoid arthritis, *Annals of the Rheumatic Diseases*, v.52, 703-706, 1993.
- [72] BLIDDAL, H., HELLESEN, C., DITLEVSEN, P., ASSELBERGHS, J., LYAGER, L. Soft-laser therapy of rheumatoid arthritis, *Scandinavian Journal of Rheumatology*, v.16, p.225-228, 1987.
- [73] ASSADA, K., YUTANI, Y., SHIMAZU, A. Diode laser therapy for rheumatoid arthritis: A clinical evaluation of 102 joints treated with low reactive-level laser therapy (LLLT), *Laser Therapy*, v.1, p.147-151, 1989.
- [74] OBARA, J., YANASE, M., MOTOMURA, A. The pain relief of low energy laser irradiation on rheumatoid arthritis, *Pain Clinical*, v.8, p.18-22, 1987.

Capítulo VI

Resultados e discussões da microscopia de força atômica

6.1. Introdução

A microscopia de força atômica (MFA) é uma técnica de análise morfológica relativamente recente e muito poderosa. A MFA permite a realização de imagens sem a necessidade de alguns dos procedimentos necessários para a análise das amostras em microscópios eletrônicos convencionais (MEV). Seu princípio de funcionamento fundamenta-se nas medidas das forças locais de adesão e repulsão entre a amostra e uma ponta de prova. A ponta de prova é em geral, um micro-cristal, com forma piramidal, colado em uma micro-viga, feita de um material delgado e resistente. A micro-viga funciona como um braço e o micro-cristal como um dedo, que ao “tocar” a amostra sofre uma força de adesão ou de repulsão, entortando a micro-viga. O conjunto micro-viga/micro-cristal é feito de materiais duros (nitreto de silício, silício, diamante, etc.) e é denominado na literatura técnica inglesa de “cantilever” [1-2]. A “imagem” da superfície da amostra é obtida ponto a ponto, com uma varredura da ponta sobre a superfície “linha por linha”, como no caso do microscópio eletrônico de varredura. O sistema de controle permite que se faça a varredura por contacto, isto é, variando a altura da ponta em relação ao plano horizontal, ou que se faça à varredura com a altura da ponta constante em relação ao plano horizontal [3]. A micro-viga varre a superfície da amostra com um controle de precisão tridimensional muito preciso. Os movimentos tridimensionais são feitos pelo auxílio da dilatação de cristais piezoelétricos, fixados no local de suporte das amostras. A medida da força de adesão ou de repulsão é feita medindo-se a distorção da micro-viga com o esforço, com um esquema de interferometria a laser. Com estes procedimentos conseguem-se deslocamentos com resolução sub-nanométrica e a medida de forças com intensidade de nano Newton, ou menos [4-6].

A imagem da amostra é obtida por meios computacionais a partir da matriz de dados gerados no processo de varredura da ponta sobre a superfície da amostra. As cores apresentadas são fictícias, o que é perfeitamente justificado visto que a maioria das escalas de amplificação das imagens é menor do que o comprimento de onda da luz visível. A imagem é usualmente representada por uma figura tri-dimensional, ou bi-dimensional, onde a tonalidade da cor indica a profundidade ou altura dos achados topográficos das amostras.

A MFA também possui algumas limitações importantes. A principal delas é a excessiva rugosidade das amostras. Amostras muito pontudas ou com grandes degraus criam um problema geométrico de interpretação. Por exemplo, as irregularidades da amostra podem estar esbarrando na micro-viga e não na micro-ponta, originando uma informação na imagem completamente falsa [7-9]. Neste caso, em geral, as distorções podem ser perfeitamente identificadas sendo muito provável também a quebra do “cantilever”. Fantasmas na imagem também podem surgir quando a ponta de prova (micro-cristal) é menos pontuda do que as estruturas presentes na superfície da amostra [10]. Estas distorções também podem ser identificadas pela aparência de imagens da ponta de prova refletidas na imagem da amostra. Outra limitação é que às vezes a amostra que se quer analisar possui estruturas morfológicas cujas dimensões estão muito acima das dimensões de escala das imagens obtidas nos microscópios de MFA. Portanto é recomendável, sempre que possível, complementar as análises utilizando as capacidades de escala do MEV (por exemplo, para se ter uma visão macroscópica da amostra) com as capacidades ultra-estruturais da MFA.

A microscopia de força atômica pode ser empregada na análise de diversos tipos de materiais, sendo particularmente indicada para a análise de biológicos, pois permite caracterizar as superfícies das amostras “a fresco” ou seja, praticamente em seu estado fisiológico natural. A MFA têm sido empregada na análise exploratória de diversos tipos de materiais e substâncias, como por exemplo, análises de seqüência de DNA [11-12], membranas biológicas [13-16], proteínas [17], bactérias [18], colágeno [19-21], ossos [22], etc.

Neste Capítulo apresentamos as análises de MFA obtidas das cartilagens dos diversos grupos de animais de controle e dos irradiados com lasers de HeNe e GaAs.

6.2. Resultados e Discussões

6.2.1 Grupos de controle sem inflamação.

A Figura 6.1 apresenta imagens típicas de AFM das cartilagens integras, dos grupos de controle sem indução da inflamação

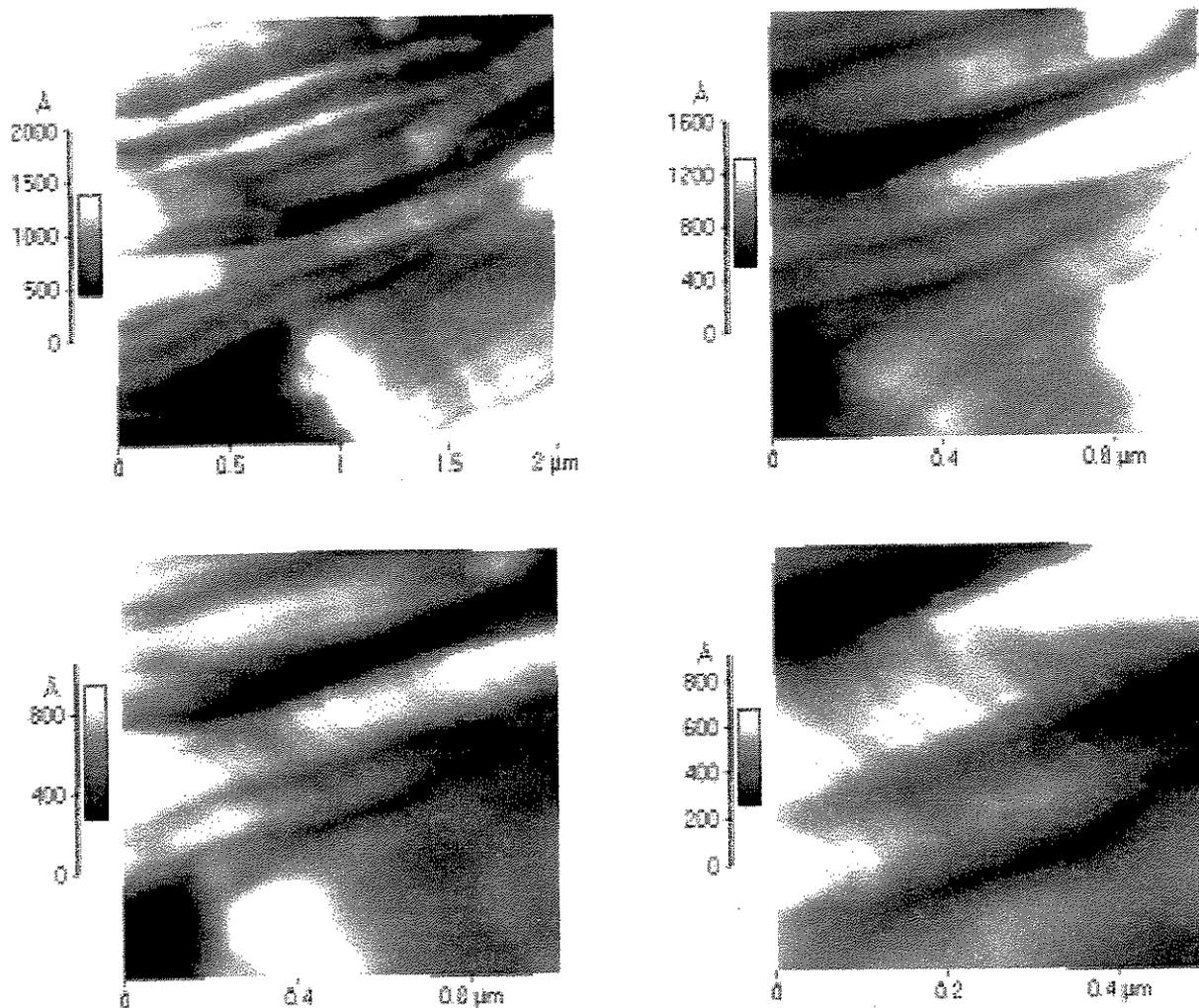


Figura 6.1 Imagens de AFM típicas da superfície da cartilagem sem inflamação

Podemos observar nas imagens que os feixes de fibras de colágeno da cartilagem hialina possuem arranjos paralelos e bem organizados. O diâmetro das fibras é em torno de 100 nm, que é um valor dentro da faixa de diâmetros descritos na literatura [23-24]. Estas fibras de colágeno apresentam composição química especial, sendo conhecidas como colágeno do tipo II e são freqüentemente organizadas em bandas ou lamelas. Pode-se observar que transversalmente algumas fibras apresentam uma estrutura de bandas periódicas. O período espacial destas bandas, medido nestas amostras, é menor do que 100 nm. Pode-se verificar que em muitas fibras a periodicidade é difícil de ser observada, devido ao recobrimento do colágeno com os proteoglicanos [2]. Alguns feixes aparecem truncados, provavelmente devido ao corte das amostras, permitindo verificar que a secção transversal das fibras é relativamente circular. Não foram observadas características comparativamente diferentes entre as cartilagens laterais ou mediais. O ordenamento das fibras corresponde ao que seria esperado pois a cartilagem íntegra apresenta-se “lisa” ou seja, com pequena rugosidade para o cumprir a sua função fisiológica deslizante na articulação óssea [24-26].

6.2.2 Grupos de controle com inflamação e sem aplicação de laser

As Figuras 6.2, 6.3, e 6.4 apresentam as imagens de MFA da evolução temporal (7, 14 e 21 dias) da morfologia no processo inflamatório na cartilagem, sem nenhuma aplicação de laser.

As imagens de MFA apresentadas na Figura 6.2 mostram que as estruturas das cartilagens inflamadas apresentam alterações morfológicas bastante drásticas, quando comparadas aos resultados morfológicos das cartilagens não inflamadas (Figura 6.1). Observa-se claramente que houve um grande aumento da rugosidade, com perda praticamente completa da organização natural e orientada das fibrilas. Esta deterioração é compatível com a dificuldade de mobilidade de marcha das cobaias ainda no biotério.

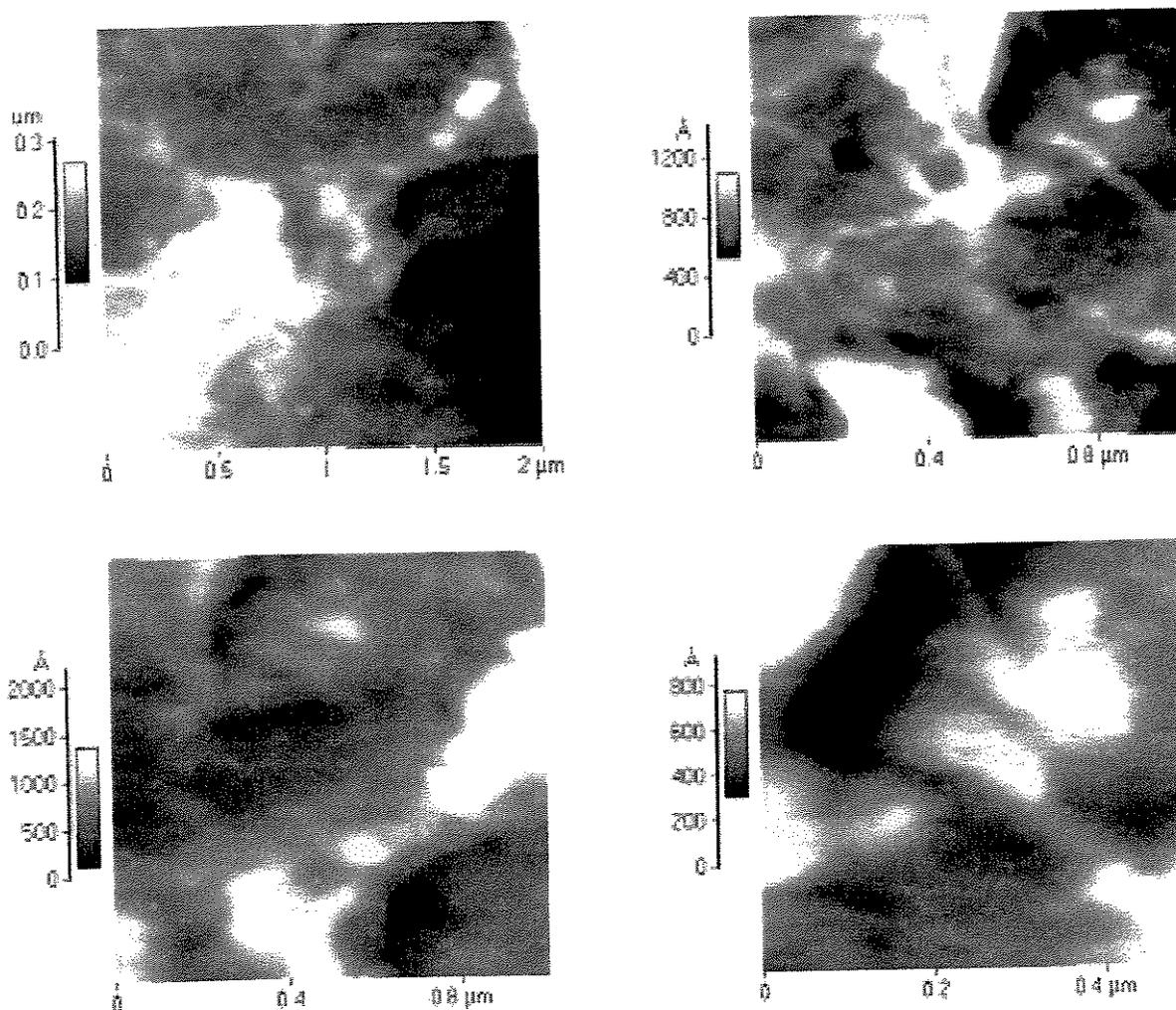


Figura 6.2. Imagens obtidas por microscopia de força atômica das microfibrilas de colágeno da cartilagem articular, em processo de inflamação 7 dias após a indução da artrite.

A seqüência do processo inflamatório nos períodos de 14 dias e 21 dias após a indução da lesão articular (Figuras 6.3 e 6.4) mostra uma acentuação temporal da desorganização das fibras de colágeno, com evidências de rupturas e de processos degenerativos provavelmente ainda em curso. Além disto pode-se observar uma maior dispersão nos valores dos diâmetros das fibras, indicando prováveis alterações nas funções celulares geradoras da matriz.

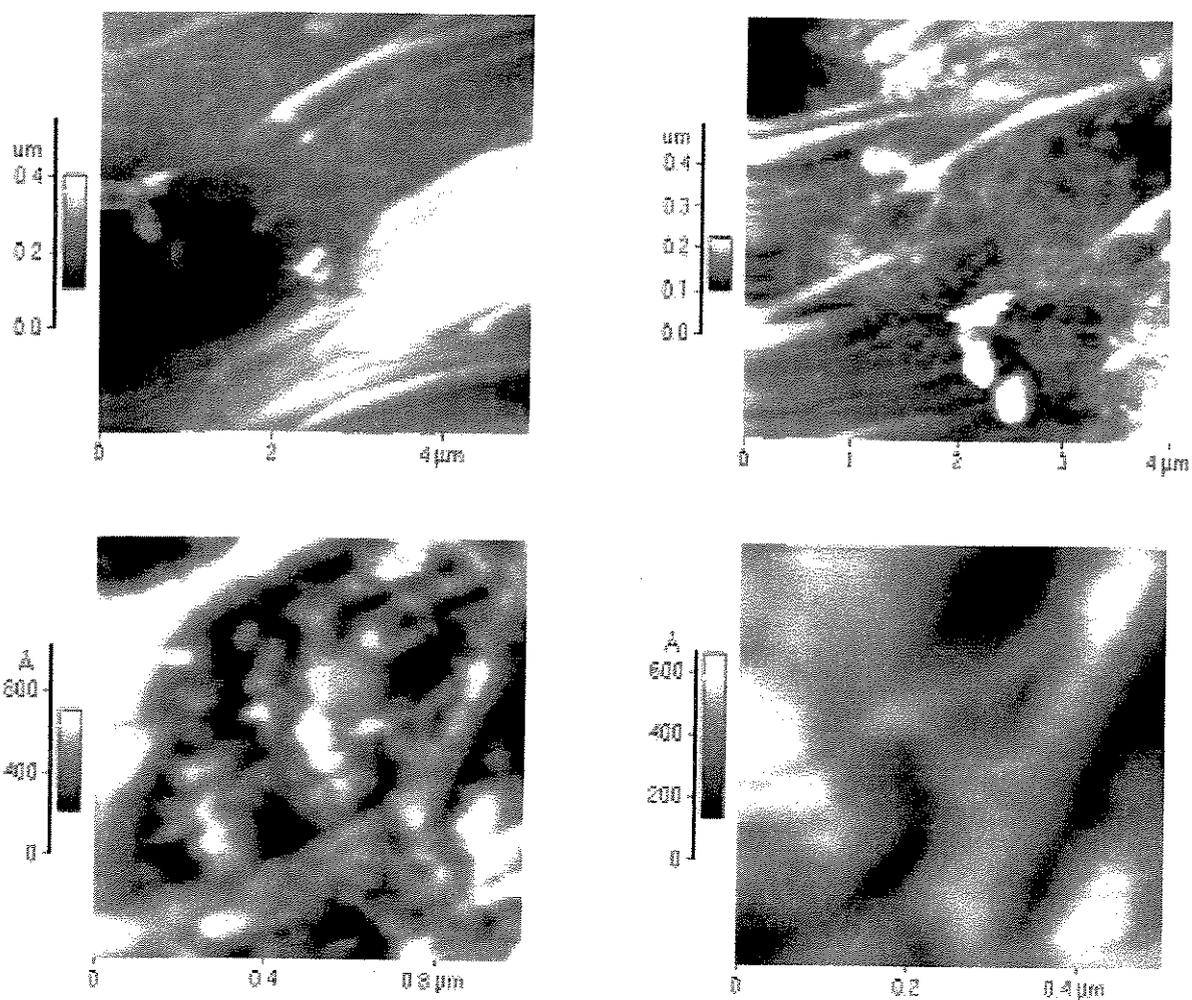


Figura 6.3. Imagens obtidas por microscopia de força atômica das microfibrilas de colágeno da cartilagem articular, em processo de inflamação 14 dias após a indução da artrite.

As diferenças morfológicas se tornam mais evidentes quando as imagens das Figuras 6.3 e 6.4 são comparadas com as morfologias da cartilagem não inflamada (Figura 6.1), cujo arranjo fibrilar é muito mais compacto, formando um tecido de alta densidade com as fibras alinhadas principalmente ao longo do plano da superfície cartilaginosa.

As medidas realizadas com as cartilagens inflamadas objetivaram estabelecer padrões para tornar possível a posterior análise comparativa destes resultados com as imagens das amostras que receberam as aplicações de laser.

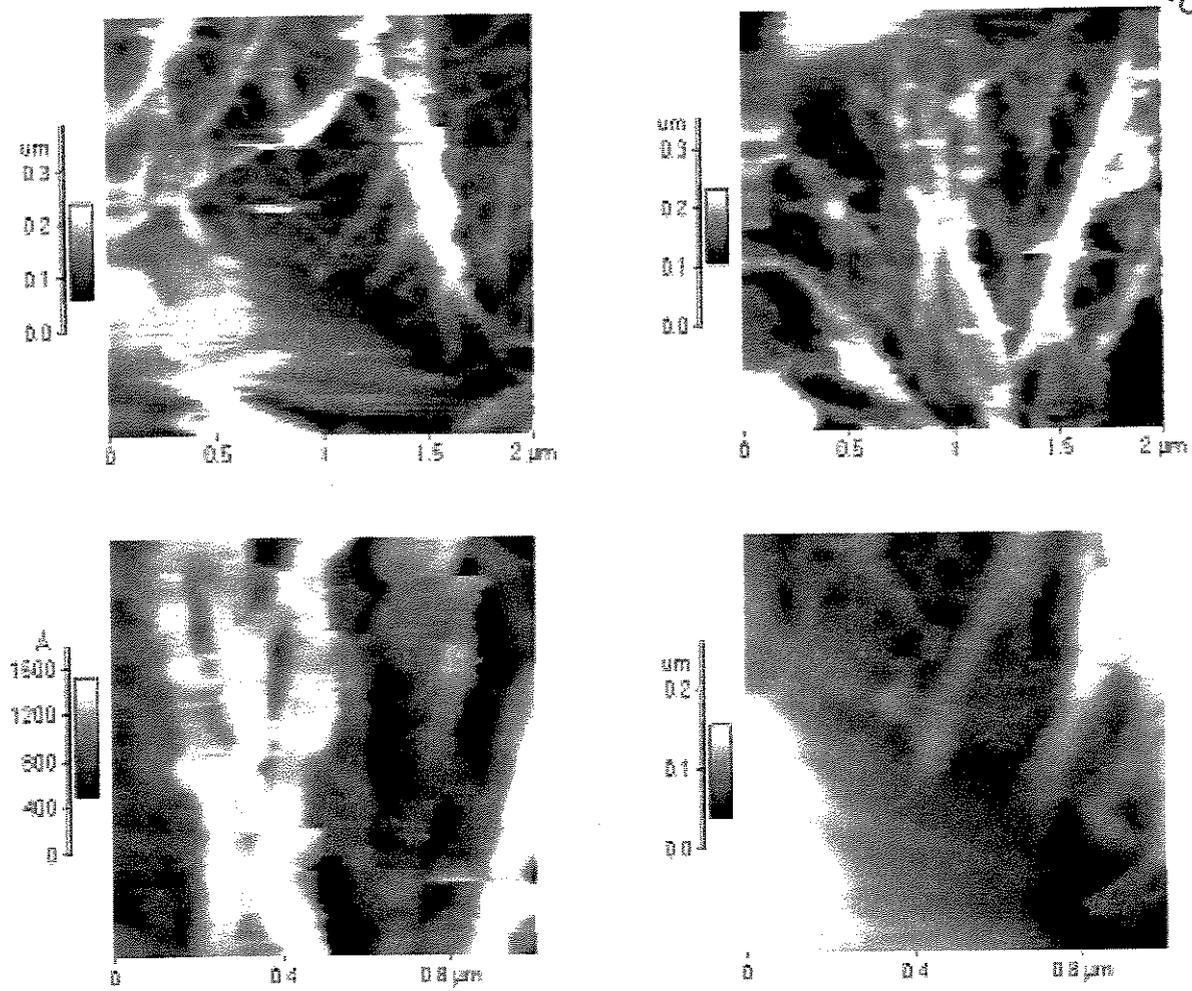


Figura 6.4. Imagens obtidas por microscopia de força atômica das microfibrilas de colágeno da cartilagem articular, em processo de inflamação 21 dias após a indução da artrite.

Entretanto, devido a grande heterogeneidade da cartilagem articular, vista nas escala da MFA, estes padrões devem ser vistos apenas como referência para comparações semi-qualitativas. As imagens apresentadas representam nas Figuras 6.2, 6.3 e 6.4. representam portanto os resultados típicos obtidos na morfologia do processo inflamatório. A cartilagem articular apresenta em seu estado natural em forma de camadas sobrepostas e unidas recobrendo as superfícies articulares dos ossos [27, 28]. O processo degenerativo é extremamente danoso, e piora com o passar do tempo, reduzindo a atividade funcional e a marcha, conforme a evolução do processo inflamatório [29, 30], resultados estes corroborados neste trabalho.

