



**AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO LASER EM BAIXA
INTENSIDADE NA REGIÃO DA GLÂNDULA
TIREÓIDE DE CAMUNDONGOS**

LUCIANE HIRAMATSU AZEVEDO

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área de Tecnologia
Nuclear - Materiais.**

**Orientadora:
Profa. Dra. Martha Marques Ferreira Vieira**

**São Paulo
2002**



Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO LASER EM BAIXA
INTENSIDADE NA REGIÃO DA GLÂNDULA
TIREÓIDE DE CAMUNDONGOS**



LUCIANE HIRAMATSU AZEVEDO

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área de Tecnologia
Nuclear - Materiais

Orientadora:

Profa. Dra. Martha Marques Ferreira Vieira

São Paulo

2002

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, **Akiko e Gedeão**, pela integridade, imenso amor e por terem me ensinado que na vida tudo se consegue com força de vontade e fé.*

*Ao meu irmão **Allan**, uma pessoa muito especial.*

*Aos meus sogros **Rosa e Fares**, pela contínua ajuda, confiança, arte e alegria no viver.*

*À **Samar, Alexia, Fernando e Fares**, sempre prontos para ajudar, o meu eterno agradecimento.*

*Às tias **Margarida, Niná, Luiza** e ao tio **Joatão**, pelo exemplo de dedicação.*

*Aos meus primos **Patrícia e Marcelo**, por estarem presentes quando precisei.*

*À minha filha **Nicole**, que com seu lindo sorriso, dá-me força e confiança.*

*Ao meu marido **Ivan**, pelo eterno amor, respeito, companheirismo em todos os momentos.*

*A **Deus**, que me deu tanta alegria, a Vida.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, **Profa. Dra. Martha Marques Ferreira Vieira**, pela atenção, dedicação, profissionalismo e amizade.

Ao **Prof. Dr. Carlos de Paula Eduardo**, pelo início no estudo nessa nova área, o LASER.

À **Profa. Dra. Denise Zezell**, por ter transmitido tanto conhecimento e didática.

À **Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro**, pela simpatia e amor à profissão.

Ao **Prof. Dr. Waldyr Antônio Jorge**, pela competência como cirurgião, professor e pelo amor à família.

Ao **Prof. Dr. Jarbas Arruda Bauer**, por despertar em *mim* a Ciência.

Ao **Sandro**, pela grande amizade, estímulo e pelo exemplo de profissionalismo, o meu eterno agradecimento.

À **Nanci e Helena**, pela transmissão de conhecimentos e disciplina.

À **Profa. Dra. Miriam Turbino**, por ter colaborado com a parte estatística desse trabalho.

À **Margareth e ao amigo João**, pelo apoio em uma fase importante na pesquisa.

Aos **amigos professores do Mestrado Profissionalizante “Lasers em Odontologia”**, pelo companheirismo e trabalho em equipe.

Aos **amigos da Clínica SOL**, por todos esses anos de agradável convívio.

À **Lili e Cida**, pela colaboração e amizade.

Ao **IPEN-CNEN/SP**, pela concessão do Laboratório de Espectroscopia Óptica.

Ao **LELO – Laboratório Experimental de Laser em Odontologia da FOU SP**, pela infraestrutura disponibilizada.

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO LASER EM BAIXA INTENSIDADE NA REGIÃO DA GLÂNDULA TIREÓIDE DE CAMUNDONGOS

LUCIANE HIRAMATSU AZEVEDO

RESUMO

Trabalhos recentes demonstram que a irradiação infravermelha pode causar alterações na glândula tireóide. A atividade normal dessa glândula deve ser preservada, uma vez que produz os hormônios triiodotironina (T_3) e tiroxina (T_4), que estimulam o metabolismo oxidativo, fundamental na manutenção do equilíbrio do organismo. O aumento ou diminuição desses hormônios reflete em uma maior ou menor atividade das mitocôndrias, que determina os efeitos secundários sobre o metabolismo. A proposta deste estudo foi avaliar se houve um aumento ou diminuição da produção desses hormônios após a aplicação de um laser de emissão infravermelha, utilizando uma densidade de energia de $4\text{J}/\text{cm}^2$ na região da glândula tireóide de camundongos machos. Pôde-se concluir que: o nível hormonal alterou-se, sendo estaticamente significativo entre o primeiro dia de irradiação e sete dias após a última aplicação. Foram realizados também cortes histológicos dessas glândulas, não tendo sido observadas quaisquer alterações morfológicas. A espectroscopia de absorção óptica do soro de camundongos mostrou um pico de absorção em 280 nm aproximadamente, que foi atribuído à tirosina (este é um aminoácido que faz parte da composição desses hormônios).

EVALUATION OF LOW INTENSITY LASER EFFECTS IN THE THYROID GLANDS REGION OF MALE MICE

LUCIANE HIRAMATSU AZEVEDO

ABSTRACT

Recent studies have demonstrated that the infra-red laser can cause alterations in thyroid glands. Their normal activity must be preserved, as they produce the thyroidal hormones triiodothyronine (T_3) and thyroxine (T_4), that stimulate the oxidative metabolism, essential to maintain a healthy organism. The increase or diminution of these hormones results in alteration of the mitochondria's activity, that determines the secondary effects in the metabolism. The purpose of this study was to evaluate if there was any alteration of the thyroidal hormones plasma levels under irradiation from infra-red laser, with energy density of $4\text{J}/\text{cm}^2$, in the region of thyroid glands of male mice. It was concluded that there was an hormonal level alteration statistically significant between the first day of irradiation and seven days after the last application. Histological studies showed that there was no morphological changes in histological sections of thyroid glands. The optical absorption spectroscopy of mice's serum presented a peak at approximately 280 nm, attributed to tyrosine (this is the amino acid compounding these hormones).

SUMÁRIO

	p.
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	4
3 REVISÃO DA LITERATURA	5
3.1 Laser	5
3.2 Glândula tireóide	9
3.3 Radioimunoensaio	12
3.4 Espectroscopia	13
4 METODOLOGIA.....	14
4.1 Teste de radioimunoensaio	20
4.1.1 Princípios gerais do radioimunoensaio.....	21
4.1.2 Componentes do sistema.....	22
4.1.3 Métodos de separação.....	23
4.1.4 Medida de radiação	23
4.1.5 Utilização do radioimunoensaio.....	24
4.1.6 Determinação da triiodotironina (T ₃) total	24
4.1.7 Determinação da tiroxina (T ₄) total em fase sólida	27
4.2 Microscopia de Luz.....	30
4.3 Espectroscopia de absorção óptica.....	31
5 RESULTADOS	32
5.1 Radioimunoensaio.....	32
5.1.1 Análise de variância - triiodotironina.....	33
5.1.2 Análise de variância - tiroxina.....	34

5.2 Microscopia de luz.....	36
5:3 Espectroscopia de absorção óptica.....	39
6 DISCUSSÃO	42
7 CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS	47
REFERÊNCIAS RECOMENDADAS	52

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 3.1 - Estrutura química da tetraiodotironina (acima) e estrutura química da triiodotironina (abaixo)	11
Figura 3.2 - Estrutura química da tirosina.....	12
Figura 4.1 - Laser de baixa potência – Twin Laser da MMOPTICS®.....	15
Figura 4.2 - Peça de mão do laser de baixa potência.	16
Figura 4.3 - Área demarcada de 1cm ² para irradiação com laser	16
Figura 4.4 - Irradiação com o laser em baixa intensidade na região da glândula tireóide de camundongos.....	17
Figura 4.5 - Coleta de sangue sendo realizada através do plexo retro-orbital	18
Figura 4.6 - Centrifugação do sangue	19
Figura 4.7 - Pipetagem do soro	19
Figura 4.8 - Obtenção do soro.....	20

Figura 5.1 - Fotomicrografia da glândula tireóide de camundongos antes da irradiação – HE, 40X	36
Figura 5.2 - Fotomicrografia da glândula tireóide de camundongos após a primeira irradiação – HE, 40X	37
Figura 5.3 - Fotomicrografia da glândula tireóide de camundongos após a segunda irradiação – HE, 40X.....	37
Figura 5.4 - Fotomicrografia da glândula tireóide de camundongos após a terceira irradiação – HE, 40X	38
Figura 5.5 - Fotomicrografia da glândula tireóide de camundongos após sete dias da última irradiação – HE, 40X	38
Gráfico 5.1 - Níveis de T ₃ no soro de camundongos	34
Gráfico 5.2 - Níveis de T ₄ no soro de camundongos	35
Gráfico 5.3 - Espectro de absorção óptica do soro antes da irradiação.....	39
Gráfico 5.4 - Espectro de absorção óptica do soro após a primeira irradiação	40
Gráfico 5.5 - Espectro de absorção óptica do soro após segunda irradiação	40
Gráfico 5.6 - Espectro de absorção óptica do soro após terceira irradiação	41

Gráfico 5.7 - Espectro de absorção óptica do soro após 7 dias da terceira irradiação	41
Gráfico 6.8 - Espectro de absorção óptica do soro (azul) e espectro de absorção óptica da tirosina diluída em água (vermelho).....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 - Valores obtidos através do teste de radioimunoensaio e as médias amostrais calculadas	32
Tabela 5.2 - Análise de variância – T_3	33
Tabela 5.3 - Médias amostrais calculadas - T_3 e o valor de Tukey	33
Tabela 5.4 - Análise de variância – T_4	34
Tabela 5.5 - Médias amostrais calculadas – T_4 e o valor de Tukey.....	35

LISTA DE SIGLAS E/OU ABREVIATURAS

ABS	absoluto
Ac	anticorpo específico
Ag	antígeno frio (não radioativo)
Ag*	antígeno marcado (radioativo)
ANS	anilino-1naftaleno sulfonato de magnésio
ANSA	anilinonaftaleno sulfônico
β	beta
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
cm	centímetro
cm^2	centímetro quadrado
com	contagens por minuto
dl	decilitro
<i>et al.</i>	el alli, e outros
F	Fisher
Ga-Al-As	arseneto de gálio-alumínio
G.L.	graus de liberdade
HE	hematoxilina-eosina
He-Ne	hélio neônio
Hz	hertz

I	iodo
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
J	Joule – unidade de energética
J/cm ²	Joules por centímetro quadrado
M	Molar
µg	micrograma
mJ	milijoule
ml	mililitro
mm	milímetro
µm	micrômetro
ms	milissegundo
mW	miliwats
ng	nanograma
nm	nanômetro
PEG	polietilenoglicol
rpm	rotações por minuto
s	segundo
T ₃	triodotironina
T ₄	tiroxina ou tetraiodotironina
TBG	proteína ligadora de tiroxina
TRH	hormônio liberador de tireotropina
TSH	hormônio estimulador da tireóide
u.a.	unidades arbitrárias
W	Watt – unidade de potência
%	porcentagem

1 INTRODUÇÃO

O cirurgião-dentista tem a face como campo de atuação para diagnóstico e tratamento das patologias que englobam o complexo maxilo-mandibular, sendo o limite inferior, o osso hióide.

