

CÉLBER RENÊ LIMONGE DE OLIVEIRA

**TERAPIA LASER DE BAIXA POTÊNCIA ($\lambda = 904\text{nm}$) ASSOCIADA AO
SULFATO DE CONDROITINA E QUITOSANA NA REPARAÇÃO DE DEFEITO
OSTEOCONDRAI EXPERIMENTAL DA CABEÇA DO ÚMERO DE CÃES.
ESTUDO HISTOPATOLÓGICO.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2006

CÉLBER RENÊ LIMONGE DE OLIVEIRA

**TERAPIA LASER DE BAIXA POTÊNCIA ($\lambda = 904\text{nm}$) ASSOCIADA AO SULFATO
DE CONDROITINA E QUITOSANA NA REPARAÇÃO DE DEFEITO
OSTEOCONDRAI EXPERIMENTAL DA CABEÇA DO ÚMERO DE CÃES.
ESTUDO HISTOPATOLÓGICO.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

APROVADA: 11 de abril de 2006

Prof^a. Marlene Isabel Vargas Vilória
(Conselheira)

Prof. Luiz Gonzaga Pompermayer
(Conselheiro)

Prof. João Carlos Pereira da Silva

Prof. Antônio José Natali

Prof. Ricardo Junqueira Del Carlo
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Osvaldo e Mary, por sempre acreditarem em meus sonhos e no meu amor.

Aos meus irmãos, Cádio, César e Cadinha, e sobrinhos, Thiago, Felipe, Daniel, Arthur e Thalís, por compartilharem as minhas derrotas e vitórias.

À minha esposa, Cristina, pelo apoio, incentivo, paciência, dedicação e por me oferecer a oportunidade de construir uma família do “tamanho dos meus sonhos”.

Ao Prof. Ricardo pela oportunidade de me tornar melhor.

À Prof. Marlene pela colaboração constante.

Ao Sr. Sílvio e ao “Ponte Nova” (*in memorium*) pela dedicação.

Aos colegas do mestrado pelas amizades que fiz.

Ao Departamento de Veterinária, bem como, à Universidade Federal de Viçosa por possibilitar esta conquista.

Enfim, a Deus pela esperança de uma vida melhor.

CONTEÚDO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	iv
RESUMO	v
ABSTRACT.....	vi
INTRODUÇÃO.....	1
MATERIAL E MÉTODOS.....	4
RESULTADOS E DISSCUSSÃO.....	6
CONCLUSÕES.....	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Região do defeito osteocondral em animal do subgrupo controle	7
Figura 2	Região do defeito osteocondral aos sete e 21 dias de pós-operatório	8
Figura 3	Região do defeito osteocondral em animal do subgrupo controle aos 35 dias	11
Figura 4	Aspecto microscópico do tecido conjuntivo fibroso sobre a falha osteocondral aos 60 dias	14
Figura 5	Região do defeito osteocondral em um animal do subgrupo tratado aos 35 dias	16

RESUMO

OLIVEIRA, Célber Renê Limonge de, M.S. Universidade Federal de Viçosa, abril de 2006. **Terapia laser de baixa potência ($\lambda = 904\text{nm}$) associada ao sulfato de condroitina e quitosana na reparação de defeito osteocondral experimental da cabeça do úmero de cães. Estudo histopatológico.** Orientador: Ricardo Junqueira Del Carlo. Conselheiros: Luiz Gonzaga Pompermayer e Marlene Isabel Vargas Vilória.

O objetivo deste estudo foi avaliar, microscopicamente, a influência do laser a diodo de Arsenieto de Gálio (As-Ga) associado ao sulfato de condroitina e quitosana no processo de reparação da superfície articular da cabeça umeral de cães após defeito osteocondral experimental. Foram utilizados 16 cães adultos, distribuídos aleatoriamente em quatro subgrupos de quatro animais. Em todos os animais foi induzido um defeito cirúrgico na articulação escápulo-umeral esquerda sendo, posteriormente, submetido à aplicação de laser As-Ga ($\lambda = 904\text{nm}$) e administração oral de sulfato de condroitina e quitosana. Para realizar as análises microscópica do defeito cirúrgico, os animais de cada subgrupo (T1, T2, T3 e T4) foram eutanasiados aos sete, 21, 35 e 60 dias após a cirurgia, respectivamente. Foi evidenciado aumento da vascularização da área de reparação, potencialização da reparação e da osteogênese local, aumento da atividade de síntese e manutenção da matriz cartilaginosa e reparação do defeito por tecido fibrocartilaginosa. Os resultados foram atribuídos aos efeitos fisioterapêuticos do laser associado ao sulfato de condroitina e quitosana administrado via oral.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Célber Renê Limonge de, M.S. Universidade Federal de Viçosa, April of 2006. **Low laser therapy (l = 904nm) associated with chondroitin sulfate and chitosan on the articular reparation after osteochondral experimental defect on dogs humeral head. Histopathological study.** Adviser: Ricardo Junqueira Del Carlo. Committee Members: Luiz Gonzaga Pompermayer and Marlene Isabel Vargas Vilória.

This work was developed in order to evaluate microscopically the influence of gallium arsenate (Ga-As) diode laser associated with chondroitin sulfate and chitosan on the healing process of the articular surface of the humeral head of dogs following experimental osteochondroplasty. Sixteen adult dogs were randomly allocated into four groups of four animals. All animals had the left humeral head injured by a surgical procedure (osteochondroplasty) and those from the TG were submitted to Ga-As diode laser sessions and received orally chondroitin sulfate and chitosan. In order to analyze microscopically the surgical injury the animals of the subgroups (C1, C2, C3, C4, T1, T2, T3 and T4) were killed on the 7th, 21st, 35th and 60th days after the surgery, respectively. The histological assessment revealed an increased vascularization, repairing potential and local osteogenesis, increase of the activity synthesis and keeping the cartilage matrix and better healing of the defect with fibrocartilage tissue of TG compared to those from CG, such findings were attributed to the physiotherapeutic effects of the Ga-As diode laser and chondroitin sulfate and chitosan.

INTRODUÇÃO

Os principais constituintes da articulação sinovial são a cartilagem e a cápsula articular, com ligamentos associados, a membrana (sinóvia) e o líquido sinovial (HETTINGA, 1993).