6.2.3 Grupos de animais inflamados e com a aplicação de laser de HeNe.

As Figuras 6.5 a 6.13 mostram as imagens típicas de MFA dos grupos de animais que tiveram a inflamação induzida e a posterior aplicação de laser de HeNe. As Figuras 6.5, 6.6 e 6.7 apresentam os resultados evolutivos (2, 9 e 16 dias) dos grupos de animais que receberam a aplicação da dose diária de $0,5 \text{ J/cm}^2$. Os conjuntos seguintes (Figuras 6.8, 6.9, 6.10 e Figuras 6.11, 6.12 e 6.13) correspondem também ao processo evolutivo mas com aplicações de doses diárias de $7,0 \text{ J/cm}^2$ e $50,0 \text{ J/cm}^2$, respectivamente.

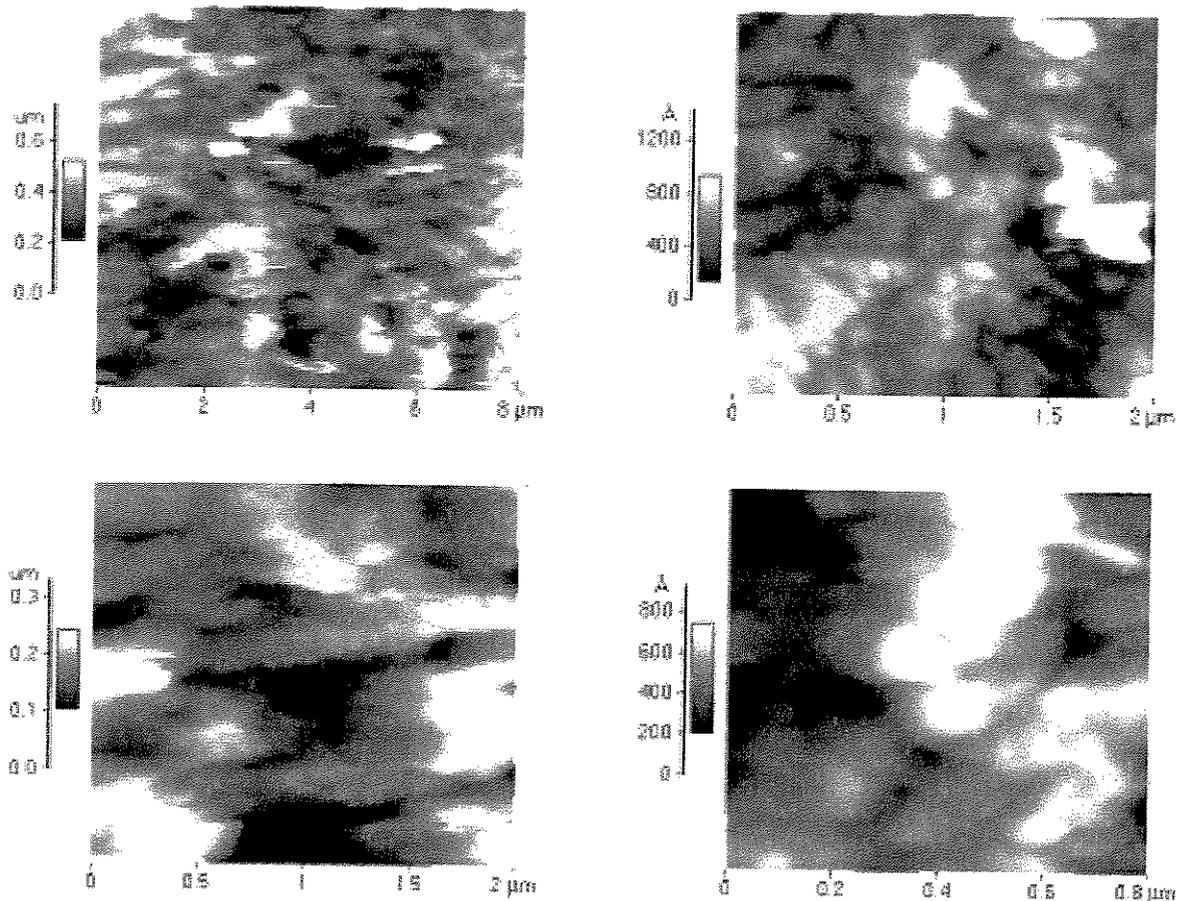


Figura 6.5. Imagens obtidas por microscopia de força atômica das microfibrilas de colágeno da cartilagem articular inflamadas, após a aplicação de laser de HeNe com doses diárias de $0,5 \text{ J/cm}^2$, por 2 dias.

A comparação das imagens que indicam a evolução do processo inflamatório das cartilagens, entre os animais que não receberam radiação (Figuras 6.5, 6.6 e 6.7) e os que receberam a radiação laser (Figuras 6.5, 6.6 e 6.7) indica que o laser na dose diária de $0,5 \text{ J/cm}^2$, mesmo com 16 dias de aplicação, não teve nenhum efeito aparente na interrupção do processo inflamatório ou na regeneração da cartilagem lesada. Pode-se observar em todas as imagens a grande rugosidade da superfície, com quase nenhuma orientação preferencial ou uniformidade no diâmetro das fibras de colágeno. Não conseguimos também observar a estrutura das bandas do colágeno.

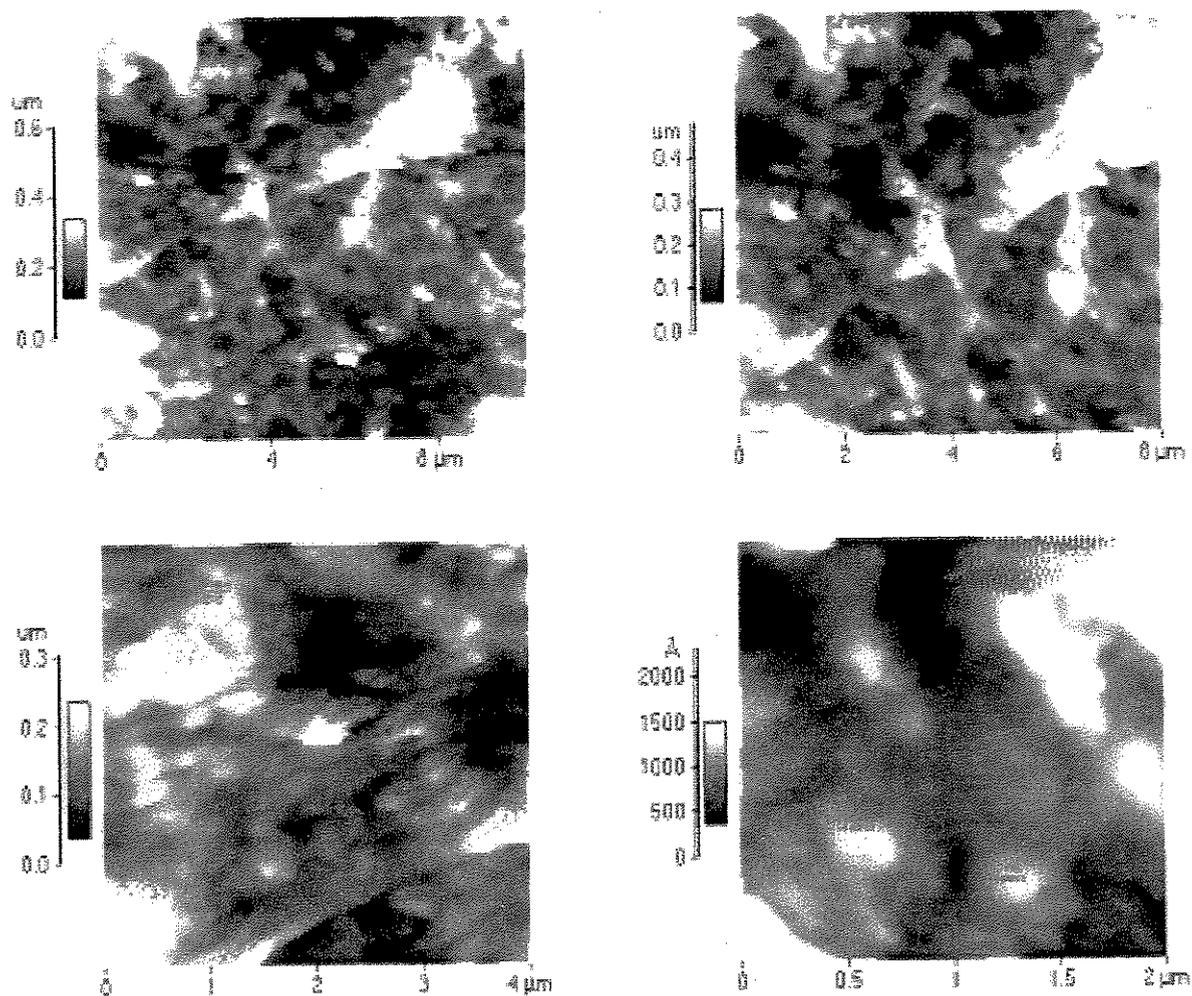


Figura 6.6. Imagens obtidas por microscopia de força atômica das microfibrilas, de colágeno da cartilagem articular inflamadas, após a aplicação de laser de HeNe com doses diárias de $0,5 \text{ J/cm}^2$, por 9 dias

Entretanto, os grupos de animais que receberam a dose diária de 7.0 J/cm^2 já apresentaram bons resultados já a partir do segundo dia de tratamento (vide a Figura 6.8). Nota-se uma maior densidade de fibras entrelaçadas na superfície, indicando uma superfície cartilaginosa de alta densidade em formação. Com o aumento das doses verifica-se o preenchimento das lacunas, com o progressivo aumento da densidade superficial. Compare-se por exemplo, a imagem do canto superior esquerdo apresentada na Figura 6.8 (2 dias de laser), com a imagem também do canto superior direito apresentada na Figura 6.10 (16 dias de laser).

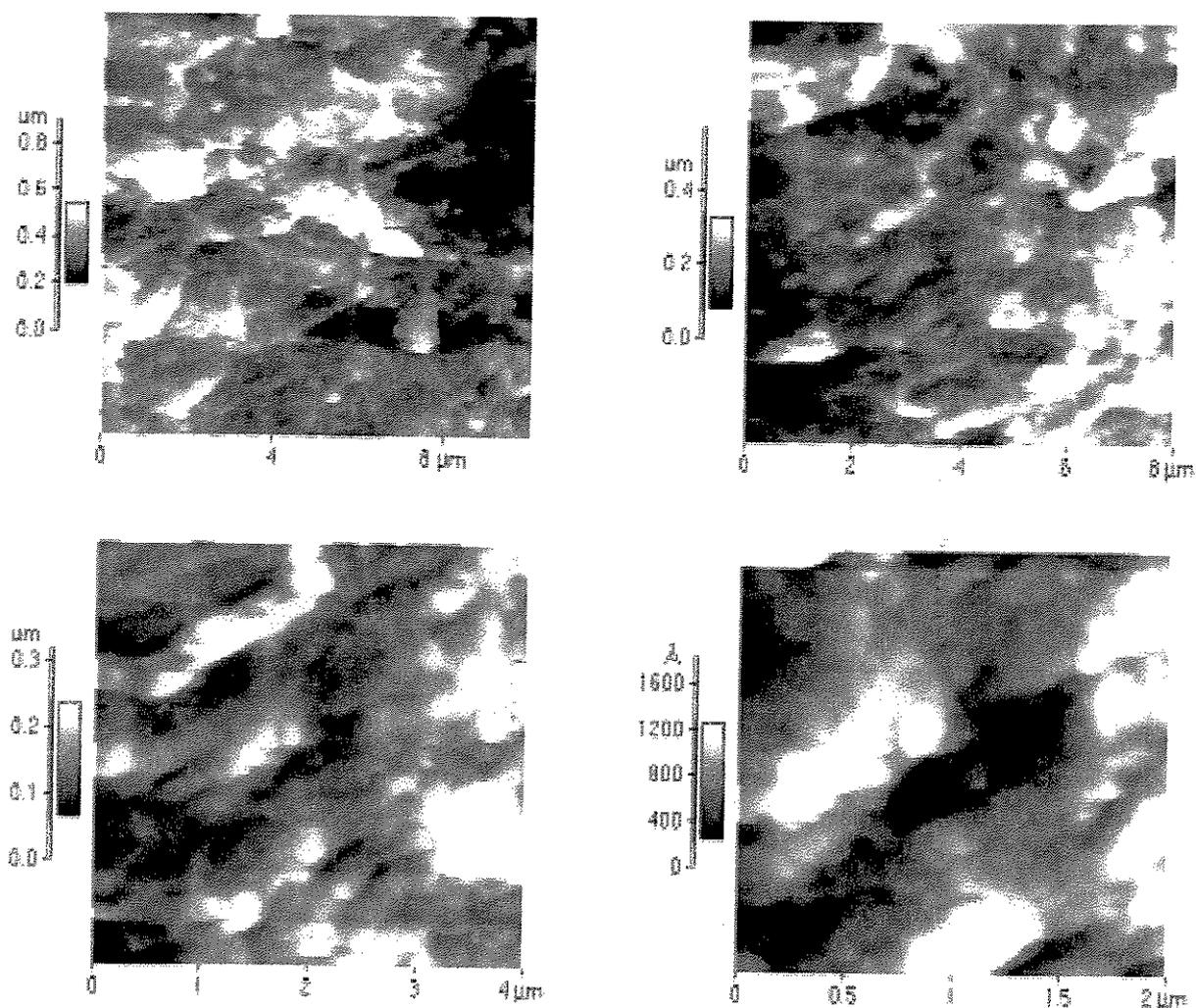


Figura 6.7. Imagens obtidas por microscopia de força atômica das microfibrilas de colágeno da cartilagem articular inflamadas, após a aplicação de laser de HeNe com doses diárias de $0,5 \text{ J/cm}^2$, por 16 dias

A aplicação diária de uma dose de laser maior ($50,0 \text{ J/cm}^2$) aparentemente não trouxe benefícios para a regeneração das cartilagens inflamadas, tanto para poucos dias de aplicação (2 dias), quanto para períodos mais longos (16 dias). Podemos observar no processo evolutivo (Figuras 6.11, 6.12, e 6.13) a continuidade da morfologia da cartilagem inflamada, com a fragmentação e desorganização das fibras.

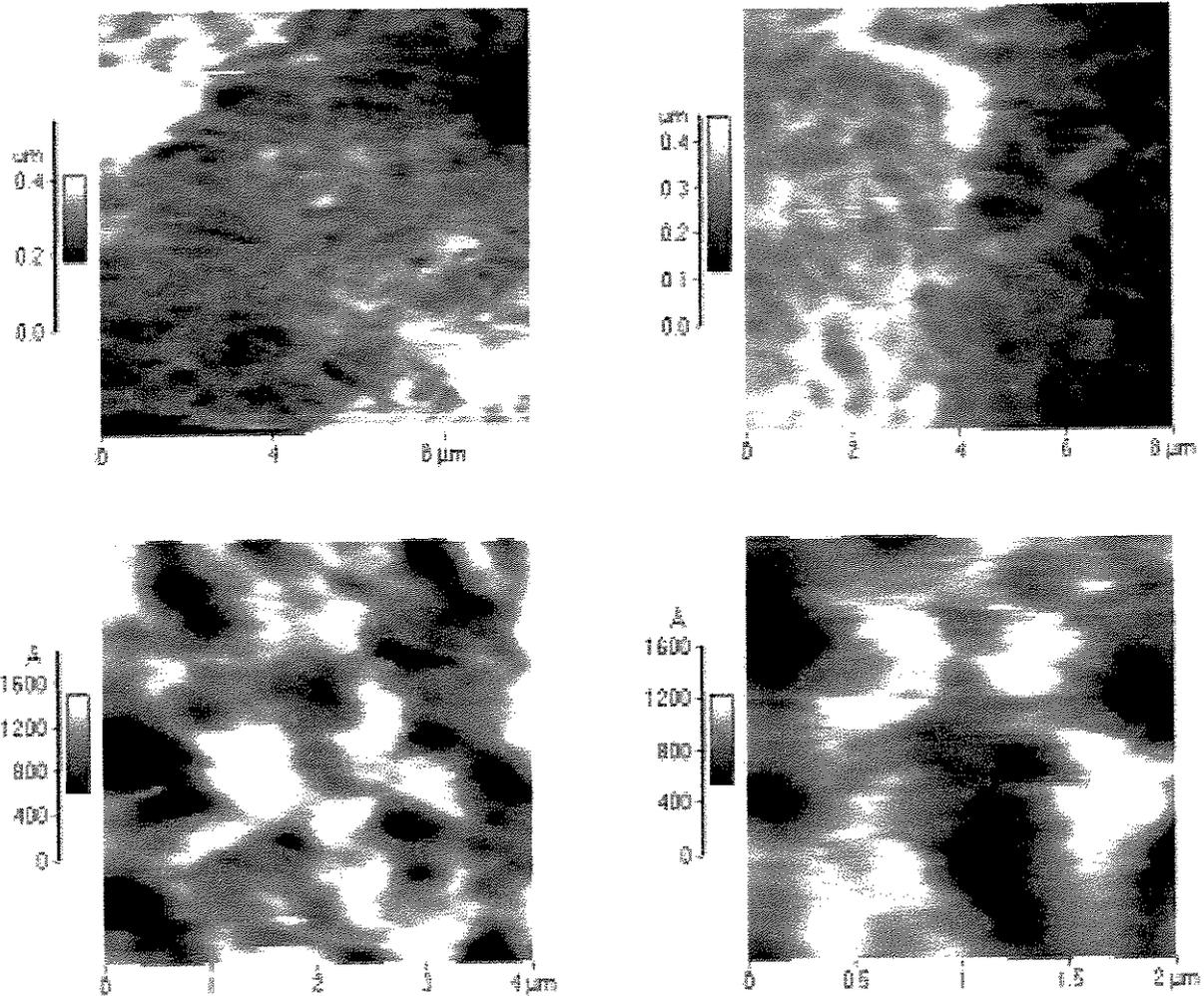


Figura 6.8. Imagens obtidas por microscopia de força atômica das microfibrilas de colágeno da cartilagem articular inflamadas, após a aplicação de laser de HeNe com doses diárias de $7,0 \text{ J/cm}^2$, por 2 dias

A correlação entre a estimulação mecânica e aumento da espessura das fibrilas de colágeno e sua agregação com a dose de $7,0 \text{ J/cm}^2$ já é conhecida [3]. Esta conversão da

deformação mecânica em carga na estrutura da molécula sugere a possibilidade de interação da energia eletromagnética com a estrutura molecular do colágeno [31-33]. Enwemeka e colaboradores [32] citaram que a interferência destes campos ocorre com a atividade enzimática dos tecidos e moléculas, e as cargas nas membranas e nas biomoléculas modificam a eficiência de interação, promovendo diferenças nos produtos finais de reação no tecido de reparo.

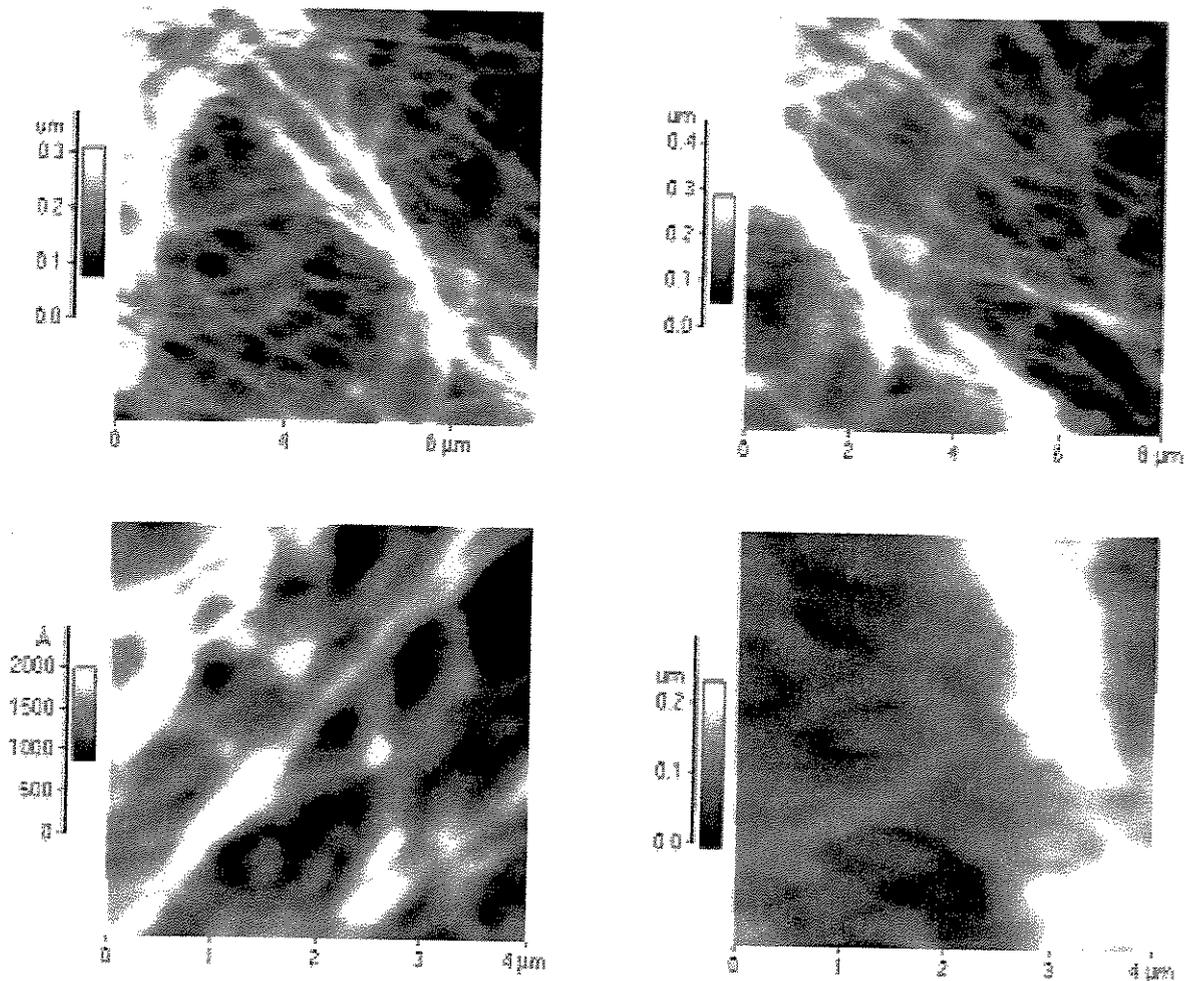


Figura 6.9. Imagens obtidas por microscopia de força atômica das microfibrilas de colágeno da cartilagem articular inflamadas, após a aplicação de laser de HeNe com doses diárias de $7,0 \text{ J/cm}^2$, por 9 dias

A transferência da radiação para os tecidos é complexa. Anders e colaboradores [33] citam que a transferência da radiação depende não do aquecimento e sim das propriedades ópticas dos tecidos. As propriedades de absorção e o espalhamento das ondas podem modificar fortemente a resposta a uma dada exposição, o que parece estar de acordo com os resultados obtidos neste trabalho.

