UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

Priscilla Hakime Scalize

Influência de diferentes doses e número de aplicações do laser em baixa intensidade no reparo de defeitos ósseos em calvária de ratas Wistar com modelo experimental para a osteoporose

RIBEIRÃO PRETO

2014

Priscilla Hakime Scalize

Influência de diferentes doses e número de aplicações do laser em baixa intensidade no reparo de defeitos ósseos em calvária de ratas Wistar com modelo experimental para a osteoporose

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biologia Oral

Orientadora: Profa. Dra. Selma Siéssere

RIBEIRÃO PRETO

2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Scalizer, Priscilla Hakime

Influência de diferentes doses e número de aplicações do laser em baixa intensidade no reparo de defeitos ósseos em calvária de ratos Wistar com modelo experimental para a osteoporose. Ribeirão Preto, 2014.

98 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP.
Área de concentração: Biologia Oral

Orientadora: Siéssere, Selma

1. Laser em Baixa Intensidade. 2. Osteoporose. 3. Estereologia.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Priscilla Hakime Scalize. **Influência de diferentes doses e número de aplicações do laser em baixa intensidade no reparo de defeitos ósseos em calvária de ratas Wistar com modelo experimental para a osteoporose.**

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Data da defesa: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais **Antônio Rodolpho Scalize** e **Maria Christina Hakime Scalize**, por serem os meus exemplos de vida, mostrando sempre o que é ter garra e perseverança, sempre com honestidade, companheirismo, trabalho e muito amor. Obrigada por sempre me apoiarem e por eu ter o privilégio de tê-los como os meus guias.*

*Ao meu irmão **Antônio Rodolpho Hakime Scalize**, por sempre me apoiar e me aconselhar em todos os momentos, sejam eles difíceis ou não. Você sempre será o meu exemplo para a conquista de meus objetivos, pela sua força e perseverança.*

*Aos meus avós, **Antônio Hakime**, **Orlay B. Hakime**, **Ather Scalize** e **Layde Baitello Scalize**, que em vida sempre me apoiaram e incentivaram, com carinho e amor e hoje me guiam espiritualmente.*

*Ao **Marco Aurelio Kenichi Yamaji**, no qual aprendi muito, como ter coragem e perseverança e por sempre estar ao meu lado me aconselhando e me ajudando, dando todo o seu apoio e dedicação.*

*Agradeço aos meus tios **Waldemar Bonadio Bertolucci**, **Wílma Bertolucci** e **Maristela da Candelária de Jesus**, por me apoiarem e por me receberem com todo o carinho em suas casas para a realização do meu projeto, vocês foram essenciais para a realização deste meu sonho.*

*Aos meus tios **Doutor Adilson Renesto** e **Doutora Maria Angela da Candelária Renesto**, por sempre estarem ao meu lado e de minha família e me apoiando em minha carreira acadêmica.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*Agradeço primeiramente á **DEUS**, por ter me proporcionado tudo que tenho principalmente, minha família no qual tenho muito amor e agora me concedendo mais uma graça, com o mestrado que sempre sonhei.*

*Agradeço a minha orientadora **Professora Doutora Selma Siéssere**, por me orientar em um dos momentos mais felizes de minha vida e da minha profissão que é no curso de mestrado o qual sempre almejei. Com certeza é uma grande professora que seguirei como exemplo. Além de ser uma pessoa de um coração maravilhoso, com muito carinho, dedicação e amor pelo o que faz e com quem está a sua volta. É uma pessoa muito especial que tive o privilégio de conhecer e de ser orientada. Aprendi muito tanto profissionalmente como pessoalmente.*

*Aos Professores Doutores **Marisa Semprini, Simone Cecílio Hallak Regalo, Karina Fittipaldi Bombonato Prado**, por sempre me ajudarem durante o meu projeto, com muito carinho e dedicação.*

*Ao **Professor Doutor Antônio Augusto Coppi**, que disponibilizou o Laboratório de Estereologia Estocástica e Anatomia Química da Universidade de São Paulo da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de São Paulo, me proporcionando o aprendizado fundamental para a realização de minha pesquisa.*

*Aos alunos de Pós - Graduação do Laboratório de Estereologia Estocástica e Anatomia Química na Universidade de São Paulo na Faculdade de Medicina Veterinária de São Paulo que dedicaram o seu tempo para me auxiliarem com as metodologias. Em especial a **Aliny Antunes Barbosa Lobo Ladd**.*

Aos Especialistas de Laboratório, Luiz Gustavo de Sousa e Paulo Batista de Vasconcelos, ao Técnico de Laboratório, Dimitrius Leonardo Pitol e Auxiliar de Laboratório Túlio R. V. de Paula Lopes com os quais passei a maior parte do meu mestrado, com certeza formei uma nova família, sem eles eu não teria conseguido realizar a pesquisa sozinha. São pessoas muito especiais no qual tive o prazer de conviver neste período e por terem a paciência de me ensinarem e auxiliarem tanto profissionalmente como pessoalmente.