A superfície de suporte de cargas da articulação sinovial é coberta por delgado revestimento de tecido conjuntivo especializado chamado de cartilagem hialina que facilita o deslizamento e absorve choques (BLOOM & FAWCETT, 1977; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995; KESSEL, 2001).

Ao contrário de outros tecidos conjuntivos, a cartilagem normal é desprovida de vasos sanguíneos, canais linfáticos e nervos. A nutrição do tecido deriva, grandemente, do líquido sinovial que irriga sua superfície e, em menor escala, da difusão de substratos sanguíneos cursando por meio de vasos situados no osso subcondral (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995; TRIPPEL & MANKIN, 1996).

O tecido cartilaginoso possui células, os condrócitos, alojados em lacunas e rodeados por uma rede elástica tridimensional de fibras de colágeno (principalmente, do tipo II) embebida em meio intersticial composto de polissacarídeos sulfatados (glicosaminoglicanos) associados às proteínas e solução aquosa de eletrólitos, a matriz extracelular (HETTINGA, 1993; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995).

Os condrócitos são células secretoras de colágeno, proteoglicanos (glicosaminoglicanos associados a proteínas) e possuem capacidade de auto-reprodução, favorecendo a renovação constante da matriz. Porém, devido a sua irrigação limitada, a cartilagem está sujeita à degeneração (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995; TRIPPEL & MANKIN, 1996).

Morfologicamente, há um padrão zonal baseado na organização dos condrócitos (zona superficial, de transição, profunda e de cartilagem calcificada), na orientação das fibras de colágeno e na distribuição de proteoglicanos, formando um material resistente às forças de compressão e tração e capaz de transmiti-las ao osso subcondral (RANDIN & ROSE, 1986; HETTINGA, 1993; TRIPPEL & MANKIN, 1996).

A matriz extracelular da cartilagem hialina é formada por fibras de colágeno, responsável por 40% do seu peso seco, assim como, por proteoglicanos. Cada molécula de proteoglicano constitui agregados de quatro subtipos moleculares distintos: o núcleo central que é um filamento longo e delgado de ácido hialurônico, a proteína linear, os glicosaminoglicanos (GAG) que são de três diferentes espécies: condroitina-6-sulfato,

condroitina-4-sulfato e sulfato de queratano, e pela proteína de ligação que fixa ou liga as subunidades de proteoglicanos ao ácido hialurônico (TRIPPEL & MANKIN, 1996).

Os proteoglicanos ligam-se quimicamente ao colágeno e esta associação é responsável pela resistência da cartilagem as pressões, que dependem principalmente de dois fatores: a interação do colágeno com os proteoglicanos, através das ligações entre os grupos sulfato dos glicosaminoglicanos e grupos básicos do colágeno, e a turgescência da matriz cartilaginosa, devido a intensa hidrofília dos glicosaminoglicanos. O alto teor de água de solvatação ligada aos grupamentos negativos dos glicosaminoglicanos atua como mola biomecânica absorvendo choques, de grande importância funcional, principalmente, nas cartilagens articulares (WHITING & ZERNICK, 2001; CHAMPE & HARVEY, 2002).

As lesões superficiais da cartilagem articular, que não envolvem o osso subcondral, possuem pouca capacidade intrínseca de reparação, por se tratar de um tecido desprovido de irrigação sanguínea e, portanto, dependente da vascularização proveniente da medula óssea para que ocorra migração de células mesenquimais responsáveis pelo processo de cicatrização (GHADIALLY et al., 1977; CHEUNG et al., 1980; SILVER & GLASGOLD, 1995; LAMMI et al., 2001).

Segundo Trippel & Mankin (1996), na lesão profunda, a dificuldade não se situa na reparação que é, ordinariamente, exuberante e rápida, mas na natureza do material que irá preencher a lesão. Embora o tecido tenda a se tornar cartilaginoso, ele permanecerá com características fibrosas. Wakitani et al. (1994) ressaltaram que o tecido de reparação, até mesmo quando histologicamente semelhante à cartilagem hialina, difere da cartilagem articular normal, bioquímica e biomecanicamente e, segundo Souza et al. (2001), freqüentemente, a longo prazo, são observadas extensas alterações degenerativas, iniciando-se com fibrilação superficial da cartilagem de reparação e posterior formação de fissuras, ocorrendo ainda diminuição na celularidade e perda da afinidade tintorial pela Safranina O.

Schultz et al. (1985) demonstraram que no início da reparação de defeitos profundos da cartilagem, células mesenquimais deram origem a cartilagem do tipo hialino por meio de alta atividade mitótica. Entretanto, após 12 meses, as camadas superficiais assumiram aspecto de fibrocartilagem.

Os efeitos fisioterapêuticos do laser de baixa potência estão fundamentados na sua ação vasodilatadora pré-capilar e capilar, melhorando a circulação e aumentando a oxigenação, o aporte de nutrientes e a retirada de catabólitos, também promovem

modificações na pressão hidrostática, favorecendo a reabsorção de edemas e atuam positivamente sobre a regeneração tecidual pela elevação do metabolismo (BASKO, 1983; HILÁRIO, 1988).

Rodrigues et al. (2006), induziram uma lesão osteocondral experimental na cabeça umeral de cães, que posteriormente foi submetida à laserterapia de baixa potência. O laser apresentou efeito analgésico logo após sua aplicação, melhorou a deambulação dos cães após 21 dias e histologicamente, foi verificado que aumentou a vascularização na região do defeito osteocondral, potencializando a osteogênese e a reparação, que se deu com tecido fibrocartilaginoso.

Em outros estudos, também foram observadas a diminuição da inflamação e formação de tecido de reparação que assumiu aparência de cartilagem hialina nos membros tratados com laser de arsenieto de gálio (As-Ga) (CALATRAVA et al., 1997; ORTIZ, 2001), bem como, o aumento da produção de glicosaminoglicanos pelos condrócitos da cartilagem remanescente que foram irradiados pela proximidade à lesão (CALATRAVA et al., 1997).

Evidências, na medicina humana e veterinária, apresentam os condroprotetores como drogas efetivas na redução dos sintomas de doença articular degenerativa a longo prazo (MELO, 2001; HUNGEFORD & JONES, 2003), além de melhorar a função articular (HANSON, 1996; MELO et al., 2000).

