

ALESSANDRA SCHLEDER DA ROSA

**EFEITOS DA RADIAÇÃO LASER DE BAIXA POTÊNCIA COM
COMPRIMENTOS DE ONDA DE 660NM E 904NM EM UM MODELO
EXPERIMENTAL DE OSTEOARTROSE**

CAMPO GRANDE
2009

ALESSANDRA SCHLEDER DA ROSA

**EFEITOS DA RADIAÇÃO LASER DE BAIXA POTÊNCIA COM
COMPRIMENTOS DE ONDA DE 660NM E 904NM EM UM MODELO
EXPERIMENTAL DE OSTEOARTROSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Paulo de Tarso Camillo de Carvalho

CAMPO GRANDE
2009

FOLHA DE APROVAÇÃO

ALESSANDRA SCHLEDER DA ROSA

**EFEITOS DA RADIAÇÃO LASER DE BAIXA POTÊNCIA COM
COMPRIMENTOS DE ONDA DE 660NM E 904NM EM UM MODELO
EXPERIMENTAL DE OSTEOARTROSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de mestre.

Resultado_____

Campo Grande (MS), 21 de maio de 2009.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo de Tarso Camillo de Carvalho
Instituição: UNIDERP/ UFMS

Prof^a.Dr^a. Iandara Schettert Silva
Instituição: UNIDERP/UFMS

Prof^a.Dr^a. Doroty Mesquita Dourado
Instituição: UNIDERP/ Anhanguera Educacional

DEDICATÓRIA

Aos meus pais: **Cleci e Ribas**. Não existem palavras para expressar o amor que sinto por vocês. Obrigada pela formação pessoal e profissional que me proporcionaram, e por todo apoio que me deram durante toda minha vida para que eu alcançasse meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me amparado durante essa caminhada.

A toda minha família, por me apoiar e torcer pelas minhas conquistas.

Ao Prof. Dr. Paulo de Tarso Camillo de Carvalho, meu orientador, a quem sou grata por acreditar neste trabalho, pelo apoio, incentivo e por abrir as portas de um grande sonho.

A Ana, técnica do Laboratório de Histopatologia da Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal/ Anhanguera , pelo auxílio na preparação das lâminas histológicas.

A Professora Márcia Maria Silva e ao Professor Mestre Gilberto Facco pela paciência e dedicação na leitura das lâminas.

Ao Professor Mestre Daniel Martins Pereira, pelo auxílio na análise estatística dos resultados.

Ao funcionário do Biotério Central da UNIDERP, Adalto, pelo apoio técnico excepcional.

Ao amigo e colega Rogério Fernando Fontes Padilha, pelo inestimável apoio e carinho em todos os momentos e pelo auxílio na fase experimental do trabalho.

Aos colegas da pós graduação, Rodrigo e Renato, pela constante ajuda e cooperação e pelo privilégio de sua amizade.

A todos os professores, colegas e funcionários da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pelo convívio e ensinamentos.

Aos colegas e funcionários da Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal (UNIDERP/Anhanguera), pelo apoio e carinho.

A Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pela confiança me proporcionando o ingresso na carreira científica.

A Fundação Manoel de Barros, pelo apoio financeiro a esta pesquisa.

Por fim, a uma pessoa muito especial, grande amiga e colega Aline Ferreira dos Santos por ter me ajudado e apoiado em toda fase experimental do trabalho. Por compartilhar comigo dos momentos alegres e difíceis nessa etapa de minha vida, sem sua ajuda não teria conseguido.

"Não basta ensinar ao homem uma especialidade, porque ele se tornará, assim, uma máquina utilizável, mas não uma personalidade.

É necessário que adquira um sentimento, um senso prático daquilo que é belo, do que é moralmente correto. A não ser assim, ele assemelhará, com seus conhecimentos profissionais, mais a um cão ensinado do que uma criatura harmoniosa e desenvolvida. Deve aprender a compreender, portanto, as motivações dos homens, suas quimeras e seu lugar exato em relação aos seus próximos e à comunidade."

EINSTEIN

RESUMO

Rosa AS. Efeitos da radiação laser de baixa potência com comprimentos de onda de 660nm e 904nm em um modelo experimental de osteoartrose. Campo Grande; 2009. [Dissertação- Universidade Federal do Mato Grosso do Sul].

O objetivo deste estudo foi analisar a influência da radiação laser de baixa potência, com comprimentos de onda de 660nm e 904nm em um modelo experimental de osteoartrose. A amostra foi composta de 54 ratos machos adultos Wistar, divididos em três grupos denominados G1, G2 e G3. Para a indução da lesão foram realizadas três infiltrações no joelho direito, com 10 µl de solução de papaína 4% e adicionado 10 µl de solução de cisteína. Após duas semanas da última infiltração, o grupo G1 foi tratado com laser 660nm, 6J/ cm², 6 pontos ao redor da articulação do joelho, 16 segundos cada ponto. O grupo G2 foi tratado com o laser 904nm, 288 segundos, 6J/cm² em 4 pontos, e o grupo G3 adotado como grupo controle. Os dados foram submetidos à análise estatística, utilizando o teste de Kruskal Wallis e o nível de significância estabelecido em $p < 0,05$. Quanto ao tipo de revestimento da membrana sinovial encontrado, houve diferença estatisticamente significativa entre 7 e 14 dias ($p < 0,05$) no grupo G2, e no período de 14 dias, entre o grupo G1 e G2 ($p < 0,05$). Quanto à formação de novos vasos houve diferença estatisticamente significativa quando comparado G1 com G3 no período de 7 e 21 dias, e G2 e G3 em 21 dias. A formação de tecido fibrótico também foi maior em G3 ($p < 0,05$). Conclui-se que a laserterapia estimula a angiogênese e diminui a formação de fibrose no reparo do modelo de lesão, principalmente com o laser de comprimento de onda de 904nm.

Palavras-chaves: cartilagem articular; osteoartrose; laser de baixa potência; bioestimulação

ABSTRACT

Rosa AS. Effects of low power laser radiation with 660nm and 904nm wave length in a experimental model of osteoarthritis. Campo Grande; 2009. [Dissertation-Federal University of Mato Grosso do Sul].

The objective of this study was to analyze the influence of low power laser radiation with 660nm and 904nm wave length in a experimental model of osteoarthritis. The sample was composed by 54 Wistar male adult rats divided into three groups called G1, G2 and G3. In order to induce the lesion three infiltrations with 10 µl of papain 4% solution and adding 10 µl of cysteine solution were carried out in the right knee. 2 weeks after the last infiltration, group G1 was treated with 660nm, 6J/ cm² laser, 6 spots around the knee articulation, 16 seconds each spot. Group G2 was treated with 904nm laser, 288 seconds, 6 J/cm² in 4 spots and group G3 was adopted as control group. The data were submitted to statistic analysis using the Kruskal Wallis test and the level of significance established at $p < 0.05$. As for the kind of revestment of synovial membrane found, there was statistically significant difference between 7 and 14 days ($p < 0.05$) in group G2, and in the period of 14 days between groups G1 and G2 ($p < 0.05$). As far as the formation of new vessels is concerned there was statistically significant difference when G1 was compared to G3 in the period of 7 and 21 days and G2 to G3 in 21 days. The formation of fibrotic tissue was also higher in G3 ($p < 0.05$). We concluded that laser therapy stimulates angiogenesis and reduces the fibrosis formation in experimental model of osteoarthritis, mainly with the use of laser with 904nm wave length.

Keywords: articular cartilage; osteoarthrosis; low power laser; biostimulation.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Tipo de revestimento da membrana sinovial constituinte entre os grupos Controle, 660 e 904. Valores expressos em média e desvio padrão. Teste de Kruskal Wallis 57
- Tabela 2** – Intensidade de células inflamatórias entre os grupos Controle, 660 e 904. Valores expressos em média e desvio padrão. Teste de Kruskal Wallis 58
- Tabela 3** – Vasos neoformados entre os grupos Controle, 660 e 904. Valores expressos em média e desvio padrão. Teste de Kruskal Wallis..... 58
- Tabela 4** – Avaliação da intensidade de Fibrose entre os grupos Controle, 660 e 904. Valores expressos em média e desvio padrão. Teste de Kruskal Wallis..... 59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura tripla hélice da molécula de colágeno.....	24
Figura 2 - Formação do colágeno tipo II.....	25
Figura 3 - Representação das zonas da cartilagem articular.....	26
Figura 4 - Interação da luz laser com os tecidos.....	36
Figura 5 - Esquemática da lei de Arndt-Schultz.....	38
Figura 6 - Condições de alojamento dos animais.....	46
Figura 7 - Organograma dos grupos experimentais.....	47
Figura 8 - Micropipeta.....	48
Figura 9 - Infiltração da solução indutora.....	49
Figura 10 - Protocolo de irradiação do grupo G1.....	50
Figura 11 - Photon Lase III.....	50
Figura 12 - Aplicação do Laser 660nm.....	51
Figura 13 - Protocolo de irradiação do grupo G2.....	51
Figura 14 - Aplicação do Laser 904nm	52
Figura 15 - Laser 904 nm.....	52
Figura 16 -Fotomicrografia de lâmina obtida dos animais do grupo I (tratado com laser de comprimento de onda de 660nm), após sete dias da indução: observar células inflamatórias_(cabeça de setas), membrana sinovial (Ms) e intensa proliferação de vasos sanguíneos_neoformados(Vb). Hematoxilina e Eosina - Barra de escala 20µm.....	60
Figura 17- Fotomicrografia de lâmina obtida dos animais do grupo I (tratado com laser de comprimento de onda de 660nm), após sete dias da indução: observar a presença de fibrose (FC), membrana sinovial (Msi) e intensa proliferação de vasos sanguíneos neoformados(Vb). Tricrômico de Masson- Barra de escala 20µm.....	60
Figura 18- Fotomicrografia de lâmina obtida dos animais do grupo II (tratado com laser de comprimento de onda de 904nm), após sete dias da indução: observar a presença de revestimento descontínuo,membrana sinovial (Msi) e intensa proliferação de vasos sanguíneos neoformados(Vb), células epitelioides Hematoxilina e Eosina - Barra de escala 20µm.....	61
Figura 19- Fotomicrografia de lâmina obtida dos animais do grupo II (tratado com laser de comprimento de onda de 904nm), após sete dias da indução: observar a presença de revestimento descontínuo, membrana sinovial e intensa proliferação de	

vasos sanguíneos neoformados(Vb), células epitelioides Hematoxilina e Eosina - Barra de escala 20µm.....	61
Figura 20- Fotomicrografia de lâmina obtida dos animais do grupo II (tratado com laser de comprimento de onda de 904nm), após sete dias da indução: observar a camada fibrosa da cápsula articular e presença de fibrose (FC). Tricrômico de Masson- Barra de escala 20µm.....	62
Figura 21- Fotomicrografia de lâmina obtida dos animais do grupo III (não tratados), após sete dias da indução:cavidade articular normal. Hematoxilina e Eosina - Barra de escala 20µm.....	62
Figura 22- Montagem de fotomicrografia de lâmina obtida dos animais do grupo III (não tratados), após sete dias da indução: Observar a presença fibrose (FC). Tricrômico de Masson-Barra de escala 20µm.....	63
Figura 23- Fotomicrografia de lâmina obtida dos animais do grupo I (tratado com laser de 660nm), após quatorze dias da indução: Observar a presença de células epitelioides (seta longa), vasos sanguíneos neoformados e membrana sinovial, Hematoxilina e Eosina - Barra de escala 20µm.....	63
Figura 24- Montagem de fotomicrografia de lâmina obtida dos animais do grupo I(tratado com laser de 660nm), após quatorze dias da indução: Observar fibrose (FC),vasos neo-formados(VB), fibroblastos(cabeça de seta). Tricrômico de Masson- Barra de escala 20µm.....	64
Figura 25- Fotomicrografia de lâmina obtida dos animais do grupo II (tratado com laser de comprimento de onda de 904nm), após quatorze dias da indução: Observar a presença de revestimento sinovial e células epitelioides . Hematoxilina e Eosina - Barra de escala 20µm.....	64
Figura 26-Fotomicrografia de lâmina obtida dos animais do grupo II (tratado com laser de comprimento de onda de 904nm),após quatorze dias da indução: Observar a presença de revestimento sinovial e células epitelioides . Hematoxilina e Eosina - Barra de escala 20µm.....	65
Figura 27- Montagem de fotomicrografia de lâmina obtida dos animais do grupo II (tratado com laser de comprimento de onda de 904nm), após quatorze dias da indução: Observar a presença fibrose (FC), vasos neoformados(VS) e camada fibrosa da cápsula. Tricrômico de Masson- Barra de escala 20µm.....	65

Figura 28- Fotomicrografia de lâmina obtida dos animais do grupo III (não tratados), quatorze dias da indução: Observar a presença fibrose (FC), tecido conjuntivo (seta TC), revestimento sinovial (MS), arranjo epitelial (seta Ae). Hematoxilina e Eosina - Barra de escala 20µm.....	66
Figura 29- Fotomicrografia de lâmina obtida dos animais do grupo III (não tratados), após quatorze dias da indução: Observar a presença de angiogênese (VS) e o revestimento sinovial (setas). fibrose (FC). Hematoxilina e Eosina - Barra de escala 20µm.....	66
Figura 30- Montagem de fotomicrografia de lâmina obtida dos animais do grupo III (não tratados), após quatorze dias da indução: Observar a presença fibrose (FC), fibroblastos (cabeça de setas) Tricrômico de Masson- Barra de escala 20µm.....	67
Figura 31- Fotomicrografia de lâmina obtida dos animais do grupo I (tratado com laser de 660nm), após vinte e um dias da indução: Observar a presença de células epitelíoides (seta), vasos sanguíneos neoformado (Vb). Hematoxilina Eosina – Barra de Escala 20µm.....	67
Figura 32- Montagem de fotomicrografia de lâmina obtida dos animais do grupo I (tratado com laser de 660nm), após vinte e um dias da indução: Observar a presença fibrose (FC), Tricrômico de Masson- Barra de escala 20µm.....	68
Figura 33- Fotomicrografia de lâmina obtida dos animais do grupo II (tratado com laser de comprimento de onda de 904nm), após vinte e um dias da indução: Observar a presença de revestimento sinovial, células epitelíoides e vasos sanguíneos (Vs) . Hematoxilina e Eosina - Barra de escala 20µm.....	68
Figura 34- Montagem de fotomicrografia de lâmina obtida dos animais do grupo II (tratado com laser de 904nm), após vinte e um dias da indução: Observar a presença fibrose (FC), vasos neoformados (VS). Tricrômico de Masson- Barra de escala 20µm.....	69
Figura 35- Fotomicrografia de lâmina obtida dos animais do grupo III (não tratados), após vinte e um dias da indução: Observar a presença de revestimento sinovial, células epitelíoides (seta), membrana sinovial (Ms). Hematoxilina e Eosina - Barra de escala 20µm.....	69

Figura 36- Montagem de fotomicrografia de lâmina obtida dos animais do grupo III (não tratados), após vinte e um dias da indução: Observar a presença fibrose (FC), membrana sinovial(Ms). Tricrômico de Masson- Barra de escala 20µm.....

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UNIDERP	Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso de Sul
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animais
n	número
G1	grupo tratado com laser 660nm
G2	grupo tratado com laser 904nm
G3	grupo controle
M	concentração molar
DE	densidade de energia
EDTA	Etilenodiaminotetracetato de tetrasódio
Ph	potencial hidrogeniônico
°C	grau Celsius
HE	Hematoxilina-Eosina
TM	Tricrômico de Masson
ANOVA	análise de variância
ECM	matriz extracelular
AH	ácido hialurônico
PGR 4	proteoglicano 4
OA	osteoartrose, osteoartrite
MMP	metaloprotease
TIMP	Inibidor Tecidual da Metaloprotease
TIMP 1	Inibidor Tecidual da Metaloprotease 1
TIMP 2	Inibidor Tecidual da Metaloprotease 2
TIMP 3	Inibidor Tecidual da Metaloprotease 3
IL-1	interleucina 1
TNF	fator de necrose tumoral
TGF beta	fator de crescimento transformador beta
BMP-2	proteína morfogenética 2
IGF 1	insulina-like
b- FGF	fator de crescimento básico de fibroblastos
MMP-1	colagenase-1
MMP-8	colagenase-2
MMP-13	colagenase-3
MMP-2	gelatinase A
MMP-9	gelatinase B
MMP-3	estromelisina 1
MMP-10	estromelisina 2

MMP-7	matrilisina 1
MMP-11	estromelisina 3
MMP-12	macrófago elastase
IL-4	interleucina 4
Pro-MMP 1	pro-colagenase
Pro-MMP 3	pro-estromelisina
RNA	ácido ribonucléico
NO	óxido nítrico
LASER	Luz Amplificada por Emissão Estimulada de Radiação
HILT	High-Intensity Laser Treatment
LILT	Low-Intensity Laser Treatment
DNA	Difosfato de adenosina
LBP	Laser de Baixa Potência
ATP	adenosina trifosfato
HeNe	Helio- Neônio
GaAl	Gálio-alumínio
AsGaAl	Arsenieto de Gálio-alumínio
HeNeAs	Arsenieto de hélio-neônio
AsGa	Arsenieto de Gálio

LISTA DE SÍMBOLOS

cm	centímetros
nm	nanômetro
mW	miliWatts
mJ/ cm ²	milijoule por centímetro ao quadrado
β	beta
ml	mililitro
mg	micrograma
g	grama
μ l	microlitro
μ m	micrômetro
mW	miliWatts
Kg	kilograma
cm ²	centímetro ao quadrado
mm	milímetro
α	alfa
%	porcentagem
<	menor
H ⁺	íon hidrogênio
Na ⁺	íon sódio
K ⁺	íon potássio
Ca ⁺	íon cálcio
+	adição

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 Tecido Cartilaginoso	23
2.1.2 Componentes.....	21
2.1.3 Processo de Degeneração Articular.....	26
2.1.4 Metabolismo da Cartilagem Artrósica.....	29
2.2 Lasers de Baixa Potência	33
2.2.1 Princípios Físicos do Funcionamento do Laser.....	34
2.2.2 Características da Radiação Laser.....	34
2.2.3 Penetração da Luz nos Tecidos.....	34
2.2.4 Efeitos da Laserterapia nos Tecidos Biológicos.....	37
2.3 Lasers no Tecido Cartilaginoso	42
3 OBJETIVOS	45
4 MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1 Animais de Experimentação	46
4.2 Grupos Experimentais	47
4.3 Procedimentos	47
4.3.1 Anestesia e Indução das Lesões Osteocondrais	47
4.3.2 Protocolos de Irradiação	49
4.3.3 Eutanásia dos Animais e Obtenção do Material para Histologia.....	53
4.4 Procedimentos para Preparo do Material Histológico	53
4.4.1 Coloração e Identificação das Lâminas.....	54
4.4.2 Avaliação do Material Histológico.....	55
4.5 Análise Estatística	55
5 RESULTADOS	57
6 ARTIGO	71
6.1 Effects of Low Level Power Laser Radiation With 660nm and 904nm Wave Length in a Experimental Model of Osteoarthritis. Lasers Med Sci (submetido	

em mar/2009)

7 DISCUSSÃO	91
8 CONCLUSÕES	97
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
ANEXO	107

1 INTRODUÇÃO

Existem diversas alterações do tecido cartilaginoso, entre elas as doenças clínicas como pós traumatismos, gota, artrite reumatóide, osteoartrose, entre outras. Comparando-se com os demais tecidos conjuntivos, a cartilagem articular é um dos tecidos que mais freqüentemente sofrem processo degenerativo, e seu processo de reparação é muitas vezes lento e ineficiente (NAKAMURA *et al.* 2008).

Devido a fatores bioquímicos, genéticos e mecânicos os condrócitos são levados a modificar seu comportamento metabólico. Os condrócitos multiplicam-se no local da lesão e aumentam seu mecanismo de síntese, na tentativa de regeneração dessa lesão, porém predomina a ação das proteases, que iniciam o processo degradativo da cartilagem. Os fragmentos de proteoglicanos e de colágeno caem no líquido sinovial e, estimulam os sinoviócitos que passam a sintetizar mais citocinas catabólicas. Estas vão atuar juntamente com os condrócitos, aumentando a produção das proteases, fechando-se assim o ciclo do processo artrósico (GLANSBEEK *et al.*,1997;GOLDRING, 2000; FELICE *et al.*,2002).

A resposta à lesão ou trauma é geralmente dividida em três fases distintas: necrose, inflamação e reparo, sendo que o reparo compreende diversos processos dentre eles a proliferação celular e a síntese dos elementos que constituem a matriz extracelular, como as fibras colágenas, elásticas e as fibras reticulares (MANKIN, 1982; PUGLIESE *et al.*,2003).

A capacidade de regeneração da cartilagem é um tópico controverso e tem sido, há muitos anos, tema de pesquisas e investigações. Até há pouco tempo acreditava-se que a cartilagem possuía pouca capacidade de regeneração, porém alguns trabalhos comprovaram que esse tecido é metabolicamente ativo tendo, portanto, capacidade para regenerar-se (PUGLIESE *et al.*,2003; BJORDAL *et al.*,2003; WAKITANI *et al.*, 2008).

A regeneração ocorre pela substituição do tecido lesado por fibrocartilagem ou pela mitose dos condrócitos. Na literatura são citados diversos métodos para promover a regeneração do tecido cartilaginoso, dentre eles: perfurações ou abrasões até o osso subcondral, transplantes de condrócitos ou células mesenquimais, movimentação passiva contínua logo após a lesão, transplante de matriz sintética, exposição da articulação a correntes elétricas, hormonioterapia e a laserterapia (CAFALLI *et al.*,1993;TORRICELLI *et al.*,2001; SCHURMAN;SMITH, 2004; LIN *et al.*,2004).

A utilização do laser tem crescido amplamente nas diversas áreas da saúde, e as evidências científicas dos seus efeitos biológicos positivos têm sido demonstradas na literatura. Com intuito de utilizar essa avançada modalidade terapêutica, numerosas pesquisas têm sido feitas nessa área, com o propósito de conhecer a interação e os efeitos dessa radiação nos diferentes tecidos biológicos e estabelecer parâmetros seguros para sua aplicação clínica.

Vários são os efeitos positivos do laser de baixa potência observados em estudos experimentais e clínicos como a bioestimulação, tais como: proliferação celular, incremento da microcirculação, neoformação vascular, estimulação da produção de colágeno pelos fibroblastos e síntese de colágeno (BAXTER, 1994; KLEBANOV *et al.*, 2001; VINCK *et al.*, 2003; IHSAN, 2005; CARVALHO *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2008).

A literatura tem demonstrado os efeitos analgésicos, bioestimulante, antiinflamatório, regenerativo e de cicatrização da radiação laser nos diferentes tecidos, e a aplicação clínica desse recurso é diversa (TAM, 1999; NICOLAU *et al.*, 2003; TARTARUNAS, 1998; MEIRELES *et al.*, 2008).

A aplicabilidade da terapia laser de baixa potência é vasta nos diferentes tecidos e seus efeitos descritos na literatura são amplos. Entretanto alguns tecidos apresentam ainda controvérsias e dificuldades em relação ao seu processo de reparo, como é o caso do tecido cartilaginoso. Entre as várias opções para recuperar o equilíbrio metabólico da articulação artrósica podem ser considerados tratamentos não invasivos como a radiação laser de baixa potência, que por ser uma modalidade não invasiva torna-se de grande interesse.

Estudos realizados sobre os efeitos do laser nas lesões osteocartilaginosas são diferentes e com resultados controversos. Tem-se observado em alguns trabalhos o efeito bioestimulante do laser de baixa potência, e tanto a bioestimulação como a bioinibição parecem estar relacionadas com o comprimento de onda e com a energia gerada pela fonte de laser (VLADIMIROV; OSIPOV; KLEBANOV, 2003; CAMPANA *et al.*, 2004; ANDREU; ZALDIVAR, 1996; CAFFALLI *et al.*, 1993; LIN *et al.*, 2004; JIA, GUO, 2004).

Nota-se uma discrepância na literatura em relação aos parâmetros utilizados do laser de baixa potência e quanto aos efeitos desse recurso nesse tecido.

Desse modo, são necessários novos trabalhos com o objetivo de avaliar os efeitos do laser de baixa potência na regeneração da articulação artrósica,

objetivando dessa forma um tratamento mais eficaz, não invasivo e um melhor entendimento dos mecanismos de ação desse recurso, podendo fornecer dados importantes para uma aplicação clínica futura, principalmente dos parâmetros utilizados.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Tecido Cartilaginoso

2.1.2 Componentes

O tecido cartilaginoso, ou cartilagem, é um tipo de tecido conjuntivo cuja rigidez é intermediária entre a do tecido ósseo e a do tecido conjuntivo denso. Distinguem-se três tipos de cartilagem hialina, elástica e fibrosa, as quais com poucas diferenças são formadas basicamente pelos mesmos elementos constituintes.

A cartilagem é, fundamentalmente, formada por grupos de células, denominado condrócitos, que ficam imersos em substância intercelular amorfa, constituída por proteoglicanos (proteínas + glicosaminoglicanas), colágeno e elastina, esta, que está presente somente na cartilagem elástica (JAMES; UHL, 2001).

O tecido cartilaginoso é altamente diferenciado, avascular e ocupado por vasta matriz extracelular (ECM), que é sintetizada pelos condrócitos e constituída principalmente por água e macromoléculas, sustentada por uma arquitetura fibrilar, formada basicamente por moléculas de colágeno capazes de se modular em segundo a demanda biomecânica exigida (POOLE *et al.*, 2001).

Os glicosaminoglicanos sulfatados são o sulfato de condroitina e o querato sulfato e os não sulfatados são o ácido hialurônico. Existem outros que se ligam a uma proteína de ligação formando os agregans. Os proteoglicanos, os colágenos e os condrócitos conectam-se através das glicoproteínas, como a fibronectina, a condronectina, a integrina e outras (SANDELL; AIGNER, 2001; YOUNG *et al.*, 2005; POOLE *et al.*, 2001).

O ácido hialurônico (AH) é sintetizado pelos condrócitos e protege as células e a estrutura anatômica contra os mecanismos de sobrecarga, juntamente com as características viscoelásticas, protegendo, ainda as células contra a perda de proteoglicanos e contra a morte dos condrócitos. A infiltração de AH induz ao decréscimo do processo inflamatório e do processo proliferativo da sinóvia (ROTH *et al.*, 2005; REZENDE *et al.*, 2000).

O endoesqueleto da cartilagem hialina é composto por fibrilas de colágeno que formam uma rede extensiva da matriz pericelular, territorial e interterritorial.

Essas fibrilas variam de diâmetro, aproximadamente de 20nm na zona superficial a 70 a 120nm na zona profunda. A matriz fibrilar da cartilagem é composta principalmente de colágeno representando cerca de 46,1% a 63,7% do peso tecidual seco, e o principal tipo encontrado é o colágeno tipo II, com, pelo menos, dez tipos adicionais, incluindo os tipos III, VI, IX, X, XI e XIII (LOHMANDER, 1994; VELOSA *et al.*, 2007).

Na cartilagem articular, o colágeno tipo IV representa somente 1% de todo colágeno articular, une a rede de colágeno e estabiliza o colágeno e os proteoglicanos da região pericelular (HORIKAWA *et al.*, 2004).

As fibras colágenas são constituídas por uma glicoproteína estrutural denominada colágeno, que tem composição de aminoácidos bem característica. A molécula do colágeno é constituída por três cadeias, denominadas cadeias α . Essas três cadeias são enroladas uma nas outras formando uma tripla hélice (POOLE *et al.*, 2001).