Aos funcionários do Biotério Antonio Massaro, Sérgio Aparecida Mesca e Aline Aparecida Ferraresi Tiballi, que cuidaram dos animais utilizados neste experimento.

AGRADECIMENTOS

*À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, representada pelo seu Diretor **Prof. Dr. Valdemar Mallet da Rocha Barros** pela oportunidade de desenvolvimento profissional.*

*À **Profa. Dra. Fernanda de Carvalho Panzeri Pires de Souza**, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação de Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela atenção e apoio.*

*Ao Chefe do Departamento de Morfologia, Fisiologia e Patologia Básica, **Prof. Dr. José Moacir Marín**, pela oportunidade concedida para conclusão deste trabalho.*

Aos Professores do Curso de Mestrado, no qual me ensinaram muito com suas experiências profissionais.

*Às funcionárias da seção de Pós-Graduação, **Isabel Cristina Galino Sola**, **Regiane Cristina Moí Sacilloto**, **Mary Possani Carmessano**, pela cordialidade e atenção sempre concedida.*

*Às Secretárias da Pós- Graduação do Programa de Reabilitação Oral, **Regiane de Cássia Tirado Damasceno** e **Fernanda Talita de Freitas**, pela disponibilidade.*

*À secretária do departamento de Morfologia, Fisiologia e Patologia Básica, **Clélia Aparecida Celino**, pela disposição e apoio.*

Aos Amigos e Colegas do Curso de Mestrado, pela colaboração e convivência durante minha trajetória.

A minha amiga Camila Barreto que sempre esteve ao meu lado, compartilhando momentos especiais.

Agradeço a todos que de certa forma contribuíram para essa conquista.

AGRADECIMENTO

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de mestrado (Processo 2012/10184-9) e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

RESUMO

SCALIZE, P.H. **Influência de diferentes doses e número de aplicações do laser em baixa intensidade no reparo de defeitos ósseos em calvária de ratas Wistar com modelo experimental para a osteoporose.** 2014. 98 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

A laserterapia em baixa intensidade (LLLI) é uma nova metodologia com comprovada eficácia na formação e na diminuição da reabsorção óssea, porém ainda não existe uma padronização quanto à sua utilização, sendo, portanto, necessários mais estudos para investigar o efeito de diferentes parâmetros como o comprimento de onda, duração da aplicação e número de sessões. Este estudo teve por objetivo avaliar os efeitos da LLLI em defeitos ósseos críticos em calvária de ratas Wistar com modelo experimental para osteoporose. A qualidade do tecido ósseo neoformado foi analisada por meio da microscopia de luz, e por meio da estereologia, foram estimados os seguintes parâmetros: volume do tecido de reparação do defeito (V_{tr} - μm^3), densidade de volume das trabéculas (V_{vt}), volume total das trabéculas ósseas neoformadas (V_{tot} - μm^3), densidade numérica de osteócitos (N_{vost} - μm^{-3}), número total de osteócitos (N_{toost}), volume médio dos osteócitos (V_{nost} - μm^3), densidade de superfície das trabéculas (S_{vt} - μm^{-1}) e superfície de área das trabéculas (S_{at} - μm^2). A quantidade total de colágeno também foi analisada (A_c - μm^2). Foram utilizadas 54 ratas que foram submetidas à ovariectomia bilateral. Após 150 dias, foram realizados defeitos ósseos na calvária. Os animais foram divididos em 9 grupos (n=6) e 24 horas após a confecção do defeito iniciou-se o tratamento com laser de Arseneto Gálio-Alumínio (AsGaAl; 780 nm). Os Grupos 1, 2 e 3 (G1, G2 e G3) receberam a dose ou densidade de energia de 0 J/cm², 20 J/cm² e 30 J/cm² respectivamente, por 3 sessões; os grupos 4, 5 e 6 (G4, G5 e G6) receberam 0 J/cm², 20 J/cm² e 30 J/cm² respectivamente, por 6 sessões e os grupos 7, 8 e 9 (G7, G8 e G9) receberam 0 J/cm², 20 J/cm² e 30 J/cm² respectivamente, por 12 sessões. Comparando os grupos G2 e G1 os resultados estereológicos foram significantes para V_{tr} (p=0,023), V_{vt} (p=0,003), V_{tot} (p=0,04), N_{toost} (p=0,048), S_{vt} (p=0,000), S_{at} (p=0,001) e A_c (p=0,000). Na comparação de G3 e G1 encontrou-se resultados significantes para V_{vt} (p=0,002) e V_{tot} (p=0,02). Na comparação de G5 e G4 os resultados foram significantes para S_{vt} (p=0,041) e S_{at} (p=0,043) e na comparação de G6 e G4 os resultados foram significantes para V_{tr} (p=0,005), V_{vt} (p=0,000), V_{tot} (p=0,000), N_{vost} (p=0,025), N_{toost} (p=0,011), S_{vt} (p=0,034), S_{at} (p=0,028) e A_c (p=0,001). A comparação de G8 e G7 mostrou que a S_{at} foi significativa (p=0,047) e na comparação entre G9 e G7 os resultados foram significantes para V_{tr} (p=0,014), V_{vt} (p=0,000), V_{tot} (p=0,000), N_{vost} (p=0,025), N_{toost} (p=0,024), S_{vt} (p=0,042), S_{at} (p=0,014) e A_c (p=0,023). Pôde-se concluir que houve neoformação óssea nos grupos que receberam as doses de 20 e 30 J/cm² quando comparados com os respectivos grupos controles, porém, ao longo do tempo, a dose de 30 J/cm² mostrou parâmetros estereológicos melhores quando comparada à dose de 20 J/cm².