A quitosana, um componente estrutural do exoesqueleto de insetos e crustáceos, vem sendo utilizada como veículo carreador de drogas (FELT et al., 1998; LAHIJI et al., 2000). A sua ligação com os glicosaminoglicanos, de forma eletrostática, serve para protegê-los, retardando sua degradação por enzimas específicas, prolongando sua liberação e aumentando a biodisponibilidade (DENUZIERE et al., 2000).

O objetivo deste trabalho foi avaliar, por meio de estudo histopatológico, os efeitos do laser arsenieto de gálio (As-Ga) associado à administração oral do sulfato de condroitina e quitosana na reparação da cartilagem da cabeça umeral de cães após lesão osteocondral experimental.

Trata-se da continuidade do projeto de pesquisa cuja primeira etapa foi iniciada e concluída por Rodrigues et al. (2006).

Nesta dissertação estão sendo adotadas as normas para publicação do Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, indexado nas bases de

dados: Agris, Biosis, CAB, CAS, Medlars, Lilacs, ISI, Referatvnyi Zhurnal e Bibliografia Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, ISSN 0102-0935.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 16 cães adultos, machos e fêmeas, clinicamente sadios, sem raça definida, pesando entre 15 e 25 kg, provenientes do canil experimental. O protocolo experimental foi aprovado pelo comitê de ética na pesquisa do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa.

Como grupo controle (GC) foram utilizados os 16 animais que constituíram o grupo controle do experimento de Rodrigues (2006). Estes cães foram separados em quatro subgrupos de quatro animais (C1, C2, C3 e C4) e submetidos somente ao procedimento cirúrgico, ou seja não foram submetidos a qualquer tratamento.

Após procedimentos rotineiros pré-operatórios e de anestesia geral, a articulação escápulo-umeral esquerda de todos os cães foi abordada, conforme estabelecido por Piermattei (1993). A incisão da cápsula articular, foi realizada após rotação medial e extensão do membro, permitindo a exposição da porção caudal da cabeça do úmero. Com auxílio de um *punch* de biopsia circular de seis milímetros de diâmetro, foi delimitada uma área na cartilagem articular. O tecido cartilaginoso circunscrito foi removido por meio de uma broca conectada a perfuratriz elétrica, na velocidade de 2000 rpm, sob irrigação contínua com solução Ringer-lactato. A profundidade do defeito criado foi a espessura completa da cartilagem articular, até penetrar no osso subcondral, evidenciando sangramento. As bordas da lesão foram mantidas perpendiculares em relação à superfície articular e a articulação lavada com solução de Ringer-lactato para remoção de pequenos fragmentos cartilaginosos. Em seguida, a cápsula articular e os planos cirúrgicos foram suturados.

Os animais foram medicados com enrofloxacina¹ (10 mg/kg/SC a cada 24 horas), imediatamente antes e durante cinco dias após a cirurgia, e cetoprofeno² (1,1 mg/kg/SC a cada 24 horas) por três dias, após a cirurgia. Nas primeiras 24 horas após a intervenção cirúrgica a articulação operada foi imobilizada por uma bandagem de Velveau (PIERMATTEI & FLO, 1999) e os animais mantidos em baias individuais.

¹ Duotril 10% - Duprat - Rio de Janeiro - RJ

² Profenid Injetável - Aventis - São Paulo - SP

Após este período, os cães foram transferidos para canis coletivos (quatro cães/canil), recebendo ração comercial³ e água à vontade.

Os 16 cães do grupo tratado também foram separados em quatro subgrupos de quatro animais (T1, T2, T3 e T4) e além do procedimento, receberam, via oral, sulfato de condroitina e quitosana⁴ na dosagem de 227,27 mg (dose recomendada pelo laboratório para cães com peso entre 15 e 25 kg) diariamente, iniciando-se no primeiro dia de pós-operatório até atingir o período de observação determinado para cada subgrupo experimental, associado à aplicação local de laser.

A aplicação de laser foi iniciada no primeiro dia de pós-operatório e as seguintes sempre com intervalo de 48 horas, até atingir sete, 21, 35 e 60 dias, de acordo com o subgrupo experimental, constituindo quatro, onze, 18 e 30 sessões, respectivamente.

As aplicações de laser As-Ga foram realizadas com um aparelho⁵ de 45 mW de potência máxima e comprimento de onda de 904 nm, na dose de quatro J/cm² por ponto. O animal foi colocado em decúbito lateral direito e, após a identificação de um ponto cranial, um caudal e outro ventral em relação ao acrômio esquerdo, a irradiação em cada animal foi realizada com a extremidade da caneta do laser, em contato com a pele, posicionada de modo a incidir perpendicularmente ao defeito.

Quando foi atingindo o tempo de avaliação previsto para cada subgrupo (sete, 21, 35 e 60 dias), os animais foram sacrificados, com sobredose de tiopental sódico, permitindo a dissecação da articulação escápulo-umeral operada.

Para avaliação sob microscopia de luz, foi colhido, em todos os animais, um fragmento envolvendo a área do defeito criado, que foi fixado em solução de formalina a 10% tamponada, por aproximadamente 48 horas. A seguir, descalcificado em solução de ácido fórmico a 10%, tamponado com citrato de sódio, com pH 4,5, sob vácuo moderado. Após descalcificação, o fragmento foi desidratado em concentrações crescentes de álcool etílico, incluído em parafina, seccionado a seis µm de espessura e corado por Safranina O e Tricrômico de Gomori.

O defeito foi avaliado microscopicamente quanto às características do tecido de reparação (organização, tipos celulares, presença de vascularização), a integração do tecido de reparação ao tecido ósseo e cartilaginoso adjacente e as alterações na cartilagem remanescente.

³ Kanina - Purina S/A - São Paulo - SP

⁴ Fortiflex - Virbac - São Paulo - SP

⁵ Laser Infra-Red 904 - KLD, Biosistemas Equipamentos Eletrônicos Ltda - Amparo - SP

Os achados histológicos foram submetidos à análise descritiva.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação microscópica, aos sete dias, os animais do subgrupo C1 apresentavam coágulo preenchendo a falha, característico da fase inflamatória do processo de reparação. Apenas em um animal foram evidentes pequenas áreas preenchidas por tecido de granulação. Ainda, em três animais, notavam-se fissuras na cartilagem articular próxima à falha (Figura 1), bem como, pequenos fragmentos ósseos dentro da falha sendo reabsorvidos. Entretanto, nos animais do T1, também foi evidenciado coágulo preenchendo a falha mas, menos exuberante, constatando-se a presença de tecido de granulação no fundo da lesão e nas laterais próximas à cartilagem articular. Além disto, neste subgrupo foi observada formação de novo osso trabecular no fundo da falha (Figura 2), da mesma forma como foi observado Rodrigues et al. (2006). Biomecanicamente, trata-se de achado relevante, pois esse osso subcondral é responsável pela manutenção do tecido de reparação no local da falha, quando submetido às forças atuantes no movimento articular, e serve de leito para deposição do tecido de reparação, conforme relatado por Souza et al. (2001).