A Odontologia dispõe cada vez mais de nova tecnologia que permeou os vários campos da Medicina, o LASER (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation).

O laser em baixa intensidade representa um pós-operatório com menor pronunciamento dos sinais de inflamação, melhor reparação tecidual e menor desconforto doloroso. Estudos vêm demonstrando esses três efeitos básicos: antiinflamatório, biomodulador e analgésico. Contudo, é de extrema importância o diagnóstico preciso da patologia a ser tratada, fazendo uso da anamnese, de um exame físico cuidadoso, e de exames complementares necessários, que visa a escolha da técnica e do tipo de laser mais adequado, norteado pelo prognóstico que está sempre ligado ao tratamento e, por fim, a confiança e o aprendizado em toda a terapêutica é vinculada à preservação do paciente.

Quando se utiliza o laser, deve-se considerar a sua absorção tanto na superfície desejada como em profundidade. Portanto, muitas vezes quando

se realiza a laserterapia, pode-se atingir órgãos que não são os que necessitam da irradiação.

Os efeitos da irradiação com laser em baixa intensidade em estruturas anatômicas e em várias aplicações clínicas têm sido uma preocupação constante. Algumas observações com relação à utilização do laser de emissão infravermelha têm demonstrado um aumento na atividade mitótica de células foliculares e hiperatividade transitória em alguns folículos da glândula tireóide.

O aumento ou diminuição dos hormônios tireoidianos em adultos promove alterações no organismo em geral, no entanto, o indivíduo consegue sobreviver. Porém, em crianças essas alterações são dramáticas, pois a fase do crescimento, tanto físico como mental, é extremamente afetada. Portanto, um estudo nesse campo faz-se necessário, utilizando-se o laser em baixa intensidade agindo na glândula tireóide.

A variação hormonal da triiodotirona e tiroxina no soro pode demonstrar a atividade dessa glândula e através da microscopia de luz é possível observar as alterações morfológicas nas células foliculares e no colóide.

A espectroscopia de absorção óptica permite observar componentes presentes em uma determinada substância em quantidades mínimas, nesse estudo, trata-se do soro de camundongos.

Os protocolos para utilização dos lasers em diversas situações clínicas estão sendo investigados, pois nem todas as suas atuações estão esclarecidas.

Diversos tipos de lasers, bem como a utilização de diferentes parâmetros em diferentes estruturas teciduais necessitam de intenso estudo, pois a correta indicação trará benefícios aos pacientes, e se utilizada de forma inadequada, poderá trazer danos até mesmo irreparáveis aos mesmos.

2 OBJETIVOS

Este trabalho tem por objetivos:

1. Avaliar a atuação do laser em baixa intensidade na glândula tireóide, através da mensuração da quantidade de triiodotironina (T_3) e tiroxina (T_4) circulante no soro de camundongos;
2. Avaliar através da Microscopia de Luz a morfologia da glândula tireóide dos camundongos após a aplicação do laser;
3. Realizar espectroscopia de absorção óptica do soro dos camundongos para identificação de componentes presentes.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Laser

Os efeitos de biomodulação da irradiação coerente em baixa intensidade têm interessado a comunidade científica desde o desenvolvimento do laser por Maiman, 1960, *apud* Takeda (1988). Experimentos sobre os efeitos da fototerapia laser são relatados desde 1964 por Goldman & Richfield.

Diversos trabalhos foram e estão sendo desenvolvidos com intuito de se melhorar e acelerar a reparação tecidual, diminuir a sintomatologia, proporcionando um maior conforto ao paciente.

Em 1984, Bosatra *et al.*, observaram úlceras no lábio inferior, antes e depois do tratamento com laser. Foi demonstrada um aumento na síntese de colágeno nas células tratadas com irradiação laser tanto no estudo *in vitro* como no estudo *in vivo*.

Mester *et al.* (1985), observaram que a aplicação do laser em baixa intensidade provoca aceleração na reparação tecidual.

Em 1987, Longo *et al.*, realizaram um estudo com o propósito de avaliar, em feridas experimentais, os efeitos da aplicação de um laser diodo de arseneto de gálio-alumínio (Ga-Al-As). Obtiveram a cura em alguns

casos e em outros não. Os autores variaram o tempo de aplicação e a frequência do laser.

Howell *et al.* (1988) avaliaram os efeitos de um laser de baixa potência no tratamento de úlceras aftosas bucais de humanos. Pareceu ter havido pouca melhora no tamanho médio, nível de desconforto e tempo de cura para as lesões tratadas com o laser, com diferenças que não foram estatisticamente válidas.

No mesmo ano, Mezawa *et al.*, examinaram os possíveis efeitos analgésicos da irradiação laser, utilizando um laser semiconductor de arseneto de gálio-alumínio (Ga-Al-As), na língua de gatos. Concluíram que a irradiação laser de baixa potência poderia ter realmente um efeito analgésico.

Wilder-Smith *et al.* (1988) investigaram os efeitos terapêutico e analgésico com o uso do laser de baixa potência em vários casos clínicos, entre eles, herpes labial. Os autores não encontraram qualquer benefício em acrescentar a terapia com laser de baixa potência a tratamentos convencionais para uma grande variedade de condições patológicas na cavidade bucal.

Karu (1989) relatou ainda que os efeitos terapêuticos da irradiação com laser de baixa potência podem ser explicados pelo aumento na proliferação de células ou pela mudança na atividade fisiológica de células excitáveis.

Em 1989, Kawakami *et al.*, avaliaram a efetividade na diminuição da dor imediatamente após a irradiação com um laser semiconductor de

arseneto de gálio-alumínio (Ga-Al-As). Ela foi efetiva, entre outros casos, em úlceras gengivais.

Taube *et al.* (1990) relataram que os lasers de baixa potência têm sido utilizados recentemente na Odontologia, sendo recomendado o uso, entre outras condições, em herpes simples e estomatites aftosas.

Silva *et al.* (1992) avaliaram clinicamente os efeitos de um laser de baixa potência semicondutor de arseneto de gálio-alumínio (Ga-Al-As). Obtiveram resultados positivos nos casos de Endodontia, Periodontia, pós-preparos cavitários e pós-cirurgias dentárias.

Nicolli Filho, 1995, estudou os efeitos do laser de He-Ne (632nm), após extrações dos elementos dentais de ratos. O tratamento mostrou uma aceleração no processo de reparação. No entanto, quando o comprimento de onda foi mudado, HeNe (500nm), nenhuma alteração no mesmo processo foi vista.

Em 1996, Eduardo *et al.* , discutiram sobre os benefícios clínicos do laser em baixa intensidade de energia em úlcera aftosa e herpes labial.

Segundo os autores citados por Simunovic (1996), há várias hipóteses para explicar a ação analgésica promovida pela terapia com laser em baixa intensidade:

- Aumento do nível de β -endorfina no liquor espinal;
- Aumento do limiar de disparo da dor, através de um mecanismo de bloqueio eletrolítico das fibras nervosas;
- Diminuição da liberação de substâncias como a bradicinina e histamina;

- Aumento da drenagem linfática da região com conseqüente diminuição do edema e de substâncias álgicas;
- Aumento do suprimento sangüíneo da região, diminuindo a hipóxia tecidual;
- Aumento da produção de ATP celular, que diminui o tempo da reação inflamatória da região;
- Aumento da produção de ATP celular, que pode provocar relaxamento muscular.

Apesar de já existirem inúmeros trabalhos demonstrando seus benefícios, há algumas contra-indicações com relação aos lasers em baixa intensidade e pode-se encontrar alguns trabalhos nos quais foram observados mudanças na glândula tireóide (Hernández *et al.*, 1989 e Parrado *et al.*, 1990). Foram também observados um aumento do número de mitoses nas células do ducto de glândulas salivares submandibulares seguidos da irradiação com laser (Takeda *et al.*, 1988).

Parrado *et al.* (1990) observaram mudanças morfológicas produzidas nas glândula tireóides de ratos albinos após a irradiação com laser de emissão infravermelha com comprimento de onda de 904nm. Dois diferentes níveis de irradiação foram aplicados: $3,12\text{J}/\text{cm}^2$ e $9,36\text{J}/\text{cm}^2$ por quinze dias. Avaliação de mudanças nas densidades dos volumes epitelial, coloidal e folicular e do índice de ativação revelaram que o laser produz mudanças no parênquima da tireóide. Foi observado que há uma relação direta entre a severidade da lesão e a energia da irradiação aplicada.

3.2 Glândula tireóide

A glândula tireóide é uma estrutura endócrina localizada no pescoço, acima da incisura supra-esternal e abaixo da cartilagem cricóide. A principal função dessa glândula é a produção dos hormônios tireoidianos (triiodotironina e tiroxina), importante na regulação do índice metabólico do corpo e que afeta o metabolismo dos carboidratos, proteínas e lipídios, além disso atuam como potencializador da ação de outros hormônios como, as catecolaminas e os hormônios do crescimento. A secreção dos hormônios tireoidianos é regulada de maneira intrincada. O hipotálamo produz um hormônio chamado hormônio de liberação de tireotropina (TRH), que estimula a produção do hormônio estimulador da tireóide (TSH) na porção anterior da hipófise. O TSH, então, irá estimular a produção de T_3 e T_4 pela glândula tireóide. Esses hormônios podem realimentar negativamente, a hipófise e o hipotálamo para interromper a secreção de TSH (Sonis *et al.*, 1996).

Os hormônios da tireóide são caracterizados por conterem iodo; a tiroxina contém quatro átomos de iodo e a triiodotironina, três (Figura 3.1). O efeito principal desses hormônios em vertebrados superiores é estimular o metabolismo oxidativo; uma alta concentração de hormônios aumenta a taxa metabólica e uma redução abaixo da concentração normal a reduz, sendo acompanhada por sintomas de outras deficiências (Schmidt-Nielsen, 1996).