Palavras-Chave: Laser em Baixa Intensidade. Osteoporose. Estereologia.

ABSTRACT

SCALIZE, P.H. **Influence of different doses and different number sessions of low-level laser irradiation in the repair of bone defects in calvaria of Wistar female rats model of osteoporosis.** 2014. 98 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Low-level laser irradiation (LLLI) is a new methodology with proven clinical benefits in increased formation and decreased resorption of bone, however, the use of LLLI still needs to be clarified and standardized. Therefore, more studies are needed to analyze the effects of different parameters, such as wavelength, duration of application and number of sessions. This study aimed to assess the effects of LLLI on critical bone defects in rat calvaria used as an experimental model of osteoporosis. Light microscopy was used to analyze the quality of newly formed bone tissue and stereology was used to calculate the following parameters: tissue repair volume (V_{tr} - μm^3), volume density of trabecular bone (V_{vt}), total volume of newly formed trabecular bone (V_{tot} - μm^3), numerical density of osteocytes (N_{vost} - μm^{-3}), total number of osteocytes (N_{toost}), mean volume of osteocytes (V_{nost} - μm^3), surface density of trabecular bone (S_{vt} - μm^{-1}) and area surface of trabecular bone (S_{at} - μm^2). The total amount of collagen was also examined (A_c - μm^2). Fifty-four Wistar rats were subjected to bilateral ovariectomy. The bone defects were created in calvaria after 150 days. The animals were divided into 9 groups (n=6) and 24 hours after creating the defect, the treatment started with 780nm low intensity gallium-aluminum-arsenide (GaAlAs) laser: Groups 1, 2 and 3 (G1, G2 and G3) received the energy density of 0 J/cm², 20 J/cm² and 30 J/cm² respectively, in 3 sessions; Groups 4, 5 and 6 (G4, G5 and G6) received 0 J/cm², 20 J/cm² and 30 J/cm² respectively, in 6 sessions; Groups 7, 8 and 9 (G7, G8 and G9) received 0 J/cm², 20 J/cm² and 30 J/cm² respectively, in 12 sessions. For the comparison between groups G2 and G1, the results obtained were significant for V_{tr} (p=0,023), V_{vt} (p=0,003), V_{tot} (p=0,04), N_{toost} (p=0,048), S_{vt} (p=0,000), S_{at} (p=0,001) and A_c (p=0,000). For the comparison between G3 and G1, the results were significant for V_{vt} (p=0,002) and V_{tot} (p=0,02). For the comparison between G5 and G4, the results were significant for S_{vt} (p=0,041) and S_{at} (p=0,043) and for the comparison between G6 and G4, the results were significant for V_{tr} (p=0,005), V_{vt} (p=0,000), V_{tot} (p=0,000), N_{vost} (p=0,025), N_{toost} (p=0,011), S_{vt} (p=0,034), S_{at} (p=0,028) and A_c (p=0,001). The comparison between G8 and G7 was significant for S_{at} (p=0,047) and for the comparison between G9 and G7, the results were significant for V_{tr} (p=0,014), V_{vt} (p=0,000), V_{tot} (p=0,000), N_{vost} (p=0,025), N_{toost} (p=0,024), S_{vt} (p=0,042), S_{at} (p=0,014) and A_c (p=0,023). In conclusion, there was new bone formation in the groups that received doses of 20 and 30 J/cm² when compared with the respective control groups, but over time, the dose of 30 J/cm² showed better stereological parameters when compared to 20 J/cm².