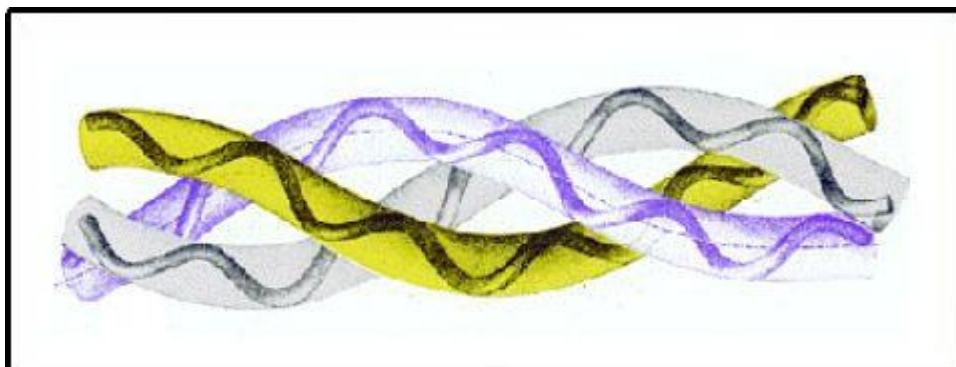


Figura 1: Estrutura tripla hélice da molécula de colágeno
Fonte: Adaptado por Ribeiro, 2000.

O colágeno mais abundante presente na cartilagem articular, o do tipo II, é homotrímérico, ou seja, formado por três cadeias α_1 do tipo II. Os tipos IX e XI, embora representem somente 5% a 10% do total de colágeno da cartilagem, são extremamente importantes na organização e estabilização das redes de fibrilas do tipo II, uma vez que o colágeno tipo XI é fundamental na fibrilogênese, regulando o diâmetro da fibrila heterotípica de colágeno; o tipo IX colabora para manter a integridade e coesão da matriz cartilaginosa, pois faz ligações cruzadas com o colágeno tipo II, na superfície dessa fibrila, além de interagir com outras moléculas

da matriz (HOLLANDER *et al.*,1995; VELOSA;TEODORO;YOSHINARI,2003; SCULLY *et al.*, 2001).

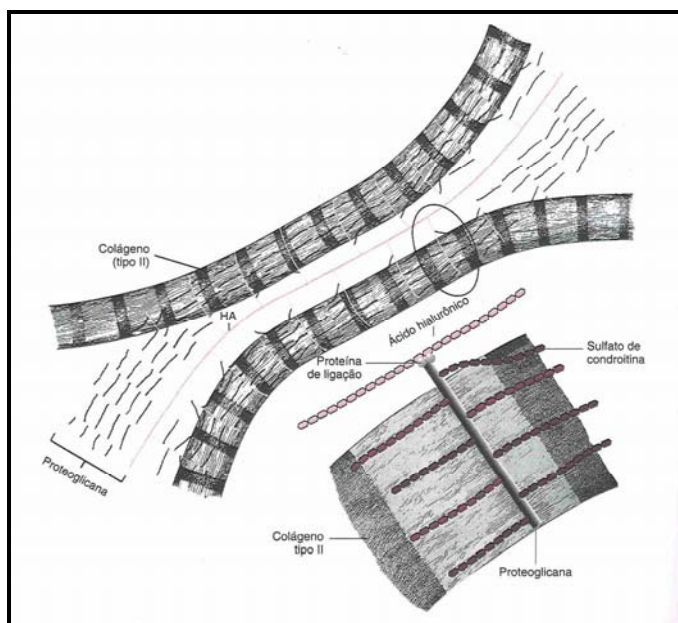


Figura 2: formação do colágeno tipo II
Fonte: Junqueira, Carneiro; 2000

O colágeno tipo XI é um heterotrímero constituído por três cadeias α distintas, $\alpha 1$ (XI), $\alpha 2$ (XI) e $\alpha 3$ (XI). É altamente suscetível à ação de outra metaloproteinase, a gelatinase, e não sendo susceptíveis as metaloproteinases clássicas. Em um estudo foi demonstrado que existe diferença no perfil molecular das cadeias de colágeno tipo XI nas cartilagens provenientes de coelhos com osteoartrose, sugerindo uma grande participação deste colágeno para o aumento ou desenvolvimento do processo degenerativo (BUTTLE; BRAMWELL; HOLLANDER, 1995; ROUGHLEY, 2001; VELOSA; TEODORO; WITZEL; YOSHINARI, 1999).

A cartilagem articular também tem uma organização lamelar composta de quatro zonas: zona superficial, zona de transição, zona radial e zona calcificada. O número de proteoglicanos aumenta e a quantidade de água diminui da zona superficial para a profunda (JAMES; UHL, 2001).

Na zona superficial, os condrócitos são alongados e alinhados, paralelos à superfície e somente nessa camada eles sintetizam uma molécula chamada lubricina e são rodeados por fibrilas de colágeno. Na zona radial, os condrócitos são mais circulares e uma extensiva matriz extracelular rica em agregans. E por fim, na

zona calcificada, os condrócitos são hipertróficos e sintetizam colágeno tipo X, que pode calcificar a matriz (POOLE *et al.*, 2001).

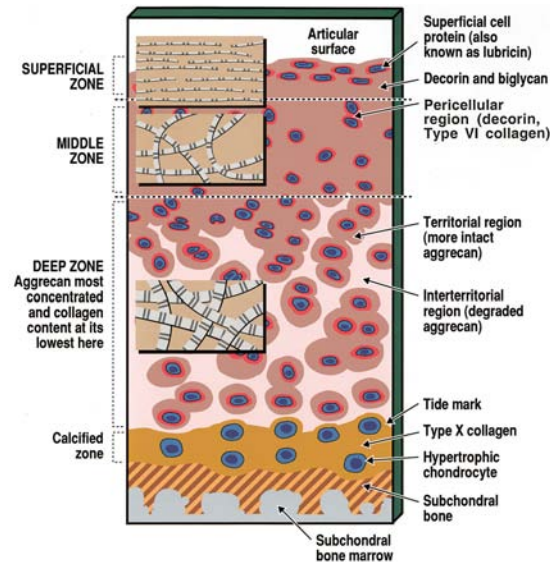


Figura 3: Representação das zonas da cartilagem articular
Fonte: Poole *et al.*, 2001

Dentro da cavidade articular há o líquido sinovial, que funciona como um lubrificante natural, diminuindo o atrito articular, através da contribuição dos proteoglicanos 4 (PGR 4), ácido hialurônico e superfície ativa de fosfolípidios. Esses lubrificantes são secretados pelos sinoviócitos e condrócitos, estando concentrados no espaço sinovial. As células da sinóvia formam uma camada descontínua, separadas por fendas intercelulares. A matriz extracelular nessas fendas contém colágeno tipo I, III e V, ácido hialurônico, sulfato de condroitina, biglicano, decorina e fibronectina (BLEWIS, 2007).

2.1.3 Processo de Degeneração Articular

A osteoartrose (OA) foi considerada uma doença degenerativa que fazia parte do processo de envelhecimento natural. Entretanto, atualmente, é considerado um processo dinâmico de intensa atividade metabólica das células da cartilagem articular, que induz aumento da produção de elementos estruturais, na tentativa de reparar a perda de componentes degradados pela patologia. Quando a atividade de regeneração tecidual não for mais capaz de superar o processo de degradação dos componentes matriciais, ocorre um estado de insuficiência osteocartilaginosa e

consequente remodelamento do osso subcondral, concepção que atualmente melhor define a osteoartrose (VELOSA; TEODORO; YOSHINARI, 2003; MURAT *et al.*, 2007; VELOSA *et al.*, 2007).

As lesões de cartilagem desenvolvem-se pelo resultado do desequilíbrio do processo de remodelação, possivelmente causado pela falha da superfície articular em manter sua “incongruência fisiológica” normal. A destruição desse tecido não pode ser explicada somente por mecanismos locais das articulações, pois em algumas patologias hereditárias, como a ocronose, a lesão condral ocorre em consequência de uma desordem metabólica sistêmica. A osteoartrose está muitas vezes associada aos idosos, relacionando a idade com o decréscimo da celularidade nesse tecido (MIRON *et al.*, 1999; MEACHIN, 2001; CLEMENTS *et al.*, 2001; AHMED, STANFORD, KANDEL, 2007).

Os produtos da degradação da matriz extracelular elevam os níveis das proteases, do substrato ou de ambos, possivelmente regulando a atividade das citocinas. Os fragmentos de proteína da matriz extracelular e da fibronectina aumentam a produção das citocinas e induzem os eventos de supressão da síntese da matriz e aumentam a liberação das metaloproteinases (HOMANDBERG, 2001).

A fibronectina está presente, em pequenas concentrações, na cartilagem normal, aumentando sua concentração na cartilagem artrósica. Os fragmentos de fibronectina ou de outras moléculas de tecido danificado que ficam acumulados na articulação artrósica, podem induzir a expressão de metaloproteinase, a degradação da matriz nos condrócitos e estimular a produção local de citocinas inflamatórias como a interleucina-1 (SANDELL; IGNER, 2001; LOHMANDER, 1994; ROUGHLEY, 2001).

As substâncias, que possuem capacidade de degradação, compõem-se das metaloproteases (MMPs) da matriz e citocinas pro-inflamatórias, secretadas pelas células sinoviais e condrócitos; essas substâncias parecem iniciar o processo de degradação da cartilagem na artrose. A síntese de MMP tem sua ativação em vários níveis, uma vez ativadas e em condições normais, que por sua vez ativa os inibidores de MMP derivados do plasma (2 - macroglobulina) e, também, o inibidor tissular da MMP (TIMPs - Inibidor Tecidual das Metaloproteases). Os mais importantes inibidores das metaloproteases são os inibidores teciduais das metaloproteases (TIMP1, TIMP2 e TIMP3), que se ligam à forma ativa da enzima, formando complexos na proporção de 1:1, e, desse modo, bloqueando sua

atividade. O aumento na síntese e liberação das MMPs, sem seus respectivos inibidores, culmina na degradação cartilaginosa (YOUNG, 2005; XU *et al.*, 2008).

A interleucina 1 (IL1) é a mais importante no processo de instalação do foco inflamatório. Uma vez liberada, induz as células sinoviais e o próprio condrócito a produzirem as MMPs, além das prostaglandinas. Além disso, a IL-1 deprime as tentativas de reparação da cartilagem articular, inibindo a síntese do colágeno tipo II e dos proteoglicanos, impedindo, ainda, a ação dos fatores de crescimento. A IL-1 também aumenta a produção do óxido nítrico, o qual induz a apoptose (desarranjo estrutural) dos condrócitos. Na cartilagem normal, a IL-1 é antagonizada por um agonista que, uma vez inibido, reduz a produção desta IL-1 equilibrando o processo. (VAN DEN BERG, 2001).

As alterações genéticas do colágeno tipo II resultam em condrodisplasias ou degeneração cartilaginosa. Nos processos artrósicos ocorre um intenso remodelamento da matriz extracelular, como tentativa de reparação tecidual, incluindo a síntese de colágeno tipo II nas fases iniciais da doença e reexpressão do pró-colágeno tipo IIA. Foram descritos aumento de colágeno tipo VI nas regiões pericondrocíticas de cartilagem artrósica humana em modelo de menissectomia parcial em coelhos e expressão do gene para colágeno tipo X, nas áreas de nova formação de osso. A presença de colágenos I e III, não presentes normalmente na cartilagem, principalmente em fibrilações e osteófitos, indica uma reparação tecidual inadequada, com a formação de fibrocartilagem (REDDI, 2003; LOHMANDER, 1994; MEACHIM, 2001).

Xu *et al.* (2008), em seu estudo para investigar a patogênese dos fatores etiológicos endógenos em um modelo de osteoartrose em cães, verificaram que os níveis de colágeno tipo I e III, presentes na cartilagem do modelo com lesão, aumentaram significativamente.

A resposta da cartilagem articular normal à lesão ou degeneração artrósica é vista como uma tentativa de reparação ineficiente; as propriedades bioquímicas e mecânicas do novo tecido diferem da cartilagem original, resultando numa função inadequada ou alterada. As mudanças do tecido cartilaginoso na osteoartrose caracterizam-se inicialmente pela fibrilação da superfície articular. Além disso, observa-se fragilização da rede de colágeno, perda de fragmentos de proteoglicanos para o fluido sinovial e acúmulo de água no tecido cartilaginoso. Em decorrência de todos esses eventos, ocorre aumento no volume do tecido, uma vez que a rede de

colágeno fragilizada não exerce a tensão necessária para conter a pressão osmótica de pró-hidratação exercida pelos proteoglicanos remanescentes (VELOSA; TEODORO; YOSHINARI, 2003; REZENDE; HERNANDEZ; CAMANHO; AMATUZZI, 2000).

Lewis *et al.* (1999), verificaram a diminuição da concentração do sulfato de condroitina no líquido sinovial de pacientes com osteoartrose ou artrite reumatóide, evidenciando, dessa maneira, que a avaliação do líquido sinovial pode também fornecer informações importantes quanto ao estado metabólico.

Os condrócitos podem proliferar e formar aglomerados celulares (clones), havendo, além disso, aumento na síntese da matriz como tentativa de reparação tecidual. Entretanto, na fase crônica as enzimas degenerativas superam a capacidade sintética e a reparação falha. Com a progressão da fibrilação na superfície articular as alterações agrava-se, a cartilagem é perdida e o osso subcondral torna-se espessado. Frequentemente ocorre a formação de osteófitos, refletindo dessa forma uma reparação inadequada da cartilagem (YOUNG *et al.*, 2005).

2.1.4 Metabolismo na Cartilagem Artrósica

A compreensão do metabolismo dos condrócitos é essencial para o entendimento do início e progressão do processo degenerativo da cartilagem articular. Os condrócitos sofrem a ação reguladora de dois tipos de mediadores: os pró-catabólicos (citocinas) e os pró-anabólicos (fatores de crescimento), que, através de liberação parácrina e/ou autócrina, podem promover junto aos condrócitos a ativação de mecanismos que resultam na degradação ou regeneração da cartilagem (YOUNG, 2005; VELOSA; TEODORO; YOSHINARI, 2003).

A articulação osteoartrósica pode também promover liberação de mediadores pró-inflamatórios, sintetizados pelos condrócitos e pelas células inflamatórias presentes na membrana sinovial, tais como a interleucina (IL) 1, a mais importante citocina pró-catabolismo, além do TNF (fator de necrose tumoral alfa) e a IL (6). É claro o papel central das citocinas inflamatórias como sinais bioquímicos que estimulam os condrócitos a sintetizar e secretar as metaloproteases e ativar as

enzimas líticas, via elevação do plasminogênio e seus ativadores, além da diminuição de produção de TIMP e dos inibidores do plasminogênio (LOTZ, 2001).

O metabolismo da cartilagem articular madura é regulado pelos fatores de crescimento, que estimulam a síntese da matriz e controlam a degradação, além de contribuírem para o reparo da cartilagem pela estimulação da proliferação dos condrócitos. Dentre os fatores de crescimento, acredita-se que o mais efetivo parece ser o fator de crescimento transformador beta (TGF beta), agindo diretamente nos condrócitos, estimulando a produção de proteoglicanos, anulando os efeitos catabólicos da IL-1 e reparando o tecido, diferentemente da proteína morfogenética 2 (BMP-2), que é capaz de aumentar a síntese de condrócitos somente na ausência da IL-1 (VAN DEN BERG, 2001; SANDELL; AIGNER, 2001; SCHARSTUHL *et al.*, 2002).

Outros fatores de crescimento como a insulina-like (IGF-1), o fator de crescimento básico de fibroblastos (b- FGF), tem sido evidenciados como cruciais na homeostasia da cartilagem, porém algum deles como a IGF-1 não desempenha nenhuma função na cartilagem artrósica (VAN DEN BERG, 2001).

Os condrócitos da cartilagem articular produzem e retêm quantidades significativas de BMPs, conhecidas por aumentar a síntese da matriz extracelular e induzir a condrogênese e a osteogênese (SANDELL; AIGNER, 2001; REDDI, 2006).

A degradação na cartilagem articular é mediada principalmente por enzimas, denominadas metaloproteases (MMP) ou matrixins. Essas enzimas são as metaloproteases (colagenase, estromelisina e gelatinase) e hialuronidase que levam à degradação dos agregados e perda de proteoglicanos da matriz, a clivagem de ácido hialurônico e de condroitina 6-sulfato, à produção de proteoglicanos incapazes de agregar, à degradação do colágeno tipo II, à degradação do arcabouço protéico dos proteoglicanos e à ativação de outras enzimas tais como a pró-estromelisina (degrada a matriz) e a estromelisina, que ativa a colagenase, que, por sua vez, destrói o colágeno o qual é, aparentemente, o fator principal na progressão da patologia e na destruição final da superfície. As famílias das MMP degradam especificamente o colágeno tripla hélice em Ph neutro (REZENDE; HERNANDEZ; CAMANHO; AMATUZZI, 2000; BUTTLE; BRAMWELL; HOLLANDER, 1995).

Os agregans sintetizados na articulação artrósica têm um padrão do sulfato de condroitina mais semelhante ao do sintetizado no jovem do que no adulto. A

aparência estrutural imatura do sulfato de condroitina muitas vezes é usada como um marcador da artrose (ROUGHLEY, 2001).

Entre as collagenases específicas estão a MMP-1 (colagenase-1), a MMP-8 (colagenase-2) e a MMP-13 (colagenase-3). Esse grupo distingue-se dos outros pela sua capacidade para degradar regiões da tripla hélice helicoidais, dos colágenos intersticiais I, II e III. Muitas das MMPs são estimuladas pela exposição às citocinas inflamatórias. As gelatinases englobam a MMP-2 (gelatinase A) e a MMP-9 (gelatinase B) e degradam os colágenos tipos IV, V, VII e XI agindo de forma sinérgica com as collagenases na clivagem dos colágenos degradados (gelatins). Além disso, degradam a elastina, a agregans e as proteínas de ligação da cartilagem. O subgrupo da estromelina (catepsina B) compreende a MMP-3 e MMP-10, que podem degradar o colágeno IV, proteoglicanos e glicoproteínas da matriz, bem como vários outros componentes da matriz extracelular, incluindo agregans, fibronectina e laminina. Existem outras metaloproteases como a MMP-7, que degrada colágeno e proteoglicanos, a MMP-11, que tem fraca ação proteolítica para fibronectina, laminina, proteoglicanos e colágenos degradados, e a MMP-12, que digere a elastina. A degradação do colágeno tipo II tem sido amplamente estudada, sendo constatado que a MMP-13 é a principal enzima responsável pela degradação desse colágeno (VELOSA; TEODORO; YOSHINARI, 2003; SANDELL; AIGNER, 2001; VALVERDE-FRANCO *et al.*, 2006).

A catepsina B ou estromelina pode estar associada com a perpetuação do processo degenerativo, pois foram evidenciados altos níveis dessa enzima ao redor dos clones celulares nas zonas de hiperplasticidade da OA. A interleucina-1 aumenta síntese da catepsina B, favorecendo a perpetuação desse processo (DOI *et al.*, 2008).

Doi *et al.* (2008) avaliaram os efeitos de uma citocina condroprotetora, a interleucina-4 (IL-4), nas alterações da expressão do gene induzidos por um estresse tênsil cíclico, verificando a inibição da expressão de MMP-13 e a catepsina B. Isso é verificado nos estágios iniciais da lesão de cartilagem, pois em estágios avançados de osteoartrose seria difícil suprimir todas as metaloproteases e outras enzimas responsáveis pela degradação.

Foi demonstrado que o colágeno tipo II pode ser clivado pelas metaloproteases tipo 7, 9, 13 e 14, indicando que na osteoartrose há uma

diversidade de enzimas capazes de destruir esse tipo de colágeno (SANDELL; AIGNER, 2001).

Na cartilagem articular artrósica está presente vários tipos de metaloproteases, sendo que dependendo do estágio da lesão, as concentrações dessas enzimas são diferentes.

Em um estudo utilizando o modelo experimental de meniscectomia parcial em coelhos, foi demonstrado que existe uma regulação aumentada de RNA mensageiro para pro-MMP1 e pro-MMP3, tanto durante os estágios iniciais da osteoartrose quanto em estágios mais avançados da patologia. Isso indica que a transcrição de genes para metaloproteases é um evento inicial e aumenta com a progressão da doença. Além disso, constataram que a transcrição para MMP-3 foi maior que a transcrição para MMP-1, tanto no início da doença quanto em estágios mais avançados (VELOSA; TEODORO; YOSHINARI, 2003).

Outro ponto de destaque é que a IL-1 deprime as tentativas de reparação da cartilagem articular, inibindo a síntese do colágeno tipo II e dos proteoglicanos, como também aumenta a produção de óxido nítrico (NO), o qual induz a apoptose dos condrócitos. Além das metaloproteases e citocinas responsáveis pela degradação da cartilagem articular na osteoartrose, também tem sido salientada a contribuição do óxido nítrico na patogenia dessa doença. O óxido nítrico é produzido em grandes quantidades por condrócitos ativados por citocinas e exercem vários efeitos catabólicos como inibição da síntese de colágeno e proteoglicanos, ativação de metaloproteases, inativação de TIMP, inibição da proliferação de condrócitos e indução de apoptose de condrócitos *in vitro* (VELOSA; TEODORO; YOSHINARI, 2003; VAN DEN BERG *et al.*, 2001; MANACU *et al.*, 2005).

A IL-1 é considerada como primeiro agente para a degradação da matriz cartilaginosa, pois estimula a síntese da secreção de várias enzimas degradativas da cartilagem como as colagenases, as gelatinases e as estromelinas (REZENDE; HERNANDEZ; CAMANHO; AMATUZZI, 2000).

O efeito catabólico da interleucina-1 é confirmado pela injeção intra-articular dessa citocina, induzindo a leucocitose do líquido sinovial e a perda de proteoglicanos da cartilagem articular (LOTZ, 2001).

De alguma forma, fatores bioquímicos, genéticos e mecânicos contribuem para lesar a matriz, expondo os condrócitos a estímulos que alteram o seu comportamento metabólico. Estas células, sem a proteção da matriz, multiplicam-se

no local da lesão e aumentam seus mecanismos de síntese, tentando uma regeneração. Clones de células, que proliferam circundadas pelas moléculas da matriz, são um dos sinais da resposta condrocitária à degeneração da cartilagem. Essa tentativa é fugaz, pois logo predomina a ação de proteases que iniciam, de modo progressivo, a degradação da cartilagem. A IL-1 inibe a síntese de agregans e suprime a síntese dos colágenos II e IX, já referidos anteriormente, aumenta a produção dos colágenos I e III, em adição ao colágeno tipo II em concordância com a expressão do RNA mensageiro, resultando numa reparação tecidual inadequada (LOHMANDER, 1994; MIRON *et al.*, 1999).

Existem diversos mecanismos envolvidos na etiopatogenia da lesão condral, levando à perda das características da cartilagem normal, tecido mais acometido na osteoartrose, e conseqüente perda da função articular. Assim sendo, o estudo aprofundado desse tecido parece ser a forma mais adequada para a compreensão da patogênese dessa doença.

2.2 Lasers de Baixa Potência

Após a criação do primeiro feixe de luz laser por Maimam, em 1960, ocorreu um grande avanço nas mais diversas áreas da medicina, odontologia e fisioterapia. Porém, o conhecimento aprofundado de seu funcionamento ainda é deficiente .

O termo laser constitui-se de um acrônimo de “*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*” ou “Luz Amplificada por Emissão Estimulada de Radiação”.

Os lasers possuem propriedades especiais que as diferem de outras fontes de luz. Podem ser classificados, de acordo com a potência de emissão, em dois grupos: os lasers cirúrgicos de alta potência (HILT- *High-Intensity Laser Treatment*) e os lasers não-cirúrgicos de baixa potência (LILT- *Low-Intensity Laser Treatment*). O laser de alta potência possui ação fototérmica de corte, vaporização e coagulação; o laser de baixa potência tem ações fotoquímicas como analgesia, cicatricial e bioestimulatória, sem que nenhum aquecimento tecidual aconteça (BASFOR, 1995).

2.2.1 Princípios Físicos do Funcionamento do Laser

O laser é gerado dentro de uma cavidade contendo um meio condutor, onde os átomos ou em alguns casos moléculas, são dirigidos a um estado de excitação pela eletricidade ou energia óptica. Quando um átomo volta ao seu estado fundamental, um fóton é emitido. Esse processo é conhecido como emissão espontânea de radiação (COTTON, 2004).

Existem três propriedades importantes que distinguem a luz laser de outras fontes luminosas: coerência, monocromaticidade e colimação.

2.2.2 Características da Radiação Laser

As características que diferem a luz laser são a monocromaticidade, a colimação e a coerência. A coerência é uma das propriedades da luz laser que pode ser descrita como coerência temporal ou espacial. Essa propriedade é perdida ao penetrar no tecido, pois sob condições fisiológicas a absorção da luz laser pelo sistema biológico é puramente não-coerente. Pesquisas a nível celular evidenciam que tanto a luz coerente quanto a não-coerente, com o mesmo comprimento de onda, intensidade e tempo de irradiação produzem o mesmo efeito fotobiológico (COTTON, 2004; KARU, 2003).

A monocromaticidade é considerada muitas vezes como uma das características mais importantes da luz laser, pois determina quais moléculas absorverão a radiação e, portanto, qual a interação fotobiológica e os respectivos efeitos terapêuticos. A colimação refere-se ao grau de paralelismo do feixe laser, que mantém um pequeno tamanho do feixe numa distância relativamente grande (BAXTER, 1994).

2.2.3 Penetração da Luz nos Tecidos

A absorção do laser ocorre por moléculas que podem ser divididas em dois grupos: um grupo contendo aminoácidos e bases ácido-nucléicas e outro grupo de moléculas chamadas de cromóforos. A absorção desses fótons por essas moléculas específicas produz estimulação ou inibição de atividade enzimática e de reações fotoquímicas (KARU, 1987; BAXTER, 1994).

O grupo de aminoácidos e bases ácido-nucléicas forma o bloco estrutural de DNA, assim como, a proteína nas células. Essas moléculas absorvem luz de comprimento de onda menor, como a ultravioleta. Já os cromóforos são definidos como as estruturas moleculares que absorvem luz no espectro do visível, sendo mais comuns aqueles derivados do grupo das porfirinas, como por exemplo a hemoglobina. Outro cromóforo importante é a melanina, que juntamente com a hemoglobina desempenham um importante papel na conversão da energia da radiação laser em calor (efeito fototérmico) (BAXTER, 1994).

Os fotorreceptores são moléculas de variedade morfológica que se encontram distribuídas nas células do organismo, entre elas, as flavoproteínas, as porfirinas, os citocromos, as tirosinas e a asparagina; essas moléculas interferem no metabolismo celular sem a necessidade de energia luminosa, mas, se irradiarmos essas moléculas com luz de comprimento de onda específico, elas são capazes de absorver os fótons da radiação e provocar variações no metabolismo celular (COTTON; MIPEN, 2004).

O Laser de Baixa Potência (LBP) age, principalmente, sobre organelas celulares (mitocôndrias e membranas), gerando aumento da síntese de ATP e modificando o transporte iônico, sendo que esses processos ocorrem por meio dos fotorreceptores celulares, descritos acima. Dessa forma o LBP acelera, a curto prazo, a glicólise e a oxidação fosforilativa e, a longo prazo, a transcrição e a replicação do DNA (KARU, 1987).

Karu (1988) verificou que a irradiação de mitocôndrias isoladas induziu mudanças na homeostasia celular, que implicaram em reações em cascata e propuseram um número de componentes da cadeia respiratória (citocromos, citocromos oxigenase e flavinas desidrogenase) os quais são fotorreceptores ou cromóforos primários e, desta maneira, capazes de absorver luz para um comprimento de onda apropriado. Estas causam, a curto prazo, a ativação da cadeia respiratória. Assim, a cadeia de elétrons transportados desta maneira resulta na melhora e no aumento da síntese de ATP. Além disso, a radiação laser afeta os

níveis de íons hidrogênio (H^+) intracelular e o aumento na concentração de H^+ , causa alterações na bomba de sódio (Na^+) e potássio (K^+) na membrana celular, e, conseqüentemente aumenta a permeabilidade de íons cálcio (Ca^+) para o meio intracelular. O aumento nos níveis de Ca^+ afeta o nível dos nucleotídeos cíclicos que modulam a síntese de RNA e DNA.