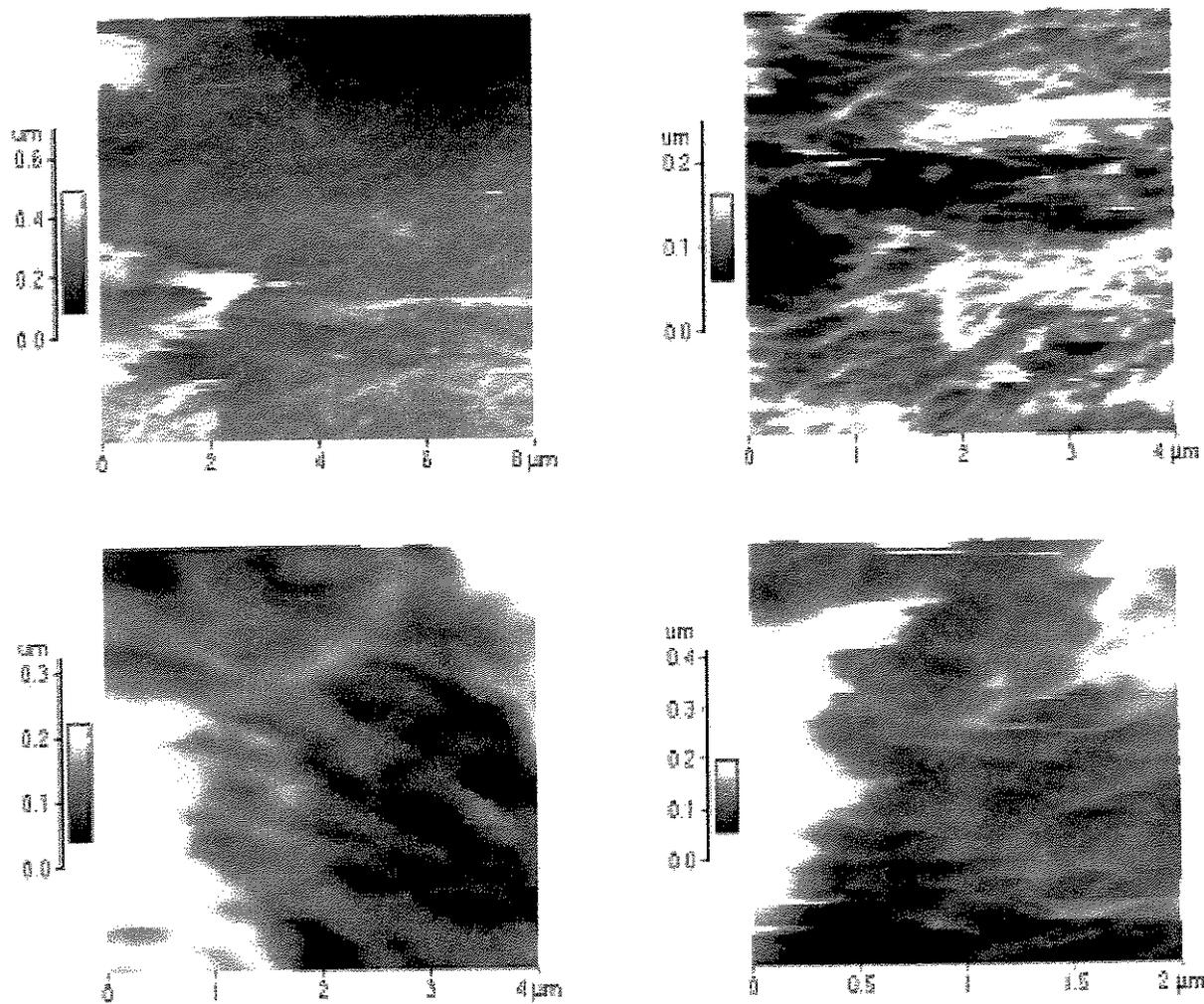


Figura 6.10. Imagens obtidas por microscopia de força atômica das microfibrilas de colágeno da cartilagem articular inflamadas, após a aplicação de laser de HeNe com doses diárias de $7,0 \text{ J/cm}^2$, por 16 dias

Breugel e colaboradores [34] relataram que a radiação de laser de HeNe produz eventos fotofísicos que podem levar a ativação ou inativação de enzimas, propriedades

físicas e químicas celulares, principalmente pelo tempo de exposição e a dose utilizada. Isto pode ativar uma cascata de reações químicas, que modifiquem as respostas de fluxo sanguíneo, permeabilidade vascular, proliferação de fibroblastos, em função das modificações no potencial de membrana. Hallman e colaboradores [35] citaram que há uma interação importante entre a luz coerente do laser de HeNe e as moléculas de colágeno, provavelmente envolvendo os fibroblastos.

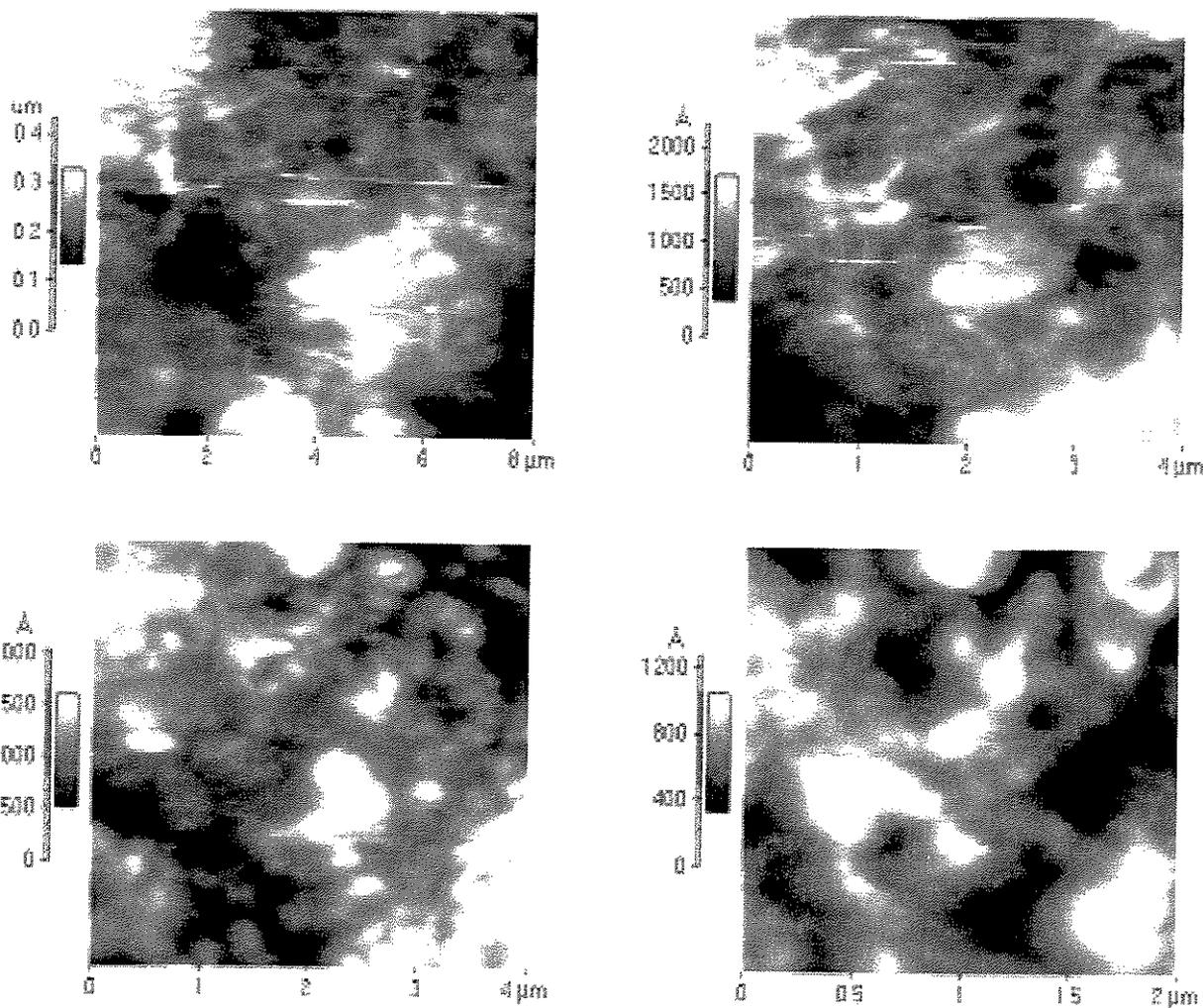


Figura 6.11. Imagens obtidas por microscopia de força atômica das microfibrilas de colágeno da cartilagem articular inflamadas, após a aplicação de laser de HeNe com doses diárias de $50\text{J}/\text{cm}^2$, por 2 dias

A possível melhora dos animais tratados com laser de HeNe, quando comparados com os animais que não receberam o tratamento, pode estar relacionado com o aumento da atividade piezoelétrica e piroelétrica do colágeno com o laser [36]. Este fenômeno provocaria modificações na conformação molecular ou na configuração espacial dessas substâncias, o que desencadearia diferentes respostas [37].

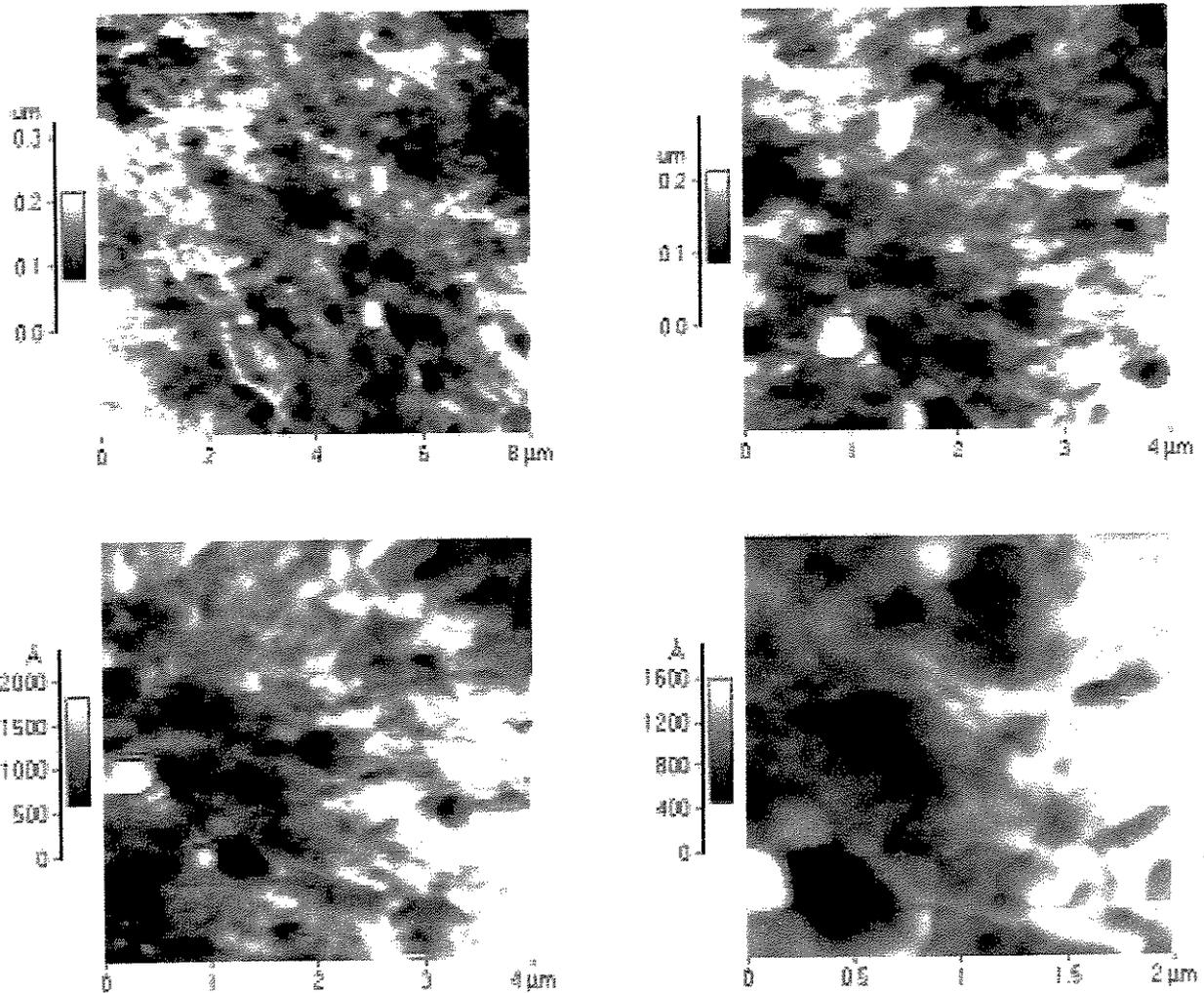


Figura 6.12. Imagens obtidas por microscopia de força atômica das microfibrilas de colágeno da cartilagem articular inflamadas, após a aplicação de laser de HeNe com doses diárias de 50 J/cm², por 9 dias

Esta atividade elétrica na estrutura da molécula, pode estar possivelmente relacionada com a interação molecular do colágeno e a energia eletromagnética [31, 38]. Estes resultados, segundo Karu [39] podem advir com a ação primária que o laser de luz visível (HeNe) promove pois no caso o laser tem ação primariamente sobre a cadeia respiratória, elevando a produção de NADPH e ATP mitocondrial. Secundariamente, esta ação pode ocorrer através da via enzimática, com elevações na produção de Na e H, alterando os mecanismos de Na/K na célula, pela atividade da enzima ATPase.

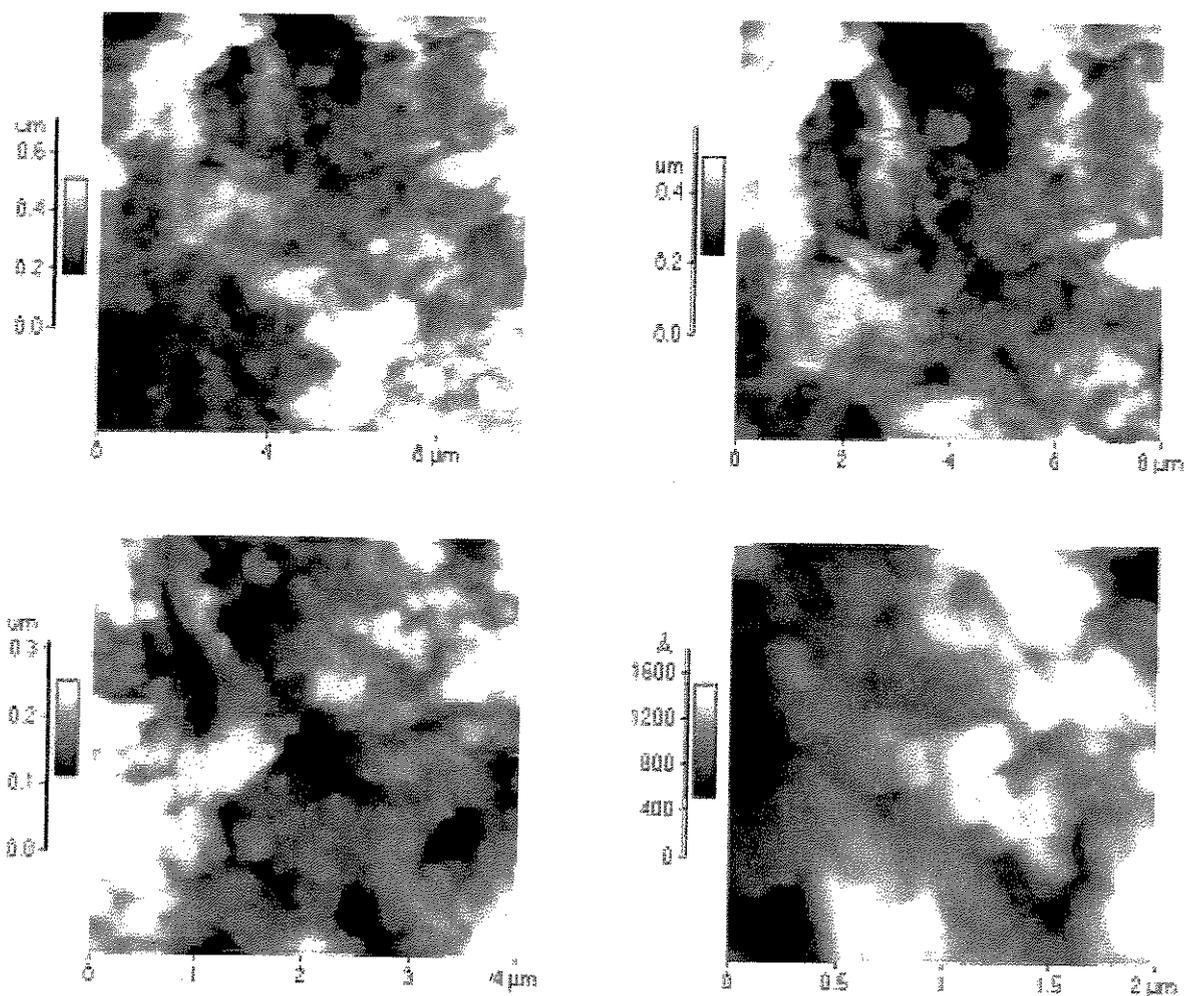


Figura 6.13. Imagens obtidas por microscopia de força atômica das microfibrilas de colágeno da cartilagem articular inflamadas, após a aplicação de laser de HeNe com doses diárias de 50 J/cm^2 , por 16 dias

Os resultados obtidos pela MFA, em relação aos efeitos positivos, negativos ou inócuos do laser na morfologia da cartilagem, foram comparáveis com os resultados observados nas análises de MEV. As imagens de MFA reforçam as observações anteriores de que a ação do laser de HeNe depende da dose diária aplicada, sendo que, no caso da MFA os resultados mais positivos foram observados para as doses de 7,0 J/cm².

6.2.4 Grupos de animais inflamados e com a aplicação de laser de GaAs.

A seqüência de Figuras (de 6.14 a 6.22) mostram imagens típicas de MFA dos grupos de animais que tiveram a inflamação induzida e a posterior aplicação de laser de GaAs. As Figuras 6.14, 6.15 e 6.16 apresentam os resultados evolutivos (2, 9 e 16 dias) dos grupos de animais que receberam a aplicação da dose diária de 1,0 J/cm².

Os conjuntos seguintes (Figuras 6.17, 6.18, 6.19 e Figuras 6.20, 6.21 e 6.22) correspondem também ao processo evolutivo mas com aplicações de doses diárias de 5,0 J/cm² e 25,0 J/cm², respectivamente. Neste estágio, as cartilagens estimuladas com o laser de GaAs, pôde-se observar a formação de grumos aglomerados com ondulações, e intenso agrupamento das fibrilas.

A coleção de imagens de MFA apresentada nesta seqüência (da Figura 6.15 até a Figura 6.19) indicam que a aplicação do laser de GaAs, em diferentes doses e em diferentes períodos de aplicação, aparentemente não teve nenhuma influência evolutiva positiva no processo de regeneração da cartilagem provocada pelo processo inflamatório.

A Figura 6.14 referente ao processo evolutivo com aplicação de laser na dose de 1,0 J/cm² durante 2 dias não foi considerada por ser atípica. A falta de focalização nas imagens da Figura 6.14 não permitiu identificar com definição as estruturas subjacentes e isto dever ter ocorrido pelo excesso de água existente na superfície da amostra, ou pelos líquidos lubrificantes derivados da própria cartilagem. A ineficácia do laser de GaAs nesta dose 1,0 J/cm² é confirmada pela Figura 6.16 onde se pode observar, na imagem do canto superior esquerdo, que mesmo depois de 16 dias de aplicação ainda está ocorrendo o

descolamento de partes da cartilagem. Nesta imagem, provavelmente pode-se ver a superfície do osso subcondral com o descolamento da cartilagem.

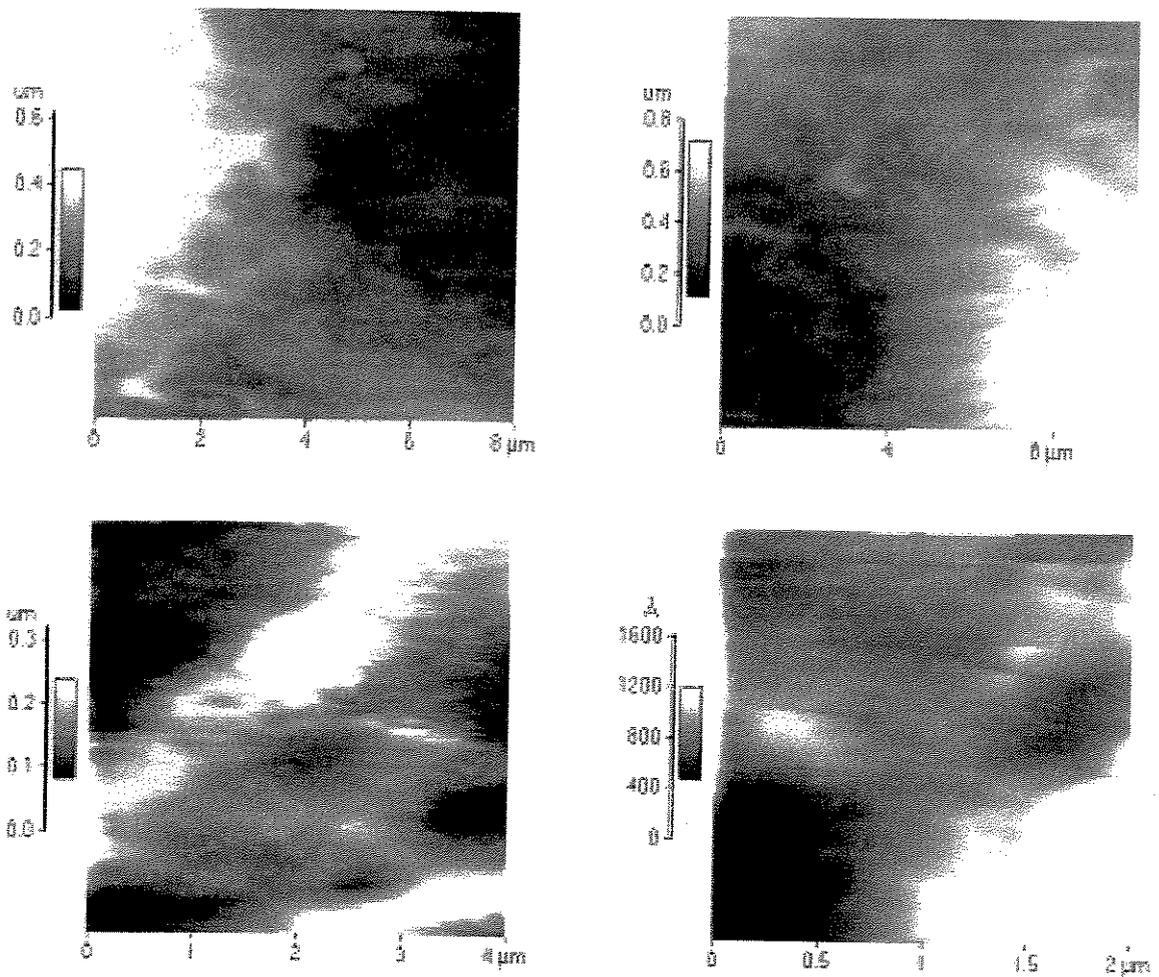


Figura 6.14. Imagens obtidas por microscopia de força atômica das microfibrilas de colágeno da cartilagem articular inflamadas, após a aplicação de laser de GaAs com doses diárias de $1,0 \text{ J/cm}^2$, por 2 dias.

A resposta biológica ao tratamento laser está relacionada com a cascata de reações bioquímicas que ocorrem no citoplasma e na membrana celular a partir de fotorreceptores nas mitocôndrias [40-42].

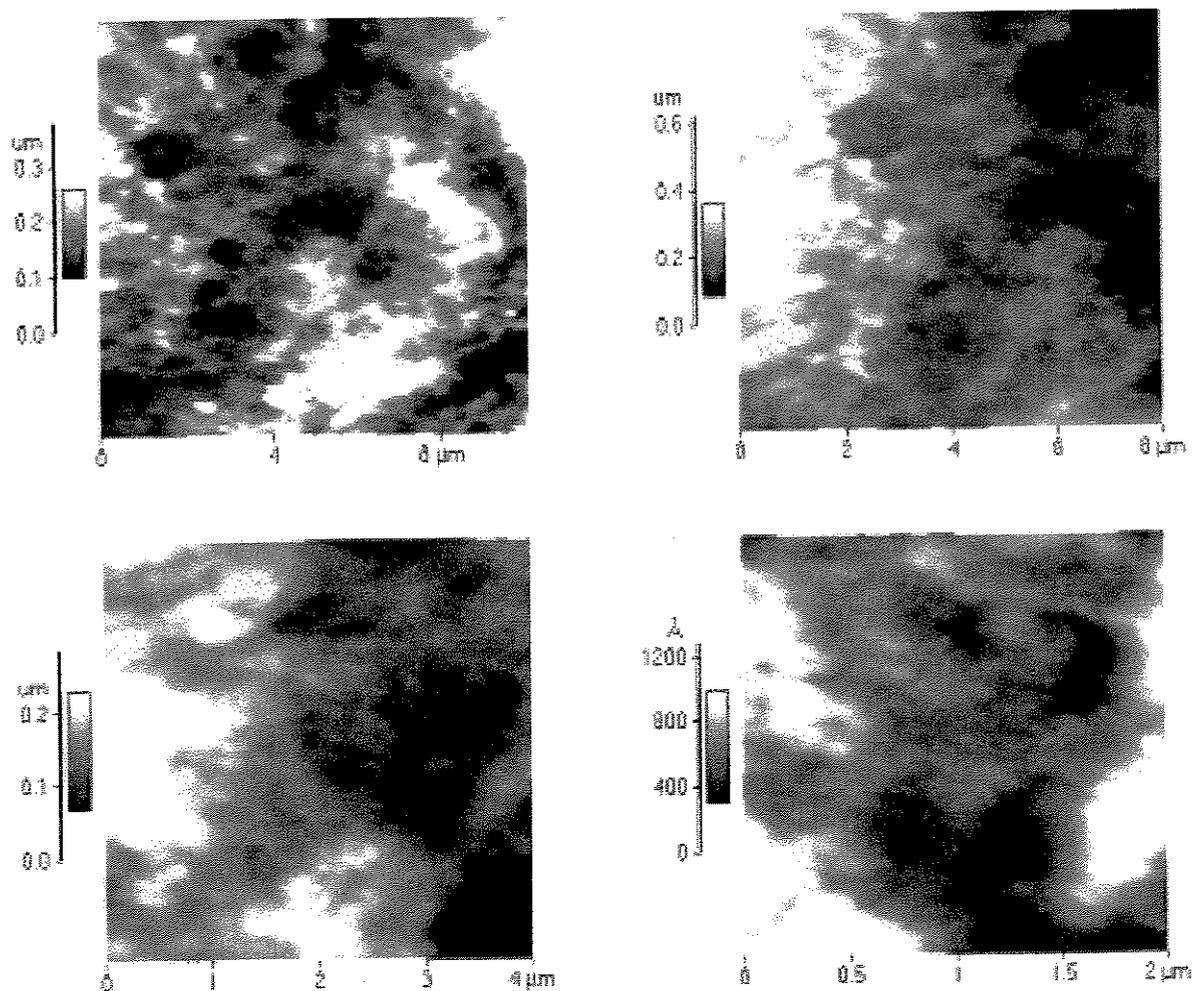


Figura 6.15. Imagens obtidas por microscopia de força atômica das microfibrilas de colágeno da cartilagem articular inflamadas, após a aplicação de laser de GaAs com doses diárias de $1,0 \text{ J/cm}^2$, por 9 dias

Fulga e colaboradores [43] relataram que os efeitos positivos do tratamento com laser de GaAs na artrite em ratos ocorrem pela ação nos fibroblastos e na resposta promovida pelos macrófagos. Citaram ainda que os efeitos eram considerados satisfatórios em doses mais altas. Calatrava e colaboradores [44] comparando os efeitos do tratamento laser de HeNe com o laser de GaAs em coelhos, verificaram que o laser de GaAs mostrou uma ação positiva na regeneração da cartilagem hialina, enquanto que, o laser de HeNe

promoveu um efeito regenerativo no tecido fibrocartilaginoso, na recuperação e regeneração da cartilagem articular.

