

INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DA LASERTERAPIA DE BAIXA POTÊNCIA EM 660nm NO REPARO OSSEO DE FEMORES DE RATOS LESIONADOS POR MICROESPECTROMETRIA FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X POR ENERGIA DISPERSIVA.

Rodrigo de Oliveira¹, Geraldo Magno Alves de Abreu², Natasha Marques Piorino³, Danilo Barbosa⁴, Emilia Angela Loschiavo Arisawa⁵, Airton Abrahão Martin⁶, Ana Maria do Espírito Santo⁷.

^{1,3} Faculdade de Engenharias, Arquitetura e Urbanismo da UNIVAP, Av. Shishima Hifumi, 2911, São José dos Campos, SP, 1244-000.

^{2,5} UNIVAP/Faculdade de Ciências da Saúde - FCS, Av. Shishima Hifumi, 2911, 12244-000, São José dos Campos, SP.

^{6,7} UNIVAP/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento - IP&D/LEVB, Av. Shishima Hifumi, 2911, 12244-000, São José dos Campos, SP.

⁴ Centro Universitário de Formiga UniForMg - Instituto de Ciências da Saúde - Departamento de Fisioterapia - Avenida Dr. Arnaldo de Senna, 328, Água Vermelha, Formiga, Minas Gerais, Brasil - Cep. 3755-000.

¹rodrigo.engbio@bol.com.br, ²magnoabreu@apcd.org.br, ³npiorino@univap.br,

⁴tdanillobarbosa@yahoo.com.br, ⁵mirela@univap.br, ⁶amartin@univap.br, ⁷amesanto@univap.

Resumo: A utilização do laser de baixa potência tem apresentado efeitos positivos em processos de regeneração óssea por promover maior velocidade nos processos de cicatrização e reparo, aceleração da neovascularização, maior formação do tecido de granulação, aumento no número de fibroblastos e alterações na proliferação e motilidade celular. O presente estudo foi delineado para avaliar, ex vivo, de forma qualitativa e semi quantitativa, os componentes minerais do osso neo formado, em defeito cirúrgico em ratos, através da Espectrometria de Fluorescência de Raios-X por Energia Dispersiva (ED-XRF). Os animais foram divididos em: G(C) controle n=08, G(660nm) n=09 e submetidos à osteotomia no fêmur direito, sendo que os animais do grupo G(660nm) foram tratados por laserterapia no comprimento de onda 660nm e os do grupo controle sofreram a mesma manipulação mas com o aparelho de laser desligado, por períodos experimentais de 7, 14 e 21 dias.

Palavras-chave: Fluorescência de Raios-X, reparo ósseo, laser de baixa potência e ratos wistar

Área do Conhecimento:

Introdução

O laser é citado como uma das descobertas mais significativa do século XX no campo da ciência médica. Isto envolve novas perspectivas nas áreas de pesquisa biológica e aplicação na área clínica. O laser de baixa intensidade foi utilizado como estímulo para a proliferação celular e seu efeito estimulante foi primeiramente utilizado no tratamento de feridas (MESTER E, et. al. 1985).

A terapia laser de baixa potência vem sendo utilizada, cada vez mais, na medicina em geral e sugere-se que seu efeito pode ser benéfico na resolução de muitas condições patológicas como na ortopedia, neurologia e reumatologia (KHADRA M. 2005) Atualmente, este recurso terapêutico é investigado no reparo de diversos tecidos biológicos, incluindo o tecido ósseo (MARTINEZ, M.E.M, et. al. 2008).