Em estudos subsequentes, Karu (1989) concluiu que a universalidade dos efeitos do LBP na estimulação do metabolismo celular decorre do fato dos receptores primários serem componentes da cadeia respiratória. Dessa maneira, em baixas doses, a irradiação causa regulação oxi-redução do metabolismo celular e, em altas doses, causa danos fotodinâmicos. A intensidade do efeito de bioestimulação depende do estado da célula antes da irradiação, fato esse que explica o porquê desse efeito nem sempre ser alcançado.

A luz laser ao incidir sobre uma superfície pode refletir, transmitir, dispersar ou ser absorvida. A reflexão varia de acordo com o ângulo de incidência da luz e de acordo com as propriedades ópticas da superfície de cada tecido. A função fotorreguladora determina qual o comprimento de onda cada estrutura é capaz de absorver e, com isso, promover transformações na célula. A absorção é um dos modos mais importantes de interação de luz com os tecidos, pois, sem a absorção, não seriam possíveis os efeitos fotobiológicos e, conseqüentemente, os efeitos clínicos. A profundidade de penetração da luz varia de indivíduo para indivíduo, pois as propriedades ópticas variam com muitos fatores tais como pele, idade e hidratação da pele, entre outros (BAXTER, 1994; PLAETZER *et al.*, 2009).

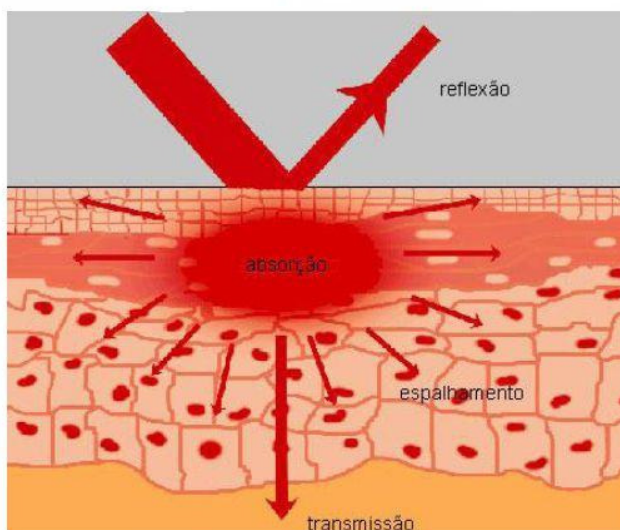


Figura 4: interação da luz laser com os tecidos
Fonte: Adaptado por Ribeiro, 2000

2.2.4 Efeitos da Laserterapia nos Tecidos Biológicos

Os Lasers de Baixa Potência (LBP) possuem um efeito fotobiológico que promove a aceleração do processo de cicatrização tecidual. Os efeitos do LBP, observados em laboratório e na prática clínica, são baseados nos efeitos fisiológicos: estimulação da proliferação celular, incremento da microcirculação, neoformação capilar, entre outros (KLEBANOV *et al.*, 2001; LIRANI; CASTRO, 2005; BOURGUIGNON-FILHO *et al.*, 2005).

A irradiação mais efetiva é aquela entre o espectro do vermelho e o infravermelho. Os lasers mais utilizados são o Laser Hélio- Neônio (HeNe – 632,8 nm), Laser gálio-alumínio (GaAl – 630-685nm), Laser Arsenieto de Gálio-alumínio (AsGaAl – 660 nm), Laser arsenieto de hélio-neônio (HeNeAs – 780-870nm), Laser Arsenieto de Gálio (AsGa – 904 nm) (VLADIMIROV; OSIPOV; KLEBANOV, 2004).

No aspecto molecular podem ocorrer três situações: excitação da cadeia de elétrons nas mitocôndrias, gerada pela região visível do espectro, sendo que essas moléculas, nesse estado, podem gerar maiores reações químicas, induzindo ao efeito biológico; vibrações moleculares, geradas pela absorção da irradiação, causando deslocamento dos núcleos atômicos; rotação total ou parcial da molécula, gerada pelo campo eletromagnético da luz incidente, podendo ocorrer um discreto aumento de temperatura (BAXTER, 1994; KARU, 1987).

A bioestimulação laser é a aplicação da luz laser nos tecidos, podendo influenciar a atividade celular com a estimulação ou inibição das funções químicas e fisiológicas. A magnitude do efeito biomodulatório é influenciada pelo comprimento de onda, fluência, densidade de potência, tipo de lesão e do espectro específico de absorção do fotorreceptor (KARU, 1987).

O efeito bioestimulante do laser pode ser explicado pelo princípio de Arndt-Schultz, que afirma que os tecidos reagem à quantidade de energia absorvida por unidade de tempo (BAXTER, 1994).

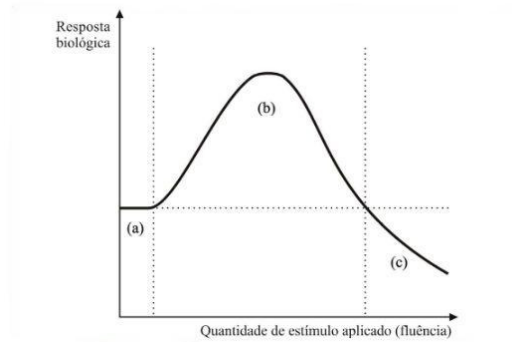


Figura 5: Esquemática da lei de Arndt-Schultz, onde (a) representa o repouso, (b) a bioestimulação e (c) a bioinibição.

Os efeitos gerados pelo laser fotoquímico, fotobiológico e fotofísico afetam não só a área irradiada como também os tecidos adjacentes a ela. Os efeitos fotobiológicos podem ser divididos em curto prazo ou direto, ou longo prazo ou indireto. Os efeitos em curto prazo são aqueles observados logo após a irradiação, entre eles a síntese de ATP e fotoestimulação da taxa respiratória. Já os efeitos em longo prazo são observados após horas ou dias da irradiação; entre os efeitos fisiológicos a longo prazo estão os efeitos analgésicos, anti-inflamatórios e cicatrizantes (KARU,1987;1988).

A literatura é vasta para exemplificar os efeitos diretos e indiretos da irradiação com laser de baixa potência.

Tartarunas (1998), constatou que ao 15º dia de irradiação com o laser AsGa, houve completa revascularização de feridas cirúrgicas em felinos.

Bisht *et al.* (1999) analisaram histologicamente o infiltrado leucocítico, neovascularização, proliferação fibroblástica, epitelização e formação de colágeno em feridas tratadas com laser HeNe. Além dessa análise foi realizado um ensaio mecânico para determinar a força de tensão do tecido. Os resultados sugeriram que o laser promovia uma epitelização antecipada, devido a um aumento da reação fibroblástica, infiltração leucocitária e angiogênese. A habilidade da ferida resistir à ruptura contra uma força de tensão era significativamente aumentada nos animais tratados.

Tam (1999), realizou uma pesquisa em 372 pacientes com patologias ortopédicas, reumáticas ou traumáticas, fazendo doze aplicações do laser AsGa, uma vez ao dia, obtendo ótimos resultados na redução do quadro álgico,

principalmente nos casos de artrose cervical e de quadril , lesões decorrentes de esporte, epicondilites e úlceras cutâneas.

O laser de arsenieto de gálio e alumínio foi utilizado por Vinck e, colaboradores, em 2003, em um estudo *in vitro*. Foram realizadas aplicações diárias de laser, durante três, dias nos fibroblastos. Os resultados mostraram aumento do número dessas células após irradiação com laser.

Nicolau *et al.*(2003), em sua pesquisa, avaliaram a atividade das células ósseas em fratura de ratos tratados com laser 660nm. Após 8 dias da cirurgia, e após a análise histomorfométrica, verificaram um aumento da atividade dessas células.

Stadler *et al.*(2004), avaliaram as mudanças de temperatura local em ratos brancos e negros irradiados com laser de 830nm de comprimento de onda, com diferentes fluências. Observaram que a temperatura aumenta conforme a fluência aumenta, sendo que a temperatura foi menor nos ratos brancos, em parte devido à reflexão.

No trabalho de Pessoa e colaboradores (2004), foi avaliado o efeito do laser de baixa potência nas lesões teciduais associados com esteróides. Concluiu-se que a laserterapia acelera o processo de cicatrização e diminui o infiltrado inflamatório nas lesões.

Ihsan (2005), avaliou os efeitos do laser de GaAlAs em coelhos. Após 3 sessões de irradiação foram colhidas amostras de sangue para análise dos níveis de adenosina, hormônio de crescimento e fator de crescimento de fibroblastos para exame histopatológico. Concluiu-se que a terapia com laser de baixa potência acelera a circulação colateral e aumenta a microcirculação.

Foi evidenciada também, em um experimento, a alteração funcional de mitocôndrias em resposta à irradiação com laser de baixa potência (532nm), principalmente no aumento do processo da fosforilação oxidativa mitocondrial. (KASSAK *et al.*,2005).

Carvalho *et al.*(2006) ao avaliarem comparativamente a influência do laser HeNe no percentual de fibras colágenas em lesões cutâneas induzidas em ratos diabéticos e não-diabéticos,observam que esse tipo de laser mostrou-se eficaz para aumentar a quantidade de fibras colágenas no local da lesão, em ambos os grupos.

No experimento de Oliveira *et al.* (2008), verificou-se aumento significativo na atividade fibroblástica após irradiação da cultura dessas células com laser AsGa 904

nm, comparando-se com a atividade dessas células após a aplicação de ultrassom pulsado.

Meireles e colaboradores (2008) compararam os efeitos fotobiológicos do laser de 660nm e o de 780nm em queimaduras de terceiro grau em ratos diabéticos. Após 21 dias de irradiação observaram que o laser de 780nm apresentou melhora do processo inflamatório e aumento da quantidade e qualidade do tecido de granulação, porém não tão eficaz quanto o laser de 660nm, que se mostrou mais eficaz no processo cicatricial.

Em outro estudo também foi avaliado os efeitos do laser de baixa potência (HeNe) no número de mastócitos e da degranulação em queimaduras de segundo grau em ratos. Verificou-se um aumento na quantidade de mastócitos intactos durante as fases inflamatórias, e proliferativas e uma diminuição na fase de remodelação nos grupos tratados com laser (VASHEGHANI *et al.*,2008).

Saygun *et al.*(2008),verificaram aumento na proliferação e viabilidade celular de fibroblastos de gengiva humana após irradiação com laser 685nm e 830nm comparando-se com o grupo controle.

No estudo de Martinez, Pinheiro e Ramalho (2008) foram comparados os efeitos da irradiação com laser 830nm no grupo de animais com fratura de fêmur, no grupo com fratura e com osso bovino orgânico e no grupo controle (somente fratura e osso bovino orgânico); a avaliação histológica evidenciou aumento no depósito de fibra colágena nos estágios iniciais do reparo da lesão e, no final do experimento, houve um aumento na quantidade de osso trabeculado organizado nos animais irradiados, demonstrando dessa forma o efeito bioestimulativo do laser de baixa potência nos defeitos ósseos.

O laser de baixa potência tem sido usado no controle do processo inflamatório. Em um estudo foi avaliada a ação do laser GaAs 904nm no processo inflamatório em pata de rato induzido por ácido cloroacético, através da medição articular do tornozelo com paquímetro para avaliação do edema. Entretanto, os resultados não demonstraram diferença significativa no edema no grupo tratado e no grupo controle (KERPPERS *et al.*,2007).

Albertini *et al.* (2008) investigaram o efeito anti-inflamatório do laser de baixa potência com dois diferentes comprimentos de onda (660 e 684nm) na expressão de citocina de RNA mensageiro após indução de inflamação aguda na pata com a carragenina; observaram uma diminuição de 30 a 40% na expressão das citocinas

fator de necrose tumoral, interleucina 1 β e interleucina 6 nos tecidos das patas irradiadas do que daquelas do grupo controle.

Em um estudo para avaliar a fotoestimulação do laser HeNe no processo de reparação de tendões cirurgicamente suturados de coelhos, Elwakil (2007) verificou, após 14 dias de irradiação, que o grupo tratado apresentou melhora na qualidade das fibras colágenas e melhora nos resultados biomecânicos, como a carga imposta para ruptura do tendão.

Na pesquisa de Arruda *et al.* (2007) puderam observar, após irradiarem 12 dias com laser (670nm e 904nm) os tendões calcaneanos de ratos submetidos a tenotomia total, que os grupos irradiados apresentaram melhora na organização das fibras colágenas em relação ao grupo não tratado.

Tumilty *et al.* (2008) compararam a efetividade do tratamento realizado em grupos de pacientes com tendinopatia de Aquiles. Para um grupo utilizou-se laser de baixa potência (810nm) associado com exercícios excêntricos; para outro grupo foi realizado tratamento com laser placebo. Após aplicação de questionário específico para essa patologia, observou-se que não houve diferença estatística entre os grupos com relação à dor e à força muscular concêntrica e excêntrica.

Silva Júnior *et al.* (2002), estudaram o efeito do laser de baixa potência em um modelo de defeito ósseo em fêmur de ratos, demonstrando, através da morfometria computadorizada, maior mineralização, 7 dias após a cirurgia no grupo tratado.

Em outro estudo Nicolau *et al.* (2003), observou aumento da atividade de reabsorção e formação óssea em fraturas de fêmures de ratos. Após cinco dias da cirurgia, o volume ósseo e a superfície de osteoclastos do grupo tratado eram maiores que o controle. Após quinze dias da cirurgia, a superfície de osteoblastos e a taxa de aposição mineral eram também, estatisticamente, maiores no grupo tratado com laser.

Denadai *et al.*(2008), avaliaram a influência do laser GaAIs 660nm associado com BMPs em fraturas de fêmur em ratos. Após a produção do defeito ósseo, os animais foram divididos em quatro grupos (grupo tratado com laser+ BMP; grupo BMPs; grupo laser e grupo controle), e o grupo tratado com laser foi irradiado por 28 dias e depois submetido à análise histomorfométrica. O grupo tratado com laser associado com a BMP obteve os melhores resultados.

A ação de dois tipos diferentes de laser após lesão do nervo mediano seguida de neurografia com o nervo ulnar em ratos, foi estudada por Gingo-Benato e colaboradores em 2004. Verificaram que quando aplicado o laser de 808nm associado com o de 905nm obtinham melhores resultados funcionais e maior número de fibras nervosas do que quando aplicados separadamente, porém apresentando resultados positivos da radiação.

Belchior *et al.*(2008) avaliaram a influência do laser GaAlAs 660 nm em lesões por esmagamento do nervo ciático em ratos, avaliados através do índice de avaliação funcional. Os animais do grupo tratado foram irradiados por 21 dias e apresentaram uma diferença estatisticamente significativa quanto ao índice de avaliação funcional, somente entre o grupo tratado no período pré-lesão e o grupo controle após 21 dias, demonstrando dessa forma um efeito positivo no processo de regeneração nervosa.

Dall Ignol *et al.* (2009) avaliaram a influência do laser 660nm na cicatrização de feridas de ratos diabéticos e verificaram que o grupo tratado apresentou aceleração da cicatrização da ferida comparando-se com o grupo não tratado.

2.3 Lasers no Tecido Cartilaginoso

Devido à capacidade limitada de reparo da cartilagem, as patologias que envolvem esse tecido e sua regeneração é um grande desafio para os clínicos. A busca de propostas de tratamentos para esse tipo de lesão é grande. Entretanto, ainda não se determinou a melhor opção. A terapia laser de baixa potência é uma opção não invasiva e eficaz no processo de regeneração dos tecidos biológicos e é uma das formas de tratamento das lesões condrais.

Alguns trabalhos reportam-se a esse tema, podendo-se citar Caffalli *et al.*(1993), que realizaram um estudo em coelhos, sendo observado que nos animais irradiados e não-irradiados não houve regeneração da cartilagem articular, apenas a formação de um tecido cicatricial.

No trabalho de Calatrava e colaboradores (1997), foi irradiado coelhos com lesões cartilaginosas com laser de 632,8nm e 904nm. Concluíram que com o laser 904nm houve uma maior capacidade antiinflamatória do que com o laser 632,8nm.

Porém, os dois apresentaram uma recuperação mais rápida e uma regeneração maior do tecido, se comparando com o membro controle. Os grupos tratados apresentaram menor diâmetro articular que o controle.

Em um outro estudo *in vitro*, Torricelli *et al.* (2001), verificaram, tanto em condrócitos humanos quanto de coelhos, que após a terapia com laser de baixa potência, houve um aumento na proliferação celular e na viabilidade dos condrócitos.

Gur *et al.* (2003), realizaram um estudo clínico em pacientes com osteoartrose avaliando dor, mobilidade articular, edema e aplicando um questionário. Após o período de tratamento com laser de baixa potência AsGa observa-se que houve melhora em todos os aspectos avaliados no pré-tratamento no grupo que fazia aplicação de laser, comparando-se com o grupo controle.

Para avaliar o efeito analgésico do laser em pacientes com diagnóstico de osteoartrose de joelho, Tascioglu *et al.* (2004), realizaram também um estudo clínico e puderam constatar que não houve melhora significativa do quadro álgico nos pacientes tratados com laser, comparando-se com o grupo controle.

Lin *et al.* (2004), demonstraram em sua pesquisa o aumento da densidade das proteínas de estresse após tratamento com laser Hélio-Neônio (HeNe), que estão intimamente relacionadas com o processo de reparação da cartilagem articular.

Jia e Guo (2004), em seu estudo *in vitro* com condrócitos, objetivaram verificar a capacidade de bioestimulação dessas células após a irradiação de laser HeNe. Observaram o aumento do número de células e da atividade de proliferação celular nos animais irradiados.

Em recente pesquisa Lin, Huang e Chai (2006), pesquisaram os efeitos nos glicosaminoglicanos após tratamento com radiação laser HeNe em joelhos induzidos a osteoartrose, verificando aumento na densidade dos glicosaminoglicanos dos joelhos tratados, demonstrando assim o incremento da biossíntese da cartilagem artrítica após a terapia laser de baixa potência.

Shen *et al.* (2007), avaliaram os efeitos da laserterapia em pacientes com osteoartrose e um grupo placebo, e observaram uma diminuição do quadro álgico em 49% nos pacientes tratados.

Em uma pesquisa foi investigado se a irradiação com laser HeNe aumentava o número de condrócitos e a espessura da cartilagem, em joelhos imobilizados, e verificaram um aumento na espessura da cartilagem no grupo tratado e não houve diferença estatística no número de condrócitos (BAYAT *et al.*, 2007).

Kamali *et al.* (2007), compararam os efeitos de um grupo de animais tratados com laser 890nm e grupo placebo, em defeitos osteocondrais, e observaram um aumento da rigidez do tecido de reparo após 8 semanas de lesão.

Youn e Milner (2008) investigaram o efeito fototérmico após irradiação de amostras de cartilagem e puderam observar que o maior efeito térmico nesse tecido foi a evaporação de água das macromoléculas presente na cartilagem, como o colágeno e os proteoglicanos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Analisar a influência da radiação laser de baixa potência, com comprimentos de onda de 660nm e 904nm em um modelo experimental de osteoartrose.

3.2 Objetivos Específicos

- Analisar os eventos histopatológicos durante o processo de reparo articular, entre os grupos controle, tratado com laser 660nm e tratado com laser 904nm, nos períodos de 7, 14 e 21 dias após o início da irradiação.
- Comparar os eventos histopatológicos do processo de reparo entre os grupos.
- Determinar qual laser (660nm ou 904nm) foi mais eficaz no processo de reparo do modelo de lesão.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais de experimentação

A amostra foi composta de 54 ratos machos adultos (*rattus norvegicus albinus*), da linhagem Wistar, com peso corporal variando de 250 a 350 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal (UNIDERP), Campo Grande-MS.

Os animais foram alojados em caixas de polipropileno com dimensões (46 cm x 32 cm x 16 cm), com 4 animais por gaiola, mantidos em foto período de 12 horas, umidade e temperatura mantidas por ar-condicionado, ruídos mínimos, ração sólida¹ e água *ad libitum*.

Todos os procedimentos experimentais deste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais/CEUA da Universidade Federal de Mato Grosso de Sul (UFMS) e estão de acordo com os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animais – COBEA, Protocolo n. 153/2007. (Anexo A)



Figura 6- condições de alojamento dos animais

4.2 Grupos Experimentais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos distintos, denominados G1, G2 e G3, sendo alocados 18 animais em cada grupo: G1 foi tratado com laser de comprimento de onda de 660nm (G1); G2 foi tratado com laser de comprimento de onda de 904nm (G2) e G3 adotado como grupo controle (G3), não foi submetido a nenhum tipo de tratamento.

Os grupos ainda foram subdivididos em três e denominados G1-7; G1-14 e G1-21, tratados com laser de comprimento de onda de 660 nm; G2-7; G2-14 e G2-21, tratados com laser de comprimento de onda de 904 nm e G3-7; G3-14 e G3-21, não tratados, cada subgrupo foi composto de 6 animais. O critério utilizado para esta subdivisão foi a evolução do processo de reparo e do processo inflamatório na articulação.

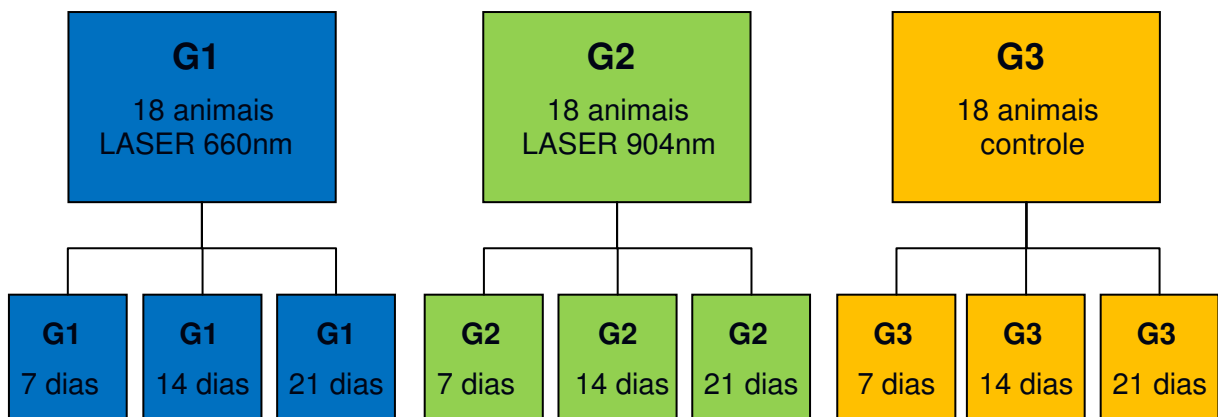


Figura 7: Organograma dos grupos experimentais

4.3 Procedimentos

4.3.1 Anestesia e Indução das Lesões Osteocondrais

Os animais foram pesados e submetidos a anestesia dissociativa com miorrelaxante, mediante a injeção intraperitoneal de Quetamina associada a Xilasina, na mesma seringa (50-75mg/Kg + 5-10mg/Kg).

Após constatado o plano anestésico os animais eram submetidos a tricotomia dos membros posteriores na região da articulação femoro-tíbio-patelar onde foi infiltrada a substância indutora da lesão osteocondral, em todos os animais.

Foi realizada uma infiltração intra-articular no joelho direito de cada animal, com 10 μ l de solução de papaína 4% e adicionado 10 μ l de solução de cisteína (0,03 M), que foi usada como ativador. A infiltração foi repetida no quarto e sétimo dias do estudo. Para se conseguir a quantidade adequada da solução indutora da lesão, foi adaptada uma agulha em uma micropipeta (*Pipetman*- marca Gilson®) e fixado o volume que foi utilizado (20 μ l). Para o controle, o mesmo volume, 20 μ l de solução salina estéril foi injetada no joelho esquerdo da pata traseira de cada animal (BUTTLE, BRAMWELL, HOLLANDER, 1995; LIN *et al.*, 2004; POMONIS *et al.*, 2005; LIN *et al.*, 2006; MURAT, 2007).

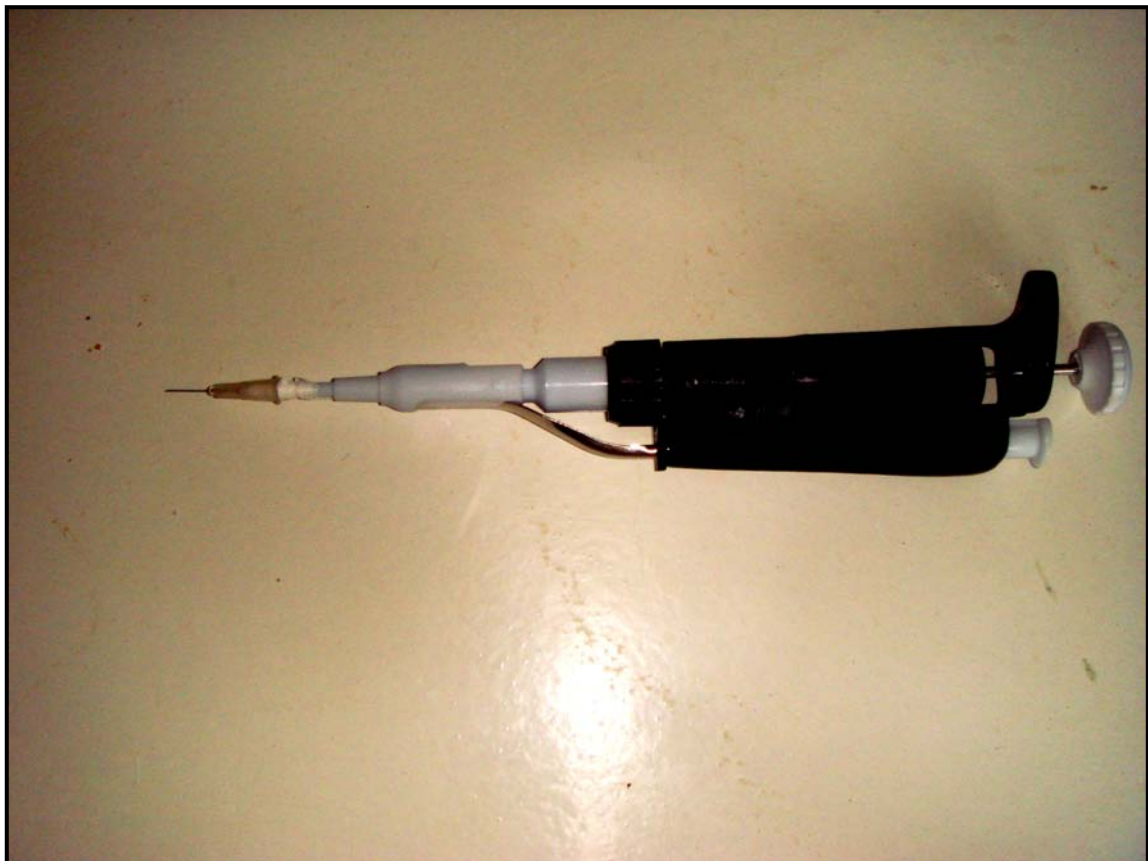


Figura 8 - Micropipeta



Figura 9 - infiltração da solução indutora

Após as infiltrações os animais foram recolocados em gaiolas limpas, sendo quatro em cada uma, com água e ração apropriada à vontade. Nenhum animal morreu durante a pesquisa.

Após a terceira dose da substância indutora e duas semanas de evolução da lesão, deu-se início aos tratamentos nos grupos G1 e G2.

Foi utilizado como medicamento analgésico a dipirona sódica por dois dias após a indução da lesão na dose de 0,1 ml/ animal, de 6/6 horas.

4.3.2 Protocolos de Irradiação

O equipamento utilizado para tratamento do grupo G1 foi o Laser da marca DMC Equipamentos Ltda.®, modelo Photon Lase III, diodo semiconductor de Índio Gálio Alumínio e Fósforo, com 100mw de potência, com comprimento de onda de 660nm, utilizando uma fibra ótica, área do feixe de 0,028 cm², contínuo, a aplicação foi a transcutânea pontual a 1 mm de distância da pele do animal, por 16 segundos cada ponto, e densidade de energia de 6 joules por cm² em 6 pontos ao redor da articulação do joelho direito (anterior, posterior, dois pontos mediais e dois pontos laterais).

Parâmetros de irradiação	Valores
Densidade de Energia (DE)	60mJ/cm ²
Potência	100mW
Comprimento de Onda	660nm
Área do feixe	0,028 cm ²
Distância da Pele	1 mm da pele
Tempo	96 seg.

