

UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA
INSTITUTO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO

RODRIGO DE SOUZA FERREIRA

**“Efeitos do Laser de GaAs (904 nm) Sobre o Processo de Reparação da
Cartilagem Auricular de Ratos Submetidos à Lesão Cirúrgica”**

São José dos Campos –SP

2006

RODRIGO DE SOUZA FERREIRA

**“Efeitos do Laser de GaAs (904 nm) Sobre o Processo de Reparação da
Cartilagem Auricular de Ratos Submetidos à Lesão Cirúrgica”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia da Universidade do Vale do Paraíba, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Bioengenharia.

Orientador: Prof^a. Dra. Renata Nicolau Amadei

Co-Orientador: Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro

São José dos Campos –SP

2006

F443e

Ferreira, Rodrigo de souza

Efeitos do Laser de GaAs (904 nm) Sobre o Processo de
Reparação da Cartilagem Auricular de Ratos Submetidos à Lesão
Cirúrgica./ Rodrigo de Souza Ferreira
São José dos Campos: UniVap, 2007.

1 Disco laser.: color

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Bioengenharia do Instituto de Pesquisa e
Desenvolvimento-Universidade do Vale do Paraíba, 2007.

1. Regeneração óssea 2. Terapia a laser de baixa intensidade
3. Fisioterapia I. Amadei, Renata Nicolau, Orient II. Zângaro, Renato
amaro, Co-Orient. III. Título.

CDU: 615.8

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total
ou parcial desta dissertação por processos fotocopiadores ou por transmissão
eletrônica.

Aluno: *Rodrigo de Souza Ferreira*

Data: *26/01/07*

A large, stylized handwritten signature in black ink, enclosed within a large, irregular oval shape. The signature appears to read 'Rodrigo de Souza Ferreira'.

“Efeitos do Laser de GaAs (904 nm) Sobre o Processo de Reparação da Cartilagem Auricular de Ratos Submetidos à Lesão Cirúrgica”

Rodrigo de Souza Ferreira

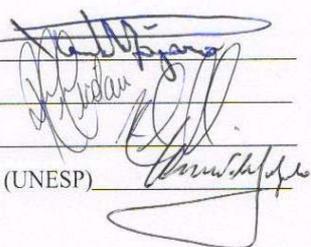
Banca Examinadora:

Prof. Dr. **RENATO AMARO ZÂNGARO** (UNIVAP)

Prof. Dr. **RENATA AMADEI NICOLAU** (UNIVAP)

Prof. Dr. **NEWTON SOARES DA SILVA** (UNIVAP)

Prof. Dr. **MIGUEL ANGEL CASTILHO SALGADO** (UNESP)



Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco

Diretor do IP&D – UniVap

Dedicatória

Dedico esta dissertação primeiramente a **Deus**, pois ele é o centro do universo, e nunca me abandonou em nenhum momento da minha vida.

Dedico de coração esta dissertação de Mestrado também, aos meus amados pais:

- **Paulo Ferreira da Silva e Marina de Souza Ferreira da Silva**, sem eles não teria chegado e conseguido conquistar minha carreira acadêmica, além disso, o mais importante foi a minha criação recebida por eles, criação esta que me fez a pessoa que sou hoje, e pretendo me espelhar juntamente com minha Esposa **Rosália de Fátima Duarte Ferreira**, na criação da netinha **Marina Duarte de Souza Ferreira** e outros. Obrigado meus pais queridos, tenho um orgulho muito grande de vocês por toda a dedicação que tiveram, e continuam tendo, em suas vidas não só por mim mais por todos os meus irmãos queridos e netos. Que Deus os abençoe.

AMO VOCÊS.

Agradecimentos

Os presentes agradecimentos, são para aquelas pessoas e instituições que direta ou indiretamente me auxiliaram a romper todas as dificuldades encontrada nesta empreitada:

- Agradeço a Minha Querida Esposa **Rosália de Fátima Duarte Ferreira** que é meu grande amor, minha companheira, minha amiga, a mulher que está sempre ao meu lado em todos os momentos de minha vida, sempre disposta a me ajudar no que for preciso. Obrigado por tudo e por ser esta pessoa maravilhosa que é meu presente de Deus, TE AMO Nana.

- Agradeço a minha orientadora Professora Dra. **Renata Amadei Nicolau**, não só por mero protocolo, mais sim de coração por ser a melhor professora por quem já tive a sorte de ganhar, pela grande paciência, empenho e sabedoria com que conduziu o andamento da presente dissertação.

- Agradeço a Professora. Dra. **Emilia Angela Loschiavo Arisawa**, pelos préstimos e conhecimento histológico.

- Agradeço a minha querida irmã e madrinha **Rosana de Souza Ferreira** pela força moral e inúmeros favores prestados durante o andamento e construção da presente dissertação, você foi peça importante e continuará sendo na construção da minha vida. TE AMO Ro e Mileninha.

- Agradeço ao meu irmão **Reinaldo de Souza Ferreira e família (GIL, GUI, CAROL, GU, GIGI)** por me sentir em casa e poder desfrutar de momentos agradáveis quando estamos juntos, fazendo minha cabeça desligar um pouco da dura empreitada e do estresse da presente pesquisa.

- Agradeço a minha sogra (in memória) **Cleuza Rodrigues Duarte**, por toda a força e carinho que tinha por mim, tratando-me como um filho.
- Agradeço a todos os meus amigos, sejam eles de muito tempo, infância e serviço ou aqueles que conquistei no Guarujá, tenho certeza que vocês estão contentes e orgulhosos de mim, um homem não é ninguém sem Família e bons amigos.
- Agradeço ainda a UNAERP Universidade de Ribeirão Preto Campus Guarujá pelo incentivo na parte prática de pesquisas científicas, dando todo suporte de animais, materiais e infra-estrutura ideal para o sucesso nos resultados obtidos.

**Efeitos do Laser de GaAs (904 nm) Sobre o Processo de Reparação da
Cartilagem Auricular de Ratos Submetidos à Lesão Cirúrgica
Resumo**

Este trabalho teve por finalidade avaliar o efeito do Laser de GaAs (904 nm) na reparação de tecido cartilaginoso elástico em ratos. Para tal os animais foram divididos em quatro grupos com 7 animais cada, sendo 2 grupos controles e 2 grupos irradiados de 14 e 23 dias. Os animais, depois de pesados e anestesiados, tiveram a cartilagem auricular perfurada (1mm de diâmetro). Após a cirurgia os animais do grupo irradiado receberam laserterapia com dose de 10 J/cm² a cada 48 horas. Após 14 e 23 dias os animais foram sacrificados e a região lesada foi retirada. Os resultados histológicos demonstraram efeitos sobre o processo de inicial de reparação cartilaginosa, no que se refere à área de reparação ($p < 0,001$) do grupo irradiado 14 dias comparado ao grupo controle. Com relação à distância entre os bordos da lesão, os resultados demonstram que os grupos irradiados, 14 e 23 dias, apresentam menor distância entre os bordos das lesões ($p < 0,05$). Os dados levam a concluir que o protocolo de irradiação estabelecido neste estudo foi efetivo na biomodulação do processo de reparação cartilaginosa.

Palavras-chave: GaAs, Processo de Reparação, Cartilagem Auricular

***Effects of the laser Ga As (904 nm) on the repair process of the auricular
cartilage of rat after surgery***

Abstract

This piece of work is aimed at assessing the effect of the laser GaAs (904 nm) on the restoration of rat damaged elastic cartilaginous tissue. Such an assessment was carried out by separating mice into four groups, namely, 2 control groups and 2 irradiated groups of 14 and 23 days. Each of the four groups consisted of 7 animals. After having been weighed and anesthetized, they had their auricle cartilage pierced (1mm in diameter). After the surgery the animals in the irradiated groups underwent laser therapy whose dosage was 10 J/cm² every 48 hours. After 14 and 23 days the animals were put to sleep and the damaged region underwent removed. The histologist's results demonstrate effects on the process of cartilage restoration regarding the area of restoration ($p < 0.001$) of the irradiated groups during 14 days in comparison with the control group. The results concerning the distance between the edges of the lesion demonstrate that the irradiated groups during 14 and 23 days bore lesions whose distance between their edges was shorter ($p < 0.05$). The data help one reach the conclusion that the protocol of irradiation established in this study was effective when it comes to the biomodulation of the process of cartilage restoration.

Key-words: GaAs, Repair Process, Auricular Cartilage

Lista de Tabela e Figuras

Tabela 1 - Diferenças dos tipos de emissão lumínica.....	08
Tabela 2 - Protocolo de irradiação com laser GaAs	24
Figura 1 - Interação luz – tecido.....	11
Figura 2 - Animais em condições de acondicionamento, sobre maravalha em caixa de poliestireno	18
Figura 3 - Animais em condições de acondicionamento	18
Figura 4 - Controle automático de luminosidade.....	19
Figura 5 -Procedimento cirúrgico de lesão auricular, de forma transcutânea.....	21
Figura 6 - Área de procedimento cirúrgico, sob condições de micro cirurgia.....	21
Figura 7 - Figura 7. Sutura de região lesionada em sua porção cutânea externa, sobre a cartilagem perfurada.....	22
Figura 8 - Sistema de vídeo acoplado ao estereoscópio e câmera CCD.....	22
Figura 9 - Mesa cirúrgica pré-procedimento, contendo instrumental empregado para o procedimento de perfuração da cartilagem auricular.....	23
Figura 10 - Posicionamento da ponteira de irradiação durante a TLBP.....	25
Figura 11 - Fotomicrografia de zona de reparação cartilaginosa.....	28
Figura 12 - Fotomicrografias de zona de reparação cartilaginosa grupo controle 14 dias.....	30
Figura 13 - Fotomicrografias de zona de reparação cartilaginosa do grupo controle 23 dias.....	30
Figura 14 - Fotomicrografias de zona de reparação cartilaginosa irradiado 14 dias.....	32

Figura 15 - Fotomicrografias de zona de reparação cartilaginosa do grupo irradiado 14 dias.....	32
Figura 16 - Medida da área da reparação cartilaginosa.....	34
Figura 17 - Fotomicrografias de zona de reparação cartilaginosa do grupo irradiado 23 dias.....	34
Figura 18 - Medida da distância entre os bordos da lesão.....	35

Lista de abreviaturas e siglas

GaAs - Arsenieto de Gálio

HeNe – Hélio Neônio

GaAlAs – Arsenieto de Gálio e Alumínio

KCl – Cloreto de potássio

ATP – Adenosina trifosfato

H&E - Hematoxilina e Eosina

Nd:YAG – Neodímio:Ítrio Alumínio Granada

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

RNA – Ácido Ribonucleico

TLBP – Terapia com laser baixa potência

p – probabilidade estatística

IP – intra-peritoneal

PO – pós-operatório

ANOVA - Análise de Variância

nm – nanômetros

mm – milímetros

J – joules

cm² – centímetros quadrados

cm – centímetros

mg – miligramas

Kg – quilogramas

ml – mililitros

g – gramas

Hz – Hertz

W – Watts

μm - micrometro

μm^2 - micrometro quadrado

ns – nano segundos

Sumário

1	Introdução	01
2	Objetivo	04
3	Revisão de Literatura.....	05
3.1	Cartilagem	05
3.2	Laser	07
3.2.1	Princípios básicos do laser	07
3.2.2	Interação laser-tecido	11
4	Material e métodos	17
4.1	Aprovação pelo comitê de ética	17
4.2	Animais	17
4.3	Procedimento cirúrgico	20
4.4	Procedimento terapêutico	24
4.5	Sacrifício e obtenção de amostras	25
4.6	Preparação das lâminas e análise histológica	26
5	Resultados	29
6	Discussão	36
7	Conclusão	41
7.1	Considerações finais	41
	Referências	42
	Anexo A Comitê de Ética em Pesquisa.....	52

EFEITOS DO LASER DE GaAs (904 nm) SOBRE O PROCESSO DE REPARAÇÃO DA CARTILAGEM AURICULAR DE RATOS SUBMETIDOS À LESÃO CIRÚRGICA

1 INTRODUÇÃO

Lesões em tecidos moles, especialmente tendões, músculos e cartilagens, normalmente resultam em longos períodos de tratamento e seqüelas incapacitantes. Estas seqüelas podem, muitas vezes, impedir o indivíduo de retornar à atividade de vida diária, principalmente lesões em cartilagem, por se tratar de uma estrutura de difícil reparação (GUYTON; HALL, 2002).