Keywords: Low-level laser irradiation. Osteoporosis. Steriology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	a) Excisão do ovário. b) Ovário completamente excisionado. c) Sutura do peritônio e da musculatura. d) Aspecto após finalização da sutura.....	34
Figura 2.	Administração de pentabiótico via intramuscular.....	35
Figura 3.	Coleta do fluido vaginal.....	36
Figura 4.	Fotomicrografia do fluido vaginal não corado, de rata na fase diestro, com predominância de leucócitos (Objetiva 10×).....	37
Figura 5.	Cornos uterinos atrofiados confirmando o sucesso da ovariectomia....	38
Figura 6.	Em A: realização da incisão sagital na região lateral da calvária (osso parietal direito). Em B: aspecto da incisão sagital na região lateral da calvária (osso parietal direito). Em C: confecção do defeito no osso parietal esquerdo com a broca trefina de 5 mm de diâmetro e sob constante irrigação. Em D: aspecto da calvária seccionada.....	39
Figura 7.	Aspecto da sutura na calvária.....	40
Figura 8.	Em A: Pontos de referência marcados com tinta vermelha no limite do defeito ósseo. Em B: Aplicação do laser na área periférica do defeito ósseo.....	43
Figura 9.	Amostra de tecido ósseo contendo a área cicatricial e tecido ósseo remanescente adjacente (margem de segurança).....	44
Figura 10.	Em a: “isector” confeccionado em silicone para a obtenção das esferas. Em b: vista aproximada do “isector”, onde foi inserida a amostra de tecido ósseo.....	46
Figura 11.	Sistema–teste utilizado sobre imagem histológica obtida em objetiva de 2,5× para a contagem de pontos do osso neoformado e do tecido de reparação do defeito. Coloração: Hematoxilina e Eosina. +: Pontos que recaem no tecido de reparação; ±: Pontos sobre o osso neoformado.....	48

Figura 12.	Esquema representativo do método de contagem “two way”. No quadro à esquerda os círculos amarelos representam os osteócitos da secção de referência. À direita (secção “look up”) pode-se observar que três osteócitos que apareciam na secção de referência, não apareciam na secção “look up” (representados pelo X vermelho). Da mesma forma os osteócitos que apareciam na secção “look up” e que não apareciam na secção de referência estão representados por um X azul. Assim neste exemplo foram contados quatro osteócitos.....	49
Figura 13.	Sistema-teste utilizado sobre imagem histológica obtida em objetiva de 40× para a contagem de pontos que recaíam sobre os osteócitos (+). Coloração: Hematoxilina e Eosina.....	51
Figura 14.	Sistema-teste utilizado sobre imagem histológica obtida em objetiva de 40× para a contagem de intersecções com o tecido ósseo neoformado. Intersecções estão representadas pelo círculo vermelho. Coloração: Hematoxilina e Eosina.....	52
Figura 15.	Imagem histológica do tecido ósseo da calvária de ratas ovariectomizadas. Coloração: Sirius Red. Objetiva: 20×.....	53
Figura 16.	Imagem histológica representativa do Grupo Controle (0 J/cm ² – 3 sessões), região periférica do defeito ósseo. OR: osso remanescente; TC: tecido conjuntivo e VS: vaso sanguíneo. Coloração: Tricrômio de Masson. Objetiva: 20×.....	56
Figura 17.	Imagem histológica representativa do Grupo Controle (0 J/cm ² – 3 sessões), região periférica do defeito ósseo. FC: fibras colágenas e Fb: fibroblastos. Coloração: Tricrômio de Masson. Objetiva: 40×.....	56
Figura 18.	Imagem histológica representativa do Grupo 20 J/cm ² (3 sessões), região periférica do defeito ósseo. OR: osso remanescente e ON: osso neoformado. Coloração: Tricrômio de Masson. Objetiva: 20×....	57
Figura 19.	Imagem histológica representativa do Grupo 20 J/cm ² (3 sessões), região periférica do defeito ósseo. C: capilar; L: lacuna; Oc: osteócito; Ob: osteoblasto e TCo: tecido conjuntivo em organização. Coloração: Tricrômio de Masson. Objetiva: 40×.....	57
Figura 20.	Imagem histológica representativa do Grupo 30 J/cm ² (3 sessões), região periférica do defeito ósseo. OR: osso remanescente e ON: osso neoformado. Coloração: Tricrômio de Masson. Objetiva: 20×....	58