Figura 10 - protocolo de irradiação do grupo G1



Figura 11- Photon Lase III

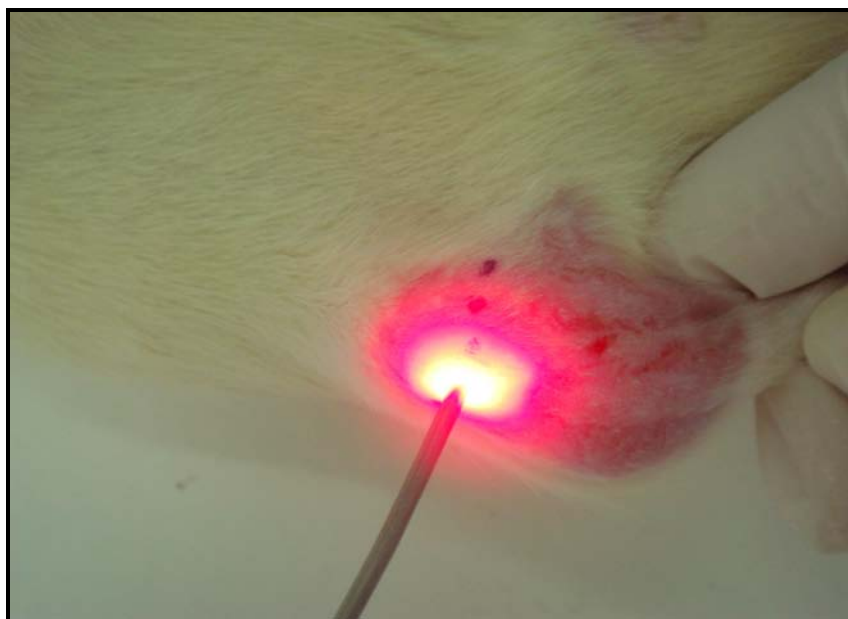


Figura 12 - Aplicação do Laser 660nm

O equipamento utilizado para tratamento do grupo G2 foi o Laser da marca KLD Biosistemas Equipamentos Eletrônicos Ltda®, modelo Endophoton, diodo semiconductor de arsenieto de gálio e alumínio, com 50mw de potência, com comprimento de onda de 904nm, área do feixe de 0,01 cm², contínuo, a aplicação foi a transcutânea pontual, por 288 segundos e densidade de energia de 6 joules por cm² em 4 pontos ao redor da articulação do joelho direito (anterior, posterior, medial e lateral).

Parâmetros de irradiação	Valores
Densidade de Energia (DE)	60mJ/cm ²
Potência	50mW
Comprimento de Onda	904nm
Área do feixe	0,01 cm ²
Distância da Pele	contato
Tempo	288 seg.

Figura 13- protocolo de irradiação do grupo G2

A irradiação foi iniciada após duas semanas da última infiltração de papaína e cisteína. Foi realizada em dias consecutivos sobre o joelho direito, nos grupos experimentais G1 e G2 até o dia da eutanásia de cada grupo.



Figura 14- Aplicação do Laser 904nm



Figura 15- Laser 904 nm

O grupo III não recebeu tratamento e foi adotado como grupo-controle comparativo para a análise histológica.

4.3.3 Eutanásia dos Animais e Obtenção do Material para Histologia

No final de cada período, 7^o, 14^o e 21^o dias, respectivamente, os animais do Grupo I, do Grupo II, bem como do Grupo III foram identificados, pesados e, posteriormente, sofreram eutanásia com dose letal de pentobarbital sódico, na dose de 200 mg/ Kg por via intraperitoneal.

Após constatado o óbito foi realizada a tricotomia da pata direita traseira com lâmina de barbear. O animal foi, então, posicionado em decúbito ventral, prendendo-se as patas dianteiras e traseiras em abdução.

Foi desarticulada a articulação coxo-femoral da pata direita traseira de cada animal, para posterior análise do tecido cartilaginoso da articulação do joelho. Não foi retirada a pata esquerda, pois para comparação dos resultados foi utilizado os animais do grupo controle, e a injeção de solução estéril nesse joelho da pata traseira foi realizada para que o volume articular dos dois membros fosse igual, evitando assim que houvesse uma má distribuição do peso corporal.

4.4 Procedimentos para Preparo do Material Histológico

Após a retirada do material, esses foram imediatamente fixados por meio de solução de formol tamponado a 10%. Em seguida procedeu-se a descalcificação com EDTA (Etilenodiaminotetracetato de tetrasódio) neutralizado com tampão de fosfato de sódio para dar pH 7,0. As peças a serem descalcificadas foram colocadas em frascos de vidro e adicionadas o descalcificador. Foi levado para estufa histológica a 60°C por aproximadamente sete dias. Procedeu-se a troca do descalcificador todos os dias e testado a resistência da peça com o uso de uma agulha. A partir do momento em que a peça apresentasse maleabilidade, a descalcificação estava completa e seguia-se o processamento histológico.

Após a fixação, os cortes foram desidratados em soluções crescentes de álcool, iniciando em 70%, 80%, 95% até o álcool absoluto 100%. As peças foram mantidas imersas meia hora na primeira, segunda, terceira e quarta solução; sendo que na última o procedimento foi repetido por três vezes com duração de meia hora cada um. Após a série de banhos de desidratação, foi iniciada a diafanização das peças em solução de álcool/xilol (1:1) por meia hora e, a seguir, em dois banhos de

xilol puro com duração de meia hora cada.

Para impregnação (infiltração) utilizou-se parafina em duas etapas com duração de duas horas cada uma, até a impregnação na parafina definitiva. Os blocos foram cadastrados e identificados com o grupo a que pertencia (G1, G2 ou G3) e individualizados com números de 1 a 6, significando a qual animal pertencia. Em seguida, as peças foram cortadas com espessura padronizada de 5 µm, utilizando-se um micrótomo rotativo da marca Microm® modelo HM 320, do Laboratório de Histopatologia da Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal.

4.4.1 Coloração e Identificação das lâminas

Para desparafinizar, os blocos foram colocados em estufa durante 15 a vinte minutos e depois submetidos a três banhos de xilol puro por 3 minutos cada. Para hidratação, o material foi tratado com dois banhos de álcool absoluto 100% por 5 minutos, e depois álcool 95%, 80% e 70% 5 minutos cada um. Após esse tratamento o material foi lavado rapidamente em água destilada. Os cortes foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE) e Tricrômico de Masson (TM).

Para a coloração de HE, os cortes foram corados com Hematoxilina de Harris por 5 minutos, lavados para retirar o excesso de corante e corados com Eosina por 8 minutos e novamente lavados.

Para o tricrômico de Masson, os cortes foram corados com Hematoxilina de Harris por 4 minutos, lavados durante 10 minutos, corados pela Fucsina ácida por 20 segundos, lavados rapidamente em água destilada 2 vezes, oxidados pelo ácido fosfomolibdico por 8 minutos, corados com azul de anilina por 6 minutos e lavado novamente.

Todos os cortes foram desidratados com álcool 100% 5 minutos por 3 vezes, diafanizados com xilol/ álcool (1:1) por 5 minutos e xilol puro duas vezes durante 5 minutos cada um. Para processar a montagem foi utilizado Bálsamo do Canadá ou Entellan. Cada lâmina foi devidamente identificada de acordo com o animal a que pertencia.

4.4.2 Avaliação do Material Histológico

Para a análise histológica foi utilizado a microscopia óptica (Microscópio Óptico, marca ZEISS®), para avaliar todos os eventos do processo regenerativo da cartilagem articular, que pudessem fornecer subsídios para comparação dos resultados dos grupos tratados e do grupo controle.

Cada lâmina foi avaliada segundo o tipo de revestimento da membrana sinovial através de uma escala ordinal de 1 a 4 cruces; presença de células inflamatórias mononucleares; presença de vasos neoformados e presença de fibrose através de uma escala ordinal de 0 a 3 cruces.

Para o tipo de revestimento da membrana sinovial formado: 1- revestimento normal; 2 - revestimento descontínuo; 3 - revestimento com focos de hiperplasia e 4- revestimento atípico de reparo. Para a avaliação da presença de células inflamatórias: 0 – ausentes; 1- pequeno número, com disposição focal; 2- moderada quantidade, com disposição difusa; 3 - grande quantidade com disposição difusa, presença de células gigantes. Para a avaliação da presença de vasos neoformados e fibrose: 0- ausente; 1- discreta quantidade; 2- quantidade moderada e 3 acentuada quantidade, difusa.

A identificação de cada lâmina foi coberta com uma fita adesiva, para que não houvesse conhecimento prévio de qual grupo estava sendo analisado, evitando-se assim qualquer indução nos resultados obtidos. Ao final de cada análise, a fita era retirada e os resultados anotados.

4.7 Análise Estatística

Os dados foram analisados estatisticamente no Software BioEstat 5.0.

Foram comparados os dados referentes ao período de 7, 14 e 21 dias para cada grupo e ainda comparadas às variáveis estudadas entre os grupos Controle, 660 e 904.

Os dados foram inicialmente avaliados quanto à hipótese de normalidade de distribuição. A normalidade foi definida pela aplicação do teste de Shapiro Wilk. O nível de decisão estabelecido em $p < 0,05$. Para os dados avaliados constatou-se predominância de dados com distribuição não normal ($p < 0,05$).

A avaliação comparou a magnitude das variações entre as amostras.

O teste utilizado para comparação foi o teste de Kruskal Wallis com pós-teste de Dunn e o nível de significância estabelecido em $p < 0,05$.

O teste de Kruskal Wallis destina-se a comparar três ou mais amostras independentes do mesmo tamanho ou desigual, cujos escores devem ser mensurados, pelo menos, em nível ordinal. É comparável ao teste ANOVA (um critério).

Os valores foram dispostos em uma escala ordinal de 0 a 3 cruces conforme intensidade de presença para as variáveis analisadas, exceto para a variável revestimento com escala ordinal de 1 a 4 cruces de acordo com o tipo de revestimento encontrado.

5 RESULTADOS

Os resultados histológicos obtidos permitiram montar um painel demonstrativo, possibilitando comparar a resposta tecidual de acordo com o tipo de laser utilizado em cada grupo e o grupo controle.

A tabela 1 demonstra os resultados comparativos, avaliando o comportamento de cada grupo tratado e controle e a comparação entre os grupos, procurando sinais de bioestimulação nos grupos submetidos à terapia laser de baixa potência, avaliando-se o tipo de revestimento da membrana sinovial. Os valores apresentados são as médias de cada grupo.

Quanto ao tipo de revestimento da membrana sinovial encontrado, não houve diferença estatisticamente significativa no grupo controle entre os períodos de 7,14 e 21 dias. Já no grupo tratado com laser 660nm, houve diferença significativa quando comparado o sétimo e o décimo quarto dia, e décimo quarto e o vigésimo primeiro ($p < 0,0301$). Quando comparado o grupo 904, houve diferença estatisticamente significativa entre 7 e 14 dias ($p < 0,0011$), e no período de 14 dias e 21 dias. E quando comparado no décimo quarto dia os grupos controle e 660nm e grupo 660 e 904 nm houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0008$).

Tabela 1 – Tipo de revestimento da membrana sinovial constituinte entre os grupos Controle, 660 e 904. Valores expressos em média e desvio padrão. Teste de Kruskal Wallis.

Revestimento	Grupos			Kruskal Wallis	Pós-teste Dunn $p < 0,05$
	Controle (C)	660	904		
7 dias	1,33±0,52	2,00±0,89	2,00±0,0	0,1061	ns
14 dias	1,33±0,52	3,50±0,55	1,00±0,0	0,0008	C vs 660 660 vs 904
21 dias	1,00±0,0	1,83±1,33	1,17±0,41	0,2834	ns
Kruskal Wallis	0,2969	0,0301	0,0011		
Pós-teste Dunn $p < 0,05$	ns	7 vs 14 14 vs 21	7 vs 14 7 vs 21		

Quanto à presença de células inflamatórias apresentadas nos grupos não houve diferença estatística significativa. Entretanto quando comparado o sétimo dia entre o grupo controle e 660nm houve diferença ($p < 0,0416$). Tabela 2

Tabela 2 – Intensidade de células inflamatórias entre os grupos Controle, 660 e 904. Valores expressos em média e desvio padrão. Teste de Kruskal Wallis.

Células Inflamatórias	Grupos			Kruskal Wallis	Pós-teste Dunn $p < 0,05$
	Controle (C)	660	904		
7 dias	0,50±0,84	1,67±0,52	1,33±0,52	0,0416	C vs 660
14 dias	1,17±1,17	2,33±1,21	1,00±0,0	0,0846	Ns
21 dias	1,50±1,76	1,50±1,22	1,00±0,0	0,8417	Ns

Kruskal Wallis	0,5278	0,2597	0,1194
Pós-teste Dunn p<0,05	ns	ns	ns

ns (não significativo)

O quadro histopatológico mostrado quanto à formação de novos vasos (angiogênese) mostrou o efeito bioestimulador do laser 660nm, evidenciado na Tabela 3, demonstrando o efeito desse laser na angiogênese quando comparado com o grupo controle e grupo 904 no sétimo dia (p<0,0019). Quando o grupo 660 foi comparado, no décimo quarto dia, com grupo 904 também houve diferença (p<0,0112). No período de 21 dias entre os grupos e no grupo 904 e 660nm houve diferença estatisticamente significativa quanto à formação de novos vasos (p<0,0059).

Tabela 3 – Vasos neoformados entre os grupos Controle, 660 e 904. Valores expressos em média e desvio padrão. Teste de Kruskal Wallis.

Vasos neoformados	Grupos			Kruskal Wallis	Pós-teste Dunn p<0,05
	Controle (C)	660	904		
7 dias	0,00±0,00	2,33±0,52	0,50±0,55	0,0019	C vs 660 660 vs 904
14 dias	1,67±0,52	1,83±0,75	0,50±0,55	0,0112	C vs 904 660 vs 904
21 dias	1,67±1.37	0,00±0,00	1,17±0,41	0,0059	C vs 660 660 vs 904
Kruskal Wallis	0,0062	0,0017	0,0819		
Pós-teste Dunn p<0,05	7 vs 14 7 vs 21	7 vs 21 14 vs 21	ns		

ns (não significativo)

A formação de tecido fibrótico (Tabela 4) também foi maior no grupo controle, e teve uma diferença significativa quando comparado o grupo controle com os grupos tratados no sétimo dia (p<0,0013) e grupo controle comparado com grupo 904, no período de 21 dias (p<0,0028).

Tabela 4 – Avaliação da intensidade de Fibrose entre os grupos Controle, 660 e 904. Valores expressos em média e desvio padrão. Teste de Kruskal Wallis.

Fibrose	Grupos			Kruskal Wallis	Pós-teste Dunn p<0,05
	Controle	660	904		
7 dias	0,00±0,0	1,67±0,52	1,17±0,41	0,0013	C vs 660 C vs 904
14 dias	1,50±0,55	2,17±0,41	1,17±0,75	0,0370	660 vs 904

21 dias	2,67±0,52	2,17±0,75	1,00±0,0	0,0028	C vs 904
Kruskal Wallis	0,0007	0,2425	0,7388		
Pós-teste Dunn p<0,05	7 vs 14 7 vs 21	ns	ns		

5.1 Resultados da Análise Histopatológica

- Sete dias após a indução da lesão : O grupo G1 apresentou revestimento normal , com alguns focos de hiperplasia; pequeno número de células inflamatórias com disposição focal; discreta presença de fibrose e moderada quantidade de vasos neoformados.

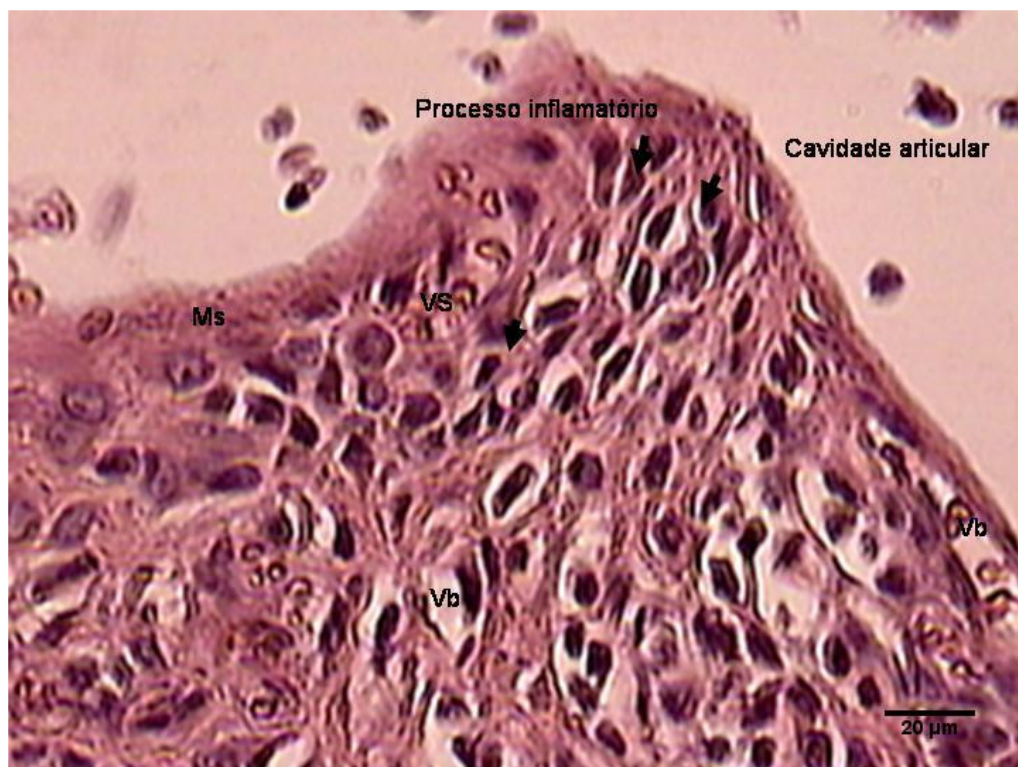


Figura 16 -Fotomicrografia de lâmina obtida dos animais do grupo I (tratado com laser de comprimento de onda de 660nm), após sete dias da indução: observar células inflamatórias (cabeça de setas), membrana sinovial (Ms) e intensa proliferação de vasos sanguíneos neoformados(Vb). Hematoxilina e Eosina - Barra de escala 20µm.

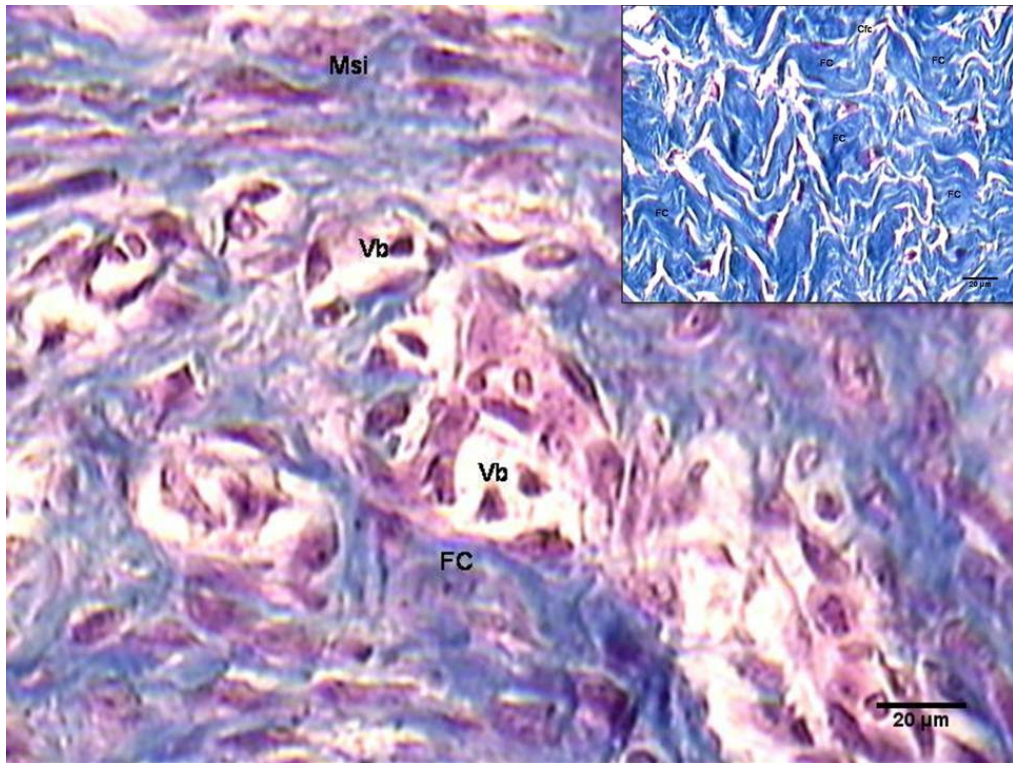


Figura 17- Fotomicrografia de lâmina obtida dos animais do grupo I (tratado com laser de comprimento de onda de 660nm), após sete dias da indução: observar a presença de fibrose (FC), membrana sinovial (Msi) e intensa proliferação de vasos sanguíneos neoformados(Vb). Tricrômico de Masson- Barra de escala 20µm.

Grupo G2: apresenta revestimento descontínuo; pequeno número de células inflamatórias; fibrose discreta e pequeno número de vasos neoformados.

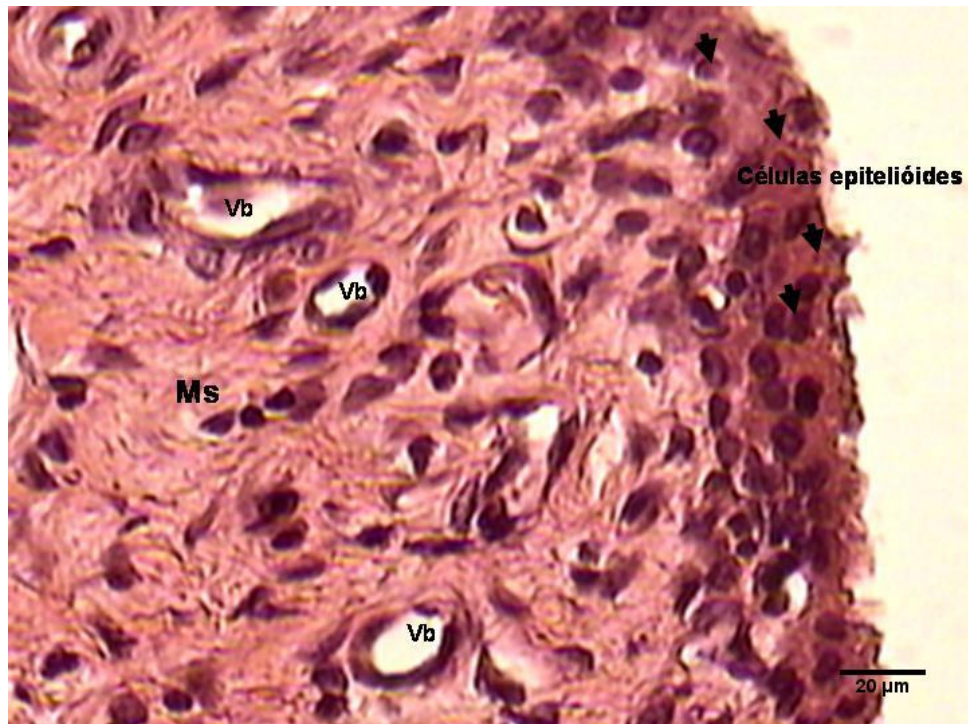


Figura 18- Fotomicrografia de lâmina obtida dos animais do grupo II (tratado com laser de comprimento de onda de 904nm), após sete dias da indução: observar a presença de revestimento descontínuo, membrana sinovial (Msi) e intensa proliferação de vasos sanguíneos neoformados(Vb), células epitelióides Hematoxilina e Eosina - Barra de escala 20µm..

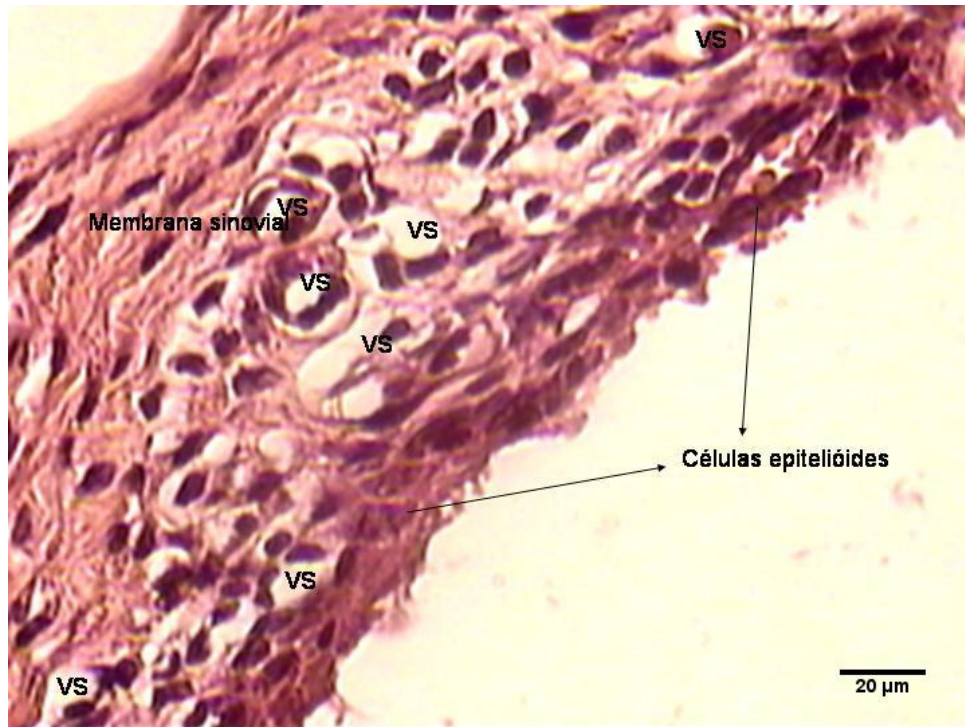


Figura 19- Fotomicrografia de lâmina obtida dos animais do grupo II (tratado com laser de comprimento de onda de 904nm), após sete dias da indução: observar a presença de revestimento descontínuo, membrana sinovial e intensa proliferação de vasos sanguíneos neoformados(Vb), células epitelioides Hematoxilina e Eosina - Barra de escala 20μm.

