

Artigo original

Alterações estruturais do colágeno da placa de crescimento irradiado por laser de baixa intensidade: uma investigação por microscopia de força atômica

Structural changes of collagen in the irradiated growth plate by low intensity laser: an investigation through microscopy of atomic force

Paulo Umeno Koeke, M.Sc. *, Charles Taciro**, Nivaldo Antonio Parizotto, D.Sc.***

.....
*Fisioterapeuta, Professor do Curso de Fisioterapia do UniSALESIANO, Araçatuba SP, **Fisioterapeuta, Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia – UFSCar, ***Fisioterapeuta, Orientador Específico do Programa de Pós-graduação Interunidades Bioengenharia - EESC/FMRP/IQSC – USP, Docente do Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, UFSCar, Professor Titular do Departamento de Fisioterapia da UFSCar

Resumo

O presente estudo investigou através da microscopia de força atômica o efeito sistêmico e local da radiação laser sobre a placa de crescimento ósseo. Foram utilizados ratos Wistar, com 30 dias de idade, divididos aleatoriamente: Grupo GC (n = 5), não irradiados pelo laser; Grupo G5J (n = 10), irradiado por um laser (fluência = 5 J/cm²) e finalmente, o grupo G60J (n = 10) também irradiados por um laser de baixa intensidade (60 J/cm²). Dos grupos tratados, foi avaliado o efeito sistêmico na placa contralateral, sendo denominados como G5JS (n = 10) a avaliação da placa de crescimento contralateral à irradiada do grupo G5J e o grupo G60JS (n = 10) a avaliação da placa de crescimento contralateral à irradiada do grupo G60J. O tratamento consistiu de 06 aplicações de laser pela técnica pontual na pata traseira direita sobre a região ântero-medial da placa de crescimento proximal da tíbia, com intervalo de 48 horas entre as irradiações. Observamos aumento na espessura dos feixes de colágeno, alteração do sentido de orientação e organização destes feixes, principalmente através de seu efeito local. O laser pode provocar alterações estruturais nos feixes de colágeno, porém os nossos resultados não são suficientes para afirmar que o crescimento ósseo possa ser afetado.

Palavras-chave: laser, AFM, placa de crescimento.

Abstract

This study investigated through the microscopy of the atomic force the systemic and local effect of the laser radiation on the bone growth plate. 30-day-old Wistar rats, randomly divided, were used in this experiment: Group GC (n = 5), not irradiated by laser; Group G5J (n = 10), irradiated by laser, ($\lambda = 780$ nm, mean output power = 20 mW, fluency rate = 5 J/cm², time = 10 seconds) and finally, the Group G60J (n = 10) also irradiated by low intensity laser ($\lambda = 780$ nm, mean output power = 20 mW, fluency rate = 60 J/cm², Time = 120 seconds). From these groups, we evaluated the systemic effect on the contra lateral plate and we named them as G5JS (n = 10) – the evaluation of the contra lateral growth plate to the irradiated one of the Group G5J and the Group G60JS (n = 10) – the evaluation of the contra lateral growth plate to the irradiated one of the Group G60J. The treatment consisted of six laser applications through the punctual technique on the back right paw over the antero-medium region of the growth plate near the tibia, with a 48-hour interval between the irradiations. We observed an increase on the thickness of the collagen sheaves, changing of orientation sense and organization of these sheaves, mainly through the local effect. Laser can cause structural changes on the collagen sheaves, but our results are not enough to claim that the bone increase can be affected.

Key-words: laser, AFM, growth plate.

Recebido 5 de julho de 2006; aceito 15 de outubro de 2006.

Endereço para correspondência: Nivaldo Antonio Parizotto, Laboratório de Eletrotermofototerapia, Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos, Via Washington Luís, km 235, CP 676, 13565-905 São Carlos SP, Tel: (16) 3351 8630 E-mail: parizoto@power.ufscar.br

Introdução

Recentemente alguma atenção tem sido dada um fator potencialmente modulatório às células presentes em tecidos em franco desenvolvimento ou em reparação, a irradiação laser de baixa potência. Resultados promissores têm sido reportados, como o aumento da atividade de células sanguíneas, macrófagos, fibroblastos [1], condrócitos, osteoblastos e osteoclastos na área da fratura irradiada pelo laser, incremento na vascularização [1,2,3] alterações na síntese de RNA [4], efeitos positivos na proliferação, diferenciação e calcificação de clones de células osteoblásticas [5,6], aumento na velocidade de reorganização da estrutura trabecular e canais haversianos [7,8].