Figura 21.	Imagem histológica representativa do Grupo 30 J/cm ² (3 sessões), região periférica do defeito ósseo. ON: osso neoformado; CM: cavidade medular; L: lacuna; Oc: osteócito e Ob: osteoblasto. Coloração: Tricrômio de Masson. Objetiva: 40×.....	58
Figura 22.	Imagem histológica representativa do Grupo Controle (0 J/cm ² – 6 sessões), região periférica do defeito ósseo. OR: osso remanescente; ON: osso neoformado; P: perióstio e TC: tecido conjuntivo. Coloração: Tricrômio de Masson. Objetiva: 20×.....	60
Figura 23.	Imagem histológica representativa do Grupo Controle (0 J/cm ² – 6 sessões), região periférica do defeito ósseo. C: capilar; CM: cavidade medular; L: lacuna; Oc: osteócito e Ob: osteoblasto. Coloração: Tricrômio de Masson. Objetiva: 40×.....	60
Figura 24.	Imagem histológica representativa do Grupo 20 J/cm ² (6 sessões), região periférica do defeito ósseo. OR: osso remanescente; ON: osso neoformado; CM: cavidade medular e Ob: osteoblasto. Coloração: Tricrômio de Masson. Objetiva: 20×.....	61
Figura 25.	Imagem histológica representativa do Grupo 20 J/cm ² (6 sessões), região periférica do defeito ósseo. TCo: tecido conjuntivo em organização; L: lacuna; Oc: osteócito e VS: vaso sanguíneo. Coloração: Tricrômio de Masson. Objetiva: 40×.....	61
Figura 26.	Imagem histológica representativa do Grupo 30 J/cm ² (6 sessões), região periférica do defeito ósseo. OR: osso remanescente; P: perióstio; ON: osso neoformado; CM: cavidade medular e TC: tecido conjuntivo. Coloração: Tricrômio de Masson. Objetiva: 20×...	62
Figura 27.	Imagem histológica representativa do Grupo 30 J/cm ² (6 sessões), região periférica do defeito ósseo. L: lacuna; Oc: osteócito; Ob: osteoblasto e TCo: tecido conjuntivo em organização. Coloração: Tricrômio de Masson. Objetiva: 40×.....	62
Figura 28.	Imagem histológica representativa do Grupo Controle (0 J/cm ² – 12 sessões), região periférica do defeito ósseo. OR: osso remanescente; ON: osso neoformado; P: perióstio; TC: tecido conjuntivo e C: capilar. Coloração: Tricrômio de Masson. Objetiva: 20×.....	64
Figura 29.	Imagem histológica representativa do Grupo Controle (0 J/cm ² – 12 sessões), região periférica do defeito ósseo. L: lacuna; Oc: osteócito e Ob: osteoblasto. Coloração: Tricrômio de Masson. Objetiva: 40×.....	64

Figura 30.	Imagem histológica representativa do Grupo 20 J/cm ² (12 sessões), região periférica do defeito ósseo. OR: osso remanescente; ON: osso neoformado; CM: cavidade medular; VS: vaso sanguíneo; P: perióstio e TCo: tecido conjuntivo em organização. Coloração: Tricrômio de Masson. Objetiva: 20×.....	65
Figura 31.	Imagem histológica representativa do Grupo 20 J/cm ² (12 sessões), região periférica do defeito ósseo. OR: osso remanescente; ON: osso neoformado; CM: cavidade medular; VS: vaso sanguíneo; P: perióstio e TCo: tecido conjuntivo em organização. Coloração: Tricrômio de Masson. Objetiva: 20×.....	65
Figura 32.	Imagem histológica representativa do Grupo 30 J/cm ² (12 sessões), região periférica do defeito ósseo. OR: osso remanescente; ON: osso neoformado e TCo: tecido conjuntivo em organização. Coloração: Tricrômio de Masson. Objetiva: 20×.....	66
Figura 33.	Imagem histológica representativa do Grupo 30 J/cm ² (12 sessões), região periférica do defeito ósseo. L: lacuna; Oc: osteócito; Ob: osteoblasto e TCo: tecido conjuntivo em organização. Coloração: Tricrômio de Masson. Objetiva: 40×.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Médias e erros-padrão do volume do tecido de reparação (V_{tr}); densidade de volume das trabéculas (V_{vt}), volume total das trabéculas ósseas neoformadas (V_{tot}), densidade numérica de osteócitos (N_{vost}), número total de osteócitos (N_{toost}), volume médio dos osteócitos (V_{nost}), densidade de superfície das trabéculas (S_{vt}), superfície de área das trabéculas (S_{at}) e área de colágeno (A_c) nos grupos de 0 J/cm ² , 20 J/cm ² e 30 J/cm ² – 3 sessões.....	67
Tabela 2.	Médias e erros-padrão do volume do tecido de reparação (V_{tr}); densidade de volume das trabéculas (V_{vt}), volume total das trabéculas ósseas neoformadas (V_{tot}), densidade numérica de osteócitos (N_{vost}), número total de osteócitos (N_{toost}), volume médio dos osteócitos (V_{nost}), densidade de superfície das trabéculas (S_{vt}), superfície de área das trabéculas (S_{at}) e área de colágeno (A_c) nos grupos de 0 J/cm ² , 20 J/cm ² e 30 J/cm ² – 6 sessões.....	71
Tabela 3.	Médias e erros-padrão do volume do tecido de reparação (V_{tr}); densidade de volume das trabéculas (V_{vt}), volume total das trabéculas ósseas neoformadas (V_{tot}), densidade numérica de osteócitos (N_{vost}), número total de osteócitos (N_{toost}), volume médio dos osteócitos (V_{nost}), densidade de superfície das trabéculas (S_{vt}), superfície de área das trabéculas (S_{at}) e área de colágeno (A_c) nos grupos de 0 J/cm ² , 20 J/cm ² e 30 J/cm ² – 12 sessões.....	75

