



# Ação do laser de HeNe na osteogênese

**Ivânia Garavello Forte Freitas**

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

Orientador: Prof. Dr. Vitor Baranauskas

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Alice da Cruz-Höfling

Banca Examinadora:

Prof Dr <sup>e</sup> Maeli Dal Pai-Silva	.....
Prof Dr. Mário Jefferson Quirino Louzada	.....
Prof Dr. Edson Moschim	.....
Dr. Alfredo Carlos Peterlevitz	.....
Prof Dr. Vitor Baranauskas	.....

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

2001

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

F884a Freitas, Ivânia Garavello Forte  
Ação do laser de HeNe na osteogênese / Ivânia Garavello  
Forte Freitas -- Campinas, SP: [s.n.], 2001.

Orientadores: Vitor Baranauskas ; Maria Alice da Cruz-  
Höfling.

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

1. Ossos - Crescimento. 2. Laser helio-neonio. I.  
Baranauskas, Vitor. II. Cruz-Höfling, Maria Alice da. III.  
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de  
Engenharia Elétrica e de Computação. IV. Título.

## Dedicatória

*Ao meu filho Rafael, que me dá  
vida, força e sabedoria  
para que eu consiga  
torna-lo homem*

*Aos meus pais, Maria Dolores e Eugênio  
que me ensinaram que honestidade  
e humildade são as raízes para  
produção de bons frutos*

*A Ismael, meu amor, marido,  
companheiro e colega,  
com quem divido os  
frutos colhidos*

*Aos meus irmãos Carmem e Guido  
e a Sr<sup>a</sup> Maria Antonieta  
pelo apoio, carinho  
durante a realização  
deste trabalho*

## **Agradecimentos**

Ao Prof. Dr Vitor Baranauskas, meu orientador, por ter me acolhido nesta área, com toda sua competência e sabedoria, conduzindo-me à produção deste trabalho e por ter sido compreensivo pelas dificuldades que passei durante estes anos, muito obrigada.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Maria Alice da Cruz-Höfling pela orientação, competência, dedicação, amizade e carinho com que me acolheu em seu laboratório e sua residência. Pelos ensinamentos, muito obrigada.

Às Chefias dos Departamentos de Semicondutores Instrumentos e Fotônica da FEEC/Unicamp e de Histologia e Embriologia IB/Unicamp, pela utilização de materiais e das estruturas físicas para que eu pudesse desenvolver meus estudos.

À Chefia do Departamento de Morfologia - Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista-Unesp, campus Botucatu, pela utilização de seu Laboratório.

À Direção da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista –Unesp, campus de Presidente Prudente, à Chefia, à Coordenação e aos colegas do Departamento de Fisioterapia, que me deram respaldo e me apoiaram nos momentos que precisei ficar afastado de minhas obrigações acadêmicas.

À Chefia e funcionários do Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista –Unesp, campus de Botucatu, pela utilização da estrutura física, pelo auxílio no preparo e manuseio com os animais.

Ao Z. Jingguo, pela obtenção das imagens no microscópio de força atômica.

Aos tios José e Olinda Costenaro, pelo lar e o incentivo que me deram, tornando mais branda esta conquista, muito obrigada.

À UNESP e CAPES, que forneceram suporte financeiro para a realização deste trabalho.

## Resumo

A lesão traumática ou cirúrgica de ossos longos é imediatamente seguida de processos de reparo por células osteogênicas, para proliferação e diferenciação em células osteoblásticas. Neste trabalho, nós exploramos a influência do laser de HeNe na osteogênese após lesão. Utilizamos ratos da linhagem *Wistar*, machos, com peso corporal entre 250-300 g. As lesões foram provocadas em apenas uma das corticais da tíbia por uma broca com diâmetro de 1,6 mm. As aplicações de laser iniciaram 24 h após as cirurgias. Os animais foram separados em três grupos, sujeitos a diferentes doses de irradiação diária (3,15; 31,5 e 94,5 Jcm<sup>-2</sup>) e sacrificados 8º e 15º dia após a lesão. Análises feitas por microscopias de luz, eletrônica de varredura e de força atômica, mostraram que doses diárias de 31,5 e 94,5 Jcm<sup>-2</sup> por 7 dias consecutivos, resultaram na formação de trabéculas ósseas mais espessas e aceleração da angiogênese, indicando que o aumento na síntese de fibras colágenas e atividade osteoblástica ocorreu pela irradiação do laser de baixa potência, acelerando o reparo da fratura.

**Palavras chaves: osso –crescimento, laser hélio-neônio**

## Abstract

The traumatic or surgical cutting of a long bone is immediately followed by a sequence of repair processes in which the osteogenic cells to proliferate and differentiate in osteoblast cells. In this work, we explored the influence of a HeNe laser on osteogenesis. We used young male adult Wistar rats (with masses between 250 and 300 g). Piercing a 1.6 mm-diameter hole in just one cortical tibia surface provoked the injury. Laser treatment was started 24 h after the surgery. The animals were separated into three groups, for different radiation doses (3.15; 31.5 e 94.5 Jcm<sup>-2</sup>), and after daily applications, they were sacrificed at 8<sup>th</sup> or 15<sup>th</sup> days. Light, electron and atomic force microscopies revealed that the laser treatment of the lesion during 7 days consecutively with doses of 31.5 and 94.5 J cm<sup>-2</sup> resulted in the formation of thicker bone trabeculae, increase of angiogenesis. These results indicate a greater synthesis of collagen fibers and therefore that the osteoblastic activity was increased by the low-energy laser radiation.

**Keywords: bone growth , laser helium-neon**

## Sumário

Capítulo I – Introdução .....	1
1. Introdução à tese .....	1
Tecido ósseo .....	2
Tipos de tecido ósseo .....	2
Reparo de lesão do tecido ósseo .....	4
Fatores que influenciam a reparação óssea .....	5
2. Objetivos .....	6
3. Modelo Experimental .....	6
4. Métodos .....	7
5. Organização da tese .....	8
6. Referências .....	9
Capítulo II –Efeitos do Laser na Osteogênese.....	11
1. Introdução .....	11
2. Procedimento Experimental .....	12
3. Resultados e Discussão .....	13
4. Conclusão.....	20
5. Referências .....	20
Capítulo III - Efeito da Irradiação Laser de Baixa Potência na Organização Lamelar .....	22
e Parâmetros Histomorfométricos no Reparo de Lesão Óssea em Ratos .....	
1. Introdução .....	22
2. Materiais e Métodos .....	23
Procedimento cirúrgico e de irradiação laser .....	23
Morfometria .....	24
Método de polarização por Picrossirius .....	25
Análise estatística .....	25
3. Resultados .....	25
4. Discussão .....	32
5. Referências .....	36
Capítulo IV - Observação por Microscopia de Força Atômica da Estrutura da Matriz .....	38
Óssea e Zonas de Regeneração em Tíbias de Ratos .....	
1. Introdução .....	38
2. Materiais e Métodos .....	39
3. Resultados e Discussão .....	39
4. Conclusão.....	46
5. Referências .....	46

Capítulo V – Análise por Microscopia de Força Atômica da Estrutura da Matriz Óssea em Regeneração de Tíbias de Ratos Após Estimulação com Laser de Baixa Potência .....	48
1. Introdução .....	48
2. Materiais e Métodos .....	49
3. Resultados e Discussão .....	51
4. Conclusão.....	59
5. Referências .....	59
 Capítulo VI - Foto-estimulação da Angiogênese por Laser de HeNe em Lesões de Tíbias de Ratos.....	61
1. Introdução .....	61
2. Materiais e Métodos .....	62
Procedimento cirúrgico e irradiação por laser .....	62
Análise histológica e quantitativa .....	63
Análise estatística .....	64
3. Resultados.....	64
4. Discussão .....	69
5. Referências .....	73
 Capítulo VII - Considerações Finais .....	75

# Capítulo I

## Introdução

### **1. Introdução à tese**

Os efeitos dos lasers de baixa potência nos diferentes tecidos biológicos tem despertado a atenção para suas possíveis aplicações terapêuticas.

Têm sido relatados na literatura científica efeitos positivos da irradiação do laser de baixa potência no reparo de lesões de tecidos como: músculo [1-4], nervos periféricos [5], pele [6, 7] e ossos [8 -11]. Também tem sido documentado que tecidos irradiados com laser de baixa potência, apresentam maior número de vasos sanguíneos [3, 5, 7, 10-13] e maior proliferação de células como, por exemplo, de fibroblastos [14]. Por outro lado, são encontradas evidências na literatura que revelam que a irradiação não provoca alterações, ou, ainda, que seus efeitos são negativos para regeneração dos tecidos biológicos [15-19].

Essas variações nas respostas do tecidos biológicos frente à ação do laser de baixa potência podem ser explicadas, pelas diferentes doses e períodos de irradiação, em tecidos com estruturas e composição distintas [20]. Segundo Simunovic *et al* [20], resultados positivos somente serão obtidos a partir de técnicas, corretamente aplicadas, e doses selecionadas individualmente, visto que doses muito baixas não provocam efeitos e, em contrapartida, doses elevadas podem provocar danos ao tecido irradiado.

Na presente tese foi investigada a ação da irradiação com laser de baixa potência em um modelo de lesão, induzido cirurgicamente, em tibia de ratos adultos jovens. Os efeitos de três doses de laser HeNe foram avaliados. Cada dose foi ministrada diariamente em períodos de 7 e 14 dias e os efeitos por elas produzidos foram avaliados por parâmetros quantitativos e qualitativos em relação a fenômenos indicativos de atividade regenerativa aumentada.

A seguir serão apresentadas considerações sobre o tecido ósseo de forma a auxiliar o leitor não especializado no entendimento do conteúdo do trabalho.

## **Tecido Ósseo**

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo de sustentação, formado por células e por material extracelular calcificado, denominado matriz óssea. As células que compõe o tecido ósseo são: osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. A parte orgânica da matriz óssea é composta principalmente por fibras de colágeno do tipo I (que compõe cerca de 90% do peso seco do material orgânico) e é sintetizada pelos osteoblastos, e portanto, células responsáveis pela formação do osso. Este processo é denominado osteogênese [21-23]. À medida que os osteoblastos são circundados pela matriz óssea que secretam, deixam de ser células poligonais e desenvolvem extensões longas e delgadas. Neste momento, o metabolismo dessas células se altera, cessam a síntese de matriz óssea e passam a ser chamadas osteócitos. Os osteócitos situam-se em cavidades ou lacunas no interior da matriz, mas mantém comunicação entre si através dos longos prolongamentos citoplasmáticos, que se intercalam e estabelecem vias de transporte de nutrientes e metabólitos.

As células responsáveis pelo remodelamento ósseo são os osteoclastos. São células multinucleadas portadoras de grande quantidade de enzimas digestivas e capazes de erodir o tecido ósseo ao atacar a matriz, e, desta forma, participam do processo de remodelação do tecido e da regulação dos níveis plasmáticos de cálcio.

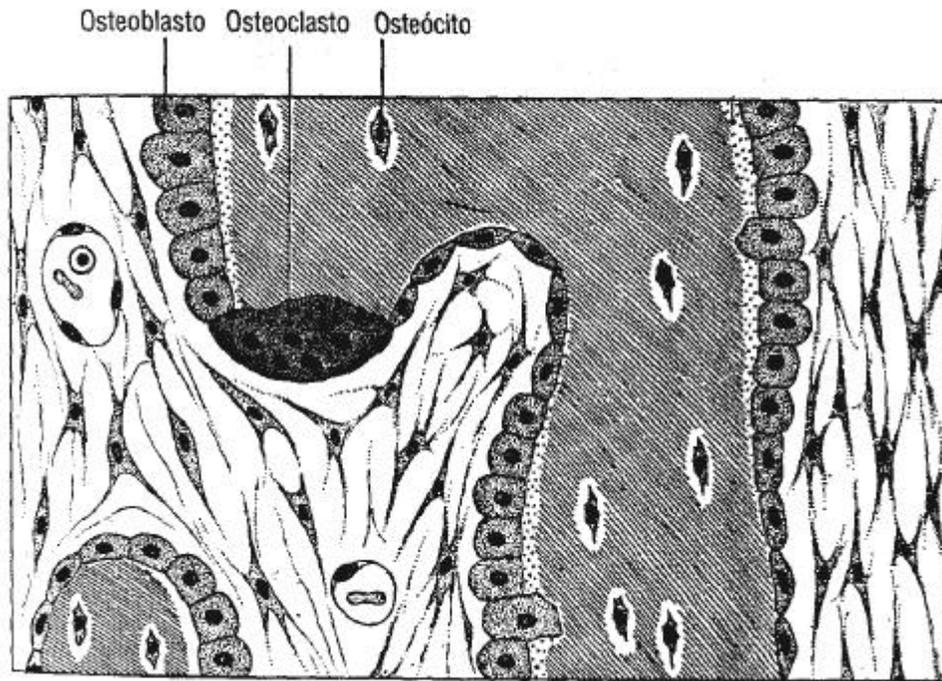
A matriz óssea recém formada constitui a porção orgânica não calcificada e recebe o nome de tecido osteóide [21, 23]. O tecido ósseo formado possui dois graus de organização histológica os quais caracterizam a forma imatura ou osso primário, e a forma madura ou tecido ósseo secundário.

### **Tipos de tecido ósseo**

Histologicamente existem dois tipos de tecido ósseo: imaturo (ou primário ou trabecular) e maduro (ou secundário ou lamelar). Os dois tipos possuem as mesmas células e os mesmos constituintes da matriz óssea, porém, apresentam diferentes organizações tridimensionais em suas fibras colágenas.

O tecido ósseo primário é o primeiro tecido ósseo a aparecer na formação da estrutura óssea. O tecido ósseo neoformado organiza-se em trabéculas, na periferia das quais alinham-se, em fileiras, os osteoblastos produtores da matriz óssea trabecular. A

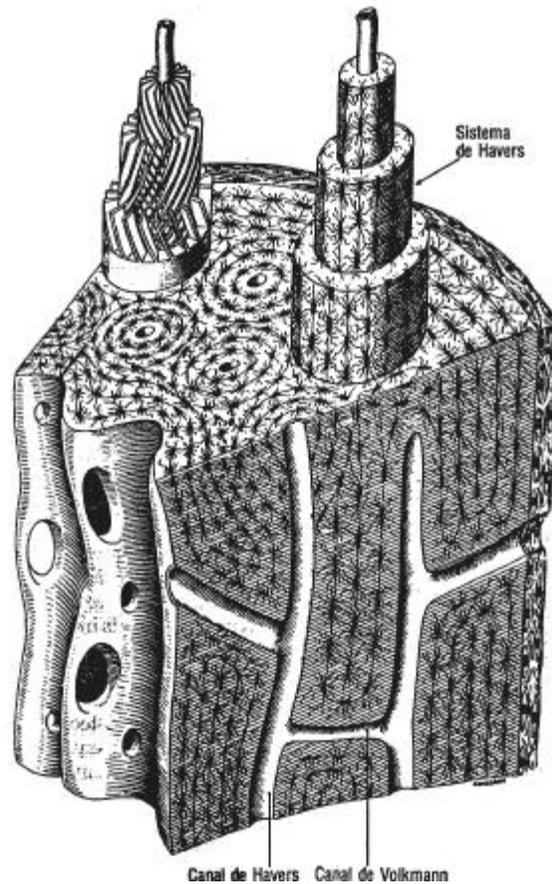
matriz neste estágio apresenta feixes entrelaçados de fibras colágenas, sem organização definida, contendo grande número de osteócitos irregularmente distribuídos no interior das trabéculas ósseas neo-formadas [21, 23] (Figura 1).



**Figura 1-** Esquema da formação trabecular pelas células osteogênicas. Podemos observar alinhamento dos osteoblastos (arranjo epitelióide) envolvendo a trabécula neo-formada.

O tecido ósseo secundário substitui gradativamente o tecido ósseo primário pela deposição gradual de estratos ou camadas de matriz, que o transformam da forma trabecular para lamelar. Sua principal característica é apresentar fibras colágenas organizadas em lamelas, dispostas paralelamente umas às outras, em camadas concêntricas em torno de um canal central, denominado canal de *Havers*, por onde ocorrem vasos sanguíneos e nervos. Cada conjunto desses forma um sistemas de *Havers*. Este sistema é típico do tecido ósseo secundário. Os canais medulares de *Havers* comunicam-se entre si com a cavidade medular, e com a parte externa do osso por canais transversais ou oblíquos, os canais de *Volkman* [21, 23] (Figura 2).

O remodelamento ósseo depende da atividade integrada de dois tipos de células: os osteoblastos, para produção de tecido neo-formado, e os osteoclastos, para destruição do tecido, ambos os eventos cruciais ao processo no decorrer do crescimento ósseo normal, ou após lesão.



**Figura 2-** Desenho esquemático da microanatomia típica do sistema Haversiano.

### **Reparo de lesão do tecido ósseo**

O acometimento de uma lesão no tecido ósseo, traumática ou cirúrgica, é seguido por seqüência histológica definida, destinada a reparar a lesão. Assim, imediatamente após a lesão, ocorre um sangramento que é seguido pela formação de coágulos que interrompem o fluxo sanguíneo local. Após quarenta e oito horas inicia-se o processo de proliferação das células osteogênicas, os osteoblastos, que dão origem às trabéculas ósseas constituídas por osso primário, dando origem assim à formação do calo ósseo. O calo é remodelado e, a

seguir, substituído por osso secundário ou lamelar. Concomitantemente, há necessidade de formação e/ou reconstituição dos vasos sanguíneos que irão suprir o tecido ósseo em processo de regeneração, através de brotamento de vasos pré-existentes. O processo é denominado angiogênese, e é acompanhado por intensa atividade dos osteoclastos. Estes se dispõem junto às trabéculas ósseas formando túneis, que serão revestidos por lâminas concêntricas de tecido ósseo maduro, constituindo o sistema Haversiano [21, 23-24].

### **Fatores que influenciam a reparação óssea**

A formação do calo cicatricial de lesões ósseas, através da osteogênese, depende de vários fatores que podem ser modificados ou alterados por diferentes tratamentos (vitamínicos, hormonais, elétricos, etc.) ou pela alteração na circulação sanguínea local [8,10-11].

Relatos mais recentes têm mostrado que o tecido ósseo irradiado por laser de baixa potência pode apresentar aumento da vascularização e aceleração dos processos biológicos envolvidos no reparo de lesões [8], aumento da calcificação da matriz óssea [8, 10], maior resistência mecânica no tecido ósseo neo-formado [11] e aumento do número de osteoblastos e osteoclastos [9], além da proliferação, diferenciação de células osteoblásticas [11]. Além disso, é importante mencionar que a irradiação por laser de HeNe de baixa potência promove aceleração no reparo de lesões no tecido ósseo por ação fotoestimuladora dos processos biológicos sem, contudo, provocar efeito térmico [8, 25-27].

Apesar das evidências a respeito dos benefícios fisiológicos da utilização da terapia por laser de baixa potência e da sua ação no tecido ósseo, não há, até o presente momento, consenso em relação à dose e ao período de irradiação adequados para promoverem efeitos positivos na osteogênese. Muito dessas dificuldades advém da complexidade inerente a cada tipo de tecido do organismo, do seu estado funcional e de outras variáveis, o que dificulta o estabelecimento de padrões que possam ser extrapolados para as diferentes situações de terapia a laser.

## 2. Objetivos

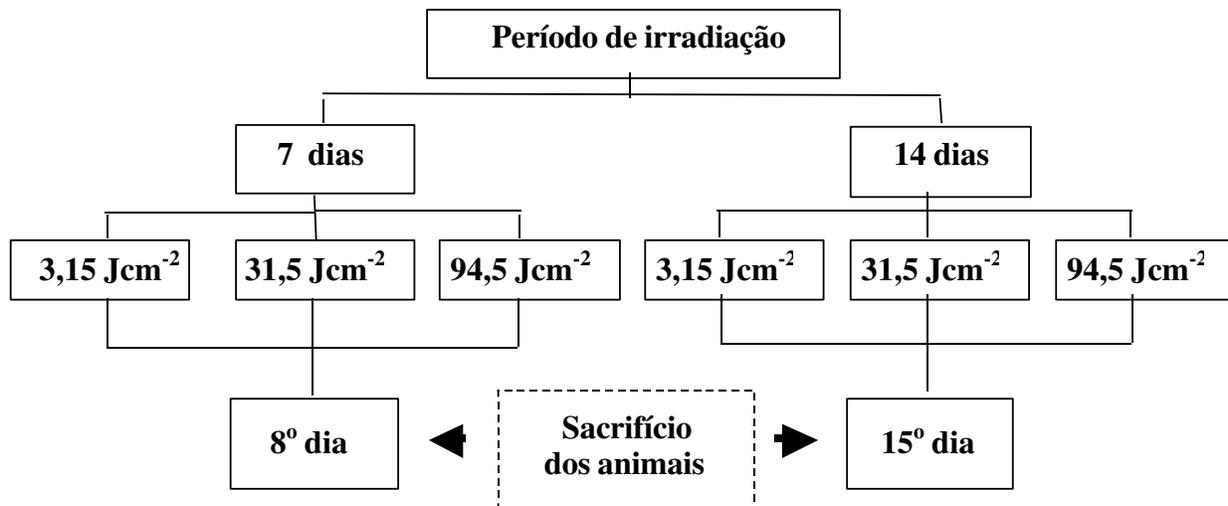
O presente trabalho visa contribuir para o entendimento dos fenômenos envolvidos. Os efeitos da aplicação do laser de HeNe, de baixa potência, no reparo de lesão de tecido ósseo de ratos, feita cirurgicamente, serão investigados utilizando-se três doses distintas por um período de 7 ou 14 dias, iniciada a irradiação após 24 horas da cirurgia ter sido efetuada. Os resultados obtidos poderão ser interpretados como decorrentes de mecanismos fotobiológicos moduladores dos fenômenos biológicos em curso durante a reparação óssea.

## 3. Modelo Experimental

Para realização deste trabalho foram utilizados um total de 90 *Rattus norvegicus albinus*, linhagem *Wistar*, machos jovens, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual Paulista – Campus de Botucatu e o procedimento experimental de lesão e irradiação foi realizado no Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista–Unesp. Os animais foram divididos em grupos de acordo com a técnica de análise.

O modelo experimental utilizado foi a tíbia pela facilidade de acesso para provocar a lesão e pela pouca massa muscular entre a tábua óssea e a pele.

As tíbias lesadas cirurgicamente foram irradiadas com laser de baixa potência com doses de  $3,15 \text{ Jcm}^{-2}$ ,  $31,5 \text{ Jcm}^{-2}$  e  $94,5 \text{ Jcm}^{-2}$ . As diferentes doses foram obtidas variando-se o tempo de exposição ao feixe de luz. Os animais foram irradiados por 7 ou 14 dias consecutivos e sacrificados 24 h após a última irradiação (Figura 3).



**Figura 3** - Esquema do período de irradiação nas diferentes doses e sacrifício dos animais

#### 4. Métodos

Para investigação estrutural do tecido ósseo neo-formado foram utilizadas Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia de Força Atômica (MFA). Para análise histológica do tecido ósseo neo-formado utilizou-se a microscopia de luz com técnicas de coloração por Tricrômico de Masson, para a caracterização morfológica e análise quantitativa de vasos sanguíneos no tecido neo-formado; coloração de Schmorl para análise dos componentes orgânicos da matriz óssea e método de Picrossirius-Hematoxilina com microscopia de polarização, para avaliação do estado de organização da matriz óssea, baseado na birrefringência apresentada pelos feixes das fibras de colágeno e análise morfométrica da área trabecular neo-formada por método computacional. O número de animais utilizados para cada diferente técnica de análise está representado na Tabela 1.

Tabela 1 - Distribuição do número de animais de acordo com as técnicas de análise	
Técnicas	número de animais
MEV	18
MFA	18
Microscopia de luz: coloração: Schmorl	18
Tricrômio de Masson e Picrossirius-Hematoxilina	18
Controle	18
Total	90

## 5. Organização da Tese

Esta tese foi organizada em: Capítulo I – Introdução, contendo alguns conceitos necessários à apresentação do tema e subsequente descrição dos resultados da pesquisa.

A seguir, considerando os vários aspectos relacionados à metodologia empregada na presente pesquisa e os diferentes métodos usados para caracterizar os efeitos da irradiação por laser de HeNe na osteogênese, apresentamos os resultados sob a forma de capítulos, sendo sua maioria publicada na forma de *papers* em importantes revistas científicas.

O Capítulo II [28] contém os resultados da ação do laser de HeNe sobre a reorganização estrutural do tecido ósseo neo-formado e irradiado com as doses de 3,15; 31,5 e 94,5 Jcm<sup>-2</sup>, vista por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e por Microscopia de luz utilizando-se a coloração de Schmorl.

No Capítulo III [29], utilizando-se o método de luz polarizada em cortes do tecido ósseo corado pela técnica de Picrossirius-Hematoxilina analisou-se indiretamente, por microscopia de polarização, a orientação dos feixes de fibras colágenas do tecido neo-formado irradiado por laser de HeNe associado à análise morfométrica da área trabecular neo-formada, utilizando-se programa computacional.

No Capítulo IV [30] redirecionamos nossos experimentos para a evolução natural da regeneração do tecido ósseo neo-formado, analisado por Microscopia de Força Atômica (MFA). Tanto quanto sabemos, fomos pioneiros na investigação do remodelamento ósseo após lesão, pelo método de MFA.