Segundo Guyton (1986), os hormônios tireóideos aumentam as atividades metabólicas de quase todos os tecidos do organismo (com poucas exceções, como o cérebro, a retina, o baço, os testículos e os

pulmões). O metabolismo basal pode aumentar por até 60 a 100% acima do normal, quando ocorre secreção de grandes quantidades de hormônios. A utilização dos alimentos para energia mostra-se acentuadamente acelerada. Algumas vezes, a velocidade da síntese protéica está aumentada, verificando-se aumento simultâneo no catabolismo protéico. A velocidade de crescimento dos indivíduos jovens fica muito acelerada. Os processos mentais são estimulados, e, com freqüência, a atividade de muitas outras glândulas endócrinas aumentada.

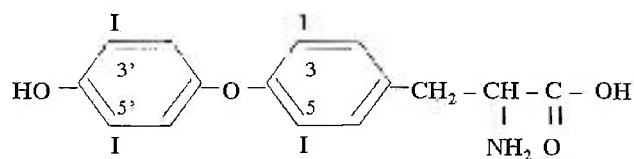
Segundo Junqueira & Carneiro, 1990, quando a dieta é insuficiente em iodo, há redução na produção de T_3 e T_4 e um aumento na síntese de TSH pela adeno-hipófise, com o conseqüente aumento de volume da tireóide. Forma-se assim um bócio por deficiência de iodo, doença comum em certas regiões geográficas. O hipotireoidismo no adulto causa a síndrome conhecida como mixedema, cujo sintoma mais evidente é um "edema" facial, que não cede à pressão. O mixedema é devido ao acúmulo excessivo de substância fundamental no tecido conjuntivo. A deficiência tireoidiana na criança pode levar ao cretinismo, caracterizado por baixa estatura e retardo mental.

A glândula tiróide mantém o metabolismo dos tecidos em nível ótimo para suas funções normais. O hormônio tireoideano estimula o consumo de oxigênio da maioria das células do organismo, auxilia a regulação do metabolismo dos carboidratos e dos lipídios e é necessário para o crescimento e maturação normais. A glândula tireóide não é essencial para a vida, porém, sua ausência acarreta menor resistência ao frio, lentidão física

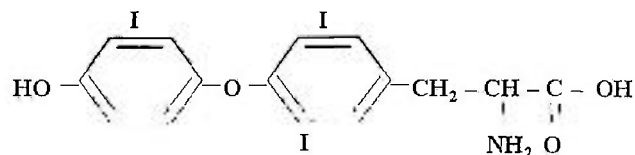
e mental e, em crianças, retardamento mental e nanismo. Pelo contrário, o excesso de secreção tireoideana produz desgaste corporal, nervosismo, taquicardia, tremores e produção excessiva de calor (Ganong, 1989).

A tiroxina e a triiodotironina são sintetizadas no colóide, pela iodação e condensação de moléculas de tirosina (Figura 3.2) que estão unidas por ligações peptídicas à tiroglobulina (Ganong, 1989).

Segundo Mäkela & Mäkela (2002), a tirosina é também precursora da triiodotironina, tiroxina e de outros hormônios tireoidianos. Quando há um aumento da tirosina, há um aumento na produção desses hormônios tireoidianos, além de outras substâncias que são constituídas por esse aminoácido (dopa, dopamina, norepinefrina e epinefrina).



3,5,3',5' – Tetraiodotironina (tiroxina T₄)



3,5,3' – Triiodotironina (T₃)

Figura 3.1 - Estrutura química da tetraiodotironina (acima) e estrutura química da triiodotironina (abaixo)

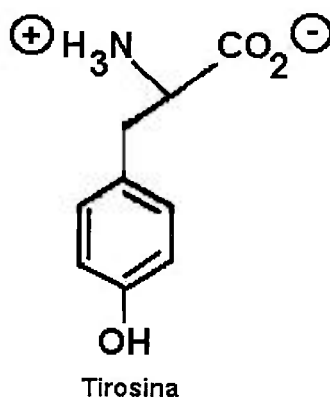


Figura 3.2 – Estrutura química da tirosina

3.3 Radioimunoensaio

Em 1959, Berson & Yalow, *apud* Moura (1987) introduziram os sistemas de análise por saturação, utilizando medida radioativa. Através desta metodologia, tornou-se possível a dosagem de substâncias com pequeníssimas concentrações, na ordem de nano e picogramas. Desta forma, surgiu a possibilidade de determinar qualquer tipo de molécula biológica, desde que se consiga obter um receptor específico e que a molécula biológica possa, de alguma maneira, ser marcada.

No radioimunoensaio, a marcação é efetuada com isótopos radioativos. Devido à sua maior especificidade, é possível efetuar os ensaios das amostras diretamente no líquido biológico e devido à sua grande afinidade, o volume de amostra também é menor.

Devido à sua importância, surgiram vários kits comerciais que vieram suprir a necessidade dos laboratórios clínicos. Alguns requisitos básicos devem ser obedecidos, tais como: simplicidade, rapidez, estabilidade, precisão, exatidão, além de apresentar baixo grau de risco à saúde.

3.4 Espectroscopia de Absorção Óptica

Segundo Campos, 1977, os métodos empregados na elucidação da estrutura molecular de compostos orgânicos, tanto de origem sintética como natural, foram basicamente químicos, ou seja, envolviam reações realizadas com compostos desconhecidos, com a finalidade de se conhecer os produtos. Do grande número de operações envolvidas, imediatamente se evidencia a desvantagem de um grande desperdício de tempo e também a necessidade de uma apreciável quantidade do produto desconhecido. Os métodos analíticos representados pela espectrometrias possibilitam a determinação da arquitetura molecular, não somente em tempo curto como também utilizando quantidades mínimas de substâncias.

A estrutura da tirosina bem como a espectroscopia de absorção são mostradas na página da internet e apresenta o coeficiente de extinção molar de $1.405\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ à 274,25 nm (Prahl, 2002).

4 METODOLOGIA

Foram utilizados setenta (70) camundongos *swiss* machos adultos com peso médio de 20g. Sessenta e cinco (65) camundongos foram divididos em cinco (5) réplicas com treze (13) animais, e os outros cinco (5) camundongos foram anestesiados e sacrificados, sendo um antes da irradiação com laser, os outros três (3), após o 1º, 2º e 3º dia de irradiação e o último após uma semana da terceira irradiação.

Os animais, provenientes do Biotério do IPEN, foram mantidos em gaiolas com maravalha de *pinus* e forneceu-se água e ração *ad libitum*. A água fornecida foi esterilizada por autoclave. Já, a maravalha e a ração foram esterilizadas por radiação γ . As Normas Nacionais e Internacionais de Bioética Animal foram seguidas.

O laser utilizado foi o de baixa intensidade – Twin Laser da MMOPTICS® (Figuras. 4.1 e 4.2), infravermelho, 780nm de comprimento de onda, potência de 30 mW. A densidade de energia aplicada foi de 4J/cm² na glândula tireóide. A aplicação do laser foi de maneira pontual, sendo, portanto, aplicado 4 segundos por ponto. O tempo total na área de 1 cm² foi de 2 minutos e 13 segundos (Figuras 4.3 e 4.4).

$$t = \frac{DE \cdot A}{P}$$

P

t = tempo (segundos)

DE = densidade de energia (J/cm^2)

A = área (cm^2)

P = potência (W)

Aplicação pontual:

$$t = \frac{4 \times 0,031}{0,03} \cong 4s$$

0,03

Aplicação na área de $1cm^2$:

$$t = \frac{4 \times 1}{0,03} = 133,33 s \cong 2 \text{ min e } 13 s$$

0,03



Figura 4. 1 - Laser de baixa potência – Twin Laser da MMOPTICS®



Figura 4.2 - Peça de mão do laser de baixa potência.

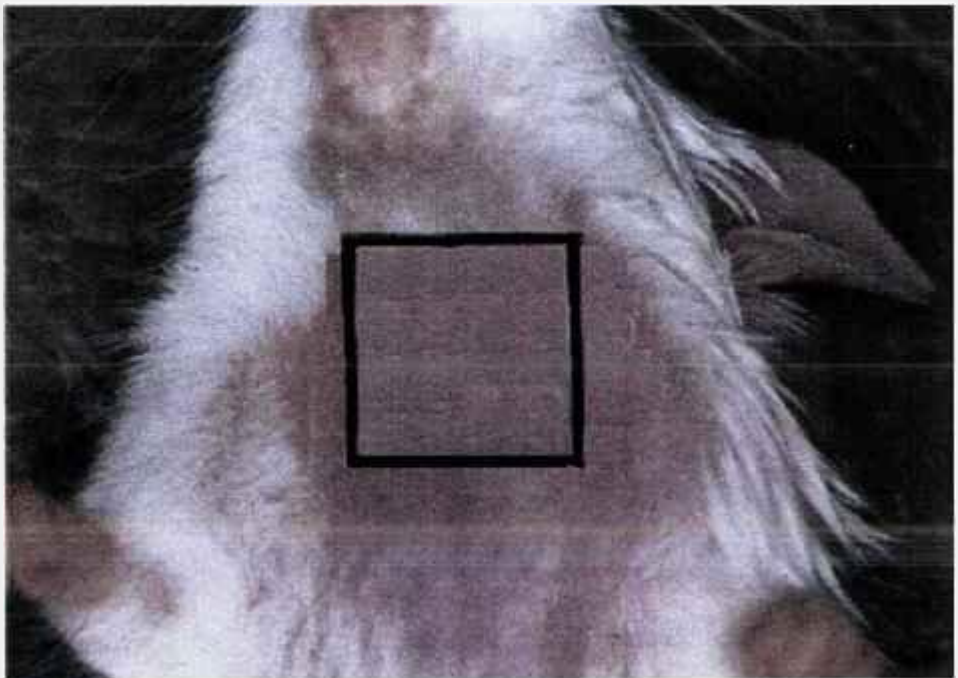


Figura 4.3 - Área demarcada de 1cm² para irradiação com laser



Figura 4.4 - Irradiação com o laser em baixa intensidade na região da glândula tireóide

Os animais foram anestesiados e sangrados pelo plexo retro-orbital, sendo coletado sangue antes da utilização do laser, 24, 48, 72 horas e 1 semana após a última (terceira) irradiação (Figura. 4.5). O laser em baixa intensidade foi utilizado no 1º, 2º e 3º dia e após as aplicações eram feitas as coletas.