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1.	Em A: valores médios do volume do tecido de reparação (μm^3) nos Grupos Controle (0 J/cm ²), 20 J/cm ² e 30 J/cm ² - 3 sessões. Em B: densidade de volume da trabécula nos Grupos Controle (0 J/cm ²), 20 J/cm ² e 30 J/cm ² - 3 sessões.....	68
Gráfico 2.	Em A: volume total de osso neoformado (μm^3) nos Grupos Controle (0 J/cm ²), 20 J/cm ² e 30 J/cm ² - 3 sessões. Em B: valores médios da densidade numérica de osteócitos (μm^{-3}) nos Grupos Controle (0 J/cm ²), 20 J/cm ² e 30 J/cm ² - 3 sessões.....	68
Gráfico 3.	Em A: número total de osteócitos nos Grupos Controle (0 J/cm ²), 20 J/cm ² e 30 J/cm ² - 3 sessões. Em B: volume médio dos osteócitos (μm^3) nos Grupos Controle (0 J/cm ²), 20 J/cm ² e 30 J/cm ² - 3 sessões.....	69
Gráfico 4.	Em A: valores médios da densidade de superfície das trabéculas (μm^{-1}) nos Grupos Controle (0 J/cm ²), 20 J/cm ² e 30 J/cm ² - 3 sessões. Em B: superfície de área das trabéculas (μm^2) nos Grupos Controle (0 J/cm ²), 20 J/cm ² e 30 J/cm ² - 3 sessões.....	69
Gráfico 5.	Área de colágeno (μm^2) nos Grupos Controle (0 J/cm ²), 20 J/cm ² e 30 J/cm ² - 3 sessões.....	70
Gráfico 6.	Em A: valores médios do volume do tecido de reparação (μm^3) nos Grupos Controle (0 J/cm ²), 20 J/cm ² e 30 J/cm ² - 6 sessões. Em B: densidade de volume da trabécula nos Grupos Controle (0 J/cm ²), 20 J/cm ² e 30 J/cm ² - 6 sessões.....	72
Gráfico 7.	Em A: volume total de osso neoformado (μm^3) nos Grupos Controle (0 J/cm ²), 20 J/cm ² e 30 J/cm ² - 6 sessões. Em B: valores médios da densidade numérica de osteócitos (μm^{-3}) nos Grupos Controle (0 J/cm ²), 20 J/cm ² e 30 J/cm ² - 6 sessões.....	72
Gráfico 8.	Em A: número total de osteócitos nos Grupos Controle (0 J/cm ²), 20 J/cm ² e 30 J/cm ² - 6 sessões. Em B: volume médio dos osteócitos (μm^3) nos Grupos Controle (0 J/cm ²), 20 J/cm ² e 30 J/cm ² - 6 sessões.....	73
Gráfico 9.	Em A: valores médios da densidade de superfície das trabéculas (μm^{-1}) nos Grupos Controle (0 J/cm ²), 20 J/cm ² e 30 J/cm ² - 6 sessões. Em B: superfície de área das trabéculas (μm^2) nos Grupos Controle (0 J/cm ²), 20 J/cm ² e 30 J/cm ² - 6 sessões.....	73