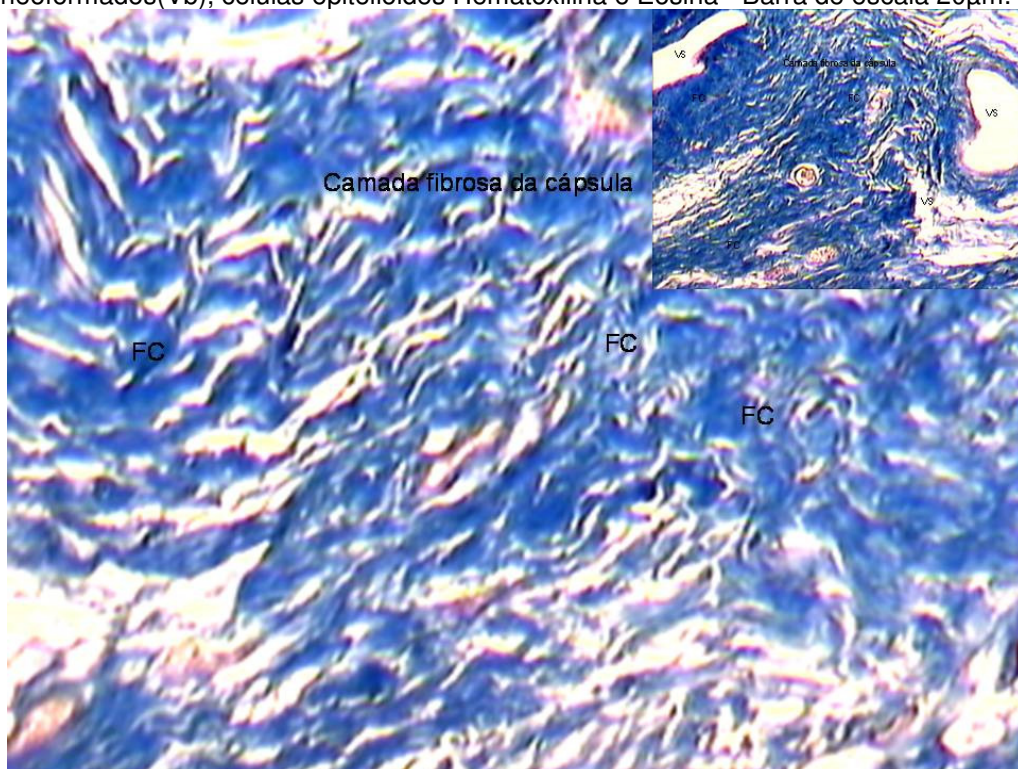
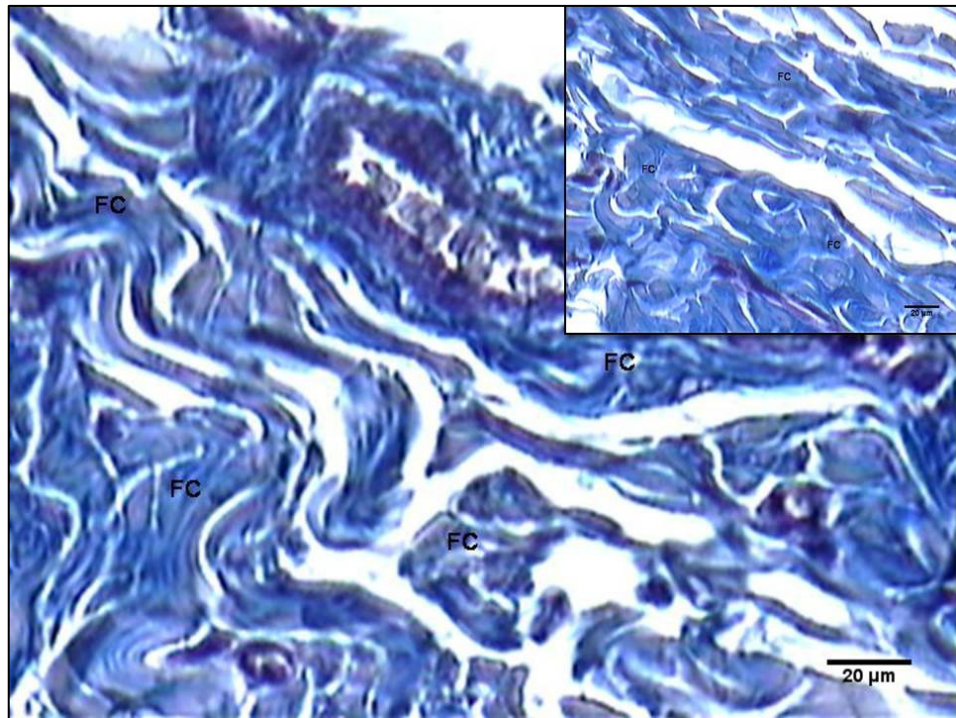


Figura 20- Fotomicrografia de lâmina obtida dos animais do grupo II (tratado com laser de comprimento de onda de 904nm), após sete dias da indução: observar a camada fibrosa da capsula articular e presença de fibrose (FC). Tricrômico de Masson- Barra de escala 20μm.



- Grupo G3: apresenta revestimento normal; pequeno número de células inflamatórias e ausência de fibrose e vasos neoformados.

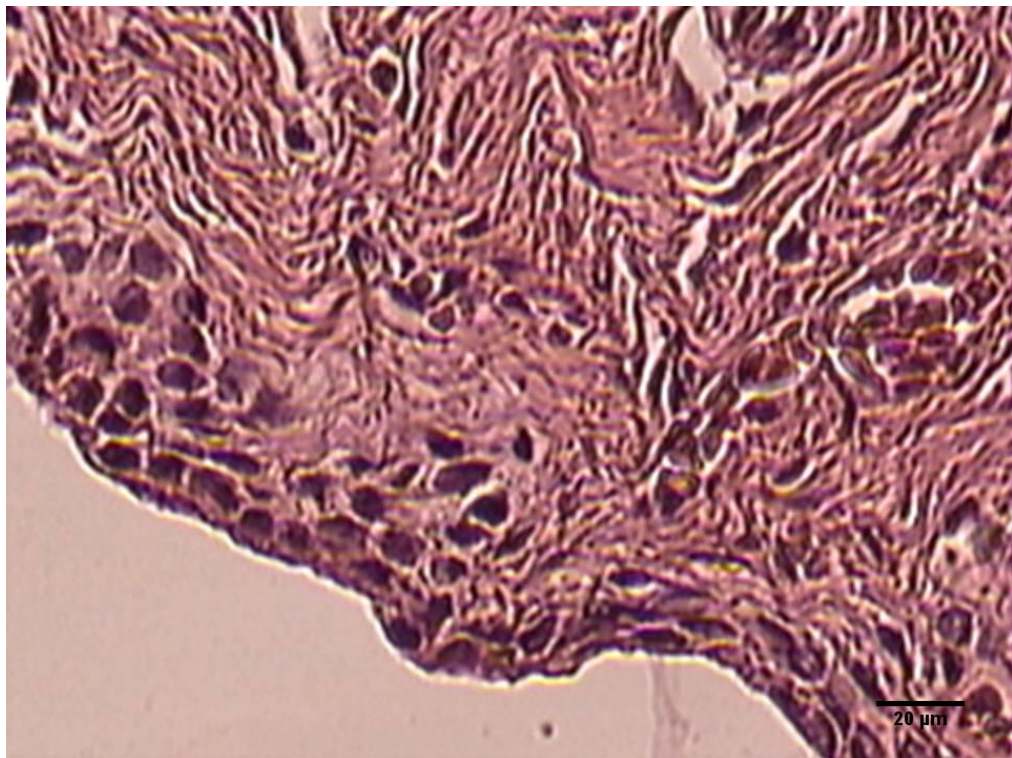


Figura 21- Fotomicrografia de lâmina obtida dos animais do grupo III (não tratados), após sete dias da indução:cavidade articular normal. Hematoxilina e Eosina - Barra de escala 20µm.

Figura 22- Montagem de fotomicrografia de lâmina obtida dos animais do grupo III (não tratados), após sete dias da indução: Observar a presença fibrose (FC). Tricrômico de Masson- Barra de escala 20µm.

- Quatorse dias após a indução da lesão: o grupo G1 apresentou revestimento com focos de hiperplasia; moderada quantidade de células inflamatórias com disposição difusa; presença de moderada quantidade de fibrose e pequeno número de vasos neoformados.

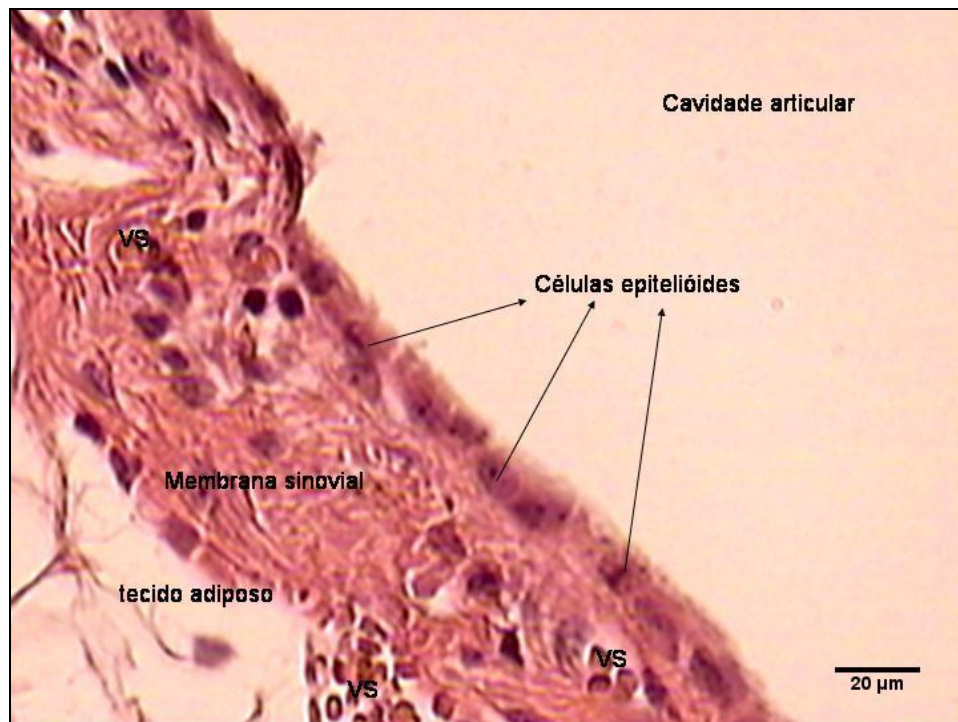


Figura 23- Fotomicrografia de lâmina obtida dos animais do grupo I (tratado com laser de 660nm), após quatorze dias da indução: Observar a presença de células epitelióides (seta longa), vasos sanguíneos neoformados e membrana sinovial, Hematoxilina e Eosina - Barra de escala 20µm.

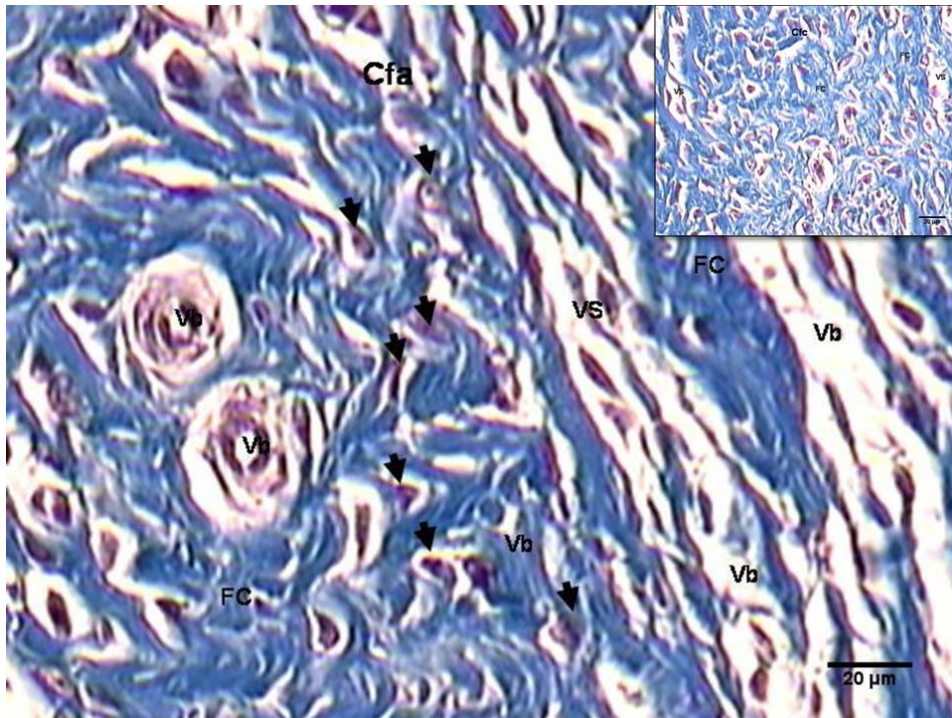


Figura 24- Montagem de fotomicrografia de lâmina obtida dos animais do grupo I (tratado com laser de 660nm), após quatorze dias da indução: Observar fibrose (FC), vasos neoformados (VB), fibroblastos (cabeça de seta). Tricrômico de Masson- Barra de escala 20µm.

- Grupo G2: apresenta revestimento normal; pequena quantidade de células inflamatórias; discreta presença de fibrose e pequeno número de vasos neoformados.



Figura 25- Fotomicrografia de lâmina obtida dos animais do grupo II (tratado com laser de comprimento de onda de 904nm), após quatorze dias da indução: Observar a presença de revestimento sinovial e células epitelióides. Hematoxilina e Eosina - Barra de escala 20µm

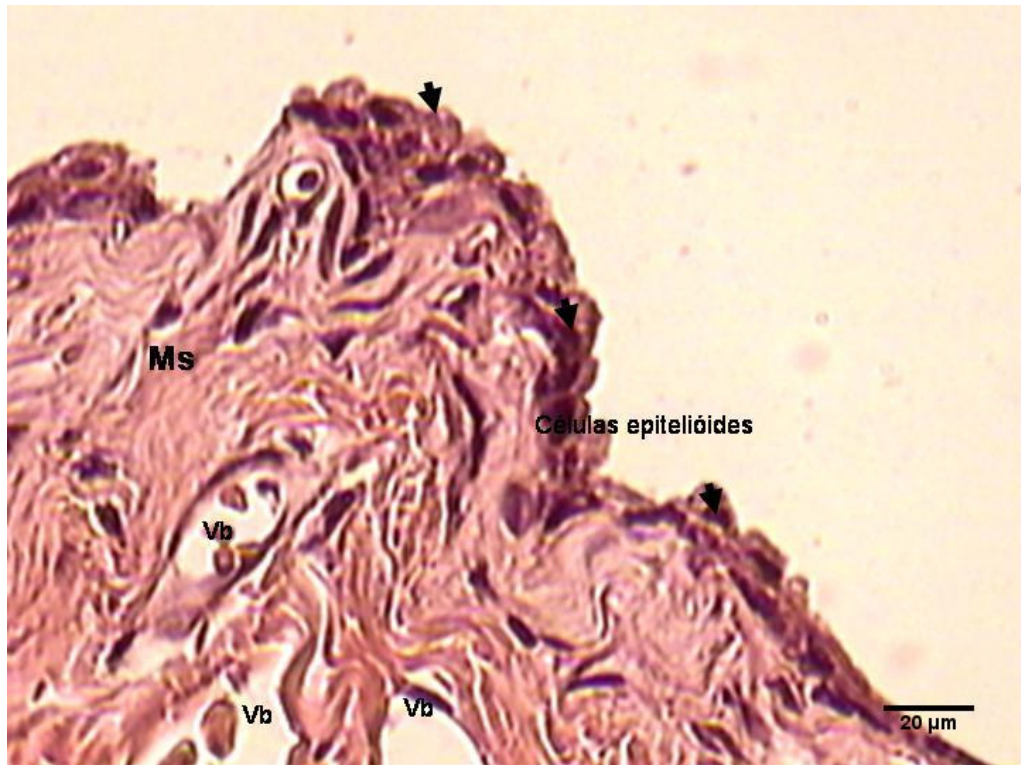


Figura 26-Fotomicrografia de lâmina obtida dos animais do grupo II (tratado com laser de comprimento de onda de 904nm),após quatorze dias da indução: Observar a presença de revestimento sinovial e celulas epitelioides . Hematoxilina e Eosina - Barra de escala 20μm.

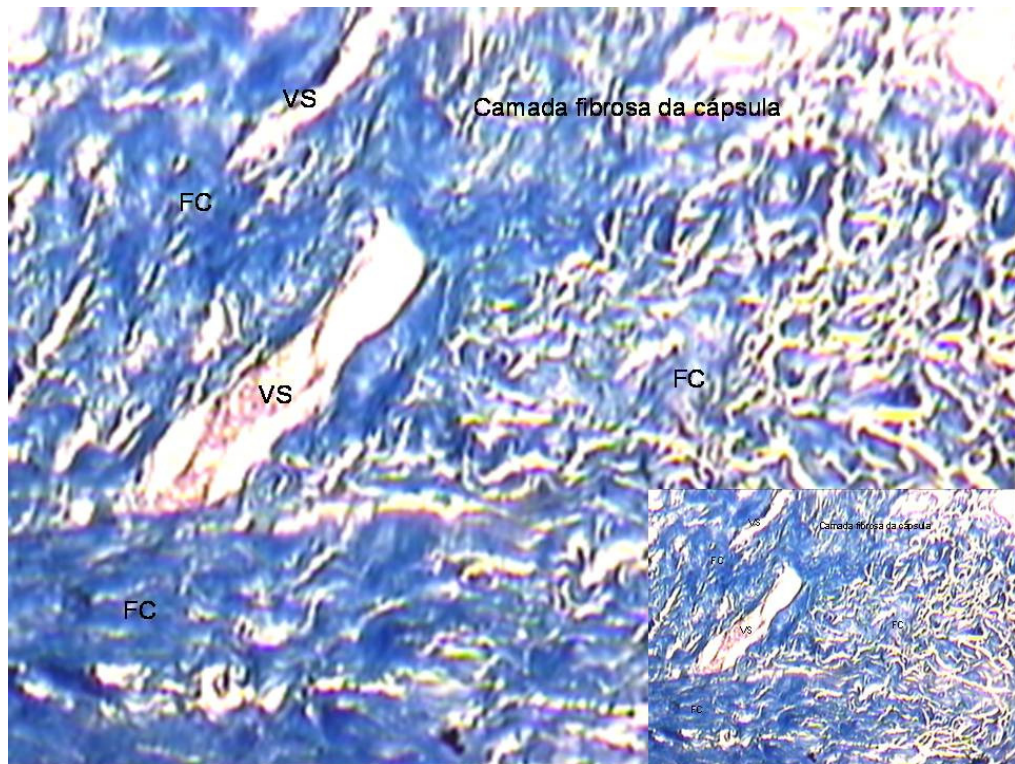


Figura 27- Montagem de fotomicrografia de lâmina obtida dos animais do grupo II (tratado com laser de comprimento de onda de 904nm), após quatorze dias da indução: Observar a presença fibrose (FC), vasos neoformados(VS) e camada fibrosa da cápsula . Tricrômico de Masson- Barra de escala 20μm.

- Grupo G3: apresenta revestimento normal; pequena quantidade de células inflamatórias; discreta presença de fibrose e pequeno número de vasos neoformados.

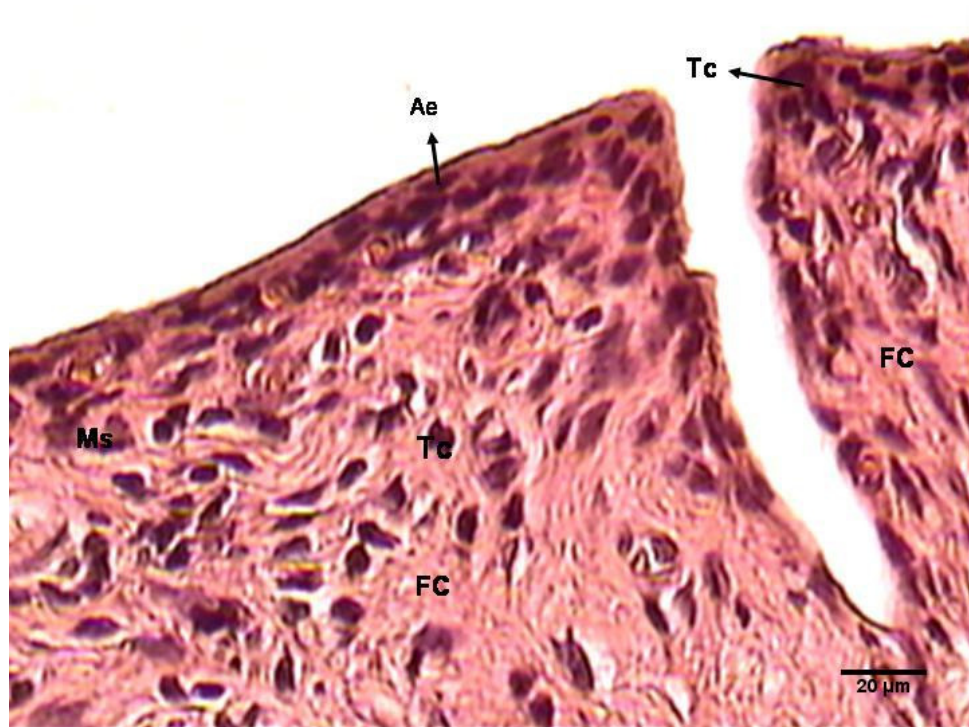


Figura 28- Fotomicrografia de lâmina obtida dos animais do grupo III (não tratados), quatorze dias da indução: Observar a presença fibrose (FC), tecido conjuntivo (seta TC), revestimento sinovial (MS), arranjo epitelial (seta Ae). Hematoxilina e Eosina - Barra de escala 20μm.

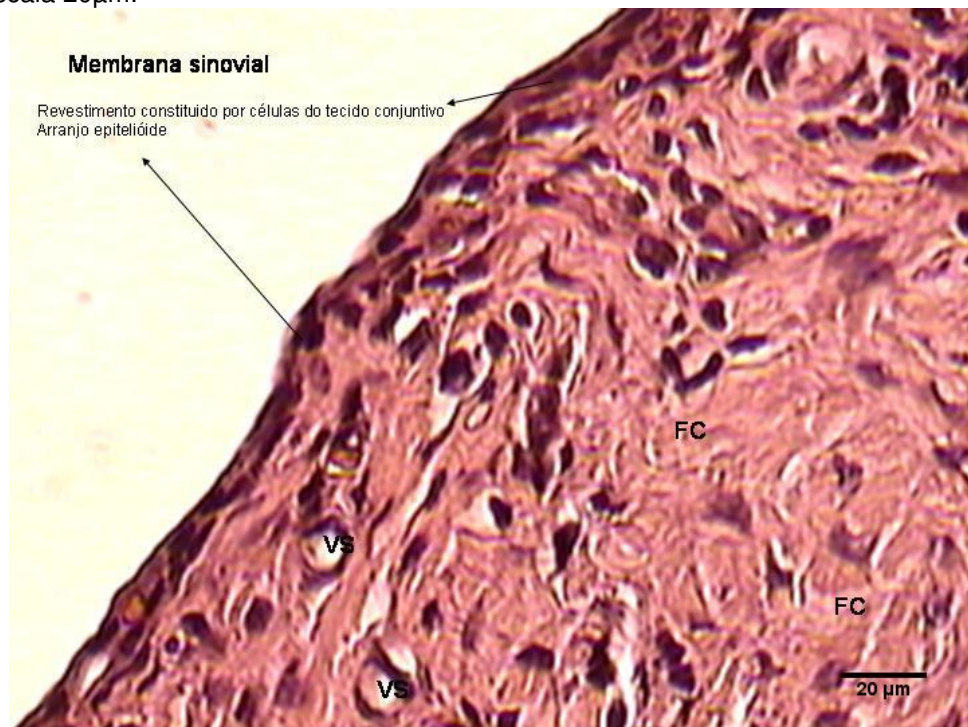


Figura 29- Fotomicrografia de lâmina obtida dos animais do grupo III (não tratados), após quatorze dias da indução: Observar a presença de angiogênese (VS) e o revestimento sinovial (setas). fibrose (FC). Hematoxilina e Eosina - Barra de escala 20μm.

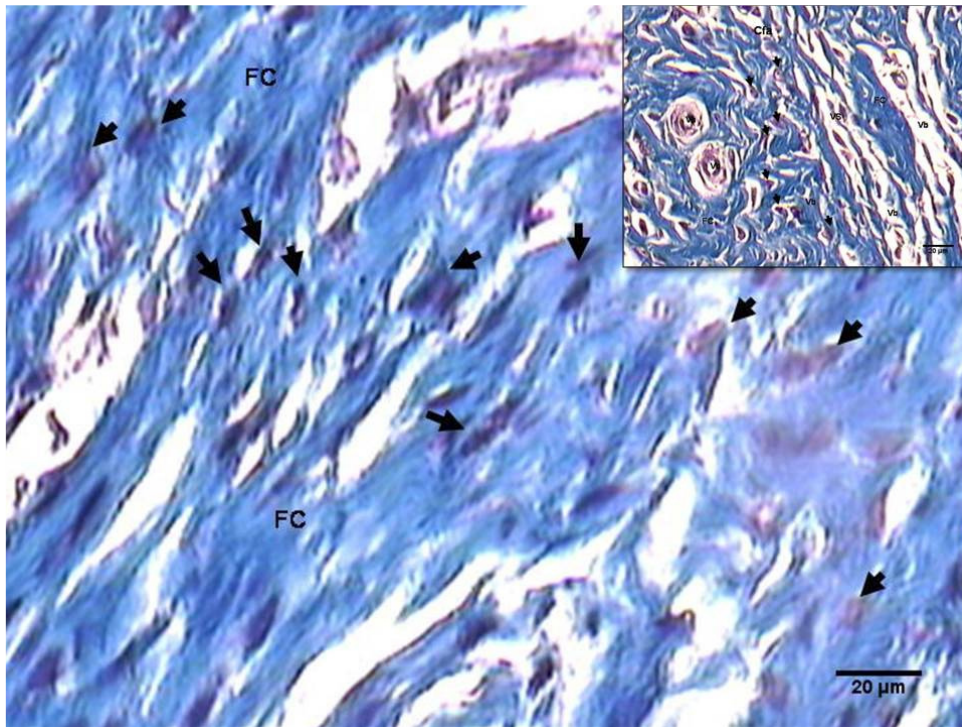


Figura 30- Montagem de fotomicrografia de lâmina obtida dos animais do grupo III (não tratados), após quatorze dias da indução: Observar a presença fibrose (FC), fibroblastos (cabeça de setas) Tricrômico de Masson- Barra de escala 20µm.

- Vinte e um dias após a indução da lesão: o grupo G1 apresentou revestimento normal; pequena quantidade de células inflamatórias; presença de moderada quantidade de fibrose e ausência de vasos neoformados.

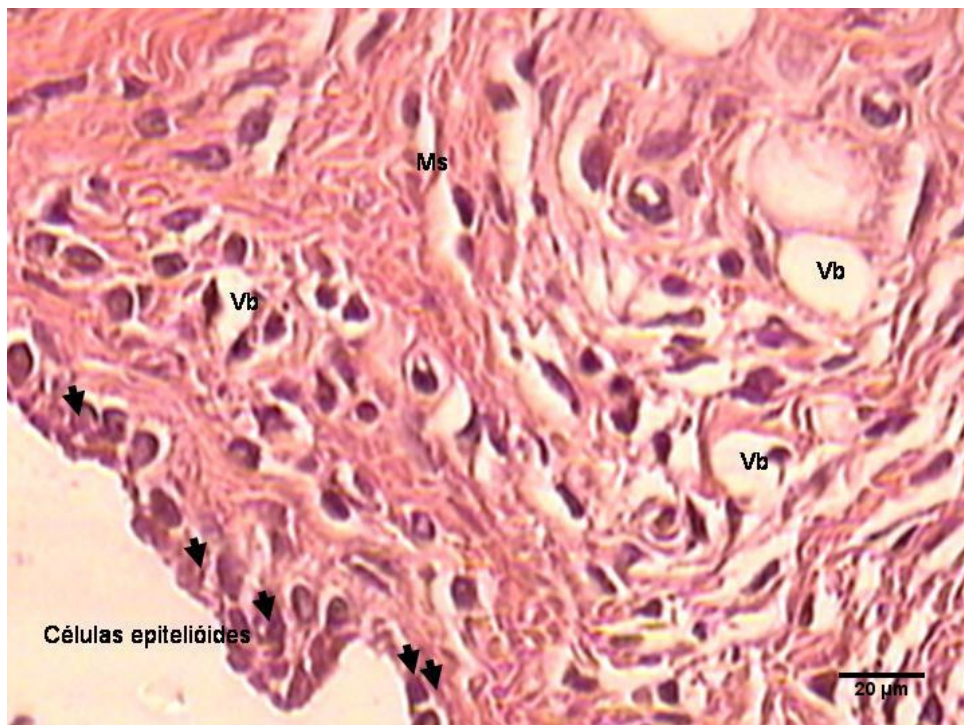


Figura 31- Fotomicrografia de lâmina obtida dos animais do grupo I (tratado com laser de 660nm), após vinte e um dias da indução: Observar a presença de células epitelióides (seta), vasos sanguíneos neoformado(Vb). Hematoxilina Eosina – Barra de Escala 20 µm.