No capítulo V [31], pudemos analisar e comparar as imagens obtidas do tecido ósseo neo-formado irradiado por laser de NeHe nas doses de 3,15; 31,5 e 94,5 Jcm<sup>-2</sup>, combinando MEV e MFA, o que nos possibilitou caracterizar a organização tridimensional das fibras colágenas da matriz no nível tecidual e macromolecular.

No capítulo VI [32], foi feita análise quantitativa dos vasos neoformados (angiogênese) no local da lesão cirúrgica do tecido ósseo irradiado por laser de HeNe nas doses de 31,5 e 94,5 Jcm<sup>-2</sup>.

No capítulo VII, apresentamos algumas considerações finais sobre os efeitos do laser de baixa potência na osteogênese, analisados neste estudo.

## 6. Referências

1. N. Weis and U. Oron, *Anat. Embryol.* **186** (1992) 497.
2. Bibikova and U. Oron, *Anat. Rec.* **235** (1993) 374.
3. Bibikova, V. Belkin and U. Oron, *Anat. Embryol.* **190** (1995) 597.
4. Bibikova and U. Oron, *Anat. Rec.* **241** (1995) 123.
5. S. Rochkind, M. Nissan, M. Alon, M. Shamir and K. Salame, *Lasers Surg. Med.* **28** (2001) 216.
6. E. Mester, A.F. Mester and A. Mester, *Lasers Surg. Med.* **5** (1985) 31.
7. A Schindl, M. Schindl, L. Schindl, W. Jurecka, H. Honigsmann and F. Breier, *J. Am. Acad. Dermatol.* **40** (1999) 481.
8. M.A. Trelles and E. Mayayo, *Lasers Surg. Med.* **7** (1987) 36.
9. O. Barushka, T. Yaakobi and U. Oron, *Bone* **16** (1995) 47.
10. T. Yaakobi, L. Maltz and U. Oron, *Calc. Tiss. Intl.* **59** (1996) 297.
11. E.J. Luger, S. Rochkind, Y. Wollman, G. Kogan and S. Dekel, *Lasers Surg. Med.* **22** (1998) 97.
12. G.D. Baxter, A.J. Bell, J. M. Allen and J. Ravey, *Physiotherapy* **77** (1991) 171.
13. Kalka, T. Asahara, W. Krone and J.M. Isner, *Herz.* **25** (2000) 611.

14. Webb, M. Dyson and W.H.P. Lewis, *Lasers Surg. Med.* **22** (1998) 294.
15. P.B. Noble, E. D. Shields, P.M.D. Blecher and K.C. Kennth, *Lasers Surg. Med.* **12** (1992) 669.
16. A.N. Gam, H. Thorsen and F. Lonnberg, *Pain* **52** (1993) 63
17. H.M. Lim, K.K. Lew and D.K. Tay, *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.* **108** (1995) 614
18. Mulcahy, D. McCormack, J. McElwain, S. Wagstaff, C. Conroy, *Injury* **26** (1995) 315.
19. R. David, M. Nissan, I. Cohen and M. Soudry, *Lasers Surg. Med.* **19** (1996) 458.
20. M. Usuba, M. Akai and Y. Shirasaki, *Lasers Surg. Med.* **22** (1998) 81-85.
21. L.C.U. Junqueira and J. Carneiro - *Histologia Básica*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 9<sup>o</sup> Ed. (1999) 427p.
22. S. Teitelbaum, *Science* **289** (2000) 1504.
23. R.G. Kessel - *Histologia Médica Básica*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, (2001) 511 p.
24. S.L. Turek, *Ortopedia, Manole*, São Paulo **1** (1991) 756 p.
25. Z. Simunovic, T. Trobonjaca and Z. Trononjaca, *J. Clin. Laser Med. Surg.* **16** (1998) 145.
26. S. England, *Physiotherapy* **74** (1988) 100.
27. S.S. Kitchen and C. J. Partridge, *Physiotherapy* **77** (1991) 161.
28. I.G.F. Freitas, V. Baranauskas and M.A. Cruz-Höfling, *Appl Surface Sci* **154-155** (2000) 548.
29. I. Garavello-Freitas, V. Baranauskas, P.P. Joazeiro, C. R. Padovani, M. DalPai-Silva and M. A. Cruz-Höfling, (2001) (*J. Photochem. Photobiol.- Biology B* (no prelo)
30. V. Baranauskas, I. Garavello-Freitas, Z. Jinguo and M. A. Cruz-Höfling, *J. Vac. Sci.Technol. A.* **19** (4) (2001) 1042.
31. M.A. Cruz-Höfling, I. Garavello-Freitas, Z. Jinguo and V. Baranauskas (2001) (Submetido).
32. I. Garavello-Freitas, V. Baranauskas and M. A. Cruz-Hofling (2001). (Submetido)

## Capítulo II

### Efeito do Laser na Osteogênese

#### 1. Introdução

As propriedades e os efeitos da irradiação por laser em materiais biológicos têm sido amplamente pesquisados, e alguns resultados já são aplicados em novas técnicas, como, por exemplo, os procedimentos de micro-cirurgias. Alguns destes procedimentos já são utilizados como processo de rotina para o tratamento de várias doenças em humanos, tais como a miopia, a retinopatia diabética, o glaucoma, o descolamento de retina, o angioma cavernoso, o angioma de face. O laser também é amplamente utilizado em processos cosméticos para eliminação de rugas, a remoção de tatuagens, etc. Nestes procedimentos sempre é utilizada uma alta densidade de energia, e a ação do laser consiste em remover ou cicatrizar tecidos, como também destruir células, através de processos puramente térmicos [1-3].

Durante as décadas passadas, também foram pesquisados novos métodos para o emprego da irradiação por laser de baixa potência em processos puramente fototerapêuticos. Estes procedimentos são classificados na literatura inglesa como Terapia de Laser de Baixa Potência ("LLLT - *Low Level Laser Therapy*") [4]. Estudos com os procedimentos da LLLT sugerem que a osteogênese pode ser estimulada pela irradiação de laser de HeNe de baixa potência [5-7]. Trelles e Mayayo [5], com experiências em fraturas induzidas (manualmente) em tíbias de ratos, verificaram aumentos na vascularização e regeneração óssea, quando irradiados por laser de HeNe. Estes pesquisadores usaram uma energia incidente de 2,4 J (laser com potência de 4 mW), irradiando os animais diariamente, durante 1 segundo. Entretanto, não informaram o diâmetro do feixe ou a densidade de energia utilizada. Yaakobi *et al.* [6] aplicaram doses de  $31 \text{ Jcm}^{-2}$ , utilizando um aparelho de laser com potência de 5,3 mW, sobre um furo

feito na cortical de tíbias de ratos machos (*Sprague-Dawley*). Através de métodos radioativos de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  e fosfatase alcalina, verificaram a ocorrência do aumento da calcificação nos animais irradiados. Luger *et al.* [7] irradiaram fraturas completas de tíbias de ratos com três doses de  $297 \text{ Jcm}^{-2}$  cada, com um aparelho de laser de potência 35 mW, aplicados diariamente sobre a lesão e áreas imediatamente abaixo e acima da mesma. Usando medidas biomecânicas, como carga máxima e dureza estrutural da tíbia, eles concluíram que houve aceleração do reparo ósseo com a irradiação do laser.

Neste Capítulo, analisou-se o efeito do laser de HeNe no reparo ósseo em ratos machos, linhagem *Wistar*, submetidos a doses de 3,15; 31,5 e  $94,5 \text{ Jcm}^{-2}$ . Foram feitas análises histológicas qualitativas pela Microscopia de Luz, e análises da organização estrutural em 3D através de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foi utilizado um laser de baixa potência (1 mW), com a intenção de minimizar a indução de eventuais reações térmicas. Nas tíbias irradiadas com doses de 31,5 e  $94,5 \text{ Jcm}^{-2}$  foi observada uma evidente aceleração na formação óssea. Os melhores resultados foram observados nas tíbias que receberam doses de  $94,5 \text{ Jcm}^{-2}$ . Entretanto, as tíbias que receberam doses bem menores ( $3,15 \text{ Jcm}^{-2}$ ) não apresentaram, aparentemente, nenhuma diferença em relação aos resultados observados nas tíbias do grupo de controle.

## 2. Procedimento Experimental

As experiências foram realizadas utilizando 36 *Rattus norvegicus albinus*, linhagem *Wistar*, machos, com idade de 75 dias e com peso corporal variando entre 250 - 300 g. Após anestesia com pentobarbital sódico, foi realizada uma pequena incisão na pele dos animais, para exposição da face ântero-medial da tíbia. Em seguida, foi feito um furo de 1,6 mm de diâmetro, através de uma broca de uso odontológico, com profundidade apenas para perfurar uma das corticais da tíbia, e posteriormente a sutura da pele. Foi utilizado laser de HeNe de baixa potência para irradiar o local da lesão, através da pele. O laser utilizado tem potência nominal de 1 mW, comprimento de onda de  $\lambda =$

633 nm e produz um feixe de luz Gaussiano, com diâmetro de  $w = 1,1$  mm, sem lentes convergentes.

A aplicação do laser foi iniciada vinte e quatro horas após a cirurgia. Os animais foram divididos em três grupos, onde receberam radiação diária com doses diferentes. As doses diferentes foram obtidas aplicando-se o laser com a mesma potência, mas em diferentes tempos. Foram utilizados tempos de 30 s, 5 min, e 15 min, para cada grupo, correspondendo às doses de energia incidente de 3,15; 31,5 e 94,5  $\text{Jcm}^{-2}$ , respectivamente. As tíbias contralaterais não irradiadas foram utilizadas como controle para referência do processo evolutivo da regeneração óssea natural. As tíbias irradiadas e as de controle foram retiradas, dissecadas e fixadas imediatamente em formol 10%, por 24 h. Após descalcificação, as áreas lesadas das tíbias foram selecionadas e processadas para análise em Microscopia eletrônica de varredura. As amostras de áreas lesadas também foram processadas para cortes histológicos pela técnica de congelação, com espessura de 14  $\mu\text{m}$ , montados em lâminas histológicas e corados pela técnica de Schmorl [8], para análise dos componentes orgânicos da estrutura óssea.

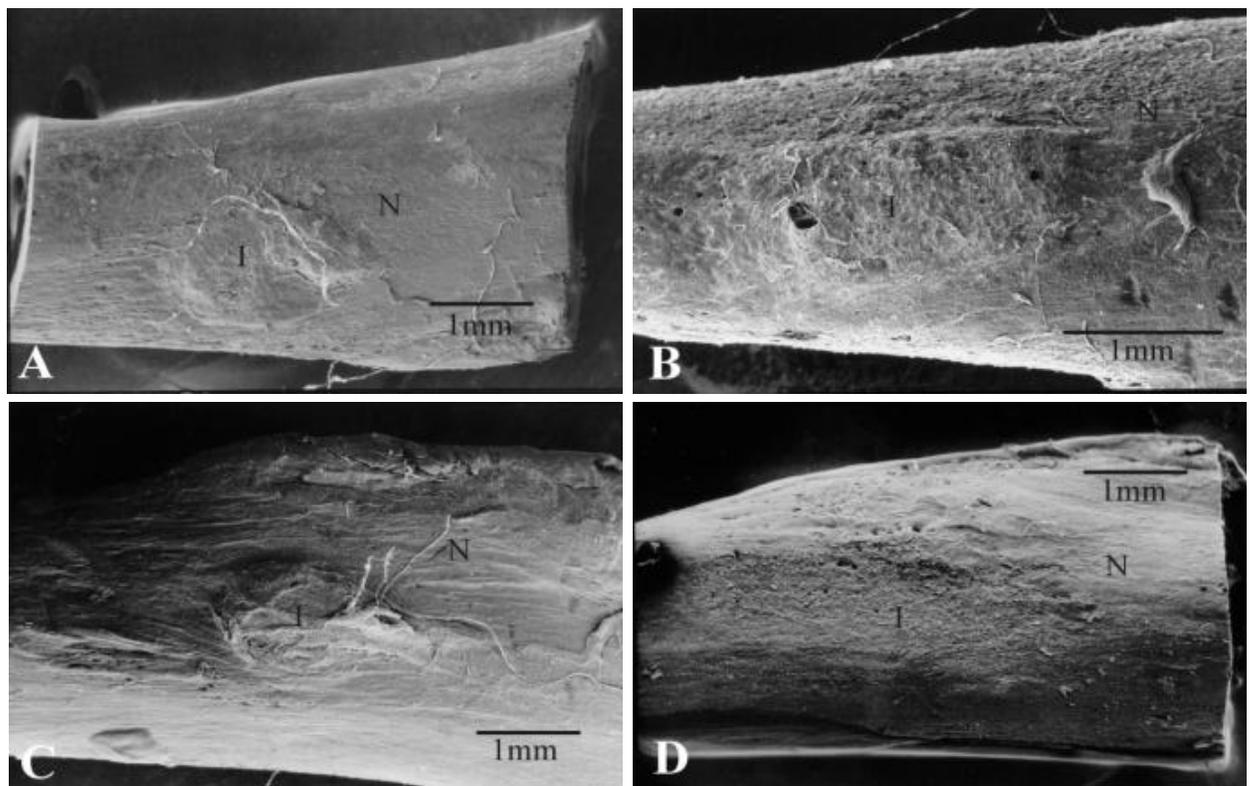
### **3. Resultados e Discussão**

A Figura 1(A - D) mostra imagens das tíbias completas, obtidas por microscopia eletrônica de varredura, apresentando o local da lesão já em processo de remodelamento. As Figuras 1A e 1B mostram as tíbias controles no oitavo e décimo quinto dia após a lesão, respectivamente; e as Figuras 1C e 1D mostram imagens das tíbias de ratos que receberam exposições diárias de laser com dose de 94,5  $\text{Jcm}^{-2}$ , durante 7 e 14 dias, respectivamente, sacrificados no mesmo período anterior. Nas imagens o tecido ósseo não lesado é identificado pela letra (N), e a área da lesão é identificada pela letra (I). Podem ser observadas diferenças entre as tíbias irradiadas e as não irradiadas. Por exemplo, pode-se observar na Figura 1D que, no décimo quinto dia após a lesão, já houve uma completa regeneração da lesão no osso irradiado.

A Figura 2 (A - F) mostra cortes histológicos típicos de tecido ósseo, corados pela técnica de Schmorl, de tíbias não irradiadas (A - C) e de tíbias irradiadas (D - F). Os

tecidos ósseos normais e lesados também são indicados nas imagens pelas letras (N) e (I), respectivamente.

Oito dias após a lesão (Figura 2 A), as tíbias contralaterais não irradiadas (controles) mostraram uma ausência de osteócitos, com desorganização da estrutura Haversiana de osso secundário (a estrutura de osso maduro está descrita por vários sistemas de Havers, com o arranjo de fibras colágenas dispostas em lamelas concêntricas e que são paralelas umas às outras, envolvendo um canal vascular contendo vasos sanguíneos e nervos).

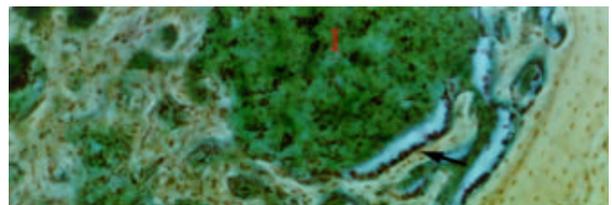
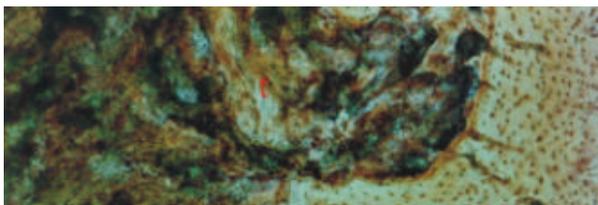


**Figura 1-** Imagens de tíbias de ratos obtidas através de microscopia eletrônica de varredura, apresentando o local da fratura (I). A e B são controle no 8º e 15º dia após a lesão, respectivamente. C e D são tíbias irradiadas (exposições diárias de  $94,5 \text{ Jcm}^{-2}$ ) no oitavo e décimo quinto dia após a lesão, respectivamente. O local da lesão é indicado pela letra (I) e a área fora da lesão (osso normal) é indicada pela letra (N).

Quinze dias após a lesão (Figuras 2B e 2C), como seria esperado, o reparo tecidual está em andamento. Podem ser vistas as trabéculas (t) do tecido ósseo neoformado primário

(trabéculas são septos de osso ainda imaturo ou primário, que está sendo formado pelos osteoblastos, que são as células responsáveis pela síntese do componente orgânico da matriz óssea). Também podem ser observadas células da medula óssea (b) ocupando os espaços intra-trabeculares, não permitindo uma clara visualização do alinhamento dos osteoblastos. No décimo quinto dia após a lesão, ainda persiste o tecido ósseo primário.

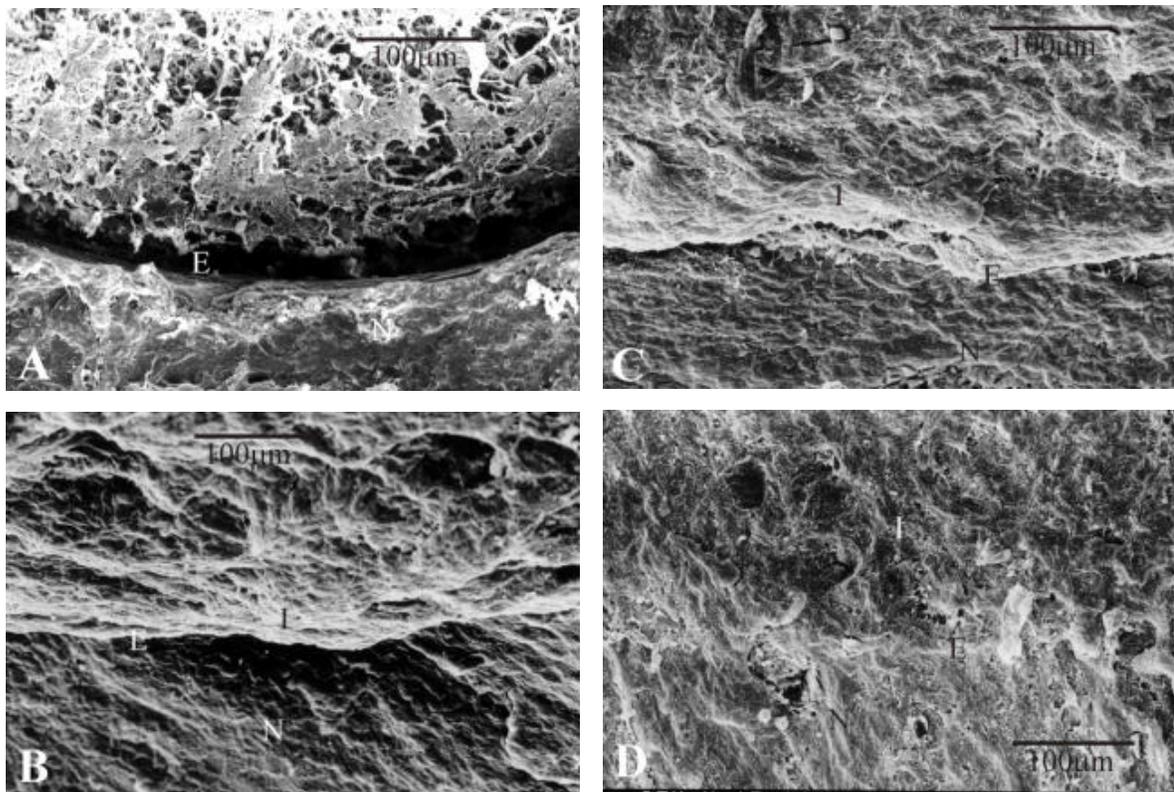
Notou-se que a eficiência das aplicações de laser, iniciadas vinte e quatro horas após a lesão, depende da dose diária aplicada no animal. As tíbias irradiadas com doses diárias de  $3,15 \text{ Jcm}^{-2}$  não apresentaram diferenças em relação às tíbias-controles, tanto no oitavo como no décimo quinto dia após a lesão. Entretanto, aplicações com doses diárias de  $31,5 \text{ Jcm}^{-2}$  e  $94,5 \text{ Jcm}^{-2}$  induziram uma aceleração progressiva da consolidação óssea, comparativamente ao processo evolutivo observado nos controles. Aplicações diárias de laser, durante 7 dias, produziram um aumento unívoco das trabéculas neoformadas (t), como ilustra as Figuras 2 D e 2 E. Os osteoblastos podem ser vistos localizados lado a lado (seta), de maneira que aparentam ser um simples epitélio, na periferia da trabécula óssea (epitélio é um tipo de tecido onde as células são bem agrupadas e com muito pouca substância intercelular). Esta disposição é uma forte característica indicadora de que os osteoblastos estão atuando efetivamente na síntese da matriz óssea (Figura 2 E). A terapia com laser não diminuiu apenas o tempo de regeneração da lesão (compare, por exemplo, as imagens presentes na Figura 2A e 2D de osso não irradiado e irradiado, após 8 dias de lesão, respectivamente), mas também produziu uma maior área de osso neoformado. No décimo quinto dia após a lesão (14 dias de exposição diária de laser com dose de  $94,5 \text{ Jcm}^{-2}$ ) aparecem nitidamente as áreas de osso secundário. A Figura 2 F mostra a consolidação de um sistema Harvesiano em lamelas concêntricas de osso envolvendo um canal contendo vasos sanguíneos (c). As lamelas externas aparecem já totalmente formadas, enquanto que o interior ainda está imaturo. Não foram observados osteoblastos neste estágio. Os osteócitos derivados dos osteoblastos acomodam-se nas lacunas situadas entre as lamelas. Pode-se observar também na Figura 2 F finos canalículos (seta), muito bem desenvolvidos e interpostos entre as lacunas osteocíticas, indicando que o intercâmbio molecular entre as células ósseas adjacentes está muito ativo.



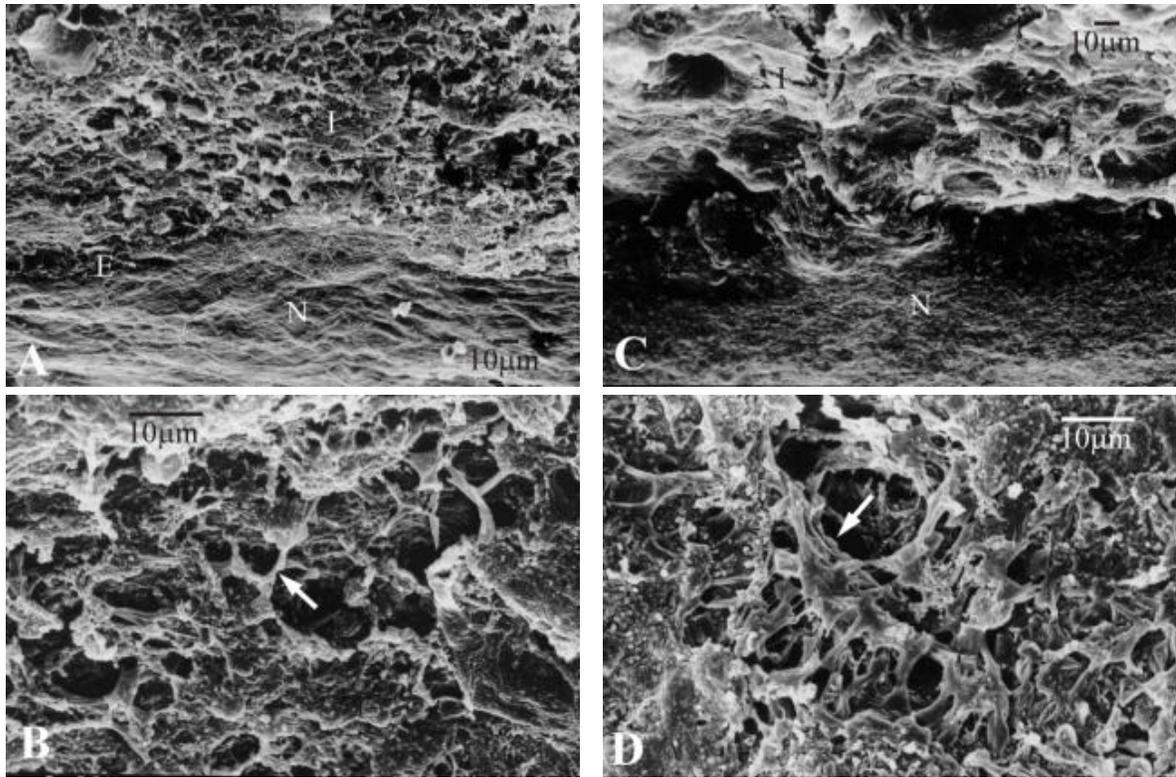
**Figura 2-** Cortes histológicos de tíbias controle (A-B) 8 dias após a lesão e (C) 15 dias após a lesão. As imagens (D-E) são de tecido ósseo no 8º dia após a lesão e (F) no 15º dia após a lesão, irradiado por 94,5 Jcm<sup>2</sup>. São observadas trabéculas ósseas (t) neo-formadas e células da medula óssea (b). Nota-se em (E) arranjo epitelióide dos osteoblastos (seta) e em (F) observa-se a formação de um canal de *Havers* (c) contendo vasos sanguíneos (cabeça de seta). Coloração Schmorl, análise por de Microscopia de Luz. Barra de escala (A - D) = 100 µm, (E) = 50 µm e (F) = 20 µm.