Gráfico 10.	Área de colágeno (μm^2) nos Grupos Controle (0 J/cm ²), 20 J/cm ² e 30 J/cm ² - 6 sessões.....	74
Gráfico 11	Em A: valores médios do volume do tecido de reparação (μm^3) nos Grupos Controle (0 J/cm ²), 20 J/cm ² e 30 J/cm ² - 12 sessões. Em B: densidade de volume da trabécula nos Grupos Controle (0 J/cm ²), 20 J/cm ² e 30 J/cm ² - 12 sessões.....	76
Gráfico 12.	Em A: volume total de osso neoformado (μm^3) nos Grupos Controle (0 J/cm ²), 20 J/cm ² e 30 J/cm ² - 12 sessões. Em B: valores médios da densidade numérica de osteócitos (μm^{-3}) nos Grupos Controle (0 J/cm ²), 20 J/cm ² e 30 J/cm ² - 12 sessões.....	76
Gráfico 13.	Em A: número total de osteócitos nos Grupos Controle (0 J/cm ²), 20 J/cm ² e 30 J/cm ² - 12 sessões. Em B: volume médio dos osteócitos (μm^3) nos Grupos Controle (0 J/cm ²), 20 J/cm ² e 30 J/cm ² - 12 sessões.....	77
Gráfico 14.	Em A: valores médios da densidade de superfície das trabéculas (μm^{-1}) nos Grupos Controle (0 J/cm ²), 20 J/cm ² e 30 J/cm ² - 12 sessões. Em B: superfície de área das trabéculas (μm^2) nos Grupos Controle (0 J/cm ²), 20 J/cm ² e 30 J/cm ² - 12 sessões.....	77
Gráfico 15.	Área de colágeno (μm^2) nos Grupos Controle (0 J/cm ²), 20 J/cm ² e 30 J/cm ² - 12 sessões.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
FORP	Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
ON	Osso Neoformado
TC	Tecido Conjuntivo
USP	Universidade de São Paulo
A_c	Área de Colágeno
V_{tr}	Volume do Tecido de Reparação
V_{vt}	Densidade de Volume das Trabéculas
V_{tot}	Volume total das trabéculas ósseas neoformadas
N_{vost}	Densidade numérica de osteócitos
N_{totost}	Número total de osteócitos
V_{nost}	Volume médio dos osteócitos
V_{vost}	densidade de volume dos osteócitos
S_{vt}	Densidade de superfície das trabéculas
S_{at}	Superfície de Área das Trabéculas
V_{tot}	<i>Volume Total das Trabéculas</i>
N_{vo}	densidade numérica de osteócitos
$\sum pE$	Somatória de Pontos que tocam tecido de reparação
$a(p)$	Área Associada ao Ponto
t	Espessura média do Corte
f	Fração de secções do animal
$\sum pT$	Somatória de Pontos Sobre a Trabécula Óssea Neoformada
$\sum I$	Somatória das intersecções com o tecido ósseo
V_{TR}	Volume do Tecido de Reparação
V_{VT}	Volume Total das Trabéculas Ósseas Neoformadas
$\sum Q^-$	Somatória do Número de Núcleos de Osteócitos
$a(f)$	Área da “frame”
h	Altura do “disector”
$\sum pOst$	Somatória de Pontos Sobre os Osteócitos
V_{vost}	Densidade de Volume dos Osteócitos

$N_{V_{Ost}}$	Densidade Numérica dos Osteócitos
$\sum I$	Somatória das Intersecções com o Tecido Ósseo
ℓ	Comprimento da linha associada a um ponto teste
VS	Vaso Sanguíneo
OR	Osso Remanescente
FC	Fibras colágenas
Fb	Fibroblastos
C	Capilar
L	Lacunas
Oc	Osteócito
Ob	Osteoblasto
TCO	Tecido Conjuntivo em organização
CM	Cavidade Medular
P	Periósteo
IL-1	Interleucina - 1
IL-6	Interleucina - 6
TNF – α	Fator de necrose tumoral alfa
RNA	Ácido ribonucléico
DNA	Ácido desoxirribonucléico
RANK	Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa-B
RANKL	Ligamento Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa-B
OPG	Osteoprotegerina
RUNX-2	Fator de transcrição 2 com domínio Runt
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
U-DPD	Marcador de reabsorção óssea

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
mm	Milímetros
μm	Micrômetro
®	Marca registrada
°C	Grau Celsius
Nº	Número

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	23
2. PROPOSIÇÃO.....	30
3.MATERIAL E MÉTODO.....	32
3.1 Realização da cirurgia de ovariectomia bilateral.....	33
3.2 Avaliação do efeito da ovariectomia: exame do ciclo estral e exame macroscópico dos cornos uterinos.....	35
3.3 Realização dos defeitos ósseos e tratamentos associados.....	38
3.4 Obtenção das peças.....	43
3.5 Processamento histológico.....	44
3.6 Análise qualitativa ao microscópio de luz.....	45
3.7 Análise quantitativa – Estereologia.....	45
3.8 Análise da quantidade total de colágeno.....	53
4. RESULTADOS.....	54
5. DISCUSSÃO.....	79
6. CONCLUSÕES.....	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89
ANEXO.....	97

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

As mudanças ocorridas com o passar do tempo, tais como os avanços obtidos com as pesquisas e descobertas de novos tratamentos, principalmente durante o século XX, tem se refletido na população mundial, acarretando uma diminuição do índice de mortalidade e aumento na expectativa de vida. Este aumento vem acompanhado de várias alterações da senescência, dentre elas as doenças crônicas, como diabetes, hipertensão, problemas vasculares, artrite, osteoporose e outras (Amadei et al., 2006).

Segundo a OMS a osteoporose é uma doença sistêmica, que provoca fraturas ósseas pela perda de estrutura e ou densidade mineral dos ossos (WHO et al., 2003).