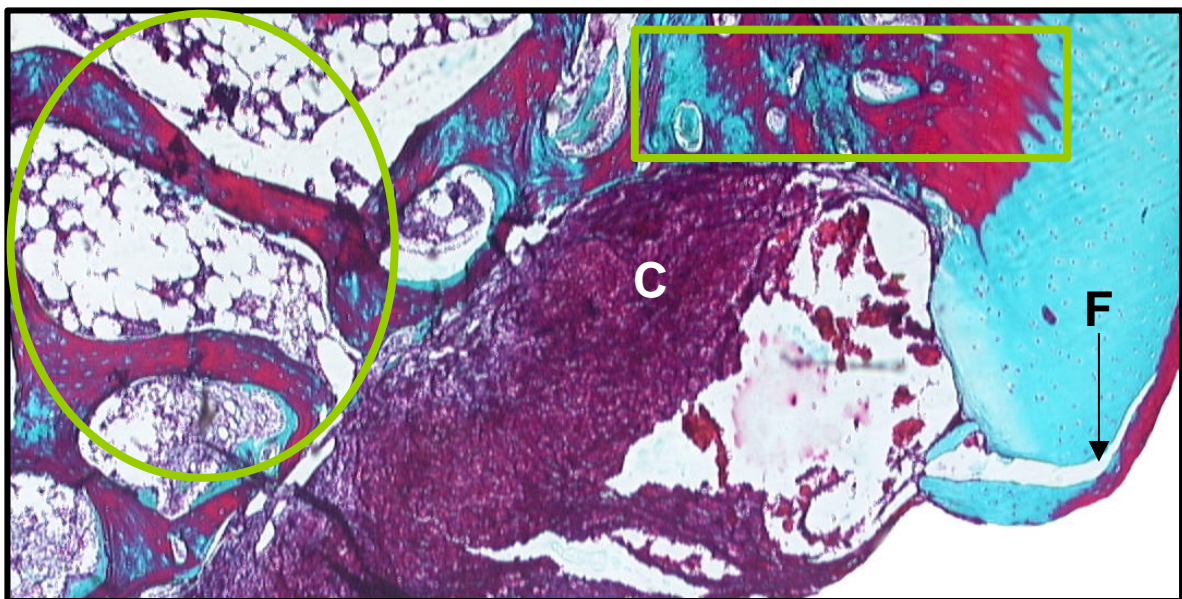


Figura 1 – Região do defeito osteocondral em um animal do subgrupo C1. Osso subcondral (elipse), interface osso subcondral/tecido cartilaginoso nas bordas do defeito (retângulo), coágulo sanguíneo na região da falha (C) e fissura na cartilagem hialina remanescente (seta F). Tricrômico de Gomori. 40X.

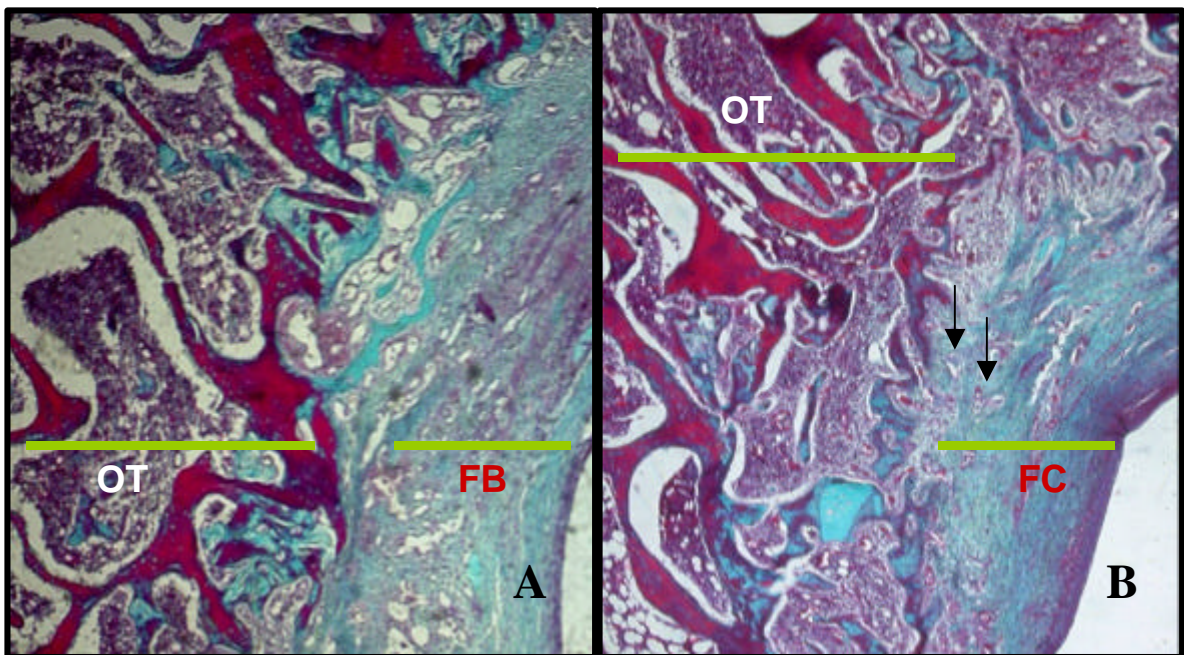


Figura 2 – Região do defeito, aos sete(A) e 21 dias (B) de pós-operatório. **A:** Animal do subgrupo T1. Osso subcondral trabecular no fundo da falha (OT) servindo de suporte para tecido de reparação diferenciado (FB). **B:** Animal do subgrupo T2. Osso trabecular no fundo da falha (OT) , tecido fibrocartilaginoso (FC), presença de vasos sanguíneos (setas).Tricrômico de Gomori. 40X.