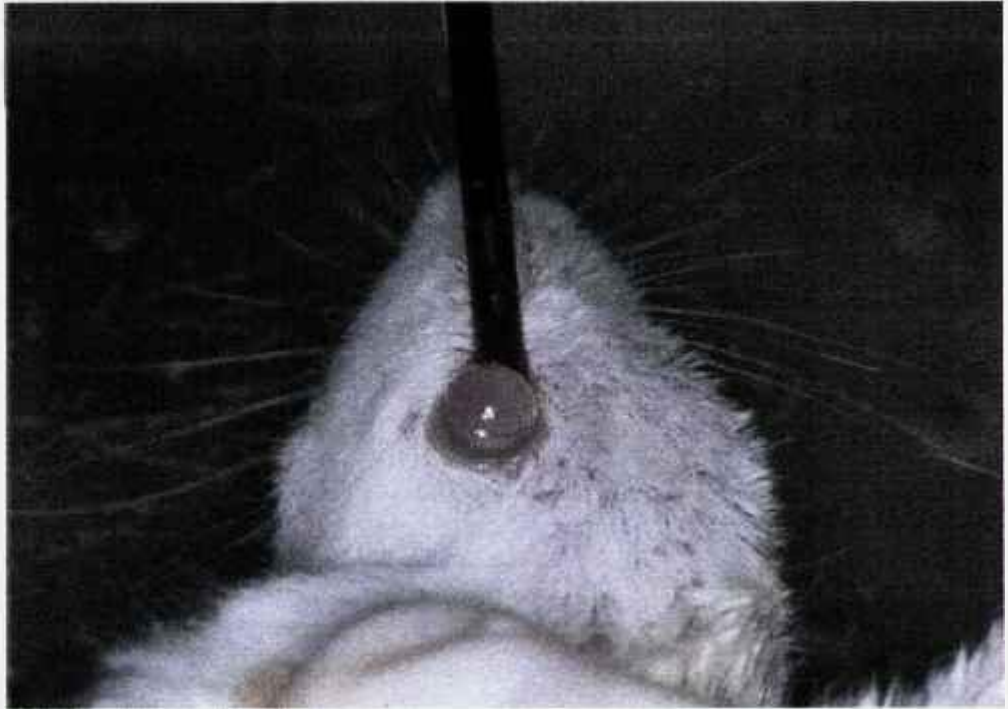


Figura 4.5 - Coleta de sangue sendo realizada através do plexo retro-orbital

O sangue coletado passou pelas seguintes etapas:

1. Estufa a 37°C durante 30 minutos para formação de coágulo;
2. Geladeira a 4°C durante 10 minutos para contração do coágulo;
3. Centrifugação por 10 minutos a 2000 rpm (Figura 4.6);
4. Pipetagem do soro (Figura 4.7);
5. Obtenção do soro (Figura 4.8).



Figura 4.6 - Centrifugação do sangue

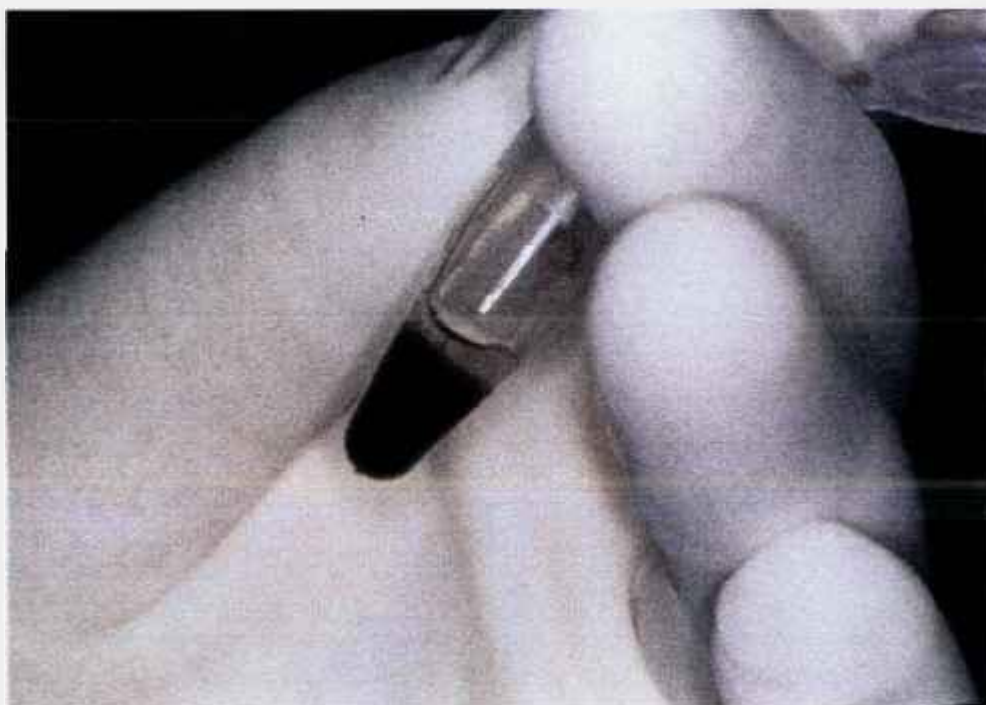


Figura 4.7 - Pipetagem do soro



Figura 4.8 - Obtenção do soro

O material foi congelado e enviado para o laboratório de análises clínicas – CEPAV – Tecnologia em Saúde Animal, onde foi realizado o teste de radioimunoensaio para avaliação da quantidade dos hormônios T_3 e T_4 . Uma outra parte foi também congelada para utilização na espectroscopia óptica.

4.1 Teste de radioimunoensaio

Foram realizados 25 exames para o hormônio T_3 e 25 exames para o hormônio T_4 .

Foi utilizado o teste “Coat-A-Count Total”, designado para mensurar a quantidade total circulante de T_3 e T_4 no soro e plasma.

4.1.1 Princípios gerais do Radioimunoensaio

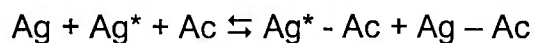
Trata-se de uma reação de competição de uma substância a ser determinada e da mesma substância marcada, radioisotopicamente, por um receptor específico comum a elas. Sendo:

- Ag = antígeno “frio” (não radioativo)
- Ag* = antígeno marcado (radioativo)
- Ac = anticorpo específico

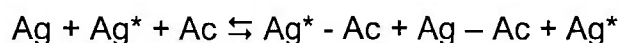
Ocorrem as seguintes reações:

- $Ag + Ac \rightleftharpoons Ag - Ac$
- $Ag^* + Ac \rightleftharpoons Ag^* - Ac$

No sistema total, tem-se:



Se ocorrer excesso de Ag*:



Desta forma, encontra-se o antígeno marcado na fração livre (como Ag*) e na fração unida (como Ag* Ac). Fixando-se uma quantidade de Ag* e Ac e variando as quantidades de Ag, O Ag irá deslocar o Ag* da ligação Ag*-Ac, formando Ag-Ac.

Separando-se as frações livre e unida e medindo-lhes a radioatividade, pode-se determinar o deslocamento devido à quantidade de Ag introduzido.

Enfim, ensaiando padrões de concentrações conhecidas e traçando curvas relacionando as medidas radioativas com as respectivas concentrações, pode-se quantificar as amostras desconhecidas.

4.1.2 Componentes do sistema

Antígeno Frio

É a substância que se vai dosar. Está presente tanto na amostra desconhecida quanto nos padrões que servirão para a construção da curva de calibração.

Antígeno Radioativo

É o antígeno natural marcado com isótopo radioativo. O elemento radioativo geralmente é o Iodo-125 (radiação Gama) ou o Trício (radiação Beta). O teste utilizado para realização desse estudo era com o Iodo-125. Do ponto de vista da estabilidade, as substâncias marcadas com o I-125 têm um tempo de utilidade menor que as triciadas. Geralmente, os hormônios protéicos são marcados com o I-125 e os esteróides são marcados com o trício. O antígeno radioativo é idêntico, imunologicamente, ao antígeno frio.

Anticorpo específico

É a gamaglobulina que se liga aos antígenos frio e radioativo, de forma específica.

Existem casos em que a fórmula estrutural dos antígenos é semelhantes. Neste caso, é necessário efetuar uma extração destas substâncias na amostra.

4.1.3 Métodos de separação

São os processos utilizados para separar a fração unida da fração livre. A separação é uma fase crítica.

Os métodos mais utilizados são:

1. Por adição de precipitantes. Os mais utilizados são o duplo anticorpo, o polietilenoglicol e o carvão-dextran. Destes, só o carvão-dextran precipita a fase livre. O duplo anticorpo é um segundo anticorpo (antigamaglobulina), possuindo alto peso molecular, que vai reagir com a fração unida e precipitar.

2. Por acoplamento à fase sólida. Nesta metodologia, o anticorpo é acoplado a sólidos, o que facilita a posterior separação. Os sólidos podem ser partículas de vidro ou o próprio tubo de ensaio. Isto tornou possível a separação das fases sem a centrifugação.

3. Por separação magnética. Os anticorpos são, covalentemente, ligados a microscópicas partículas de ferro com altas características de flutuação. A utilização de um separador magnético, que atrai as partículas de ferro, torna possível a não centrifugação para a obtenção da fração unida.

Neste trabalho, a separação foi realizada por adição de precipitantes para o teste de T_3 .

4.1.4 Medida de radiação

A medida do decaimento radioativo é uma quantificação estatística. O erro percentual depende do número de contagens por minuto (cpm).

Geralmente, efetua-se aproximadamente 10.000 contagens por minuto, o que dará um erro padrão de 2%.

O número de contagens por minuto varia de acordo com as características do aparelho.

Para a medida da radiação gama, são utilizados os cintiladores de cristal de iodeto de sódio ativados com tálio. Para a radiação beta utiliza-se cintiladores líquidos.

4.1.5 Utilização do Radioimunoensaio

Deve-se realizar os ensaios em sala especial e estar devidamente autorizado pela Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN).

4.1.6 Determinação da Triiodotironina (T_3) Total

Quase toda a T_3 circulante está ligada a proteínas séricas, principalmente a TBG (Proteína ligadora de tiroxina). A dissociação é feita pelo 8-anilinoftaleno-sulfônico (ANSA). Realiza-se, então, uma reação de competição. Após o período de incubação, a fração unida é precipitada pelo polietilenoglicol (PEG).

Amostra biológica

Soro sem hemólise.