A dificuldade de reparação do tecido cartilaginoso ocorre devido às características estruturais como ausência de vasos sanguíneos e linfáticos no interior da matriz. Este tecido não possui irrigação sanguínea e linfática em seu interior. Sua nutrição é realizada pelos vasos sanguíneos dos tecidos conjuntivos que a rodeiam, através da matriz, capilares do tecido conjuntivo denominado pericôndrio (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

As cartilagens que sofrem lesões regeneram-se com dificuldade e freqüentemente de forma incompleta, a não ser em crianças de pouca idade devido à alta atividade celular e metabólica. No adulto a regeneração ocorre pela atividade do pericôndrio, que penetra na área lesada e dá origem ao tecido cartilaginoso de reparo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Atualmente inúmeras terapias têm sido investigadas, como recurso fisioterapêutico, no tratamento de reparação tecidual visando reduzir o tempo para a reabilitação do indivíduo. Dentre estes recursos está a terapia com laser de baixa

potência (TLBP), a qual teve sua descoberta no início do século passado, porém o primeiro equipamento de laser foi construído em 1960, por Theodore Maiman na Califórnia-USA. Era um laser de Rubi, operando em 694,3 nm (MAIMAN, 1960).

Para demonstrar os efeitos da TLBP no reparo tecidual, a utilização de diversas doses tem sido estudada no estímulo da síntese de colágeno (MESTER et al., 1971; OSHIRO et al., 1987; REDDY et al., 1998). Embora o mecanismo biomodulador, envolvido neste processo, ainda não tenha sido plenamente esclarecido, alguns trabalhos sugerem que a radiação laser aumenta a síntese de ácido nucléico e promove divisão celular, além de induzir aumento dos procolágenos dos tipos I e III (GUM et al., 1997).

Inúmeras são as indicações para a utilização da TLBP, com o uso do laser de GaAs (904 nm) sobre o processo de reparação neuromuscular e ósseo, aplicados à fisioterapia. Autores têm atestado para um efeito estimulador da TLBP sobre os tecidos biológicos promovendo aumento na microcirculação (MAIER et al., 1990), facilitação da drenagem linfática (LIEVENS, 1991), proliferação de células epiteliais (STEINLECHNER; DYSON, 1993) e de fibroblastos (LUBART et al., 1995; SKINNER et al., 1996; WEBB et al., 1998), analgesia (KLEINKORT; FOLEY, 1982), síntese de colágeno (OSHIRO et al., 1987; ENWEMEKA et al., 1990), aceleração no processo de cicatrização das fraturas ósseas (TANG; CHAI, 1986) e lesões cutâneas (MESTER et al., 1980).

Considerando as peculiaridades do tecido cartilaginoso e sua reduzida capacidade de reparação, estudos têm sido realizados com intuito de otimizar este processo. Tendo em vista os efeitos atribuídos à terapia laser sobre a biomodulação de tecidos em reparação, sua aplicação sobre o processo de reparação cartilaginosa se constitui de grande importância. Não foram encontrados na literatura trabalhos

empregando a laserterapia sobre processos de reparação de tecido cartilaginoso elástico, utilizando modelos animais e investigando eventos que norteiam mudanças no tecido promovidas pela luz laser.

2 OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi estudar o efeito da terapia com laser (GaAs - 904 nm) de baixa potência, sobre lesão de cartilagem elástica de ratos, previamente lesadas cirurgicamente, para avaliar a possível alteração no tempo de reparo tecidual por meio de análise histomorfométrica.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 CARTILAGEM

O tecido cartilaginoso é um tecido conjuntivo com uma matriz firme e flexível, resistente às tensões e pressões mecânicas. Este tecido possui células denominadas condrócitos, que ocupam pequenas cavidades chamadas lacunas, dentro da matriz extracelular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

O tecido cartilaginoso é subdividido em três tipos existente em algumas partes do corpo: cartilagem hialina, elástica e fibrosa (GUYTON; HALL, 2002).

A cartilagem elástica é encontrada no conduto auditivo externo, nas tubas auditivas, na epiglote na laringe e no pavilhão auditivo. Possui uma semelhança muito grande com a cartilagem do tipo hialina e freqüentemente está associada à mesma. Além da presença de fibras elásticas finas e ramificadas, a cartilagem elástica também possui pericôndrio e, pelos seus componentes, é menos sujeita aos processos degenerativos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A cartilagem elástica é formada basicamente por matriz de fibras elásticas e de fibras de colágeno tipo II. Esta constituição tecidual confere maior elasticidade à cartilagem (ROSS; ROMREL, 1993). Entre os componentes da cartilagem elástica está o pericôndrio, o qual é constituído por tecido conjuntivo denso com células semelhantes a fibroblastos, funcionando como uma cápsula, servindo como fonte para novas células cartilaginosas, ou seja, é um dos fatores que influenciam na reparação cartilaginosa (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

As cartilagens se caracterizam por ter dois tipos específicos de crescimento, o crescimento aposicional e intersticial. O crescimento aposicional é a formação de matriz sobre uma superfície de cartilagem já existente. São derivadas do pericôndrio, o qual é responsável por este tipo de crescimento. O crescimento intersticial ocorre no interior da massa cartilaginosa, isso ocorre porque os condrócitos são capazes de se dividir como a matriz (ROSS; ROMREL, 1993).

A reparação cartilaginosa inicia-se fisiologicamente quatro dias após a lesão, formando um tecido de granulação composto de um leito denso de macrófagos, fibronectina, colágeno tipo I e tipo II além do ácido hialurônico (GUYTON; HALL, 2002).

A capacidade de recuperação da cartilagem lesada é pequena e quando isto ocorre, é devido principalmente à atividade do pericôndrio. Esta dificuldade de regeneração é associada, primeiro por ser uma estrutura pouco vascularizada, e segundo em virtude da distância dos vasos sanguíneos (ROSS; ROMREL, 1993).

3.2 LASER

3.2.1 Princípios básicos do laser

A palavra laser é o acrônimo de *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* (luz amplificada por emissão estimulada de radiação). As características que diferenciam a luz de um laser da luz de uma lâmpada de filamento são que a luz laser é gerada por fótons com o mesmo comprimento de onda (monocromaticidade), alta concentração de energia (intensidade), e em fase espacial e temporal (coerência e direcionalidade). A possibilidade de focalizar o feixe laser em áreas muito

pequenas e a emissão de altas densidades de energia faz do laser um instrumento de grande interesse e importância para aplicações nas áreas da saúde.

Em relação à aplicação em tecidos biológicos, os lasers são divididos nas classes de alta potência e de baixa potência, acima e abaixo de 500 W respectivamente. Os primeiros são destinados principalmente à cirurgia, e são considerados como um bom instrumento para vaporização, corte e coagulação de tecidos. A utilização do laser como instrumento cirúrgico, baseia-se na capacidade de transformação da energia fotônica (segundo o comprimento de onda) em energia térmica. Este efeito afetará mais a um tecido ou a outro dependendo do cromóforo predominante. São exemplos desta ação específica:

- a) Corte preciso de tecido neuronal com laser de CO₂, causando um mínimo dano em profundidade, uma vez que esta radiação é altamente absorvida pela água;
- b) Coagulação de lesões vasculares com laser de Nd:YAG, devido à alta absorção de energia pela hemoglobina neste comprimento de onda (KRISHNAMURTHY; POWERS, 1994).

Os lasers de baixa potência são aplicados tanto para o diagnóstico (diagnóstico óptico) (SILVEIRA-JUNIOR et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2002; SILVEIRA-JUNIOR et al., 2004) como para a terapia (terapia fotodinâmica) (PALECKIS et al., 2001) e terapia laser de baixa potência (TLBP) ou como é conhecida internacionalmente *Low Level Laser Therapy* (LLLT) (FRIEDMANN; LUBART, 1993; KRISHNAMURTHY; POWERS, 1994; BASFORD, 1995).

A TLBP tem sido descrita como uma técnica capaz de modular os processos biológicos (NICOLAU et al., 2004 a, b, c e d). O processo de reparação de tecidos pode ser modulado pela ação do laser, segundo parâmetros de irradiação

empregados, tais como: comprimento de onda, forma de emissão (modo pulsado ou contínuo), densidade de potência e de energia (CALDERHEAD, 1991), frequência de pulsos, área de irradiação, ritmo e tempo de tratamento (número de seções semanais e totais), entre outros (TÚNER; HODE, 1999).

O êxito desta terapia tem sido referenciado em diferentes especialidades médicas e em uma grande variedade de estudos biológicos, em diferentes países de todo o mundo. Sua forma de aplicação e resultados obtidos são ainda contraditórios, em alguns casos. Estudos atuais têm revelado uma grande variedade de mediadores celulares relacionados com o processo de interação laser-tecido, tanto na faixa do vermelho como no infravermelho próximo do espectro eletromagnético (MANTEIFEL; BAKEEVA; KARU, 1999; UZDENSKY, 2002).

As características que diferenciam a radiação laser de uma luz emitida por uma lâmpada de filamento estão descritas na tabela 1.

Tabela 1. Diferenças dos tipos de emissão lumínica

Luz laser	Luz de lâmpada de filamento
• Monocromaticidade	• Policromaticidade
• Coerência	• Não coerência
• Direcionalidade	• Polidirecional

A monocromaticidade ocorre quando todos os fótons possuem o mesmo comprimento de onda. Esta é uma característica importante do laser, pois cada comprimento de onda tem uma interação diferente com os distintos tecidos (EL SAYED; DYSON, 1990).

A coerência é a propriedade de sincronia entre os fótons no espaço e no tempo. A coerência espacial ocorre quando as cristas e vales, de todas as ondas de diferentes fótons que compõe a luz, coincidem ao longo de uma linha e coerência temporal, ou seja, quando todas as ondas têm a mesma frequência, o mesmo comprimento de onda e velocidade de propagação. (MESTER et al., 1975)

A direcionalidade ocorre quando os fótons estão na mesma direção com baixa divergência, diferente do que ocorre com uma luz convencional, que possui alto grau de divergência. A polarização acontece quando as ondas de luz estão orientadas num só plano, assim, as vibrações em seus campos elétricos acontecem numa só direção. (SCHAWLOW,1995)

A alta intensidade existente em um feixe laser é fundamental no seu uso como opção terapêutica, tanto cirúrgica, quanto para biomodulação de tecidos em reparação. Com o desenvolvimento do laser houve a possibilidade de concentrar alta quantidade de energia sobre pequenos focos no tecido biológico, ora criando temperaturas elevadas ora interagindo com a membrana celular ou com componentes da célula. A grande quantidade de energia produzida e focalizada em uma superfície reduzida permite obter pelas emissões de laser uma elevada densidade de potência (NICOLAU et al., 2004 a e b)

As características técnicas de um laser, junto com a parametrização que definem seus efeitos, aplicações e limitações, são: o tipo de laser, comprimento de onda de emissão, tipo de emissão (pulsada ou contínua), duração do pulso (dados em nanossegundos, microssegundos ou milissegundos), intervalo entre os pulsos (tempo entre duração de pulso para pulso), *transverse electromagnetic mode* (TEM – a forma de distribuição da energia irradiada), frequência do pulso (dado em hertz –

Hz), tamanho da área de radiação (ou *spot size*), potência (dado em Watt, fornecido pelo aparelho), potência média e potência de pico (em emissão pulsada) e energia por pulso (em emissão pulsada) dado em joules (J). (MESTER et al., 1975)

O tipo de laser é determinado pelo meio ativo utilizado. Vários estudos estão descritos empregando o laser de Hélio-Neônio (HeNe), o qual é produzido a partir de um meio ativo gasoso, cuja emissão se encontra no vermelho (632,8 nm). Os lasers atualmente empregados em terapia de baixa potência geralmente são diodos como: Arsenieto de Gálio e Alumínio (GaAlAs) e Arsenieto de Gálio (GaAs), com comprimentos de onda que variam desde a faixa do visível ao infravermelho próximo, no espectro eletromagnético (ENWEMEKA, 1998).