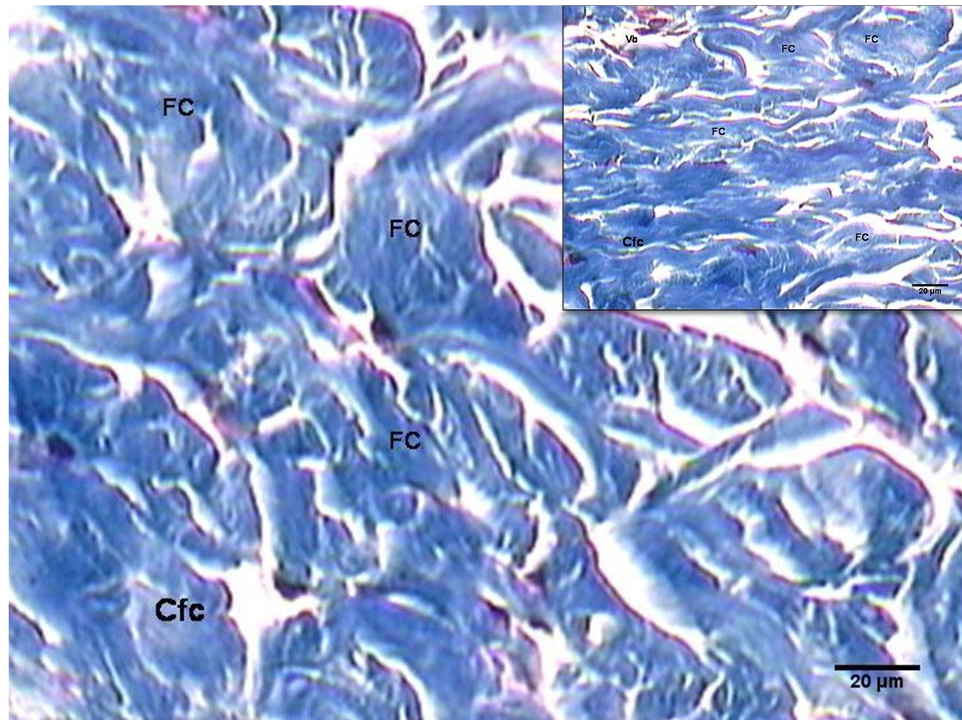


Figura 32- Montagem de fotomicrografia de lâmina obtida dos animais do grupo I (tratado com laser de 660nm), após vinte e um dias da indução: Observar a presença fibrose (FC), Tricrômico de Masson- Barra de escala 20µm.

- Grupo G2: apresentou revestimento normal; pequena quantidade de células inflamatórias; presença de pequena quantidade de fibrose vasos neoformados.



Figura 33- Fotomicrografia de lâmina obtida dos animais do grupo II (tratado com laser de comprimento de onda de 904nm), após vinte e um dias da indução: Observar a presença de revestimento sinovial, células epitelióides e vasossanguíneos (Vs). Hematoxilina e Eosina - Barra de escala 20µm

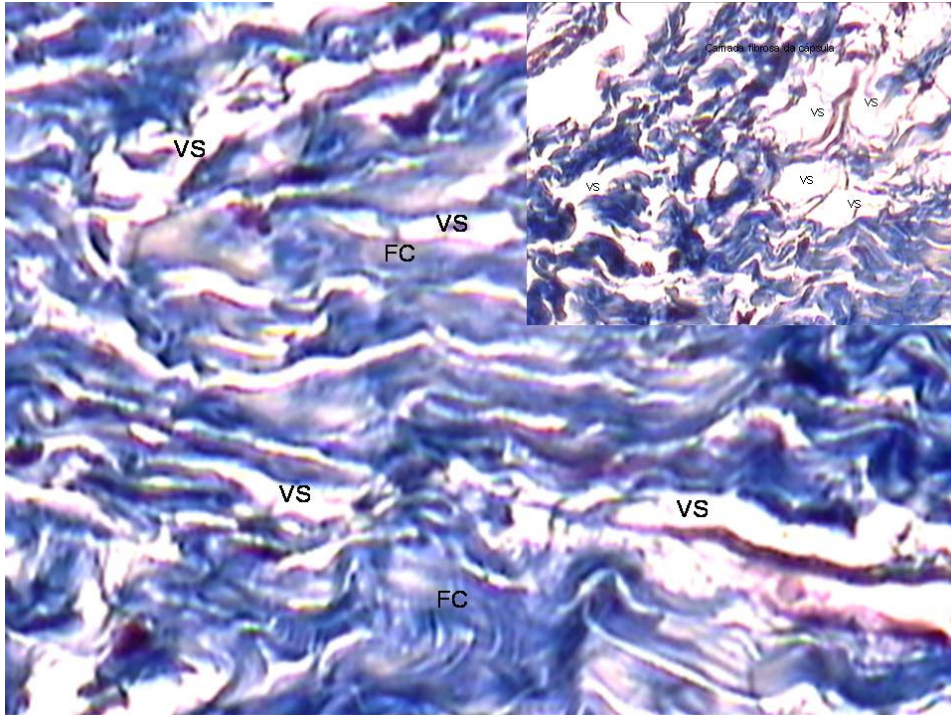


Figura 34- Montagem de fotomicrografia de lâmina obtida dos animais do grupo II (tratado com laser de 904nm), após vinte e um dias da indução: Observar a presença fibrose (FC), vasos neoformados(VS). Tricrômico de Masson- Barra de escala 20µm.

- Grupo G3: apresentou revestimento normal; pequena quantidade de células inflamatórias; presença de moderada quantidade de fibrose e pequena quantidade de vasos neoformados.



Figura 35- Fotomicrografia de lâmina obtida dos animais do grupo III (não tratados), após vinte e um dias da indução: Observar a presença de revestimento sinovial, células epitelioides (seta), membrana sinovial (Ms). Hematoxilina e Eosina - Barra de escala 20µm.

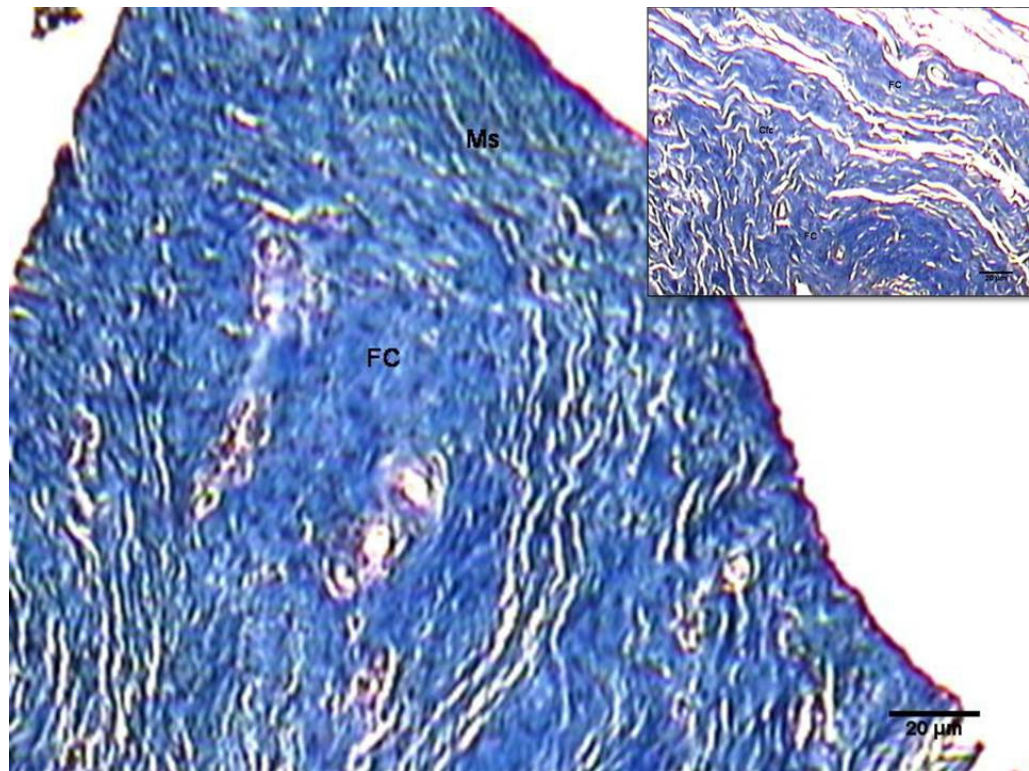


Figura 36- Montagem de fotomicrografia de lâmina obtida dos animais do grupo III (não tratados), após vinte e um dias da indução: Observar a presença fibrose (FC), membrana sinovial(Ms). Tricrômico de Masson- Barra de escala 20 μ m.

Alessandra Schleder da Rosa; Paulo de Tarso Camillo de Carvalho; Aline Ferreira dos Santos; Márcia Maria da Silva; Gilberto Facco; Daniel Martins Pereira

EFFECTS OF LOW POWER LASER RADIATION WITH 660NM AND 904NM WAVE LENGTH IN A
EXPERIMENTAL MODEL OF OSTEOARTHRITIS

A.S. Rosa; P.T.C.Carvalho; A.F.Santos; M.M.Silva; G.Facco; D.M.Pereira

Department of Physiotherapy, University for the Development of the State and the Pantanal Region
(Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal)

(UNIDERP)/ Anhanguera Educational

Campo Grande, Mato Grosso do Sul/Brazil

A.S. Rosa; P.T.C. Carvalho

Post Graduation Program for Health and Development of the Central-West Region, Federal University
of Mato Grosso do Sul

Campo Grande, Mato Grosso do Sul / Brazil

P. T. C. Carvalho

Rua Abricó do Pará, 146, Carandá Bosque,

79032-423 Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil

e-mail: ptpaulo@terra.com.br

ABSTRACT: The objective of this study was to analyze the influence of low power laser radiation with 660nm and 904nm wave length in a experimental model of osteoarthritis. The sample was composed by 54 Wistar male adult rats divided into three groups called G1, G2 and G3. In order to induce the cartilage lesion three infiltrations with 10 µl of papain 4% solution and adding 10 µl of cysteine solution were carried out in the right knee. 2 weeks after the last infiltration, group G1 was treated with 660nm, 6J/ cm² laser, 6 spots around the knee articulation, 16 seconds each spot. Group G2 was treated with 904nm laser, 288 seconds, 6 J/cm² in 4 spots and group G3 was adopted as control group. The data were submitted to statistic analysis using the Kruskal Wallis test and the level of significance established at p<0.05. As for the kind of revascularization found, there was statistically significant difference between 7 and 14 days (p<0.05) in group G2, and in the period of 14 days between groups G1 and G2 (p<0.05). As far as the formation of new vessels is concerned there was statistically significant difference when G1 was compared to G3 in the period of 7 and 21 days and G2 to G3 in 21 days. The

formation of fibrotic tissue was also higher in G3 ($p < 0.05$). We concluded that laser therapy stimulates angiogenesis and reduces the fibrosis formation in experimental model of osteoarthritis, mainly with the use of laser with 904nm wave length.

Keywords: articular cartilage; osteoarthritis; low power laser; biostimulation.

INTRODUCTION

The chronic articular pathologies represent one of the most prevalent conditions among the population. Osteoarthritis is one the most common and it is growing parallel to the population's aging process. The cartilage lesions or osteoarthritis are the most common ambulatory articular diseases. Besides causing loss of articular function and productivity, it is a limiting pathology which can even be incapacitating to the patient [1;2].

In the arthrotic processes there is an unbalance between the production of the components of the extracellular matrix and their destruction by the metalloproteases, leading to the degradation of the tissue. Due to this event, the cartilage loses its special characteristics, which causes alterations in the articular function. [3]

The articular cartilage's regeneration capacity is a controversial issue and it has been topic of research and investigation for many years. Until not long ago it was believed that cartilage had short regeneration capacity. However, some studies proved that this tissue is metabolically active, thus having capacity to regenerate itself.[2;4;5].

Regeneration occurs through the substitution of the damaged tissue by fiber cartilage or by the chondrocyte mitosis. In medical literature there are records of methods to promote regeneration of cartilage tissue amongst which perforations or abrasions as far as the subchondral bone, chondrocyte or mesenchymal cells transplants, continuous passive moving right after the lesion, synthetic matrix transplant, exposition of articulation to electric currents and laser therapy [6;7;8;9].

A number of techniques or surgical procedures aiming to promote regeneration of articular lesions have been developed, but none of them has been totally successful. For all these facts there is great interest in searching for new forms of treatment which aim to accelerate or promote the regeneration of this tissue. Among the various options to recover the metabolic balance of the joint one can consider using low potency laser radiation which rises great interest for being a non invasive modality.

Low power laser therapy was introduced as a non invasive alternative for the treatment of osteoarthritis many years ago. It has a vast applicability in the different tissues and its effects described in the literature are numerous. However, some tissues still present controversy and difficulties as far as their repairing process in concerned, as can be noticed in the cartilage tissue [10].

Studies carried out on the effects of laser in the osteocartilagenous lesions are different and present controversial results. In some studies the biostimulating effect of the low power laser has been observed and both biostimulation and bioinhibition seem to be related to the wave length and to the energy generated by the laser source [10;11;12].

Nevertheless literature is not totally clear regarding all the used parameters (such as application time, application mode, among others), what makes it difficult to understand the

methodology and reproduction of results as well as the comparative analysis among the studies. Nor does it have many studies about the effects on cartilage regeneration using lasers with 650nm and 904nm wave length. Thus, new research in this area might provide interesting data for a future clinical application.

Through this perspective, the objective of our study was to evaluate the effects of the low potency laser therapy with 660nm and 904nm wave length in a experimental model of osteoarthritis.

Materials and Methods

The sample was composed of 54 adult male rats (*rattus norvegicus albinus*) of Wistar lineage with corporal weight ranging between 250 to 350 grams, originated from the Central Vivarium of the University for the Development of the State and the Pantanal Region, Campo Grande, MS

The animals were housed in polypropylene boxes, 4 animals per cage, kept in photo period of 12 hours, with controlled humidity and temperature, minimum noise, solid feeding and water ad libitum.

All the experimental procedures in this study were approved by the committee for Ethics in the use of Animals / CEUA of the Federal University of Mato Grosso do Sul and agree with the ethical principles of the Brazilian College of Animal Experiments (COBEA), Protocol n. 153/2007.

Experimental Groups

The animals were randomly divided into three distinct groups called G1, G2 and G3, and 18 animals were put in each group. G1 animals were treated with 660nm wave length laser (G1); G2 animals were treated with 904nm wave length laser (G2) and G3, which was adopted as control group (G3), was not submitted to any kind of treatment.

The groups still suffered other three subdivisions called G1 – 7; G1 – 14 and G1 – 21, treated with 660nm wave length laser; G2 – 7; G2 – 14 and G2 – 21, treated with 904nm wave length laser and G3 – 7; G3 – 14 and G3 – 21 not treated. Each subgroup was composed of 6 animals.

Cartilage Lesions Induction

The animals were anesthetized with intraperitoneal injection of the veterinary anesthetic ketamine chloridrate (Vetanarcol® – 50ml/25mg – König laboratory) associated with the sedative, analgesic and muscle relaxing of xylasine hydrochloride (Ketalar® – 50ml/50mg – Pfizer Laboratory), in a mixture of 2:1 using 0.1 ml/100gr before each infiltration of the substance which induced the cartilage lesion.

After the anesthetic procedure the trichotomy was carried out, using shaving blade, in the hinder legs of each animal.

Afterwards the touching of the right knee was carried out with the flexed articulation in order to identify the articular interline. An intra-articular infiltration was made in the hinder leg right knee of each animal with 10µl of papain solution 4% and added 10µl of cysteine solution (0.03M), which was used as an activator.

The infiltration was repeated on the fourth and seventh days of the study. For the control, the same volume, 20µl of sterile saline solution was injected in each animal's hinder leg left knee [9;14].

After two weeks from the last infiltration of the inductive substance (carried out on the seventh study day) an application of laser in the groups G1 and G2 was started.

Irradiation Protocols

The equipment used for treating Group G1 was Laser from DMC Equipamentos Ltda®, model Photon Laser III, diode semiconductor of Indium, Gallium, Aluminum and Phosphorus, with 100mw potency and 660nm wave length, using optical fiber, 0.028cm² continuous bundle area. The application was punctual transcutaneous 1mm far from the animal skin, for 16 seconds each spot and energy density of 6 joules per cm² in 6 spots around the articulation of the in the hinder leg right knee (anterior, posterior, two medial spots and two lateral spots).

The equipment used for treating group G2 was Laser from KLD Biosistemas Equipamentos Eletrônicos Ltda®, model Endophoton, diode semiconductor of gallium and aluminum arsenide, with 50mw potency of 904nm wave length, continuous bundle area of 0.01cm². The application was punctual transcutaneous for 288 seconds and energy density of 6 joules per cm² in four spots around the right knee articulation in the hinder leg (anterior, posterior, medial and lateral).

The irradiation was initiated after two weeks from the last papain and cysteine infiltration. It was carried out in consecutive days on the right knee in the experimental groups G1 and G2 until the euthanasia day of each group, with lethal dosage of sodium pentobarbital, with dosage of 200mg/kg through peritoneal via.

After the euthanasia, the trichotomy of the hinder right leg was carried out using a shaving blade. The animal was then positioned in ventral decubitus with front and hinder legs tied in abduction.

The thigh-femoral articulation was disarticulated in the right hinder leg of each animal for further analysis of the cartilage tissue of the knee articulation.

Procedure for Preparing Histological Material

After collecting material, it was immediately fixed through a buffered formalin solution at 10%. Then the decalcification with EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) was made. The EDTA was neutralized with sodium phosphate tampon to reach PH 7.0. In order to carry out the impregnation (infiltration), paraffin was used in two stages until the impregnation on the definitive paraffin. Then the pieces were cut with patterned 5µm thickness. The cuts were colored with hematoxylin-eosin and Masson trichrome.

Statistic Analysis

The data were analyzed using the Bio Estat 5.0 Software.

The compared data were those referring to the period of 7, 14 and 21 days for each group and then compared to the studied variables between the control groups, 660 and 904.

The evaluation compared the magnitude of the variations among the samples.

The utilized test for comparison was the Kruskal Wallis Test and the level of significance was established at $p < 0.05$.

The values were organized in an ordinal scale from 0 to 3 crosses according to the intensity of presence for the analyzed variables, except for the revestment variable with ordinal scale from 1 to 4 crosses according to the kind of revestment found.

Results

The histological results obtained allowed us to devise a demonstrative panel which made it possible to compare the tissue response according to the kind of laser used in each group and in the control group.

Figure 1 demonstrates the comparative results evaluating the behavior of each treated group and the control group and the comparison among the groups, looking for signs of biostimulation in the groups which were submitted to the laser therapy, evaluating the kind of coat and the presence of inflammatory cells. The values presented are the average for each group.

Concerning the kind of coat found, there was no statistically significant difference in the control group and 660 among the periods of 7, 14 and 21 days. When compared to the 904, there was a statistically significant difference between 7 and 14 days ($p < 0.05$), and in the period of 14 days, between the group G1 and G2 ($p < 0.05$).

As for the presence of inflammatory cells presented in the groups and intergroups there was no statistically significant difference.

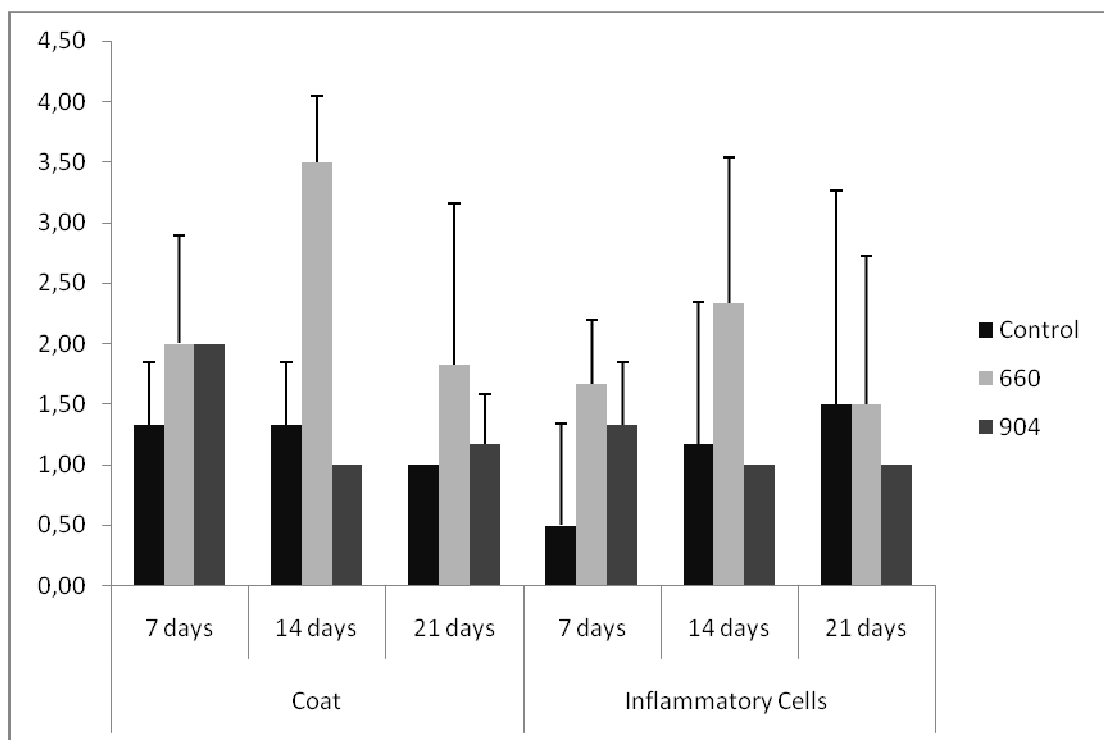


Figura 1. Kind of constituting coat and intensity of inflammatory cells among the control, 660 and 904. Values expressed on average.

The histological scenario showed concerning the formation of new vessels (angiogenesis), showed the laser's biostimulating effect, evidenced on figure 2. This demonstrated the 660 laser effect in the angiogenesis when compared to the control group in the period of 7 days and 21 days, and 904 group compared to the 660 group. In the period of 14 days among the groups and in the 904 group there was no statistically significant difference concerning the formation of new vessels.

The formation of fibrotic tissue was also higher in the control group and there was a significant difference when it was compared to the group treated in the period of 7 days, and when it was compared to the 904 group in the period of 21 days ($p < 0.05$).

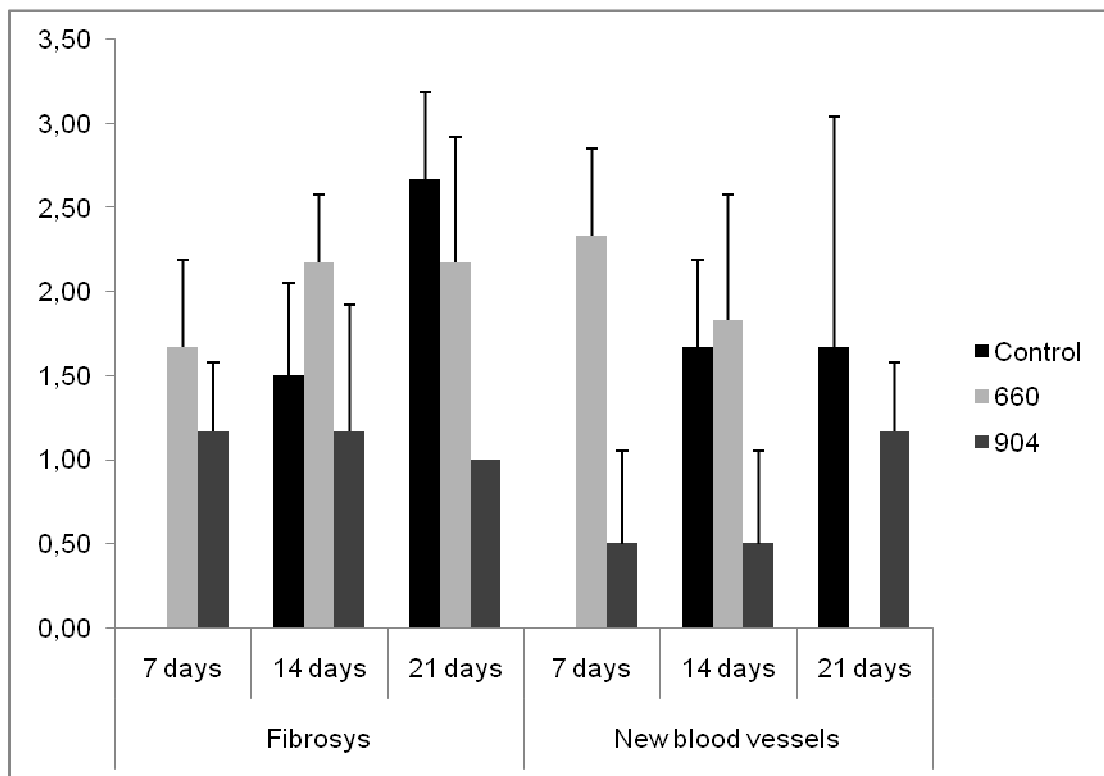


Figura 2. Fibrosis and newly formed vessels among the control group 660 e 904. Values expressed on average .

Results of Histopathological Analysis

- Seven days after lesion induction : Group G1 presented normal coat with some hyperplasy areas; small number of inflammatory cells with focal disposition; discreet presence of fibrosis and moderate quantity of newly formed vessels.
- Group G2: presents discontinuous coat; small number of inflammatory cells; discreet fibrosis and small number of newly formed vessels.
- Group G3: presents normal coat; small number of inflammatory cells and absence of fibrosis and newly formed vessels.

- Fourteen days after lesion induction: Group G1 presented coat with hyperplasy areas; moderate quantify of inflammatory cells with difuse disposition; presence of moderate quantity of fibrosis and small number of newly formed vessels .
 - Group G2: presents normal coat; small quantity of inflammatory cells; discreet presence of fibrosis and small number of newly formed vessels.
 - Group G3: presents normal coat ; small quantity of inflammatory cells; discreet presence of fibrosis and small number of newly formed vessels.
-
- Twenty one days after lesion induction:Group G1 presented normal coat; small quantity of inflammatory cells; presence of moderate quantity of fibrosis and absence of newly formed vessels.
 - Group G2: presented normal coat; small quantity of imflammatory cells; presence of small quantity of fibrosis and newly formed vessels.
 - Group G3: presented normal coat; small quantity of inflammatory cells; presence of moderate quantity of fibrosis and small quantity of newly formed vessels.

Discussion

The low potency laser has increasingly been studied and represents one of the most frequently used therapeutic modality in rehabilitation. However, clinic and scientific evidences are often contradictory [6;12;15;16;17], thus the necessity for research involving this resource becomes important and relevant.

The articular cartilage is the most important structure for protection against stress and weight discharge in the articulation. Nevertheless, this tissue has a small and controversial spontaneous regeneration potential. Due to this fact, various studies are described in literature in order to investigate techniques which help or accelerate this articular degenerative's process of regeneration. The purpose of evaluating this kind of lesion behavior becomes relevant because of the unanswered questions related to the regeneration process and the vast literature registering the regeneration difficulties [3;18;19;20;21;22;23;27;28].

Many techniques or surgical procedures aiming to promote cartilage regeneration and others parts of joints such as drilling or abrasions as far as the subchondral bone, condrocytes or mesenchemal cells transplants, continuous passive motion right after the lesion, synthetic matrix transplant, exposure of articulation the electric currents, hormone therapy and laser therapy have been developed, although none of them were totally successful. Because of all these facts there is great interest in searching for new ways of treatment which aim to accelerate or promote the regeneration of the joint [6;7;8;9].

The experimental research in vitro and in vivo are necessary and have fundamental importance in the understanding of this tissue's degeneration and regeneration process. There are

various methods to induce lesion such as ligament section, meniscectomy, articulation compression and intra-articular injection of substances as papain.

This study adopted the lesion induction with papain which is a proteolytic enzyme which causes the chondroitin sulfate and the polysaccharide complex lyze, widely used in literature for being an effective, economic and easily applicable method. [9;14;26;27].

In order to obtain a homogeneous lesion in relation to the degree of articular lesion, we carried out the lesion induction through infiltration of controlled papain volume, according to what is described by Lin and collaborators [9;14].