Reativos

1. Solução extratora (ANSA);
2. Solução de anticorpo anti-T₃, tamponada;
3. Solução de T₃, marcada com Iodo radioativo I – 125;
4. Solução de polietilenoglicol (PEG);
5. Padrões nas concentrações 0, 50, 100, 200, 400 e 800 ng/dl correspondendo aos P₀, P₁, P₂, P₃, P₄ e P₅, respectivamente.

Técnica

1. Marcar 8 tubos de ensaio 12 x 75 mm, PEG (Controle do PEG), P₀, P₁, P₂, P₃, P₄ e P₅ (Padrões), A (Amostra);
2. Pipetar 0,2 ml dos respectivos padrões nos tubos P₀, P₁, P₂, P₃, P₄ e P₅;
3. Adicionar 0,2 ml da amostra no tubo A;
4. Acrescentar 0,5 ml da solução extratora (ANSA) em todos os tubos, agitar;
5. Pipetar 0,1 ml da solução de anticorpos anti-T₃, com exceção do tubo PEG;
6. Pipetar 0,1 ml da solução de T₃ marcada com I-125, em todos os tubos, agitar;
7. Incubar a 37°C, por 15 minutos;
8. Pipetar 1 ml da solução de PEG, gelada, em todos os tubos;

9. Centrifugar, a 2.000-3.000 rpm, por 10 minutos, à temperatura ambiente;
10. Decantar os sobrenadantes dos tubos, cuidadosamente. Encostar as bordas dos tubos num papel absorvente, para retirar o líquido excedente;
11. Contar o precipitado de todos os tubos, utilizando um contador de poço para radiação gama, durante um minuto.

Cálculo

1. Cálculo das contagens líquidas
 1. Contagem líquida = contagem de cada tubo - contagem do tubo PEG;
 2. Cálculo das porcentagens (Relação da contagem da fração ligada de cada tubo em função da contagem da fração ligada do tubo de massa zero):

$$\% = \frac{\text{contagem líquida de cada tubo}}{\text{contagem líquida do tubo } P_0} \times 100$$

3. Utilizando um papel semi-log, colocar as porcentagens, em ordenadas, e as respectivas concentrações, em abscissas;
4. Efetuar a leitura da concentração da amostra desconhecida, comparando a porcentagem obtida na curva de padronização.

Observações

1. As análises devem ser efetuadas em duplicata;
2. Com a exceção da solução de PEG, utilizar os reagentes, somente quando eles atingirem a temperatura ambiente;
3. Para a pipetagem do PEG, utilizar pipetas de vidro, evitando, assim, a aderência da substância na parede plástica das ponteiros;
4. Centrifugar todos os tubos, simultaneamente, de preferência utilizar a mesma centrífuga;
5. Cálculo da % de capacidade de ligação: marcar um tubo de ensaio 12 x 75 mm - TOT (TOTAL) e pipetar 0,5 ml da solução extratora e 0,1 ml da solução de T₃ marcada com I-125. Agitar e contar, durante um minuto, no mesmo contador de poço utilizado para o ensaio:
$$\% \text{ de capacidade de ligação} = \frac{\text{contagem líquida de cada tubo } P_0 \times 100}{\text{contagem líquida do tubo TOT}}$$
6. Os tubos de ensaio utilizados devem estar limpos e serem uniformes, quanto ao tamanho e à constituição;
7. Seguir, rigorosamente, as recomendações do fabricante, inclusas nos prospectos de cada *kit*.

4.1.7 Determinação da tiroxina (T₄) total em fase sólida

Realiza-se uma reação de competição entre o T₄ da amostra desconhecida e o T₄ radioativo adicionado, pelo anticorpo anti-T₄ que está incorporado às paredes do tubo, especialmente preparado. Após incubação, a separação é efetuada por simples decantação.

Amostra biológica

Soro, sem hemólise.

Reativos

1. Solução de T_4 marcada com I-125, contendo $900\mu\text{g}$ de ANS (8-anilino-1-naftaleno sulfonato de magnésio) em tampão barbital $0,075$ molar;
2. Tubos de ensaio, contendo anticorpo anti- T_4 , covalentemente ligado às paredes dos tubos (tubo de anticorpo);
3. Padrões de T_4 , contendo $0, 2, 5, 10, 20$ e $40 \mu\text{g}$ correspondendo aos P_0, P_1, P_2, P_3, P_4 e P_5 , respectivamente.

Técnica

1. Marcar 6 tubos de ensaio, contendo anticorpos anti- T_4 covalentemente ligados às suas paredes, P_0, P_1, P_2, P_3, P_4 e P_5 , e pipetar $0,025\text{ml}$ de cada um dos respectivos padrões;
2. Marcar um outro tubo de anticorpo como A (Amostra) e pipetar $0,025 \text{ ml}$ da amostra;
3. Adicionar 1 ml da solução de T_4 marcado com I-125 a todos os tubos;
4. Agitar os tubos, por meio de rotação suave, durante vários segundos;
5. Levar os tubos para um banho-maria a 37°C e deixar incubado por $55-65$ minutos. Não é necessário agitar;

6. Desprezar o sobrenadante de todos os tubos;
7. Adicionar, aproximadamente, 2 a 3 ml de água destilada em cada tubo. Em seguida, decantá-la e tocar as bordas dos tubos em papel absorvente, para eliminar o líquido excedente;
8. Contar cada tubo, utilizando um contador de poço para radiação gama.

Cálculo da porcentagem

1. Dividir a contagem de cada tubo pela contagem obtida pelo tubo P_0 e multiplicar por 100:

$$\% = \frac{\text{Contagem de cada tubo} \times 100}{\text{Contagem do tubo } P_0}$$

1. Utilizando um papel semi-log, colocar, em ordenadas, as porcentagens e, em abscissas, as respectivas concentrações;
2. Efetuar a leitura da concentração da amostra desconhecida, comparando a porcentagem obtida, na curva de padronização.

Observações

1. As análises devem ser efetuadas em duplicata;
2. Obedecer a seqüência de adição dos componentes do sistema;
3. As pipetagens devem ser efetuadas no fundo dos tubos de anticorpos. Evitar formação de espuma, tendo cuidado na hora da agitação;
4. Procurar utilizar pipetas automáticas para a adição dos volumes de 0,025 ml;

5. O ANS é utilizado na reação para inibir a ligação do T₄ com a TBG do soro;
6. Seguir, rigorosamente, as recomendações do fabricante, inclusas nos prospectos de cada kit.

4.2 Microscopia de Luz

O protocolo para obtenção de cortes histológicos da tireóide foi o seguinte:

Desidratação:

1. Álcool 50 – 30 minutos
2. Álcool 60 – 30 minutos
3. Álcool 70 – 30 minutos
4. Álcool 80 – 30 minutos
5. Álcool 95 – 1 hora
6. Álcool ABS – over night (3 trocas)
7. Xilol – 1 hora e 30 minutos (2 trocas)
8. Parafina – 3 horas (2 trocas)

Após essas etapas, foi realizada a microtomia com corte de 6 μm de espessura. A coloração foi com hematoxilina de Harris por 5 minutos e eosina de Lison por 1 minuto.

4.3 Espectroscopia de Absorção Óptica

Para a espectroscopia óptica foi utilizado o Espectrofotômetro Cary 17 do Laboratório de Espectroscopia Óptica do IPEN, para observação dos componentes do soro coletado.

Previamente a realização deste teste, o soro foi trazido à temperatura ambiente.

5 RESULTADOS

5.1 Radioimunoensaio

Os resultados originais consistiam de vinte e cinco valores de T₃ e vinte e cinco valores de T₄ referentes a cinco réplicas e cinco tempos de observação (Tabela 5.1).

Para análise estatística os dados foram submetidos à análise de variância separadamente, ou seja, um teste para T₃ e outro para T₄.

Tabela 5.1 - Valores obtidos através do teste de radioimunoensaio e as médias amostrais calculadas

Réplicas		Tempos				
		Antes	1º dia	2º dia	3º dia	7 dias
T ₃ ng/dl	1	63	70	62	70	61
	2	68	56	68	61	76
	3	60	50	67	58	81
	4	60	52	67	58	77
	5	61	57	66	58	76
	Média	62,4	57	66	61	74,2
T ₄ µg/dl	1	3,9	4,0	2,5	3,1	2,1
	2	4,3	2,9	3,2	2,8	4,2
	3	2,5	1,0	2,8	2,4	4,7
	4	2,6	1,4	2,8	2,4	4,6
	5	2,5	1,2	2,8	2,5	4,1
	Média	3,16	2,18	2,82	2,64	3,94

5.1.1 Análise de variância – Triiodotironina

A análise de variância (Tabela 5.2) demonstrou haver significância estatística ao nível de 5% entre os tempos de observação ($F = 5,44$).

Tabela 5.2 – Análise de variância – T_3

Fonte de variação	Soma de Quadrados	G.L.	Quadrados Médios	(F)	Probabilidade (HO)
Entre réplicas	34,2406	4	8,5602	0,22	7,8640%
Entre tempos	842,6406	4	210,6602	5,44	0,6070%
Resíduo	619,7594	16	38,7350		
Varição Total	1496,6406	24			

Para a comparação entre as médias foi realizado o teste de Tukey ($T = 12,05$), que demonstrou haver diferença entre os valores do primeiro dia de irradiação e sete dias após a terceira irradiação (Tabela 5.3), não havendo diferença entre os outros tempos.

Tabela 5.3 – Médias amostrais calculadas de T_3 e o valor de Tukey

Antes	1 ^a irradiação	2 ^a irradiação	3 ^a irradiação	7 dias após	$T = 12,05$
62,4	57	66	61	74,2	

O gráfico 5.1 mostra a alteração de T_3 antes e após as irradiações com o laser e uma semana após a última irradiação.