Em geral os lasers de diodo têm depósito energético pouco absorvível pelo componente aquoso e hemoglobina, e por isso, a profundidade de penetração alcança entre 2 e 3 cm. Uma vantagem da aplicação da radiação infravermelha próxima é sua maior penetração nos tecidos. (NICOLAU et al., 2004 a e b)

3.2.2 Interação Laser – Tecido

Muitos trabalhos investigam *in vitro* e *in vivo* a interação de luz com componentes biológicos, seu comportamento óptico em tecidos, cromóforos e suas particularidades de absorção, e também o comportamento que exercem algumas moléculas como barreiras ópticas (KARU, 1998). Não obstante, para se ter algum efeito em tecido, é necessário ser absorvida em tecido. A energia lumínica se converte em energia térmica e bioquímica, em especial quando a luz é irradiação por laser em decorrência a alta intensidade. (MESTER et al., 1975)

Os tecidos biológicos são pouco homogêneos no ponto de vista óptico. Toda radiação eletromagnética ao incidir sobre uma superfície qualquer, sofre uma reflexão e absorção, e quando este ocorre, pode haver espalhamento e transmissão

(Fig. 1).

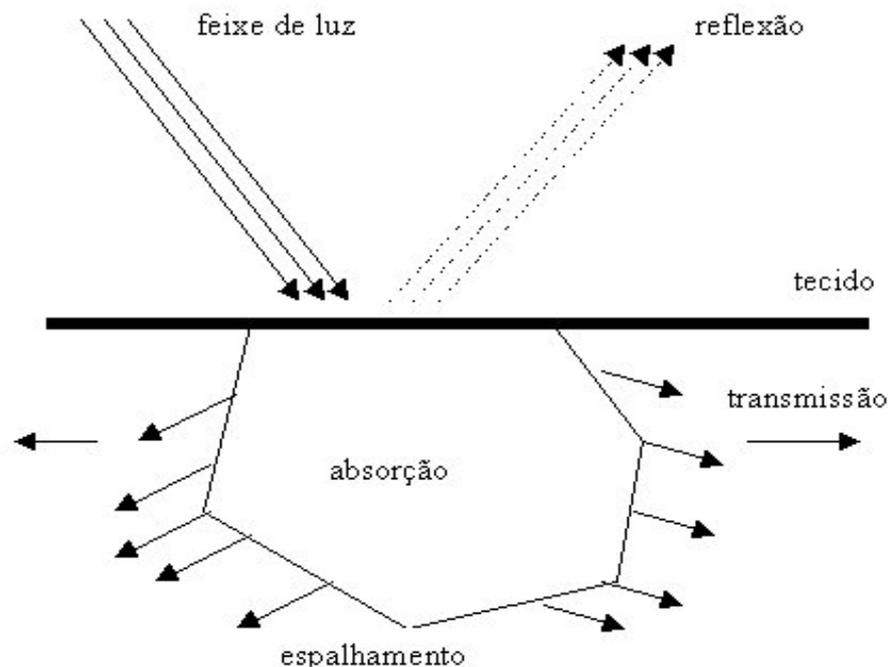


Figura. 1 Interação luz – tecido. Quando ocorre incidência em tecido de um feixe de luz, ocorrem as propriedades de reflexão, absorção, transmissão e espalhamento

A reflexão interna múltipla pode ocorrer devido à não homogeneidade da pele e dos tecidos profundos. A absorção e o espalhamento resultam da interação da luz com as moléculas e células, onde o efeito de espalhamento é, muitas vezes, mais importante do que a absorção para tecidos biológicos. (NICOLAU et al., 2004 a e b)

Em 1962 Patel desenvolveu o primeiro laser com finalidade terapêutica, um Hélio-Neônio (He-Ne) com comprimento de onda de 632,8 nm (PÖNTINEN, 1992). A aplicação clínica do laser iniciou-se com Calderhead, em 1981 que, além de comprovar a eficácia de sua utilização na analgesia, também comparou a eficiência do uso de diodos de GaAs (904 nm) e Nd:YAG (1064 nm).

Embora diversos trabalhos mostrem resultados controversos sobre a TLBP aplicada a algumas situações, não esclarecem a efetividade da terapia com seus reais benefícios para o ser humano (BASFOR, 1995). Sabe-se que a interação do laser com sistemas biológicos é bem estabelecida em nível celular, onde, em processos patológicos o laser interfere no processo de troca iônica, acelerando o incremento de ATP (LUBART et al., 1997).

Em 1999, Stadler et al., estudaram os efeitos de um laser de Argon:Dye operando em 660 nm, sobre linfócitos, na presença de eritrócitos, observou-se um aumento significativo na proliferação dos linfócitos, sendo a resposta máxima detectada condensidade de energia de 3 J/cm^2 .

Os estudos *in vitro* e *in vivo* são importantes por dois grandes motivos: primeiramente, porque fornecem uma base científica para a aplicação clínica de lasers de baixa potência no tratamento lesão tecidual, mediante a demonstração dos mecanismos fotobiológicos subjacentes a estes tratamentos. Em segundo lugar porque, com o uso de técnicas de pesquisa laboratoriais bem controladas e investigações sistemáticas, alguns grupos demonstraram a importância dos parâmetros da irradiação por laser (como o comprimento da onda, dose e velocidade de repetição do pulso) com relação aos efeitos observados (O'KANE et al., 1994).

Neste aspecto, vários estudos *in vitro* examinaram os efeitos da irradiação por laser de baixa potência em diversas linhagens celulares e em células explantadas, para que fosse estabelecida a base fotobiológica do uso clínico desta modalidade.

Dentre estes, diversos estudos avaliaram os efeitos fotobiomoduladores da irradiação por laser na promoção da cicatrização, como a proliferação celular (BOULTON; MARSHALL, 1986), produção de colágeno (CASTRO et al., 1983) e alterações ultra-estruturais (BOSATRA, 1984).

Devido à sua importância no reparo das feridas, as células mais comumente utilizadas nos diversos estudos até o presente momento têm sido os fibroblastos e macrófagos (O'KANE et al., 1994). Os estudos envolvendo animais têm se concentrado em duas áreas principais de pesquisa: os efeitos fotobiomoduladores do reparo tecidual e modulação do sinal nervoso (NICOLAU et al., 2004 a e b). No caso dos estudos que abrangem a primeira área de pesquisa, pequenos animais de pele frouxa, como ratos e camundongos, são os mais comumente utilizados (LYONS et al., 1987).

Nos diferentes estudos encontrados na literatura observam-se efeitos positivos da TLBP sobre feridas cutâneas (MESTER et al., 1985), lesões musculares (MESTER et al., 1975), tendinosas (ENWEMEKA et al., 1990), neuronal (ROCHKIND et al., 1989).

Alguns pesquisadores, como Cambier et al. (1996) relatam não haver qualquer diferença na evolução do processo de reparo entre uma ferida irradiada e a controle. Porém, a maioria dos estudos demonstra que o laser de baixa potência exerce um efeito positivo no processo de reparação. Estes efeitos referem-se à aceleração do processo de cicatrização e aumento da resistência dos tecidos cicatriciais. Estes efeitos, demonstrados em estudos *in vivo*, destacando-se trabalhos que enfatizam o aumento da microcirculação local, ativação do sistema linfático (LOPES, 1999).

Além disso, os efeitos terapêuticos do laser sobre o reparo de diferentes tecidos biológicos são muito amplos, incluindo efeitos trófico-regenerativos, antiinflamatórios e analgésicos, demonstrados em diversos, destacando-se os trabalhos que evidenciaram um aumento na microcirculação local (MIRÓ et al., 1984; MAIER et al., 1990; LIEVENS, 1986, 1988, 1990 e 1991), na proliferação de

fibroblastos (STEINLECUNER; DYSON, 1993; LUBART et al., 1995; WEBB et al., 1998; ALMEIDA-LOPES, 1998), assim como aumento na síntese de colágeno (BIHARI; MESTER, 1989; ENWEMEKA et al., 1990).

Diversos autores têm demonstrado que existe uma dependência direta entre os efeitos da TLBP e os parâmetros empregados na terapia, como comprimento de onda do laser, forma de emissão, densidade de potência e de energia (ABERGEL et al., 1988; TRELLES et al., 1989; TERRIBILE et al., 1992; AL-WATBASS; ZHANG, 1994; HALEVY et al., 1997, KARU, 1990).

Karu (1998; 1999) observou que a interação do laser no infravermelho e no vermelho com mitocôndrias, gerava o aumento da produção de ATP, o que, segundo Baxter (1991), leva ao aumento da síntese de DNA e RNA com conseqüente aumento da produção de proteínas.

Ortiz et al. (2001) descreve a interação do laser com o tecido celular em três situações:

1. Excitação das cadeias de elétrons em estruturas celulares específicos, principalmente nas mitocôndrias, resultando na ruptura de algumas moléculas relativamente grandes ou inclusive mudanças na cadeia de carbonos. As moléculas excitadas têm um maior potencial para gerar reações químicas levando a um efeito observável em nível biológico.
2. Vibrações moleculares, que consistem em estiramento e batimento de ligações que causam deslocamentos dos núcleos atômicos, mas não afetam suas posições de equilíbrio, o espectro infravermelho é o que gera estas vibrações.
3. Rotação da biomolécula, total ou parcialmente, ao redor de um eixo, gerada pelo campo eletromagnético criada pela luz incidente, o que poderia levar a um

pequeno aumento da temperatura, que ainda não se conhece claramente se acontece em nível celular ou subcelular.

A TLBP tem como principais indicações estimular a resposta das células e tecidos a fatores de crescimento como aumento da síntese de ATP e proteínas; aumento da proliferação celular, mudança na permeabilidade celular; alívio da dor pelo aumento de endorfina, serotonina e supressão da ação de nociceptores e reforço da resposta do sistema imunológico via aumento dos níveis da atividade linfocitária e através da modulação do sangue (GENOVESE, 2000).

A área de aplicação da radiação laser pode ser sobre toda a extensão da lesão e/ou área dolorosa, nervos periféricos (inervando a área de estudo), *trigger points*, pontos de acupuntura ou auriculoterapia, gânglios simpáticos superficiais, região intravascular, extra-corpóreo, com subseqüente, reinfusão, intraoperatório, endoscópico, em conjunto com fotosintetizantes.

A TLBP pode ser eleita para atuar em três sistemas básicos: nervoso, linfático e sanguíneo, ou seja, circulatório (OSHIRO, 2001). As contra-indicações, conforme Kitchen e Basin (1996), no emprego deste recurso terapêutico se devem a sítios neoplásicos (por possível efeito estimulante potencial do carcinoma); irradiação em gestante diretamente sobre região uterina (por não se saber os possíveis efeitos que a radiação cause no feto); áreas de hemorragia (por possível aumento do quadro hemorrágico); terapia próximo ao olho (devido à possibilidade de dano ocular); regiões glandulares (por aumentar produção hormonal desequilibrando seu sistema). Sítios de infecção precisam ser cuidadosamente estudados, já que o efeito do laser

poderá exacerbar o quadro infeccioso, no entanto, quando controlado, poderá ser empregado (RIGAU, 1996).