Os efeitos da radiação laser de baixa intensidade no crescimento e reparo ósseo têm sido investigados para aplicações clínicas e práticas (LOPES, C.B. et. al. 2007). Entretanto, os

mecanismos biológicos relacionados à irradiação em tecido ósseo ainda não estão claramente bem definidos. Supõe-se que a energia laser excita as porfirinas e os citocromos, que são cromóforos intracelulares, promovendo um aumento da atividade celular, aumentando a concentração de adenosina trifosfato (ATP), fosfatase alcalina, liberando cálcio (LUBART R. 1992) O laser de baixa intensidade pode promover maior velocidade nos processos de cicatrização e reparo, aceleração da neovascularização, maior formação do tecido de granulação, aumento do número de fibroblastos, maior número de fibras colágenas, liberação de histamina pré-formada, redução do pH intracelular e alterações na proliferação e motilidade celular, fagocitose e reposta imune (KICHEN SS. et. al. 1991). Ainda, na regeneração de tecidos duros, o mesmo pode melhorar a função de osteócitos, promovendo a aceleração do metabolismo e formação mais rápida do calo ósseo. A radiação laser de baixa potência tem apresentado efeitos positivos na cura de fraturas ósseas em animais, baseando-se em medidas morfológicas, bioquímicas e radiográficas

(LUGER E.J. 1998). A laserterapia não só reduz o tempo de reparo, como também produz uma maior área de reparo ósseo (NICOLAU R.A. 2003).

O presente estudo foi delineado para avaliar quimicamente, por meio de Fluorescência de Raios-X, a ação da laserterapia de baixa potência no processo de regeneração óssea em lesões experimentais em femores de ratos. A região lesionada foi irradiada com laser de diodo no comprimento de onda de 660nm em diferentes tempos experimentais de tratamento (7, 14 e 21 dias).

A análise por fluorescência de raios-X é um método semi-quantitativo baseado na medida da intensidade (número de fótons coletados por unidade de tempo) dos raios-X característicos emitidos pelos elementos que constituem a amostra quando devidamente excitada. A intensidade da energia característica emitida pelos componentes da amostra está relacionada com a concentração de cada elemento (LIEBHAFSKY, H. A. et al. 1966). Deste modo, uma avaliação elemental quali- e/ou quantitativa pode ser conduzida para a determinação dos teores dos componentes inorgânicos presentes na estrutura óssea. Esta técnica, vastamente aplicada em engenharia, tem sido utilizada para o estudo de tecidos biológicos (BORTOLETO, G.G. et. al. 2007) Entre as principais vantagens desta técnica analítica destaca-se o fato de que não há qualquer necessidade de preparação prévia da amostra, pois se trata de uma técnica analítica não-destrutiva na qual o resultado pode ser obtido em tempo real.

Metodologia

A pesquisa recebeu aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade do Vale do Paraíba sob o protocolo no L213-2006, e seguiu os princípios éticos na experimentação animal (COBEA 1991). O presente trabalho foi feito pelo aproveitamento das amostras utilizadas na avaliação radiológica digital do reparo ósseo após laserterapia (BARBOSA, D. 2006). As amostras foram conservadas em formol antes das análises. Neste estudo foram utilizados 17 ratos machos adultos sadios da raça wistar (*Rathus Norvegicus*) divididos, aleatoriamente, em 2 grupos: I: Grupo de Controle (GC) com n=08; II: Irradiação laser em 660 nm (G660nm) com n=09; o grupo GC foi subdividido em 2 animais para o tempo experimental de 7 dias, 3 animais para 14 dias e 3 animais para 21 dias. O grupo G660 foi subdividido com 3 animais para cada tempo experimental (7, 14, 21 dias).

Os animais foram anestesiados como descrito por Barbosa (2006). O defeito ósseo foi realizado com uma broca trefina com 2,8 mm de diâmetro conectada a um motor com velocidade de 1100

rpm. Todo o procedimento cirúrgico de lesão foi feito sob irrigação constante e abundante com soro fisiológico a fim de se evitar queimaduras. Após a realização do defeito ósseo, a camada muscular foi suturada. Para a aplicação da laserterapia os mesmos foram posicionados em decúbito lateral sobre uma plataforma e imobilizados.

A laserterapia foi realizada de 48 em 48 horas com laser de diodo em condições ambientes normais. A 1ª aplicação foi feita imediatamente após o procedimento cirúrgico. Os animais do grupo controle (GC) receberam o mesmo tipo de manipulação que os animais irradiados, porém com o equipamento desligado. A dosimetria utilizada no experimento foi de: densidade de energia 4 J/cm², potência 5,0 x 10⁻³ W, comprimento de onda 660nm / 830nm, área do feixe incidente 0,08 cm², distância da pele 1 cm, tempo de exposição de 40 segundos por ponto.