Aos 21 dias, em todos os animais do subgrupo C2 foi observado tecido de granulação preenchendo a falha. Porém, diferente do encontrado nos animais do subgrupo T2, pois além da maior vascularização e menor quantidade de tecido conjuntivo frouxo, estavam presentes numerosas células com características semelhantes a fibroblastos. Em ambos os subgrupos houve formação de novo osso trabecular que se originava do osso subcondral, com maior quantidade de trabéculas em T2. Estas observações também foram feitas por Rodrigues et al. (2006) e creditadas ao efeito vasodilatador pré-capilar e capilar do laser, melhorando a circulação e aumentando a oxigenação, o aporte de nutrientes e a retirada de catabólitos. Nos animais do C2, ainda restavam pequenos fragmentos ósseos sendo reabsorvidos. Em ambos os subgrupos foi evidente a penetração da cartilagem articular, próxima à falha, por túneis vasculares oriundos do osso subcondral. Estes túneis vasculares penetrando o osso subcondral favorecem a nutrição do tecido cartilaginoso por meio da difusão de substratos sanguíneos, segundo Bloom & Fawcett, 1977. Além disso, a reparação de lesões cartilaginosas são dependentes da vascularização proveniente da medula óssea para que ocorra migração de células mesenquimais, responsáveis pelo processo de cicatrização (GHADIALLY et al., 1977; CHEUNG et al., 1980; FURUKAWA et al., 1980; RADIN & BURR, 1984; SILVER & GLASGOLD, 1995; LAMMI et al., 2001).

As diferenças observadas entre C2 e T2 também podem ser imputadas aos pequenos fragmentos ósseos que ainda estavam presentes no subgrupo controle. Sua presença pode ter atrasado a reparação, uma vez que, segundo Hettinga (1993), para que ela possa ocorrer, há necessidade de reabsorção e/ou fagocitose de todo tecido necrosado ou corpos estranhos. Ainda, a menor vascularização e diferenciação do tecido de granulação que foram observadas no subgrupo controle em relação ao tratado pode ter influenciado negativamente.

Aos 35 dias, foi evidenciada maior formação de osso trabecular no fundo da falha e menor presença de tecido de granulação na área do defeito, no subgrupo tratado (T3) em relação ao controle (C3). Estas características histológicas de reparação em T3 foram semelhantes às encontradas no grupo tratado com laserterapia no modelo experimental usado por Rodrigues et al. (2006). E, como se restringem a proliferação óssea, podem ser creditadas ao efeito vasodilatador da laserterapia e, conseqüente, maior nutrição local.

Também, nesta época, nos animais de C3 foram identificados fragmentos ósseos no interior do defeito, envolvidos por tecido conjuntivo (Figura 3). Provavelmente, numa tentativa do organismo de isolar estes fragmentos não reabsorvidos.

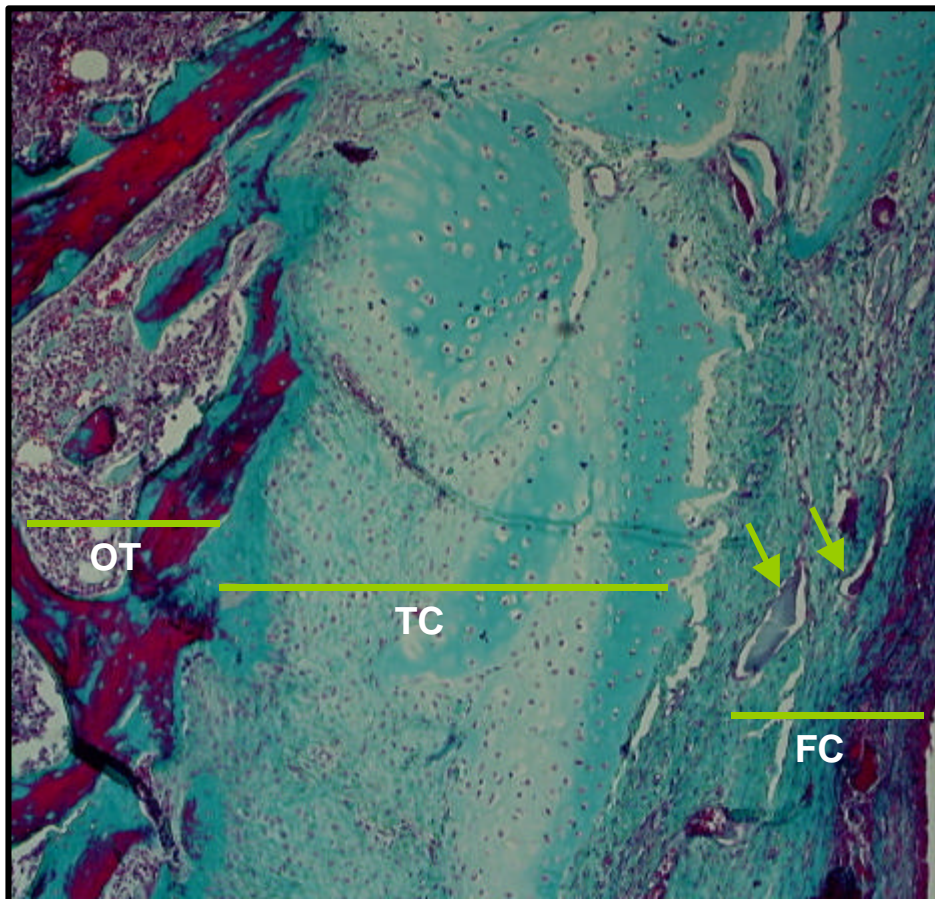


Figura 3 – Região do defeito osteocondral em animal do subgrupo C3. Osso trabecular subcondral (OT). Tecido cartilaginoso (TC) e fibrocartilaginoso de reparação (FC). Fragmentos ósseos envolvidos por tecido fibroso (setas). Tricrômico de Gomori. 100X.

Aos 60 dias, em todos os animais do grupo tratado e em 75% do controle, observou-se o preenchimento completo da falha osteocondral até o nível da superfície articular por tecido fibrocartilaginoso, que foi mantido em contato com a cartilagem remanescente por meio de uma faixa de tecido conjuntivo fibroso, com formação de osso trabecular no fundo da falha. Estes resultados estão de acordo com os que foram descritos por Kettunen (1963), Cambell (1969), Shapiro et al. (1993), Souza et al. (2001) e Rodrigues et al. (2006).