No processo de reparação tecidual a terapia com laser está relacionada com a coagulação, inflamação, fibroplasia, neovascularização, contração da ferida e reconstituição do epitélio principalmente por queratinócitos (BISHT, 1999). A TLBP age sobre o processo inflamatório em três níveis: (a) aumento na microcirculação; (b) aumento do fluxo linfático e (c) efeito direto sobre as células envolvidas na inflamação (YU, 1997). Os efeitos biomodulatórios da TLBP em nível tecidual se traduzem por: epitelização precoce, aparecimento de tecido conjuntivo frouxo, composto basicamente por fibroblastos, infiltração leucocítica e neovascularização (BISHT, 1999) e possivelmente reparação de tecido cartilaginoso.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA

Neste trabalho foram aplicados os princípios éticos da experimentação animal de acordo com a COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVAP (Anexo A).

4.2 ANIMAIS

Neste estudo foram utilizados 28 ratos machos da raça Wistar (*Rattus norvegicus* variedade *albinus*), com peso de 225 ± 25 g (balança analógica Bender®). Os animais foram obtidos do Biotério da Universidade de Ribeirão Preto – SP. Os mesmos foram mantidos em gaiolas (sete animais por gaiola) em condições automáticas de temperatura e luminosidade, alimentados com ração padrão Labina® e água *ad libitum* (Fig. 2, 3 e 4). Os animais permaneceram por um período de ambientação de 23 dias no biotério de passagem da Universidade de Ribeirão Preto Campus Guarujá –SP (UNAERP). O experimento foi realizado no laboratório de experimento animal, da Universidade de Ribeirão Preto Campus Guarujá (UNAERP).



Figura 2. Animais em condições de acondicionamento, sobre maravalha em caixa de poliestireno.



Figura 3. Animais em condições de acondicionamento, em caixa de poliestireno, condições automáticas de temperatura e luminosidade, alimentados com ração padrão Labina® e água *ad libitum*.



Figura 4. Controle automático de luminosidade.

4.3 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os animais, após o período de ambientação, foram pesados e anestesiados seguindo o protocolo de anestesia preconizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Univap. Para tal os animais receberam administração do pré-anestésico Butorfanol (Turbogestic, 2mg/kg), associado á Acepromazina (Acepran, 1mg/kg), ambos administrados em dose única, via intramuscular. Após 15 minutos foram administrados os anestésicos gerais Zolazepan e Tiletamina (Zoletil 50, 40mg/kg), em dose única, via intramuscular.

Os animais foram tricotomizados após anti-sepsia da região auricular com álcool iodado, abrangendo toda a orelha direita, na porção externa. Após nova anti-sepsia a orelha foi perfurada (1 mm de diâmetro) em sua porção mediana sob aumento de 10 vezes, em procedimento microcirúrgico (esterioscópio) com saída para televisor (Fig. 5 e 6). Após a perfuração da cartilagem auricular de forma

transcutânea, a orelha era isolada em mini campo de gaze para a sutura da superfície cutânea externa e interna, individualmente, com fio de nylon 6.0 (Fig. 7). Todo o procedimento foi filmado para permitir análise de homogeneização cirúrgica a posteriori (Fig. 8).



Figura 5. Procedimento cirúrgico de lesão auricular, de forma transcutânea.



Figura 6. Área de procedimento cirúrgico, sob condições de micro cirurgia, utilizando magnificação visual de 10 vezes.



Figura 7. Sutura de região lesionada em sua porção cutânea externa, sobre a cartilagem perfurada.

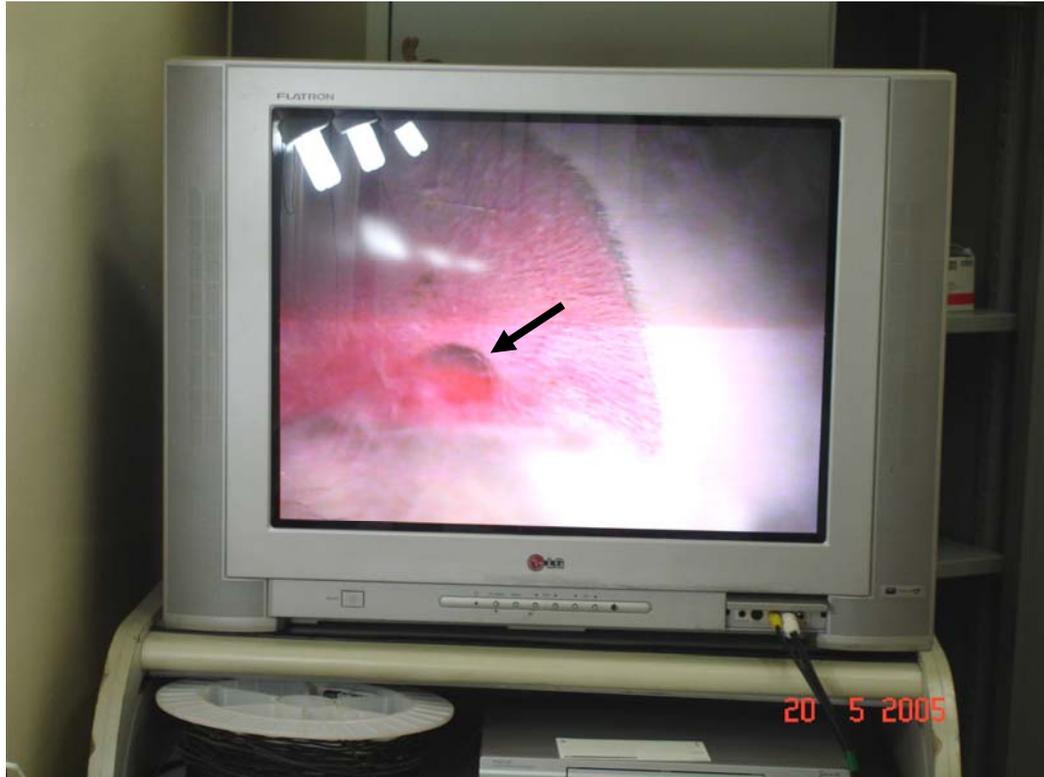


Figura 8. Sistema de vídeo acoplado ao estereoscópio e câmera CCD, para gravação simultânea do procedimento. Seta - local de perfuração transcutânea, com magnificação de 10 vezes.

Todo procedimento foi realizado com instrumental estéril (Fig. 9). Para analgesia pós-cirurgia foi utilizada a droga Fentanil® por via intra-peritoneal (IP), a uma dose de 0,032 mg/kg, de 12/12 horas, por dois dias consecutivos após a lesão.



Figura 9. Mesa cirúrgica pré-procedimento, contendo instrumental empregado para o procedimento de perfuração da cartilagem auricular.

4.4 PROCEDIMENTO TERAPÊUTICO

Após a cirurgia os animais foram divididos em dois grupos de forma aleatória, denominados grupo controle 14 dias, grupo controle 23 dias, grupo irradiado 14 dias, grupo irradiado 23 dias, contendo 7 animais por grupo.

O grupo tratado recebeu a terapia com laser de baixa potência (TLBP), Arsenieto de Gálio, da marca Laserpulse Ibramed geração 2000, aparelho microcontrolado, (904nm) (Tabela 2 e Fig. 10). O tratamento iniciou-se após 24 horas do procedimento cirúrgico, sendo administrado a cada 48 horas. O grupo irradiado 14 dias recebeu um total de 7 aplicações da TLBP, e o grupo irradiado 23 dias recebeu um total de 12 aplicações de TLBP.

Tabela 2: Protocolo de irradiação com laser GaAs.

Parâmetros de irradiação	Valores
Densidade de energia	10 J/cm ²
Potência de pico	70 W
Comprimento de onda	904 nm
Área do feixe (fibra óptica)	0,1 cm ²
Modo de Aplicação	Pontual
Número de pontos	1 ponto
Modo pulsado	9500 Hz
Tempo estimado	84 segundos
Largura de Pulso	60 ns

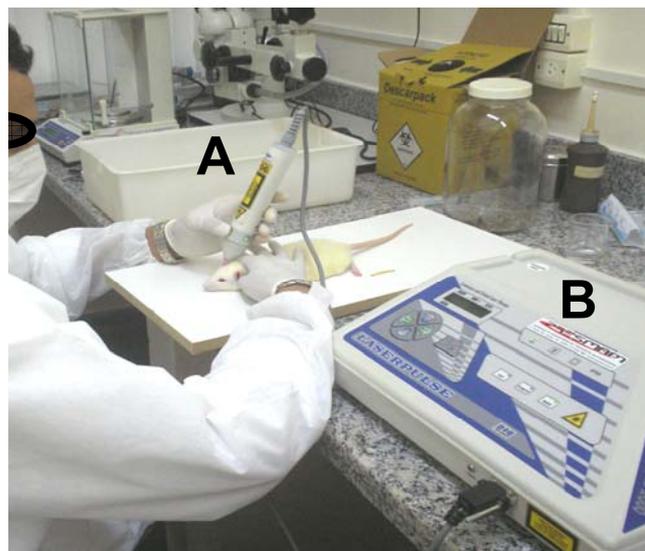


Figura 10. Posicionamento da ponteira de irradiação durante a TLBP (A). Equipamento da KLD, laser de GaAs (904 nm) (B). A superfície auricular permanece em contato com a prancha de manipulação e o laser opostamente.

4.5 SACRIFÍCIO E OBTENÇÃO DE AMOSTRAS

Aos 14 e 23 dias pós-operatórios os animais dos grupos controle 14 dias e irradiado 14 dias e grupo controle 23 dias e irradiado 23 dias, respectivamente, foram pesados e receberam pré-anestésico Butorfanol (Turbogestic, 2mg/kg) associado à Acepromazina (Acepran, 1mg/kg), ambos administrados em dose única, via intramuscular. Após 15 minutos foram administrados os anestésicos gerais Zolazepan e Tiletamina (Zoletil 50, 40mg/kg) em dose única, via intramuscular. Após a anestesia foram sacrificados com dose letal de cloreto de potássio (KCl, 0,4ml/100g de peso) via intra cardíaca. A região lesionada foi biopsiada com uma margem de 5 mm de tecido saudável circundante, fixada em formol a 10% e encaminhada para confecção de lâminas histológicas junto ao Laboratório de Patologia da Faculdade de Ciências da Saúde, da Universidade do Vale do Paraíba.

4.6 PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS E ANÁLISE HISTOLÓGICA

O volume do formol utilizado para fixação da peça anatômica compreendeu de aproximadamente 20 vezes seu volume, impedindo assim sua degradação. As amostras foram tratadas uma a uma com o seguinte procedimento: após serem lavadas em água corrente por 15 minutos, as peças sofreram desidratação gradativa por imersão em álcool 70%, 95% e álcool absoluto e posterior diafanização em xilol I-II-III, 30 minutos, em cada. Posteriormente, a peça foi impregnada por Parafina derretida (62°). Decorrida a impregnação da peça, o material foi acondicionado em blocos retangulares (emblocadas) e submetidos ao

corde em micrótomo de parafina rotativo com espessura de 6 μm . A parafina funciona como um suporte físico, e possibilitou a obtenção de cortes finos (sem deformação da estrutura e da arquitetura celular). Os cortes foram desparafinados utilizando para tal xilol, durante 10 minutos e em seguida foram reidratados, com água fresca através da passagem por uma série gradativa de soluções alcoólicas (álcool absoluto, álcool 95°, álcool 80°, álcool 70°), durante 2 minutos cada. Em seguida os cortes foram lavados durante 10 minutos. Após este procedimento os cortes histológicos foram corados com hematoxilina – eosina (H&E). A coloração com hematoxilina se deu por 2 minutos, sendo os cortes lavados durante 10 minutos, corados com eosina durante 1 minuto e novamente lavados com água destilada. Os cortes corados foram desidratados com álcool (álcool 70°, 80°, 95°, absoluto) durante 2 minutos cada, diafanizados com xilol I-II-III, 5 minutos cada e montados, usando-se um meio de montagem não aquoso (Centellan[®]). Os cortes seriados foram montados em lâminas. Desta foram, a peça correspondente ao material lesado e tratada tornou-se própria para a análise histológica por microscopia óptica de luz (Microscópio Leica Slandasd).