Após o período de tratamento instituído para cada grupo experimental, os animais dos respectivos grupos foram submetidos à eutanásia e, posteriormente, à osteotomia do femur lesionado (BARBOSA, D. 2006).

A análise química da região lesionada foi feita pela técnica de espectroscopia de fluorescência de raios-X por energia dispersiva (ED-XRF). Foi utilizado um espectrofotômetro marca Shimadzu, modelo µEDX-1300 disponível no LEVB, IP&D/Univap.

A superfície da amostra foi analisada longitudinalmente por dispersão de energia da radiação proveniente de um tubo de Rh acoplado a um sistema computadorizado. O diâmetro do feixe incidente foi de 50µm. O mapeamento da região de defeito ósseo foi feito em linha, com leitura de 400 pontos utilizando-se o passo de 20 µm. O tempo de varredura foi estipulado em 50 s por ponto. A contagem da radiação foi feita por um detector semicondutor de Si (Li) refrigerado por nitrogênio líquido. A tensão do tubo foi ajustada em 50 kV com ajuste automático da corrente. Foi utilizado, como referência, o reagente de hidroxiapatita estequiométrica sintética Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂, marca Sigma-Aldrich, grau de pureza 99.99%. Os parâmetros fundamentais para cálculo do balanço da fórmula química foram estabelecidos para os pesos relativos de Ca, P e O.

Resultados

As fotografias das amostras representativas de cada grupo e subgrupo utilizados no estudo são mostradas na Figura 1. Observa-se uma evolução do quadro de regeneração óssea de acordo o tempo experimental em todas as amostras. Entretanto, visualmente, não é possível fazer uma estimativa de qual terapia foi mais eficaz.

De acordo o perfil de composição de Ca e P do GC (fig. 2a e 2b, respectivamente) a região lesionada tem diâmetro de cerca de 3 mm após o tempo experimental de 7 dias. Observa-se uma depreciação dos teores minerais nesta região. Após 21 dias de tempo experimental, não é mais observada esta depreciação e qualquer diferença significativa entre os perfis das amostras tratadas.

A análise estatística dos valores obtidos referentes às medidas de ED-XRF dos grupos nestes tempos de tratamento permitiu avaliar e comparar as alterações químicas no componente mineral do osso neo-formado na região lesionada. As médias e os valores dos desvios-padrão calculados para o elemento Ca e P são apresentados nos gráficos das figuras 3(a) e 3 (b), respectivamente. Os resultados indicaram que o tratamento laser 660nm é o mais eficiente, principalmente no início da regeneração, ou seja, de 7 a 14 dias. Após, o tratamento laser é menos eficiente.

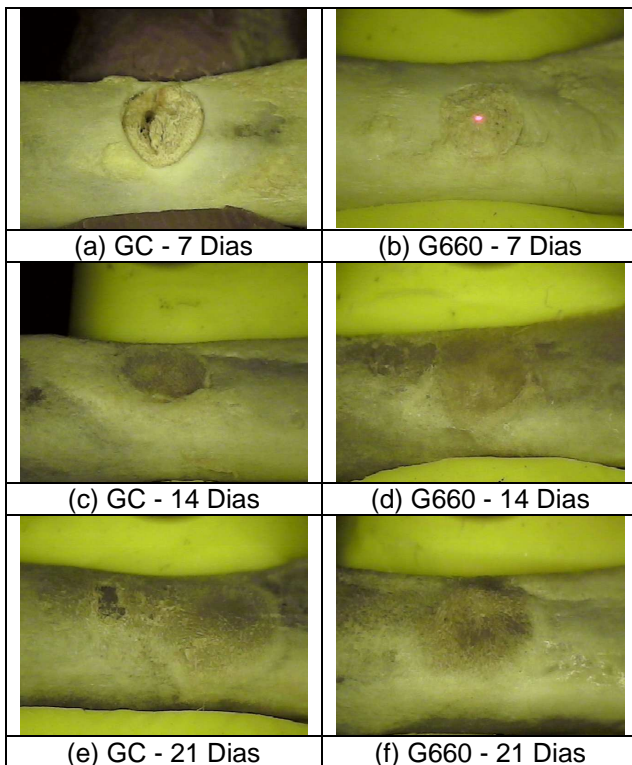


Figura 1: Fotografias das amostras representativas dos grupos e subgrupos avaliados.