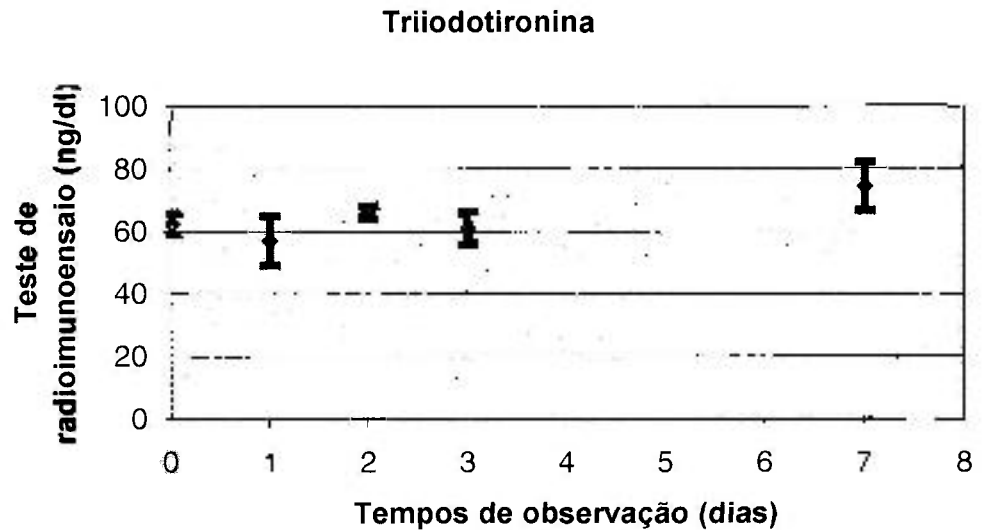


Gráfico 5.1 – Níveis de T_3 no soro de camundongos.

5.1.2 Análise de variância – Tiroxina

A análise de variância (Tabela 5.4) demonstrou haver significância estatística ao nível de 3% entre os tempos de observação ($F= 3,03$).

Tabela 5.4 – Análise de variância – T_4

Fonte de variação	Soma de Quadrados	G.L.	Quadrados Médios	Probabilidade (F)	Probabilidade (HO)
Entre réplicas	2,6304	4	0,6576	0,86	48,8392
Entre tempos	9,2904	4	2,3226	3,03	4,8523
Resíduo	12,2735	16	0,7671		
Varição Total	24,1944	24			

Para a comparação entre as médias foi realizado o teste de Tukey ($T = 1,70$), que demonstrou haver diferença entre os valores do primeiro dia de irradiação e sete dias após a terceira irradiação (Tabela 5.5), não havendo diferença entre os outros tempos.

Tabela 5.5 - Médias amostrais calculadas de T_4 e o valor de Tukey

Antes	1 ^a irradiação	2 ^a irradiação	3 ^a irradiação	7 dias após	$T = 1,70$
3,16	2,18	2,82	2,64	3,94	

O gráfico 5.2 mostra a alteração de T_4 antes e após as irradiações com o laser e uma semana após a última irradiação.



Gráfico 5.2 - Níveis de T_4 no soro de camundongos

5.2 Microscopia de Luz

Não foram observadas alterações morfológicas das glândulas tireóides. Todos os cortes histológicos apresentaram os folículos tireoidianos com epitélio cubóide, disposto em uma só camada, limitando espaços esféricos cheios de uma substância gelatinosa chamada colóide. Não houve, portanto, nem aumento, nem diminuição acentuada na altura do epitélio folicular (figuras 5.1 a 5.5).

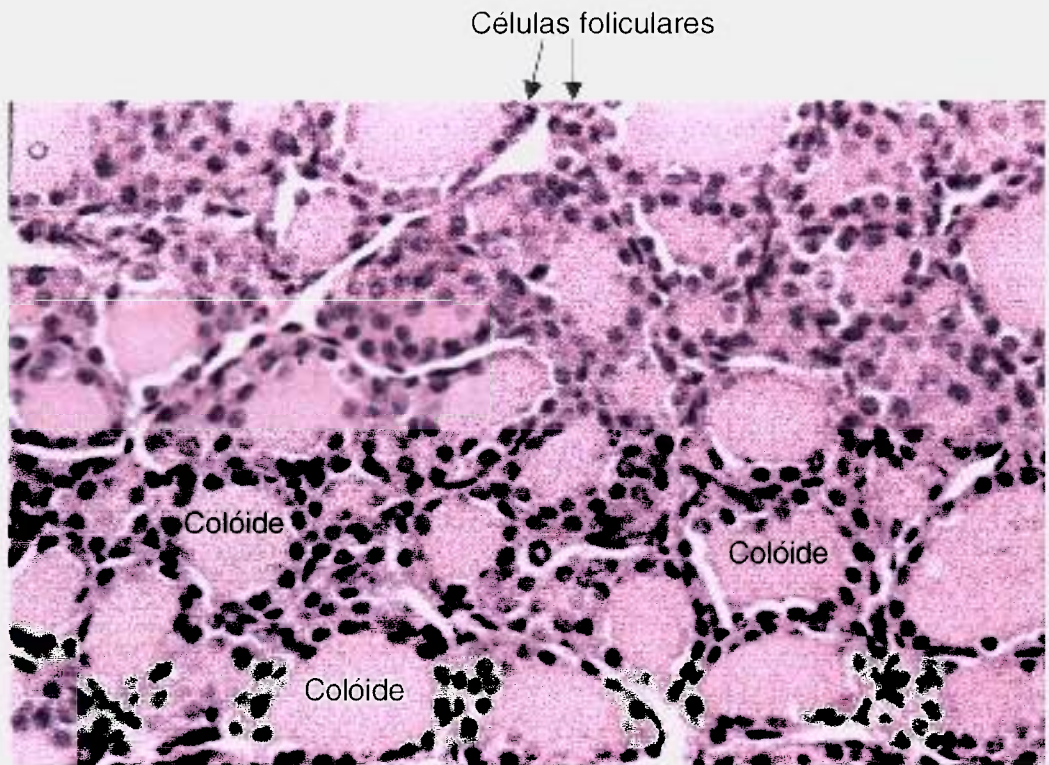


Figura 5.1 - Fotomicrografia da glândula tireóide de camundongos antes da irradiação - HE, 40X



Figura 5.2 - Fotomicrografia da glândula tireóide de camundongos após a primeira irradiação - HE, 40X

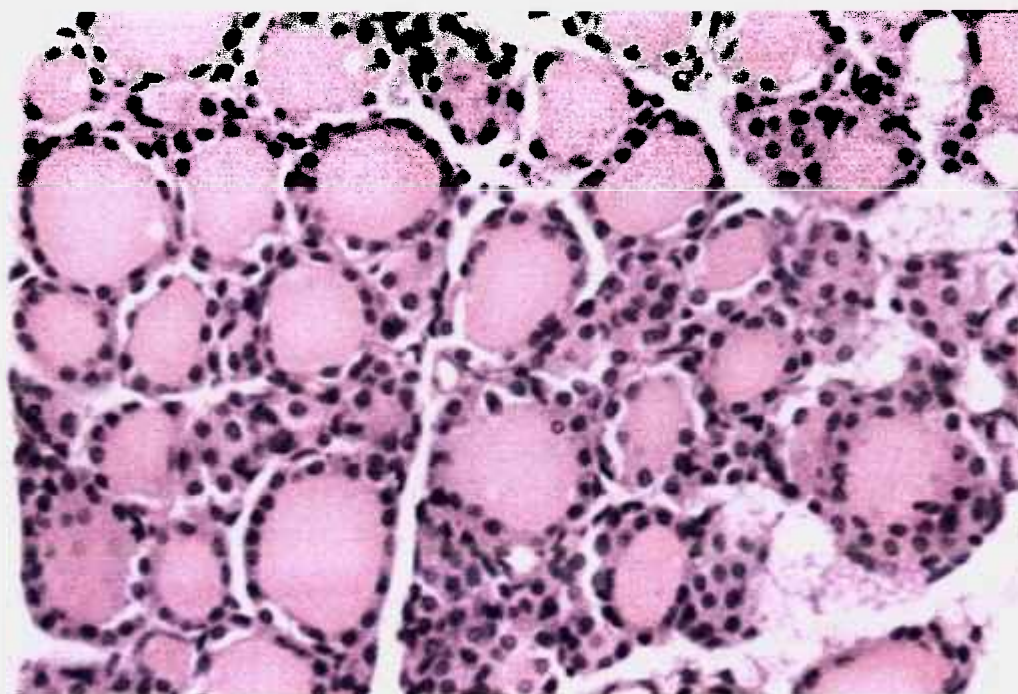


Figura 5.3 - Fotomicrografia da glândula tireóide de camundongos após a segunda irradiação - HE, 40X

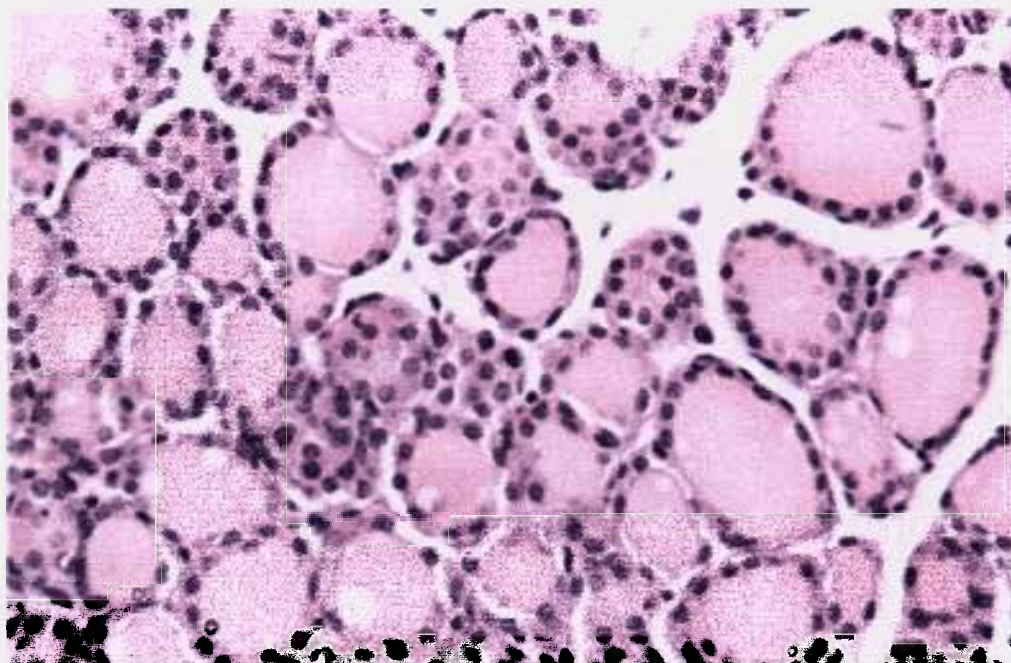


Figura 5.4 - Fotomicrografia da glândula tireóide de camundongos após a terceira irradiação - HE, 40X