As Figuras 3 (A - D) e 4 (A - D) apresentam imagens típicas de microscopia eletrônica de varredura. A amplificação utilizada na Figura 4 é maior do que a utilizada na Figura 3, conforme indicado pelas barras nas imagens. Em ambas as figuras, as

imagens indicadas por A e B são de tíbias controle do oitavo e décimo quinto dia após a lesão, respectivamente; as imagens indicadas por C e D são de tíbias irradiadas (exposições diárias de  $94,5 \text{ Jcm}^{-2}$ ), também no oitavo e décimo quinto dia após a lesão, respectivamente. A interface entre a área lesada (I) e o tecido ósseo normal (N) é indicada pela letra (E). Como pode ser visto na Figura 3 D, nas tíbias irradiadas, o aspecto do tecido ósseo neoformado na área lesada (I), no décimo quinto dia após a lesão, assemelha-se com o aspecto das áreas de osso normal (N), indicando que o tratamento com o laser de HeNe foi efetivo para o processo de regeneração. Pode-se observar claramente na Figura 4 D que as trabéculas das tíbias irradiadas são mais espessas e que possuem uma melhor organização concêntrica (seta).



**Figura 3-** Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura da cito-arquitetura do calo da falha óssea. As imagens da coluna esquerda (A e B) são de tíbias controle no oitavo e décimo quinto dia após a lesão, respectivamente; as imagens da coluna direita (C e D) são de tíbias irradiadas (exposição diária de  $94,5 \text{ Jcm}^{-2}$ ), também no oitavo e décimo quinto dia após a lesão.



**Figura 4** Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura da cito-arquitetura do calo ósseo no local da lesão. As imagens da coluna esquerda (A e B) são tíbias controle no oitavo e décimo quinto dias após a lesão, respectivamente; as imagens da coluna direita (C e D) são tíbias irradiadas (exposições diárias de  $94,5 \text{ Jcm}^{-2}$ ), também no 8º e 15º dias após a lesão (ver detalhes no texto).

A combinação das análises por microscopia eletrônica de varredura e por Microscopia de luz permitiu comparar a reorganização óssea tridimensional no local da lesão com a estrutura trabecular primária do osso neoformado com sua evolução para a estrutura Haversiana secundária de um osso completamente regenerado como totalidade de reparo ósseo. Como as amostras preparadas para estas análises foram descalcificadas, não pudemos medir a presença de cálcio e fósforo, usualmente presentes na forma de cristais de hidroxiapatita.

Os resultados demonstram que aplicações diárias e sucessivas de laser HeNe com doses de  $31,5$  e  $94,5 \text{ Jcm}^{-2}$  (por um período de 7 e 14 dias de irradiação) produzem uma melhor regeneração nos sítios lesados do osso, sendo que as doses de  $94,5 \text{ Jcm}^{-2}$  são aparentemente mais eficazes do que as doses de  $31,5 \text{ Jcm}^{-2}$ . Os resultados positivos concordam também com os dados obtidos por Yaakobi *et al.* [6], que utilizaram doses de

31 Jcm<sup>-2</sup>. Nossas observações de que as doses de 94,5 Jcm<sup>-2</sup> são mais eficientes e que doses menores (por exemplo de 3,15 Jcm<sup>-2</sup>) não apresentam nenhum efeito positivo, também contribuem para a controvérsia entre resultados neutros ou positivos obtidos na regeneração de fraturas completas de tíbias de ratos, realizados independentemente por David et al. [9] (efeitos neutros) e Luger *et al.* [7] (efeitos positivos). O diâmetro da tíbia no local onde as fraturas completas foram feitas, é de aproximadamente 5 mm. Como o diâmetro do feixe de laser tem poucos milímetros, devem ser necessárias aplicações em vários pontos da lesão, ou mesmo a varredura do laser sobre toda a área lesada, incluindo a falha entre as duas partes ósseas. David *et al.* [9] usaram apenas um único ponto de irradiação (de aproximadamente 3 mm de diâmetro) e, deste modo, mesmo na máxima densidade de potência que utilizaram (56 Jcm<sup>-2</sup>), eles não teriam a possibilidade de obter uma dose de irradiação apropriada (de pelo menos aproximadamente 31 Jcm<sup>-2</sup>) em todas as áreas da fratura. Eles também optaram por realizar irradiações em dias alternados, o que resulta na redução pela metade da dose total acumulada no tratamento. Em contraste, Luger *et al.* [7], usando três pontos de irradiação com doses diárias de 297 Jcm<sup>-2</sup> cada, certamente conseguiram uma dose apropriada de irradiação, talvez com intensidade excessiva no ponto focal do feixe, mas com energia suficiente para promover o excitamento em uma grande área da fratura com doses de irradiação convenientes (de pelo menos aproximadamente 31 Jcm<sup>-2</sup>).

Para que esta técnica possa ser aplicada para a regeneração de fraturas ósseas de animais maiores, deve se prever a necessidade de um mecanismo óptico de varredura que possa irradiar homogêaneamente o local da lesão com doses de energia, provavelmente semelhantes às doses utilizadas neste trabalho.

Os mecanismos biológicos envolvidos na melhora do crescimento do tecido ósseo irradiado por laser ainda não são claramente entendidos. A hipótese mais provável é que a energia do laser possa excitar as porfirinas e os citocromos (que são cromóforos intracelulares) e desta maneira induzir um aumento da atividade celular [10-13], aumentando a concentração de ATP, ALP e liberando cálcio. É importante observar que os resultados obtidos neste experimento confirmam indiretamente este modelo foto-biológico, pois usando um laser de 1 mW de potência, os efeitos térmicos são desprezíveis e portanto não devem interferir nos mecanismos.

## 4. Conclusão

Os efeitos da aplicação do laser de HeNe sobre o reparo ósseo de lesões foram analisados através das Microscopias de Luz e Microscopia Eletrônica de Varredura. Foram observadas diferenças na evolução regenerativa das lesões entre os ossos dos animais irradiados e dos animais não irradiados. As doses diárias de 31,5 e 94,5 Jcm<sup>-2</sup> (durante um período de 7 e 14 dias de aplicação) induziram uma aceleração progressiva na consolidação óssea da lesão das tíbias tratadas, quando comparadas ao processo regenerativo natural das lesões das tíbias-controles. A eficiência do laser foi mais pronunciada nos animais que receberam doses diárias de 94,5 Jcm<sup>-2</sup>. Como foi propositalmente utilizado um laser de baixa potência (1 mW), os resultados deste estudo também demonstram que processos puramente foto-biológicos (e não foto-térmicos) devem estar envolvidos nos mecanismos de aceleração da regeneração do tecido ósseo. Os resultados obtidos são promissores para que esta técnica tenha futuras aplicações em outros mamíferos.

## 5. Referências

1. J.S.M. Lai, C.C.Y. Tham and D.S.C. Lam, *Eye* **13** (1999) 26.
2. J.M. Bauerberg, *J. Refract. Surg.* **15** (1999) 66.
3. D.C. MacCarth, *Photonics Spectra* **32** (1998) 90.
4. S.S. Kitchen and C. J. Partridge, *Physiotherapy* **77** (1991) 161.
5. M.A. Trelles and E. Mayayo, *Lasers Surg. Med.* **7** (1987) 36.
6. T. Yaakobi, L. Maltz and U. Oron, *Calcif. Tissue Int.* **59** (1996) 297.
7. E.J. Luger, S. Rochkind, Y. Wollman, G. Kogan and S. Dekel, *Lasers Surg. Med.* **22** (1998) 97.

8. G. Schmorl, in: Die Pathologisch-Histologische Untersuchungsmethoden, F.G.W. Vogel, Leipzig, Germany, (1922) 243 p.
9. R. David, M. Nissan, I. Cohen and M. Soudry, Lasers Surg. Med. **19** (1996) 458.
10. B.M. Zaturunsky, Lasers Light Ophthalmol. **2** (1988) 63.
11. T. Karu, Phys. **56** (1989) 691.
12. H. Friedmann, R. Lubart, I. Laulicht and S. Rochkind, J. Photochem. Photobiol. B **11** (1991) 87.
13. S. Rochkind and G. E. Ouakinine, Neurol. Res. **14** (1992) 2.

## Capítulo III

# Efeito da Irradiação Laser de Baixa Potência na Organização Lamelar e Parâmetros Histomorfométricos no Reparo de Lesão Óssea em Ratos

### **1. Introdução**

Em geral, a utilização do raio laser para propósitos clínicos, cirúrgicos, ou estéticos é realizada com lasers de alta potência [1- 4], embora haja um crescente interesse na pesquisa com lasers de baixa potência, tanto para futuras aplicações clínicas quanto para o entendimento dos processos secundários que possam advir do emprego do laser de alta potência nos tecidos adjacentes ou subjacentes às de aplicação do laser [5- 9]. A diferença fundamental entre os dois tipos de utilização do laser (alta e baixa potência) é a diferenciação entre a excitação foto-térmica ou foto-biológica dos tecidos e células. O laser de alta potência permite que o raio seja concentrado com intensidade suficiente para cortar, soldar, evaporar ou fundir os tecidos, de modo imediato, por efeitos puramente térmicos. Os lasers de baixa potência não têm esta possibilidade e seu mecanismo de ação só é possível através de processos foto-biológicos, envolvendo efeitos correlatos à biologia celular e molecular.

Foi demonstrado no Capítulo II, através das análises de microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura, que o laser de HeNe, aplicado em doses sucessivas e diárias em ratos, pode ter efeitos na aceleração da regeneração óssea de lesões provocadas em suas tíbias, quando comparadas à velocidade de regeneração natural das lesões sem aplicação de laser, ou com aplicação de doses baixas [10]. Entretanto, não foi apresentada até aqui nenhuma análise quantitativa da matriz óssea neo-formada, nem foi discutido com detalhes o padrão de reorganização das fibras colágenas.

No presente Capítulo, utilizou-se a morfometria com auxílio computacional para quantificar a área óssea neoformada na lesão das tíbias. Analisou-se também o arranjo da matriz das fibras de colágeno com a utilização da técnica de luz polarizada (Picrossirius-polarização [11- 15]).

## **2. Materiais e Métodos**

### *Procedimentos cirúrgicos e de irradiação laser*

Foram utilizados 36 *Rattus norvegicus albinos*, linhagem *Wistar*, com peso corporal variando entre 250-280 g, e com idade de aproximadamente 75 dias. Após anestesia com pentobarbital sódico, foi feita uma pequena incisão na pele dos animais, para expor a face ântero-medial da tibia D. Um furo de 1,6 mm de diâmetro foi feito no terço médio da diáfise (equidistante das epífises), em apenas uma das corticais, utilizando-se broca de uso odontológico.

Um grupo contendo 18 animais foi irradiado com laser de HeNe de 1 mW de potência,  $\lambda = 633$  nm (feixe de luz Gaussiano, com diâmetro  $w = 1,1$  mm, sem lentes convergentes). A irradiação foi feita através da pele, sobre o local da lesão, incidindo-se o raio do laser perpendicular ao eixo longitudinal da tibia.

A irradiação foi iniciada vinte e quatro horas após a lesão e foram realizadas exposições diárias durante 30 s, 5 min e 15 min, correspondendo a doses de energia de 3,15; 31,5 e 94,5 Jcm<sup>-2</sup>, respectivamente, para os três subgrupos de animais (n = 6 para cada dose de irradiação). Os animais foram sacrificados por dose excessiva de pentobarbital sódico, no oitavo (n = 3 para cada dose) e décimo quinto (n = 3 para cada dose) dia após a lesão. Um grupo de 18 animais não irradiados foi igualmente sacrificado no oitavo e décimo quinto dia após a lesão e utilizado como controle. A Tabela 1 resume a divisão dos grupos e procedimentos. Após o sacrifício, as tíbias lesadas dos animais irradiados e controle foram imediatamente removidas, dissecadas e fixadas.

<b>Tabela 1 – Esquema de Irradiação</b>					
Dias de sacrifício após a lesão	Período de Irradiação (dias)	Tempo de Irradiação	Dose (Jcm <sup>-2</sup> )	Nº de animais irradiados	Número Total de animais
8	0 (controle)	0	0	0	9
	7	0,5min	3,15	3	9
	7	5 min	31,5	3	
	7	15 min	94,5	3	
15	0 (controle)	0	0	0	9
	14	0,5 min	3,15	3	9
	14	5 min	31,5	3	
	14	15 min	94,5	3	
					36

### *Morfometria*

Após fixação em solução de formol 10% por vinte e quatro horas, as amostras foram descalcificadas em ácido acético 10% durante vinte e cinco dias, posteriormente colocadas em EDTA 5% por quarenta e oito horas, sendo realizada a troca diária de ambas soluções. As áreas lesadas das tíbias foram selecionadas, removidas e desidratadas em concentração crescente de álcool, embebidas em parafina e seccionadas com 5 µm de espessura. Os cortes foram montados em lâminas de vidro e corados pelas técnicas de tricrômico de Masson e Picrossirius-Hematoxilina, para análise histológica da organização de osteoblastos, presença de osteócitos, osteoclastos e vasos sanguíneos na trabécula óssea. As lâminas foram utilizadas para o cálculo da área do tecido ósseo neo-formado. A análise morfométrica foi feita a partir de medidas de áreas de trabéculas neo-formadas contendo osso primário. Foram medidos doze campos de osso trabecular neoformado de cada dose de laser usada, em ambos os períodos de irradiação (7 e 14 dias), juntamente com o grupo

controle correspondente. Foi utilizado um Microscópio de Luz (40x - objetiva 6,3x, optovar 1,25) acoplado a um computador, contendo o programa para análise de imagem Optimas 4.1 para medidas das áreas trabeculares. Os dados obtidos a partir da medida das áreas, foram tratados estatisticamente.

#### *Método de Polarização por Picrossirius*

Para avaliar as alterações da estrutura da matriz trabecular neoformada, os cortes histológicos corados pela técnica de Picrossirius-Hematoxilina foram analisados sob luz polarizada [11-14, 7]. Este método permite uma avaliação indireta do estágio da organização da matriz óssea, baseado na birrefringência apresentada pelos feixes de fibras colágenas após coloração por Picrossirius e Hematoxilina.

#### *Análise Estatística*

Foi utilizado o teste não paramétrico de Tukey [16] para comparar os dados das diferentes doses (3,15; 31,5 e 94,5 Jcm<sup>-2</sup>) e diferentes períodos de aplicação (7 e 14 dias). As diferenças foram consideradas significantes para  $p \leq 0,05$ .

### **3. Resultados**

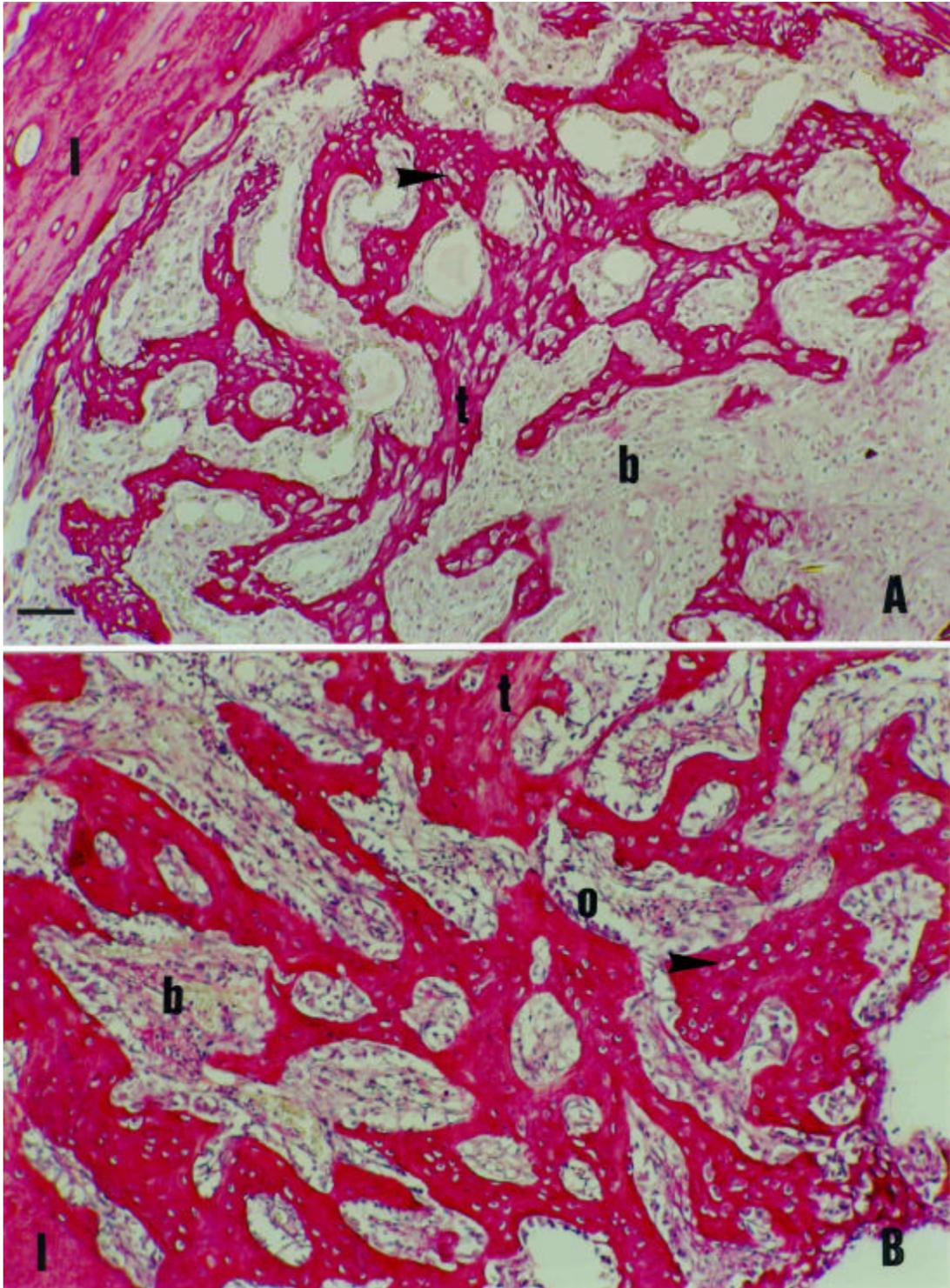
As análises histológicas e morfométricas mostraram que ocorreu, do oitavo para o décimo quinto dia após a lesão, uma evolução significativa no crescimento do osso trabecular nas tíbias dos animais do grupo de controle (Tabela 2, Figuras 1(A-B)). Entretanto, a área das trabéculas ósseas neo-formadas das tíbias irradiadas com dose diárias de 3,15 Jcm<sup>-2</sup> não apresentou nenhuma evolução significativa, quando comparada ao grupo controle (Tabela 2), tanto no período de 7 como 14 dias de irradiação. De modo similar, a análise pelo método de Polarização por picrossirius também não revelou diferenças na organização do colágeno na matriz óssea nas tíbias irradiadas, quando comparadas aos controles correspondentes (dados não mostrados).

**Tabela 2- Medida da área óssea  $\pm$  desvio padrão (n = 36)**

Tempo de aplicação do laser	Dose (Jcm <sup>-2</sup> )	Área Trabecular (mm <sup>2</sup> )	
		8 <sup>o</sup> dia	15 <sup>o</sup> dia
0 (controle)	0	0,270 $\pm$ 0,042*†	0,376 $\pm$ 0,071*
0,5 min	3,15	0,399 $\pm$ 0,098	0,513 $\pm$ 0,088
5 min	31,5	0,531 $\pm$ 0,249 †	0,509 $\pm$ 0,102
15 min	94,5	0,495 $\pm$ 0,188*†	0,304 $\pm$ 0,056*

(\*) = Significante em relação ao período de irradiação  
(†) = Significante em relação à dose de irradiação  
p  $\leq$  0,05

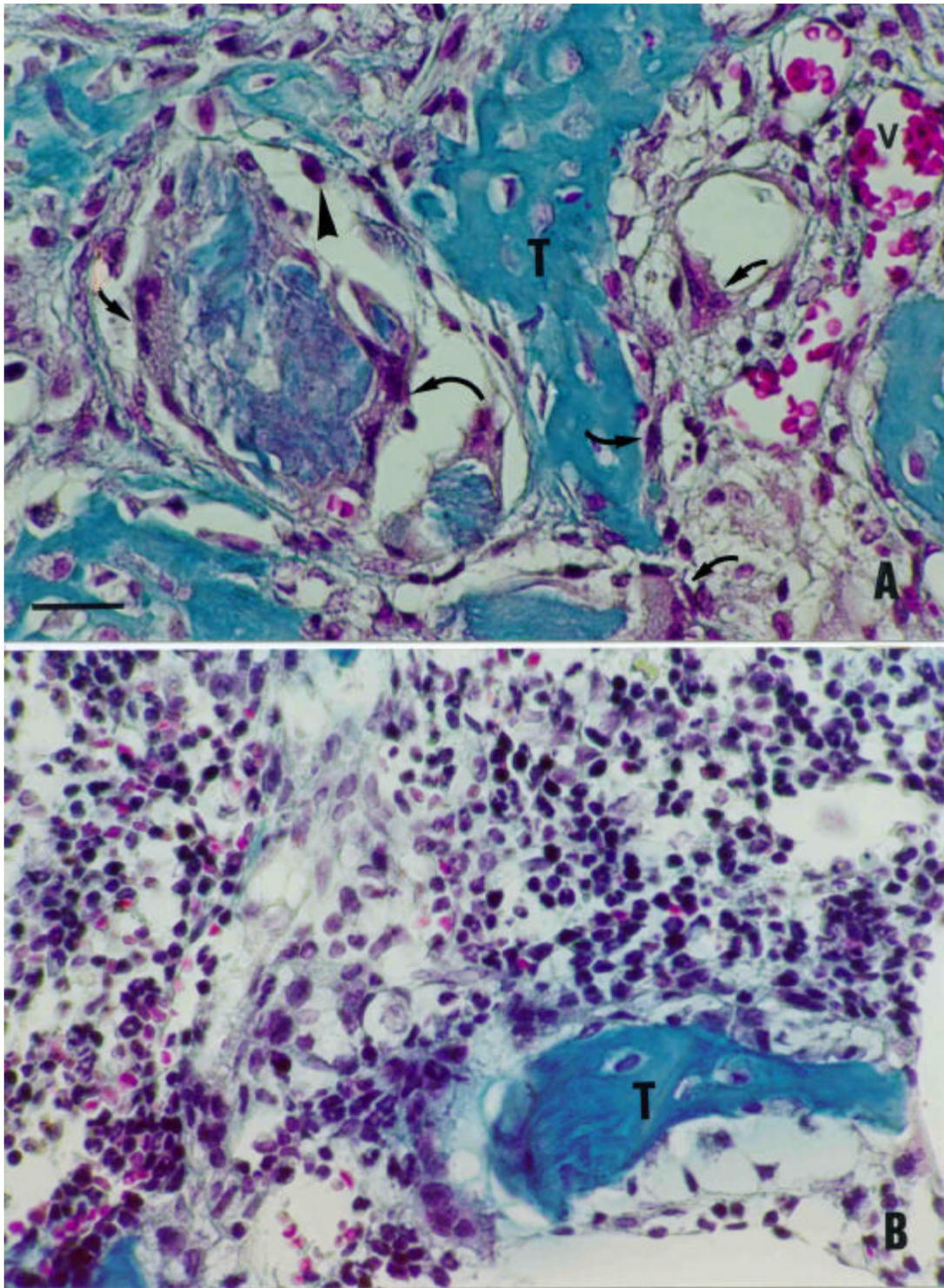
Em contraste, as medidas do tecido trabecular neoformado de tíbias irradiadas por 7 dias consecutivos, com doses diárias de 31,5 e 94,5 Jcm<sup>-2</sup> (5 e 15 minutos de irradiação, respectivamente), mostraram um aumento significativo na espessura das trabéculas, quando comparadas ao grupo controle (Tabela 2). Contudo, no décimo quinto dia após a lesão (isto é, após 14 dias de irradiação diária com dose de 31,5 Jcm<sup>-2</sup>), não houve aumento significativo na área trabecular neo-formada, quando comparada às tíbias controles, não irradiadas (Tabela 2). Por outro lado, as tíbias submetidas às irradiações diárias com doses de 94,5 Jcm<sup>-2</sup>, durante 14 dias, mostraram um decréscimo (não significativo) na área das trabéculas neoformadas, quando comparadas ao grupo controle (Tabela 2), mas a comparação feita entre os grupos irradiados, com dose de 94,5 Jcm<sup>-2</sup>, durante 7 e 14 dias, indica que a área do osso trabecular neo-formado foi significativamente maior no primeiro período. A comparação entre as tíbias controles não irradiadas no 8<sup>o</sup> e 15<sup>o</sup> dia após a lesão revelaram um aumento no osso trabecular no último período.