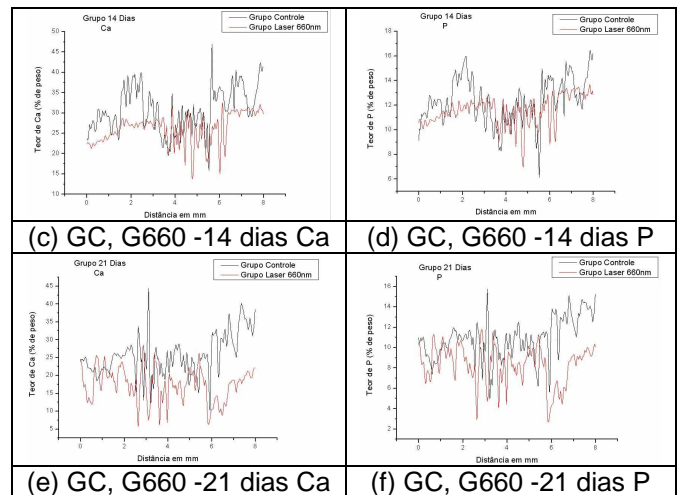
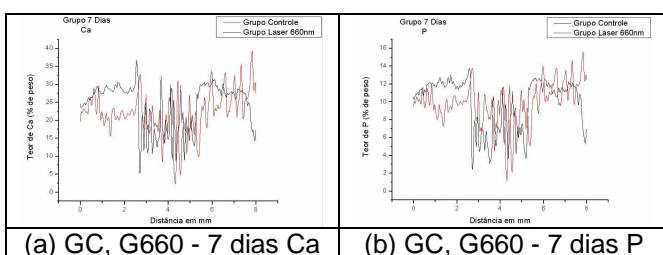


Figura 2: Gráficos dos perfis de concentração de Ca (a-c) e de P (d-e) das amostras avaliadas por ED-XRF após o período experimental de 7, 14 e 21 dias. A distância de 3 mm representa o ponto de medida situado no centro da lesão.

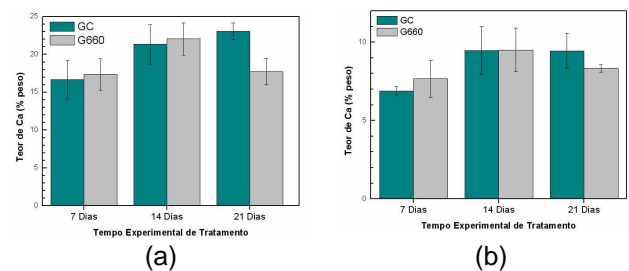


Figura 3: Teores de Ca (a) e P (b) dos tratamentos nos tempos experimentais de 7, 14 e 21 dias - ED-XRF.

Discussão

Barbosa (2006) avaliou os efeitos minerais por densitometria óptica, e foi observado um aumento gradativo na morfologia e na radiopacidade das tomadas radiográficas nos três tempos experimentais. No presente trabalho, a análise por ED-XRF mostrou que o laser de 660nm é o mais eficiente. Entretanto apenas para o período inicial experimental.

Os teores de minerais nas amostras podem ter sido alterados por causa do tempo de conservação das amostras. Oliveira e colaboradores (2007), no estudo conduzido para avaliar os efeitos de conservação de ossos utilizados em análises e pesquisa, mostraram que há alterações e redução significativa dos teores minerais dos ossos conservados em soro fisiológico e em formol. Estas alterações podem ser observadas após 60 horas de conservação, tendendo a estabilidade após um longo período. Como as amostras foram conservadas em formol por um longo período de tempo, mais do que 12

meses, os teores de elementos minerais podem ter sofrido variações maiores do que o próprio efeito de regeneração. Sugere-se a condução de um trabalho sistemático com amostras conservadas a baixas temperaturas ou análise imediata após a osteotomia.