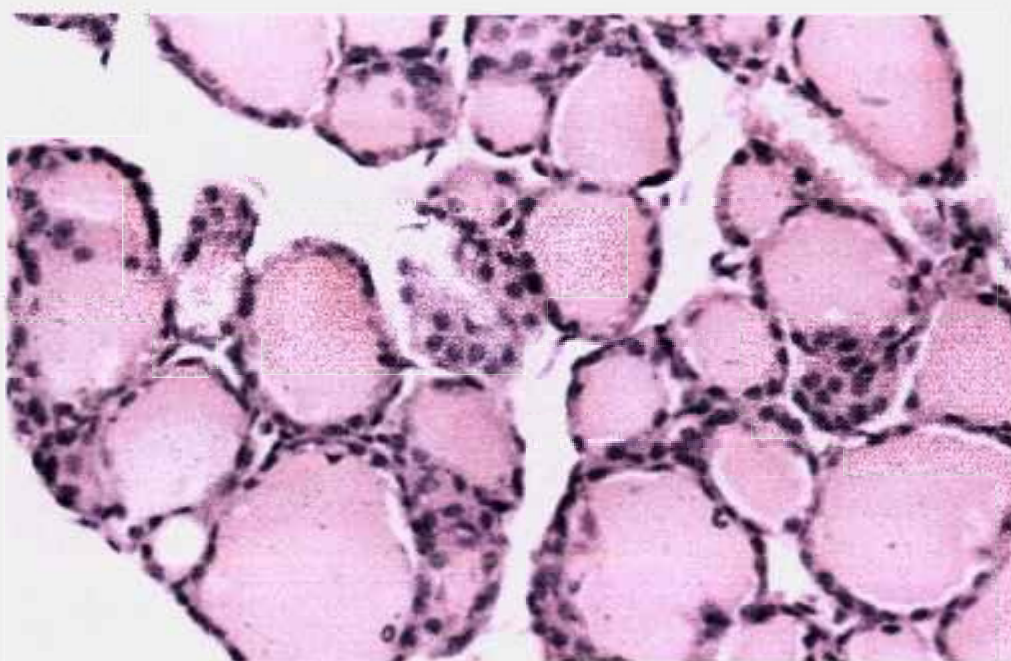


Figura 5.5 - Fotomicrografia da glândula tireóide de camundongos após sete dias da última irradiação - HE, 40X

5.3 Espectroscopia de Absorção Óptica

O espectro de absorção obtido do soro mostra um pico em torno de 280nm, conforme mostram os gráficos 5.6 a 5.10, que foi atribuído à tirosina.

Não foram observadas alterações entre os espectros nos diferentes dias de irradiação e também em relação ao controle.

Soro - Antes da Irradiação

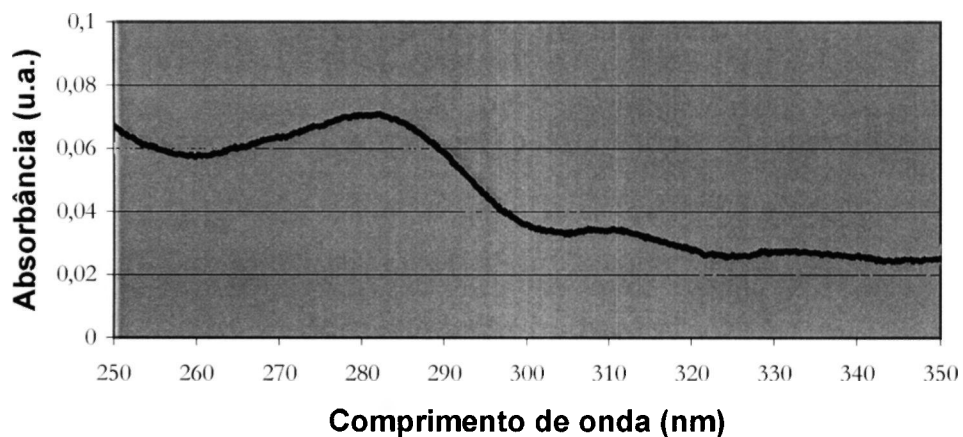


Gráfico 5.3 - Espectro de absorção óptica do soro antes da irradiação

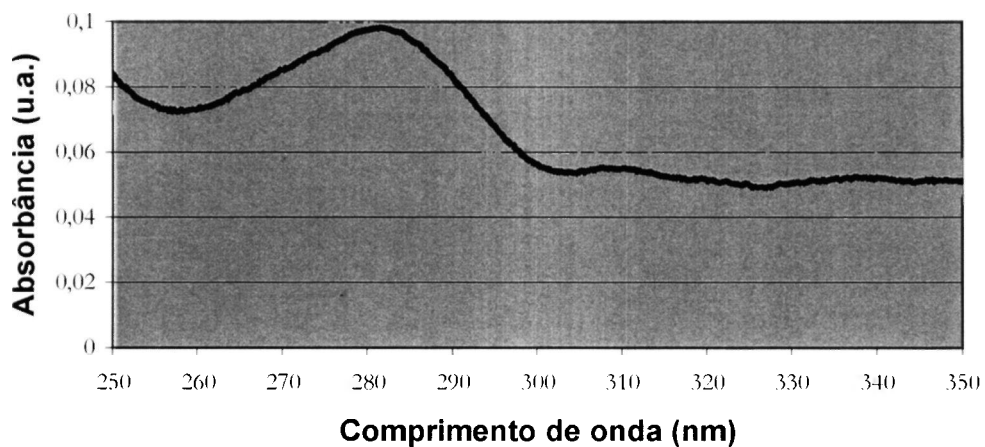
Soro - Primeira Irradiação

Gráfico 5.4 - Espectro de absorção óptica do soro após a primeira irradiação

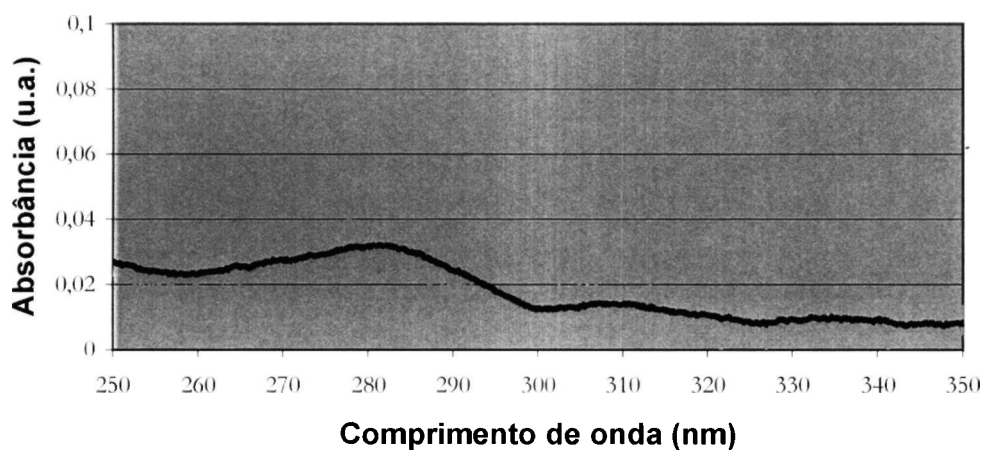
Soro -Segunda Irradiação

Gráfico 5.5 - Espectro de absorção óptica do soro após segunda irradiação

Soro - Terceira Irradiação

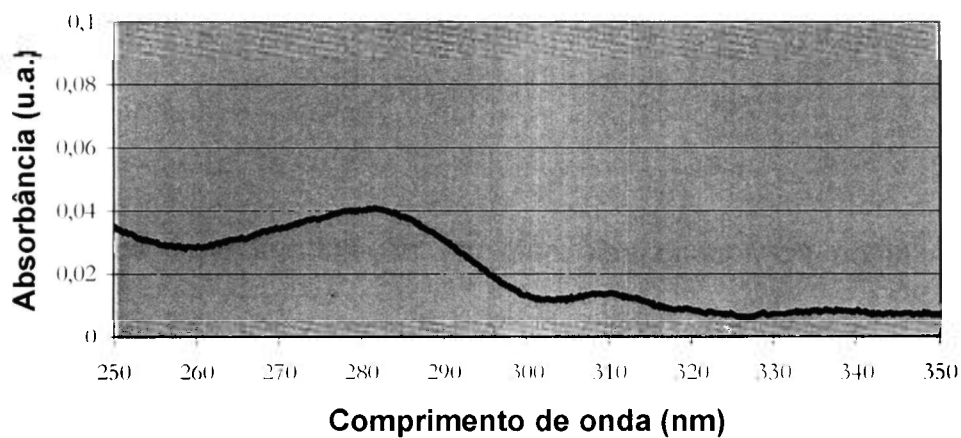


Gráfico 5.6 - Espectro de absorção óptica do soro após terceira irradiação

Soro - Sete Dias Após

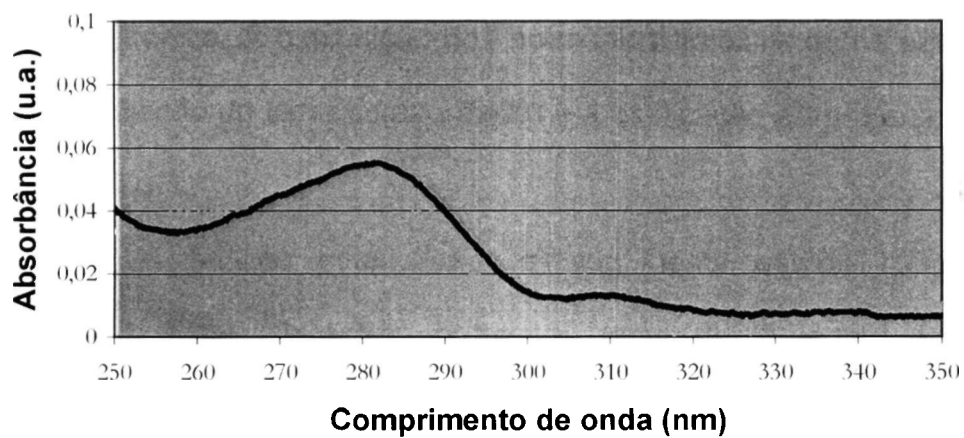


Gráfico 5.7 - Espectro de absorção óptica do soro após 7 dias da terceira irradiação

6 DISCUSSÃO

Os efeitos de biomodulação em glândulas endócrinas do laser de baixa intensidade têm sido reportados por alguns autores (Hernadéz *et al.*, 1989 e Parrado *et al.*, 1989).