**Figura 1-** Secções de tecido ósseo de tíbias de animais controle, no 8<sup>o</sup> e 15<sup>o</sup> dia após a lesão (A e B, respectivamente), coradas pela técnica de Picrosirius-Hematoxilina, fotografadas sobre um campo de luz convencional. Em A e B observa-se osso intacto (I) (osso secundário), trabéculas neo-formadas (t), compartimento da medula óssea (b) e as cabeças de setas apontam os osteócitos. Note em B a espessura das trabéculas (t) e o arranjo epitelióide dos osteoblastos (O). Barra de escala = 50  $\mu$ m (A e B)

As imagens histológicas dos cortes corados por Picrossirius-Hematoxilina nos locais das lesões nas tíbias do grupo controle, no 8<sup>o</sup> e 15<sup>o</sup> dia após a lesão, são apresentadas na Figura 1A e 1B. Pode-se observar que nas tíbias que receberam irradiação por laser, durante 7 dias (5 min ou 15 min de exposição diária), os osteoblastos e osteócitos tenderam ao alinhamento tanto na periferia como dentro da trabécula, respectivamente. Houve também um aumento na celularidade do compartimento intertrabecular do osso medular. Estes achados são sugestivos de aumento no metabolismo do tecido. O aumento na celularidade resultou de um aumento do número de fibroblastos ativos (Fig. 2 A) e de uma afluência de células inflamatórias migratórias (Fig. 2B). A proliferação dos vasos sanguíneos foi observada em tíbias irradiadas por 7 dias (Fig. 2 A), os quais não foram tão evidentes nos correspondentes controles. Um outro achado importante foi o aparecimento de um grande número de osteoclastos basófilos ativos ao redor dos septos ósseos nas tíbias irradiadas por 7 dias (Fig. 2A), os quais não foram observadas abundantemente nos controles. Os osteoclastos também foram freqüentemente observados no grupo irradiado por 14 dias (Fig. 2 B), mas foram raramente encontrados nas tíbias não irradiadas do grupo controle (Figuras 1A e 1B).

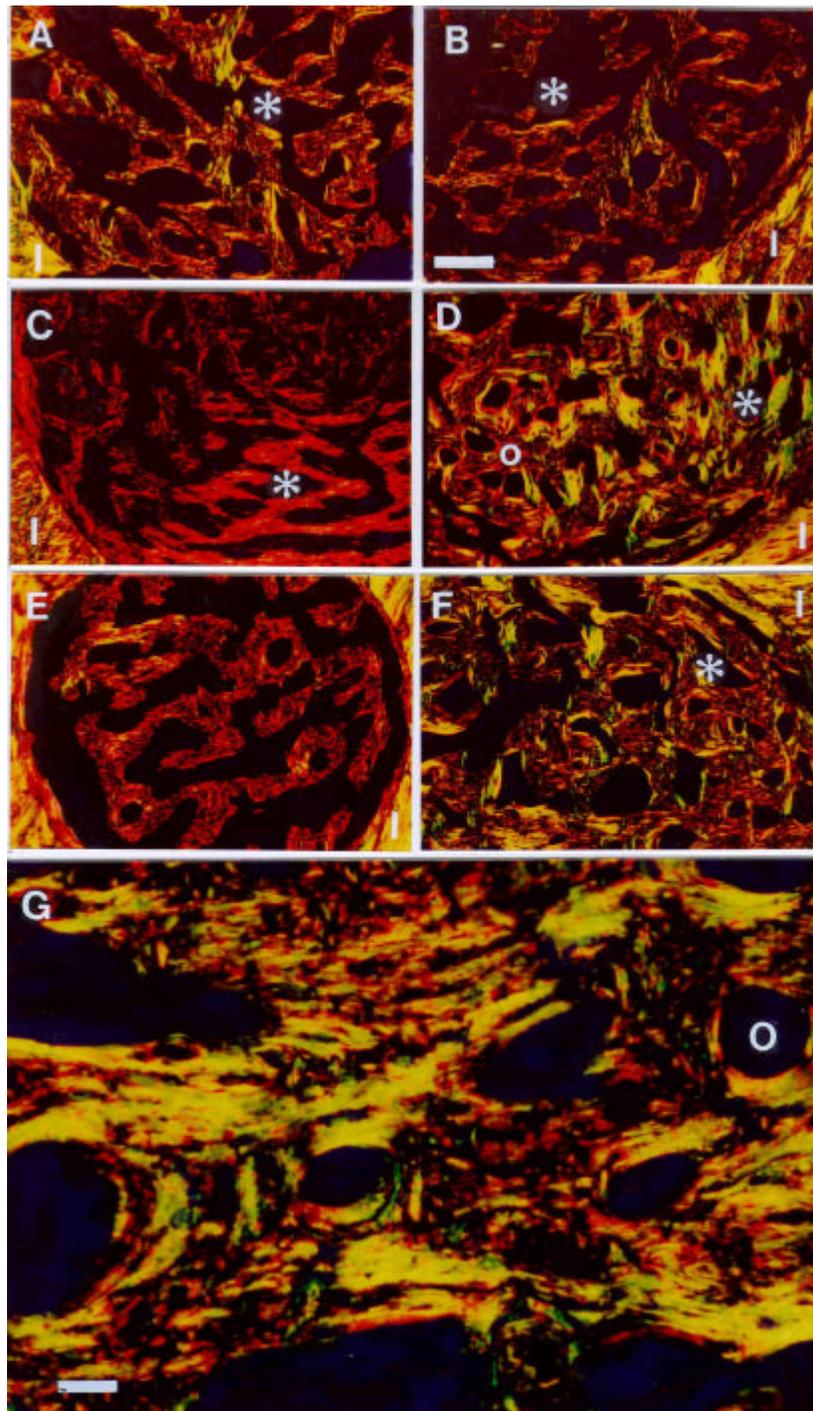
Estes resultados também são consistentes com a análise das amostras pelo método de Polarização-picrossirius. Os resultados do método de Polarização-picrossirius demonstraram que a organização das fibras colágenas nos grupos irradiados (14 dias durante 5 min e 15 min, com doses de 31,5 e 94,5 Jcm<sup>-2</sup>, respectivamente), (Figuras 3 D e 3 F) foi melhorada, quando comparada às dos grupos controle no 8<sup>o</sup> e 15<sup>o</sup> dia após a lesão (Figuras 3 C e 3 E). A melhora na organização das fibras colágenas foi vista com o aumento das áreas coloridas (áreas trabeculares amareladas, avermelhadas ou esverdeadas).



**Figura 2** – Detalhes de osso primário neo-formado corado pela técnica de tricrômio de Masson, após irradiações diárias com laser de HeNe: Em A, tíbia irradiada por sete dias com dose de  $94,5 \text{ Jcm}^{-2}$  e em B, tíbia irradiada por 14 dias com dose de  $31,5 \text{ Jcm}^{-2}$ . As fotomicrografias mostram em A, osteoblastos (cabeça de seta) e osteoclastos (setas) engajados ativamente na síntese e remodelamento ósseo, respectivamente e em B, aumento da celularidade (células inflamatórias) no compartimento da medula óssea e trabéculas ósseas (T).  
 Barra de escala =  $20 \mu\text{m}$  (A e B)

Embora em todos os grupos de ratos estudados a regeneração óssea tenha sido do tipo imaturo (Figuras 3 (A – G)), ocorreram diferenças na organização das fibras colágenas entre os grupos. Em tíbias irradiadas por 14 dias, especialmente aquelas que receberam dose de 31,5 Jcm<sup>-2</sup> (Figura. 3 D) e 94,5 Jcm<sup>-2</sup> (Figuras 3 F e 3 G), as fibras colágenas apresentaram um arranjo muito próximo ao lamelar, o qual é característico de osso secundário. Além disso, feixes espessos, formadores de fibras colágenas foram estruturados ao redor de pré-canais de *Havers*, ou nos precursores do sistema intersticial da matriz do osso maduro (Figuras 3 D, 3 F e 3G). Em contraste, nos animais do grupo de controle foram observadas fibras esponjosas de osso com fibras finas de colágeno, as quais não estavam organizadas, isto é, as fibras mantinham o arranjo irregular típico ao do osso primário imaturo (Figura 3 A e 3 B). Além disso, o compartimento medular ósseo foi maior nos animais do grupo controle e vice-versa, em relação à área trabecular neoformada.

O método de Polarização-picrossirius revelou que, independentemente da dose utilizada (31,5 Jcm<sup>-2</sup> ou 94,5 Jcm<sup>-2</sup>), após 14 dias de irradiação, alguns ósteons estavam muito mais alinhados (Figuras 3 D, 3 F e 3 G) quando comparados aos animais do grupo controle (Figuras 3A e 3 B) ou nos animais após 7 dias de irradiação (Figuras 3 C e 3 E). Nos animais irradiados por 14 dias, a dose diária de 31,5 Jcm<sup>-2</sup> produziu regiões de tecido de regeneração com espessas fibras colágenas vistas com uma birrefringência avermelhada (Figura 3 C), mas com um arranjo típico de osso primário, isto é, um arranjo lamelar espacial não concêntrico. Com a aplicação da dose de 94,5 Jcm<sup>-2</sup> durante 7 dias, as fibras colágenas apesar de constituírem bandas mais finas que a dose de 31,5 Jcm<sup>-2</sup>, apresentaram uma tendência à formação do sistema Haversiano (Figura 3 E). O método de Polarização por picrossirius também mostrou que as fibras colágenas do tipo I da matriz óssea, as quais têm uma birrefringência avermelhada ou amarelada, constituem a maioria da matriz óssea nas tíbias irradiadas (Figuras 3 (C - G)), tanto no local da lesão como no osso intacto (não lesado). Esta característica, entretanto, não foi evidente no local da lesão nas tíbias dos animais de controle (Figuras 3 A e 3 B). A birrefringência de coloração esverdeada a qual foi provavelmente causada pela presença de finas fibras do colágeno tipo III e ou por fibras moleculares de colágeno agregadas, foi predominante nas tíbias irradiadas por 14 dias (Figuras 3 D, 3 F e 3 G).



**Figura 3** - Fotomicrografias de Picrossirius-polarização típica de tecido ósseo. A e B, animais controle 8 e 15 dias após a lesão, respectivamente; C e E animais irradiados por 7 dias com doses de 31,5 e 94,5  $\text{Jcm}^{-2}$ , respectivamente; D, F e G animais irradiados por 14 dias com doses de 31,5 D e 94,5  $\text{Jcm}^{-2}$  F e G. Observe em A e B zonas de birrefringência amareladas e avermelhadas mais finas, e compartimento medular ósseo (\*) maior que nas tíbias irradiadas, considerando que o osso intacto (I) das zonas da periferia é fortemente birrefringente. Em C e E, a birrefringência avermelhada e o início da formação dos canais de *Havers* estão presentes. Em D, F e G houve aumento na organização lamelar da matriz óssea (birrefringência amarelada), e um estágio crescente na formação de ósteons (O) estavam presentes com um número de canais de *Havers* bem definido. Barra de escala = 100  $\mu\text{m}$  (A-F); 50  $\mu\text{m}$  (G).

## 4. Discussão

O método de Polarização-picrossirius combinado a morfometria auxiliada por métodos computacionais provou ser bastante útil para analisar os benefícios da ação do laser na regeneração óssea, também permitindo analisar a correlação da organização estrutural das fibras de colágeno, como também relataram outros autores [17, 18], com o aumento da área do osso primário (trabecular). Os parâmetros histológicos adicionais utilizados também permitiram observar uma melhor evolução do processo de regeneração do tecido ósseo lesado, após a irradiação por raio laser. O método de Polarização-picrossirius tem sido utilizado para a detecção de fibras de colágeno do tipo I, II e III [13], e também como um possível indicador da agregação das moléculas de colágeno [11, 13]. A cor e intensidade da birrefringência do colágeno variam de acordo com o diâmetro da fibra, espessura do corte do tecido ou ambos [11, 13]. A vantagem deste método está na capacidade de revelar a organização tridimensional das fibras colágenas, que são os principais componentes do tecido ósseo.

As tonalidades birrefringentes de amarelo para vermelho, indicativos de organização densa e paralela das fibras colágenas, foram detectadas nas secções com espessura de 5  $\mu\text{m}$ , em tíbias irradiadas. Esta coloração é indicativa de fibras colágenas do tipo-I, as quais são típicas de osso maduro, que adquiriram uma disposição de maturidade na matriz do osso neo-formado. Este arranjo lamelar das fibras colágenas foi atribuído ao efeito estimulante da irradiação de laser. Este efeito torna-se mais evidente quando as trabéculas neo-formadas, de ratos irradiados por 7 ou 14 dias com doses de 31,5  $\text{Jcm}^{-2}$  e 94,5  $\text{Jcm}^{-2}$ , são comparadas aos animais controle, pois foi claramente observado um aumento da organização paralela das fibras colágenas da matriz óssea. Estes achados sugerem que a energia laser nas doses utilizadas neste trabalho (exceto 3,15  $\text{Jcm}^{-2}$ ), foi eficaz para melhorar o arranjo das fibras colágenas.

A organização espacial das fibras colágenas vistas aqui, as quais usualmente precedem o arranjo lamelar típico das fibras colágenas do osso secundário, já estão presentes em osso trabecular primário, como demonstrado por Marotti [19, 20].

A presença de birrefringência esverdeada (indicativa da presença de fibras finas de colágeno do tipo-III - o primeiro tipo que aparece durante a formação e/ou renovação

óssea) em tíbias irradiadas pode indicar que osteoblastos estão sendo estimulados para produzir a maioria das fibras da matriz óssea das tíbias irradiadas, o que explica a presença de novas fibras.

Outra possibilidade seria que a irradiação laser estimulou os osteoclastos, engajados na absorção, e que estes promoveram a hidrólise de fibras para produzir uma pequena concentração de colágeno. Isto pode ter permitido uma estreita interação entre o corante vermelho *Sirius* e as fibras colágenas.

Como o colágeno é constituído basicamente por proteínas, ele reage fortemente com o ácido do *Sirius red* para aumentar a birrefringência normal das fibras. [11]. As moléculas do colágeno do tipo I, possuem grandes quantidades de grupos aminos disponíveis para reagirem com o corante, e por isso fibras contendo este tipo de colágeno mostram forte birrefringência.

Outros resultados indicam que, em adição ao aumento da organização das fibras de colágeno, a aplicação do laser acelerou também o arranjo das fibras de colágeno do tipo I quando comparadas aos controles, particularmente após 14 dias de irradiação. Em paralelo com as alterações qualitativas, a análise morfométrica mostrou que o máximo crescimento ósseo ocorreu nos animais irradiados por 7 dias.

Nos animais irradiados por 14 dias com dose de  $31,5 \text{ Jcm}^{-2}$  não foram observados aumentos significantes no crescimento ósseo quando comparados aos grupos controle, tendo ocorrido também um pequeno decréscimo, não significativo, no crescimento ósseo, quando comparado ao grupo irradiado por 7 dias, com a mesma dose. Nos animais irradiados com dose de  $94,5 \text{ Jcm}^{-2}$  também ocorreu um decréscimo (não significativo) no crescimento ósseo, quando comparado ao grupo controle, e uma diminuição significativa da área trabecular, quando comparada ao grupo irradiado por 7 dias com a mesma dose, sugerindo uma possível alteração dos efeitos do laser nos processos de regeneração durante a segunda semana de tratamento. Esta interpretação está baseada no aumento significativo da área óssea trabecular ( $p \leq 0,05$ ) dos animais do grupo controle de 15 dias após a lesão, quando comparado ao grupo controle com 8 dias de lesão .

A área trabecular também foi significativamente menor ( $p \leq 0,05$ ) no grupo irradiado por 14 dias com dose de  $94,5 \text{ Jcm}^{-2}$ , quando comparada ao grupo irradiado por 7 dias com a mesma dose.

Estes achados apontam uma sólida indicação de que as alterações provocadas pelos efeitos da irradiação com laser promovem uma ação estimulante no crescimento ósseo na primeira semana e uma ação inibitória na segunda semana. Estes resultados vão de encontro aos relatos de Barushka *et al.* [21] e Yaakobi *et al.* [22], os quais mostraram que a fração do volume do osso trabecular, a atividade da fosfatase alcalina e do cálcio contidos no local da lesão diminuíram mais rapidamente com o tempo de exposição à irradiação com laser de HeNe, nas tíbias irradiadas por laser, quando comparadas aos controles.

Nossos resultados também coincidem com os encontrados por Barushka *et al.* [21], em relação ao tempo de irradiação, onde longos períodos (15 min) não aceleram o processo de reparo (aumento de área), comparados a pequenos períodos (5 min). Em nosso modelo experimental, um longo período de irradiação acelerou a organização paralela de fibras colágenas e o aparecimento de um tipo de tecido semelhante a um sistema Haversiano na matriz óssea.

Deve ser considerado que um duplo mecanismo pode estar envolvido na interação da irradiação eletromagnética do laser com os processos de regeneração que ocorrem na tíbia. O primeiro mecanismo deve estar relacionado provavelmente com a ativação de osteoblastos para produção de matriz óssea. Num estágio seguinte, um mecanismo fotobiológico inibitório poderia diminuir a atividade osteoblástica, envolvida na produção de matriz.

A irradiação com laser de baixa potência também poderia estar concomitantemente estimulando a atividade osteoclástica, promovendo assim a reabsorção e o remodelamento ósseo. É provável que o momento de aparecimento de osteoclastos coincida com o pico da atividade osteoblástica, quando a área trabecular é a maior e a formação do novo osso está sendo equilibrada pela absorção óssea. Esta hipótese é coerente com a observação de que os osteoblastos ativos estão dispostos em um alinhamento epitelial na periferia da trabécula óssea, nas tíbias irradiadas com laser no 8<sup>o</sup> e 15<sup>o</sup> dia depois da lesão óssea, conforme vimos no exame histológico.

A osteoclastogênese e a atividade osteoclástica podem ser reguladas pelas células osteoblásticas vindas da membrana molecular para o controle hormonal local ou sistêmico da reabsorção óssea [23], e as células osteoblásticas semelhantes podem secretar simultaneamente fatores osteolíticos e osteoblásticos de diferenciação *in vitro*. Também já

foi observado um aumento na proliferação de fibroblastos, em cultura, irradiados por laser de baixa potência [9, 24 -27].

Como o suprimento sanguíneo ou a neovascularização interferem nos processos biológicos proliferativos e regenerativos, é plausível que a irradiação laser possa interferir na neoformação de vasos sanguíneos, conforme sugerido por Barushka *et al.* [21]. Em concordância com esta hipótese, os vasos sanguíneos observados nas tíbias dos grupos de animais irradiados por 7 dias foram muito mais numerosos do que os observados tanto no grupo de controle como nos animais irradiados por 14 dias consecutivos. Este último período coincide com a fase estacionária ou da diminuição do crescimento trabecular, mas de melhora na organização lamelar das fibras colágenas, de aumento da celularidade das células da medula óssea e de aumento na atividade osteoclástica. O aumento da angiogênese também foi observado na regeneração do músculo gastrocnêmio [28-30].

Conclui-se que a irradiação do laser de baixa potência acelerou a velocidade de consolidação de lesão de tíbia produzida cirurgicamente. Estes resultados reforçam observações prévias (Capítulo II) utilizando o mesmo modelo experimental [10], nos quais cortes histológicos corados pela técnica de Schmorl e análise por microscopia eletrônica de varredura foram utilizados para estudar os efeitos da irradiação do laser de baixa potência na osteogênese no processo de regeneração de tíbias de ratos. O aumento da área trabecular na primeira semana e decréscimo na segunda semana de aplicações do laser pode ser consequência do aumento ou decréscimo na formação óssea osteoblástica, do aumento na reabsorção osteoclástica [31], ou com a combinação de ambos mecanismos. São necessárias ainda pesquisas complementares para esclarecer os mecanismos envolvidos na foto-modulação do laser de HeNe no equilíbrio dos mecanismos de excitação osteoblásticos e osteoclásticos. Avanços na elucidação desta questão fundamental podem contribuir para que o laser de baixa potência possa ser futuramente uma ferramenta promissora para a pesquisa da regeneração óssea.

## 5. Referências

1. A.O. Cvitanic, J. Schimandle, G.D. Casper and P.F.J. Tirman, *Am. J. Roentg.* **174** (2000) 363.
2. M. Haedersdal, *Acta Dermat Vener., Suppl* **207** (1999) 5.
3. X.M. Tang and B.P. Chai, *Lasers Surg. Med.* **6** (1986) 346.
4. M.L. Walter, M.E. Domes, R.A. Diller, J. Sproedt and U.H. Joosten, *Lasers Surg. Med.* **25** (1999) 153.
5. A. Bibikova and U. Oron, *Anat. Rec.* **241** (1995) 123.
6. M.R. Guerino, V. Baranauskas, A.C. Guerino and N. Parizotto, *Appl. Surface Sci.* **154-155** (2000) 561.
7. G.K. Reddy, L. Stehno-Bittel and C.S. Enwemeka, *Lasers Surg. Med.* **22** (1998) 281.
8. M. Usuba, M. Akai and Y. Shirasaki, *Lasers Surg. Med.* **22** (1998) 81.
9. C. Webb, M. Dyson and W.H.P. Lewis, *Lasers Surg. Med.* **22** (1998) 294.
10. I.G.F. Freitas, V. Baranauskas and M.A. Cruz-Höfling, *Appl. Surface Sci.* **154-155** (2000) 548.
11. G.B. Andrade, G.S. Montes, G. M. S. Conceição and P.H.N. Saldiva, *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **93** (1999) 265.
12. L.C.U. Junqueira, G. Bignolas and R.R. Brentani, *Histochem. J.* **11** (1979) 447.
13. L.C.U. Junqueira, G.S. Montes and E.M. Sanches, *Histochemistry* **74** (1982) 153.
14. G.S. Montes, *Cell. Biol. Int.* **20** (1996) 15.
15. S.A.A. Reid, *Anat. Embryol.* **174** (1986) 329.
16. D.L. Streiner and G.R. Norman, *Bioestatistic - The Bare Essentials*, St. Louis: Mosby – Year Book (1994) 199p.
17. G.B. Andrade, F. Riet-Correa, G.S. Montes, C.N. Battlehner and P.H.N. Saldiva, *Eur. J. Histochem.* **41** (1997) 203.
18. J.G. Pickering and D.R. Boughner, *Am. J. Pathol.* **138** (1991) 1225.
19. G. Marotti, *Ital. J. Anat. Embryol.* **101** (1996) 25.
20. G. Marotti and M.A.A. Muglia, *Arch. Ital. Anat. Embryol.* **93** (1988) 163.
21. O. Barushka, T. Yaakobi and U. Oron, *Bone* **16** (1995) 47.
22. T. Yaakobi, L. Maltz and U. Oron, *Calcif. Tissue Int.* **59** (1996) 297.
23. S. Teitelbaum, *Science* **289** (2000) 1504.

24. S.P. Nair, S. Meghji and B. Henderson, *Calcif. Tissue Int.* **52** (1993) 31.
25. R. Lubart, H. Friedmann, I. Peled and N. Grossman, *Laser Ther.* **5** (1993) 55.
26. Y. Nara, Y. Tsukamoto, S. Fukutani, N. Yamaguchi, M. Mori and T. Morioka, *Lasers Life Sci.* **4** (1992) 249.
27. W. Yu, J.O. Naim and R.J. Lanzafame, *J. Photochem. Photobiol. B* **59** (1994) 167.
28. A. Bibikova, V. Belkin and U. Oron, *Anat. Embryol.* **190** (1994) 597.
29. A. Bibikova and U. Oron, *Anat. Rec.* **235** (1993) 374.
30. M. Boulton and J. Marshall, *Lasers Life Sci.* **1** (1986) 125.
31. K. Kawasaki and N. Shimizu, *Lasers Surg. Med.* **26** (2000) 282.

## Capítulo IV

### Observação por Microscopia de Força Atômica da Estrutura da Matriz Óssea e Zonas de Regeneração em Tíbias de Ratos

#### **1. Introdução**

Estudos morfológicos do processo natural de remodelamento ósseo, especialmente após lesão, são de grande importância científica para o entendimento do processo de regeneração que envolve a ação de osteoblastos (responsáveis pela produção da matriz óssea) e osteoclastos (células de reabsorção óssea) na síntese do tecido ósseo. Desta maneira, os processos são altamente complexos, visto que mecanismos reguladores e sinalizadores como hormonais podem acelerar ou retardar a regeneração óssea [1-4]. Vários estudos estão em andamento para promover o reparo ósseo através de implantes [5], tratamento hormonal [6], terapia genética [7] e irradiação por raio laser [8]. Entretanto, é da maior importância ter um conhecimento morfológico microscópico do processo natural da regeneração óssea, para uma melhor avaliação e tratamentos, como também a obtenção de novos parâmetros no mecanismo de remodelamento ósseo.

Neste Capítulo, estudou-se o remodelamento natural do tecido ósseo após lesão, utilizando a técnica de microscopia de força atômica (MFA) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). A microscopia de força atômica vem como um novo instrumento para investigação de amostras biológicas, sem a necessidade de colorações, coberturas, desidratações ou meio a vácuo, abrindo a possibilidade de investigar a estrutura do tecido ósseo sobre novas condições fisiológicas com excelente resolução [9-12]. Neste capítulo analisou-se comparativamente a estrutura da matriz óssea de tíbias de ratos em regiões intactas, não lesadas cirurgicamente e em regiões submetidas a lesões cirúrgicas.