Com a finalidade de se obter uma avaliação qualitativa dos resultados obtidos no estudo, uma análise dos eventos histológicos nos tecidos lesados e em processo de reparação da região de cada animal estudado foi realizada. Durante esta análise, o tecido sadio da região circunvizinha foi utilizado como um dos parâmetros para comparação ao tecido alterado.

Todas as imagens digitalizadas através do programa Leica[®] Qwin, onde foi empregado segundo alinhamento padrão, e aumento de 400 vezes. Para definir o quadrante de medida, utilizou-se o comando *Measure*, a fim de se obter uma imagem quantificada em $50.805 \mu\text{m}^2$, calibrada em $l_{\text{pixel}}=0,805 \mu\text{m}$. Foram obtidas

lâminas histológicas (Fig. 11), das quais se analisou a área de cartilagem reparada e distância entre os cotos da lesão. Após a seleção de áreas ou determinação de distância, o programa executou as medidas de áreas de neoformação de cartilagem e separação entre os cotos da lesão. Os valores obtidos de área e distância de cotos, foram submetidos à análise de variância (ANOVA), com nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Para análise estatística dos dados utilizou-se o programa GraphPad Instat® aplicando teste ANOVA, com grau de significância de 5% e pós-teste de Newman Kells.

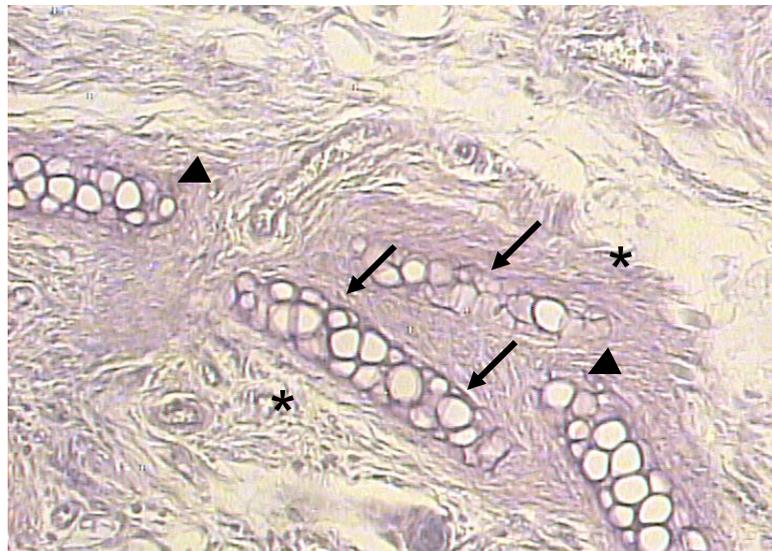


Figura 11. Fotomicrografia de zona de reparação cartilaginosa (setas), cotos da zona de lesão (cabeças de seta), pericôndrio (*). H&E. 400x. grupo irradiado 14 dias.

5 RESULTADOS

Para a exposição dos resultados da análise histológica (qualitativa) obtida na pesquisa, optou-se pela apresentação de exemplos de fotomicrografias de lâminas de todos os grupos participantes, para a evidenciação dos dados observados (Fig. 12 a 15).

Através da análise histológica do grupo controle 14 dias, verificou-se presença de fragmentos de tecidos moles na área de lesão, margens de tecido de granulação formado por fibroblastos jovens e pouco volumosos, macrófagos e nenhuma neovascularização e não apresentando área de reparação cartilaginosa. Não observou-se ganho expressivo de tecido conjuntivo, formado por fibroblastos secretores e fibras colágenas imaturas, em fase inicial de organização. Após análise do grupo controle 14 dias os cortes histológicos apresentaram algumas amostras de formação de anexos da derme e sem formação de tecido cartilagenoso (Fig. 12).

Através da análise histológica do grupo controle 23 dias, verificou-se presença de fragmentos de tecidos moles na área de lesão, margens de tecido de granulação formado por fibroblastos jovens e volumosos, macrófagos e proliferação de vasos. A análise demonstrou ainda, pequeno ganho tecido conjuntivo formado por fibroblastos secretores e fibras colágenas imaturas, em fase inicial de organização. Após análise do grupo controle 23 dias os cortes histológicos apresentaram algumas amostras de formação de anexos da derme e pequena quantidade de tecido colágeno em formação, com presença de pequena área de reparação de tecido cartilagenoso (Fig. 13).

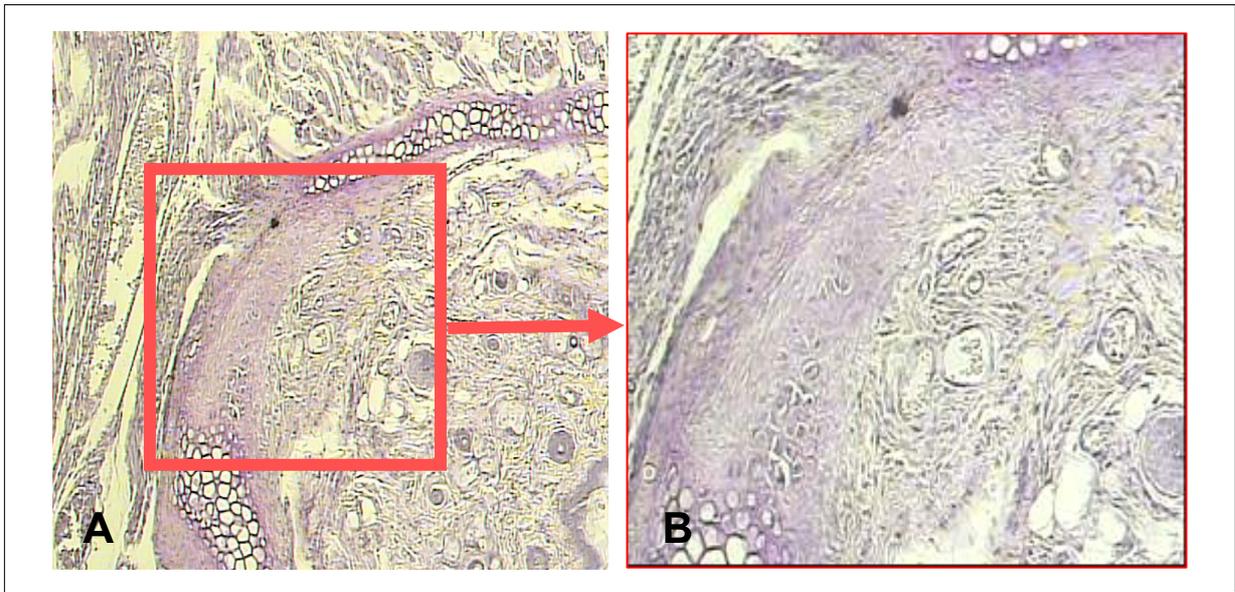


Figura 12. Fotomicrografias de zona de reparação cartilaginosa grupo controle 14 dias. H&E. 200x (A) e 400x (B).

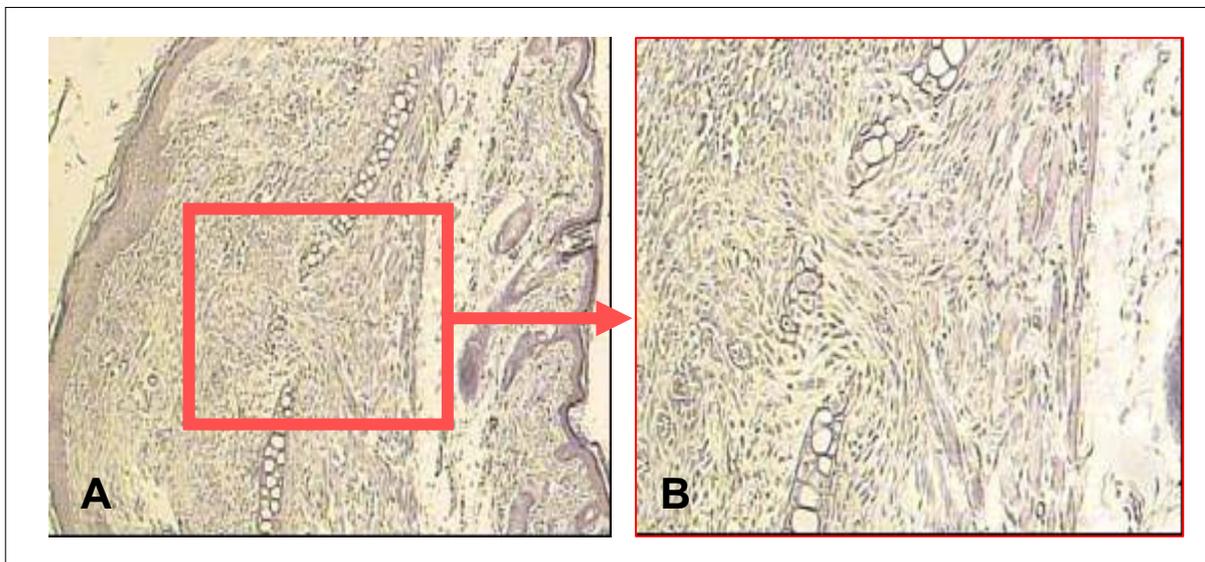


Figura 13. Fotomicrografias de zona de reparação cartilaginosa do grupo controle 23 dias. H&E. 200x (A) e 400x (B).

Por meio da análise histológica do grupo irradiado 14 dias, verificou-se presença de fragmentos de tecidos moles na área de lesão, margens de tecido de granulação formado por fibroblastos jovens e volumosos, macrófagos e vasos neo formados. A análise demonstrou ainda ganho tecido conjuntivo formado por fibroblastos secretores e fibras colágenas imaturas, em fase inicial de organização. Após análise do grupo irradiado 14 dias os cortes histológicos apresentaram algumas amostras de formação de anexos da derme e maior quantidade de tecido colágeno em formação (Fig. 14).

Os resultados obtidos após a análise estatística quanto à área da lesão, podem ser verificados na figura 16. Comparando os grupo controle e grupo irradiado 14 dias pós-operatório (PO), verificou-se que houve diferença significativa ($p < 0,001$) quanto à área de reparação do tecido cartilaginoso.