Considerando-se a biomecânica articular e o impacto de compressões, a reparação óssea encontrada no fundo da falha favorece a integridade da cartilagem articular quando as forças a que é submetida suplantam sua capacidade de atuação. Deve ser considerado ainda que o tecido fibrocartilaginoso de reparação não possui as mesmas características atribuídas à presença dos proteoglicanos que são altamente viscosos e intensamente hidrofílicos e, juntamente, com as propriedades coloidais extracelulares da matriz são importantes para a rigidez e elasticidade da cartilagem (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995).

A reparação das falhas osteocondrais criadas neste experimento, se deu a partir da diferenciação das células mesenquimais provenientes da medula óssea pelostúneis vasculares. Contudo, a rápida transformação desse tecido pouco diferenciado em tecido ósseo pode estar relacionada à abundante vascularização observada nos animais do GT. Estes resultados estão de acordo com as observações de vários autores (HANIE et al., 1992; SHAPIRO et al., 1993; SOUZA et al., 2001; RODRIGUES et al., 2006) segundo os quais, lesões nas superfícies articulares que incluem toda cartilagem hialina, penetrando também no osso subcondral, são reparadas a partir de células mesenquimais provenientes da medula óssea.

A osteogênese, responsável pela reposição do osso subcondral excisado, ocorreu predominantemente por ossificação endocondral, caracterizada pela invasão do tecido de reparação por vasos sanguíneos, provenientes do fundo e das laterais das falhas, e, conseqüentemente, transformação da matriz cartilaginosa em matriz óssea, bem como, pela formação intramembranosa de osteóide.

Deve-se ressaltar que em nenhum dos grupos foi observada formação de tecido cartilaginoso sobre a falha e, também, durante todo o período de observação notava-se uma faixa de tecido conjuntivo fibroso sobre a falha o qual se encontrava mais delgada nos animais do subgrupo T4 (Figura 4). Depreende-se, destas informações, que o defeito foi coberto inicialmente por tecido conjuntivo frouxo bem vascularizado, altamente celular, que posteriormente se organizou em tecido conjuntivo fibroso denso, semelhante à fibrocartilagem.

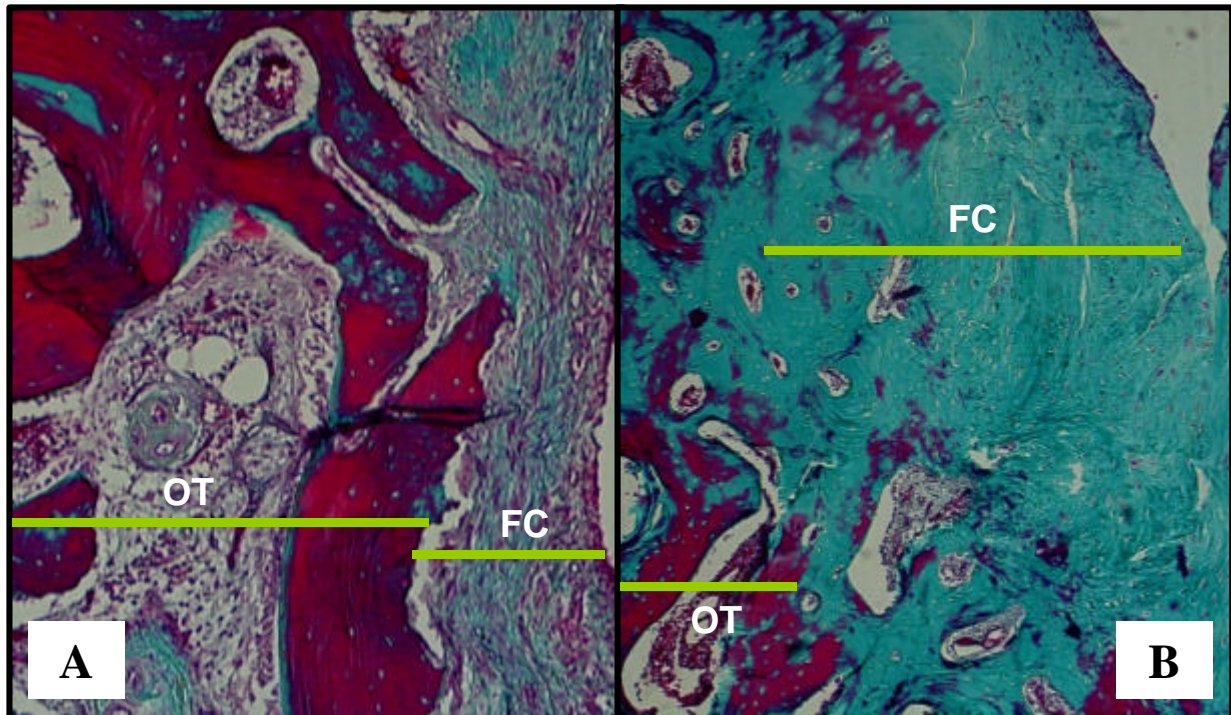


Figura 4 - Aspecto microscópico do tecido conjuntivo fibroso sobre a falha osteocondral aos 60 dias. **A**: animal do subgrupo C4. Osso trabecular subcondral (OT), tecido conjuntivo fibrocartilaginoso (FC) sobre o defeito. Tricrômico de Gomori. 40x **B**: animal do subgrupo T4. Osso trabecular subcondral (OT), tecido fibrocartilaginoso (FC) sobre o defeito. Tricrômico de Gomori. 100X.

Com o decorrer do período de observação, evidenciou-se no tecido cartilaginoso remanescente, tanto nos subgrupos controle quanto no tratado, o aumento gradual da afinidade pela safranina O. Entretanto, nos animais tratados com o laser e o sulfato de condroitina associado à quitosana, a afinidade formada pela ligação do corante com as moléculas de proteoglicanos foi mais evidente que no grupo controle.

Em sete animais, de ambos os grupos, houve perda de afinidade pela safranina O na cartilagem articular próxima à lesão osteocondral. Provavelmente, por sobrecarga mecânica incidindo nestas regiões.