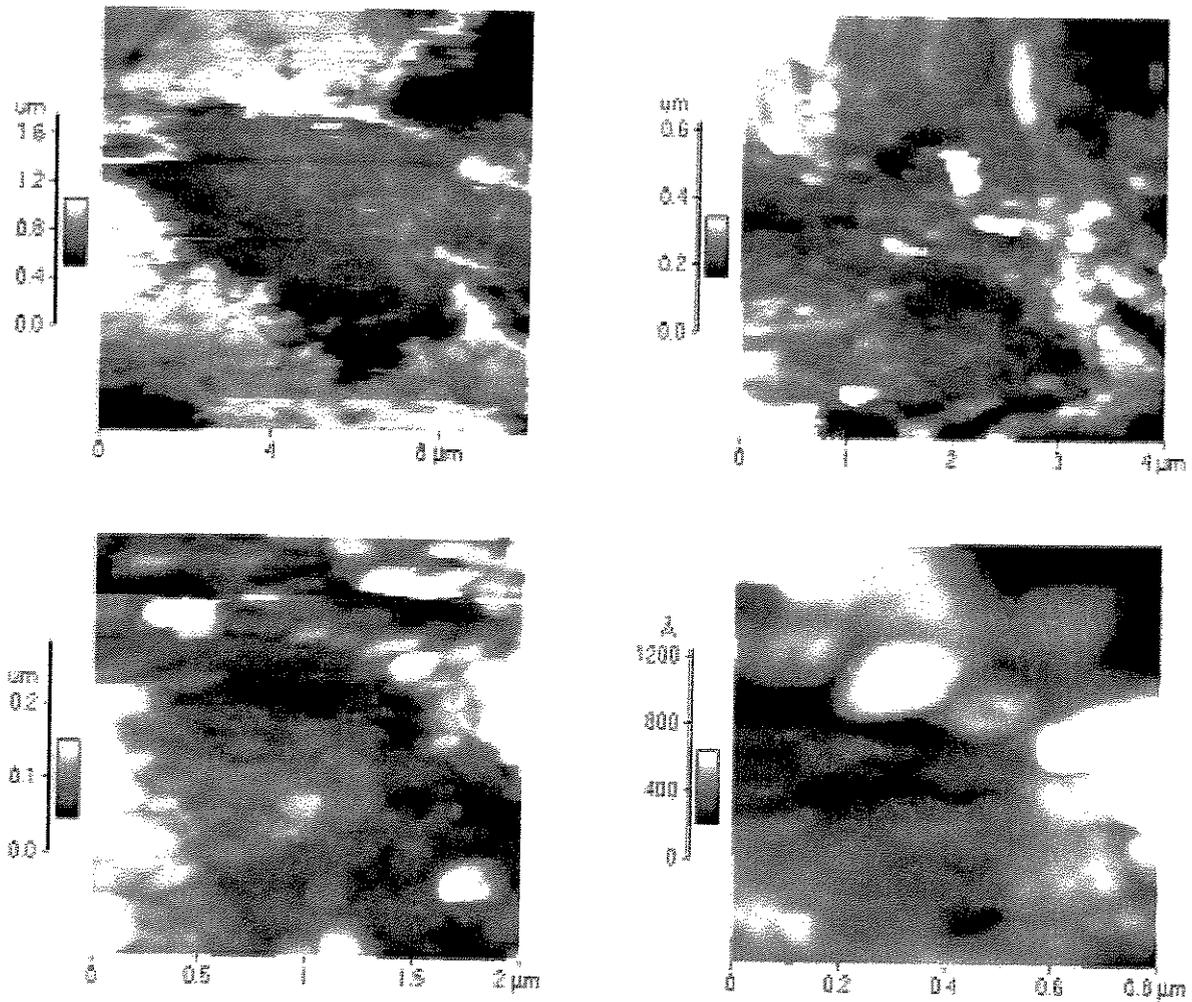


Figura 6.16. Imagens obtidas por microscopia de força atômica das microfibrilas de colágeno da cartilagem articular inflamadas, após a aplicação de laser de GaAs com doses diárias de $1,0 \text{ J/cm}^2$, por 16 dias

Schults e colaboradores [45] realizaram análises histoquímica na cartilagem inflamada e com a aplicação várias doses de laser de GaAs e concluíram que a aplicação de altas doses não garantia uma resposta positiva na regeneração da cartilagem. Citaram ainda

que, as melhores doses para se obter resultados positivos na regeneração da cartilagem estão por volta de 25 J/cm^2 .

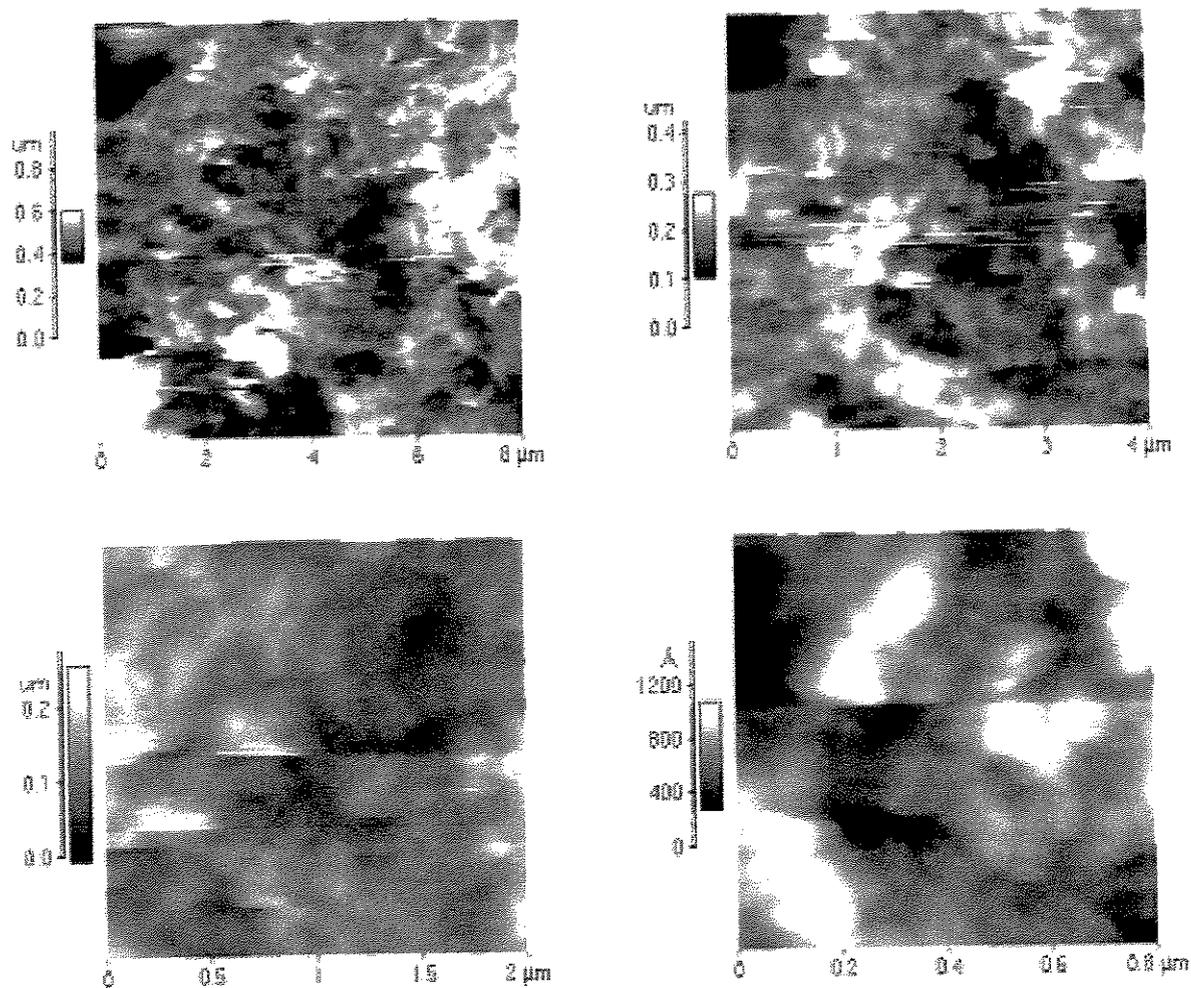


Figura 6.17. Imagens obtidas por microscopia de força atômica das microfibrilas de colágeno da cartilagem articular inflamadas, após a aplicação de laser de GaAs com doses diárias de $5,0 \text{ J/cm}^2$, por 2 dias

Todas as amostras analisadas eram bastante rugosas, tornando difícil à análise por MFA. Podemos exemplificar isto através das imagens mostradas na Figura 6.17. Nas imagens superiores observam-se alguns riscos, indicando a tração de material da própria cartilagem pela ponta de prova. Nas imagens inferiores é evidente a mudança do padrão das texturas. As imagens aparecem divididas horizontalmente indicando que o “cantilever”

e ou a ponta tocaram em degraus muito altos da amostra, deslocando radicalmente a ponta de prova da região de varredura nestas transições.

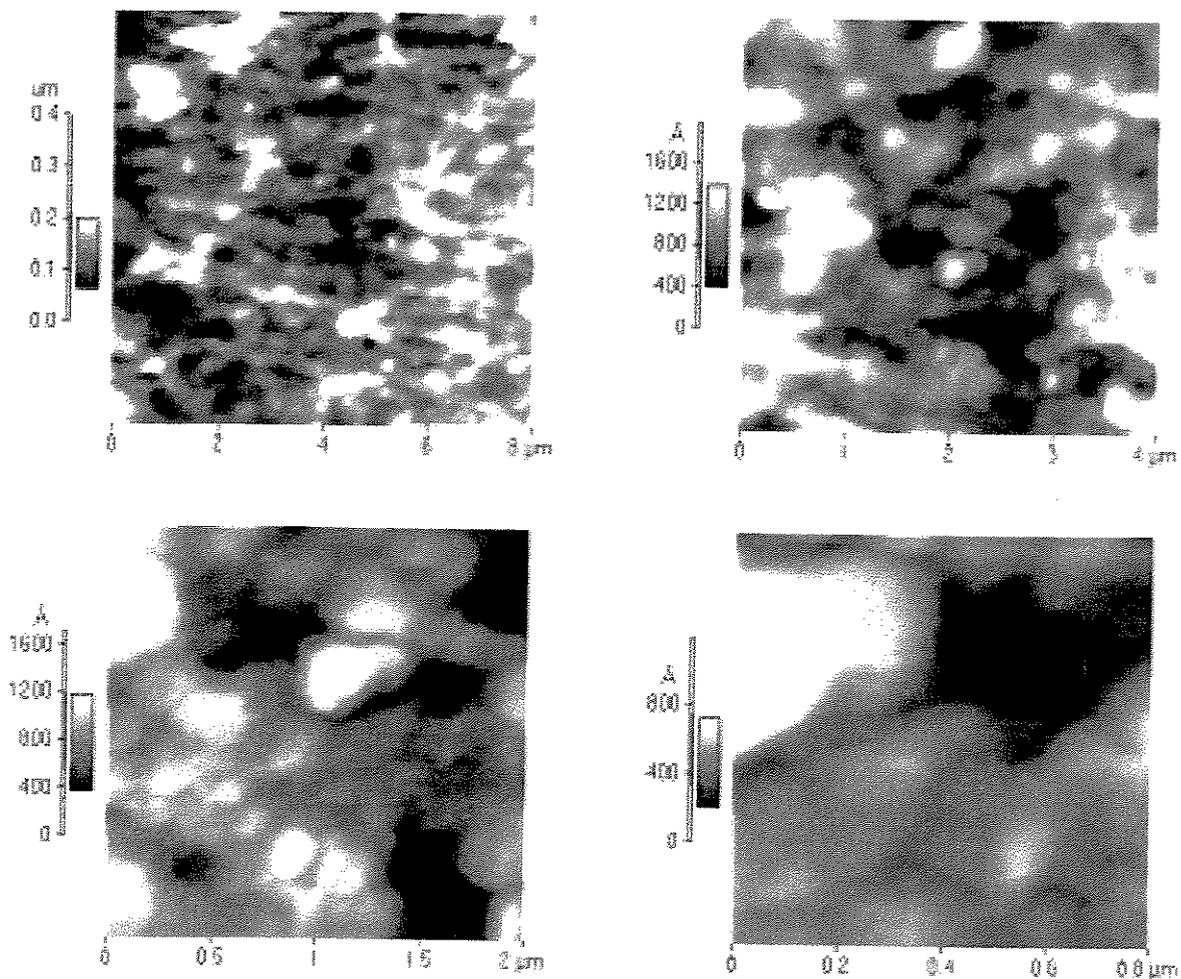


Figura 6.18. Imagens obtidas por microscopia de força atômica das microfibrilas de colágeno da cartilagem articular inflamadas, após a aplicação de laser de GaAs com doses diárias de $5,0 \text{ J/cm}^2$, por 9 dias

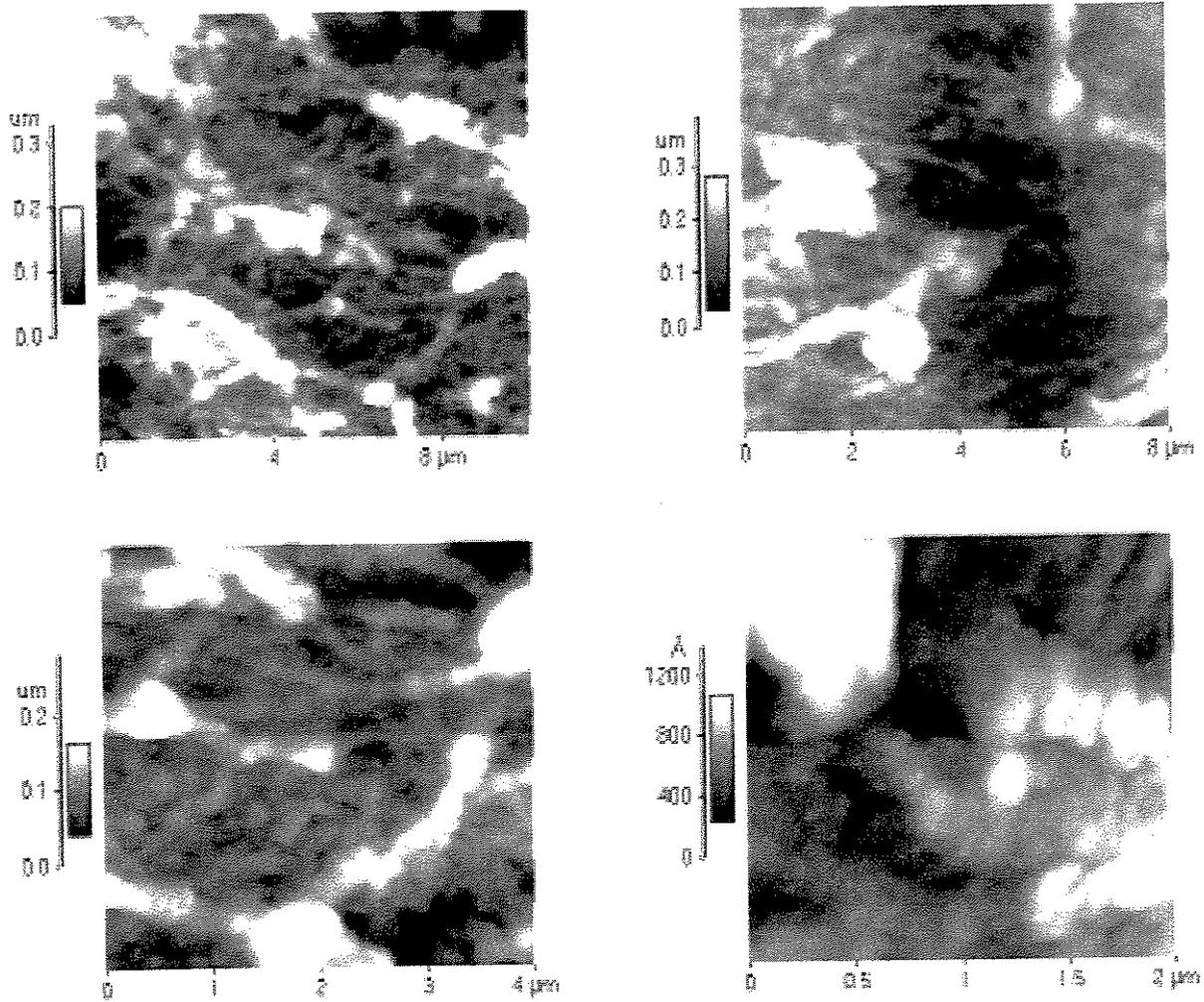


Figura 6.19. Imagens obtidas por microscopia de força atômica das microfibrilas de colágeno da cartilagem articular inflamadas, após a aplicação de laser de GaAs com doses diárias de $5,0 \text{ J/cm}^2$, por 16 dias

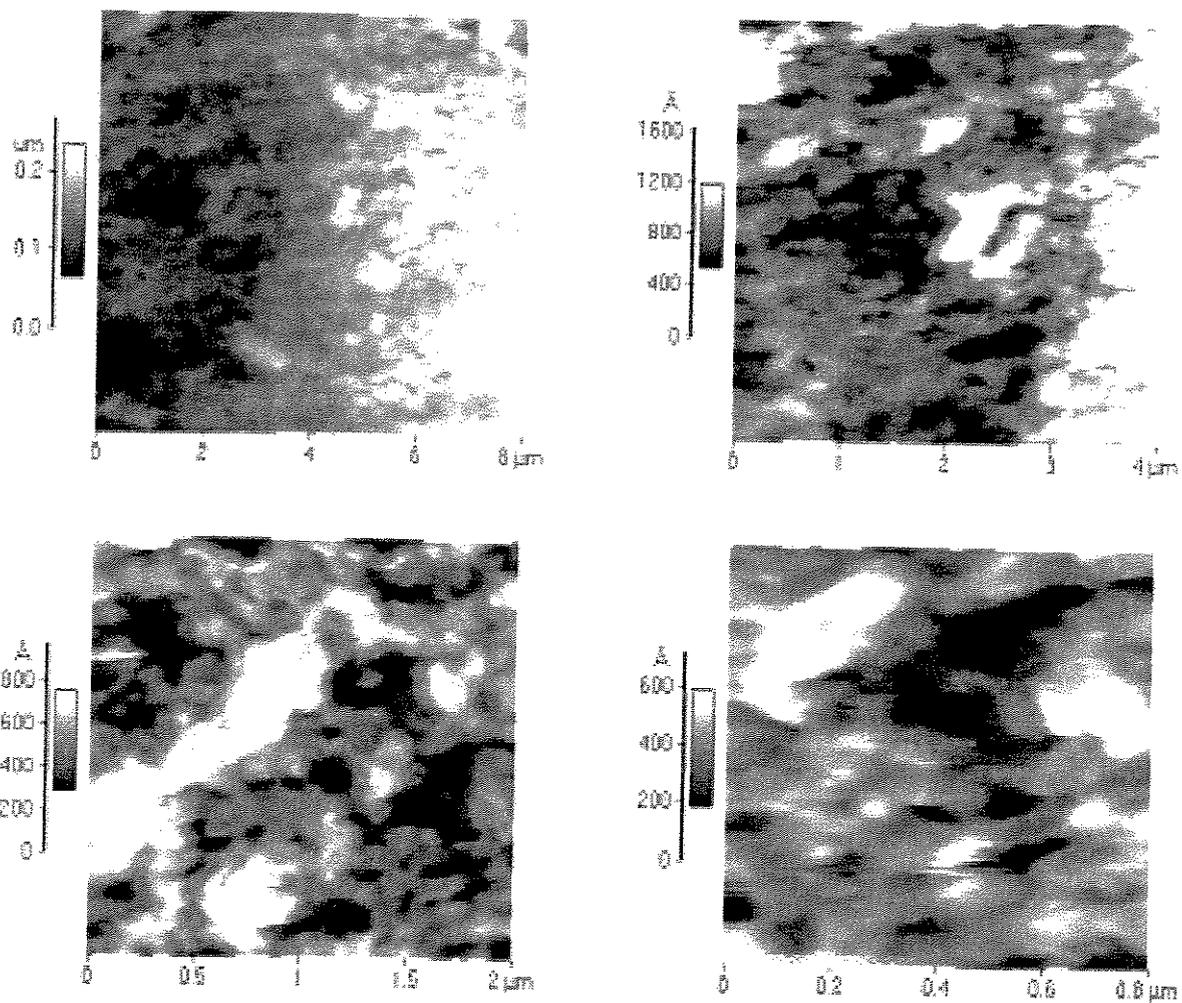


Figura 6.20. Imagens obtidas por microscopia de força atômica das microfibrilas de colágeno da cartilagem articular inflamadas, após a aplicação de laser de GaAs com doses diárias de 25 J/cm^2 , por 2 dias