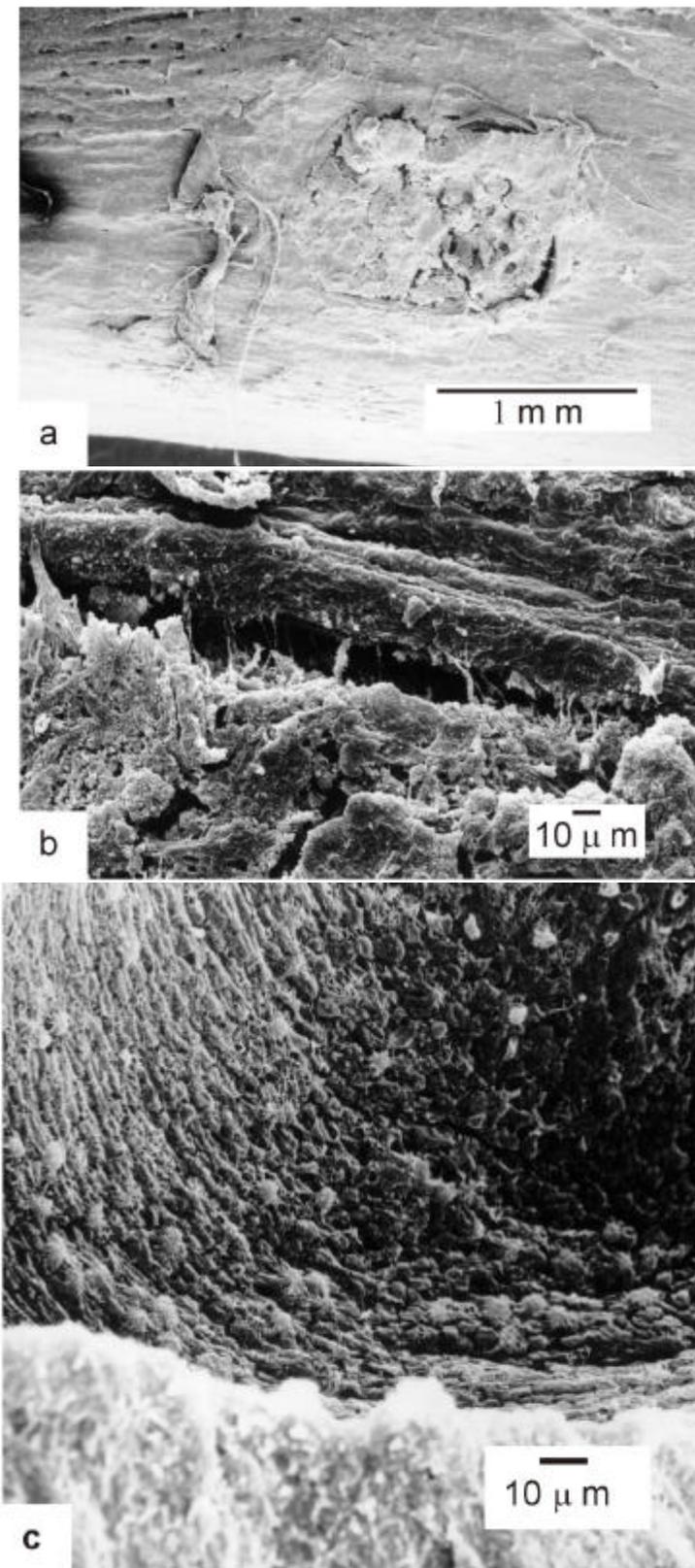
## 2. Materiais e Métodos

O experimento foi realizado utilizando-se de 36 *Rattus norvegicus albinus*, machos, linhagem *Wistar* com peso corporal variando entre 250-300 g, com 75 dias de idade. Após anestesia com pentobarbital sódico, uma pequena incisão foi feita na pele dos animais, para expor a face ântero-medial da tíbia. Um furo de 1,6 mm de diâmetro foi feito em apenas uma das corticais da tíbia, utilizando-se broca de uso odontológico. Os animais de cada grupo foram sacrificados com dose excessiva de anestésico, após 8 e 15 dias ocorrida a lesão. As tíbias lesadas foram imediatamente removidas, dissecadas e fixadas em solução formol 10% por 24 h. Após descalcificação, parte das tíbias contendo parte da área óssea intacta e a área da lesão (n = 18) foram selecionadas e desidratadas através de séries crescentes de álcool, secas através do método de ponto crítico utilizando CO<sub>2</sub> líquido, recobertas com ouro e fixada em suporte para serem analisadas em um microscópio de força atômica (MEV) Jeol JXA 840 A com aceleração de voltagem de 20 kV.

Para obtenção das imagens no microscópio de força atômica (NanoScope II AFM), as porções contendo osso intacto e o local da lesão (n = 18) foram fixadas sobre uma lamínula de metal. Para análise comparativa, foram feitas imagens em ambas regiões do tecido ósseo, tanto no osso intacto como no tecido em regeneração após a lesão.

## 3. Resultados e Discussão

A Figura 1 (a) mostra imagem macroscópica (MEV) de tíbia de rato, contendo na parte central o local da lesão após 8 dias de regeneração. Pode ser observado que a área do calo ósseo (tecido ósseo primário imaturo formado temporariamente para reparar a lesão) está em processo de preenchimento com tecido neo-formado, e que, neste período, encontram-se alguns espaços vazios entre o local da lesão e o osso intacto.



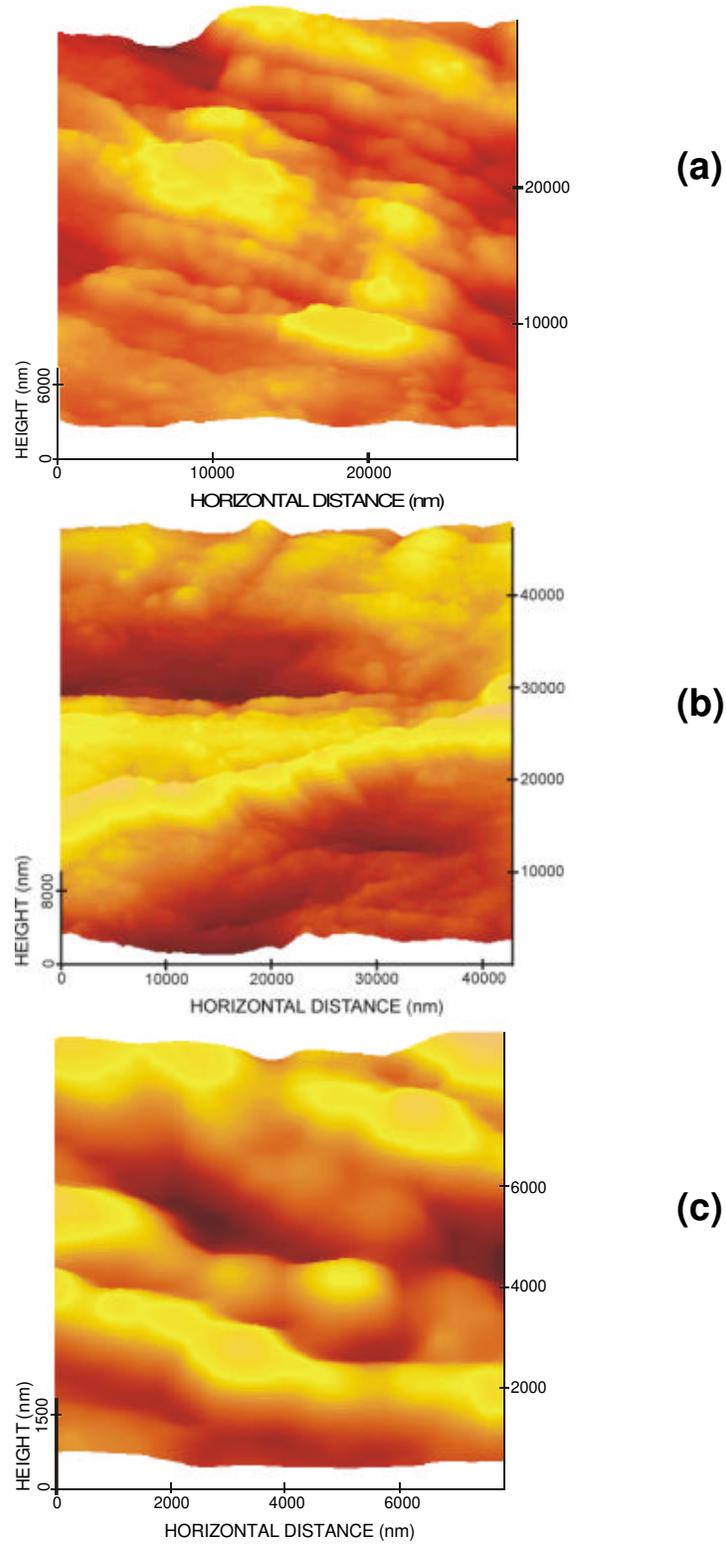
**Figura 1-** Micrografia típica de MEV de tíbia de rato; (a, b) oito dias após a lesão e (c) quinze dias após a lesão. Note que o tecido ósseo em regeneração está na parte superior. O preenchimento do calo no local da lesão e zonas de áreas intactas são comparados.

Em nossas amostras, apenas uma das corticais da tíbia foi lesionada para preservar as células da medula óssea responsáveis pela produção de osteoblastos [13]. Ampliação da interface entre o osso neo-formado e osso intacto estão presentes na Figura 1 (b) e (c) após 8 e 15 dias à lesão, respectivamente. Em ambas imagens, a área intacta do tecido ósseo está na parte inferior da figura. Pode ser visto que a regeneração do tecido ósseo está ocorrendo por um aumento na formação de fibras colágenas mais ordenadas.

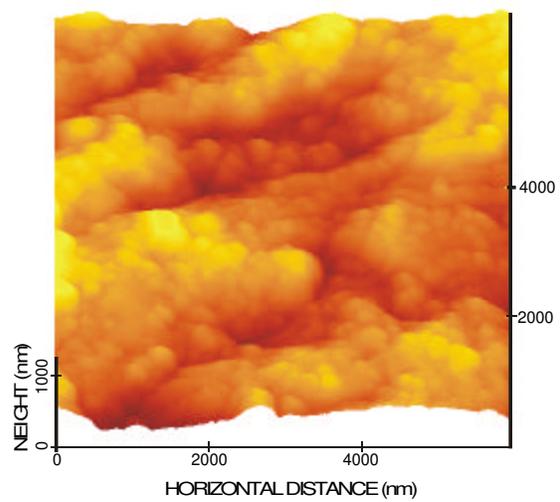
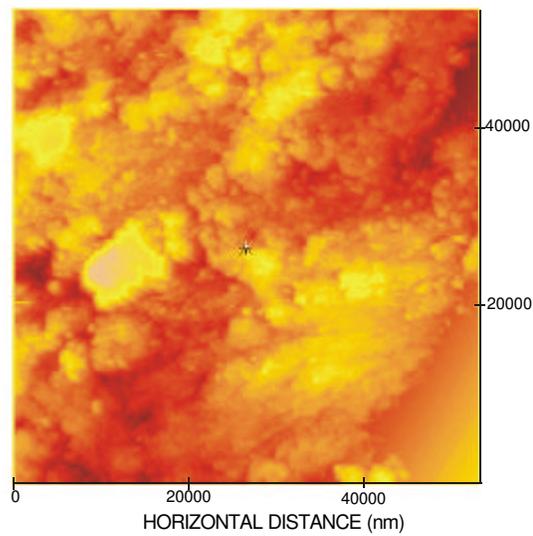
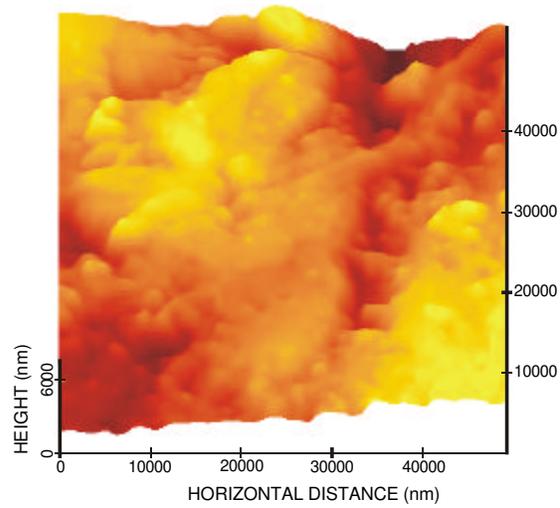
Algumas fibras colágenas bem definidas e células osteoblásticas são claramente vistas na parte superior da Figura 1 (c). O tecido ósseo consiste basicamente de proteínas colágenas do tipo I (> 90%) [14] e outras proteínas contendo uma fase mineral substituída por hidroxiapatita, mas como nossas amostras são desmineralizadas, não há componentes de hidroxiapatita nas imagens captadas. Detalhes tridimensionais do aspecto da superfície óssea foram revelados pela microscopia de força atômica. A Figura 2 (a), (b) e (c), obtida por microscopia de força atômica mostra imagens típicas de tecido ósseo intacto, em diferentes magnitudes. Pode se observar uma organização mais paralela dos feixes de colágeno e detalhes de bandas de colágeno periódicas existentes ao longo do eixo longitudinal das fibras em toda imagem. Estes efeitos são devido ao arranjo das fibrilas de colágeno as quais constituem as fibras de colágeno do tipo I da matriz óssea.

A Figura 3 (a), (b) e (c) mostra imagens obtidas pelo microscópio de força atômica da área de regeneração do tecido ósseo, após 8 dias de lesão. Aparentemente houve um progresso no processo de reparo tecidual, mas a organização natural da matriz óssea não foi alcançada neste período

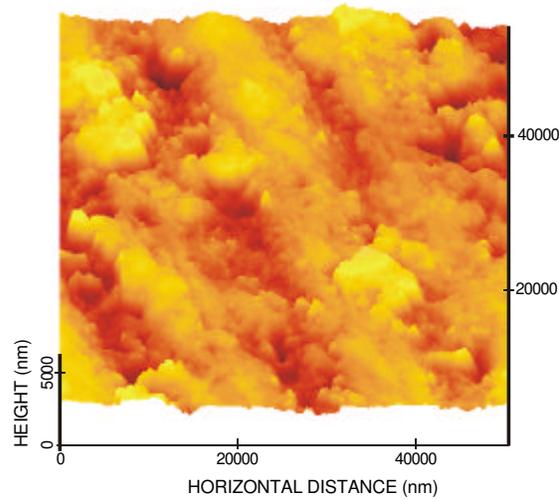
A Figura 4 (a), (b) e (c) mostra imagens de tecido ósseo em regeneração no 15º dia após a lesão, obtidas por microscopia de força atômica. Grossos feixes de fibras colágenas são observados na superfície do tecido cortical, indicando que o remodelamento ósseo natural do rato está alcançando uma estrutura semelhante a do tecido ósseo intacto. A figura 4 (b) apresenta imagem tridimensional obtida por MFA, feita da borda lateral da fibra, mostrando sua orientação. Maiores aumentos desta estrutura (Figura 4 (c)) mostram que as fibras colágenas exibem uma boa orientação, se assemelhando a feixes de fibras colágenas de tecido ósseo maduro (secundário). Secções transversais mostrando o perfil da amplitude das fibras, são vistos na Figura 5 (a), e uma representação bi-dimensional da análise derivada de *Fourier* está representada na Figura 5 (b). Os resultados mostram que o diâmetro estático das fibras de 159 nm está de acordo com os valores encontrados na literatura para fibras colágenas do tipo I [12].



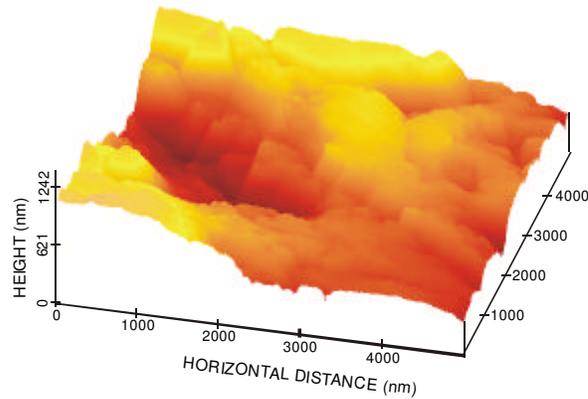
**Figura 2 - (a, b, c)** - Imagens de MFA de diferentes magnitudes de osso intacto, mostrando a morfologia tridimensional da superfície.



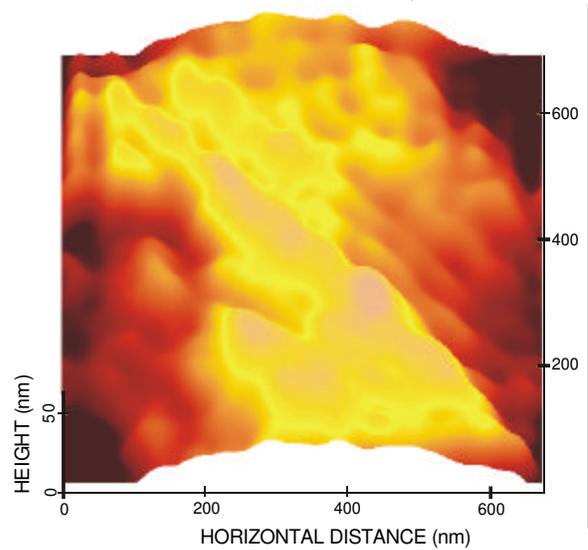
**Figura 3 - (a, b, c) -** Imagens da MFA feitas da superfície óssea da área de remodelamento no oitavo dia após a lesão.



(a)

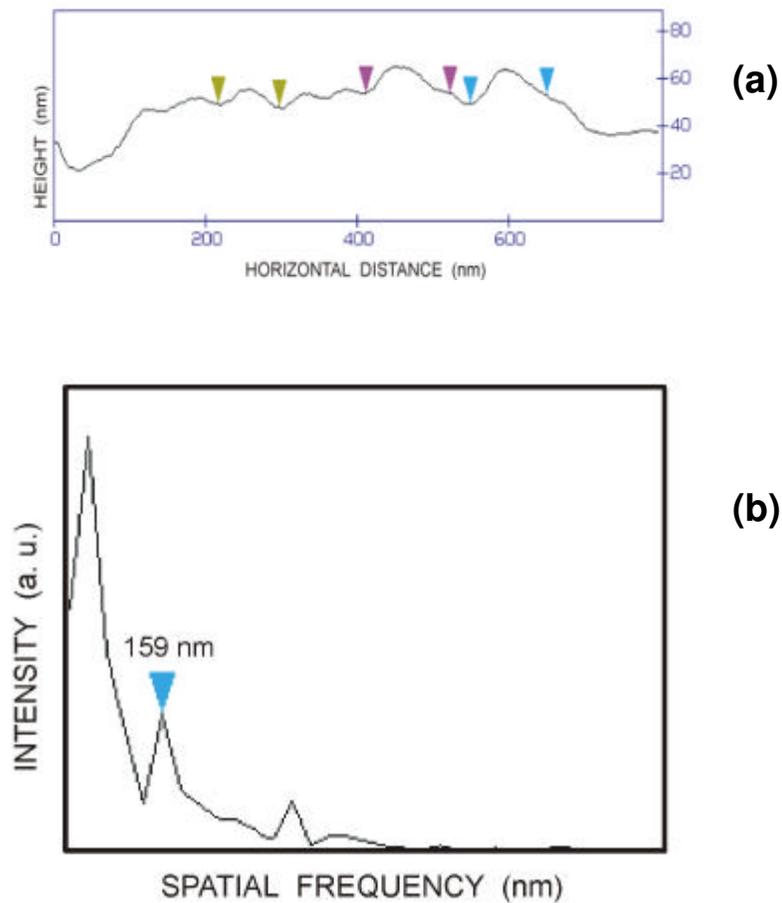


(b)



(c)

**Figura 4 - (a, b, c)** - Imagens obtidas do MFA, mostrando melhora na orientação das fibras colágenas na matriz óssea no 15<sup>o</sup> dia após a lesão. Em (a), feixes de fibras colágenas são observados numa visão panorâmica. Observe em (a) e (c) detalhes em 3-D da orientação das fibras. A figura (b) mostra as laterais das fibras entre os feixes em (c) observa-se em maior aumento imagem de feixes paralelos típicas de fibras colágenas de tecido maduro.



**Figura 5** - (a) Secção transversal mostrando um arranjo paralelo das fibras colágenas, (b) transformada de *Fourier* mostrando bi-dimensionalmente que o diâmetro estático das fibras é de 159 nm, de acordo com valores encontrados na literatura (124 -170 nm).

O uso do microscópio de força atômica (MFA) de resolução molecular permitiu observar imagens topográficas do remodelamento natural do tecido ósseo, com a vantagem de permitir correlacionar com a arquitetura tridimensional das imagens obtidas pela microscopia eletrônica de varredura. Estas observações revelaram que a MFA pode ser um instrumento valioso no estudo de alterações estruturais na organização das fibras colágenas, tanto em condições fisiológicas (crescimento ou envelhecimento) como em condições patológicas (doenças ou traumas), ou sobre agentes exógenos benéficos ou maléficos que influenciam no processo de remodelamento ósseo.

## 4. Conclusão

Utilizando microscópio eletrônico de varredura e de força atômica, comparou-se a organização da matriz de osso intacto com a reorganização fisiológica do tecido ósseo no 8<sup>o</sup> e 15<sup>o</sup> dia, após lesão feita cirurgicamente. Quinze dias após a lesão, pode-se observar que as fibras colágenas adquiriram uma estrutura mais organizada, disposta em feixes paralelos na matriz óssea, característica de tecido ósseo secundário. Imagens de MFA com arranjo espacial tridimensional revelaram a transição macromolecular da morfologia da matriz óssea em regeneração para estruturas características de osso maduro. Estruturas lamelares foram observadas, mas não foi possível a observação de periódicos feixes colágenos, usualmente presentes neste período.

## 5. Referências

1. S.C. Manolagas, *Aging-Clinical Exp. Res.* **10** (1998) 182.
2. G.A. Rodan and T.J. Martin, *Science* **289** (2000) 1508.
3. I.A. Silver and R.J. Murrills, *Etherington. Exp. Cell Res.* **175** (1998) 266.
4. G.A. Rodan, *Bone* **20** (1997) 1.
5. B.M. Sandmair, R. Sorb, J. Kniley, W. Hardy, M. Black, A. Moseley and R. Deans, *Blood* **92** (1998) 473.
6. K. Michaelsson, J.A. Baron, B.Y. Farahmand, O. Jochenll, C. Magnusson, P.G. Persson, I. Persson and S. Ljunghall, *British. Med. J.* **316** (1998) 1858.
7. J. Bonadio, E. Smiley, P. Patil and S. Goldstein, *Nature Med.* **5** (1999) 753.
8. I.G.F. Freitas, V. Baranauskas and M.A.Cruz-Höfling, *Appl. Surf. Sci.* **154-155** (2000) 548.
9. G. Binnig, C.F. Quate and C. Gerber, *Phys. Rev. Lett.* **56** (1986) 930.
10. J. Yang, Z. Shao, *Micron* **26** (1995) 35.
11. H.R. Wickramasinghe, *Acta Mater.* **48** (2000) 347.

12. V. Baranauskas, B.C. Vidal and N.A. Parizotto, *Appl. Biochem. Biotech.* **69** (1998) 91.
13. P. Ducy, T. Schinke and G. Karsenty, *Science* **289** (2000) 1501.
14. S L Teitelbaum, *Science* **289** (2000) 1504.

## Capítulo V

# Análise por Microscopia de Força Atômica da Estrutura da Matriz Óssea em Regeneração de Tíbias de Ratos Após Estimulação com Laser de Baixa Potência

### 1. Introdução

A utilização de novas técnicas de interferência nos processos biológicos naturais, conjuntamente com o emprego de novas técnicas instrumentais para quantificar estas diferenças, tem avançado a nossa compreensão sobre os complexos mecanismos que estão envolvidos nos fenômenos biológicos. O osso é um exemplo de um importante sistema biológico que requer estudos mais aprofundados para analisar e entender a cascata de processos complexos que estão envolvidas na regeneração óssea [1, 2]. Estes processos podem ser acelerados, atrasados ou mesmo interrompidos com a interferência de agentes biológicos (hormônios [2], modificação genética [2], implante de partículas [2] ou físicos (ultra-som [3], microondas [4], radiação de laser [5], micro-gravidade [6], etc.), sendo que seus efeitos na morfologia da regeneração óssea podem ser identificados por várias técnicas de obtenção de imagens sofisticadas como, por exemplo, a micro-tomografia computadorizada [7], a ressonância magnética [8], a microscopia eletrônica de varredura [9], a microscopia eletrônica de transmissão (TEM) [10], e a microscopia de força atômica [11, 12]. Cada técnica tem um potencial diferente para produzir informações gerais e específicas e a combinação de seus resultados pode fornecer informações qualitativas e quantitativas importantes para diagnosticar o processo de recuperação óssea e desta forma permitir a escolha da melhor estratégia que pode ser utilizadas nas terapias do futuro.