Em 50% dos animais de T3 e T4 foram observados focos de afinidade pela safranina O no tecido de reparação localizado sobre a área da lesão (Figura 5). Infere-se que o sulfato de condroitina associado à quitosana induziu alterações no metabolismo celular, determinando aumento da atividade de síntese de proteoglicanos pelas células presentes no tecido remanescente, assim como observou Gonçalves (2004). Também, acredita-se, que o aumento da vascularização local proporcionado pela laserterapia, favoreceu a disponibilidade do medicamento para o tecido de reparação.

Pode-se inferir que a reparação do defeito osteocondral, criado neste modelo experimental, aconteceu inicialmente a partir do coágulo de fibrina que preencheu o defeito, e de células mesenquimais indiferenciadas originadas na região da medula óssea. Este tecido, subsequentemente, transformou-se em tecido fibrocartilaginoso, com pequeno grupo de células com fenótipo condrocítico. A laserterapia local, favoreceu a proliferação vascular, de forma mais evidente na região óssea trabecular subcondral, contribuindo para a nutrição e aporte celular na região do defeito.

O grupo que recebeu o sulfato de condroitina, apresentou, tanto na área de reparação quanto na cartilagem remanescente, numerosos focos de coloração pela safranina O e de maneira mais intensa do que o observado no experimento de Rodrigues (2004), podendo-se inferir que o medicamento atuou de maneira benéfica na síntese e manutenção da matriz cartilaginosa.

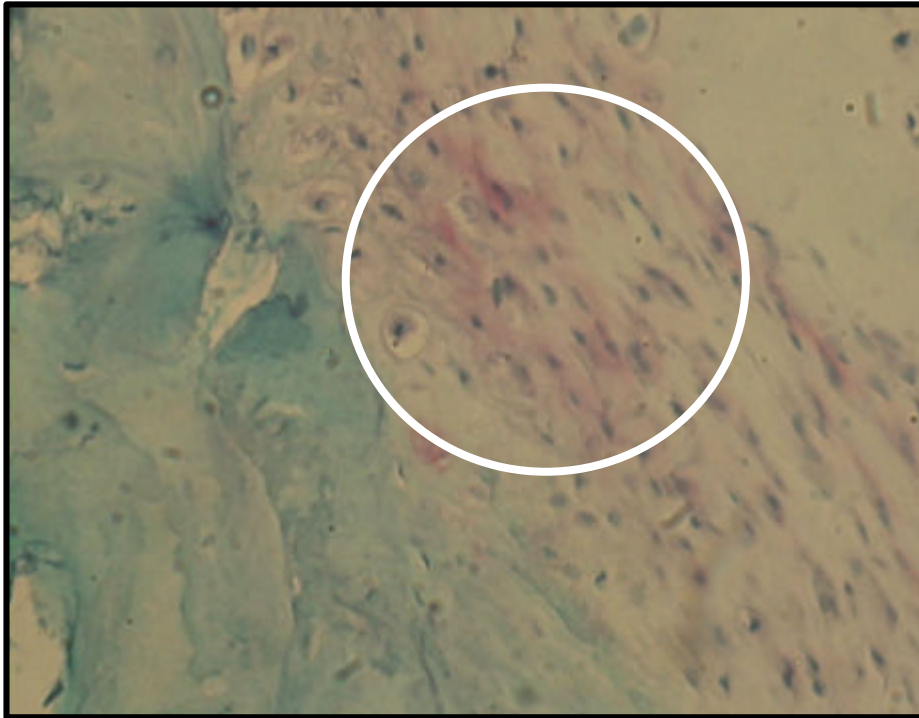


Figura 5 - Região do defeito osteocondral em um animal do subgrupo T3. Área do defeito subcondral com presença de focos de afinidade pela Safranina O (círculo), localizados no fundo do defeito. Safranina O. 200X.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados histopatológicos, após o uso do laser a diodo de As-Ga associado ao sulfato de condroitina e quitosana durante a reparação da cartilagem da cabeça do úmero de cães com lesão osteocondral experimental, conclui-se que houve aumento da vascularização na região do defeito osteocondral, potencializando a osteogênese e a reparação; houve aumento da atividade de síntese e manutenção da matriz cartilaginosa e, que a reparação se deu por tecido fibrocartilaginoso, com pequeno grupo de células com fenótipo condrocítico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BASKO, I.J. A new frontier: laser therapy. **Californian Veterinarian**. v.1, n.10, p.17-18, 1983.

BLOOM, W.; FAWCETT, D.W. **Tratado de Histologia**. Rio de Janeiro: Interamericana, 1977. p.213-222.

CALATRAVA, I.R.; VALENZUELA, S.; GÓMEZ-VILLAMANDOS, R.J.; REDONDO, J.I., GÓMEZ-VILLAMANDOS, J.C.; JURADO, I.A. Histological and clinical responses of articular cartilage to low-level laser therapy: experimental study. **Laser in Medical Science**. v.12, n.1, p.117-121, 1997.

CAMBELL, C.J. The healing of cartilage defects. **Clinical Orthopaedics and Related Research**. n.64, p.45-63, 1969.

CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A. **Bioquímica Ilustrada**. 2 ed. São Paulo: Artmed, 2002. p.446.

CHEUNG, H.S.; LYNCH, K., L.; JOHNSON, R.P.; BREWER, B.J. In vitro synthesis of the tissue-specific type II collagen by healing cartilage. **Arthritis and Rheumatism**. v.23, n.2, p.211-219, 1980.

DENUZIERE, A.; FERRIER, D.; DOMARD, A. Interactions between chitosan and glycosaminoglycans (chondroitin sulfate and hyaluronic acid): physicochemical and biological studies. **Ann. Pharm.** v.58, n.1, p.47-53, 2000.

FELT, O.; BURI, P.; GURNY, R. Chitosan: a unique polysaccharide for drug delivery. **Drug development and Industrial Pharmacy**. v.24, n.11, p.979-993, 1998.

FURUKAWA, T.; EYRE, D.R.; KOIDE, S.; GLIMCHER, M.J. Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbits knee. **Journal of Bone and Joint Surgery**. v.62, n.1, p.79-89, 1980.

GHADIALLY, F.N.; THOMAS, I.; OSYSCHAK, A.F.; LALONDE, J. M. Long-term results of superficial defects in articular cartilage: a scanning electron microscopic study. **Journal of Pathology**. v.121, n.1, p.213-217, 1977.