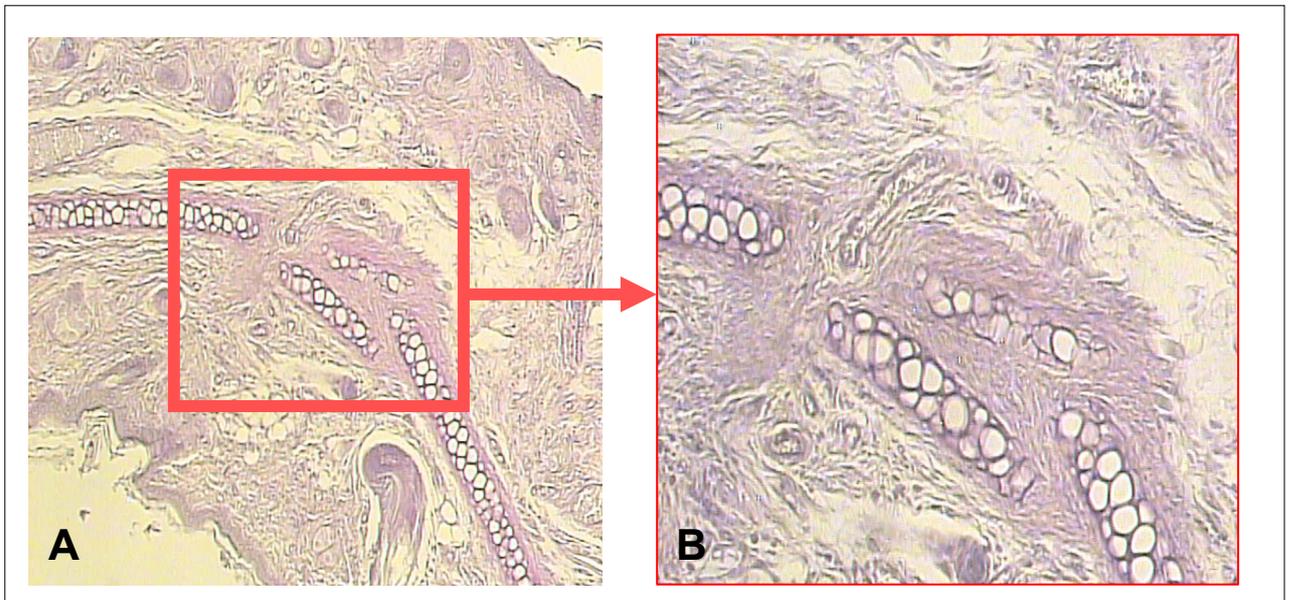


Figura 14. Fotomicrografias de zona de reparação cartilaginosa irradiado 14 dias. H&E. 200x (A) e 400x (B).

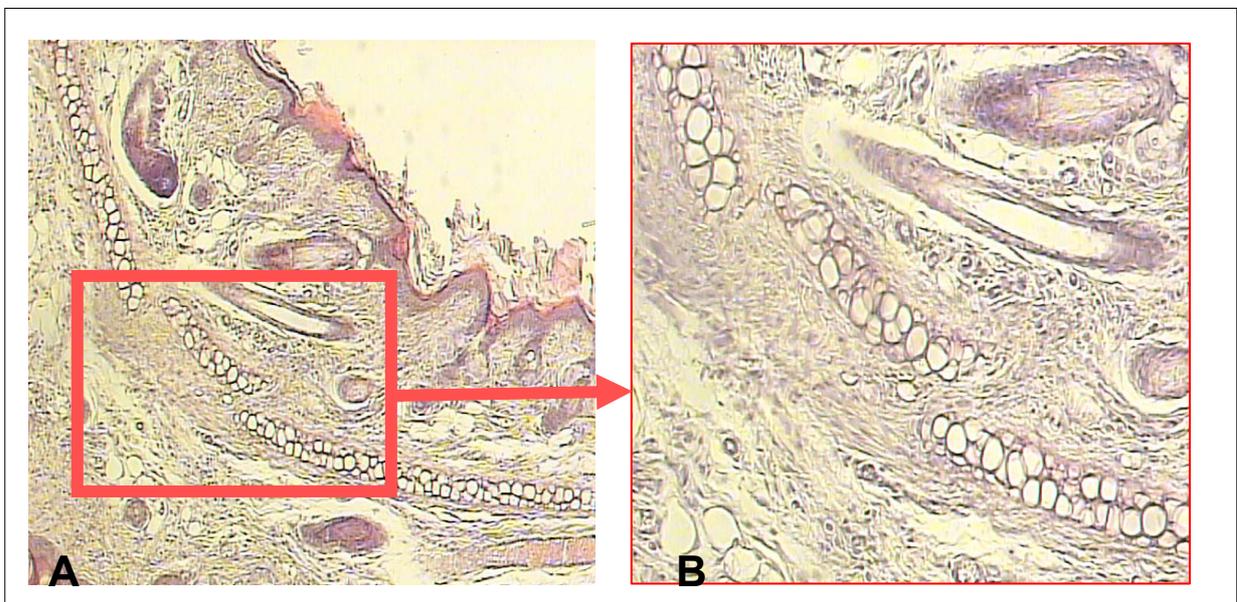


Figura 15. Fotomicrografias de zona de reparação cartilaginosa do grupo irradiado 14 dias. H&E. 200x (A) e 400x (B).

Os cortes histológicos do grupo controle 23 dias mostram proliferação de tecido conjuntivo fibroso, apresentando fibroblastos ativos e em repouso no interior de fibras colágenas. Ao passo que os cortes histológicos do grupo irradiado 23 dias mostram fragmentos de tecidos moles, apresentado defeito cirúrgico, preenchidos nas margens do mesmo condroblasto jovem e volumoso e formação de grupos exógenos. Na área central da loja cirúrgica observa-se proliferação de tecido conjuntivo e de forma periférica vasos sanguíneos e anexos da derme (Fig. 17).

Os dados referentes à análise histológica da área de reparação e distância entre os bordos da lesão encontram-se resumidos na figura 18. O segundo parâmetro observado, distância entre os bordos da lesão, demonstrou diferença significativa ($p < 0,05$) na comparação entre os grupos controle 14 x irradiados 14 assim como entre os grupos controle 23 x irradiados 23. Estes resultados podem ser observados na figura 18.

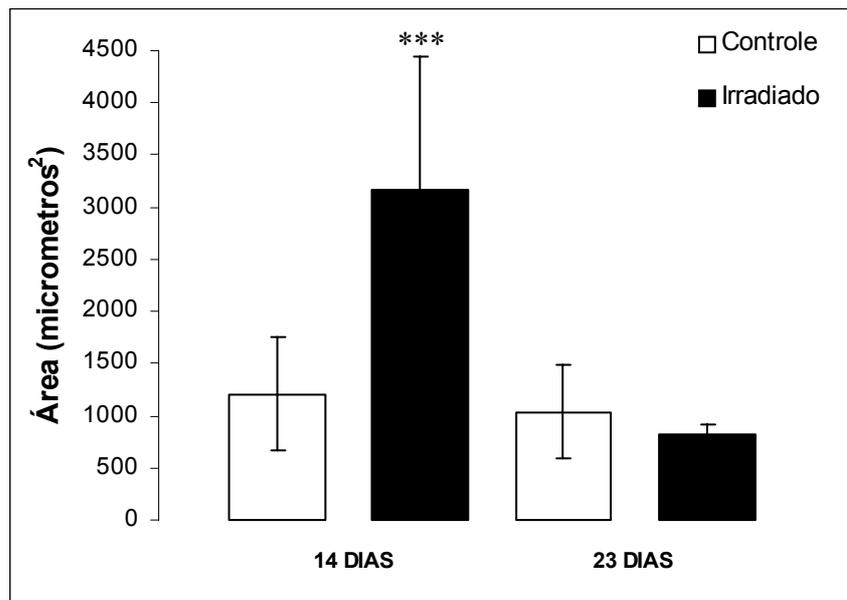


Figura 16: Medida da área da reparação cartilaginosa. *** $p < 0,001$. Os Dados estão expressos em média e desvio padrão.

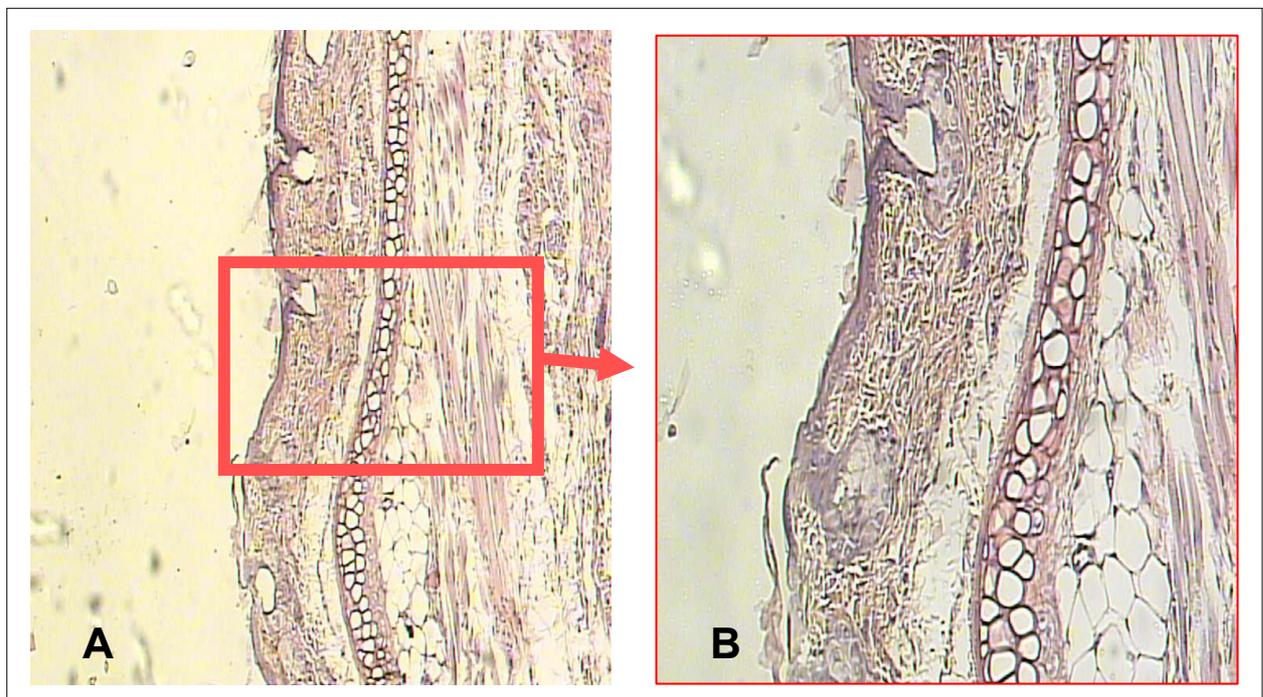


Figura 17. Fotomicrografias de zona de reparação cartilaginosa do grupo irradiado 23 dias. H&E. 200x (A) e 400x (B).

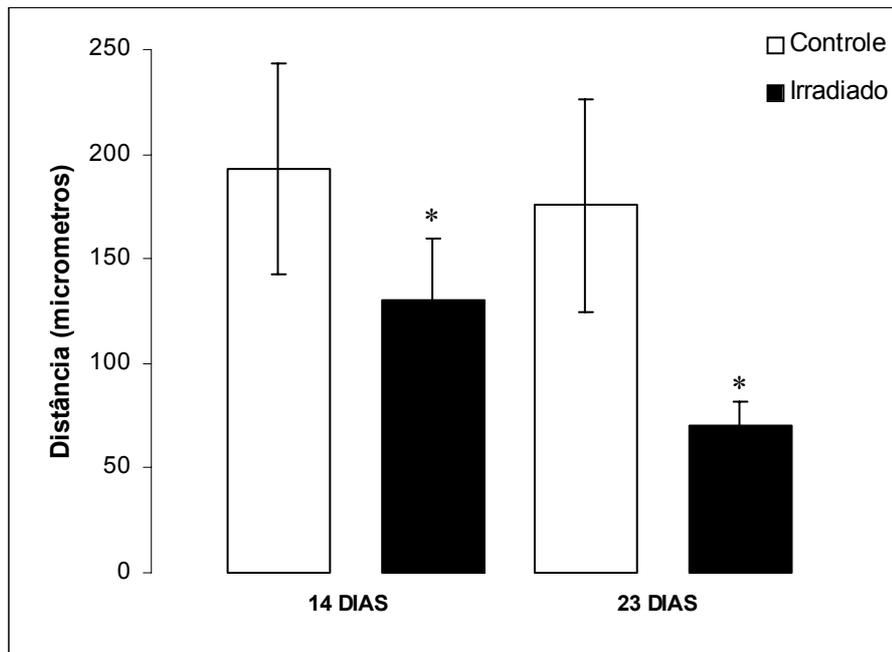


Figura 18: Medida da distância entre os bordos da lesão. * $p < 0,05$. Os Dados estão expressos em média e desvio padrão.