Porém há poucos estudos que verificam a influência desta radiação eletromagnética sobre a placa de crescimento ósseo, tecido esse que é o responsável pelo crescimento em comprimento para a metáfise e para a diáfise do osso longo. Sabe-se que os fatores responsáveis pela coordenação do desenvolvimento e do crescimento pós-natal envolvem principalmente as influências ambientais, fatores de crescimento e o controle genético [9], os quais podem ser modulados por ação da laserterapia.

A fotobiomodulação laser é o efeito da radiação eletromagnética do laser de baixa intensidade em materiais biológicos, através da estimulação ou inibição de atividades bioquímicas, fisiológicas e proliferativas. A magnitude do efeito é referida sendo dependente do comprimento de onda, das doses e da dose-intensidade do laser [10,11].

Algumas dessas alterações e respostas teciduais podem ser evidenciados através do estudo estrutural dos feixes de colágeno do tecido em questão. Essas alterações envolvem dimensão dos feixes de colágeno (espessura), organização e homogeneidade estrutural.

Neste trabalho nós utilizamos a microscopia de força atômica como técnica para o estudo da superfície topográfica do corte histológico, com o objetivo de estudar a morfologia e a influência da irradiação laser de baixa intensidade sobre o desenvolvimento da placa de crescimento de ratos.

Material e métodos

Foram utilizados 25 ratos Wistar (*Rattus norvegicus, albinus*) machos, com massa corporal variando de 70 a 90 gramas, com 30 dias de idade, divididos aleatoriamente: Grupo GC (n = 5), não irradiados pelo laser; Grupo G5J (n = 10), irradiado por um laser com potência de saída de 20 mW a uma fluência de 5 J/cm², por 10 segundos e finalmente, o grupo G60J (n = 10) irradiados por um laser com potência de saída de 20 mW a uma fluência de 60 J/cm², por 120 segundos. Dos grupos tratados, foi avaliado o efeito sistêmico na placa contralateral, sendo demoninados como G5JS (n = 10) a avaliação da placa de crescimento contralateral à irradiada do grupo G5J e o

grupo G60JS (n = 10) a avaliação da placa de crescimento contralateral à irradiada do grupo G60J.

O equipamento laser utilizado foi um laser terapêutico MMOptics®, classe 3b, emissão contínua, potência óptica útil na saída de 70 mW, divergência do feixe 50° e a área do spot de saída é de 4,0 mm².

A irradiação laser foi realizada pelo método transcutâneo pontual sobre a placa de crescimento proximal do osso tibial anterior, localizado logo abaixo da interlinha articular do joelho da pata posterior direita do rato em 06 aplicações, com um intervalo de 48 entre as irradiações.

As tíbias removidas após 48 horas da última sessão, foram fixadas por 24hs solução de Bouin, seguindo-se então o processo de lavagem para a retirada dos resíduos e então a desmineralização através da solução de Morse (ácido fórmico a 50% e citrato de sódio a 20% em partes iguais), trocada a cada 3 dias, durante 25 dias.

As peças foram lavadas em água corrente por 24 horas, neutralizadas em solução de sulfato de sódio a 5% por 24 horas, lavadas novamente em água corrente por mais 24 horas. Posteriormente conservado em solução de álcool 70% para desidratação (álcool 90%, álcool 95%, álcool absoluto) e na seqüência a diafanização e inclusão em parafina para confecção de blocos e realização dos cortes no plano coronal por meio de um micrótomo rotatório.

Foram, então, realizados cortes seriados longitudinais com 6 µm de espessura padronizada, buscando melhor visão para análise da cartilagem de crescimento.

Microscopia de Força Atômica

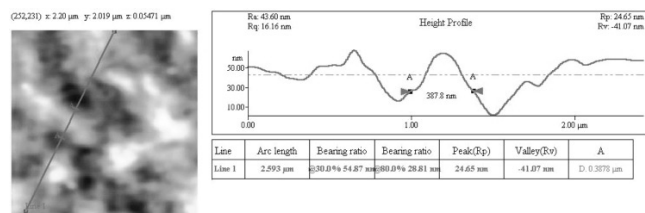
No nosso trabalho a topografia das amostras foi adquirida através de um microscópio de força atômica (modelo Bio-Probe da Park Scientific Instruments, atualmente a Thermo Microscopes - Veeco) em ar, operando no modo de contato a uma frequência de varredura de 1.5 Hz por linha, gerando 256 linhas, num campo de análise de 25X25 µm, em temperatura e condições de pressão controlados e umidade relativa do ar em 50%.

As lâminas foram hidratadas por cerca de 30 minutos em água destilada. Logo em seguida, foram obtidas 4 imagens de AFM em pontos aleatórios na zona de repouso placa de crescimento para cada corte histológico.