GONÇALVES, G. **Sulfato de condroitina e hialuronato de sódio na cartilagem articular com doença articular degenerativa em cães (Canis familiaris): efeitos na matriz extracelular e nos condrócitos**. Belo Horizonte, MG: Escola de Veterinária da UFMG, 2004. 53p. (Tese de Mestrado).

HANIE, E.A., SULLINS, K.E., POWERS, B.E., NELSON, P.R. Healing of full-thickness cartilage compared with full-thickness cartilage and subchondral bone defects in the equine third carpal bone. **Equine Veterinary Journal**. v.24, n.5, p.382-386, 1992.

HANSON, R.R. Oral glycosaminoglycans in treatment of degenerative joint disease in horses. **Equine Practice**. v.18, n.10, p.18-22, 1996.

HETTINGA, D.L. Resposta inflamatória das estruturas sinoviais da articulação. In: GOULD, J.A. **Fisioterapia na Ortopedia e na Medicina do Esporte**, São Paulo: Manole. 2 ed. 1993. p.87-117.

HILÁRIO, M. Softlaser: um novo recurso terapêutico. **Ciência Hoje**. v.7, n.40, p.8, 1988.

HUNGEFORD, D.S.; JONES, L.C. Glucosamine and chondroitin sulfate are effective in the management of osteoarthritis. **Journal of Athroplasty**. v.18, n.3, p.5-9, 2003.

JUNQUEIRA L.C; CARNEIRO J. **Histologia Básica**. 6 ed. São Paulo: Guanabara Koogan. 1995. 512p.

KESSEL, R.G. **Histologia Médica Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p.530.

KETTUNEN, K. Effect of articular function on the repair of a full-thickness defects of the joint cartilage. An experimental study of mature rats. **Annals Chirurgiae and Gynaecology**. v.52, p.627-642, 1963.

LAHIJI, A.; SOHRABI, A.; HUNGERFORD, D.S.; FRONDOZA, C.G. Chitosan supports the expression of extracellular matrix proteins in human osteoblasts and chondrocytes. **Journal of Biomedical Materials Research**. v.51, n.4, p.586-595. 2000.

LAMMI, P.E.; LAMMI, M.J.; TAMMI, R.H.; HELMINEN, H.J.; ESPANHA, M.M. Strong hyaluronam expression in the full-thickness rat articular cartilage repair tissue. **Histochemistry and Cell Biology**. v.115, n.4, p.301-308, 2001.

LIPPIELLO, L. Glucosamine and chondroitin sulfate: biological response modifiers of chondrocytes under simulated conditions of joint stress. **Osteoarthritis and cartilage**. v.11, n.5, p.335-342, 2003.

MELO, E.G.; REZENDE, C.M.F.; GOMES, M.G.; ARIAS, S.A. Condroprotetores no tratamento da doença articular degenerativa (DAD): Avaliação artroscópica da membrana sinovial e da cartilagem. **Ciência Animal Brasileira**. v.1, n.4, p.68, 2000.

MELO, E.G. **Sulfato de condroitina e hialuronato de sódio no tratamento da doença articular degenerativa em cães. Estudo experimental**. Belo Horizonte, MG: Escola de Veterinária da UFMG, 2001. 48p. Tese. (Doutorado em Medicina Veterinária).

ORTIZ, M.C.S. **Efeito do laser de baixa potência sobre o processo inflamatório articular de coelhos**. São Paulo, SP: Departamento de Fisioterapia da UFSCar, 2001. 161p. (Dissertação de mestrado).

PIERMATTEI, D.L. **An atlas of surgical approaches to the bones and joints of the dog and cat**. 3 ed. Philadelphia: W.B. Saunders. 1993. 324p.

PIERMATTEI, D.L.; FLO, G.L. **Manual de Ortopedia e Tratamento das Fraturas dos Pequenos Animais**. 3 ed. São Paulo: Manole, 1999. 694p.

RADIN, E.L.; BURR, D.B. Hypothesis: Joints Can Heal. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**. v.13, n.3, p.293-302, 1984.

RADIN, E.L.; ROSE, R.M. Role of subcondral bone in the initiation and progression of cartilage damage. **Clinical Orthopedics and Related Research**. n.213, p.34-40, 1986.

RODRIGUES, C.B.S.; DEL CARLO, R.J.; OLIVEIRA, C.R.L.; MONTEIRO, B.S.; PINHEIRO, L.C.P.; NATALI, A.J.; SOUZA, T.D. Aspectos clínicos e anatomopatológicos da reparação de defeito osteocondral experimental da cabeça umeral de cães, após aplicação de laser a diodo de arsenieto de gálio (As-Ga). **Revista Fisioterapia Brasil**. v.7, n.2, p.95-98, 2006.

SCHULTZ, R.J.; KRISHNAMURTHY, S.; THELMO, W.; RODRIGUEZ, J.E.; HARVEY, G. Effects of varying intensities of laser energy on articular cartilage: a preliminary study. **Laser in Surgery and Medicine**. v.5, p.577-588, 1985.

SHAPIRO, F.; KOIDE, S.; GLIMCHER, M.J. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. **Journal of Bone and Joint Surgery**. v.75A, n.4, p.532-553, 1993.

SILVER, F.H.; GLASGOLD, A.I. Cartilage wound healing: an overview. **Otolaryngologic Clinics of North América**. v.28, n.5, p.847-864, 1995.

SOUZA, T.D.; DEL CARLO, R.J.; VILORIA, M.I.V. Efeitos da eletroterapia no processo de reparação da superfície articular de coelhos. **Ciência Rural**. v.31, n.5, p.819 - 824, 2001.

TRIPPEL, S.B.; MANKIN, H.J. Consolidação da cartilagem articular. In: BOJRAB, M.J.; SMEAK, D.D.; BLOOMBERG, M.S. **Mecanismos da moléstia na cirurgia dos pequenos animais**. São Paulo: Manole, 1996. p.829-846.

WAKITANI, S.; GOTO, T.; PINEDA, S.J.; YOUNG, R.G.; MANSOUR, J.M.,
CAPLAN, A.I.; GOLDBERG, V.M. Mesenchymal cell-based repair of large, full
thickness defects of articular cartilage. **Journal of Bone and Joint Surgery**. v.76, n.4,
p.579-592, 1994.

WHITING, W.C.; ZERNICKE, R.F. **Biomecânica da Lesão Musculoesquelética**. 2
ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p.251.