Hernadéz *et al.*, em 1989, relataram que o decréscimo dos hormônios T_3 e T_4 depois da irradiação do laser infravermelho pode ser explicado pelas mudanças no citoesqueleto e/ou a síntese de tiroglobulina. Isto está de acordo com o acúmulo de material coloidal no citoplasma encontrado na microscopia eletrônica. A diminuição dos hormônios tireoidianos no sangue seguido da irradiação do laser infravermelho é a explicação para o aumento nos valores do TSH.

Através da análise estatística realizada neste estudo, pôde-se observar que a única alteração hormonal, tanto de T_3 como de T_4 , estatisticamente significativa foi em relação ao primeiro dia de aplicação e sete dias após a terceira aplicação. Essa alteração deve-se, provavelmente, a uma queda do nível de T_3 e T_4 após a primeira aplicação e um pequeno aumento no nível desses hormônios após sete dias.

Com relação à morfologia, não houve alteração dos folículos tireoidianos, diferentemente do que ocorreu no estudo de Parrado *et al.*, em

1989, onde utilizando diferentes parâmetros ($3,12\text{J}/\text{cm}^2$ e $9,36\text{J}/\text{cm}^2$) com um laser de 904nm por 15 dias, encontraram alterações na densidade dos folículos e dos volumes coloidal e epitelial. Cabe ressaltar que todos os animais foram sacrificados após os 15 dias para avaliação histológica. No estudo realizado, cinco animais foram sacrificados seguindo esta ordem: antes da primeira irradiação, após a 1ª, 2ª e 3ª irradiação e após sete dias da última irradiação. Alterações morfológicas não ocorreram, talvez por ser reduzido o número de dias com irradiação.

Apesar da vasta literatura sobre os laser em baixa intensidade, as informações sobre os seus efeitos em tecidos biológicos não são conclusivas, relatando muitas vezes casos clínicos com pouco embasamento científico (Wilder-Smith, 1988). Muitos trabalhos não indicam os parâmetros corretos, impedindo a reprodução dos mesmos (Mezawa *et al.*, 1988).

Parrado *et al.*, em 1989, relataram a utilização de $46,8$ e $140,4\text{J}/\text{cm}^2$ na região da glândula tireóide de ratos, quando na verdade utilizaram $3,12$ e $9,36\text{J}/\text{cm}^2$ por 15 dias. Não existem doses cumulativas, não se pode multiplicar a dose diária pelo número de dias da utilização do laser.

Quanto ao espectro de absorção óptica realizado com o soro obtido através da coleta do sangue de camundongos, foi observado um pico de absorção principal em torno de 280nm que deve ser atribuído a tirosina por comparação ao espectro da tirosina dissolvida em água, como pode ser observado no gráfico 6.8.



Gráfico 6.8 - Espectro de absorção óptica do soro (azul) e espectro de absorção óptica da tirosina diluída em água (vermelho)

A intenção da realização da espectroscopia óptica do soro foi a de utilizá-la como um exame preliminar para ajudar no diagnóstico de alterações hormonais em indivíduos, uma vez que, a tirosina é o aminoácido presente nos hormônio tireoidianos. Porém, mais estudos devem ser realizados nessa área para que se possa quantificar esse aminoácido, pois a espectroscopia óptica, neste trabalho, cumpriu apenas uma função qualitativa.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que:

1. O nível hormonal alterou-se, sendo estaticamente significante entre o primeiro dia de aplicação e sete dias após a última aplicação;
2. Não houve alteração morfológica nos cortes histológicos de glândula tireóide realizados;
3. Os espectros de absorção óptica do soro de camundongos sugerem que o pico observado em torno de 280nm seja devido à tirosina.
4. Prováveis alterações nas glândulas tireóides após irradiação com lasers em baixa intensidade de emissão infravermelha devem ser profundamente investigados. Mais estudos variando o comprimento de onda, densidade de energia e potência devem ser realizados, com o intuito de se poder afirmar com segurança os efeitos deletérios ou até mesmo benéficos sobre glândula tireóide.

5. Outras pesquisas devem ser realizadas com animais de maior porte para a obtenção de uma maior quantidade de soro, facilitando a realização do teste de radioimunoensaio e conseqüentemente a análise e interpretação dos resultados;
6. Um intervalo de tempo de observação mais amplo também é necessário para que se possa avaliar a variação hormonal por um período maior.

REFERÊNCIAS*

BOSATRA, M.; JUCCI, A.; OLLIARO, P.; QUACCI, D.; SACCHI, S. *In vitro* fibroblast and dermis fibroblast activation by laser irradiation at low energy.

Dermatologica, Basel, v. 168, n. 4, p. 157-162, 1984.

CAMPOS, M. de M. **Química orgânica**. In: _____. São Paulo: Edgard Blücher, 1977. v.2, cap. 15, p. 405-431.

EDUARDO, C. P.; CECCHINI, S. C. M.; CECCHINI, R.C. Low-power laser on oral soft tissue. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BIOMEDICAL OPTICS. LASER IN DENTISTRY, 2., 1996, San Jose. **Proceedings...** San Jose: SPIE, 1996. p. 24.

GANONG, W. F. **Fisiologia médica**. In: _____. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 1989. cap. 18, p. 271-285.

GOLDMAN, L.; RICHFIELD, D. F. The effect of repeated exposure to laser beams. **Acta Dermatovener**, Stockholm, v. 44, p. 264-268, 1964.

* De acordo com NBR-6023 da Associação Brasileira de Normas Técnicas, 1989. Abreviatura de periódicos segundo "Index to Dental Literature".

GUYTON, A. C. **Tratado de fisiología médica**. In: _____. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1989. cap. 76, p. 712 a 720.

HERNANDÉZ, L. C.; SANTISTEBAN, P.; VALLE-SOTO, M. E. DEL; AYALA, J. M.; VEGA, J. A. Changes in mRNA of thyroglobulin, cytoskeleton of thyroid cells and thyroid hormone levels induced by IR-laser irradiation. **Laser Ther**, v. 4; p. 203-208, 1989.

HOWELL, R. M.; COHEN, D. M.; POWELL, G. L.; GREEN, J.G. The use of low energy laser therapy to treat aphthous ulcers. **Ann Dent**, New York, v. 47, n. 2, p. 16-18, Winter 1988.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J.. **Histología básica**. In: _____. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1990. cap. 20, p. 307-311.

KARU, T. Photobiology of low-power laser effects. **Health Phys**, New York, v. 56, n. 5, p. 691-704, May 1989.

KAWAKAMI, T.; IBARAKI, Y.; HARAGUCHI, K.; ODACHI, H.; KAWAMURA, H.; KUBOTA, M.; MIYATA, T.; WATANABE, T.; IIOKA, A.; NITTONO, M.; ODACHI, T.; OHNUMA, S.; SEKIGUCHI, N.; YOKOUCHI, A.; MATSUDA, K. T. The effectiveness of Ga-Al-As semiconductor laser treatment to pain decrease after irradiation. **Higashi Nippon Shigaku Zasshi**, Hokkaido, v. 8, n. 1, p. 57-62, June 1989.

LONGO, L.; EVANGELISTA, S.; TINACCI, G.; SESTI, A. G. Effect of diodes-laser silver arsenide-aluminium (Ga-Al-As) 904 nm on healing of experimental wounds. **Lasers Surg Med**, New York, v. 7, n. 5, p. 444-447, 1987.

MÄKELÄ, R.; MÄKELÄ, A. Laser acupuncture. Disponível em: <<http://www.earthpulse.com/health/laser.html>>. Acesso em: 22 fev. 2002.

MESTER, E.; MESTER, A. F.; MESTER, A. The biomedical effects of laser application. **Lasers Surg Med**, New York, v. 5, n. 1, p. 31-39, July 1985.

MEZAWA, S.; IWATA, K.; NAITO, T.; KAMOGAWA, H. The possible effect of soft-laser irradiation on heat nociceptors in the cat tongue. **Arch Oral Biol**, New York, v. 33, n. 9, p. 693-694, 1988.

MOURA, R. de A. **Técnicas laboratório**. In: _____. 3ª ed. São Paulo: Atheneu, 1987. cap. 7, p. 97 a 101.

NICCOLI FILHO, W.; OKAMOTO, T.; CARDENUTO, N.; PICON, L. C. Efeitos da radiação laser do tipo He-Ne verde (550) no processo de reparo de feridas de extração dental. Estudo histológico em ratos. **Rev Odontol UNESP**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 213-221, jul./dez. 1993.

PARRADO, C.; PELÁEZ, A.; VIDAL, L.; VARGAS, I. P. de. Quantitative study of the morphological changes in the thyroid gland following IR laser irradiation. **Med Sci**, v. 5, n.77, p.77-80, August 1989.

PRAHL, S. Tyrosine. Disponível em:

<<http://omlc.ogi.edu/spectra/PhotochemCAD/html/tyrosine.html>>. Acesso em: 22 fev. 2002.

SCHMIDT-NIELSEN, K. **Fisiologia animal**: adaptação e meio ambiente.

In: _____. 5. ed. São Paulo: Editora Santos, 1996. cap. 12, p. 489, 496 e 497.

SILVA, N. M. M; CECCHINI, R. C. M.; EDUARDO, C.P. Aplicações clínicas do soft laser em odontologia. **Rev Paul Odont**, v. 14, n. 4, p. 30-32, jul./ago. 1992.

SIMUNOVIC, Z. Low laser therapy with trigger points technique: a clinical study on 243 patients. **J Clin Laser Med Surg**, New York, v. 14, n.14, p. 163-167, Aug. 1996.

SONIS, S. T.; FAZIO, R. C.; FANG, L. **Princípios e Prática de Medicina Oral**. In: _____. 2. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 1996. cap. 16, p.137.

TAKEDA, Y. Irradiation effect of low-energy laser on rat submandibular salivary gland. **J Oral Pathol**, Copenhagen, v.17, n. 2, p. 91-94, Feb. 1988.

TAUBE, S.; PIRONEN, J.; YLIPAAVALNIEMI, P. Helium-neon laser therapy in the prevention of postoperative swelling and pain after wisdom tooth extraction. **Proc Finn Dent Soc**, Helsinki, v. 86, n.1, p. 23-27, 1990.

WILDER-SMITH, P. The soft laser: therapeutic tool or popular placebo?

Oral Surg Med Oral Pathol, St. Louis, v. 66, n. 6, p. 654-658, Dec. 1988.