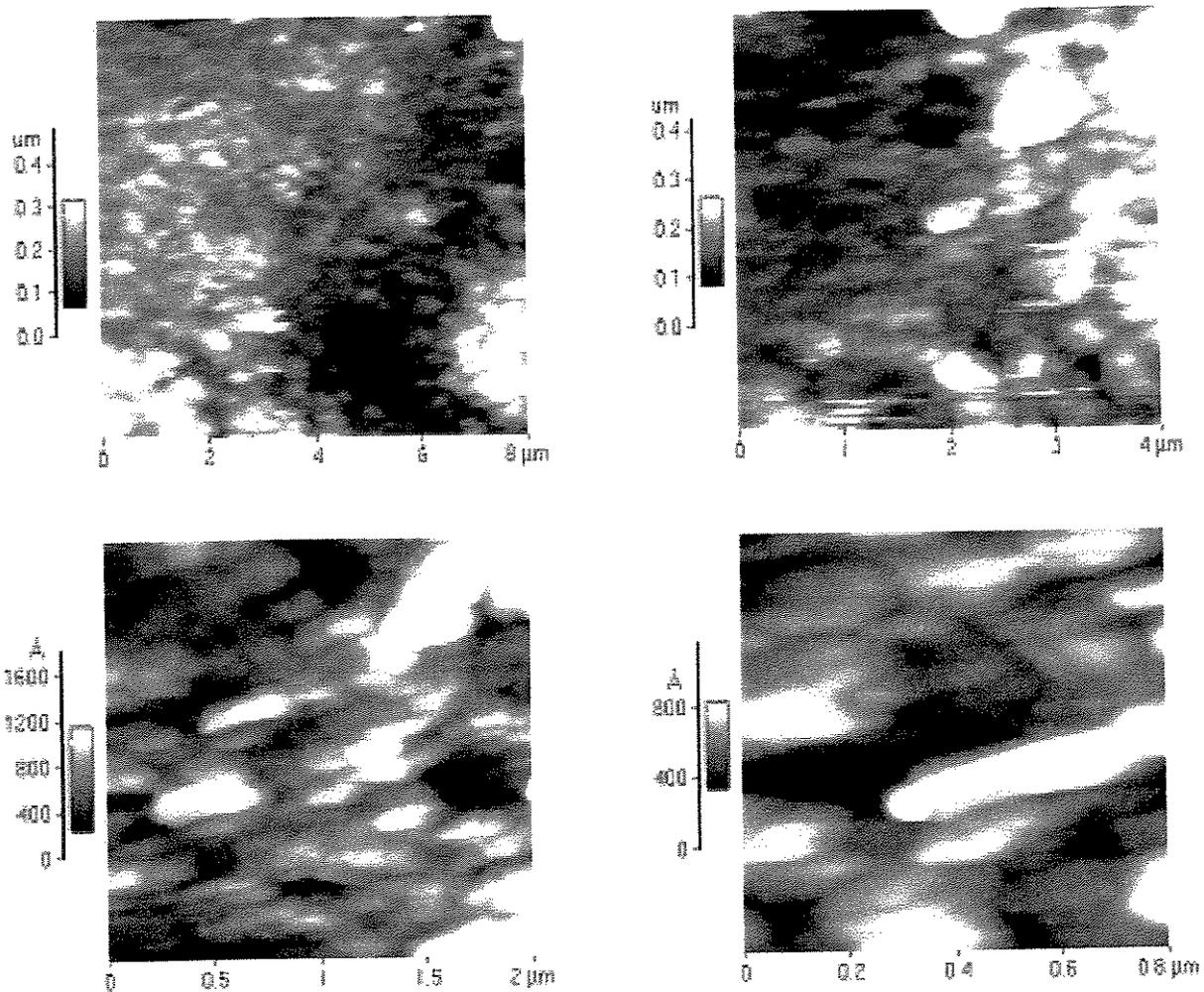


Figura 6.21. Imagens obtidas por microscopia de força atômica das microfibrilas de colágeno da cartilagem articular inflamadas, após a aplicação de laser de GaAs com doses diárias de 25 J/cm^2 , por 9 dias

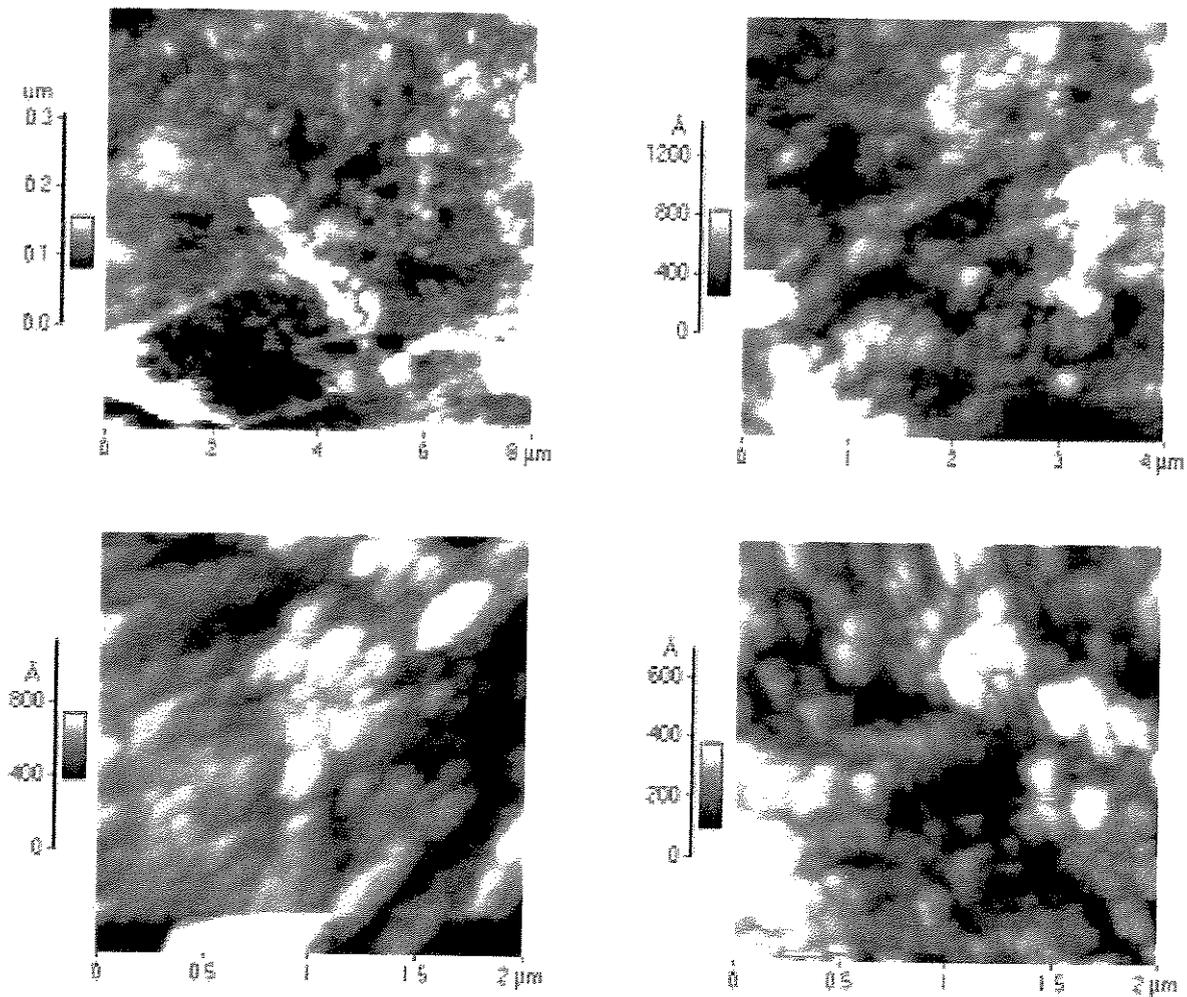


Figura 6.22. Imagens obtidas por microscopia de força atômica das microfibrilas de colágeno da cartilagem articular inflamadas, após a aplicação de laser de GaAs com doses diárias de 25 J/cm^2 , por 16 dias

6.3. Conclusões

O processo degenerativo de artrite é bastante complexo e portanto é muito interessante a utilização de diversas técnicas de análise para que haja a possibilidade do entendimento pelo menos parcial dos mecanismos envolvidos. A MFA é uma ferramenta de

análise morfológica muito poderosa e que pode trazer informações importantes sobre a ação do laser sobre os mecanismos de regeneração da cartilagem. Entretanto, as análises são predominantemente morfológicas e de difícil interpretação.

Através de nossas observações com a MFA podemos concluir que o laser de GaAs, aparentemente, não apresentou nenhuma alteração significativa na evolução do quadro degenerativo, pelo menos do ponto de vista morfológico ultraestrutural. Outros efeitos, como por exemplo, de adesão e aglomeração celular, também não puderam ser evidenciados com clareza.

No caso do laser de HeNe foram observadas melhoras significativas, principalmente no caso dos animais tratados com as doses diárias de $7,0 \text{ J/cm}^2$. Doses muito menores ($0,5 \text{ J/cm}^2$) demonstraram quase que nenhuma significância. No outro extremo, isto é, doses muito maiores (50 J/cm^2) também não houve melhora na regeneração.

Podemos concluir que provavelmente existem mecanismos no processo de regeneração que são fotossensíveis para os fótons do laser de HeNe (luz visível) e não fotossensíveis para os fótons do laser de GaAs (infravermelho). Outra conclusão é que, no caso da radiação do laser de HeNe, os mecanismos de foto-regeneração da cartilagem também dependem da dose diária aplicadas, sendo que doses pequenas aparentemente não conseguem desencadear nenhum processo regenerativo e que doses grandes podem desencadear processos regenerativos e degenerativos ao mesmo tempo, levando à existência de uma dose ótima para a regeneração. De acordo com os resultados observados pela MFA a melhor dose é de $7,0 \text{ J/cm}^2$. evidentemente o valor ótimo pode estar na faixa maior ou igual a $7,0 \text{ J/cm}^2$.

6.4. Referências

[1] EDSTRON, R.D., YANG, X.R., LEE, G., EVANS, D.F. Viewing molecules with scanning tunneling microscopy and atomic force microscopy, *The FASEB Journal*, v.4, p.3144-3151, 1990.

[2] RIPPE, K., MÜCHE, N., LANGOWSKI, J. Superhelix dimensions of a 1868 base pair plasmid determined by scanning force microscopy in air and in aqueous solution, *Nucleic Acids Research*, v.25 (9), p.1736-1744, 1997.

- [3] WYMAN, C., ROMBEL, I., NORTH, A.K., KUSTU, S. Unusual oligomerization required for activity of NtrC, a bacterial enhancer-binding protein, *Science*, v.275, p.1658-1663, 1997.
- [4] HENDERSON, E. Imaging and nanodissection of individual supercoiled plasmids by atomic force microscopy, *Nucleic Acids Research*, v.20, p.445-447, 1992.
- [5] DUNLAP, D.D., MAGGI, A., SORIA, M.R., MONACO, L. Nanoscopic structure of DNA condensed for gene delivery, *Nucleic Acids Research*, v.25 (15), p.3095-3101, 1997.
- [6] DIETZ, P. Surface pore structures of micro- and ultrafiltration membranes imaged with the atomic force microscope, *Journal of Membrane Science*, v.65, p.101-112, 1992.
- [7] HANSMA, H.G., REVENKO, I., KIM, K., LANEY, D.E. Atomic force microscopy of long and short double-stranded, single-stranded and triple-stranded nucleic acids, *Nucleic Acids Research*, v.24 (4), p.713-720, 1996.
- [8] BINNIG, G, QUATE, C.F., GERBER, Ch. Atomic force microscope, *Phys. Rev. Lett.*, v.56, p.930-933, 1986.
- [9] GALE, M., POLLANEN, M.S., MARKIEWICZ, P., GOH, C. Sequential assembly of collagen revealed by atomic force microscopy, *Biophysics Journal*, v.68, p.2124-2128, 1995.
- [10] YAMAMOTO, S.Y., HITOMI, J., SHIGENO, M., SAWAGUCHI, S., ABE, H., USHIKI, T. Atomic force microscopy studies of isolated collagen fibrils of the bovine cornea and sclera, *Archives of Histology and Cytology*, v.60 (4), p.371-378, 1997.
- [11] MURASHITA, T. Low-temperature tunnelling-electron luminescence microscopy using tip collection, *Journal of Electron Microscopy*, v.46, p.199-205, 1997.
- [12] LUTWYCHE, M.I., WADA, Y. Application of a micromachine scanning tunnelling microscope (μ - STM) for vacuum tunnelling gap observation, *Journal of Electron Microscopy*, v.46, p.161-164, 1997.
- [13] COSTA, K.D., YIN, F.C.P. Analysis of indentation: Implications for measuring mechanical properties with atomic force microscopy, *Journal of Biomechanical Engineering-Transactions of the Asme*, v.121 (5), p.462-471, 1999.
- [14] GATHERCOLE, I.j., MILES, M.J., McMASTER, T.J. Scanning probe microscopy of collagen I and the relevance to scanning tunnelling microscopy contrast generation in proteins, *Journal of Chemistry Society Faraday Transactions*, v.89, p.2589-2594, 1993.
- [15] ARAGNO, I., ODETTI, P., ALTAMURA, F., CAVALLERI, O., ROLANDI, R. Structure of rat tail tendon collagen examined by atomic force microscopy, *Experientia*, v.51, p.1063-1067, 1995.

- [16] RASPANTI, M., GUIZZARDI, S., STROCCHI, R., RUGGERI, A. Collagen fibril patterns in compact bone: preliminary ultrastructural observations, *Acta Anatomica*, v.155, p.249-256, 1996.
- [17] FUJITA, Y., KOBAYASHI, K., HOSHINO, T. Atomic force microscopy of collagen molecules. Surface morphology of segment-long-spacing (SLS) crystallites of collagen, *Journal of Electron Microscopy*, v.46, p.321-326, 1997.
- [18] CHERNOFF, E.A.G. CHERNOFF, D.A. Atomic force microscope images of collagen fibers, *Journal Vacuum Technology*, v.10, p.596-599, 1992.
- [19] WIEGRAEBE, J.R.. Atomic force microscopy of a hydrated bacteria surface, *Journal of Microscopy (Oxford)*, v.163, p.79-84, 1991.
- [20] PARIZOTTO, N. Ação do laser Hélio-Neônio sobre o processo de reparo tecidual: Um estudo do colágeno por microscopia eletrônica de varredura, microscopia de força atômica e espectroscopia por infravermelho, Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, UNICAMP, Campinas, 181 p., 1998.
- [21] HULMES, D.J.S, WESS, T.J., PROCKOP, D.J., FRATZL, P. Radial packing, order, and disorder in collagen fibrils *Biophysical Journal*, v.68, p.1661-1670, 1995.
- [22] BARANAUSKAS, V., VIDAL, B.C., PARIZOTTO, N.A. Observation of geometric structure of collagen molecules by atomic force microscopy, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.69, p.91-97, 1998.
- [23] KURE, M., ARAKI, K., OGATA, T. Scanning tunneling microscopic study of osmium collagen, *Journal of Electron Microscopy*, v.44, p.207-211, 1995.
- [24] JURVELIN, J.S., MULLER, D.J., WONG, M., STUDER, D., ENGEL, A., HUNZIKER, E.B. Surface and subsurface morphology of bovine humeral articular cartilage as assessed by atomic force and transmission electron microscopy, *Journal of Structural Biology*, v.117, p.45-54, 1996.
- [25] NEURATH, M.F. Detection of luse bodies, spiralled collagen, dysplastic collagen, and intracellular collagen in rheumatoid connective tissues: An electron microscopic study, *Annals of the Rheumatic Diseases*, v.52, p.278-284, 1993.
- [26] SAWAE, Y., MURAKAMI, T., MATSUMOTO, K., HORIMOTO, M. Study on morphology and lubrication of articular cartilage surface with atomic force microscopy, *Journal of Japanese Society of Tribologists*, v.45 (2), p.150-157, 2000.
- [27] MOW, V.C., RATCLIFFE, A., POOLE, A.R., Cartilage and diarthrodial joint as paradigms for hierarchical materials and structures, *Biomaterials*, v.13 (2), p.67-97, 1992.
- [28] MICHET, C.J., Osteoarthritis, *Primary Care*, v.20, p.815-826, 1993.

- [29] NUKI, G. Oseoarthritis: a problem of joint failure. *Zeitschrift fur Rheumatologie*, v.58 (3), p.142-147, 1999.
- [30] HOFLAND, L.J., LAMBERTS, S.W.J., HAZENBERG, M.P., Somatostatin receptor subtype expression in cells of the rat immune system during adjuvant arthritis, *Journal of Endocrinology*, v.161, p.167-175, 1999.
- [31] VAN BREUGEL, H.H.F.I., DOP BÄR, P.R. Power density and exposure time of HeNe laser irradiation are more important than total energy dose in photo-biomodulation of human fibroblasts in vitro, *Lasers in Surgery and Medicine*, v.12, p.528-537, 1992.
- [32] ESENALIEV, R.O., ORAEVSKY, A.A., LETOKHOV, V.S., KARABUTOV, A.A., MALINSK, T.V. Studies of acoustical and shock waves in the pulsed laser ablation of biotissue, *Lasers in Surgery and Medicine*, v.13, p.470-484, 1993.
- [33] BROWN, M, GOGIA, P.P., SINACORE, D.R., MENTON, D.N. high-voltage galvanic stimulation on wound healing in Guinea Pigs: Longer-term effects, *Archives of Physics and Medicine Rehabilitation*, v.76, p.1134-1137, 1995
- [34] ENWEMEKA, C.S. Ultrastructural morphometry of membrane-bound intracytoplasmic collagen fibrils in tendon fibroblasts exposed to HENE laser-bean, *Tissue & Cell*, v.24 (4), p.511-523, 1992.
- [35] ANDERS, J.J., BORKE, R.C., WOOLERY, S.K., VAN De MERWE, W.P. Low power laser irradiation alters the rate of regeneration of the rat facial nerve, *Lasers in Surgery and Medicine*, v.13, p.72-82, 1993.
- [36] HALMAN, H.O., BASFORD, J.R., O'BRIEN, J.F., CUMMINS, L.A. Does low-energy helium-neon laser irradiation alter in vitro replication of human fibroblasts, *Lasers in Surgery and Medicine*, v.8, p.125-129, 1998.
- [37] KASAI, S., KONO, T., SAKAMOTO, T., MITO, M. Effects of low-power laser irradiation on multiple unit discharges induced by noxious stimuli in the anesthetized rabbit, *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, v.12 (4), p.221-224, 1994
- [38] ENWEMEKA, C.S., RODRIGUEZ, O.O., GALL, N.G., WALSH, N.E. Morphometrics of collagen fibril populations in He:Ne Laser photostimulated tendons, *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, v.6, p.47-52, 1990.
- [39] KARU, T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near - IR radiation on cells, *Journal of Photochemistry and Photobiology, Biophysics and Biology*, v.49, p.1-17, 1999.
- [40] HEUSSLER, J.K., HINCHEY, G., MARGIOTTA, E., QUINN, R., BUTLER, P., MARTIN, J., STURESS, A.D. A double blind randomised trial of low power laser treatment in rheumatoid arthritis, *Annals of the Rheumatic Diseases*, v.52, 703-706, 1993.

- [41] BASFORD, J.R. Low-energy laser therapy: controversies and new research findings, *Lasers in Surgery and Medicine*, v.9, p.1-5, 1989.
- [42] TIPHLOVA, O, KARU, T., Role of primary photoacceptors in low power laser effects, *Lasers in Surgery and Medicine*, v.9, p.67-69, 1989.
- [43] FULGA, C., FULGA, I.G., PREDESCU, M. Clinical study of the effect of laser therapy in rheumatic degenerative diseases, *Rev. Roum. Méd. Int.*, v.32, p.227-232, 1994.
- [44] CALATRAVA, I.R., VALENZUELA, J.M.S., GOMEZ VILLAMANDOS, R.J., JURADO, I.A. Histological and clinical responses of articular cartilage to low-level laser therapy: Experimental study, *Lasers in Medical Science*, v.12(2), p.117-121, 1997.
- [45] SCHULTS, R.J., KRISHANAMURTHY, S., THELMO, W., RODRIGUEZ, J.E., HARVEY, G. Effects of varying intensities of laser energy on articular cartilage, *Lasers in Surgery and Medicine*, v.5, 577-588, 1985.

Capítulo VII

Resultados da dosagem de hidroxiprolina nos animais submetidos à aplicação de lasers

7.1. Considerações Preliminares

No Capítulo III desta tese apresentamos uma introdução sobre a influência da hidroxiprolina como constituinte na formação do colágeno e como indicador da regeneração ou degeneração do colágeno decorrentes das patologias ou das lesões da cartilagem articular. Neste Capítulo apresentamos os resultados experimentais da dosagem de hidroxiprolina nos grupos de animais submetidos a diferentes tipos de lasers, em diferentes doses e em diferentes períodos, após a indução da inflamação.

7.2. Resultados e Discussões

7.2.1 Grupo de controle sem inflamação e grupo de controle inflamado mas sem aplicação de laser

A Tabela 7.1 e a Figura 7.1 apresentam os resultados da dosagem de hidroxiprolina medida nos grupos de animais de controle sem inflamação e com inflamação, em diferentes estágios. Observa-se que o grupo que sofreu a inflamação durante mais tempo (Grupo de 21 dias após a indução da artrite) apresenta uma maior concentração de hidroxiprolina, quando comparado a qualquer outro grupo. Já as diferenças do grupo de 7 dias depois da indução de artrite com o grupo de controle sem inflamação são quase inexistentes. Mesmo assim, comparando-se as médias totais ou os valores de cada grupo das concentrações de

hidroxiprolina pode-se observar que há um crescimento com evolução do tempo da inflamação.

Este crescimento é praticamente inexistente no sétimo dia, detectável no décimo quarto dia, mas bem evidente, em todos os grupos, no final de 21 dias de inflamação. Os resultados observados no presente trabalho são compatíveis com as experiências de Geetha e Varalakshmi [1] que também observaram um aumento crescente da hidroxiprolina depois de 11 dias de inflamação, em cartilagens de joelhos de ratos que sofreram a indução da artrite por injeção de adjuvante de Freund.

Tabela 7.1. Níveis de hidroxiprolina ($\mu\text{g}/\text{mg}$ do peso seco de cartilagem) dos animais experimentais nos respectivos dias de sacrifício ($n = 7$)

Grupo	Controle sem Inflamação	Inflamado 7 dias	Inflamado 14 dias	Inflamado 21 dias
1	30,00	25,15	24,99	42,33
2	23,80	25,20	28,94	25,46
3	25,60	22,18	29,77	37,19
4	21,10	22,32	25,79	37,29
5	25,16	22,61	27,37	27,06
6	25,61	25,30	27,89	27,75
7	25,23	25,26	27,49	37,36
Média com desvio padrão.	$25,21 \pm 2,65$ ^d	$24,00 \pm 1,53$ ^d	$27,46 \pm 1,66$ ^d	$33,49 \pm 6,58$ ^{abc}
a = diferente do grupo controle sem lesão; b = diferente do grupo inflamado 7 dias; c = diferente do grupo inflamado 14 dias; d = diferente do grupo inflamado 21 dias				

O aumento da concentração da hidroxiprolina nas cartilagens inflamadas com o tempo pode ser associado ao desequilíbrio entre os proteoglicanos e o colágeno[2]. Segundo Tanaka e colaboradores [3] esforços cíclicos aplicados sobre a superfície da cartilagem articular produzem nos condrócitos uma diminuição na síntese dos proteoglicanos. Setton e colaboradores [4] observaram que a deterioração da rede sólida de

proteoglicanos-colágeno na superfície articular é o mecanismo predominante no desgaste mecânico da articulação. No processo degenerativo ocorre o desprendimento entre os proteoglicanos e o colágeno, alterando a composição da matriz extracelular e elevando o teor de hidroxiprolina, medido na cartilagem [5].

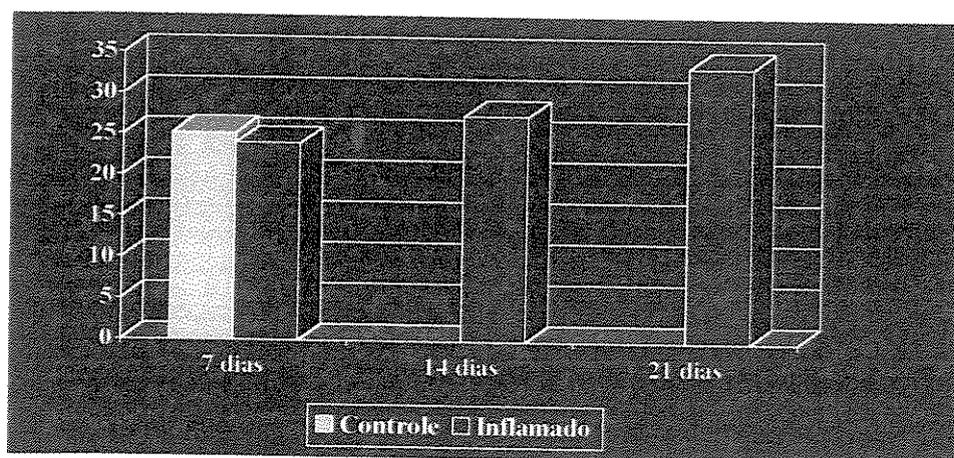


Figura 7.1. Níveis de hidroxiprolina ($\mu\text{g}/\text{mg}$ do peso seco de cartilagem) dos animais experimentais nos respectivos dias de sacrifício ($n = 7$); resultados expressos em média.

A degeneração da cartilagem inflamada com o tempo é coerente com as observações morfológicas feitas por microscopia eletrônica de varredura e microscopia de força atômica, descritos nos Capítulos V e VI.

Altman e colaboradores [6] indicam que a presença de altas concentrações de hidroxiprolina nas análises de cartilagem osteoartrítica, não se deve necessariamente estar relacionada com o aumento na síntese ou na produção da mesma pela cartilagem, pois a hidroxiprolina também pode aumentar devido à liberação do colágeno dos proteoglicanos, causada pela abrasão na ulceração da cartilagem articular.