A análise o aspecto dimensional foi efetuada através da mensuração das espessuras dos feixes de colágeno da matriz celular da zona de repouso da placa de crescimento, com o auxílio do software *Image Processing and Data Analysis – Version 2.0.0 – ThermoMicroscopes*.

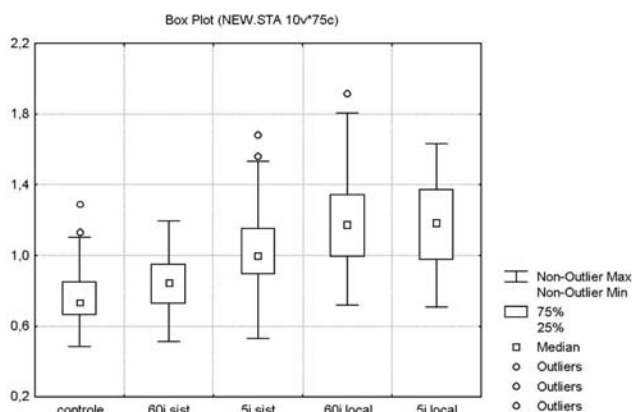
Também foi avaliado de forma qualitativa o aspecto geral da topografia da zona de repouso, observando-se os aspectos de organização, sentido de orientação das fibras e homogeneidade.

Figura 1 - Mensuração da largura do feixe de colágeno na zona de repouso da placa de crescimento através do programa Image Processing and Data Analysis – Version 2.0.0 – TermoMicroscopes. Em “1A” imagem da topografia e em “1B” seção transversa do feixe de colágeno.



Resultados e discussão

Figura 2 - Distribuições das medições da espessura dos feixes de colágenos.



No presente estudo, um importante fator a ser destacado foi o aumento da espessura dos feixes de colágenos da zona de repouso da placa de crescimento dos ratos tratados com laser quando comparados ao grupo controle ($p \leq 0,05$), que não recebeu nenhuma radiação, sendo que o efeito local nas doses de 60 joules e 5 joules provocou maior alteração quando comparado com o efeito sistêmico da irradiação ($p \leq 0,05$).

Os nossos resultados estão de acordo com diversos pesquisadores que observaram um incremento da proliferação celular, particularmente dos fibroblastos responsáveis pela produção de colágeno após a irradiação com laser de baixa intensidade [3,4,12,13], assim como, a deposição dessas novas fibras de colágenos de forma organizada de tal modo a se agregarem, aumentando o diâmetro dos feixes de colágeno.

Outras pesquisas relatam alteração no número de componentes da cadeia respiratória (citocromo, citocromo oxidase e flavina desidrogenase) por excitação de fotorreceptores ou cromóforos, permitindo maior ativação da cadeia respiratória e ativação do transporte de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial, resultando no aumento da síntese de ATP [14] e alterações metabólicas importantes que culminam

em influência no nível do ciclo de nucleotídeo, componente envolvido na síntese de RNA [4].

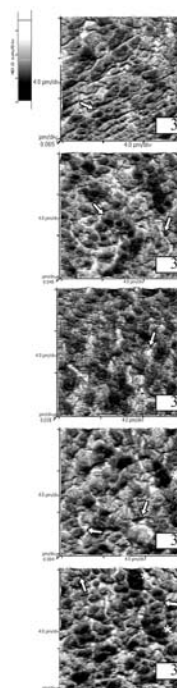
Interessante observar que o efeito da radiação laser não se restringiu apenas ao local irradiado, afetando também a placa de crescimento esquerda, contra-lateral à irradiada. As alterações foram em menor magnitude, porém estatisticamente significativas, implicando na possibilidade de efeito sistêmico da laserterapia. Há a hipótese de que mediadores químicos e fatores de crescimento produzidos no local irradiado possam, através da corrente sanguínea, atuar sobre outros centros de crescimento, afetando a estrutura tecidual [15].

A literatura descreve que preferencialmente os tecidos “lesados”, que em sua maioria apresentam alterações no seu estado redox, são susceptíveis ao efeito biomodulatório da radiação laser, possibilitando que os efeitos biomodulatórios se concentrem predominantemente no foco de lesão. Os nossos resultados demonstram que esse efeito pode ocorrer na placa de crescimento “saudável”, talvez pelo fato de ser um tecido com elevada atividade metabólica, ou por apresentar células em franca divisão celular.

Outro fato importante é que a literatura descreve a placa de crescimento como uma estrutura na qual suas fibras de colágeno não apresentam uma orientação definida [9,16,17], porém em nosso estudo observamos através das imagens de AFM que os feixes de colágenos formam uma estrutura de frequência relativamente constante em forma de colméia de abelha (CA).