6 Discussão

Neste estudo optou-se pela utilização da microcirurgia na região auricular visando estudar o processo de reparação de cartilagem elástica pós-laserterapia. Esta região foi eleita devido à facilidade de acesso cirúrgico e reduzido risco de autocanibalismo. Esta região possui restrito aporte sanguíneo, com limitada capacidade de reparação, permitindo o estudo do processo correlacionando-o, entre outros fatores, com o efeito da laserterapia sobre a microcirculação periférica.

A microcirurgia (procedimento realizado com esteroscópico) foi adotada como procedimento experimental para permitir que o tecido epitelial fosse suturado sobre a perfuração em cartilagem (face anteriormente e posteriormente da orelha), minimizando o risco de fibrose cicatricial e consequentemente redução na neoformação de tecido cartilaginoso.

Foram utilizados neste estudo ratos Wistar adultos jovens para que o processo de *turnover* celular em organismos em crescimento não interferisse nos resultados histológicos, devido à alta celularidade e irregularidade entre animais. Optou-se por ratos machos para evitar variações hormonais entre os diferentes animais, além de serem os modelos de estudo mais utilizados em experimentos em biotérios, devido à facilidade de manuseio e de tratamento além de permitir acondicionamento em gaiolas (Nicolau et al., 2003).

O laser empregado neste estudo foi o laser de GaAs (904 nm), pois atualmente estes equipamentos são os mais utilizados em nível clínico (clínica fisioterapêutica), empregado em processos de reparo tecidual. O comprimento de onda é um fator determinante para o efeito no tecido biológico. Segundo Karu (1989) o tecido biológico tem baixo coeficiente de absorção para o laser GaAs 904 nm, logo

capacidade de penetração na pele (p.ex.). Alguns estudos comprovam a existência de efeitos fotobiomoduladores da radiação laser no processo de cicatrização, como a atividade e proliferação celular (BOULTON; MARSHALL, 1986). Segundo Castro et al. (1983) os efeitos benéficos da TLBP influenciam na produção de colágeno, substância essa de suma importância na formação de novas estruturas cartilaginosas, tendo em vista que a nutrição do tecido cartilaginoso que provém basicamente do pericôndrio, o qual é constituído de tecido colágeno (BOSATRA, 1984).

Os fibroblastos e macrófagos, devido à sua importância no reparo das feridas, são as células mais estudadas até o presente momento (O'KANE et al., 1994). No presente estudo realizou-se uma lesão epitelial associada a uma lesão de tecido cartilaginoso. Logo a terapia com laser instituída de forma transcutânea poderia agir em ambos os tecidos, englobando assim atividade tecidual fibroblástica (produção de colágeno) e condroblástica (produção de matriz cartilaginosa). Assim, pode-se relacionar a presente pesquisa com achados literários sobre TLBP e o tecido epitelial, uma vez que existe grande escassez de trabalhos realizados sobre reparação cartilaginosa. O emprego da TLBP com o objetivo de acelerar ou permitir o processo de reparação tem sido atestado como válido em diversas estruturas como: tecido epitelial, tecido ósseo, tecido nervoso (RABELO et al., 2006). Segundo Nicolau et al. (2003) a reparação óssea pode ser acelerada com o emprego da TLBP, através da aceleração no processo de reconstrução e aumento da remodelação observada em tecidos tratados, através do estudo da atividade de osteoclastos e osteoblastos, além de microarquitetura. A capacidade da laserterapia influenciar positivamente em diferentes tecidos biológicos, durante o processo de reparo, norteou a realização do presente estudo, pois o tecido cartilaginoso possui

pouca capacidade de reparação e seu estímulo seria de grande valia clínica. Em suma, o interesse do autor por realizar este experimento, se deu por vários motivos, dentre eles esta dificuldade relacionada à anatomia e à fisiologia da região auriculares, além da dificuldade em encontrar referências bibliográficas e artigos científicos de procedências sobre a eficiência do TLBP em cartilagem do tipo elástica.

Segundo Junqueira e Carneiro (2004) a região auricular é pouco vascularizada, possuindo tecido cartilaginoso do tipo elástico, composta por grande quantidade de pericôndrio. A cartilagem é caracterizada por ter dois tipos específicos de crescimento: o oposicional e o intersticial. O crescimento oposicional é a formação de cartilagem sobre uma superfície de cartilagem já existente. São derivadas do pericôndrio, o qual é responsável por este tipo de crescimento. O crescimento intersticial ocorre no interior da massa cartilaginosa, isso ocorre porque os condrócitos são capazes de se dividir e a matriz é distensível (ROSS; ROMREL,1993). Estes eventos puderam ser observados nos resultados da presente pesquisa, onde houve presença de crescimento oposicional e intersticial possivelmente atribuída a efeitos bioestimulatórios da TLBP

Os resultados demonstraram que houve diferença significativa ($p < 0,001$) quanto à eficácia do laser estudado sobre processo de reparação cartilaginosa, haja vista que o grupo irradiado apresentou uma maior área de neoformação cartilaginosa quando comparado ao grupo controle num período de análise de 14 dias pós-lesão, sugerindo assim a eficácia do TLBP nos grupos de ratos submetidos a radiação.

Segundo Gyton e Hall (2002) a reparação cartilaginosa inicia-se fisiologicamente quatro dias após a lesão, formando um tecido de granulação

composto de um leito denso de macrófagos, fibronectina, colágeno e tipo II além do ácido hialurônico. Visando antecipar este processo, melhorando o aporte sanguíneo, celularidade tecidual, metabolismo celular; no tecido estudado, na presente investigação a TLBP foi instituída logo após 24 horas da cirurgia. Os resultados obtidos corroboram com estudos de Trelles et al. (1989), que observaram efeitos antiinflamatórios, reparadores, analgésico durante processo de reparação de feridas. Lievens (1990), assim como no presente estudo também relata efeito de reparação tecidual otimizada pela TLBP. Contudo o autor atribui estes efeitos sobre aumento do número de fibroblastos e neovascularização. No presente estudo a celularidade e a vascularização não foi estudada, contudo quanto à formação menos evidente de tecido fibroso e presença de reparação cartilaginosa, em animais tratados, conotam similaridade com estudos Lievens. Estes resultados também se mostram similares a outros estudos publicados como o de Bisht (1999), que observou a presença de efeitos biomodulatórios que incluem: epitelização precoce, neoformação de tecido conjuntivo composto basicamente por fibroblastos. Segundo Steinlechener et al. (1993) e Stadler (1999) os efeitos de bioestimulação, observados com a TLBP, são provenientes do aumento na síntese de ATP devido à estimulação mitocondrial promovida pelo laser.

Um parâmetro avaliado neste estudo foi a distância entre os bordos da lesão nos períodos após 14 dias e após 23 dias. Após esta análise pode-se verificar diferença significativa ($p < 0,05$) na comparação entre os grupos controles e irradiados, em ambos os períodos de avaliação. Observou-se que a distância entre os bordos da lesão cartilaginosa (Fig. 11) foi menor nos animais irradiados com o laser GaAs comprovando assim o crescimento oposicional e intersticial estimulado pela TLBP. Assim, apesar de todas as dificuldades encontradas em um tratamento

numa região pouco vascularizada, como a cartilagem elástica, comprovou-se a eficácia da regeneração cartilaginosa auricular em ratos, através do tratamento utilizado neste estudo.

7 Conclusão

Pôde-se concluir através deste estudo que o laser Ga As, com comprimento de onda de 904nm e dose de 10 J/cm², promove um efeito positivo quanto à neoformação cartilaginosa no período de 14 e 23 dias.

7.1 Considerações finais

Considerando os resultados obtidos neste estudo, novas investigações podem ser realizadas visando:

- Avaliar *in vitro* a atividade celular deste tecido;
- Estudo de novas doses de irradiação, diferentes comprimentos de onda e forma de tratamento;
- Emprego desta terapia em nível clínico (dermato-funcional).

Referências

- ABERGEL, R. P. et al. Efectos biológicos del láser. **Invest. Cli. Laser**, v.1, p. 7-14, 1986.
- ABERGEL, R. P.; GLASSBERG, E.; UITTO, J. Increased wound-healing rate in pig skin treated by helium-neon laser. **SPIE Proceedings**, p.6-10. 1988.
- ALMEIDA-LOPES, L. Aplicações clínicas do laser não-cirúrgico. In: BRUGNERA, A. Jr.; PINHEIRO, A. L. B. **Laseres na odontologia moderna**. São Paulo: Pancast, 1998. p. 99-120.
- ALMEIDA-LOPES L. et al. Acción del láser a baja densidad de potencia en la proliferación in vitro de fibroblastos de encía humana. **Bol SELMQ**. v.14, n.5, p.14-18, 1998b.
- AL-WATBAN F. A. H.; ZHANG, Z. Dosimetry-related wound healing response in the rat model following helium neon laser LLLT. **Laser Therapy**, p.119-124, 1994.
- BASFORD, JR. Laser therapy: scientific basis and clinical role. **Orthopedies**, v.16, p. 541-547, 1995.
- BAXTER G. D. et al. Low level laser therapy: current clinical practice in Northern Ireland. **Physiotherapy**, v. 77, p. 171-178, 1991.
- BIHARI, J.; MESTER A. R. The biostimulative effect of low level laser therapy on longstanding crural ulcers using helium neon laser, helium neo laser plus infrared lasers, and noncoherent light: preliminary report of a randomised double blind comparative study. **Laser Therapy**, v.1, n.2, p.97, 1989.
- BISCHT, D; et al. Effect of helium neon laser on wound healing. **Ind. J. Exp. Biol.**, v.37, p.187-189, 1999.
- BOSATRA, M.; JUCCI, A.; OLLIANO, P. In vitro fibroblast and dermis fibroblast activation by laser irradiation at low energy. **Dermatologica**, v.168, p.157-162, 1984.
- BOULTON, M.; MARSHALL, J. He-Ne laser stimulation of human fibroblasts proliferation and attachment in vitro. **Lasers in Life Sciences**, v.1, p.125-134, 1986.
- CALDERHEAD, R. G. The Nd:YAG and GaAlAs lasers: a laser comparative analysis in pain therapy. **Japan Society for Laser Medicine**, v.21, n.1, 1981.
- CALDERHEAD, G. The action of low reactive level laser therapy (LLLT) on mast cells: a possible pain relief mechanism examined. **Laser Therapy**, v.1, p.27-30, 1989 a.
- CAMBIER D. C. et al. Low-power laser and healing of burns: a preliminary assay. **Plast Reconstr.**, v. 93, n.3, p.555-559, 1996.

CASTRO, D. J.; ABERGEL, P.; MEEKER, C. Effects of Nd-yag laser on DNA synthesis and collagen production in human skin fibroblast cultures. **Annals Plastic Surgery** , v.11, n.3, p.214-222, 1983.

EL SAYED, S.A.; DYSON, M. Comparison of the effect of multiwavelength light produced by a cluster of semiconductor diodes each individual diode on master cell number and phosphorus metabolism. **Lasers in Surg. and Med.** , v.10, n. 6, p 559, 1990.

ENWEMEKA, C. S.; RODRIGUEZ, O.; GALL, N. G. Correlative ultra structural and biomechanical changes induced in regenerating tendons exposed to laser photostimulation. **Lasers in Surg. and Med.** n.12, suppl. 2, 1990.

ENWEMEKA, C S. Laser biostimulation of healing wounds: specific effects and mechanisms of action. **The Journal of Orthop. and Sports Physical Therapy** , v. 10, n.10, p.333-338, 1998.

FRIEDMANN, H.; LUBART, R. Nonlinear photobiostimulation: the mechanism of visible and infrared laser- induced stimulation and reuction of neural excitability and growth. **Laser Therapy**, v. 5, p.39-42, 1993.