In this study we used the Wistar rat for it is easy to handle at laboratories, easy to obtain and because the experimental models using papain work with this animal.

We chose to carry out this investigation with two kinds of low potency laser: one in the red spectrum (660nm) and another in the infrared spectrum (904nm), in order to make a comparison of the histological events presented after the treatment and verify which one was more effective since the literature is controversial concerning the most effective wave length in osteoarthritis tissues. The studies present varied wave lengths in cartilage tissue, which makes it difficult to compare results and determine the most suitable wave length to treat this kind of tissue [9;14;16;17;28].

6 Joules per cm² energy density was used because a number of authors demonstrated that wave length and energy density are crucial factors for the laser therapy success and too high or low energy densities do not present favorable results. Moreover, photodynamic damage may happen [29;30].

As far as fluencies are concerned there is a wide discrepancy in the studies about arthritic joint ranging from 2J/cm² to 16 J/cm² [6;7;9;10;14;15;16], and in order to standardize one of the parameters used in the research we chose to use 6J/cm² fluency based on Jia e Guo (2004), who compared fluencies from 1 to 6J/cm² and verified that there was higher cell proliferation of chondrocytes with 4 to 6J/cm² fluencies than with others.

Aiming to analyze the histological events related to the regeneration of articular lesion, this repair was accompanied on the seventh, fourteenth and twenty first days after lesion induction in the groups G1, treated with 660nm laser, group G2, treated with 904nm laser and G3, adopted as control group, which had induced lesion but no treatment.

In the present study the results demonstrate that the formation of the coat of synovium in the group treated with 904nm low potency laser presented better results on the seventh day compared to the fourteenth day, evolving from an discontinuous coat in the beginning of the radiation to a normal one without discontinuity and areas of hyperplasia.

The synovial membrane plays an important role in the development of osteoarthritis. The changes of the membrane associated with degenerative joint disease vary from average to moderate inflammation and include hypertrophy and hyperplasia of synovial cells, infiltration linfoplasmocytary, increased vascularization in the synovial tissue and fibrosis subsynovial [31]. The membrane releasing proteolytic enzymes in the articular space that will act in the degradation of cartilage [32].

As reported by Allard et al. (1990), inflammatory cells that accumulate in tissue proliferated synovial joint damage can induce the production of proteolytic enzymes and the interaction, via cytokines, with cells of the cartilage and bone

Calatrava e collaborators (1997) carried out a study in rabbits with cartilage lesions treated with 632,8nm and 904nm lasers and reported that the animals treated presented a faster recovery and higher tissue regeneration when compared to the control limb, clarifying the laser's biostimulating potential in the process of tissue repair. They still observed that the group treated with infrared laser presented shorter articular diameter when compared with the other treated group.

The tissue's response to the lesion is generally divided into necrosis, inflammation and repair. The necrosis phase happens right after the lesion and depends on the lesion type and degree and the amount of necrotic tissue depends on the tissue cell's sensitivity to hypoxia. Chondrocytes are relatively insensitive to hypoxia and thus the cartilage has a lower cellular death probability than other tissues' in this phase. Inflammation occurs immediately after the first phase, and is mediated by the vascular system. 24 hours after a cartilage lesion there is an increase in the mitotic activity associated with the increase in the synthesis of the matrix components and proteolytic enzymes. The evidences of the increase in the anabolic and catabolic activity happen from the first days after the lesion until two weeks, when these levels decrease [33].

In our study, the quantity of mononuclear inflammatory cells was not statistically significant when compared among the periods of 7, 14 and 21 days in three evaluated groups and when the comparison was made between the groups. This fact can be justified for the experiment's protocol started two weeks after the last infiltration, when there was enough time to solve the acute inflammatory process. This is confirmed by the author mentioned above when he states that 2 weeks after the lesion the anabolic and catabolic activity is reduced.

Similarly Kerppers *et al.* (2007) research, the results did not show reduction in the inflammatory process in the group treated with laser, what is against the various studies which state the anti inflammatory effect of laser therapy [29;36;37;38;39;40] In our research, however, we cannot claim that low power laser therapy does not have this effect since our study showed an inflammatory reaction in all the groups, although there was no statistically significant alteration between the treated groups and the control groups, which as far as we were concerned happened due to the proposed protocol.

Nevertheless we could verify that the group treated with 904nm laser demonstrated a decrease in the inflammatory exudate in the evaluated periods whereas the control group presented an increase.

It was verified that the quantity of fibrotic tissue in the control group was significantly bigger than in the treated group, evidencing the low power lasers' biostimulation effect on the articular joint repair process of the latter. In the histological analysis the group submitted to 904nm laser compared to 660nm laser showed a lower formation of this kind of tissue. This information was also evidenced in the Calatrava and collaborators' work (1997), which while comparing the treatment of chondral lesions with 632,8 and 904nm lasers, verified that the group treated with the 632,8nm laser and the control group had higher formation of fibrotic tissue than the group treated with the 904nm.

This happened differently from Cafalli and collaborators' (1993) work, which after 920nm laser radiation in chondral lesions on rabbits did not observe difference in the scar tissue presented in the treated group and in the control group.

The great challenge in this tissue's regeneration is the kind of tissue formed, since it is known that the composition of the normal cartilage is basically type II collagen fibers. When there is formation of fibrosis as part of regeneration we know that this formed tissue does not present the same extensibility, resistance to compression and load properties needed by the articulation tissue. And that training of fibrotic synovium, can reduce the range of motion and assist in the degenerative process

According to Starkey (2001), the scarring speed and quality are regulated by the quantity of adenosine triphosphate (ATP) produced. ATP is the cell's primary energy source and it is fundamental to provide the necessary metabolic energy to restore the cellular membrane's property. This provision is carried out when sodium and potassium get into and out of the cell to build and produce new proteins.

Low Power Laser acts mainly on cell organelles (mitochondria and membranes), generating an increase in the production of ATP and modifying the ionic transport. These processes occur through cellular photoreceptors described above [29]. One can observe that the quality of the scar tissue was better in the treated groups when compared with the control group on the seventh and twenty first days, which was evidenced by the quantity of fibrotic tissue presented in the repair process of the articular joint.

Another aspect related to the quality of the scar tissue is the angiogenesis. For some authors, angiogenesis is the most important histological characteristic in the scarring process [42].

In our research it can be observed that the quantity of newly formed vessels on the seventh day was bigger in the irradiated groups and had statistically significant difference when compared to the control group and the group treated with 660nm. The quantity of newly formed vessels directly influences the quality of the scar tissue. This becomes evident when we observe that the quantity of fibrotic tissue in the control group was bigger than in the treated groups.

The influence of blood supply in the scar tissue's process and quality is elucidated in studies [38;43;44]. And there are reports in literature that laser has the capacity of increasing microcirculation blood flow for increasing the release of nitric oxide in the irradiated tissue [45], thus making the provision of oxygen necessary for the tissue repair possible.

Most experimental studies on cartilage lesions evaluated cellular growth with low potency laser in chondral lesions and the increase in the proliferation of these cells was shown in studies such as [7;9;28].

In order to highlight the laser therapy regenerative effect on lesions of arthritic joints, further studies are necessary which can evaluate the kind of collagen formed in this process, analysis of the synovial membrane arthritic, the proliferation of chondrocytes and effects on microcirculation relating the ideal parameters for such.

There are various studies on laser therapy but there is no standardization in the used parameters. Moreover, many studies do not present all the necessary data to understand this resource's action mechanism. Therefore more studies are necessary to verify the importance of the utilized parameters and their influence on the tissue's response so that it can be possible to standardize effective protocols for treating lesions using low power laser.

Conclusions

The comparative study of the low power laser therapy with 660nm and 904nm wave length made it possible for us to conclude that:

- The group treated with 904nm laser presented formation of discontinuous coat on the seventh day and normal coat on the fourteenth day, demonstrating this laser's biostimulating effect in the coat formation in the lesions.
- The control group presented an increase of the inflammatory exudate, whereas the group treated with 904nm laser presented a decreased in the inflammatory process in the evaluated periods.
- The control group showed higher fibrosis formation on the seventh, fourteenth and twenty first days and also higher when compared to the irradiated group.
- In the histological analysis, the irradiated lesions with 660nm presented higher formation of new vessels on the seventh day compared to the other periods and compared to the control group.
- AsGa 904nm laser proved to be more effective in the repair of lesions occasioned by experimental model, formation and smaller inflammatory exudate.

References

- 1- Bjordal JM, Couppé C, Chow RT, Tunér J, Ljunggren EA. A systematic review of low laser therapy with location-specific doses for pain from chronic joint disorders. *Australian Journal of Physiotherapy*.2003; 49:107- 116.
- 2- Fu LLK, Maffulli N, Yip KMH, Chan KM. Articular cartilage lesions of the knee following immobilization or destabilization for 6 or 12 weeks in rabbits. *Clin Rheumatol*.1998; 17:227-233.

- 3- Velosa APP, Teodoro WR, Yoshinari NH. Colágeno na Cartilagem Osteoartrótica. *Rev Bras Reumatol* .2003; 43(3): 160-166.
- 4- Pugliese LS, Medrado AP, Reis SRA, Andrade ZA. A influência da terapia a laser de baixa densidade de energia na biomodulação das fibras colágenas e elásticas. *Pesquisa Odontológica Brasileira*.2003; 17(4).
- 5- Wakitami S, Kawaguchi A, Tokuhara Y. Present status of and future direction for articular cartilage repair. *J Bone Miner Metab*. 2008; 26:115-122.
- 6- Cafalli FAS, Borelli V, Holzchuh MP, Farias EC, Cipola WWV, Coutinho Neto AC, Livani B, Xavier RM. Estudo experimental dos efeitos da radiação laser de baixa energia na regeneração osteocartilagínea em joelhos de coelhos Aspectos histológicos. *Rev Bras Ortop*. 1993; 28(9): 673- 678.
- 7- Torricelli P, Giavaresi G, Fini M, Guzzardella GA, Morrone G, Carpi A, Giardino R. Laser Biostimulation of cartilage: in vitro evaluation. *Biomed Pharmacother*. 2001; 55:117-120.
- 8- Schurman DJ, Smith LR. Osteoarthritis: Current Treatment and Future prospects for Surgical, Medical, and Biological Intervention. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 2004; 427: 183-189.
- 9- Lin YS, Huang MH, Chai CY, Yang RC. Effects of Helium-Neon Laser on Levels of Stress Protein and Arthritic Histopathology in Experimental Osteoarthritis. *Am.J Phys. Med.Rehabil*. 2004; 83(10):758-765.
- 10- Gur A, Cosut A, Sarac AJ, Cevik R, Nas K, Uyar A. Efficacy of different therapy regimes of low-power laser in painful osteoarthritis of the knee: a double-blind and randomized-controlled trial. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2003; 33: 330-338.
- 11- Vladimirov YA, Osipov AN, Klebanov GI. Photobiological Principles of Therapeutic Applications of Laser Radiation. *Biochemistry*.2004; 69(1):103-113.
- 12- Campana VR, Moya M, Gavoto A, Spitale L, Soriano F, Palma JA. Laser therapy on arthritis induced by urate crystals. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2004; 22(6): 499-503.
- 13- Andreu MIG, Zaldívar CV. Efectos biológicos de la radiación laser de baja potencia en la reparación histórica. *Ver Cubana Estomatol*. 1996; 33(2).
- 14- Lin YS, Huang MH, Chai CY. Effects of Helium-Neon Laser on the mucopolysaccharide induction in experimental osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006; 14(4): 377-383.
- 15- Calatrava RI, Valenzuela SJM, Gómez-Villamandos RJ, Redondo JI, Gómez-Villamandos JC, Jurado AI. Histological and Clinical Responses of Articular Cartilage to Low-level Laser Therapy: Experimental Study. *Lasers Med Sci*.1997; 12:117-121.
- 16- Kamali F, Bayat M, Torkaman G, Ebrahimi E, Salavati M. The therapeutic effect of low-level laser on repair of osteochondral defects in rabbit knee. *J Photochem Photobiol B*.2007; 88:11-15.
- 17- Tascioglu F, Armagan O, Tabak Y, Corapci I, Oner C. Low Power Laser Treatment in patients with Knee Osteoarthritis. *Swiss Med WKLS*.2004; 134:254-258.
- 18- Lohmander LS. Articular cartilage and osteoarthrosis.The role of molecular markers to monitor breakdown, repair and disease. *J Anat*.1994; 184: 477-492.
- 19- Poole AR, Kojima T, Yasuda T, Mwale F, Kobayashi M, Laverty S. Composition and Structure of Articular Cartilage. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 2001; (391S): 26-33.
- 20- Scully SP, Lee JW, Ghert MA, Qi W. The Role of the Extracellular Matrix in Articular Chondrocytes Regulation. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 2004; (391S): 72-89.
- 21- Meachin G. Ages Changes in Articular Cartilage. *Clinical Orthopaedics and Related Research*.2001;(391S):6-13.
- 22- Nakamura N, Horibe S, Toritsuka Y, Mitsuoka T, Natsu-ume T, Yoneda K, Hamada M, Tanaka Y, Boorman RS, Yoshikawa H, Shino K. The location-specific healing response of damage articular cartilage after ACL reconstruction: short-term follow-up. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*.2008; 16: 843-848.
- 23- Ahmed N, Stanford WL, Kandel RA. Mesenchymal stem and progenitor cells for cartilage repair. *Skeletal Radiol*.2007;36:909-912.
- 24- Velosa APP, Oliveira AM, Carrasco S, Capelozzi VL, Teodoro WR, Yoshinari NH. Meniscectomia parcial como modelo experimental de osteoartrite em coelhos e efeito protetor do difosfato de cloroquina. *Rev Bras Reumatol* .2007; 47(6): 401-410.

- 25- Murat N, Karadam B, Ozkal S, Karatosun K, Gidener S. Quantification of papain-induced rat osteoarthritis in relation to time with the Mankin score. *Acta Orthopaedica et Traumatologica Turcica*.2007; 41(3):233-237.
- 26- Pomonis JD, Boulet JM, Gottshall SL, Phillips S, Sellers R, Bunton T, Walker K. Development and pharmacological characterization of a rat model of osteoarthritis pain. *Pain*.2005; 114(3).
- 27- Buttle DJ, Bramwell H, Hollander AP. Proteolytic mechanisms of cartilage breakdown: a target for arthritis therapy?. *Journal Clin Pathol*. 1995; 48.
- 28- Jia YL, Guo ZY. Effect of Low-Power He-Ne Laser Irradiation on Rabbit Articular Chondrocytes in Vitro. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2004; 34:323-328.
- 29- Karu TI. Photobiological Fundamentals of Low- Power Laser Therapy. *IEEE Journal of Quantum Eletronics*. 1987; (10):1703 -1719.
- 30- Karu TI. Laser biostimulation: a photobiological phenomenon. *J Photochem Photobiol B*. 1989; 3(4):638-639.
- 31- Lipowitz AJ. Synovial fluid. *Textbook of Small Animal.Orthopaedics*. Philadelphia: J.B. Lippincott, 1985:1015-1028.
- 32- Vaughan-Scott T, Taylor JH. The pathophysiology an medical manegement of canine osteoarthritis. *J. S. Afr. Vet. Assoc*.1997; 68:21-25.
- 33- Allard SA, Bayliss MT, Maini RN. The sinovium-cartilage junction of the normal human knee. *Arth. Rheum*.1990;33:170-1178.
- 34- Mankin HJ. The response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Joint Surg Am*. 1982;64: 460-466.
- 35- Kerppers II, Martins EJ, Vieira FF, Galli G, Ferreira LAB, Thomé MR, Pereira WM. Análise do edema induzido por ácido cloroacético pós irradiação com laser 904 nm. *Rev. Salus-Guarapuava*. 2007; 1(1): 59-63.
- 36- Karu TI. Molecular mechanism of therapeutic effects of low intensity laser radiation. *Lasers life Sci*. 1988; 2(1):53 -74.
- 37- Nicolau RA, Jorgetti V, Rigau J, Pacheco MTT, Reis LM, Zângaro RA. Effect of low-power GaAlAs Laser (660nm) on bone structure and cell activity: an experimental animal study. *Lasers Med Sci*.2003;18: 89-94.
- 38- Pessoa ES, Melhado RM, Theodoro LH, Garcia VG. A Histologic Assessment of the Influence of Low- Intensity Laser Therapy on Wound Healing in Steroid-Treated Animals. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2004; 22(3):199-204.
- 39- Albertini R, Villaverde AB, Aimbire F, Bjordal J, Brugnera Junior A, Mittmann J, Silva Junior JA, Costa M. Cytokine mRNA Expression Is Decreased in the Subplantar Muscle of Rat Paw Subjected to Carrageenan- Induced Inflammation after Low-Level Laser Therapy. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2008; 26(1): 19-24.
- 40- Meireles GCS, Santos JN, Chagas PO, Moura AP, Pinheiro ALB. Effectiveness of Laser Photobiomodulation at 660 or 780 Nanometers on the Repair of Third-Degree Burns in Diabetic Rats. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2008; 26(1): 47- 54.
- 41- Starkey, C. Recursos terapêuticos em fisioterapia. Barueri: Manole, p. 404; 2001.
- 42- Dall Agnol MA, Amadei RA, Lima CJ, Munin E. Comparative analysis of coherent light action (laser) versus non-coherent light (light-emitting diode) for tissue repair in diabetic rats. *Lasers Med Sci*.2009. DOI 10.1007/s10103-009-0648-5.
- 43- Bisht D et al. Effect of helium-neon laser on wound healing. *Indian Journal Experimental Biology*. 1999; 37: 187-189.
- 44- Elwakil TF. An in-vivo experimental evaluation of He-Ne laser photostimulation in healing Achilles tendons. *Lasers Med Sci* .2007; 22: 53-59.
- 45- Baxter DG. *Therapeutic Lasers* .Londres : Churchill Livingstone , 1994.

6 DISCUSSÃO

O laser de baixa potência vem sendo cada vez mais estudado, e constitui uma das modalidades terapêuticas mais utilizadas na reabilitação. Entretanto as evidências científicas e clínicas são muitas vezes contraditórias (Calatrava *et al.*,1997; Cafalli *et al.*, 1993; Campana *et al.*, 2004; Kamali *et al.*,2007; Tascioglu *et al.*,2004), por isso a necessidade de pesquisas envolvendo esse recurso torna-se importante e relevante.

A cartilagem articular é a estrutura mais importante na proteção do estresse e da descarga de peso na articulação. Entretanto esse tecido tem um potencial espontâneo de regeneração controverso e pequeno. Devido a esse fato, diversos estudos são descritos na literatura, para investigar técnicas que auxiliem ou acelerem o processo de reparo do processo degenerativo da articulação. O propósito de avaliar o comportamento desse tipo de lesão deve-se ao fato das questões em aberto relacionado ao processo de reparo e a vasta literatura reportando às dificuldades da regeneração (LOHMANDER, 1994; POOLE *et al.*, 2001; SCULLY *et al.*, 2004; MEACHIN, 2001 ; VELOSA;TEODORO;YOSHINARI, 2003; NAKAMURA *et al.*,2008; AHMED; STANFORD;KANDEL,2007; VELOSA *et al.*, 2007; MURAT; KARADAM; OZKAL; KARATOSUN; GIDENER, 2007).

Várias técnicas ou procedimentos cirúrgicos com a finalidade de promover a regeneração da cartilagem e demais estruturas da articulação, entre elas perfurações ou abrasões até o osso subcondral, transplantes de condrócitos ou células mesenquimais, movimentação passiva contínua logo após a lesão, transplante de matriz sintética, exposição da articulação a correntes elétricas, hormonioterapia e a laserterapia têm sido desenvolvidos, porém nenhuma alcançou seus objetivos com total sucesso. Por todos estes fatos, há um grande interesse na busca de novas formas de tratamento, que visam acelerar ou promover a regeneração articular (CAFALLI *et al.*,1993;TORRICELLI *et al.*,2001; SCHURMAN;SMITH, 2004; LIN *et al.*,2004).

As pesquisas experimentais *in vitro* e *in vivo* são necessárias e de fundamental importância para compreensão do processo degenerativo e regenerativo desse tecido. Vários são os métodos de indução da lesão, entre eles a secção de ligamentos, a meniscectomia, a compressão da articulação e a injeção intra-articular de substâncias como a papaína.

Nesse trabalho adotou-se o protocolo de indução da lesão com papaína, que é uma enzima proteolítica que causa a lise do sulfato de condroitina do complexo

polissacarídeo, vastamente utilizada na literatura, por ser um método eficaz, econômico e de fácil aplicação (BUTTLE, BRAMWELL, HOLLANDER, 1995; LIN *et al.*, 2004; POMONIS *et al.*, 2005; LIN *et al.*, 2006).

Com o intuito de obter uma lesão homogênea em relação ao grau de lesão da articulação, realizamos a indução da lesão por meio de infiltração de volume controlado de papaína, conforme descrito por Lin e colaboradores (2004; 2006).

Nesse estudo utilizamos o rato Wistar por ser um animal de fácil manuseio laboratorial e obtenção, e pelos modelos experimentais utilizando a papaína utilizarem esse animal.

Optamos por realizar esta investigação com dois tipos de laser de baixa potência, um no espectro do vermelho (660nm) e outro no infravermelho (904nm), para se fazer um comparativo dos eventos histológicos apresentados após o tratamento e verificar qual o mais efetivo, visto que a literatura é controversa em relação ao comprimento de onda mais efetivo na regeneração dos tecidos na osteoartrose. Os trabalhos apresentam comprimentos de onda variados no tecido cartilaginoso, dificultando dessa forma a comparação dos resultados e determinação do comprimento de onda mais adequado para o tratamento das lesões desse tecido (JIA ;GUO ,2004; LIN *et al.*, 2004; TASCIOGLU *et al.*, 2004; LIN *et al.*, 2006; Kamali *et al.* , 2007).

Foi utilizado a densidade de energia de 6 joules por cm², pois diversos autores demonstraram que o comprimento de onda e a densidade de energia são fatores preponderantes para o sucesso da terapia laser e que densidades de energia muito altas ou baixas não apresentam resultados favoráveis, podendo haver danos fotodinâmicos (KARU 1987;1989).

Em relação às fluências há uma discrepância muito grande nos trabalhos envolvendo a articulação artrósica variando de 2J/cm² à 16 J/cm² (Caffalli *et al.*,1993; Calatrava *et al.*,1997; Torricelli *et al.* ,2001; Gur *et al.* ,2003; Lin *et al.*, 2004, 2006; Kamali *et al.*, 2007), e com o intuito de padronizar um dos parâmetros utilizados na pesquisa, optamos por utilizar a fluência de 6J/cm², baseados no estudo de Jia e Guo (2004), que compararam as fluências de 1 a 6J/cm² e verificaram que houve uma proliferação celular de condrócitos maior com fluências entre 4 a 6J/cm² que com outras fluências.

Com a finalidade de analisar os eventos histopatológicos relacionados ao reparo da lesão articular, acompanhou-se o reparo no sétimo, décimo quarto e

vigésimo primeiro após a indução da lesão nos grupos G1 grupo tratado com laser 660nm, G2 grupo tratado com laser 904nm e G3 adotado como grupo controle, onde foi induzida a lesão, porém não recebeu tratamento.

No presente estudo os resultados demonstram que a formação do revestimento da membrana sinovial no grupo tratado com laser de baixa potência 904nm apresentou melhores resultados no sétimo dia comparados com o décimo quarto, evoluindo de um revestimento descontínuo no início da irradiação para normal sem descontinuidade e focos de hiperplasia.

A membrana sinovial desempenha importante papel na evolução da osteoartrose. As alterações da membrana associadas à doença articular degenerativa variam de inflamação média à moderada e incluem hipertrofia e hiperplasia das células sinoviais, infiltração linfoplasmocitária, aumento da vascularização nos tecidos sinoviais e fibrose subsinovial (LIPOWITZ, 1993). A membrana libera enzimas proteolíticas no espaço articular que virão a agir na degradação da cartilagem (VAUGHAN-SCOTT; TAYLOR, 1997).

Como citado por Allard et al. (1990), as células inflamatórias que se acumulam neste tecido sinovial proliferado podem induzir lesão articular pela produção de enzimas proteolíticas e pela interação, via citocinas, com células da cartilagem e do osso.

Calatrava e colaboradores (1997) realizaram um estudo em coelhos com lesões cartilaginosas tratadas com laser de 632,8nm e 904nm e relataram que os animais tratados apresentaram uma recuperação mais rápida e uma regeneração maior do tecido, comparando-se com o membro controle, elucidando o potencial bioestimulante do laser no processo de reparo tecidual. Ainda observaram que grupo tratado com o laser infravermelho apresentou menor diâmetro articular quando comparado com o outro grupo tratado.

A resposta do tecido à lesão é geralmente dividida em necrose, inflamação e reparo. A fase de necrose acontece logo após a lesão e depende do tipo e do grau da lesão, a quantidade de tecido necrosado depende da sensibilidade da célula do tecido à hipóxia. Os condrócitos são relativamente insensíveis à hipóxia, e dessa forma, a cartilagem tem uma probabilidade de morte celular menor que outros tecidos, nessa fase. A inflamação ocorre imediatamente logo após a primeira fase, mediada pelo sistema vascular. Após 24 horas de uma lesão à cartilagem, ocorre um aumento na atividade mitótica, associado com aumento na síntese dos

componentes da matriz e enzimas proteolíticas. As evidências do aumento da atividade anabólica e catabólica ocorrem nos primeiros dias após a lesão até duas semanas, quando esses níveis diminuem (MANKIN, 1982).

Neste estudo a quantidade de células inflamatórias mononucleares não foi estatisticamente significativa quando comparada entre os períodos 7, 14 e 21 dias nos três grupos avaliados e quando feito a comparação entre os grupos, esse fato pode justificar-se pelo fato do protocolo do experimento ter iniciado após duas semanas após a última infiltração, tendo tempo suficiente para a resolução do processo inflamatório agudo, confirmado pelo autor citado acima, quando ele afirma que após duas semanas da lesão, a atividade anabólica e catabólica do tecido diminuem.

Similarmente na pesquisa de Kerppers *et al.* (2007) os resultados não demonstraram a diminuição do processo inflamatório no grupo tratado com laser, contrariando os diversos estudo que afirmam o efeito antiinflamatório da laserterapia (KARU,1987;1988; NICOLAU *et al.*, 2003;PESSOA *et al.*, 2004 ;ALBERTINI *et al.*,2008; MEIRELES *et al.*,2008;); entretanto não se pode afirmar nesta pesquisa que a terapia laser de baixa potência não possui esse efeito, pois em nossa pesquisa houve uma reação inflamatória em todos os grupos, porém não houve alteração estatisticamente significativa entre os grupos tratados e o grupo controle, que em nosso entendimento ocorreu devido ao protocolo proposto.

Entretanto pode-se verificar que o grupo tratado com o laser 904nm demonstrou uma diminuição do exsudato inflamatório nos períodos avaliados, e o grupo controle um aumento.

Foi verificado que a quantidade de tecido fibrótico no grupo controle foi significativamente maior do que nos grupos tratados, evidenciando o efeito de bioestimulação dos lasers de baixa potência no processo de reparo articular dos grupos tratados. O grupo submetido ao tratamento com laser 904nm comparado ao laser 660nm evidenciou na análise histológica menor formação desse tipo de tecido. Esse dado também foi evidenciado no trabalho de Calatrava e colaboradores (1997), que ao comparar o tratamento de lesões condrais com laser 632,8 e 904nm, verificaram que o grupo tratado com laser 632,8nm e o grupo controle tiveram maior formação de tecido fibrótico, que o grupo tratado com 904nm.

Diferentemente de Cafalli e colaboradores (1993), que após irradiação com laser 920nm em lesões condrais de coelhos, não observaram diferença no tecido cicatricial apresentado no grupo tratado e controle.

O grande desafio da regeneração desse tecido é o tipo de tecido formado, pois se sabe que a composição da cartilagem normal é basicamente de fibras colágenas do tipo II. Quando há a formação de fibrose como parte da regeneração, esse tecido formado não apresenta as mesmas propriedades de extensibilidade, resistência à compressão e carga, que o tecido da articulação necessita. E que a formação fibrótica da sinóvia, pode diminuir a amplitude de movimento e auxiliar no processo degenerativo.