Observa-se através das imagens topográficas da zona de repouso (figura 3) que essa estrutura apresenta alteração nos grupos tratados com laser de baixa intensidade, quando comparados ao GC.

Figura 3 - Imagens topográficas da zona de repouso.



A imagem 3A representa a topografia da zona de repouso do GC, no qual observam-se feixes de colágeno com dimensão homogênea mantendo um padrão de orientação perpendicular ao eixo longitudinal da tíbia.

Como demonstrando na análise da espessura dos feixes, o G5J (figura 3B) os feixes de colágeno são espessos que os do GC e formam estruturas mais circulares com o eixo longitudinal e transversal, sendo que no G60J – figura 3C – a estrutura geral da amostra há um predomínio da orientação dos feixes mais espessos no sentido longitudinal. As estruturas em forma de CA são maiores e apresentam distribuição regular.

O efeito sistêmico do laser parece gerar uma desorganização dos feixes de colágenos, principalmente no G5JS – figura 3D – no qual as estruturas em CA são de tamanhos diferentes e feixes de colágeno sem eixos de orientação definidos, mas o aumento da dose parece ter provocado no G60JS – figura 3E – uma estrutura relativamente mais homogênea que o G5JS, mas ainda com estruturas em CA de dimensões diferentes e sem orientação definida, porém com feixes de colágeno com espessura relativamente constante.

No entanto, mesmo diante das alterações observadas nesse trabalho, não é possível prever se o crescimento do osso poderia ser modulado por ação do laser de baixa intensidade, mas implica sim em uma condição de precaução na aplicação desta modalidade terapêutica

Dessa forma, é muito importante que estudos subsequentes abordem este tema, pois se comprovado por estudos subsequentes que a terapia laser possa estimular o crescimento ósseo, uma importante terapia pode vir a ser uma nova solução para o tratamento de traumas ou doenças que afetam a placa de crescimento ósseo.

Conclusão

O laser de baixa intensidade pode provocar alterações estruturais (dimensão, organização e orientação) nos feixes de colágeno. Os resultados não são suficientes para afirmar que o crescimento ósseo possa ser afetado pela irradiação laser.

Referências

1. Mester E, Mester AF, Mester A. The biomedical effects of laser application. *Lasers Surg Med* 1985;5:31-9.
2. Luger EJ, Rochkind S, Wollman Y, Galina K, Dekel S. Effect of low-power laser irradiation on the mechanical properties of bone fracture healing in rats. *Lasers Surg Med* 1998;22:97-102.
3. Low L, Reed A. Eletroterapia explicada: Princípios e prática. 3ª ed. Barueri-SP: Manole; 2001.
4. Baxter GD. Therapeutic laser. USA: Churchill Livingstone; 1997.
5. Saito S, Shimizu N. Stimulatory effects of low-power laser irradiation on bone regeneration in midpalatal suture during expansion in the rat. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1997;111:525-32.
6. Kawasaki K, Shimizu N. Effects of low-energy laser irradiation on bone remodeling during experimental tooth movement in rats. *Lasers Surg Med* 2000;26:282-91.
7. Freitas IGF, Baranauskas V, Cruz-Höfling MA. Lasers effects on osteogenesis. *Applied Surface Science* 2000;154-155:548-54.
8. Trelles MA, Mayago E. Bone fracture consolidates faster with low-power laser. *Lasers Surg Med* 1987;7:36-45.
9. Iannotti JP. Growth plate physiology and pathology. *Clin Orthop* 1990;21:1-17.
10. Beckerman H, De Bie R, Bouter L, De Cuyper H, Oostendorp R. The efficacy of laser therapy for musculoskeletal and skin disorders: A criteria-based meta-analysis of randomized clinical trials. *Phys Ther* 1992;72:483-91.
11. De Bie RA, De Vet H, Lenssen TF, Wildenberg F, Kootstra G. Low-level laser therapy in ankle sprains: a randomized clinical trial. *Arch Phys Med Rehabil* 1998;79:1415-20.
12. Ohshiro T. Low reactive-level laser therapy practical application. Chichester: John Wiley & Sons; 1991. p.3-10.
13. Kitchen SS, Bazin S. Eletroterapia de Clayton. São Paulo: Manole; 1998. p.191-210.
14. Karu TI. The science of low-power laser therapy. Amsterdam: Copyright; 1998.
15. Roith DL, Scavo L, Butler A. What is the role of circulating IGF-I? *Trends Endocrinol Metab* 2001;12(2):48-52.
16. Brighton CT. Morphology and biochemistry of the growth plate. *Rheum Dis Clin North Am* 1987;13:75-100.
17. Brighton CT. Structure and function of the growth plate. *Clin Orthop* 1978;136:22-32.