Em condições normais há um equilíbrio entre o proteoglicano e o colágeno, mas devido à limitada irrigação da cartilagem hialina, esta é sujeita freqüentemente em processos degenerativos [7]. O processo mais comum é a calcificação da matriz provocada pela deposição de fosfato de cálcio sob a forma de cristais de hidroxiapatita, precedida por um aumento de volume e morte das células [5, 8-10].

Segundo Li e colaboradores [11] a degradação do proteoglicano ocorre na cartilagem articular durante toda a vida, principalmente nos lisossomos. Os lisossomos

liberam enzimas proteolíticas na matriz vizinha e despolimerizam os proteoglicanos pela clivagem hidrolítica da estrutura protéica [1]. A catepsina K é a protease predominante na mediação dos osteoclastos, no processo de remodelação da matriz extracelular. No processo inflamatório da cartilagem articular a catepsina K está acentuadamente elevada, bem como, a concentração de hidroxiprolina [7, 11, 12]. É provável que essa enzima seja a responsável pela perda de proteoglicanos, resultando na promoção da lesão da cartilagem articular [2, 11, 13].

7.2.2 Grupo com aplicação de laser de HeNe.

As Tabelas 7.2, 7.3 e 7.4 apresentam os valores de dosagem da hidroxiprolina para os animais irradiados com laser de HeNe em doses de 0,5 J/cm², 7,0 J/cm² e 50,0 J/cm², respectivamente.

Tabela 7.2. Níveis de hidroxiprolina (µg/mg do peso seco de cartilagem) dos animais experimentais tratados com laser de HeNe com 0,5 J/cm², nos respectivos dias de sacrifício; (n = 7).

Grupo	HeNe 0,5 J/cm ²	HeNe 0,5 J/cm ²	HeNe 0,5 J/cm ²
	2 dias	9 dias	16 dias
1	27,29	28,45	26,13
2	33,88	31,29	30,54
3	24,73	22,45	22,64
4	24,10	25,16	25,69
5	33,31	27,45	26,45
6	27,89	28,73	27,18
7	27,39	33,66	26,99
Média com desvio padrão.	28,37 ± 3,84	28,17 ± 3,71	26,52 ± 2,34 d

a = diferente do grupo controle sem lesão; b = diferente do grupo inflamado 7 dias; c = diferente do grupo inflamado 14 dias; d = diferente do grupo inflamado 21 dias; *diferente do grupo tratado 2 dias com a mesma dose, **diferente do grupo tratado 9 dias com a mesma dose; ***diferente do grupo tratado 16 dias com a mesma dose.

Nos animais tratados com a dose de 0,5 J/cm² (vide a Tabela 7.2 e a Figura 7.2) observa-se que depois de 2 ou de 9 dias de aplicação de laser (ou 7 e 14 dias depois da injeção do adjuvante), uma concentração de hidroxiprolina praticamente da mesma ordem que os valores das concentrações obtidas nos animais de controle (Tabela 7.1).

Entretanto, depois de 16 dias de aplicação de laser (ou 21 dias após a indução) ocorre uma diminuição significativa dos valores de hidroxiprolina quando comparados com o grupo inflamado sem tratamento aos 21 dias (Tabela 7.1), além do valor também se aproximar muito do grupo de controle sem lesão.

Tabela 7.3. Níveis de hidroxiprolina ($\mu\text{g}/\text{mg}$ do peso seco de cartilagem) dos animais experimentais tratados com laser de HeNe com 7,0 J/cm², nos respectivos dias de sacrifício (n = 7)

Grupo	HeNe 7,0 J/cm ²	HeNe 7,0 J/cm ²	HeNe 7,0 J/cm ²
	2 dias	9 dias	16 dias
1	28,29	31,82	27,68
2	35,88	41,12	31,77
3	25,93	30,96	23,31
4	25,20	27,17	30,89
5	28,80	32,76	28,41
6	28,85	32,75	29,73
7	26,94	31,21	27,99
Média com desvio padrão.	28,56 \pm 3,53	32,54 \pm 4,23 ab	28,54 \pm 2,76

a = diferente do grupo controle sem lesão; b = diferente do grupo inflamado 7 dias; c = diferente do grupo inflamado 14 dias; d = diferente do grupo inflamado 21 dias; *diferente do grupo tratado 2 dias com a mesma dose; **diferente do grupo tratado 9 dias com a mesma dose; ***diferente do grupo tratado 16 dias com a mesma dose

Nos animais tratados com doses de 7,0 J/cm² (vide a Tabela 7.3 e o Gráfico 7.2), verifica-se um aumento na produção de hidroxiprolina, principalmente com 9 dias de

aplicação de laser ou 14 dias após a indução da artrite. Entretanto como o aumento das aplicações para 16 (21 dias após a indução da artrite) a concentração de hidroxiprolina ainda é grande (28,54 µg/mg), mas é menor do que seria se a cartilagem não tivesse recebido a aplicação do laser (37,36 µg/mg),.

Nos animais tratados com doses de 50,0 J/cm² (vide a Tabela 7.4 e o Figura 7.2) todos os grupos apresentaram concentrações de hidroxiprolina com valores maiores dos que os obtidos na evolução temporal das cartilagens inflamadas de controle. Comparando este resultado com os resultados morfológicos observados pela MEV, aparentemente neste caso, o aumento da concentração de hidroxiprolina pode não ser devido a uma maior síntese de colágeno, mas sim a maior perda dos proteoglicanos.

Tabela 7.4. Níveis de hidroxiprolina (µg/mg do peso seco de cartilagem) dos animais experimentais tratados com laser de HeNe com 50,0 J/cm², nos respectivos dias de sacrifício

(n = 7).

Grupo	HeNe 50,0 J/cm ²	HeNe 50,0 J/cm ²	HeNe 50,0 J/cm ²
	2 dias	9 dias	16 dias
1	25,64	47,36	41,32
2	34,37	35,63	32,73
3	30,00	41,40	37,20
4	30,50	41,95	38,25
5	31,10	37,92	33,54
6	29,93	39,15	34,75
7	29,63	41,54	37,55
Média com desvio padrão.	30,17 ± 2,57 b, **, ***	40,71 ± 3,72 abcd, *, ***	36,48 ± 3,00 abc, *
<p>a = diferente do grupo controle sem lesão; b = diferente do grupo inflamado 7 dias; c = diferente do grupo inflamado 14 dias; d = diferente do grupo inflamado 21 dias; *diferente do grupo tratado 2 dias com a mesma dose, **diferente do grupo tratado 9 dias com a mesma dose; ***diferente do grupo tratado 16 dias com a mesma dose.</p>			

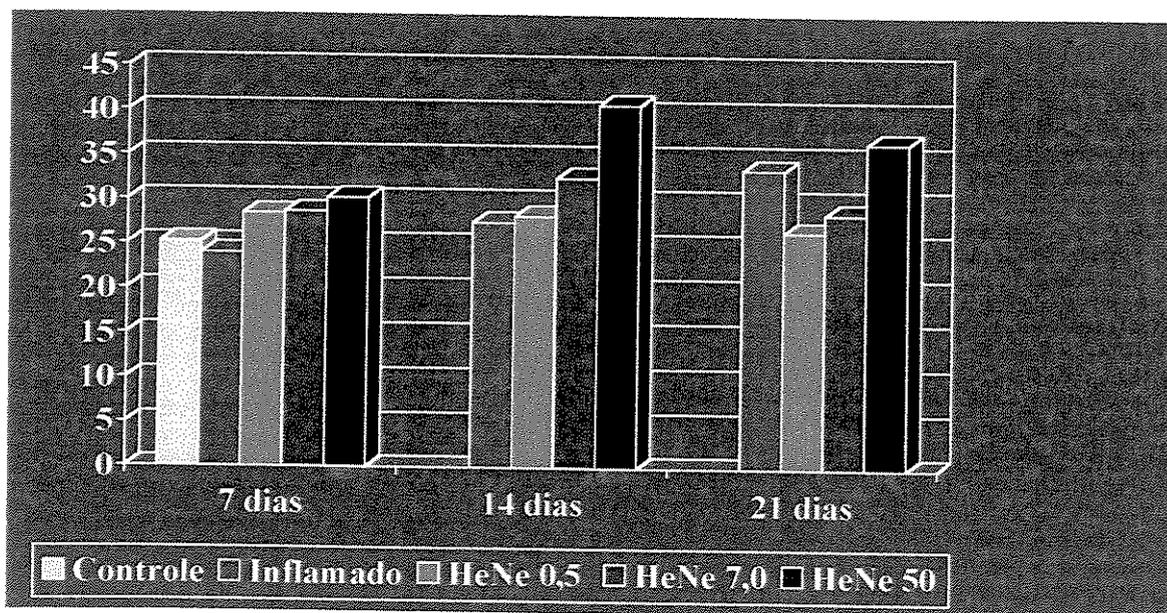


Figura 7.2. Níveis de hidroxiprolina ($\mu\text{g}/\text{mg}$ do peso seco de cartilagem) dos animais experimentais tratados com laser de HeNe com doses de $0,5 \text{ J}/\text{cm}^2$, nos respectivos dias de sacrifício; ($n = 7$); resultados expressos em média..

Estudando os efeitos da radiação laser de HeNe com doses de $8,5 \text{ J}/\text{cm}^2$ em feridas, Ghamsari e colaboradores [14] verificaram um aumento significativo na síntese de colágeno através do teor de hidroxiprolina, incluindo a diminuição da inflamação e a formação de edema. Miyajima e colaboradores [15] realizaram um estudo evolutivo do tratamento de feridas com radiação com laser de HeNe com doses de $4 \text{ J}/\text{cm}^2$, em ratos, e verificaram um aumento significativo da concentração de hidroxiprolina entre 10 e 17 dias após o início do tratamento, estabelecendo um efeito bioestimulante satisfatório, na regeneração do tecido de colágeno da escara. Reindel e colaboradores [16] citaram que, em geral, o tecido de reparo na cartilagem articular necessita de células de adesão, de migração, de proliferação e de diferenciação da matriz extracelular.

Acredita-se que o GMPc no fibroblasto pode estar envolvido no processo de síntese do procolágeno [17]. A estruturação da matriz depende da adesão dos componentes celulares entre si, e com a própria matriz extracelular. Karu e colaboradores [18] demonstraram que, as interações da superfície celular com outras células e com a matriz

extracelular, estão envolvidas na regulação dos processos como crescimento celular e diferenciação, morfogênese e divisão celular.

A degradação da cartilagem segundo Mow e colaboradores [19], realizada pelos macrófagos pode ser estimulada pela liberação de citocinas, interleucina 1 e pelo fator de necrose tumoral (TNF- α), elementos essenciais envolvidos na degradação promovida pela inflamação na artrite, que irão transformar os fatores de crescimento- β (TGF- β), corticoesteróides e retinóides, inibindo a síntese de protéica da cartilagem articular.

Alterações mecânicas na superfície da cartilagem afetam os condrócitos e alteram a atividade do metabolismo anabólico e catabólico da cartilagem, que estão envolvidos no controle da manutenção da integridade do tecido. O TGF- β , que é abundante nas lesões teciduais, funciona como uma sintonia fina na síntese de matriz extracelular dentro da família dos polipeptídeos [17]. O ambiente proteolítico característico das lesões serve para ativar o peptídeo ou liberar das suas reservas na matriz extracelular, o que poderia facilitar a síntese protéica na matriz, o que parece ter sido promovida pela radiação laser neste trabalho.

7.2.3 Grupo com aplicação de laser de GaAs.

As Tabelas 7.5, 7.6 e 7.7 e a Figura 7.3 apresentam as concentrações de hidroxiprolina das cartilagens dos animais submetidos à aplicação do laser de GaAs, em diferentes doses e tempos, depois de cinco dias da indução da inflamação.

Quase que todos grupos de animais tratados com a dose diária de 1,0 J/cm² de radiação do laser de GaAs (vide a Tabela 7.5 e a Figura 7.3) apresentaram concentrações um pouco acima das encontradas nos animais de controle com e sem inflamação. A exceção foi o grupo de 16 dias de aplicação de laser (21 dias depois da indução). Neste grupo a concentração de hidroxiprolina ficou abaixo das concentrações encontradas nos controles (21 dias de inflamação sem tratamento, vide a última coluna da Tabela 7.1)

Resultados similares foram também observados nos grupos tratados com doses de 5,0 J/cm². As concentrações dos animais tratados com 2 dias e 9 dias de aplicação são muito

próximas (levemente superiores) as concentrações dos controles correspondentes (Tabela 7.1), mas com 16 dias de aplicação ocorre uma inversão, isto é, a concentração de hidroxirolina é maior nas cartilagens dos animais que não receberam nenhum tratamento.

Tabela 7.5. Níveis de hidroxirolina ($\mu\text{g}/\text{mg}$ do peso seco de cartilagem) dos animais experimentais tratados com laser de GaAs com $1,0 \text{ J}/\text{cm}^2$, nos respectivos dias de sacrifício ($n = 7$)

Grupo	GaAs $1,0 \text{ J}/\text{cm}^2$	GaAs $1,0 \text{ J}/\text{cm}^2$	GaAs $1,0 \text{ J}/\text{cm}^2$
	2 dias	9 dias	16 dias
1	24,15	23,90	32,33
2	33,30	27,01	28,49
3	26,68	28,34	29,12
4	23,42	31,11	31,31
5	24,54	21,37	26,16
6	27,23	23,80	23,51
7	29,60	28,09	27,60
Média com desvio padrão	$26,99 \pm 3,5$	$26,23 \pm 3,35$	$28,36 \pm 3,0$
a = diferente do grupo controle sem lesão; b = diferente do grupo inflamado 7 dias; c = diferente do grupo inflamado 14 dias; d = diferente do grupo inflamado 21 dias; *diferente do grupo tratado 2 dias com a mesma dose, **diferente do grupo tratado 9 dias com a mesma dose; ***diferente do grupo tratado 16 dias com a mesma dose.			

Já no caso dos animais que receberam a aplicação de laser de GaAs com doses diárias de $25,0 \text{ J}/\text{cm}^2$ (vide a Tabela 7.7 e a Figura 7.3) foi possível observar diferenças significativas com 2 e 9 dias de aplicação de laser, quando comparados com os animais de controle sem lesão e sem tratamento (vide a Tabela 7.1). Nos animais com 16 dias de

aplicação a concentração de hidroxiprolina também foi alta, mas inferior a concentração do controle.

Tabela 7.6. Níveis de hidroxiprolina ($\mu\text{g}/\text{mg}$ do peso seco de cartilagem) dos animais experimentais tratados com laser de GaAs com $5,0 \text{ J}/\text{cm}^2$, nos respectivos dias de sacrifício ($n = 7$)

Grupo	GaAs $5,0 \text{ J}/\text{cm}^2$	GaAs $5,0 \text{ J}/\text{cm}^2$	GaAs $5,0 \text{ J}/\text{cm}^2$
	2 dias	9 dias	16 dias
1	26,99	25,61	40,81
2	32,49	27,45	35,46
3	24,88	31,37	27,13
4	25,72	26,19	27,79
5	25,71	28,67	25,11
6	27,30	28,19	26,46
7	22,36	29,79	31,22
Média com desvio padrão.	$26,49 \pm 3,1$	$28,18 \pm 2,0$	$30,57 \pm 5,71$ ^{ab}
<p>a = diferente do grupo controle sem lesão; b = diferente do grupo inflamado 7 dias; c = diferente do grupo inflamado 14 dias; d = diferente do grupo inflamado 21 dias; *diferente do grupo tratado 2 dias com a mesma dose, **diferente do grupo tratado 9 dias com a mesma dose; ***diferente do grupo tratado 16 dias com a mesma dose.</p>			

Comparando os efeitos da dose de $25,0 \text{ J}/\text{cm}^2$ com as doses de $1,0$ e $5,0 \text{ J}/\text{cm}^2$ do mesmo tipo de laser, fica evidente que houve uma maior estimulação bioquímica da cartilagem lesada com a dose de $25,0 \text{ J}/\text{cm}^2$.

Skinner e colaboradores [20] mostraram que o laser de GaAs a $1,0 \text{ J}/\text{cm}^2$ estimula a ação na formação dos fibroblastos pela produção do procolágeno através do aumento de síntese de hidroxiprolina. Essa possibilidade de atuação do laser pode significar um potente aliado no processo de reparo tecidual [21], aumentando a produção de colágeno, o que pode facilitar a síntese protéica pelas células na matriz extracelular.

Tabela 7.7. Níveis de hidroxiprolina ($\mu\text{g}/\text{mg}$ do peso seco de cartilagem) dos animais experimentais tratados com laser de GaAs com $25 \text{ J}/\text{cm}^2$, nos respectivos dias de sacrifício ($n = 7$)

Grupo	GaAs $25 \text{ J}/\text{cm}^2$	GaAs $25 \text{ J}/\text{cm}^2$	GaAs $25 \text{ J}/\text{cm}^2$
	2 dias	9 dias	16 dias
1	29,19	37,12	36,11
2	30,45	38,09	32,96
3	28,29	29,41	30,48
4	27,45	28,32	31,38
5	27,14	33,77	29,49
6	29,64	30,80	29,65
7	32,55	29,01	31,29
Média com desvio padrão.	$29,24 \pm 1,88$ a,b	$32,36 \pm 4,0$ a,b	$31,62 \pm 2,3$ a,b

a = diferente do grupo controle sem lesão; b = diferente do grupo inflamado 7 dias; c = diferente do grupo inflamado 14 dias; d = diferente do grupo inflamado 21 dias;
 *diferente do grupo tratado 2 dias com a mesma dose, **diferente do grupo tratado 9 dias com a mesma dose; ***diferente do grupo tratado 16 dias com a mesma dose

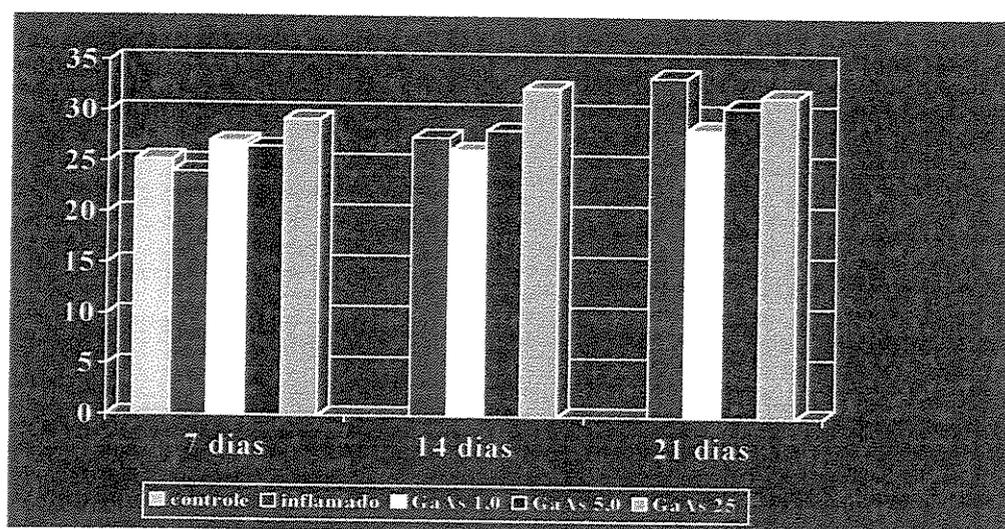


Figura 7.3. Níveis de hidroxiprolina ($\mu\text{g}/\text{mg}$ do peso seco de cartilagem) dos animais experimentais tratados com laser de GaAs com $25 \text{ J}/\text{cm}^2$, nos respectivos dias de sacrifício ($n = 7$); resultados expressos em média.

Altas concentrações de hidroxiprolina encontradas na cartilagem articular, não indicam necessariamente, que o aumento de síntese de colágeno, esteja sendo alterado favoravelmente em relação ao processo de reparo da superfície articular, e sim que o processo inflamatório poderia estar produzindo esta elevação, conforme observado na literatura [3, 8, 13, 14, 19, 20, 21].

7.3. Conclusões

A Tabela 7.8 resume nossas conclusões semiquantitativas em relação às alterações das concentrações de hidroxiprolina em função do tipo de laser, dose e período de aplicação nos processos inflamatórios decorrentes da indução de artrite na cartilagem articular.

Tabela 7.8. Avaliação da concentração de hidroxiprolina encontrada nos processos inflamatórios e em seus respectivos tratamentos.

<i>Grupos</i>	<i>Inflamação</i>	<i>HeNe 0,5 J/cm²</i>	<i>HeNe 7,0 J/cm²</i>	<i>HeNe 50 J/cm²</i>	<i>GaAs 1,0 J/cm²</i>	<i>GaAs 5,0 J/cm²</i>	<i>GaAs 25 J/cm²</i>
<i>2 dias (7 d)</i>	+	+	+	++++	+	+	++
<i>9 dias (14 d)</i>	++	+	++	++++	+	+	++
<i>16 dias (21 d)</i>	+++	++	+	+++	+	++	++

+ = pouca concentração; ++ = concentração intermediária; +++ = alta concentração; ++++ = excessiva concentração de hidroxiprolina.

Concluimos que ocorreram alterações na concentração de hidroxiprolina da cartilagem inflamada através da aplicação tanto do laser de HeNe quanto do laser de GaAs. No caso das aplicações de laser de GaAs os resultados de aumento da concentração de hidroxiprolina foram menos significantes do que os obtidos com a aplicação do laser de HeNe. Os maiores aumentos na concentração da hidroxiprolina foram obtidos com a aplicação de laser de HeNe na dose diária de 50,0 J/cm². O aumento da concentração de hidroxiprolina pode propiciar o aumento da geração do colágeno reparador do tecido

cartilaginosa, mas não é uma condição unívoca, pois, o aumento da hidroxiprolina também pode estar associado com a degeneração do colágeno da cartilagem em um estado avançado de inflamação. Neste sentido, doses altas de laser também podem ter um efeito de inibição da recuperação do tecido cartilaginosa.

7.4. Referências

- [1] GEETHA, T., VARALAKSHMI, P. Effect of lupeol and lupeol linoleate on lysosomal enzymes and collagen in adjuvant-induced arthritis in rats, *Molecular and Cellular Biochemistry*, v.201 (1-2), p.83-87, 1999.
- [2] WEI, L. SVENSSON, O., HJERPE, A. Correlation of morphologic and biochemical changes in the natural histology of spontaneous osteoarthritis in guinea pigs, *Arthritis and Rheumatism*, v.40 (11), p.2075-2083, 1997.
- [3] TANAKA, S., HAMANISHI, C., KIKUCHI, H., FUKUDA, K. Factors related to degradation of articular cartilage in osteoarthritis: A review, *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, v.27 (6), p.392-399, 1998.
- [4] SETTON, L.A., ELLIOTT, D.M., MOW, V.C. Altered mechanics of cartilage with osteoarthritis: human osteoarthritis and an experimental model of joint degeneration, *Osteoarthritis and Cartilage*, v.7 (1), p.2-14, 1999.
- [5] MORO, L., ROMANELLO, M., FAVIA, A., LAMANNA, M.P., LUZOPONE, E. Posttranslational modifications of bone collagen type I are related to the function of rat femoral regions, *Calcified Tissue International*, v.66 (2), p.151-156, 2000.
- [6] ALTMAN, R.D., KATES, J., CHUN, L.E., DEAN, D.D., EYRE, D. Preliminary-observations of chondral abrasion in a canine model, *Annals of the Rheumatic Diseases*, v.51 (9), p.1056-1062, 1992.
- [7] CORTET, B. FLIPO, R.M., DUQUESNOY, B., DELCAMBRE, B. Bone tissue rheumatoid-arthritis. 2. Pathophysiologic data, pathological findings, and therapeutic implications, *Revue du Rhumatisme*, v.62 (3), 205-211, 1995.
- [8] KARRAN, E.H., YOUNG, T.J., MARKWELL, R.E., HARPER, G.P. In vivo model of cartilage degradation – effects of a matrix metalloproteinase inhibitor, *Annals of the Rheumatic Diseases*, v.54 (8), p.662-669, 1995.
- [9] OTTERNESS, I.G., CHANG, M., BURKHARDT, J.E., SWEENEY, F.J., MILICI, A.J. Histology and tissue chemistry of tidemark separation in hamsters, *Veterinary Pathology*, v.36 (2), p.138-145, 1999.