Segundo Starkey (2001), a velocidade e a qualidade da cicatrização são reguladas pela quantidade de trifosfato de adenosina (ATP) produzido. O ATP é a fonte primária de energia da célula e é fundamental para fornecer a energia metabólica necessária para restaurar as propriedades da membrana celular, sendo realizado por meio da entrada e saída de sódio e potássio da célula, para construir e sintetizar novas proteínas.

O Laser de Baixa Potência age principalmente sobre organelas celulares (mitocôndrias e membranas), gerando aumento da síntese de ATP e modificando o transporte iônico, sendo que esses processos ocorrem por meio dos fotorreceptores celulares, descritos acima (KARU,1987). Foi observado que a qualidade do tecido cicatricial foi melhor nos grupos tratados quando comparados com grupo controle, no sétimo e vigésimo primeiro dias, evidenciado pela quantidade de tecido fibrótico apresentado no processo de reparo articular.

Outro aspecto relacionado à qualidade do tecido cicatricial é a angiogênese, para alguns autores a angiogênese é a característica histológica mais importante no processo de cicatrização (Dall Agnol et al., 2009).

Segundo descreveu Carvalho (2001), a molécula helicoidal de procolágeno somente se formará e será liberada para o espaço extracelular na presença de oxigênio suficiente.

Podemos observar no presente estudo que a quantidade de vasos neoformados no sétimo dia foi maior nos grupos irradiados, e com diferença estatística significativa quando comparado o grupo controle e grupo tratado com 660nm. A quantidade de vasos neoformados influencia diretamente a qualidade do

tecido cicatricial, ficando evidenciado isso quando se observou que a quantidade de tecido fibrótico no grupo controle foi maior que os grupos tratados.

A influência da vascularização no processo e qualidade do tecido cicatricial é elucidada em alguns trabalhos (BISHT *et al.*,1999;PESSOA *et al.*,2004; ELWAKIL,2007). E há relatos na literatura de que o laser tem capacidade de aumentar o fluxo sanguíneo da microcirculação por aumentar a liberação de óxido nítrico no tecido irradiado (BAXTER, 1994). Possibilitando dessa forma o fornecimento de oxigênio necessário para o reparo tecidual.

A grande parte dos estudos experimentais nas lesões cartilaginosas avaliou o crescimento celular com o laser de baixa potência nas lesões condrais, porém o incremento da proliferação dessas células foi evidenciado em diversos estudos (TORRICELLI *et al.*, 2001; JIA;GUO,2004; LIN *et al.*,2004).

Para se elucidar melhor o efeito regenerativo da laserterapia nas lesões da articulação artrósica fazem-se necessários estudos subseqüentes avaliando-se o tipo de colágeno formado nesse processo; análise da membrana sinovial artrósica, proliferação dos condrócitos e efeitos na microcirculação relacionando os parâmetros ideais para tanto.

Há um grande número de trabalhos com laserterapia, porém não há uma padronização dos parâmetros utilizados, e muitos destes trabalhos não apresentam todos os dados necessários para o entendimento dos mecanismos de ação do recurso. Portanto fazem-se necessários mais estudos para verificar a importância dos parâmetros utilizados e a influência desses parâmetros na resposta do tecido, podendo assim padronizar protocolos eficazes no tratamento das lesões com o uso do laser de baixa potência.

8 CONCLUSÕES

O estudo comparativo da terapia laser de baixa potência com comprimentos de onda de 660nm e 904nm nos possibilitou concluir que:

- O grupo tratado com laser 904nm apresentou formação de tecido conjuntivo descontínuo no sétimo dia e normal no décimo quarto dia, demonstrando o efeito bioestimulante desse laser na formação desse tecido nas lesões.
- O grupo controle apresentou um aumento no exsudato inflamatório, enquanto que o grupo tratado com laser 904nm apresentou uma diminuição do processo inflamatório nos períodos avaliados.
- O grupo controle mostrou uma maior formação de fibrose no sétimo, décimo quarto e vigésimo primeiro dia, e maior também quando comparado com os grupos irradiados.
- As lesões irradiadas com laser 660nm apresentaram na análise histológica, maior formação de novos vasos no sétimo dia comparado com os outros períodos, e comparada com o grupo controle.
- O laser AsGa 904nm mostrou-se mais eficaz no reparo da lesão ocasionada pelo modelo experimental, pois demonstrou uma menor formação de fibrose e menor exsudato inflamatório.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmed N, Stanford WL, Kandel RA. Mesenchymal stem and progenitor cells for cartilage repair. *Skeletal Radiol.*2007;36:909-912.

Allard SA, Bayliss MT, Maini RN. The sinovium-cartilage junction of the normal human knee. *Arth. Rheum.* 1990;33:170-1178.

Albertini R, Villaverde AB, Aimbire F, Bjordal J, Brugnera Junior A, Mittmann J, Silva Junior JA, Costa M. Cytokine mRNA Expression Is Decreased in the Subplantar Muscle of Rat Paw Subjected to Carrageenan- Induced Inflammation after Low-Level Laser Therapy. *Photomedicine and Laser Surgery.* 2008; 26(1): 19-24.

Andreu MIG, Zaldívar CV. Efectos biológicos de la radiación laser de baja potencia en la reparación hística. *Ver Cubana Estomatol.* 1996; 33(2).

Arruda ERB, Rodrigues NC, Taciro C, Parizotto NA. Influência de Diferentes Comprimentos de Onda da Laserterapia de Baixa Intensidade na Regeneração Tendínea do Rato após Tenotomia. *Rev. bras.fisioter.* 2007; 11(4): 283- 288.

Baxter, DG. *Therapeutic Lasers* .Londres : Churchill Livingstone , 1994.

Belchior ACG, Reis FA, Nicolau RA, Silva IS, Perreira DM, Carvalho PTC. Influence of laser (660 nm) on functional recovery of the sciatic nerve in rats following crushing lesion. *Lasers Med Sci.* 2008. DOI 10.1007/s10103-008-0642-3

Bjordal JM, Couppé C, Chow RT, Tunér J, Ljunggren EA. A systematic review of low laser therapy with location-specific doses for pain from chronic joint disorders. *Australian Journal of Physiotherapy.*2003; 49:107- 116.

Basford JR. Low intensity laser therapy-still not in established clinical tool. *Lasers Surg Med.* 1995; 16 (4): p. 331-342.

Bayat M, Ansari E, Gholami N, Bayat A. Effect of low-level helium-neon laser therapy on histological and ultrastructural features of immobilized rabbit articular cartilage. *Journal of Photochemistry and Photobiology.* 2007; 41(3):233-237.

Bentley G. Papain-induced Degenerative Arthritis of the Hip in Rabbits. *The Journal of Bone and Joint Surgery.*1971; 53B(2):324- 337.

Blewis ME, Nugent-Derfus GE, Schmidt TA, Schumacher BL, Sah RL. A Model of Synovial Fluid Lubricant Composition in Normal and Injured Joints. *European Cells and Materials.* 2007;13: 26-39.

Bisht D et al. Effect of helium-neon laser on wound healing. *Indian Journal Experimental Biology.* 1999; 37: 187-189.

Bourguignon-Filho AM, Feitosa ACR, Beltrão GC, Pagnoncelli RM. Utilização do laser de baixa intensidade no processo de cicatrização tecidual. Revisão de

Literatura. *Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial*. 2005. 46 (1): 37- 43.

Buttle DJ, Bramwell H, Hollander AP. Proteolytic mechanisms of cartilage breakdown: a target for arthritis therapy?. *Journal Clin Pathol*. 1995; 48.

Cafalli FAS, Borelli V, Holzchuh MP, Farias EC, Cipola WWV, Coutinho Neto AC, Livani B, Xavier RM. Estudo experimental dos efeitos da radiação laser de baixa energia na regeneração osteocartilagínea em joelhos de coelhos Aspectos histológicos. *Rev Bras Ortop*. 1993; 28(9): 673- 678.

Calatrava RI, Valenzuela SJM, Gómez-Villamandos RJ, Redondo JI, Gómez-Villamandos JC, Jurado AI. Histological and Clinical Responses of Articular Cartilage to Low-level Laser Therapy: Experimental Study. *Lasers Med Sci*.1997; 12:117-121.

Campana VR, Moya M, Gavoto A, Spitale L, Soriano F, Palma JA. Laser therapy on arthritis induced by urate crystals. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2004; 22(6): 499-503.

Carvalho PTC, et al. Os efeitos do laser de baixa intensidade em feridas cutâneas induzidas em ratos com diabetes melitus experimental. *Fisioterapia Brasil*. 2001; 2(4): 241-246.

Carvalho PTC, Mazzer N, Reis FA, Belchior ACG, Silva IS. Analysis of the influence of low-power HeNe laser on the healing of skin wounds in diabetic and non-diabetic rats. *Acta Cirur. Bras*. 2006; 21(3):177-183.

Clements KM, Bee ZC, Crossingham GV, Adams MA, Sharif M. How severe must repetitive loading be to kill chondrocytes in articular cartilage? *Osteoarthritis and Cartilage*.2001; 9: 499-507.

Cotton AM, Mipen BA. A Review of the Principles and Use of Lasers in Lower Limb Problems. *Lower Extremity Wounds*.2004; 3(3): 133-142.

Dall Agnol MA, Amadei RA, Lima CJ, Munin E. Comparative analysis of coherent light action (laser) versus non-coherent light (light-emitting diode) for tissue repair in diabetic rats. *Lasers Med Sci*.2009. DOI 10.1007/s10103-009-0648-5.

Denadai AS, Carvalho PTC, Reis FA, Belchior ACG, Pereira DM, Dourado DM, Silva IS, Oliveira LVF. Morphometric and histological analysis of low-power laser influence on bone morphogenetic protein in bone defects repair. *Lasers Med Sci* .2008 DOI 10.1007/s10103-008-0595-6.

Driscoll SWO. Preclinical Cartilage Repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research*.2001 (391S): 397-401.

Doi H, Nishida K, Yorimitsu M, Komiyama T, Kadota Y, Tetsunaga T, Yoshida A, Kubota S, Takigawa M, Ozaki T. Interleukin-4 Downregulates the Cyclic Tensile Stress-induced Matrix Metalloproteinases-13 and Cathepsin B Expression by rat Normal Chondrocytes. *Acta Med Okayama*. 2008; 62(2):119-126.

Elwakil TF. An in-vivo experimental evaluation of He-Ne laser photostimulation in healing Achilles tendons. *Lasers Med Sci* .2007; 22: 53-59.

Felice JC, Costa LFC, Duarte DG, Chahade WH. Elementos Básicos de Diagnóstico da Osteoartrose. *Reumatologia Clínica*. 2002; 3(3):68-81.

Fu LLK, Maffulli N, Yip KMH, Chan KM. Articular cartilage lesions of the knee following immobilization or destabilization for 6 or 12 weeks in rabbits. *Clin Rheumatol*.1998; 17:227-233.

Gigo-benato D, Geuna S, Rodrigues AC, Fornaro PTM, Boux E, Battiston B, Giacobini-robecchi MG. Low-power laser biostimulation enhances nerve repair after end-to-side neurorrhaphy: a double-blind randomized study in the rat median nerve model. *Lasers Med Sci*. 2004; 19:57-65.

Glansbeek HL, Van beuningen HM, Vitters EL, Morris EA, Van der kraan PM, Van der berg WB. Bone Morphogenetic protein 2 stimulates articular cartilage proteoglycan synthesis in vivo but does not counteract interleukin- 1 a, effects on proteoglycan synthesis and content. *Arthritis Rheumatology*. 1997; 40 (6):1020-1028.

Goldring MB. The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis Rheumatology*. 2000; 43(9): 1916-1926.

Gur A, Cosut A, Sarac AJ, Cevik R, Nas K, Uyar A. Efficacy of different therapy regimes of low-power laser in painful osteoarthritis of the knee: a double-blind and randomized-controlled trial. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2003; 33: 330-338.

Hess CT. Tratamento de feridas e úlceras. 4.ed. Rio de Janeiro: Reichmann & Affonso;2002.

Hollander AP, Pidoux I, Reiner A, Rorabeck R, Poole R. Damage to type II in aging and osteoarthritis starts at the articular surface, originates around chondrocytes, and extends into the cartilage with progressive degeneration. *J Clin Invest*, 1995; 96: 2859-2869.

Homandberg GA. Cartilage Damage by Matrix Degradation Products: Fibronectin Fragments. *Clinical Orthopaedics and Related Research*.2001;(391S):100-107.

Horikawa O, Nakajima H, Kikuchi T, Ichimura S, Yamada H, Fujikawa K, Toyama Y. Distribution of type VI collagen in chondrocyte microenvironment: study of chondrons isolated human normal and degenerative articular cartilage and culture chondrocytes. *J Orthop Sci*. 2004; 9: 29-36.

Ihsan FRM. Low Level Laser Therapy Accelerates Collateral Circulation and Enhances Microcirculation. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2005; 23(3): 289-294.

James CB, Uhl TL. A Review of Articular Cartilage Pathology and the Use of Glucosamine Sulfate. *Journal of athletic Training*.2001; 36(4):413-419.

Jia YL, Guo ZY. Effect of Low-Power He-Ne Laser Irradiation on Rabbit Articular Chondrocytes in Vitro. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2004; 34:323-328.

Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.1995: 100-107.

Kamali F, Bayat M, Torkaman G, Ebrahimi E, Salavati M. The therapeutic effect of low-level laser on repair of osteochondral defects in rabbit knee. *J Photochem Photobiol B*.2007; 88:11-15.

Karu TI. Photobiological Fundamentals of Low- Power Laser Therapy. *IEEE Journal of Quantum Electronics*. 1987; (10):1703 -1719.

Karu TI. Molecular mechanism of therapeutic effects of low intensity laser radiation. *Lasers life Sci*. 1988; 2(1):53 -74.

Karu TI. Laser biostimulation: a photobiological phenomenon. *J Photochem Photobiol B*. 1989; 3(4):638-639.

Karu TI. Low-Power Laser Therapy. *Biomedical Photonics Handbook*.2003: 1-25.

Kassak P, Przygodzki T, Hobodászová D, Bryszewska M, Sikurová L. Mitochondrial Alterations Induced by 532 nm Laser Irradiation. *Gen. Physiol. Biophys*.2005; 24: 209-220.

Kerppers II, Martins EJ, Vieira FF, Galli G, Ferreira LAB, Thomé MR, Pereira WM. Análise do edema induzido por ácido cloroacético pós irradiação com laser 904 nm. *Rev. Salus-Guarapuava*. 2007; 1(1): 59-63.

Klebanov GI, Kreinina MV, Poltanov EA, Khristoforova TV, Vladimirov YA. Mechanism of Therapeutic Effect of Low-Intensity Infrared Laser Radiation. *Biophysics and Biochemistry*. 2001; (3):239-241.

Lewis S, Crossman M, Flannelly J, Belcher C, Doherty M, Bayliss MT, Mason RM. Chondroitin sulphation patterns in synovial fluid in osteoarthritis subsets. *Am Rheum Dis*. 1999; 58:441-445

Lin YS, Huang MH, Chai CY. Effects of Helium-Neon Laser on the mucopolysaccharide induction in experimental osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006; 14(4): 377-383.

Lin YS, Huang MH, Chai CY, Yang RC. Effects of Helium-Neon Laser on Levels of Stress Protein and Arthritic Histopathology in Experimental Osteoarthritis. *Am.J Phys. Med.Rehabil*. 2004; 83(10):758-765.

Lipowitz AJ. Synovial fluid. *Textbook of Small Animal Orthopaedics*. Philadelphia: J.B. Lippincott, 1985:1015-1028.

Lirani APR, Castro ML. Evidências da ação de agentes físicos sobre o metabolismo do tecido ósseo e seus potenciais usos clínicos. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2005; 49 (6):891- 896.

Lohmander LS. Articular cartilage and osteoarthritis. The role of molecular markers to monitor breakdown, repair and disease. *J Anat.* 1994; 184: 477-492.

Low J, Reed A. *Eletroterapia Explicada - Princípios e Prática.* São Paulo: Manole;2001.

Lotz M. Cytokines in Cartilage Injury and Repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research.* 2001;(391S):108-115.

Mankin HJ. The response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Joint Surg Am.* 1982;64: 460-466.

Manacu CA, Martel-Pelletier J, Roy-Beaudry M, Pelletier JP, Fernandes JC, Shipkolye FS, Mitrovic DR, Moldovan F. Endothelin-1 in osteoarthritic chondrocytes triggers nitric oxide production and upregulates collagenase production. *Arthritis Res Ther.* 2005;7: 324-332.

Martinez MEM, Pinheiro ALB, Ramalho LMP. Effect of IR laser photobiomodulation on the repair of bone defects grafted with organic bovine bone. *Lasers Med Sci.* 2008;23: 313-317.

Meachin G. Ages Changes in Articular Cartilage. *Clinical Orthopaedics and Related Research.* 2001;(391S):6-13.

Meireles GCS, Santos JN, Chagas PO, Moura AP, Pinheiro ALB. Effectiveness of Laser Photobiomodulation at 660 or 780 Nanometers on the Repair of Third-Degree Burns in Diabetic Rats. *Photomedicine and Laser Surgery.* 2008; 26(1): 47-54.

Miron BG, Teodoro WR, Velosa APP, Witzel SS, Yoshinari NH. Análise Morfológica da cartilagem articular de coelhos submetidos a meniscectomia parcial. *Rev Bras Reumatol.* 2007; 39(3): 119-122.

Murat N, Karadam B, Ozkal S, Karatosun K, Gidener S. Quantification of papain-induced rat osteoarthritis in relation to time with the Mankin score. *Acta Orthopaedica et Traumatologica Turcica.* 2007; 41(3):233-237.

Nakamura N, Horibe S, Toritsuka Y, Mitsuoka T, Natsu-ume T, Yoneda K, Hamada M, Tanaka Y, Boorman RS, Yoshikawa H, Shino K. The location-specific healing response of damage articular cartilage after ACL reconstruction: short-term follow-up. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2008; 16: 843-848.

Nicolau RA, Jorgetti V, Rigau J, Pacheco MTT, Reis LM, Zângaro RA. Effect of low-power GaAlAs Laser (660nm) on bone structure and cell activity: an experimental animal study. *Lasers Med Sci.* 2003;18: 89-94.

Oliveira RF, Oliveira DAAP, Monteiro W, Zangaro RA, Magini M, Soares CP. Comparison Between the Effect of Low-Level Laser Therapy and Low-Intensity Pulsed Ultrasonic Irradiation in Vitro. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2008; 26(1):6-9.

Pessoa ES, Melhado RM, Theodoro LH, Garcia VG. A Histologic Assessment of the Influence of Low- Intensity Laser Therapy on Wound Healing in Steroid-Treated Animals. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2004; 22(3):199-204.

Plaetzer K, Krammer B, Berlanda J, Berr F, Kiesslich T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers Med Sci*. 2009; 24:259-68.

Pollack SV. Wound healing: A review. The biology of wound healing. *J Dermat Surg Oncol*. 1979; 5(5):389-393.

Pomonis JD, Boulet JM, Gottshall SL, Phillips S, Sellers R, Bunton T, Walker K. Development and pharmacological characterization of a rat model of osteoarthritis pain. *Pain*. 2005; 114(3).

Poole AR, Kojima T, Yasuda T, Mwale F, Kobayashi M, Laverty S. Composition and Structure of Articular Cartilage. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 2001; (391S): 26-33.

Pugliese LS, Medrado AP, Reis SRA, Andrade ZA. A influência da terapia a laser de baixa densidade de energia na biomodulação das fibras colágenas e elásticas. *Pesquisa Odontológica Brasileira*. 2003; 17(4).

Ribeiro MS. Interação da radiação laser linearmente polarizada de baixa intensidade com tecidos vivos; Efeitos na aceleração de cicatrização tissular em lesões de pele [Tese]. São Paulo: IPEN/Universidade São Paulo; 2000.

Reddi AH. Cartilage morphogenetic proteins:role in joint development, homeostasis, and regeneration. *Ann Rheum Dis*. 2003 62:73-78.

Rezende MU, Hernandez AJ, Camanho GL, Amatuzzi MM. Cartilagem Articular e Osteoartrose. *Acta Ortopédica Brasileira*. 2000; 8 (2).

Roughley PJ. Articular cartilage and changes in arthritis Noncollagenous proteins and proteoglycans in the extracellular matrix of cartilage. *Arthritis Res*. 2001 3:342-347.

Roth A, Mollenhauer J, Wagner A, Fuhrmann R, Straub A, Venbrocks RA, Petrow P, Brauer R, Schubert H, Ozegowski J, Peschel G, Muller PJ, Kinne RW. Intra-articular injections of high-molecular-weight hyaluronic acid have biphasic effects on joint inflammation and destruction in rat antigen-induced arthritis. *Arthritis Res*. 2005 7:677-686.

Sandell LJ, Aigner T. Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: Cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Research*. 2001; 3(2):107-113.

Saygun I, Karacay S, Serdar M, Ural AU, Sencimen M, Kurtis B. Effects of laser irradiation on the release of basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin like growth factor-1 (IGF-1), and receptor of IGF-1 (IGFBP3) from gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci.* 2008; 23: 211-215.

Scharstuhl A, Glansbeek HL, Van Beuningen HM, Vitters EL, Van der Kraan PM, Van den Berg WB. Inhibition of Endogenous TGF- β During Experimental Osteoarthritis Prevents Osteophyte Formation and Impairs Cartilage Repair. *J Immunol.* 2002; 169: 507-514.

Schurman DJ, Smith LR. Osteoarthritis: Current Treatment and Future prospects for Surgical, Medical, and Biological Intervention. *Clinical Orthopaedics and Related Research.* 2004; 427: 183-189.

Scully SP, Lee JW, Ghert MA, Qi W. The Role of the Extracellular Matrix in Articular Chondrocytes Regulation. *Clinical Orthopaedics and Related Research.* 2004; (391S): 72-89.

Sellards RA, Nho SJ, Brian J. Chondral Injuries. *Current Opinion in Rheumatology.* 2002; 14(2):134-141.

Shen X, Zhao L, Ding G, Tan M, Gao J, Wang L, Lao L. Effect of combined laser acupuncture on knee osteoarthritis: a pilot study. *Lasers Med Sci.* 2007. DOI 10.1007/s10103-007-0536-9.

Silva Junior R et al. Computerized morphometric assessment of the effect of low-level laser therapy on bone repair: an experimental animal study. *Journal Clinical Laser Medical Surgery.* 2002: 83- 87.

Stadler I, Lanzafame RJ, Oskoui FP, Zhang RY, Coleman J, Whittaker M. Alteration of Skin Temperature during Low-Level Laser Irradiation at 830 nm in a Mouse Model. *Photomedicine and Laser Surgery.* 2004; 22(3): 227-231.

Starkey, C. Recursos terapêuticos em fisioterapia. Barueri: Manole, p. 404; 2001.

Tam G. Low power laser therapy and analgesic action. *Journal Clinical Laser Medical Surgery.* 1999; 17:29- 33.

Tartaruna AC, Matera JM, Dagli MLZ. Estudo Clínico e Anatomopatológico da Cicatrização Cutânea no Gato Doméstico. *Acta Cirúrgica Brasileira.* 1998; 13.

Tascioglu F, Armagan O, Tabak Y, Corapci I, Oner C. Low Power Laser Treatment in patients with Knee Osteoarthritis. *Swiss Med WKLS.* 2004; 134:254-258.

Toricelli P, Giavaresi G, Fini M, Guzzardella GA, Morrone G, Carpi A, Giardino R. Laser Biostimulation of cartilage: in vitro evaluation. *Biomed Pharmacother.* 2001; 55:117-120.

Tumilty S, Munn J, Abbott H, McDonough S, Hurley DA, Baxter DG. Laser Therapy in the Treatment of Achilles Tendinopathy: A Pilot Study. *Photomedicine and Laser Surgery*.2008; 26(1): 25-30.

Valverde-Franco G, Binette JS, Li W, Wang H, Chai S, Laflamme F, Tran-Khanh N, Quenneville E, Meijer T, Poole AR, Mort JS, Buschmann MD, Henderson JE. Defects in articular cartilage metabolism and early arthritis in fibroblast growth factor receptor 3 deficient mice. *Human Molecular Genetics*.2006; 15 (11):1783-1792.

Van Breugel HHFI, Bar PR. Power density and exposure time of HeNe laser irradiation are more important than total energy dose in photobiomodulation of human fibroblast in vitro. *Lasers Medical Surgery*.1992; 12:528-537.

Van den Berg WB, Van der Kraan PM, Scharstuhl A, Van Beuningen HM. Tissue Engineering, Cells, Scaffolds, and Growth Factors. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 2001;(391S): 244-250.

Vasheghani MM, Bayat M, Rezadei F, Bayat A, Karimipour M. Effect of Low-Level Laser Therapy on Mast Cells in Second-Degree Burns in Rats. *Biochemistry*.2003; 69(1):103-113. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2008; 26(1): 1-5.

Vaughan-Scott T, Taylor JH. The pathophysiology and medical management of canine osteoarthritis. *J. S. Afr. Vet. Assoc*.1997; 68:21-25.

Velosa APP, Teodoro WR, Witzel SS, Yoshinari NH. Quantificação do colágeno XI em cartilagem articular de coelhos com osteoartrose. *Rev Bras Reumatol* .1999; 39(3): 137-142.

Velosa APP, Teodoro WR, Yoshinari NH. Colágeno na Cartilagem Osteoartrótica. *Rev Bras Reumatol* .2003; 43(3): 160-166.

Velosa APP, Oliveira AM, Carrasco S, Capelozzi VL, Teodoro WR, Yoshinari NH. Menissectomia parcial como modelo experimental de osteoartrite em coelhos e efeito protetor do difosfato de cloroquina. *Rev Bras Reumatol* .2007; 47(6): 401-410.

Vinck VM, Cagnie BJ, Cornelissen MJ,Declercq HA, Cambier DC. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. *Lasers Med Sci*. 2003; 18:95-99.

Vladimirov YA, Osipov AN, Klebanov GI. Photobiological Principles of Therapeutic Applications of Laser Radiation. *Biochemistry*.2004; 69(1):103-113.

Wakitami S, Kawaguchi A, Tokuhara Y. Present status of and future direction for articular cartilage repair. *J Bone Miner Metab*. 2008; 26:115-122.

Xu QR, Dong YH, Chen SL, Bao CD, Du H. Degeneration of normal articular cartilage induced by late phase osteoarthritic synovial fluid in beagle dogs. *Tissue Cell*. 2008; DOI: 10.1016.

Ya-Li J, Guo ZY. Effect of Low-Power He-Ne Laser Irradiation on Rabbit Articular Chondrocytes In Vitro. *Lasers Med Sci* .2004; 34: 323-328.

Yon J, Milner TE. Evaluation of photothermal effects in cartilage using FT-IR spectroscopy. *Lasers Med Sci* .2008; 23: 229-235.

Young DA, Lakey RL, Pennington CJ, Jones D, Kevorkian I, Edwards DR, Cawston TE, Clark IM. Histone deacetylase inhibitors modulate metalloproteinase gene expression in chondrocytes and block cartilage resorption. *Arthritis Research & Therap*.2005; 7(3):503-512.

Young AA, Smith MM, Smith SM, Cake MA, Ghosh P, Read RA, Melrose J, Sonnabend DH, Roughley PJ, Little CB. Regional assessment of articular cartilage gene expression and small proteoglycan metabolism in an animal model of osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy*. 2005; 7(4): 852-861.

ANEXOS

ANEXO A- Aprovação do Comitê de ética



C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 153/2007, da Mestranda Alessandra Schleder da Rosa, sob a Orientação do Prof. Paulo de Tarso Camillo de Carvalho, referente ao protocolo “**Efeitos da radiação laser de baixa potência com comprimentos de onda de 650nm e 904nm sobre a regeneração das lesões cartilaginosas**”, está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS, em reunião de 22 de junho de 2007.

Campo Grande (MS), 25 de junho de 2007.


Dr.ª Maria Araújo Tenreiro
Presidente da CEUA