O diagnóstico da regeneração óssea pode ser obtido pela visualização através da MEV, da organização espacial das fibrilas formadoras de colágeno na matriz óssea, durante o desenvolvimento da ossificação, remodelamento ou eventos reparadores pós-ferimento [13]. As fibras colágenas são componentes importantes do tecido ósseo: mais de 90% do

peso seco do material orgânico é de colágeno [14], e sua arquitetura espacial se altera durante o processo de maturação óssea. A MFA é uma técnica de obtenção de imagens relativamente recente que tem a vantagem de complementar imagens obtidas pela MEV, sem a necessidade de um sistema de vácuo, o que é um procedimento mais próximo das condições fisiológicas do tecido [15]. Imagens de MFA de fibras de colágeno em tendões [16], tecidos subcutâneos [17], cartilagens [18], e tecidos oculares [19], tem sido apresentados na literatura, entretanto trabalhos descrevendo o uso da MFA como uma ferramenta de diagnóstico, tem sido escassos. Recentemente a MFA foi aplicada para a visualização tridimensional (3-D) da superfície da matriz óssea em zonas intactas e em zonas de regeneração, mas somente o processo de regeneração natural foi examinado [20].

Neste Capítulo descrevemos um estudo complementar da MEV e MFA realizado para observar e caracterizar as possíveis diferenças na regeneração óssea foto-estimulada, com o processo natural de regeneração. Foram aplicadas diferentes doses de laser de HeNe de baixa potência com o intuito de tentar modular os efeitos regenerativos de ferimentos ósseos provocados cirurgicamente na tibia de ratos. Discutiremos a seguir os resultados desta metodologia.

## 2. Materiais e Métodos

Todos os procedimentos experimentais foram realizados seguindo as diretrizes do Conselho Brasileiro de Cuidados com os Animais (COBEA). Foram utilizados ratos machos *Wistar* com massa corpórea de 250-300 g e tempo de vida médio de 75 dias (n = 24). Após anestesia com pentobarbital sódico foi realizada uma pequena incisão cirúrgica na pele dos animais para expor a superfície antero-medial da tibia direita. Em seguida com uma broca de uso odontológico foi feita uma perfuração de 1,6 mm de diâmetro na superfície cortical da tibia.

Após 24 horas a lesão, dois grupos de ratos (n = 6 por grupo) foram irradiados com laser de HeNe (1 mW,  $\lambda = 633$  nm, diâmetro do feixe  $w = 1,1$  mm). A radiação foi aplicada diariamente por 5 min ou 15 min, correspondendo as doses com densidades de energia diárias de 31,5 e 94,5 Jcm<sup>-2</sup>, para cada grupo, respectivamente (n = 6 para cada tempo de exposição). O feixe de laser foi apontado para o local do ferimento, incidindo através da

pele e perpendicularmente ao eixo longitudinal da tíbia. Os ratos de cada grupo foram sacrificados com uma overdose de anestésico no oitavo (n = 3 para cada dose) ou décimo quinto (n = 3 para cada dose) dia após cirurgia. Um grupo de 12 animais sofreu os ferimentos mas não foi irradiado com laser para servir como controle, seguindo o esquema apresentado na Tabela 1.

**Tabela 1 – Esquema de Irradiação**

Dias de sacrifício após lesão	Período de irradiação (Dias)	Tempo de irradiação	Dose (Jcm <sup>-2</sup> )	Animais irradiados	Número total de animais
8	0 (controle)	----	0,0	----	6
	7	5 min	31,5	3	
	7	15 min	94,5	3	6
15	0 (controle)	-----	0,0	----	6
	14	5 min	31,5	3	
	14	15 min	94,5	3	6
					24

Após o sacrifício dos animais, as tíbias foram imediatamente removidas, dissecadas, fixadas e desmineralizadas para expor as características organizacionais do colágeno na matriz óssea. As amostras para a MEV também foram desidratadas com etanol, secas no ponto crítico (Balzers SCD 30 – Áustria) e recobertas com um filme de ouro pulverizado (Sputter Balzers CPD 30 – Áustria). O microscópio eletrônico de varredura utilizado foi um Jeol JXA-840 (Japão), operando com a tensão de aceleração típica de 20 kV.

As análises de MFA foram realizadas utilizando um MFA NanoScope II (Digital Instruments - USA) com pontas finas montadas em microvigas de constante de força de aproximadamente 0,1 Nm<sup>-1</sup>. A rugosidade vertical das amostras (r) foi calculada medindo-se as variações de altura ao longo do plano *x-y* da área observada e então ajustando o respectivo histograma com uma função Gaussiana. As medidas quantitativas dos diâmetros

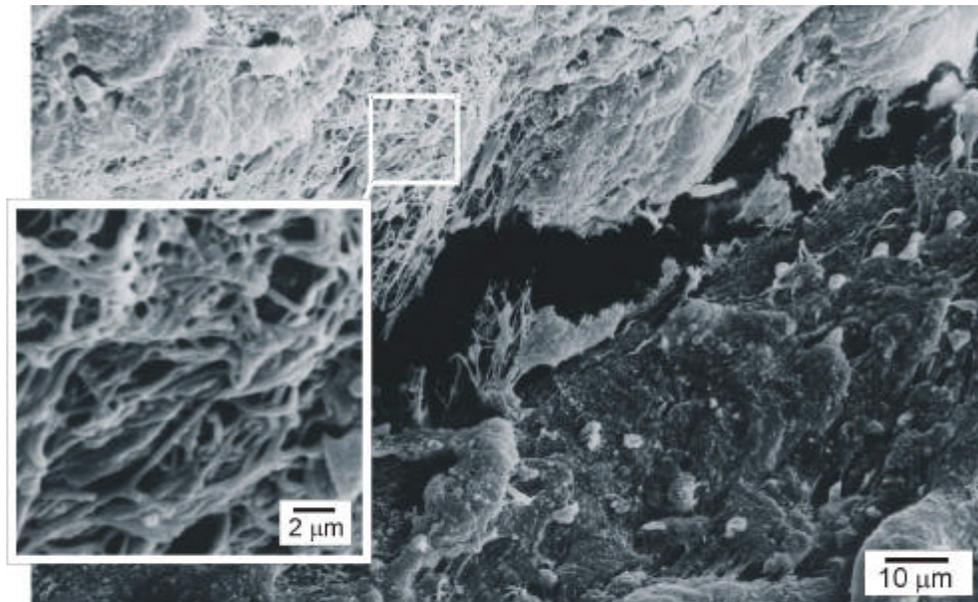
das fibras e de suas dimensões laterais foram feitas pela análise das seções transversais das mesmas e pela frequência espacial medida pela transformada de Fourier das imagens digitalizadas de MFA.

### **3. Resultados e Discussão**

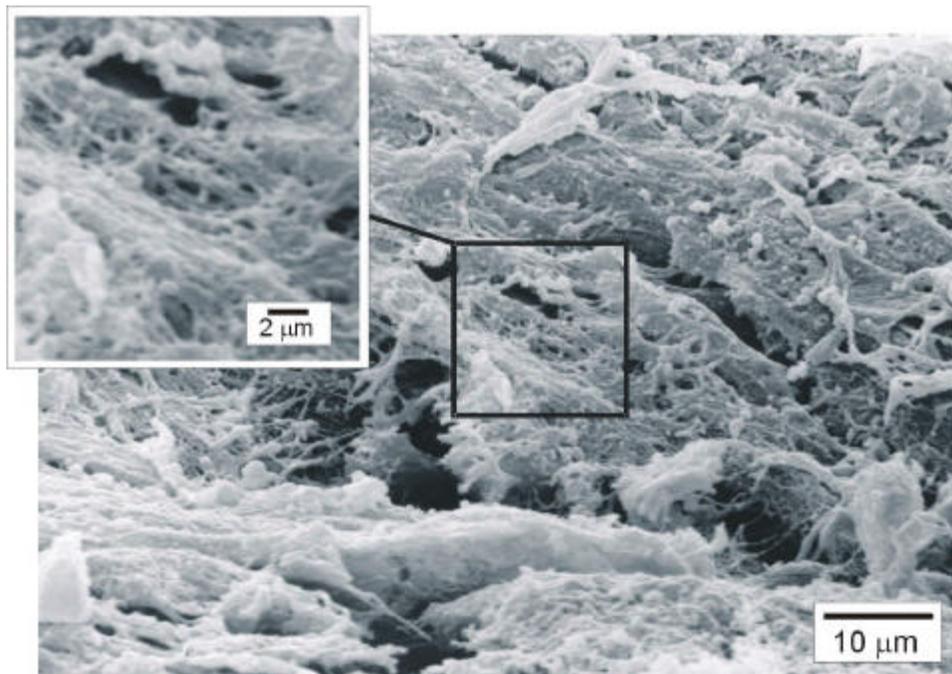
As imagens das tíbias não irradiadas com laser (Figura 1), foram comparadas às imagens das tíbias dos animais irradiados em diferentes doses e em diferentes tempos de recuperação (Figuras 2, 3 e 4).

A Figura 1 apresenta detalhes morfológicos do processo natural de regeneração óssea depois de 8 dias do ferimento. Pode-se observar uma falha na interface (área negra) entre o calo do osso neoformado (parte superior da figura) e a parte densa e intacta o osso ao redor do ferimento (canto direito esquerdo). Neste estágio o novo tecido estrutura-se como um emaranhado de fibras colágenas (veja o destaque), característico da morfologia do osso primário ainda imaturo [21- 24]. Nas amostras provenientes dos animais irradiados com laser foram observados resultados diferentes, conforme se apresenta a seguir.

A Figura 2 apresenta as imagens de MEV feitas na amostra sujeita a 7 doses com aplicações diárias de laser  $94,5 \text{ J cm}^{-2}$  iniciadas 24 horas depois que tibia foi lesionada. O recorte ampliado nesta figura está na mesma escala do recorte apresentado na Figura 1 a fim de facilitar a comparação das possíveis diferenças causadas pela radiação. Pode-se observar que agora as fibras de colágeno formam feixes densos e alinhados (fibras em paralelo) que correspondem ao estágio de consolidação da estrutura do osso secundário [21- 22, 25]. A evolução deste processo pode ser observada nas imagens de MEV (Figura 3) de uma tibia sujeita a uma exposição mais prolongada (14 doses com aplicações diárias de  $94,5 \text{ J cm}^{-2}$ ). Podemos observar que a estrutura do osso regenerado (parte superior da imagem) é praticamente similar a do osso intacto (parte inferior da imagem) e que a interface entre o calo ósseo e o osso intacto está praticamente repleto de constituintes ósseos.

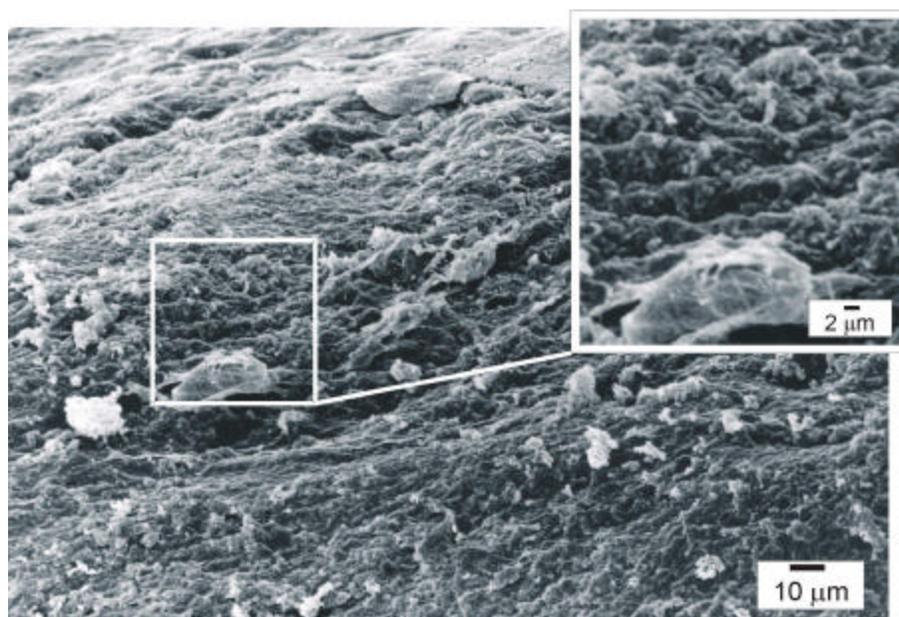


**Figura 1-** Imagem típica de MEV do calo ósseo em regeneração após 8 dias da cirurgia de animais do grupo que não recebeu radiação.



**Figura 2-** Imagem típica de MEV do calo ósseo em recuperação feitas 8 dias depois da cirurgia, referente aos animais irradiados por 7 dias consecutivos com doses diárias de  $94,5 \text{ J cm}^{-2}$ . A escala de amplificação da imagem destacada desta figura é a mesma que a do destaque apresentado na Figura 1.

Como seria esperado na morfologia de um osso secundário, a imagem destacada dentro da Figura 3 mostra que as fibras de colágeno do osso regenerado organizam-se em feixes. A Figura 4 mostra imagem típica de tíbias também sujeitas a tempos de exposição prolongados (14 dias), mas com menores doses diárias de radiação ( $31,5 \text{ Jcm}^{-2}$ ). O osso regenerado (parte superior da figura e destaque à direita) apresenta uma estrutura densa, mas uma superfície bastante rugosa comparada a estrutura do osso intacto (parte inferior da figura e destaque esquerdo).

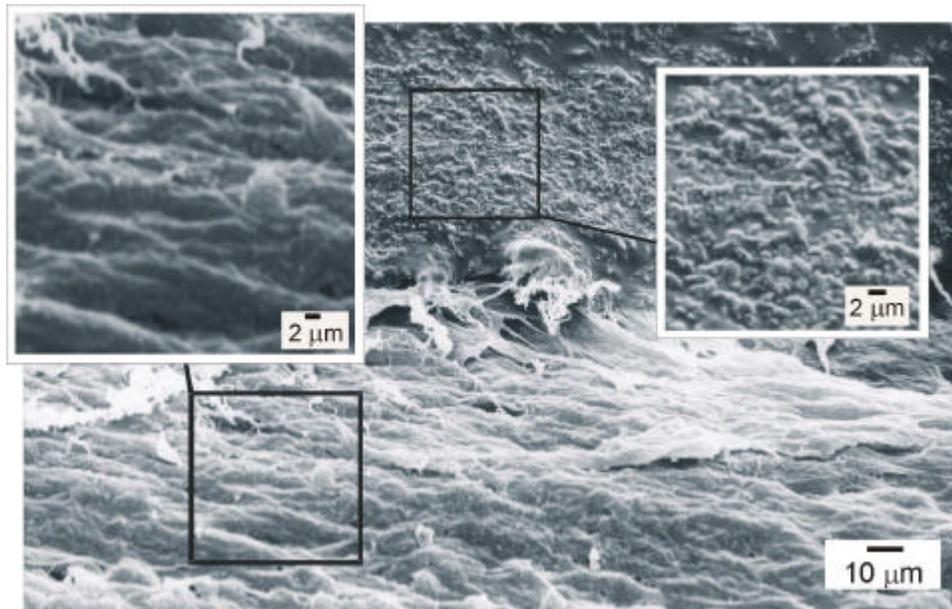


**Figura 3** - Imagem típica de MEV do calo ósseo em regeneração realizada 15 dias depois da cirurgia do grupo de animais irradiados por 14 dias com doses diárias de  $94,5 \text{ Jcm}^{-2}$ .

As Figuras 5 e 6 mostram um conjunto de imagens da evolução típica da arquitetura molecular de uma matriz óssea desmineralizada durante o processo de regeneração (com e sem radiação de laser).

Em ambas as figuras as imagens na coluna direita representam uma ampliação 10 vezes maior do que as imagens apresentadas na coluna da esquerda. Também em ambas as figuras, as imagens (a) e (b) correspondem ao processo de regeneração natural (sem tratamento com laser), as imagens (c) e (d) correspondem ao desenvolvimento do tecido

ósseo que receberam doses diárias de  $31,5 \text{ J cm}^{-2}$ , e as imagens (e) e (f) correspondem as tíbias que receberam doses diárias de  $94,5 \text{ J cm}^{-2}$ .



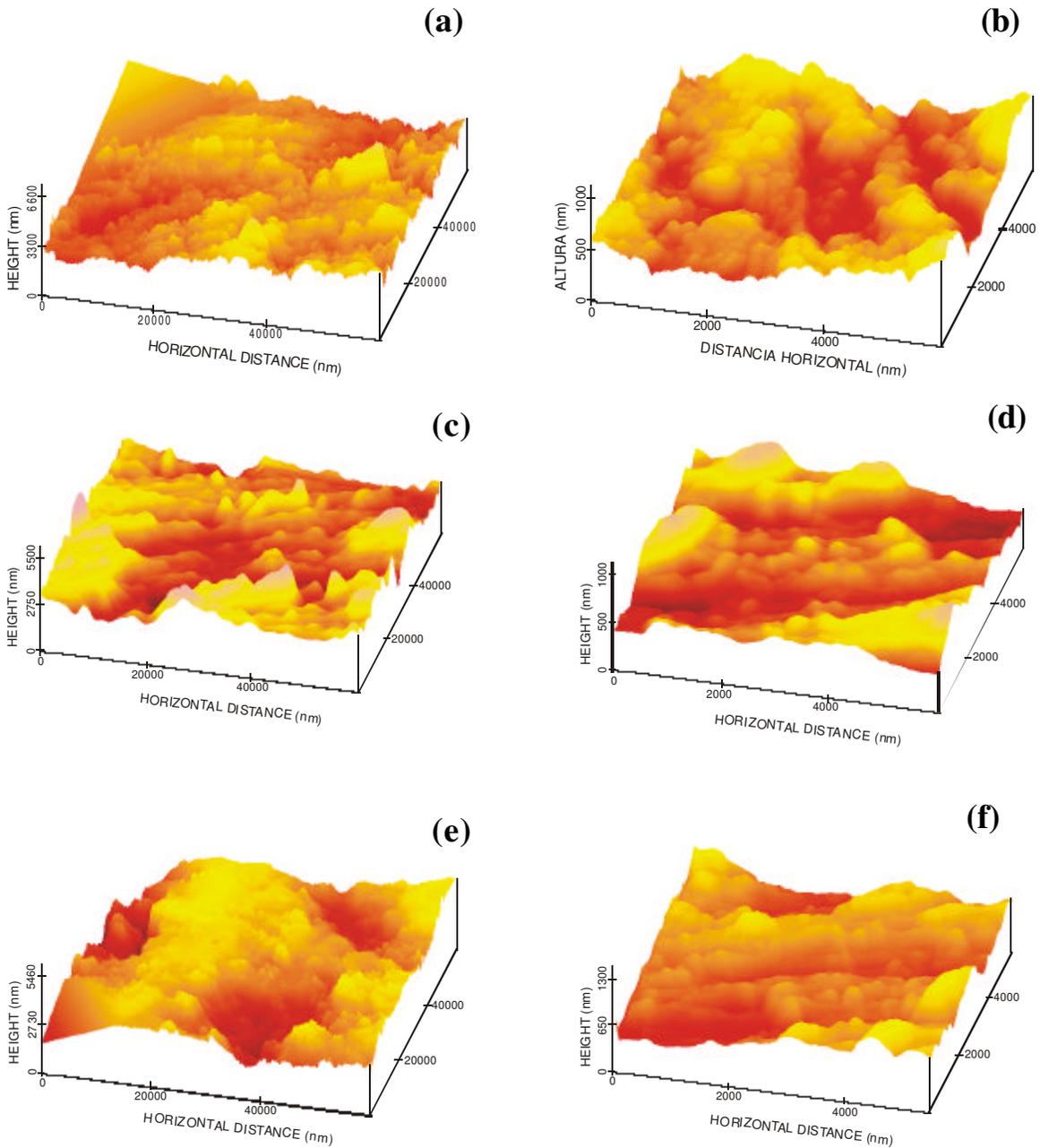
**Figura 4** - Imagem típica de MEV do calo ósseo em regeneração realizada 15 dias depois da cirurgia do grupo de animais irradiados por 14 dias consecutivos com doses diárias de radiação de  $31,5 \text{ J cm}^{-2}$ .

Oito dias depois da cirurgia (veja a Figura 5 (a)) começa a aparecer algum alinhamento nas fibras, ainda não bem definido. Uma maior amplificação desta amostra (Figura 5 (b)) mostra que o tecido apresenta várias falhas e desalinhamentos, indicando que as fibras colágenas ainda estão no processo de formação e entrelaçamento. Devido a ausência de fibras bem definidas neste estágio de regeneração não foi possível medir o diâmetro das fibras, mas conseguimos medir as variações verticais (rugosidade) e obter um histograma cuja distribuição estatística apresentou um perfil Gaussiano com rugosidade média de  $r = 2600 \text{ nm}$ . As tíbias dos animais que foram irradiados por 7 dias consecutivos com doses diárias de  $31,5 \text{ J cm}^{-2}$  apresentaram no mesmo período de recuperação, uma estrutura fibrosa mais alinhada (compare a Figura 5 (a) e Figura 5 (c)). Estas amostras também apresentaram menor rugosidade ( $r = 1610 \text{ nm}$ ) tendo sido possível medir o diâmetro médio ( $d = 613 \text{ nm}$ ) das fibras entrelaçadas que formam as lamelas ósseas (veja a Figura 5 (d)) que vão formar as trabéculas. As trabéculas ósseas são septos em crescimento

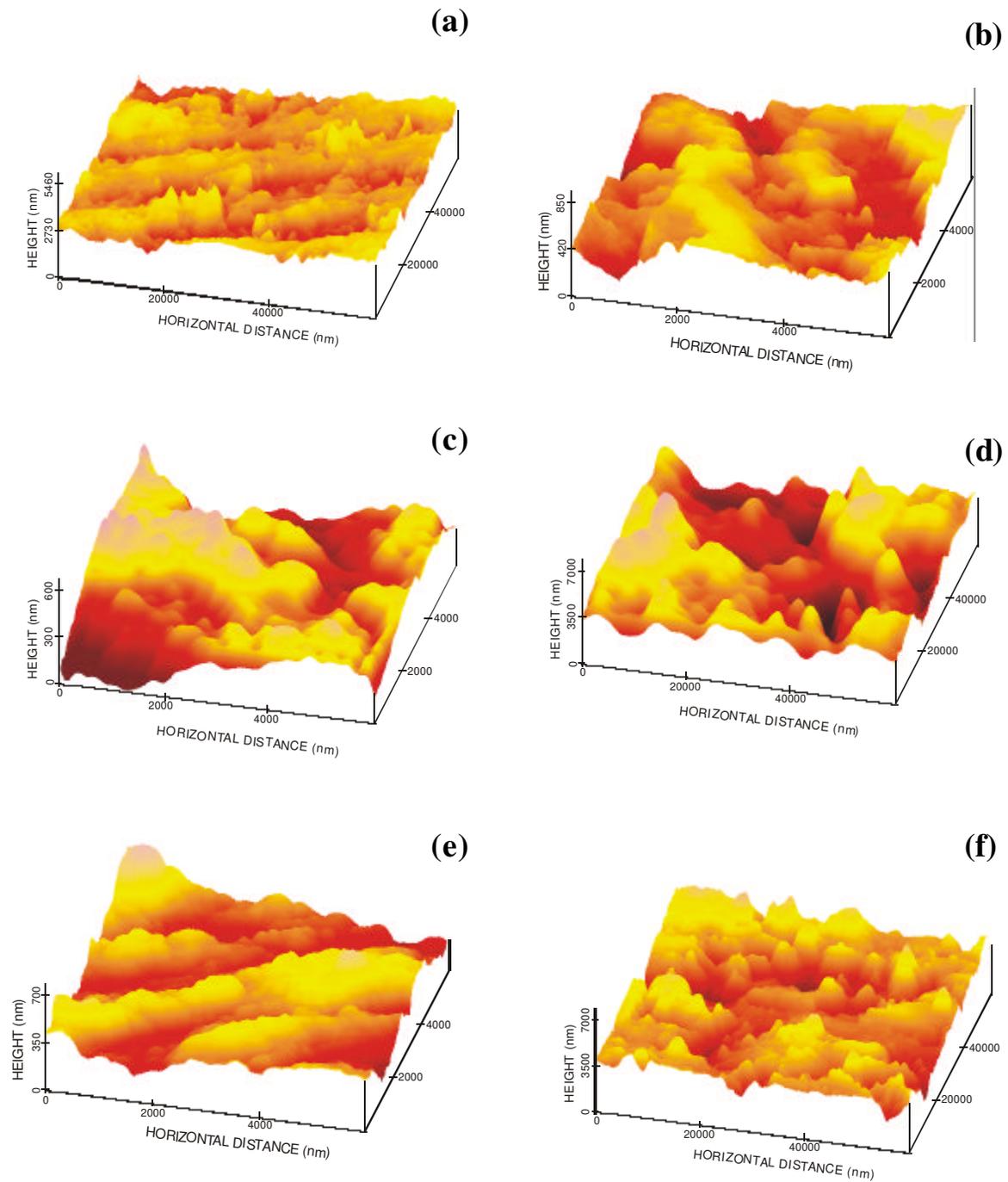
do osso primário (osso trabecular) que procuram preencher o orifício feito cirurgicamente. As fibras de colágeno dentro das trabéculas têm uma organização transiente passando de um emaranhado fibroso (primeira fase) para uma fibragem paralela no estágio final e no osso Harvesiano maduro. Os animais que receberam doses diárias de  $94,5 \text{ Jcm}^{-2}$  também apresentaram diferenças significativas quando comparados com as tíbias dos animais não irradiados ou com os animais irradiados com doses de  $31,5 \text{ Jcm}^{-2}$ . Pode-se verificar (veja a Figure 5 (e)) que as fibras agora estão formando feixes mais largos e mais empacotados de lamelas constituindo as trabéculas ósseas. O diâmetro das lamelas é por volta de 2400 nm e uma maior ampliação revela que uma estrutura subjacente de fibras com diâmetro médio unitário de  $d = 650 \text{ nm}$ . Isto sugere que as doses diárias de  $94,5 \text{ Jcm}^{-2}$  promovem a formação de uma área maior de feixes de colágeno coalescidos e agrupados na forma de lamelas, apesar de que as fibras formadoras das lamelas terem praticamente o mesmo diâmetro das fibras observadas nos ratos irradiados com doses diárias de  $31,5 \text{ Jcm}^{-2}$ . Assim o diâmetro das fibras subjacentes sugere que elas são formadas por várias moléculas de colágeno entrelaçadas.