Conclusão

Foi possível avaliar e comparar os teores minerais da hidroxiapatita, Ca e P, em tecido duro durante a regeneração óssea de lesões em diferentes tempos de tratamento experimental e e tipos de irradiação. O melhor resultado foi observado para o tratamento laser 660nm durante 7 dias de irradiação. A recomposição mineral é significativamente acelerada até este período, entretanto, após 21 dias de tratamento, o grupo controle apresentou maior grau de mineralização. O estudo forneceu balizamento para proceder um tratamento terapêutico a laser apenas no período inicial da regeneração.

Referências

- BARBOSA, D. Avaliação radiológica do reparo ósseo após laserterapia em osteotomias experimentais em femores de ratos. Dissertação de Mestrado, pós-graduação em Bioengenharia, IP&D, Univap, São José dos Campos, SP, 72p. 2006.
- BARUSKA O, YAAKOBI T, ORON U. Effect of low-energy laser (He-Ne) irradiation on the process of bone repair in the rat tibia. *Bone*; 16:47-55. 1995.
- BORTOLETO, G.G., BORGES, S.S.O., BUENO, M.I.M.S. X-ray Scattering and Multivariate Analysis for Classification of Organic Samples: A Comparative Study using Rh Tube and Synchrotron Radiation; *Analytica Chimica Acta*, v. 595, n. 1-2, p. 38-42. 2007
- COBEA. Princípios éticos na experimentação animal. [s.l.]: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. 1991.
- KICHEN SS, PARTRIDGE CJ. A review of low level laser therapy. *Physiotherapy*; 77:161-68. 1991.
- KHADRA M. The effect of low level laser irradiation on implant-tissue interaction. In vivo and in vitro studies. *Swedish dental journal*;172:1-63. 2005.
- LIEBHAFSKY, H. A. et al.X-Ray Absorption and Emission in Analytical Chemistry. In: *Spectrochemical Analysis with X-rays.*, New York, John Wiley e Sons, Inc., 2ª ed, p.357. 1966.
- LOPES, C.B., PACHECO, M.T.T., SILVEIRA, L., DUARTE, J., CANGUSSU, MCT; PINHEIRO, ALB The effect of the association of NIR laser therapy BMPs, and guided bone regeneration on tibial fractures treated with wire osteosynthesis: Raman spectroscopy study. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, v. 89, n. 2-3, p. 125-130. 2007.
- LUBART R, FRENCY J, JOREY HJ, et al. Effects of visible and near-infrared lasers on cells cultures. *Journal of Photochemistry and Photobiology*;3:2-31. 1992.
- LUGER EJ. Effect of low-power irradiation on the mechanical properties of bone fracture healing in rats. *Lasers in Surgery and Medicine*;22: 97-102. 1998.
- MARTINEZ, M.E.M., PINHEIRO, ALB, RAMALHO, L.M.P. Effect of IR laser photobiomodulation on the repair of bone defects grafted with organic bovine bone. *Lasers in Medical Science*,v. 23, n. 3, p. 313-317. 2008.
- MESTER E, MESTER AF, MESTER, A. The biomedical effects of laser application. *Laser in Surgery and Medicine*;5:31-39. 1985.
- NICOLAU RA. Effect of low-power GaAlAs laser (660 nm) on bone structure and cell activity: an experimental animal study. *Lasers Medicine Science*;18:89-94. 2003.
- OLIVEIRA, R., SILVA, C.M.O.M., MARTIN, A.A., SANTO, A.M.E. Análise dos componentes inorgânicos de fêmures de camundongos por fluorescência de raios-X. *Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e VI Encontro Latino Americano de Pós-Graduação*, p. 634-637. 2007.