- [10] DiCESARE, P.E., FANG, C., LESLIE, M.P., DELLA VALLE, C.J., GOLD, J.M., TULLI, H., PERRIS, R., CARLSON, C.S. Localization and expression of cartilage oligomeric matrix protein by human rheumatoid and osteoarthritic synovium and cartilage, *Journal of Orthopaedic Research*, v.17 (3), p.437-445, 1999.
- [11] LI, Z.Q., HOU, W.S., BROMME, D. Collagenolytic activity of cathepsin K is specifically modulated by cartilage-resident chondroitin sulfates, *Biochemistry*, v.39 (3), p.529-536, 2000.
- [12] MOSKOWITZ, R.W. Role of collagen hydrolysate in bone joint disease, *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, v.30 (2), p.87-99, 2000.
- [13] AMAN, S, RISTELI, J., LUUKKAINEN, R., RISTELI, L, KAUPPI, M., NIEMINEN, P., HAKALA, M. The value of synovial fluid analysis in the assessment of knee joint destruction in arthritis in a three year follow up study, *Annals of the Rheumatic Diseases*, v.58 (9), p.559-562, 1999.
- [14] GHAMSARI, S.M., TAFUCHI, K., ABE, N., ACORDA, J.A., SATO, M., YAMADA, H. Evaluation of low level laser therapy on primary healing of experimentally induced full thickness teat wounds in dairy cattle, *Veterinary Surgery*, v.26 (2), 114-120, 1997.
- [15] MIYAJIMA, A. Coordinate regulation of immune and inflammatory responses by T-cell-derived lymphokines. *FASEB JOURNAL*, v.2, p.2462, 1988.
- [16] REINDEL, E.S., ANNAMARIE, M.A., CHEN, A.C., CHUN, D.M. Integrative repair of articular cartilage *In Vitro*: Adhesive Strength of the interface region, *Journal of Orthopaedic Research*, v.13, p.751-760, 1995.
- [17] PARIZOTTO, N. Ação do laser Hélio-Neônio sobre o processo de reparo tecidual: Um estudo do colágeno por microscopia eletrônica de varredura, microscopia de força atômica e espectroscopia por infravermelho, Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, UNICAMP, Campinas, 181 p., 1998.
- [18] KARU, T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near – IR radiation on cells, *Journal of Photochemistry and Photobiology, Biophysics and Biology*, v.49, p.1-17, 1999.
- [19] MOW, V.C., RATCLIFFE, A., POOLE, A.R., Cartilage and diarthrodial joint as paradigms for hierarchical materials and structures, *Biomaterials*, v.13 (2), p.67-97, 1992.
- [20] SKINNER, S.M., GAGE, J.P., WILCE, P.A., SHAW, R.M. A preliminary study of the effects of laser radiation on collagen metabolism in cell cultured, *Australian Dental Journal*, v.41 (3), p.188-192, 1996.
- [21] HENDRICH, C., HUTTMANN, G., DIDDENS, H., SEARA, J., SIEVERT, W.E. Experimental basis of photodynamic laser therapy for rheumatoid arthritis, *Orthopade*, v.25 (1), p.30-36, 1996.

Capítulo VIII

Resultados e discussão das análises biomecânicas

8.1. Introdução

O tecido cartilaginoso tem a função mecânica de suporte da articulação, absorção dos choques do osso subcondral e proteção óssea, podendo ser submetido a grandes variações de cargas estáticas ou dinâmicas [1, 2]. A cartilagem serve principalmente de junção, apoio e suporte das partes ósseas. Além de proteger as partes moles e os órgãos vitais vários ossos as cartilagens também constituem parte dos sistemas de alavancas, que aumentam a força gerada pela contração muscular [3].

A tensão, a compressão, e as cargas multiaxiais aplicadas aos ossos ajudam a compreender os efeitos de determinados exercícios sobre a articulação [1]. De modo geral, todos os corpos sofrem deformações, quando submetidos a forças de compressão ou de tração [4]. Apesar de sua alta resistência mecânica, o tecido ósseo é muito plástico, sendo possível remodelar sua forma em função das forças a que está sendo submetido, mesmo que sejam apenas as forças de suporte do peso corporal [5].

Oloyede e Broom [3] observaram que as forças externas aplicadas na cartilagem articular têm grande influência na variação das propriedades mecânicas relacionadas com o alinhamento das fibrilas colágenas. A estrutura do tecido cartilaginoso possui um arranjo tridimensional das fibrilas, diretamente relacionadas ao suporte das tensões promovidas pelo peso corporal, além de grande quantidade de complexos de proteoglicanos hidratados, que amortizam a rigidez da compressão [6-8]. Keaveny e colaboradores [9] afirmam que ocorrem grandes variações na formação e na manutenção da arquitetura trabecular devido à heterogeneidade de aplicação de forças durante a formação óssea, e que isto provoca imprecisão na comparação dos testes mecânicos.

Embora Soulhat e colaboradores [10] relatem que os mecanismos sinalizadores celulares e extracelulares, que desencadeiam a resposta da cartilagem para a reação as

cargas aplicadas sejam ainda desconhecidos, Wu e colaboradores [11], sugerem que os condrócitos tem um importante papel na sinalização e regulação da atividade da matriz da cartilagem articular.

Hayes e colaboradores [12] afirmam que a arquitetura trabecular está diretamente relacionada com a área de distribuição de estresse (compressão repetida) na superfície articular. Mow e Wang [13] observam que, os materiais duros e porosos do osso, são estruturados de tal forma que produzem a máxima resistência com um mínimo de material, e que, em sua forma e estrutura, os ossos são programados evolutivamente para resistir da maneira mais otimizada aos esforços compressivos. Nuki [14] relata que mesmo o esforço produzido pelo peso excessivo do peso corporal ou de atividades ocupacionais e esportivas inadequadas, podem ser suficientes para promover alterações metabólicas na formação do colágeno na articulação, levando a osteoartrite.

Como uma das funções da cartilagem é distribuir a carga de compressão, Cohen e colaboradores [15] observam que o contato ósseo aplicado por superfícies articulares com carga em excesso pode alterar a constituição da cartilagem; como por exemplo, quantidade de água, de eletrólitos, composição da matriz do colágeno e dos proteoglicanos. Segundo Oloyede e Broom [3] a deformação de cada parte óssea é determinada pelo local de maior compressão e pelas condições elásticas do tecido.

Jacobs e colaboradores [16] demonstraram através de modelos matemáticos que existem vários tipos de remodelamento do tecido ósseo adaptativos, e que os mecanismos biológicos de reparo ósseo podem ser determinados por estímulos de aplicação de estresse e força em locais específicos, provenientes da superfície da cartilagem articular. Keaveny e colaboradores [17] observaram que os módulos de tensão e de compressão (indentação mecânica), são equivalentes tanto no osso cortical quanto no osso trabecular recoberto de cartilagem. Porém, há incertezas quanto à distância e o comportamento elástico para o osso trabecular, principalmente em relação aos mecanismos de sedimentação.

Os mecanismos envolvidos nos processos de dor e de degeneração da cartilagem articular nos processos de artrite são complexos e bastante polêmicos [18], pois a ruptura da cartilagem no processo patológico da artrite é influenciada pelas mudanças na fixação dos glicosaminoglicanos, pela desnaturação do colágeno, pela perda da capacidade de reter água [6, 8]. Estes fatores somatizados diminuem a elasticidade da cartilagem e inibem seus

mecanismos próprios de regeneração após o desgaste promovido naturalmente pelos esforços mecânicos externos [19].

As propriedades biomecânicas da cartilagem articular submetida à compressão podem ser estudadas pelo método de indentação [20-26]. A Figura 8.1 apresenta um diagrama esquemático de uma cartilagem articular submetida ao teste de indentação mecânica, onde o tecido (cartilagem hialina) é comprimido por uma carga constante, rígida, e cíclica, aplicada verticalmente sobre a cartilagem.

O procedimento de análise de indentação não requer cuidados especiais para a preparação das amostras, permitindo que as propriedades da cartilagem no tecido ósseo sejam analisadas em condições muito próximas das condições encontradas fisiologicamente [27-29].

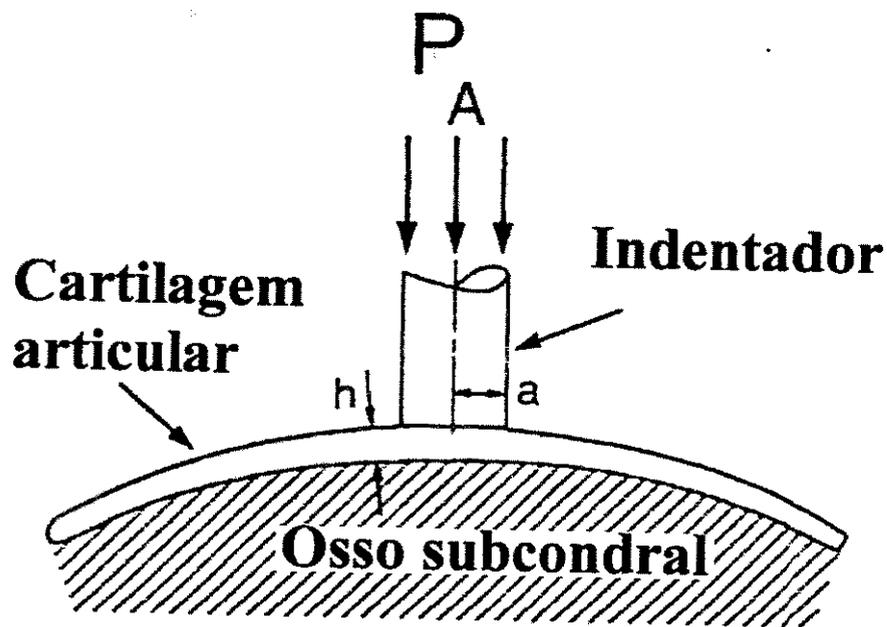


Figura 8.1. Diagrama esquemático da cartilagem articular sendo submetida ao teste de indentação mecânica. O tecido (cartilagem hialina) é comprimido por uma carga cíclica e rígida (P_A) do indentador mecânico.

8.2. Resultados e Discussões

8.3. Grupos de controle sem inflamação e Grupos de controle com inflamação e sem aplicação de laser

Turek [30] demonstrou que a camada superficial da cartilagem articular é mais rígida do que as camadas mais internas. Nesta região, embora as fibras do tecido cartilaginoso sejam de diâmetro pequeno, elas estão intimamente agregadas em feixes sem praticamente espaço intermediário. Além disto são dispostas horizontalmente o que aumenta a densidade do colágeno unidade de volume. As camadas mais profundas são menos rígidas, pois as fibrilas aumentam de diâmetro com a profundidade tendo também maior espaçamento e menor orientação preferencial. [1, 13, 21].

Segundo Trock e colaboradores [19] a cartilagem tem maior resistência às cargas aplicadas na direção normal do que às cargas aplicadas nas direções tangenciais. A resistência da cartilagem articular normal depende da orientação e densidade do colágeno superficial, da profundidade das camadas cartilaginosas e da quantidade de degeneração da cartilagem nas áreas vizinhas [23-24]. A Figura 4.2 apresentada no Capítulo IV mostra o esquema experimental utilizado para as medidas. Consideramos que a resistência das amostras é por definição, a mínima força necessária para a ruptura do osso [26-27].

O equipamento utilizado era mais favorável para a medida da fratura óssea do que para a medida da rigidez da cartilagem, devido à falta de sensibilidade no controle da carga aplicada [21-29]. Além disso, durante a compressão da cartilagem articular ocorre o deslocamento de líquidos da cartilagem pela pressão e pelo cisalhamento da cartilagem superficial, também podendo comprometer o osso subcondral, o que dificulta muito a análise dos resultados referentes ao tecido cartilaginoso.

Podemos observar que nos animais de controle sem lesão ou tratamento (Tabela 8.1 e Figura 8.1) que a rigidez da cartilagem articular tem maior valor para as regiões dos platôs das tíbias laterais, em ambas as pernas dos animais. Esta diferença pode estar relacionada com as linhas de aplicação de carga para o movimento articular e para sustentação do corpo dos animais [11, 29, 31, 32]. Há uma diferença, não muito

significativa, indicando maior valor de rigidez para as cartilagens das patas direitas e em comparação com cartilagens das patas esquerdas.

Tabela 8.1. Resistência mecânica à compressão (Rigidez em N/mm) na porção lateral e medial das tíbias direita e esquerda, das cobaias experimentais de controle sem inflamação (n = 9).

Animais do Grupo Controle	Tibia Direita		Tibia Esquerda	
	Lateral	Medial	Lateral	Medial
1	255,08	178,61	168,52	158,27
2	178,75	144,49	280,98	164,00
3	197,02	175,73	175,58	144,89
4	197,32	175,00	175,38	144,04
5	266,54	180,03	191,25	168,23
6	212,20	151,39	237,48	106,64
7	226,41	160,16	252,21	208,58
8	210,32	173,25	206,96	167,96
9	209,87	176,56	200,30	165,28
Média com desvio padrão.	217,06 ± 28,2	168,36 ± 13,02	209,81 ± 38,99	158,65 ± 27,05

As mesmas observações feitas no parágrafo anterior podem ser aplicadas em relação aos animais de controle com inflamação (Tabela 8.2 e Figura 8.1). Pode-se observar também que não ocorreram mudanças significativas na rigidez da cartilagem em função do tempo de sacrifício, tanto para as cartilagens direitas (inflamadas) quanto para as cartilagens esquerdas (não inflamadas).

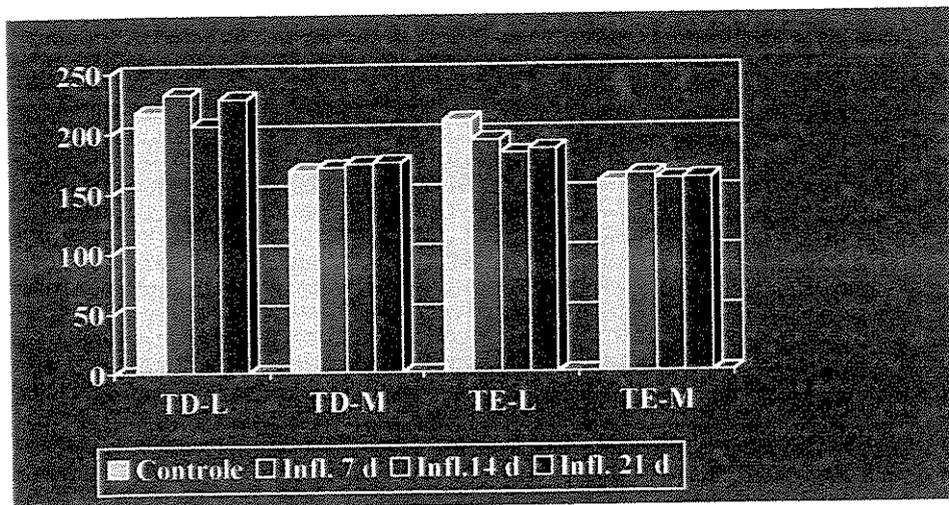


Figura 8.1. Resistência mecânica à compressão (Rigidez em N/mm) na porção lateral e medial das tíbias direita e esquerda, das cobaias experimentais do grupo de controle e aos 7, 14 e 21 dias após a indução da inflamação. Resultados expressos com valores médios.

Tabela 8.2. Resistência mecânica à compressão (Rigidez em N/mm) na porção lateral e medial das tíbias direita e esquerda, das cobaias experimentais aos 7, 14 e 21 dias após a indução da inflamação. Resultados expressos em média \pm desvio padrão

Animais do Grupo Inflamado	Tíbia Direita		Tíbia Esquerda	
	Lateral	Medial	Lateral	Medial
7 Dias	232,08 \pm 33,27	170,84 \pm 17,16	193,53 \pm 23,31	164,29 \pm 14,11
14 Dias	206,12 \pm 27,56	173,48 \pm 13,5	182,56 \pm 8,2	159,96 \pm 9,74
21 Dias	227,98 \pm 32,27	174,54 \pm 10,98	185,73 \pm 8,59	160,88 \pm 9,9

8.4. Grupo com inflamação induzida e com aplicação de laser de HeNe

A Tabela 8.3 e as Figuras 8.2, 8.3 e 8.4 resumem os valores médios de rigidez da cartilagem medidos nos diversos grupos de animais tratados com laser de HeNe, com diferentes dosagens diárias e com diferentes períodos de aplicação, conforme indicado.

Tabela 8.3. Resistência mecânica à compressão (Rigidez em N/mm) da superfície lateral e medial das tíbias, direita e esquerda, em função do número de aplicações da radiação de laser de HeNe, com diferentes doses diárias iniciadas 5 dias depois da injeção do adjuvante inflamatório. Resultados expressos em média \pm desvio padrão.

Grupos	Tíbia Direita (inflamada)		Tíbia Esquerda (controle)	
	Lateral	Medial	Lateral	Medial
Dose diária de 0,5 J/cm²				
2 dias	249,63 \pm 64,84	212,4 \pm 32,11 ^{a, b}	235,32 \pm 28,56 ^b	212,68 \pm 26,93 ^{ab}
9 dias	258,17 \pm 40,08	221,88 \pm 20,54 ^{a, b}	216,68 \pm 13,37 ^b	204,68 \pm 13,52 ^{ab}
16 dias	185,93 \pm 19,83	170,19 \pm 25,03 ^{a, b}	208,07 \pm 14,18 ^b	196,15 \pm 6,05 ^{ab}
Dose diária de 7,0 J/cm²				
2 dias	245,31 \pm 39,53	227,68 \pm 44,86 ^{ab}	232,57 \pm 26,48	218,55 \pm 30,08 ^{ab}
9 dias	244,32 \pm 24,28	229,62 \pm 25,9 ^{ab}	261,75 \pm 32,14 ^{ab}	229,1 \pm 31,43 ^{ab}
16 dias	207,67 \pm 4,77	182,71 \pm 9,21	214,37 \pm 27,49	195,27 \pm 8,6
Dose diária de 50,0 J/cm²				
2 dias	122,53 \pm 31,15 ^{ab}	133,11 \pm 24,25 ^{ab}	177,51 \pm 13,74	169,40 \pm 9,41
9 dias	127,79 \pm 11,47 ^{ab}	126,01 \pm 19,12 ^{ab}	175,30 \pm 19,79	165,20 \pm 8,11
16 dias	161,01 \pm 36,56	170,99 \pm 55,11	173,99 \pm 14,46	163,35 \pm 10,61
a = diferente do grupo de controle sem lesão;				
b = diferente do grupo inflamado sem tratamento.				

Pode-se observar que tanto para as doses de 0,5 J/cm² como de 7,0 J/cm² ocorreu uma diminuição significativa da rigidez da cartilagem com o aumento dos períodos de aplicação tanto no platô lateral quanto no platô medial das tíbias direitas. Observa-se também o mesmo decréscimo evolutivo nas tíbias esquerdas, utilizadas como controle.

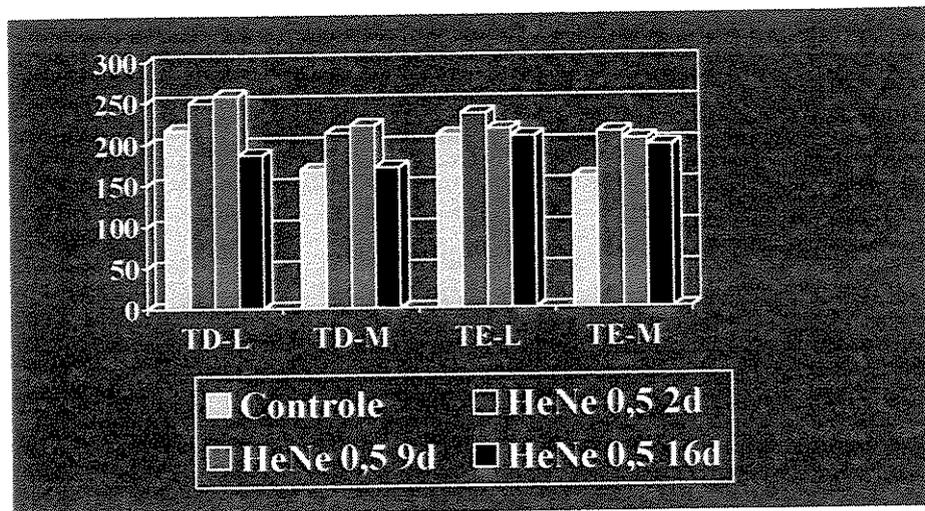


Figura 8.2. Resistência mecânica à compressão (Rigidez em N/mm) da superfície lateral e medial das tíbias, direita e esquerda, em função do número de aplicações da radiação de laser de HeNe, com doses de 0,5 J/cm² iniciadas 5 dias depois da injeção do adjuvante inflamatório. Resultados expressos com valores médios.

A partir destes resultados podemos concluir que houve alguma variação evolutiva na experiência que influenciou tanto as tíbias direitas (que receberam aplicações de laser) quanto às tíbias não inflamadas e não irradiadas com laser. Os valores de rigidez encontrados depois de 16 dias de aplicação estão levemente abaixo dos valores de rigidez das cartilagens de controle sem inflamação (Tabela. 8.1 e Figura 8.1)

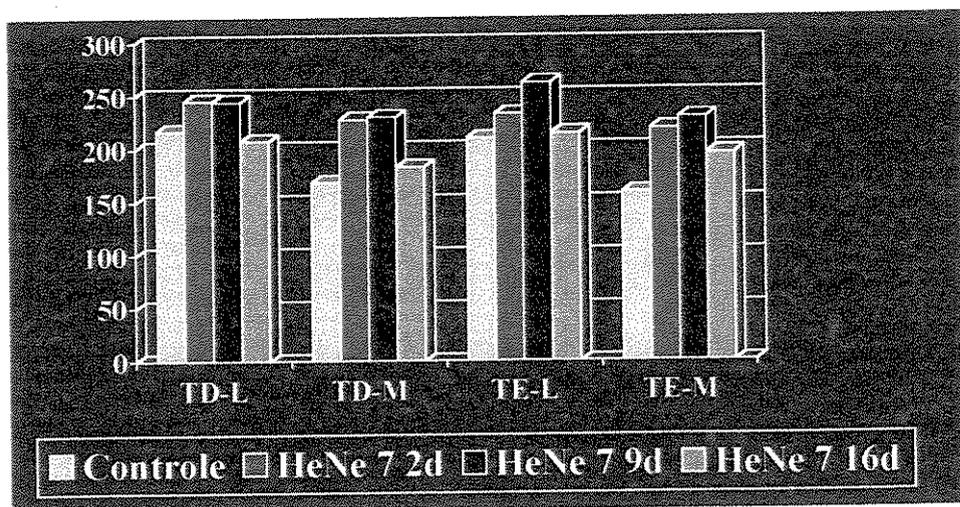


Figura 8.3. Resistência mecânica à compressão (Rigidez em N/mm) da superfície lateral e medial das tíbias, direita e esquerda, em função do número de aplicações da radiação de laser de HeNe com doses de 7,0 J/cm² iniciadas 5 dias depois da injeção do adjuvante inflamatório. Resultados expressos com valores médios.

Já no grupo irradiado com a dose de $50,0 \text{ J/cm}^2$ (Tabela 8.3 e Figura 8.4) pode-se observar que as tíbias de controle (esquerdas) não sofreram alterações na sua rigidez, tanto lateral quanto medial. A manutenção das características dos controles neste grupo permite, com segurança, afirmar que houve um processo evolutivo favorável nas tíbias que receberam a aplicação laser, pois a rigidez tanto da cartilagem lateral quanto medial tiveram valores muito aumentados depois de 16 dias de aplicações quando comparados com os valores depois de 2 dias de aplicações.

Os valores de rigidez das partes medial das tíbias tratadas com 16 aplicações de laser são muito próximos dos valores da rigidez das partes medial das tíbias de controle, sem inflamação induzida (terceira coluna da Tabela 8.1). Entretanto no caso da parte lateral das tíbias, os valores de rigidez obtidos após o tratamento tem valores significativamente menores do que as partes laterais das tíbias de controle (segunda coluna da Tabela 8.1).