Vamos discutir agora as imagens MFA apresentadas na Figura 6 que são representativas da reorganização espacial das fibras que ocorreu após 15 dias da recuperação do ferimento. Para os animais não tratados, comparando-se a evolução da regeneração na segunda semana com a primeira semana observou-se um progresso do arranjo lamelar (compare por exemplo as imagens da Figure 5(a) e 6(a), correspondendo a 8 e 15 dias de regeneração). O alinhamento das fibras está melhor definido e mais uniforme (mostrado com maior ampliação na Figure 6 (b)), e o diâmetro das fibras é em torno de  $d = 650 \text{ nm}$ . Entretanto, as fibras dos animais que receberam doses diárias de  $31,5 \text{ Jcm}^{-2}$  por 14 dias (veja, por exemplo, a Figure 6 (c)) aparentemente evoluíram para uma nova estrutura quando comparadas com o período inicial de regeneração (8 dias, Figura 5 (c)), ou quando comparadas com as tíbias dos animais que não receberam radiação de laser no mesmo período de recuperação (15 dias, Figura 6 (a, b)). Estas amostras têm formas irregulares e mesmo com maiores ampliações (Figura 6 (d)) não foi possível identificar um padrão consistente de organização estrutural espacial. Corroborando com estes resultados, as tíbias dos animais tratados com doses maiores ( $94,5 \text{ Jcm}^{-2}$ ) também apresentaram superfícies mais rugosas ( $r = 2730 \text{ nm}$ ). A Figura 6 (f) feita com maior ampliação revela

que estas estruturas são formadas por feixes paralelos de fibrilas e que estas fibrilas tem um diâmetro em torno de 360 nm.

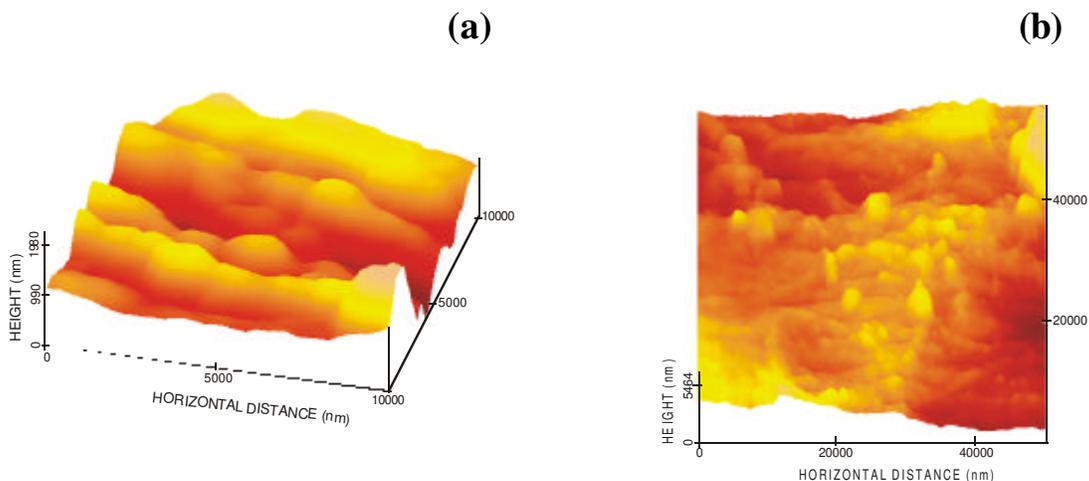


**Figura 5** - Imagens de MFA do processo de regeneração 8 dias depois do ferimento cirúrgico (a, b), sem radiação de laser, (c, d), irradiados por 7 dias com doses diárias de 31,5 J cm<sup>-2</sup> e (e, f) irradiados por 7 dias com doses diárias de 94,5 J cm<sup>-2</sup>.



**Figura 6** - Imagens de MFA do processo de regeneração 15 dias depois do ferimento cirúrgico (a, b), sem radiação de laser, (c, d), irradiados por 14 dias com doses diárias de  $31,5 \text{ J cm}^{-2}$  e (e, f) irradiados por 14 dias doses diárias de  $94,5 \text{ J cm}^{-2}$ .

A Figura 7 apresenta imagens típicas de MFA de uma área de osso intacta, isto é, de uma parte da tíbia que não foi irradiada com laser, aproximadamente 3 mm longe da área de ferimento. A Figura 7 (a) mostra uma imagem de topo mostrando o alinhamento natural das fibras de colágeno que formam as lamelas da matriz óssea. A rugosidade típica desta superfície é de  $r = 1660$  nm, o que é um valor muito próximo da rugosidade superficial da área regenerada das tíbias que receberam 7 doses diárias de  $31,5 \text{ Jcm}^{-2}$ , mas menor do que as amostras que receberam 14 doses diárias  $94,5 \text{ Jcm}^{-2}$ . Com imagens de MFA mais ampliadas (Figura 7 (b)) pode-se observar que as fibras do osso intacto estão bem alinhadas e têm um diâmetro de  $d = 710$  nm, o qual é próximo dos diâmetros das fibras encontradas no osso regenerado (613-650 nm) dos animais que receberam 7 doses diárias de laser (tanto de  $31,5 \text{ Jcm}^{-2}$  ou de  $94,5 \text{ Jcm}^{-2}$ ) e também dos animais que tiveram a regeneração natural 15 dias depois da cirurgia. Este resultado indica claramente que ambas as doses de radiação utilizadas contribuem para a aceleração do processo de regeneração óssea.



**Figura 7-** Imagens de MFA de uma tíbia intacta, mostrada como referência: (a) *top-view*; (b) imagem ampliada tri-dimensional.

## 4. Conclusão

A utilização complementar da MEV e da MFA foi muito útil para identificar o progresso da regeneração óssea induzida pela radiação de laser. As imagens de MEV proporcionaram uma visão ampla do calo ósseo e do osso intacto. A MFA forneceu ferramentas para a medida das estruturas ósseas como, por exemplo, as lamelas e suas fibras e fibrilas. Foi possível acompanhar o progresso da regeneração óssea próximo da escala de resolução molecular das proteínas de colágeno que formam as fibras matriciais. Nossos resultados permitem concluir que a radiação de laser de HeNe teve boa eficiência na aceleração da regeneração óssea depois de 8 dias da cirurgia (usando tanto doses de  $31,5 \text{ Jcm}^{-2}$  ou de  $94,5 \text{ Jcm}^{-2}$ ) ou para a promoção da consolidação óssea (15 dias depois da cirurgia) com o uso de doses diárias de  $94,5 \text{ Jcm}^{-2}$ .

## 5. Referências

1. R. F. Service, *Science* **289** (2000) 1500.
2. P. Ducy, T. Schinke and G. Karsenty, *Science* **289** (2000) 1501.
3. S.J. Warden, K.L. Bennell, M.R. Forwood and J.M. McMeeken, *Bone* **27** (2000) 42.
4. E.M. Keithley, T. Truong, B. Chandronait and P.B. Billins, *Hear. Res.* **148** (2000) 192.
5. I.G.F. Freitas, V. Baranauskas and M.A. Cruz-Höfling, *Appl. Surf. Sci.* **154-155** (2000) 548.
6. G. Horneck, *Mutation Research* **430** (1999) 221.
7. R. Müller, M. Hahn, M. Vogel, G. Delling and P. Rügsegger, *Bone* **18** (1996) 215.
8. T. Mizowaki, N. Araki, Nagata, Yasushi; Y. Negoro, T. Aoki and M. Hiraoka, *Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys.* **49** (2001) 605.
9. K. Kusuzaki, N. Kageyama, H. Shinjo, H. Takeshita, H. Murata, S. Hashiguchi and T. Ashihara, *Bone* **27** (2000) 655.
10. F. Shapiro, *Calcif. Tissue Int.* **61** (1997) 285.
11. W. Hans-Peter, C. Lifeng, S. Udo, P. Ulrich, F. Harald, J. Ulrich and H.J. Höling, *Cell. Tissue. Res* **294** (1998) 93.

12. Y. Okazaki, E. Nishimura, H. Nakada and K. Kobayashi, *Biomaterials* **22** (2001) 599.
13. T. Mashiba, D.B. Burr, C.H. Turner, M. Sato, R.L. Cain and J.M. Hock, *Bone* **28** (2001) 538.
14. S.L. Teitelbaum, *Science* **289** (2000) 1504.
15. T. Ushiki, J. Hitomoi, S. Ogura, T. Uemoto and M. Shigeno, *Arch. Histol. Cytol.* **59** (1996) 421.
16. V. Baranauskas, B.C. Vidal and N.A. Parizotto, *Appl. Biochem. Biotech.* **69** (1998) 91.
17. H. Matsuno, A. Yokoyama, F. Watari, M. Uo, T. Kawasaki, *Biomaterials* **22** (2001) 1253.
18. M.R. Guerino, V. Baranauskas, A.C. Guerino and N. Parizotto, *Appl. Surface Sci.* **154-155** (2000) 561.
19. D. Meller, K. Peters and K. Meller, *Cell. Tissue Res.* **288** (1997) 111.
20. V. Baranauskas, I. Garavello-Freitas, Z. Jingguo and M. A. Cruz-Höffling, *J. Vac. Sci. Technol. A.* **19** (4) (2001) 1042.
21. G. Marotti, *Ital. J. Anat. Embryol.* **101** (1996) 25.
22. G. Marotti and M.A.A. Muglia, *Arch. Ital. Anat. Embryol.* **93** (1988) 163.
23. M. Raspanti, S. Guizzard, R. Strocchi and A. Ruggeri, *Acta Anat.* **155** (1996) 249.
24. M. Raspanti, R. Strocchi, De V. Pasquale, D. Martini, C. Montaneri and A. Ruggeri, *It. J. Anat. Embryol.* **101** (1996) 97.
25. S.A.A. Reid, *Anat. Embryol.* **174** (1986) 329.

## Capítulo VI

### Foto-estimulação da Angiogênese por Laser de HeNe em Lesões de Tíbias de Ratos

#### **1. Introdução**

A formação de novos vasos sanguíneos pode ser um fator determinante tanto na saúde como em doenças. Processos fisiológicos relacionados ao sistema reprodutor feminino, reparo de tecidos, recuperação de tecidos danificados pós-infarto ou queimaduras, ou processos patológicos tais como o crescimento de tumores, retinopatia diabética, psoríase e artrite reumatóide, todos envolvem a angiogênese, através do brotamento de novos capilares dos vasos pré-existentes. No caso do desenvolvimento embrionário *de novo*, o aparecimento e o crescimento de novos vasos, ocorre um evento conhecido como vasculogênese [1-2]. Ambos são complexos processos envolvidos na proliferação e migração de células endoteliais e requerem a assistência do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) [3-4], o fator mais potente e específico, embora outros fatores angiogênicos também participem deste processo. O entendimento do mecanismo básico modulando o crescimento de vasos sanguíneos constitui uma fonte valiosa para possibilidades de controle desejável ou viabilizar tecidos indesejáveis. Assim, processos para a introdução de novas opções terapêuticas no tratamento de uma variedade de doenças ou desordens poderiam ser estimulados.

Nos Capítulos anteriores, foi observado que a irradiação com laser de HeNe influenciou o processo de cicatrização do tecido ósseo de tíbias de ratos lesionadas cirurgicamente [5-7]. No decorrer deste estudo, suspeitou-se, que a irradiação com laser de baixa potência poderia também estar estimulando qualitativamente a revascularização da área lesionada, e que isto seria um fator adicional ao aumento da área trabecular óssea, observado no reparo das tíbias submetidas à terapia com laser.

Neste Capítulo foi feita uma análise quantitativa dos vasos sanguíneos presentes no tecido ósseo em regeneração, com o objetivo de verificar se a irradiação com laser de baixa potência (HeNe) seria capaz de estimular crescimento de vasos sanguíneos durante a cicatrização das tíbias de ratos.

## **2. Materiais e Métodos**

### *Procedimento cirúrgico e irradiação com laser*

As experiências foram realizadas, utilizando-se de 24 ratos *Wistar*, com peso corporal entre 250 – 280 g, e 75 dias de idade (adultos jovens). Após anestesia intraperitoneal com pentobarbital sódico (0,1 ml/100g de peso), foi feita uma pequena incisão na pele em uma das patas dos ratos, para que a superfície ântero-medial da tíbia fosse exposta. Foi feito um furo de 1,6 mm de diâmetro utilizando-se uma broca de uso odontológico em apenas uma das corticais do terço médio da diáfise da tíbia. Utilizou-se um laser de HeNe ( $\lambda = 633$  nm, diâmetro do feixe Gaussiano de  $w = 1,1$  mm) para irradiar um grupo de animais ( $n = 12$ ). A irradiação foi feita através da pele e direcionada perpendicularmente ao eixo longitudinal da tíbia, sobre o local da lesão. As irradiações iniciaram 24 h após a cirurgia, com aplicações diárias de 5 min ou 15 min em dois grupos de ratos ( $n = 6$  para cada grupo), correspondendo às doses de 31,5 e 94,5 Jcm<sup>-2</sup>, respectivamente. Os animais de cada grupo foram sacrificados com uma overdose de anestésico no oitavo e décimo quinto dia após a lesão (4 grupos com  $n = 3$  para cada combinação de dose e data de sacrifício). O controle foi realizado com um grupo de 12 animais submetidos à lesão e aos mesmos procedimentos, com exceção das aplicações com laser.

## *Análises Histológica e Quantitativa*

Após o tempo devido, tanto as tíbias irradiadas quanto as controle foram imediatamente removidas e processadas para os estudos histológicos e morfométricos da seguinte maneira: As tíbias foram dissecadas e fixadas em uma solução tampão de fosfato a 10% (pH 7,3), por 24 h, e descalcificadas em ácido acético 10% durante 25 dias, posteriormente colocada em 5% de EDTA, por 48 h, com ambas soluções trocadas diariamente. As áreas lesionadas e ao redor da lesão foram separadas do comprimento total da tíbia. As amostras de ossos foram então mergulhadas em solução tampão de fosfato salina (duas vezes por 15 minutos cada), desidratadas em séries de concentração crescente de álcool, fixadas em parafina e seccionadas com 5 µm de espessura. Os cortes foram então corados, pela técnica de tricrômio de Masson, para a análise quantitativa da ocorrência e quantificação dos novos vasos sanguíneos, através da microscopia de luz. A quantificação de novos vasos sanguíneos foi feita pela contagem dos vasos presentes na matriz óssea, intercalados nas trabéculas do osso primário neo-formado. Para a contagem dos vasos foi utilizado um diagrama de grade de pontos (“contagem de pontos”) com 100 quadros (1 x 1 mm cada) ou 9 x 9 configurações com 81 pontos de teste cada, representando a intersecção das duas linhas ortogonais. Vasos que estavam posicionados em dois ou mais quadros eram contados somente no quadro onde ocupavam a maior área. A contagem foi sempre feita em linhas varridas da esquerda para a direita, iniciando-se sempre no canto superior esquerdo. Para a contagem dos vasos sanguíneos foram escolhidos aleatoriamente cinco áreas focais (campos) dos tecidos de cada corte, perfazendo um total de 75 campos para cada dosagem de laser em ambos os períodos de 7 e 14 dias consecutivos de irradiação. O mesmo procedimento foi realizado para os correspondentes grupos de controle. As medidas foram feitas, utilizando-se um Microscópio de Luz e ampliação final de 500 X (10 X na objetiva de 50X).

### *Análise estatística*

Todos os dados foram expressos em média e desvio padrão (dp). As diferenças entre os grupos foram analisadas pelo método paramétrico de Student-Newman-Keuls [8]. Os dados foram obtidos pela contagem dos vasos sanguíneos contidos nas lâminas dos animais irradiados com doses de 31,5 e 94,5 Jcm<sup>-2</sup>, em ambos períodos (7 e 14 dias, iniciando 24 h após a cirurgia) e dos respectivos controles (8 e 15 dias). Os resultados com  $P \leq 0,0001$  foram considerados estatisticamente significativos.

### **3. Resultados**

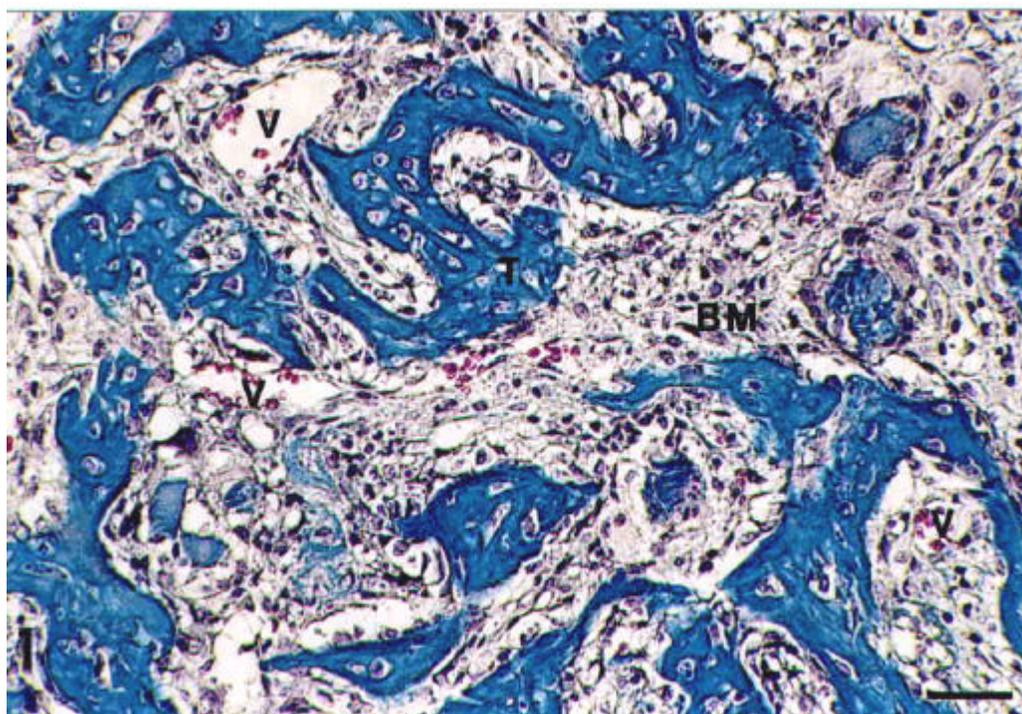
A comparação do número de vasos neo-formados presentes no compartimento da medula óssea das tíbias irradiadas e não irradiadas foi feita através da análise, por microscopia de luz, dos cortes histológicos das amostras de ossos. As áreas de tecido danificado foram identificadas pela presença de estrutura primária de osso trabecular. A comparação de animais do grupo controle, após 8 dias de lesão, com animais irradiados por 7 dias com dose diária de 31,5 Jcm<sup>-2</sup>, mostrou um aumento moderado, não significativo de vasos sanguíneos no grupo irradiado (Figuras 1 e 2, Tabela 1). Entretanto, quando comparamos animais do grupo controle, no 8º dia após a lesão, com animais irradiados por 7 dias com dose de 94,5 Jcm<sup>-2</sup>, observamos um aumento significativo de vasos sanguíneos no compartimento da medula óssea (Figuras 1 e 3, Tabela 1). Um aumento significativo também foi observado quando comparamos animais irradiados com dose diária de 94,5 Jcm<sup>-2</sup>, com animais irradiados com dose diária de 31,5 Jcm<sup>-2</sup>, durante 7 dias (Figuras 2 e 3, Tabela 1).

**Tabela 1** - Comparação entre os valores médios do número de vasos sanguíneos de tíbias de rato não irradiadas em processo de regeneração no 8º e 15º dia depois da lesão.

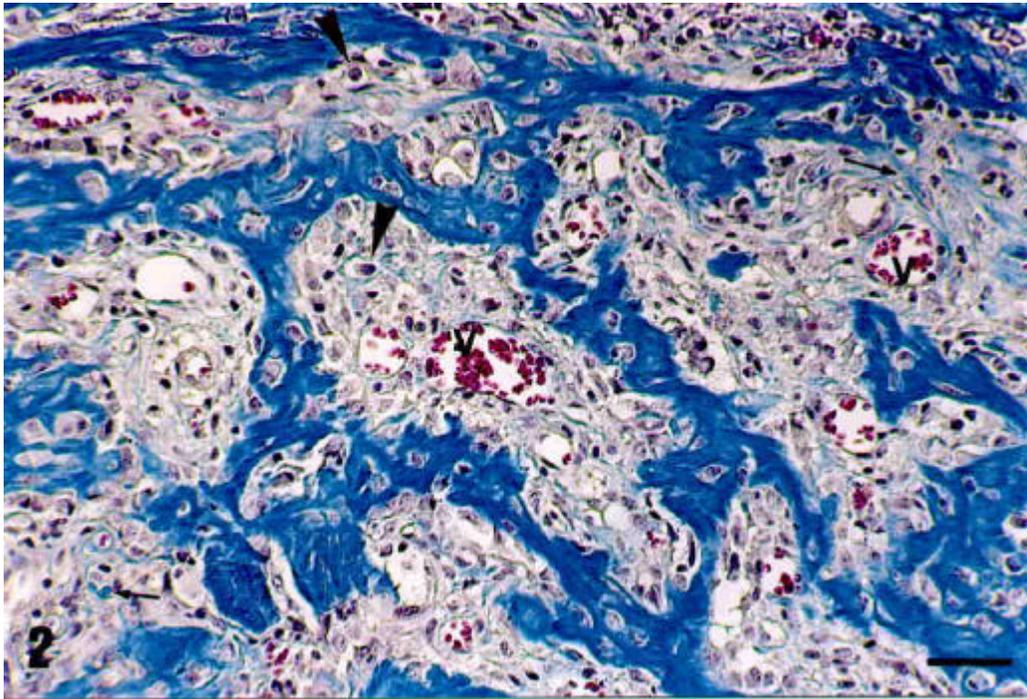
<i>Sacrifício dos animais (dias)</i>	8			15		
		7	14		7	14
<i>Período de irradiação (dias)</i>						
Dose (Jcm <sup>-2</sup> )	0 (controle)	31,5	94,5	0 (controle)	31,5	94,5
Média	278,1 <sup>a</sup>	293,9 <sup>a</sup>	369,8 <sup>b</sup>	291,6 <sup>a</sup>	232,6 <sup>c</sup>	214,1 <sup>c</sup>
dp	17,7	81,4	80,6	42,4	39,8	37,7

Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão (dp) de 75 campos visuais de tecidos, tomados aleatoriamente em cada grupo de animais; n = 6 para os grupos controle e n = 3 para cada grupo irradiado com diferente dose e diferente período. Letras diferentes significam alterações significantes.

p  $\leq$  0,001

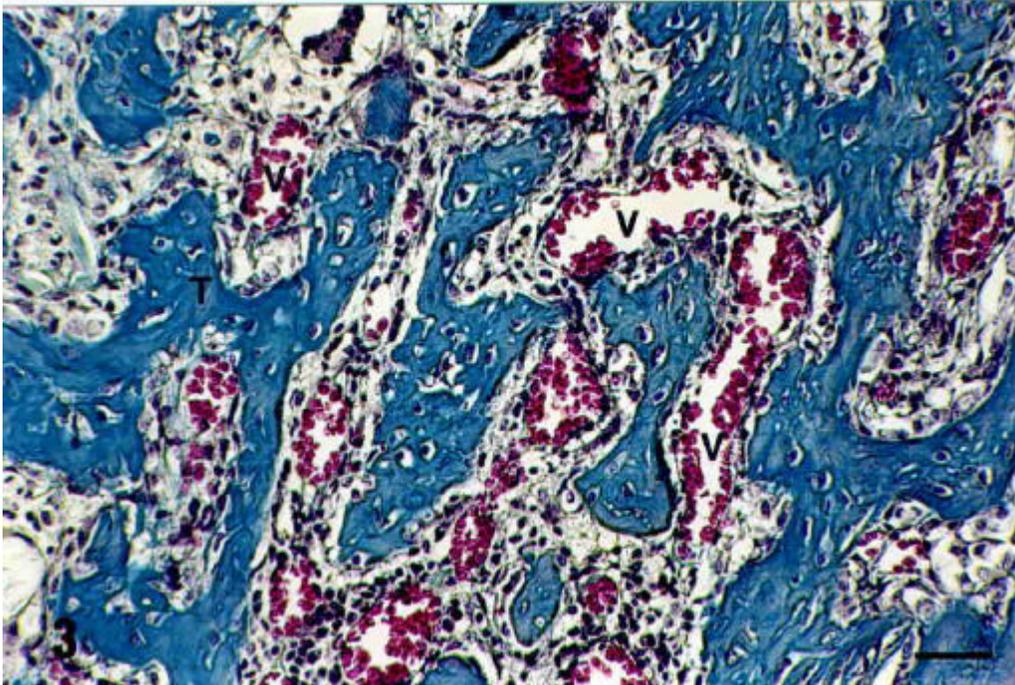


**Figura 1**- Imagem histológica típica do calo na tíbia de rato 8 dias depois da lesão cirúrgica (grupo controle não irradiado). A área de regeneração está agora ocupada pelas trabéculas (T) de osso primário, o qual ainda é muito fino e o seu perfil ocupa uma área menor do que o compartimento da medula óssea (BM). Note a nova formação de vasos (V) espalhados neste compartimento (tricrômio de Masson). Barra de escala = 40  $\mu$ m.