GAMALEJA, N. F.; POLISCHUK, E. I. The experience of skin to tumours treatment with laser radiation. **Panminerva Med.** , v.7, p.238-240, 1975.

GENOVESE, W.J. **Laser de baixa intensidade: aplicações terapêuticas em odontologia**. São Paulo: Lovise, 2000.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de fisiologia médica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

GUM, S. L. et al. Combined ultrasound, electrical stimulation, and laser promote colegen synthesis with moderate changes in tendon biomechanics. **American J. of Phys. Medicine & Rehabilitation**, v.76, n.4, p.288-296, 1997.

HALEVY, S. et al. Infrared (780 nm) low level laser therapy for wound healing: in vivo and in vitro studies. **Laser Therapy**, v. 9, p. 159-164, 1997.

HECHT, J. **The laser guidebook**. New York: McGraw-Hill, 1992.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J.; **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KLEINKORT. J.A.; FOLEY, R.A. Laser: a preliminary report on its use in physical therapy. **Clin. Management** , v.2, p.30-31, 1982.

KARU, T. I. Effects of visible radiation on cultured cells. **J. Orthop Sports Phys. Therapy** , v. 9, n.10, p.333-338, 1988.

KARU, T. **The Science of Low Power Laser Therapy**. Amsterdam: Overseas Publishers Association, 1998.

KITCHEN, S.; BAZIN, S (eds). **Eletroterapia de Clayton**. 10. ed. São Paulo: Manole, 1998.

KITCHEN, S.; BAZIN, S. **Eletroterapia: prática baseada em evidências**. 11. ed. São Paulo: Manole, 2003.

KRISHNAMURTHY, S.; POWERS, S.K. Lasers in neurosurgery. **Lasers in Surg and Med.**, v.15, n.2, p.126-167, 1994.

LIEVENS, P. The influence of laser-irradiation on the motricity of the lymphatical system and on the wound healing process. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON LASER IN MEDICINE AND SURGERY, 1986, Bologna, Itália, **Anais...** p. 171-174.

LIEVENS, P. C. Effects of laser treatment on the lymphatic system and wound healing laser. **J. Eur. Med. Laser Ass.**, v.1, n.2, p.12, 1988.

LIEVENS, P. C. The effect of a combined He:Ne and I.R. laser treatment on the regeneration of the lymphatic system during the process of wound healing. **Laser News**, v.3, n.3, p.3-9, 1990.

LIEVENS, P.C. The effect of I.R. laser irradiation on the vasomotricity of the lymphatic system. **Laser Med. Sci.**, v.6, p.189-191, 1991.

LOWE, A.S. et al. Effect of low intensity monochromatic light therapy (890nm) on a radiation-impaired, wound healing model in murine skin. **Lasers in Surg. and Med.**, v.23, n.5, p.291-298, 1998

LUBART R.; et al. Biostimulation of photosensitised fibroblasts by low incident levels of visible light energy. **Laser Therapy**, v.7, p.101-106, 1995.

LUBART, R. et al. The effect of He :He laser (633 nm) radiation on intracellular Ca²⁺ concentration in fibroblasts. **Laser Therapy** ,v.9, p.115-120, 1997.

LYONS, R. F.; ABERGEL, R. P.; WHITE, R. A. Biostimulation of wound healing in vivo by a helium neon laser. **Annals Plastic Surgery**, v. 18, p.47-50, 1987.

MAIER, M.; HAINA, D.; LANDTHALER, M. Effect of low energy laser on the growth and regeneration of capillaries. **Lasers Med. Sci.** v.5, p.381-386, 1990.

MAIMAN, T. H. Stimulated optical radiation in ruby. **Nature**, v. 187. p.493, 1960.

MANTEIFEL, V.; BAKEEVA, L.; KARU, T. Ultrastructural changes in chondriome of human lymphocytes after irradiation with He-Ne laser: appearance of giant mitochondria. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v.38, n.1, p.25-30, 1999.

MESTER, E.; SPIRY, T.; SZENDE, B.; et al. Effect of laser radiation on the wound healing. **Zeitschrift Exper Chi.**, v.8, n.258, 1971a.

MESTER E; SPIRY T; SZEND B. Effect of laser rays on wound healing. **Bull. Soc. Int. Shir.**, v.32, p.169-173, 1973.

MESTER, E.; JASZSÁG, E. The effect of laser radiation on wound healing and collagen synthesis. **Studia Biophysica**, v.35, n.227, 1973.

MESTER, E.; KORENY-BOTH, A.; SPIRY, T. The effect of laser irradiation on the regeneration of muscle fibers. **Zeltschrift Experimentelle Chirurgie**, v.8, p. 258-262, 1975.

MESTER, E. Laser application in promotion of wound healing. in: Koenbner, H.G. **Lasers in Med.**, v. 1, p. 83-95, 1980.

MESTER, E.; MESTER, A. F.; MESTER, A.. The biomedical effects of laser application. **Laser in Surg. and Med.**, v. 5, n.1, p. 31-39, 1985.

MIRÓ L. et al. Estudio capiloscópico de la acción de un láser de AsGa sobre la microcirculación. **Inv. Clin. Laser**, v. 1, n.2, p.9-14, 1984.

NICOLAU, R.A. et al. Effect of low-power GaAlAs laser (660 nm) on bone structure and cell activity: an experimental animal study. **Lasers Med. Sci.** v.18, n.2, p.89-94, 2003.

NICOLAU, R.A. et al. Effect of low power 655 nm diode laser irradiation on the neuromuscular junctions of the mouse diaphragm. **Lasers in Surg. and Med.**, v.34, n.3, p.277-284, 2004.

O'KANE, S.; SHIELDS, T.D.; GILMORE, W. S. Low intensity laser irradiation inhibits tritiated thymidine incorporation in the haemopoietic cell lines HL-60 and U-937. **Lasers in Surg. and Med.**, v.14, n.1, p.34-39, 1994.

OHSHIRO, T. et al. Clinical application of the low powered diode laser. **Lasers in Surg and Med.**, v.7, n. 78, 1987.

OHSHIRO, T. **Low reactive-level laser therapy: practical application.** Chichester: John Wiley. 2001.

OLIVEIRA, A.C.E.; MELLO, J.B.; NICOLAU, R.A. Efeito da profilaxia no diagnóstico de cárie com laser. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE LASER E NOVOS RECURSOS EM ODONTOLOGIA. (FUTURA)2., **Anais eletrônicos...**São Paulo, 2002, p. 1-2. Disponível em: <http://www.dentalonline.com.br/futura2002/TLI_27_2.html> Acesso em: 16 nov 2002.

ORTIZ, M.C.S. et al. Laser de baixa intensidade: princípios e generalidades – parte 1. **Fisioterapia Brasil**, v.2, n.4, p.221-40, 2001.

ORTIZ, M.C.S.; et al. Laser de baixa intensidade: efeitos sobre os tecidos biológicos – parte 2. **Fisioterapia Brasil.**, v.2, n.6, p.337-352, 2001.

PALECKIS, L.G.P. et al. Photodynamic therapy effect on chemically induced malignant and premalignant lesions in the hamster cheek pouch. **Oral Oncology**, v.1, p. 313-317. 2001.

PÖNTINEN, P. J. **Low level laser therapy as a Medical treatment modality.** Tampere: Art Urpo, 1992, p. 13-17.

RABELO, S.B, et al. Comparison between wound healing in induced diabetic and nondiabetic rats after low-level laser therapy. **Photomed. Laser Surg.**, v. 24, n.4, p.474-479, 2006.

REDDY, G. K.; STEHNO-BITTEL, L.; ENWEMEKA, C. S. Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit achilles tendons. **Lasers in Surg. and Med.**,v. 22, n.5, p. 281-287, 1998.

RIGAU, J. **Acción de la luz láser a baja intensidad en la modulación de la función celular.** 1997. Tese (Doutorado) – Facultat de Medicina y Ciències de la Salut, Universitat Rovira I Virgili. Espanha.

ROCHKIND, S.; ROUSSO, M.; NISSAN, M. Systemic effects of low power laser irradiation on the peripheral and central nervous system, cutaneous wounds and burns. **Lasers in Surg. and Med.**, v.9, n.2, p.174-178, 1989.

ROSS, M.H.; ROMREL, L.J. **Histologia: texto e atlas.** 2. ed. São Paulo: Panamericana, 1993.

SCHAWLOW, A. L. Principles of lasers. **Journal of clinical laser for medicine and sugery** , v. 13, n. 3, p 127, 1995.

SILVEIRA-JUNIOR, L. et al. Dosagem de diclofenaco sódico por espectroscopia raman: novas perspectivas em farmacologia clínica. **Rev. Faculd. Méd. Veter. Valença**, v.2, p.15-19, 2000.

SILVEIRA-JUNIOR, L. et al. Detecção de lesões neoplásicas induzidas em mucosa oral de hamster utilizando espectroscopia fluorescência. **Ver. Assoc. Med. Bras.**, v.50, n.3, p.297-301, 2004.

SKINNER, S. M. et al. A preliminary study of the effects of laser radiation on collagen metabolism in cell culture. **Aust. Dent. J.** v. 41, n.3, 1996.

STADLER, J. et al. The effect of low-level laser irradiation on lymphocytes from peripheral blood. In: ANNUAL MEETING OF LASERS IN SURGERY AND MEDICINE...1999, p.16-18.

STEINLECHNER, C. W. B.; DYSON, M. The effects of low level laser therapy on the proliferation of keratinocytes. **Laser Therapy**, v.5, p.65-73, 1993.

TANG, X. Y.; CHAI, B. P. Effect of CO2 laser irradiation on experimental fracture healing: a transmission electron microscopy study. **Lasers in Surg. and Med.**, v.6, n.3, p.346-352, 1986.

TERRIBILE, W. M. V. et al. Experimental wound healing with coherent and non-coherent radiation. **Laser Technol.**, v.2, n.3, p.121-134, 1992.

TRELLES, M. A. et al. Clinical use of He-Ne laser for wound healing. **J Bloodless Med. Surg.**, v.7, n.1, p.3-7, 1989.

TRELLES, M. A.; MAYAYO, E. Bone fracture consolidates faster with low power laser. **Lasers in Surg. and Med.**, v.7, p.36-45, 1987.

TÚNER, J.; HODE, L. Reinnervation after nerve injury: the effects of low laser treatment. In: **Low level laser therapy: clinical practice and science background**. Sweden: PrimaBooks, 1999,. p.280-302.

WEBB, C.; DYSON, M.; LEWIS, W. H. P. Stimulatory effect on 660 nm low level laser energy on hypertrophic scan-derived fibroblasts: Possible mechanisms for increase in cell culture. **Lasers in Surg. and Med.** , v.22, n.5, p. 294-301, 1998.

YU, W.; NAIM, J.P.; LANZAFAME, R.J. Effects of photostimulation on wound healing in diabetic mice. **Lasers and Surg. and Med.** , v.20, n.1 p.56-63, 1997.

Anexo A

FVE Fundação
Valeparaibana de
Ensino

Univap
UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA
UNIVAP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo n.ºA067/CEP/2006, sobre "*Efeitos do laser de GaAs (904nm) sobre o processo de reparação da cartilagem auricular de ratos submetidos a lesão cirúrgica*" sob a responsabilidade de *Renata Amadei Nicolau*, foi **aprovado** por esta Comissão de Ética em Pesquisa por estar de acordo com os Princípios Éticos seguindo as Diretrizes Nacionais e Internacionais da pesquisa envolvendo animais.

Informamos que o pesquisador responsável por este Protocolo de Pesquisa deverá apresentar a este Comitê de Ética um relatório das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação.

São José dos Campos, 06 de março de 2006.



PROF. DR. LUÍS VICENTE FRANCO DE OLIVEIRA
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa
Universidade do Vale do Paraíba – Univap