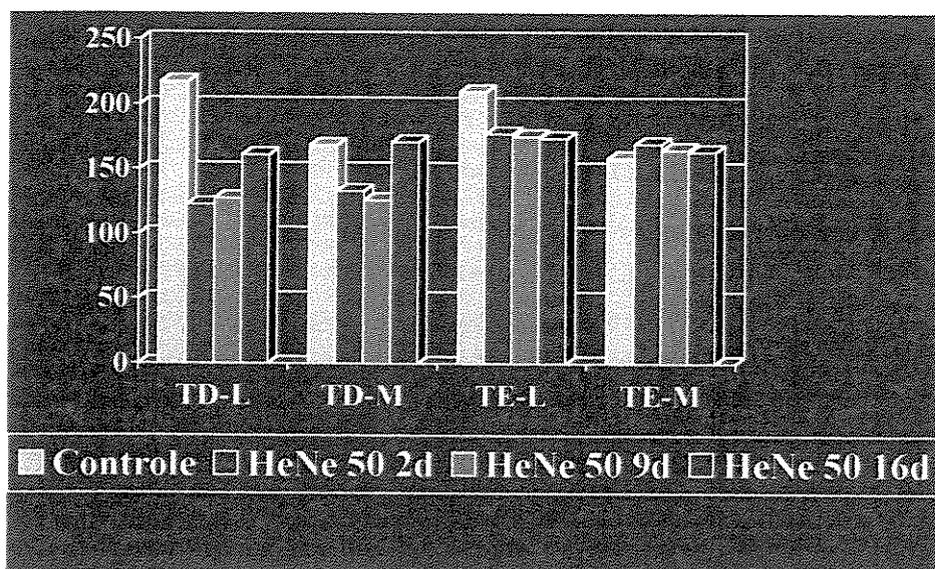


Figura 8.4. Resistência mecânica à compressão (Rigidez em N/mm) da superfície lateral e medial das tíbias, direita e esquerda, em função do número de aplicações da radiação de laser de HeNe com doses de $50,0 \text{ J/cm}^2$ iniciadas 5 dias depois da injeção do adjuvante inflamatório. Resultados expressos com valores médios

8.5. Grupo com inflamação induzida e com aplicação de laser de GaAs

A Tabela 8.4 e as Figuras 8.5, 8.6 e 8.7 apresentam os valores médios da rigidez da cartilagem medidos nos diversos grupos de animais tratados com laser de GaAs, com diferentes dosagens diárias e com diferentes períodos de aplicação, conforme indicado.

Tabela 8.4. Resistência mecânica à compressão (Rigidez em N/mm) da superfície lateral e medial das tíbias, direita e esquerda, em função do número de aplicações da radiação de laser de GaAs, com diferentes doses diárias iniciadas 5 dias depois da injeção do adjuvante inflamatório. Resultados expressos em média \pm desvio padrão.

Grupos	Tíbia Direita (inflamada)		Tíbia Esquerda (controle)	
	Lateral	Medial	Lateral	Medial
Dose diária de 1,0 J/cm²				
2 dias	229,67 \pm 35,46	204,08 \pm 20,29 ^{ab}	193,50 \pm 11,54	177,09 \pm 9,51
9 dias	202,37 \pm 31,45	178,29 \pm 27,71	187,73 \pm 7,25	182,01 \pm 16,12
16 dias	221,33 \pm 29,27	196,88 \pm 11,64	188,04 \pm 9,09	179,40 \pm 12,95
Dose diária de 5,0 J/cm²				
2 dias	216,78 \pm 24,28	190,42 \pm 16,23 ^{ab}	206,39 \pm 16,76	171,98 \pm 9,47
9 dias	202,19 \pm 20,43	187,98 \pm 9,49	181,96 \pm 8,13	179,04 \pm 13,14
16 dias	238,07 \pm 42,05	202,55 \pm 24,73 ^{ab}	184,15 \pm 11,84	175,41 \pm 7,93
Dose diária de 25,0 J/cm²				
2 dias	220,50 \pm 43,34	206,48 \pm 27,17 ^{ab}	213,42 \pm 15,39	188,19 \pm 14,28
9 dias	228,16 \pm 31,22	214,48 \pm 24,71 ^{ab}	204,78 \pm 15,26	192,74 \pm 14,08
16 dias	193,88 \pm 11,17	184,96 \pm 7,86	194,61 \pm 8,74	178,28 \pm 8,71
a = diferente do grupo de controle sem lesão;				
b = diferente do grupo inflamado sem tratamento.				

Pode-se observar que nas tíbias de controle (esquerdas) não ocorreram mudanças evolutivas nos valores de rigidez das cartilagens tanto para as partes laterais quanto mediais. Isto indica, que com exceção do laser aplicado no joelho direito, não houve nenhuma mudança provocada por agentes externos durante o período da experiência.

Os valores médios encontrados também estão significativamente próximos dos valores encontrados nos animais que não sofreram nenhuma indução de inflamação (vide as duas últimas colunas da Tabela 8.1).

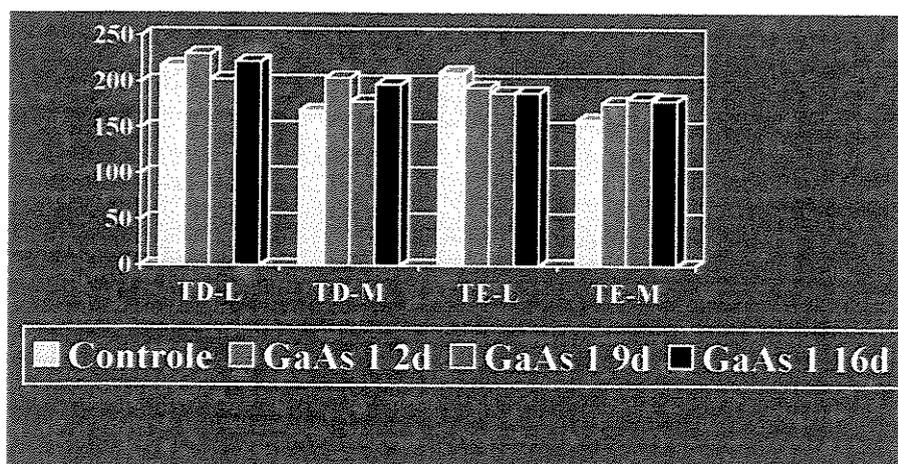


Figura 8.5. Resistência mecânica à compressão (Rigidez em N/mm) da superfície lateral e medial das tíbias, direita e esquerda, em função do número de aplicações da radiação de laser de GaAs com doses de $1,0 \text{ J/cm}^2$ iniciadas 5 dias depois da injeção do adjuvante inflamatório. Resultados expressos em valores médios.

Em relação aos animais irradiados, podemos observar na Tabela 8.4 que praticamente não houve nenhuma alteração nos valores da rigidez das cartilagens da tíbia direita, seja em função do tempo ou em função da dose do laser de GaAs. Os valores encontrados para a rigidez da parte lateral da cartilagem são significativamente muito próximos dos valores obtidos para os animais com inflamação induzida e sem aplicação de laser (Tabela 8. 2, segunda e terceira coluna).

Os valores de rigidez das partes mediais das cartilagens que receberam a aplicação de laser estão em média um pouco acima dos valores de controle inflamados, mas a evolução temporal também não apresenta nenhuma variação significativa para todas as doses de laser empregadas.

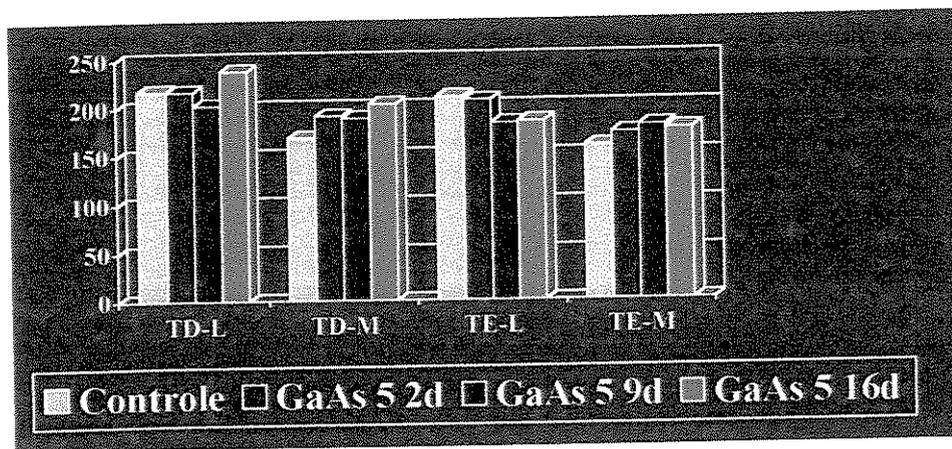


Figura 8.6. Resistência mecânica à compressão (Rigidez em N/mm) da superfície lateral e medial das tíbias, direita e esquerda, em função do número de aplicações da radiação de laser de GaAs com doses de 5,0 J/cm² iniciadas 5 dias depois da injeção do adjuvante inflamatório. Resultados expressos com valores médios.

Os resultados apresentados pela Tabela 8.4 indicam claramente que, do ponto de vista de alteração da rigidez da cartilagem, o laser de GaAs não parece ter nenhuma eficiência, de excitação ou de inibição. Isto não significa que o laser de GaAs não tenha nenhum efeito no processo regenerativo da cartilagem, conforme observado pelos outros métodos de caracterização utilizados no presente trabalho.

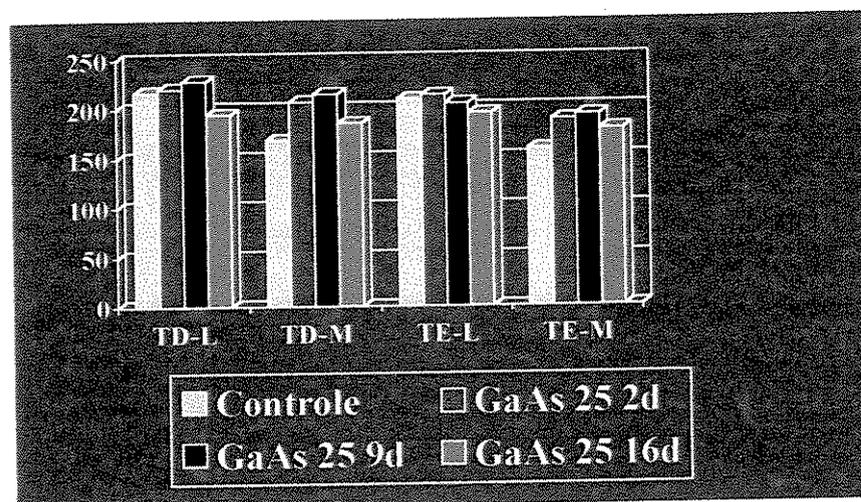


Figura 8.7. Resistência mecânica à compressão (Rigidez em N/mm) da superfície lateral e medial das tíbias, direita e esquerda, em função do número de aplicações da radiação de laser de GaAs com doses de 25,0 J/cm² iniciadas 5 dias depois da injeção do adjuvante inflamatório. Resultados expressos com valores médios.

8.6. Conclusões

Praticamente todos os resultados mostraram que a rigidez das partes laterais das cartilagens é maior do que a rigidez das partes mediais, independente da orientação (direita ou esquerda) da cartilagem. Esta diferença está provavelmente relacionada com as funções fisiológicas da cartilagem do joelho. Pelo fato de termos feitas medidas independentes em ambas as partes, as diferenças de integridade locais das cartilagens não contribuíram para a dispersão dos nossos parâmetros de medidas.

As medidas realizadas em vários grupos sem inflamação e sem aplicação de laser permitiram observar a repetibilidade das mesmas, com o estabelecimento de valores de referência (Tabela 8.1), mesmo que os valores do desvio padrão tenham sido altos.

A análise evolutiva das cartilagens com inflamação e sem aplicação de laser permitiram verificar que as diferenças nos valores de rigidez obtidos para os casos agudos (7 dias) e casos crônicos (21 dias) não eram significativas (Tabela 8.2). Se supormos que hajam diferenças críticas nas estruturas das cartilagens nestes dois casos, os resultados apresentados na Tabela 8.2 indicam que provavelmente o teste da rigidez mecânica não é sensível para a detecção destas variações, visto que foram obtidos valores evolutivos muito próximos para os casos agudos e os casos crônicos. Portanto a sua aplicabilidade para testes comparativos dos efeitos do laser na regeneração induzida da cartilagem tem de ser vistos com cautela.

Nas experiências com a aplicação de laser tivemos também o cuidado de utilizar a cartilagem do joelho esquerdo como controle sem inflamação e sem irradiação de laser. No caso da irradiação com laser de HeNe, este procedimento do controle com a cartilagem esquerda permitiu observar mudanças que as mudanças evolutivas de decréscimo da rigidez da cartilagem direita, nos grupos que receberam a aplicação de doses de 0,5 e 7,0 J/cm²; não foi relevante, pois também houve decréscimo evolutivo nas cartilagens esquerdas, de controle. Diferentemente disto, no caso dos grupos tratados com a dose de laser de 50 J/cm²; não houve mudança evolutiva nas cartilagens esquerdas, o que nos permite afirmar com segurança que a evolução positiva observada nas cartilagens direitas pode estar diretamente relacionada com mecanismos de regeneração induzidos pelo laser.

Finalmente, em todos os grupos onde o laser de GaAs foi aplicado não houve nenhuma mudança significativa nos valores medidos de rigidez, tanto das cartilagens irradiadas quanto nas cartilagens de controle. Este resultado não significa que o laser de GaAs não tenha induzido nenhum mecanismo excitatório ou inibidor ao processo evolutivo da artrite, pois a medida da rigidez realizada em nossos procedimentos pode não ter sensibilidade suficiente para correlacionar os estados de degeneração ou regeneração da cartilagem com a rigidez mecânica, conforme ficou claramente demonstrado com os resultados apresentados pelos grupos de animais que foram apenas inflamados (Tabela 8.2).

8.7. Referências

- [1] OLOYEDE, A., FLACHSMANN, R., BROOM, N. The dramatic influence of loading velocity on the compressive response of articular cartilage, *Connective Tissue Research*, v.27, p.211-224, 1992.
- [2] OLOYEDE, A., BROOM, N. A physical model for the time-dependent deformation of articular cartilage, *Connective Tissue Research*, v.29, p.251-261, 1993.
- [3] OLOYEDE, A., BROOM, N. The biomechanics of cartilage load-carriage, *Connective Tissue Research*, v.34, p.119-143, 1996.
- [4] OKUNO, E., CALDAS, I.L., CHOW, C.. *Física para ciências biológicas e biomédicas*, São Paulo: Harbra, 1982. 490 p.
- [5] AIKMAN, H. The association between arthrits and the weather, *International Journal of Biometeorology*, v.40 (4), p.192-199, 1997.
- [6] BURTON-WURSTER, N., VERNIER-SINGER, M., FARQUHAR, T., LUST, G. Effect of compressive loading and unloading on the synthesis of total protein, proteoglican, and fibronectin by canine cartilage explants, *Journal of Orthopaedic Research*, v.11 (5), p.717-729, 1993.
- [7] BUSCHMANN. M.D., HUNZIKER, E.B., KIM, Y.J., GRODZINSKY, A.J. Altered aggrecan synthesis correlates with cell and nucleous structure in statically compressed cartilage, *Journal of Cell Science*, v.109 (2), p.499-508, 1996.
- [8] BUSCHMANN. M.D., KIM, Y.J., WONG, M., FRANK, E., HUNZIKER, E.B., GRODZINSKY, A.J. Stimulation of aggrecan synthesis in cartilage explants by cyclic

- loading is localized to regions high interstitial fluid flow, *Archives of Biomechanics and Biophysics*, v.366 (1), p.1-7, 1999.
- [9] KEAVENY, T.M., GUO, X.E., WATCHEL, E.F., McMAHON, T.A., HAYES, W.C. Differences between the tensile and compressive strengths of bovine tibial trabecular bone depend on modulus, *Journal of Biomechanics*, v.27, n.9, p.1137-1146, 1994.
- [10] SOULHAT, J., BUSCHMANN, M.D., SHIRAZI-ADL, A. A fibril-network-reinforced biphasic model of cartilage in unconfined compression, *Journal of Biomechanical Engineering*, v.121, (3), p.340-347, 1999.
- [11] WU, J.Z., HERZOG, W., EPSTEIN, M. Modelling of location- and time-dependent deformation of chondrocytes during cartilage loading, *Journal of Biomechanics*, v.32, p.563-572, 1999.
- [12] HAYES, W.C., SWENSON JR, L.W., SCHURMAN, D.J.. Axisymmetric finite element analysis of the lateral tibial plateau, *Journal of Biomechanics*, v.11, p.21-33, 1978.
- [13] MOW, W.V., WANG, C.C. Some bioengineering considerations for tissue engineering of articular cartilage, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, v.367S, p.204-223, 1999.
- [14] NUKI, G. Osteoarthritis: a problem of joint failure, *Zeitschrift fur Rheumatologie*, v.58 (3), p.142-147, 1999.
- [15] COHEN, N.P., FOSTER, R.J., MOW, V.C. Composition and dynamics of articular cartilage: Structure, function, and maintaining healthy state, *Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy*, v. 28 (4), p.203-215, 1998.
- [16] JACOBS, C.R., LEVENSTON, M.E., BEAUPRE, G.S., SIMO, J.C., CARTER, D.R. Numerical instabilities in bone remodeling simulations: the advantages of a node-based finite element approach, *Journal of Biomechanics*. v.28, p.449-459, 1995.
- [17] KEAVENY, T.M., GUO, X.E., WATCHEL, E.F., McMAHON, T.A., HAYES, W.C. Trabecular bone exhibits fully linear elastic behavior and yields at low strain, *Journal of Biomechanics*, v.27, p. 1127-1136, 1994.
- [18] CHEN, C.T., BURTON-WURSTER, N., BANK, R.A., TEKOPPELE, J.M. Compositional and metabolic changes in damage cartilage are peak-stress, stress-rate, and loading-duration dependent, *Journal of Orthopaedic Research*, v.17 (6), p.870-879, 1999.
- [19] TROCK, D.H., BOLLET, A.J., MARKOLL, R.. Effect of pulsed electromagnetic fields in the treatment of osteoarthritis of the knee and cervical spine. Report of randomized, double blind, placebo controlled trials, *Journal of Rheumatology*, v.21, p.1903-11, 1994.
- [20] SMITH, C.L., MANSOUR, J.M. Indentation of an osteochondral repair: sensitivity to

experimental variables and boundary conditions, *Journal of Biomechanics*, v.33 (11), p.1507-1511, 2000.

[21] KAAB, M.J., ITO, K., RAHN, B., CLARK, J.M., NOTZLI, H.P. Effect of mechanical load on articular cartilage collagen structure: A scanning electron microscopic study, *Cells Tissues Organs*, v.167 (2-3), p.106-120, 2000.

[22] HELMINEN, H.J., HYTTINEN, M.M., LAMMI, M.J., AROKOSKI, J.P.A., LAPVETELAINEN, T., JURVELIN, J., KIVIRANTA, I. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, v.18 (5), p.245-257, 2000.

[23] AROKOSKI, J.P.A., JURVELIN, J.S., VAATAINEN, U., HELMINEN, H.J. Normal and pathological adaptations of articular cartilage to joint loading, *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, v.10 (4), p.186-198, 2000.

[24] JURVELIN, J.S., AROKOSKI, J.P.A., HUNZIKER, E.B., HELMINEN, H.J. Topographical variation of the elastic properties of articular cartilage in the canine knee, *Journal of Biomechanics*, v.33 (6), p.669-675, 2000.

[25] KAAB, M.J., ITO, K., RAHN, B., CLARK, J.M., NOTZLI, H.P. Deformation of articular cartilage collagen structure under static and cyclic loading, *Journal of Orthopaedic Research*, v.16 (6), 743-751, 1998.

[26] ECKSTEIN, F., TIESCHKY, M., FABER, S., ENGLMEIER, K.H., REISER, M. Functional analysis of articular cartilage deformation, recovery, and fluid flow following dynamic exercise *in vivo*, *Anatomy and Embryology*, v.200 (4), 419-424, 1999.

[27] LI, L.P., SOULHAT, J., BUSCHMANN, M.D., SHIRAZI-ADL, A. Nonlinear analysis of cartilage in unconfined ramp compression using a fibril reinforced poroelastic model, *Clinical Biomechanics*, v.14 (9), p.673-682, 1999.

[28] COSTA, K.D., YIN, F.C.P. Analysis of indentation: Implications for measuring mechanical properties with atomic force microscopy, v.121 (5), p.462-471, 1999.

[29] LYYRA, T., KIVIRANTA, I., VAATAINEN, U., HELMINEN, H.J., JURVELIN, J.S. In vivo characterization of indentation stiffness of articular cartilage in the normal human knee, *Journal of Biomedical Materials Research*, v.48 (4), p.482-487, 1999.

[30] TUREK, S.L.. *Ortopedia: princípios e sua aplicação*, 4. ed., São Paulo: Manole, 1991. p.250-257.

[31] STONE, J.L., BEAUPRE, G.S., HAYES, W.C.. Multiaxial strength characteristics of trabecular bone, *Journal of Biomechanics*, v.16, p.743-752, 1983.

[32] ODGAARD, A., HVID, I., LINDE, F.. Compressive axial strain distributions in cancellous bone specimens, *Journal of Biomechanics*, v.22, n.8, p.829-835, 1989.

Capítulo IX

Considerações finais

Desde o início do presente trabalho de tese sabíamos que não seria uma tarefa fácil visto que havia as dificuldades da escolha dos animais, do método de indução da inflamação, do tipo e da dose de laser, dos métodos de caracterização e da interpretação dos resultados, dentro de um contexto interdisciplinar que visava identificar se havia ou não influência das aplicações de laser de baixa energia fotônica nos processos de artrite.

Tivemos o objetivo de realizar um trabalho eminentemente experimental, com a utilização de todas as técnicas de caracterização disponíveis. Ficamos agradecidos de contar com a cooperação de diversos profissionais que gentilmente nos ofereceram as portas abertas de seus laboratórios e sua orientação como especialistas para que pudéssemos trabalhar com liberdade na composição dos dados experimentais apresentados na presente tese. Pedimos escusas por qualquer erro não intencional nos procedimentos laboratoriais, ou outros, pelos quais assumimos todas as responsabilidades. Acreditamos que nosso trabalho proporcionou resultados muito interessantes, mas que devem ser encarados como resultados de primeira ordem, no sentido de que colegas, no futuro próximo possam aperfeiçoá-lo.

Concluimos que o laser de HeNe tem influência nos mecanismos de regeneração da cartilagem articular inflamada. Estes efeitos alteram os equilíbrios das reações bioquímicas envolvidas no restabelecimento da estrutura danificada. Observa-se que existe uma dose adequada ($7,0 \text{ J/cm}^2$) para a promoção da recuperação e que doses maiores (por exemplo 50 J/cm^2) não têm efeitos positivos, mas inibidores. Isto significa que a dose de $7,0 \text{ J/cm}^2$ é uma boa dose mas não é a dose ótima. Estudos mais refinados no futuro podem estudar casos intermediários para encontrar o ponto de máxima excitação positiva. Evidentemente que a dose em seres humanos deve ser diferente da dose dos animais experimentais, devido às diferenças biológicas existentes. A aplicação do laser em nosso trabalho foi pontual,

isto é, o feixe de laser incidia em uma região fixa. Trabalhos futuros poderiam explorar as alterações regenerativas com a aplicação do laser varrendo toda a área inflamada, de modo a excitar toda a região da articulação.

Os resultados obtidos, em relação à regeneração com a aplicação do laser de GaAs, foram muito menos significativos. Isto nos leva a crer que existem processos de regeneração foto-biológicos que são melhores excitados por lasers de maior energia de fóton, como é o caso do laser de HeNe.

Não tivemos condições laboratoriais para analisar a quantidade de leucócitos ou outras células envolvidas nos mecanismos de defesa e regeneração. Seria muito interessante poder medir a quantidade das células nas cartilagens inflamadas e compara-las com as dos animais que receberam a aplicação de laser.

Observou-se bioquimicamente que as cartilagens inflamadas e também as que receberam aplicações de laser, apresentaram variações na concentração de hidroxiprolina. Entretanto, na artrite, a concentração elevada de hidroxiprolina não significa apenas o aumento na síntese de colágeno. Embora a hidroxiprolina atue como um indicador da síntese protéica, ela também pode estar relacionada com a ação dos proteoglicanos que liberam o colágeno, proveniente do atrito na superfície articular. Verificamos que em vários casos, a aplicação de laser provocou um aumento na concentração de hidroxiprolina.

Estudos futuros podem ser realizados, por exemplo, para quantificar a concentração de proteoglicanos na superfície da cartilagem articular lesada e da tratada, em relação com os dados obtidos pela dosagem de hidroxiprolina. A utilização concomitante de ambas as dosagens é importante para a definição do mecanismo de desgaste da cartilagem articular. As condições em que os mecanismos da matriz extracelular estejam deteriorando ou beneficiando a síntese do colágeno poderiam ser estabelecida de maneira mais unívoca.

Finalmente gostaria de dizer que cada obstáculo encontrado no decorrer deste trabalho de tese foi um desafio e um estímulo para a sua continuidade. Há muito ainda que ser feito e é nossa esperança continuar neste trabalho e incentivar jovens pesquisadores a nos ajudar nesta área.

Não posso deixar de agradecer aqui a Deus e a todos os meus amigos e professores, sem os quais este trabalho não teria condições de ser realizado. O meu "Muito Obrigado".