**Figura 2-** Imagem histológica típica do calo ósseo em tíbia de rato 8 dias após a lesão cirúrgica e irradiada durante 7 dias por laser de HeNe com dose diária de  $31,5 \text{ Jcm}^{-2}$  (5 min por dia). Regiões como estas foram utilizadas para a quantificação da neo-vascularização. Observe que vários vasos sanguíneos (V) aparecem no compartimento medular. Note também que junto com a formação de trabéculas aparecem vários pontos de deposição de matriz óssea na forma de feixes azuis irregulares de fibras colágenas (setas) em torno dos osteoblastos (pontas de flechas) em toda área da medula óssea, indicando que está em andamento a síntese da matriz óssea. (tricroômio de Masson). Barra de escala =  $40 \mu\text{m}$ .

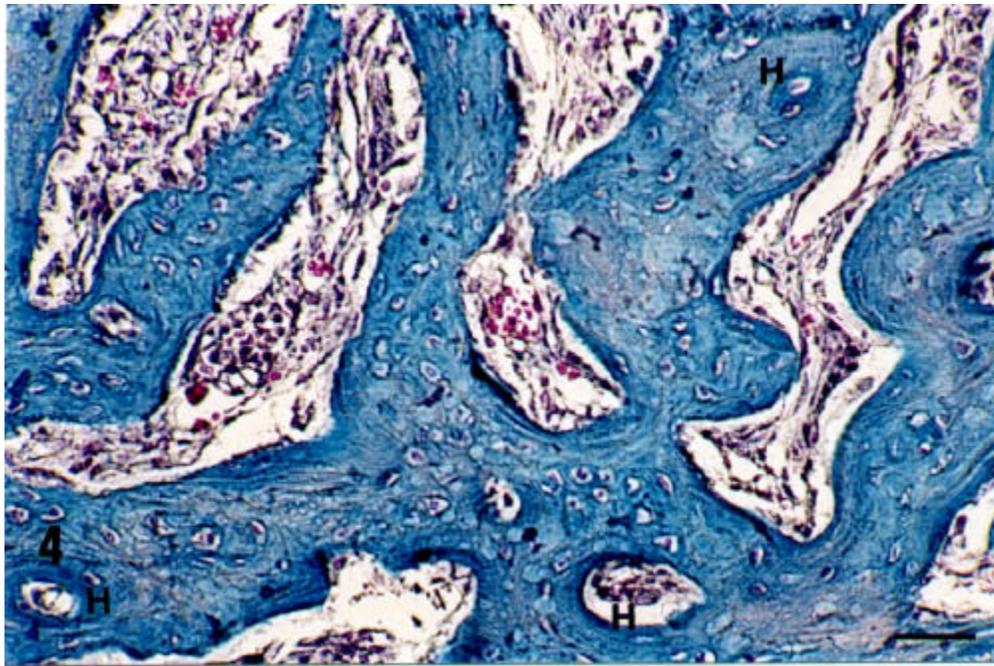
Quando comparamos os grupos controle no 8<sup>o</sup> e 15<sup>o</sup> dia após a lesão, observamos um pequeno aumento no número de vasos, porém, não significativo (Tabela 1). Contrariamente, quando comparamos animais 15 dias após a lesão, irradiados por 14 dias, com ambas as doses, observamos um decréscimo significativo no número de vasos sanguíneos tanto em relação aos animais irradiados por 7 dias com as mesmas doses, quanto nos animais do grupo controle (Tabela 1).



**Figura 3** – Imagem histológica típica do calo na tíbia de rato 8 dias após a lesão cirúrgica e irradiada durante 7 dias por laser de HeNe com dose diária de  $94,5 \text{ Jcm}^{-2}$  (15 min por dia). O número de vasos novos e bem formados (V) aumentou significativamente neste período. Observe que as trabéculas ósseas primárias (T) têm um aspecto mais compacto e parecido com as formas presentes nas Figuras 1 e 2. Os símbolos em forma de seta apontam a matriz que está sendo depositada. (tricrômio de Masson). Barra de escala =  $40 \mu\text{m}$ .

Durante a progressão do reparo, as trabéculas irregulares de osso primário temporariamente unem as extremidades da tíbia lesionada, formando o calo ósseo. Estas alterações histológicas também ocorreram nas trabéculas do osso primário nas tíbias irradiadas. Nas tíbias irradiadas por 7 dias com dose diária de  $31,5 \text{ Jcm}^{-2}$ , a matriz óssea começou a ser depositada por toda área intertrabecular (Figura 2). Ela aparece corada como sobras azuis alongadas em torno dos osteoblastos ativos formando um padrão bastante distinto. Este padrão não foi observado no calo ósseo das tíbias não tratadas (controles) (Figura 1). No mesmo período de 7 dias de irradiação, mas com a dose de  $94,5 \text{ Jcm}^{-2}$ , este padrão não foi tão visível quanto na dose anterior, mas foi mais acentuado quando comparado ao grupo controle (Figuras 1-3). Pode-se observar uma evolução dos resultados entre os períodos de irradiação. A aparência histológica do trabeculado de osso primário ganhou consistência, com a matriz óssea apresentando uma maior compactação

óssea. No final da primeira semana pós-lesão, as trabéculas tornaram-se mais espessas e conseqüentemente o compartimento da medula óssea ficou menor, tanto nas tíbias controle como nas tíbias irradiadas. Um achado comum no final da segunda semana de irradiação diária foi o aparecimento de sistemas de *Havers*, ainda incipientes, que são característicos do osso lamelar maduro (Figura 4).



**Figura 4.-** Imagem histológica típica do calo na tíbia de rato 15 dias após a lesão cirúrgica e irradiada por 14 dias por laser de HeNe com dose diária de  $94,5 \text{ Jcm}^{-2}$  (15 min por dia). Os vasos sangüíneos não são tão numerosos quanto os apresentados na Figura 3. Observe a área trabecular mais larga e o estreitamento do compartimento da medula óssea, que é uma característica típica do reparo ósseo neste estágio. Observe também que em algumas regiões a matriz óssea já assumiu um arranjo que lembra os sistema de *Havers*, típico do osso secundário maduro (H). (tricroômio de Masson). Barra de escala = 40  $\mu\text{m}$ .

## 4. Discussão

Os resultados obtidos no presente estudo indicam claramente que a irradiação com laser de HeNe, aplicada transcutaneamente em lesões de tíbias de ratos, teve dois tipos de efeitos sobre a revascularização do tecido neo-formado. Pode-se observar um significativo efeito estimulatório tanto no final da primeira semana com dose diária de  $94,5 \text{ Jcm}^{-2}$ , como um efeito inibitório significativo (independente da dose) no final da segunda semana de tratamento. O efeito positivo na formação de novos vasos nos animais que receberam as aplicações de laser durante a primeira semana, foi atribuído ao tratamento por laser de HeNe, visto que o mesmo não foi observado nos animais do grupo controle. Este efeito ocorreu paralelamente com um aumento significativo da área trabecular de osso primário, observado em estudos prévios por Garavello-Freitas *et al.* [6], mas com dose diária efetiva de  $31,5 \text{ Jcm}^{-2}$ . Com esta dose, a síntese da matriz óssea estava bastante ativa, como pode ser observado em numerosos pontos de deposição da matriz sobre o compartimento da matriz óssea (veja a Figura 2). O efeito negativo do laser na angiogênese encontrado neste trabalho ( com ambas as doses) também demonstrou ser devido a irradiação do laser, pois, nas tíbias do grupo controle, no mesmo período, houve um crescimento no número de vasos (não significativo,  $p \leq 0.0001$ ). De modo semelhante, comparando as tíbias irradiadas com doses diárias de  $94,5 \text{ Jcm}^{-2}$  por 14 dias com as tíbias irradiadas por 7 dias, Garavello-Freitas *et al.* [6] demonstraram que ocorre uma inibição no processo de formação do osso trabecular primário. Como nos controles a área trabecular aumenta significativamente com o tempo, comparando-se os controles de 8 e 15 dias, pode-se concluir que ocorreu um efeito inibitório provocado pela luz do laser nas amostras irradiadas. Consideramos que existe uma correlação inversa entre no ganho absoluto de área trabecular, que pode ser visto no primeiro período de irradiação, com o decréscimo correspondente no compartimento da medula óssea ao longo do período de regeneração óssea e, conseqüentemente uma diminuição no número de vasos sangüíneos no final do período. Entretanto, Garavello-Freitas *et al* [6] também observaram que, apesar da área trabecular não ter crescido nas tíbias que receberam 14 dias de irradiação (em ambas as doses), ocorreu um melhor arranjo na deposição espacial das fibras de colágeno, vistas pelo método de Picrosirios-polarização e que não pode ser detectado nas tíbias de controle. Como foi

utilizado um mesmo modelo experimental, para examinar a neo-formação de tecido ósseo [6] e a neo-formação de vasos sanguíneos, as semelhanças e as diferenças relacionadas aos efeitos estimulatórios ou inibitórios têm mais confiabilidade de serem comparadas. Os dados obtidos permitem deduzir que a terapia por laser de baixa potência é capaz de interferir nos processos celulares, em coerência com os resultados de vários trabalhos relacionados com a influência do laser na regeneração de fratura óssea [8, 9], ou de outros tecidos, como por exemplo, no reparo de lesões do tecido músculo-esquelético [10, 11], na regeneração de tendões [12, 13], na aceleração do reparo cicatricial em úlceras de pele [14], na recuperação pós-compressão do nervo ciático [15], processos odontológicos [16, 17], etc. Entretanto, o sucesso do efeito foto-modulador no processo de reparo depende da cuidadosa seleção da dose e do período de aplicação do laser. Para este objetivo deve-se levar em consideração as especificidades morfológicas e fisiológicas (bioquímicas) dos tecidos corpóreos e de seus estados metabólicos ou de seus processos fisiopatológicos em desenvolvimento, pois tudo isto pode interferir na resposta à interação entre a luz do laser e o tecido biológico. Em nosso modelo experimental, foram escolhidos dois tipos de tecidos; o tecido mielóide (vasos sanguíneos localizados na medula óssea), e o tecido esquelético duro (osso). A ação do laser de HeNe no tecido mielóide foi analisada neste Capítulo e a ação do laser no tecido esquelético foi analisada nos Capítulos anteriores [5, 6]. Com base em nossas observações, concluímos que a irradiação com laser de HeNe durante 7 dias consecutivos, na dose de  $94,5 \text{ Jcm}^{-2}$ , promoveu a proliferação de novos vasos sanguíneos. Isto não ocorreu com os animais irradiados por 14 dias (em ambas as doses), onde a neovascularização foi influenciada negativamente, em contraste com os dados obtidos dos animais do grupo controle não irradiados, no 8º e 15º dia após a lesão, quando foi observado um aumento do número de vasos sanguíneos, embora não significativo. Aparentemente existe uma quantidade ótima de energia para a promoção da revascularização. Nossos resultados indicam que nos animais que sofreram 7 dias de aplicação, a dose de  $31,5 \text{ Jcm}^{-2}$  foi mais apropriada para acelerar a atividade osteoblástica e aumentar a deposição de matriz óssea, enquanto que a dose de  $94,5 \text{ Jcm}^{-2}$  foi melhor para estimular a angiogênese. Bibikova *et al.* (1994) pesquisando o efeito foto-biológico da irradiação do laser de baixa energia (HeNe) na neo-formação de capilares durante a regeneração do músculo gastrocnêmio de sapos *Bufo viridis*, verificaram um efeito positivo

aplicando a dose diária de  $31,2 \text{ Jcm}^{-2}$  no período de 2 a 9 dias. O período em que ocorreu a angiogênese foi similar ao observado por nós, mas a dose de irradiação foi diferente. Estas diferenças podem ser atribuídas a dois tecidos experimentais distintos, que são o tecido muscular/sapo (com a revascularização ocorrendo em um tecido com arranjo para-cristalino de macromoléculas, muito bem ordenadas) e o tecido ósseo/rato (fibras colágenas de osso primário neo-formado, dispostas entrelaçadas). Apesar dos inúmeros trabalhos realizados sobre os efeitos benéficos da terapia de laser de baixa potência em processos fisiológicos ou patológicos, os mecanismos envolvidos em cada caso, ainda são pouco entendidos. Entretanto, vale a pena ressaltar que apesar de poderem existir mecanismos específicos em um processo biológico particular, também devem existir mecanismos gerais que podem estar envolvidos em todos os processos biológicos. É possível então, que os mecanismos de foto-estimulação ou de foto-inibição por laser, que podem acelerar ou inibir, a angiogênese, osteogênese (síntese de colágeno) e a regeneração muscular, possam ter um carácter mais geral, sendo que talvez as particularidades de resposta de cada tecido seja devido à quantidade de energia capturada por estas diferentes estruturas. Neste sentido, Agaiby *et al.* [19], verificaram que pequenas variações na densidade de energia incidente de laser de baixa potência (LLLT) induzem diferenças significantes na proliferação de linfócitos T *in vitro*. Funk *et al* [20], verificaram que culturas de células sanguíneas humanas mononucleares (periféricas) irradiadas com laser de HeNe (30 min. de irradiação com dose de  $18,9 \text{ Jcm}^{-2}$ ), em seguida estimuladas com diferentes mitógenos, tinham aumentos significativos dos níveis de alfa-interleucina-1 (IL-1 alfa), interleucina-2 (IL-2), fator alfa de necrose tumoral (TNF-alfa) e de interferon-gama (IFN-gamma), enquanto que irradiações com mais energia (60 min. com dose de  $37,8 \text{ Jcm}^{-2}$ ) mostraram um decréscimo significativo nos níveis de citocinas, evidenciando portanto a influência da foto-modulação na função imunológica [20]. Estudos *in vitro* têm mostrado que certas frequências de laser podem induzir a proliferação celular, liberar o fator de crescimento dos fibroblastos [21, 22], modular a proliferação de miocardiócitos fetais, e causar um aumento significativo na expressão dos genes proangiogênicos, transformando fator de crescimento beta (TGF-beta) e VEGG por miócitos cardíacos [23]. Estudos de células endoteliais em cultura mostram que a estimulação por laser aumenta a produção de VEGF por células de músculo liso, fibroblastos e miócitos cardíacos [24]. Foi demonstrado também que os hematomas

humanos provocados por fratura contêm o fator citocícito angiogênio do crescimento do endotelial vascular, e têm a capacidade inerente de induzir a angiogênese, e, desta forma, promover a revascularização durante o reparo ósseo [25]. Estes autores demonstraram, com a utilização de um modelo femural de roedor, que a introdução de fatores angiogênicos, como o fator lipídimental e o fator de crescimento de fibroblastos, podem acelerar a formação óssea e a regeneração da fratura imediatamente após o ferimento [26]. A foto-estimulação com laser aumenta a síntese de ATP, promove a ação do ácido nucléico e aumenta a divisão celular [27, 28]. A foto-modulação do tecido pode ser modulada pela mitocôndria, que poderia funcionar como uma foto-receptora da luz visível [29]. A absorção de energia pela cadeia respiratória pode provocar a oxidação do NADPH e produzir mudanças nas reações de redox, tanto na mitocôndria quanto no citoplasma. A ativação na cadeia de transporte de elétrons resulta o aumento do potencial elétrico através da membrana da mitocôndria, um aumento no ATP e finalmente a ativação da síntese dos ácidos nucléicos. Ficou demonstrado recentemente, que, em condições de irradiação apropriadas, o citocromo é um agente específico que pode ser ativado pela luz do laser de HeNe, sendo então considerado como foto-receptor mitocondrial [30]. A radiação do laser de HeNe estimula a transcrição citosólica e mitocondrial e a translação das proteínas [31, 32] e a síntese protéica nas células hepáticas [32]. Assim, torna-se claro que a terapia a laser deve ter uma interação relacionada não apenas com os sistemas energéticos biológicos, mas também na ativação de sinalizadores como os genes de fator de crescimento, as respostas imunológicas e de outros mecanismos essenciais, no contexto completo dos fenômenos biológicos. No presente trabalho (e em outros da mesma natureza) fica evidente que no uso do laser é muito importante que se otimize a dose e o tempo de tratamento, de forma a se atingir a combinação perfeita das condições mais favoráveis para o desenvolvimento das estruturas vasculares e de uma boa osteogênese (formação óssea). Esta atenção é um pré-requisito fundamental para a boa condução de um processo de regeneração estimulado.

A existência de várias estratégias que podem modular os mecanismos relacionados à angiogênese pode ser de grande importância para melhorar as condições de restauração em condições extremas, como, por exemplo, em pessoas idosas ou em pacientes com politraumatismos. A terapia a laser parece ser uma candidata promissora para estas aplicações,

pois tem o predicado de ser uma técnica de tratamento que emprega procedimentos não-invasivos, não patogênicos, não-químicos e não-térmicos. Fica também claro que pesquisas adicionais são necessárias para determinar com precisão os mecanismos envolvidos na promoção da angiogênese pela terapia a laser.

## 5. Referências

1. C. Kalka, T. Asahara, W. Krone and J.M. Isner, *Herz*. **25** (2000) 611.
2. L.L. Nguyen and A. D' Amore, *International Review of Cytology* **204** (2001) 1.
3. T. Mustonen and K. Alitalo, *J. Cell. Biol.* **129** (1995) 895.
4. M. Shibuya, *Adv. Cancer Res.* **67** (1995) 281.
5. I.G.F. Freitas, V. Baranauskas and M.A. Cruz-Höfling, *Appl. Surface Sci.* **154-155** (2000) 548.
6. I. Garavello-Freitas, V. Baranauskas, P.P. Joazeiro, C.R. Padovani, M. DalPai-Silva and M.A. Cruz-Höfling, (2001) (Submetido).
7. M.A. Cruz-Höfling, I. Garavello-Freitas, Z. Jingguo and V. Baranauskas (2001) (Submetido)
8. D.L. Streiner and G.R. Norman *Biostatistics- The Bare Essential Mosby-Year Book*, St. Louis, (1994). p 260.
9. M.A. Trelles and E. Mayayo, *Lasers Surg. Med.* **7** (1987) 36.
10. S. Saito and N. Shimizu, *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.* **111** (1997) 525.
11. N. Weiss and U. Oron, *Anat. Embryol.* **186** (1992) 497.
12. A. Bibikova and U. Oron, *Anat. Rec.* **241** (1995) 123.
13. C.S. Enwemeka, *Tissue Cell.* **42** (1992) 511.
14. G.K. Reddy, L. Stehno-Bittel and C.S. Enwemeka, *Lasers Surg. Med.* **22** (1998) 281.
15. A. Schindl, M. Schindl, L. Schindl, W. Jurecka, H. Honigsmann and F. Breier, *J. Am. Acad. Dermatol.* **40** (1999) 481.
16. S. Rochkind, M. Nissan, M. Alon, M. Shamir and K. Salame, *Lasers Surg. Med.* **28** (2001) 216.

17. K. Kawasaki and N. Shimizu, *Lasers Surg. Med.* **26** (2000) 282.
18. L.J. Walsh, *Aust. Dent.* **42** (1997) 247.
19. A. Bibikova, V. Belkin and U. Oron, *Anat. Embryol.* **190** (1994) 597.
20. A.D. Agaiby, L.R. Ghali, R. Wilson and M. Dayson, *Lasers Surg. Med.* **26** (2000) 357.
21. J.O. Funk, A. Kruse and H. Kirchner, *J. Photochem. Photobiol. B* **16** (1992) 347.
22. W. Yu, J.O. Naim and R.J. Lanzafame, *Lasers Surg. Med.* **6** (Suppl) (1994) 8.
23. W. Yu, J.O. Naim and R.J. Lanzafame, *Lasers Surg. Med.* **20** (1997) 56.
24. A.Khanna, L.R. Shankar, M.H.Keelan, R.Kornowski, M.Leon, J.Moses and N.Kipshidze, *Cardiovasc. Radiat. Med.* **1** (1999) 256.
25. N. Kipshidze, V. Nikolaychik, M.H. Keelan, L.R. Shankar, A. Khanna, R. Kornowski, M. Leon and J. Moses, *Lasers Surg. Med.* **28** (2001) 355.
26. J. Street, D. Winter, J.H. Wang, A. Wakai, A. McGuinness and H.P. Redmond, *Clin. Orthop.* **378** (2000) 224.
27. C.H. Cornell and J.M. Lane, *Clinical Orthopaedics and Related Research* **277** (1992) 297.
28. P. Wedlock, R.A. Shepard, C. Little and F. McBurney, *Physiol Behav.* **59** (1994) 445.
29. T. Yaakobi, L. Maltz, U. Oron, *Calc. Tiss. Intl.* **59** (1996) 297.
30. W. Yu, J.O. Naim and R.J. Lanzafame, *Lasers Surg. Med.* **20** (1997) 56.
31. D. Pastore, M. Greco and S. Passarella, *Int. Radiat. Biol.* **76** (2000) 836.
32. M. Greco, G. Guida, E.Perlino, E. Marra and E. Quagliariello, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **163** (1989) 1428.
33. R.A.Vacca, E. Marra, S. Passarella, V.A. Petragallo and M.Greco, *J. Photochem. Photobiol. B* **34** (1996) 197.

## Capítulo VII

### Considerações Finais

O estudo dos efeitos da aplicação de laser HeNe de baixa potência durante o reparo de lesões feitas no tecido ósseo, revelou resultados distintos de acordo com as diferentes doses e períodos de irradiação utilizados e do tipo de análise realizadas.

Apesar de existirem estudos relatando os efeitos benéficos da terapia por laser de baixa potência em processos de reparo de tecidos biológicos, os mecanismos fisiológicos envolvidos ainda são pouco entendidos.

Em nosso modelo experimental o período de irradiação com laser de baixa potência durante 7 dias consecutivos, mostrou ser a mais eficaz na aceleração da osteogênese e angiogênese, tanto com doses de  $31,5 \text{ Jcm}^{-2}$  como de  $94,5 \text{ Jcm}^{-2}$ , sendo que a dose maior apresentou melhores resultados. Dose de  $3,15 \text{ Jcm}^{-2}$  não provocou nenhum efeito sobre o reparo da lesão. Tal fato foi observado tanto em relação ao arranjo das fibras de colágeno da matriz óssea, analisadas por Microscopia eletrônica de varredura e por Microscopia de força atômica, como pelo aumento significativo da área trabecular neo-formada e do número de vasos sanguíneos.

Os resultados obtidos pelas diferentes análises realizadas apontam uma sólida indicação de que as alterações provocadas pelos efeitos da irradiação por laser promovem uma ação estimulante no reparo da lesão durante a primeira semana de irradiação e uma ação inibitória na segunda semana. Deve ser considerado que um duplo mecanismo possa estar envolvido na interação da irradiação eletromagnética do laser com processos de regeneração do tecido ósseo. O primeiro mecanismo, foto-estimulatório, pode estar relacionado com a ativação de osteoblastos na produção da matriz óssea, promovendo o aumento significativo da área trabecular e do número de vasos sanguíneos na primeira semana de irradiação consecutiva. Num estágio seguinte, um mecanismo foto-inibitório deve diminuir a atividade osteoblástica e concomitantemente estimular a atividade osteoclástica, promovendo assim, a reabsorção da matriz óssea e inibindo a proliferação de vasos sanguíneos na segunda semana de irradiação.

É possível que mecanismos fisiológicos do tecido ósseo, influenciados pela foto-estimulação ou foto-inibição, possam acelerar ou inibir a osteogênese e a angiogênese e que estes não são apenas específicos em um processo biológico particular, mas envolvem processos biológicos gerais, como, por exemplo, aumento da produção de fatores de crescimento, VEGF e de fibroblastos, ativando a síntese dos ácidos nucléicos.

A terapia por laser de baixa potência parece ser promissora na aceleração do reparo de lesões em diferentes tecidos biológicos, pois tem o atributo de ser uma técnica de tratamento que emprega procedimentos não-invasivos, não-patogênicos, não-qímicos e não-térmicos.

Este estudo está em conformidade com os relatos encontrados na literatura a respeito dos efeitos fisiológicos do laser de baixa potência nos tecidos biológicos, entretanto maiores elucidacões são necessárias, pois alteracões na dose e no período de irradiação podem não apenas deixar de produzir os efeitos positivos desejáveis, mas podem promover danos ao tecido irradiado.