Existem diversos tipos de osteoporose: 1) osteoporose pós-menopausa cujos sintomas aparecem em mulheres dos 51 aos 75 anos de idade; 2) osteoporose senil que afeta, em geral, pessoas com mais de 70 anos e é duas vezes mais frequente nas mulheres que nos homens; 3) osteoporose secundária (induzida por outras perturbações de saúde ou por medicamentos) como a insuficiência renal crônica e certas perturbações hormonais (especialmente da tireóide, das paratireóides ou das supra-renais) ou da administração de alguns medicamentos, como corticosteróides, barbitúricos, anticonvulsivantes e quantidades excessivas de hormônio da tireóide e 4) osteoporose juvenil idiopática que é pouco frequente e de causa desconhecida e que aparece em crianças e adultos jovens, que não apresentam qualquer razão óbvia para apresentar a doença (Manual Merck, 2014).

De acordo com os dados de prevalência da National Osteoporosis Foundation (2014), atualmente estima-se que um total de 54 milhões de adultos norte-americanos com 50 anos ou mais são afetados pela osteoporose, com consequente redução na massa óssea. Para o ano de 2020, nos Estados Unidos, a estimativa é de aproximadamente 64,4 milhões e em 2030 este número aumente para 71,2 milhões, um aumento de 29% quando comparado ao ano de 2010.

O número de fraturas também irá aumentar proporcionalmente (Wright et al., 2014). No Brasil, os estudos sobre a prevalência da osteoporose são pequenos, embora seja a doença osteometabólica mais comum (Frazão e Naveira, 2006). Para o ano de 2003, a estimativa da prevalência desta doença foi entre 15 e 20% nas mulheres brasileiras com mais de 50 anos (Costa-Paiva et al., 2003).

Com relação à prevalência de todos os tipos de fratura por fragilidade óssea, estudos recentes demonstraram que a mesma é elevada, variando de 11% a 23,8%. Estudos nacionais também demonstraram que 12 meses após a fratura de fêmur, a taxa de mortalidade variou de 21,5% a 30%, com elevada taxa de incapacidade física e deterioração da qualidade de vida (Pinheiro e Eis, 2010).

Os fatores que podem contribuir para a osteoporose são a falta do hormônio estrógeno (Ko *et al.*, 2013) e de exercícios físicos (Ko *et al.*, 2011), a hereditariedade, etnia (caucasianas e orientais são mais atingidas), idade, o consumo exagerado de álcool, uso de cigarros e dieta pobre em cálcio (Aciole *et al.*, 1999).

Os principais ossos acometidos pela osteoporose são o fêmur, úmero, osso do quadril e vértebras, mas os ossos da face também podem ser atingidos (Amadei *et al.*, 2006).

O osso é constituído por um tecido conjuntivo especializado formado por células como osteócitos; osteoblastos e osteoclastos, e por um material extracelular mineralizado; o osso tem a função de sustentação do corpo formando sua estrutura, além de proteger órgãos importantes (Junqueira e Carneiro, 2004).

Os osteócitos são células maduras responsáveis pela manutenção do equilíbrio e vitalidade do tecido ósseo; os osteoblastos sintetizam a matriz óssea e se originam das células mesenquimais indiferenciadas e os osteoclastos reabsorvem a matriz óssea mineralizada e se originam de células hematopoiéticas indiferenciadas (Fundamentos de ortopedia e traumatologia).

No processo fisiológico de remodelação óssea, há o equilíbrio entre a reabsorção e a formação óssea, onde os osteoclastos reabsorvem o osso por acidificação e digestão proteolítica e os osteoblastos segregam osteóide (matriz orgânica do osso) na cavidade formada após a reabsorção (Manolagas, 2000). Em mulheres pós-menopausa, a taxa de remodelação óssea aumenta dramaticamente e permanece elevada por até quarenta anos após a cessação da função ovariana, levando a uma perda óssea contínua e progressiva (Garnero *et al.*, 1996). O aumento da remodelação óssea é, em parte, devido ao encurtamento do tempo de vida dos osteoblastos e ao prolongamento do tempo de vida dos osteoclastos (Manolagas, 2000). A perda de estrógeno acarreta aumento do ligante do receptor ativador do fator nuclear *kappa* B (RANKL), e diminuição na secreção de osteoprotegerina (OPG) pelos osteoblastos. O RANKL ativa o receptor ativador do fator nuclear *kappa* B (RANK) na superfície dos pré-osteoclastos, o que induz sua diferenciação e ativação. Este desequilíbrio induz à perda óssea rápida e aumenta o risco de fraturas.

A partir da década de 90, os cirurgiões-dentistas passaram a prestar mais atenção para a questão da densidade óssea em pacientes osteoporóticos. O diagnóstico precoce da osteoporose ou de outras desordens endócrinas ou osteometabólicas é de suma importância, pois permitem um melhor prognóstico nos procedimentos odontológicos que envolvam manipulação óssea (Yamada e Elias, 2005), tais como a implantodontia que depende de uma osseointegração satisfatória (Ourique *et al.*, 2005).

A osteoporose dificulta a instalação de próteses parciais ou totais e o seu diagnóstico também é importante para as áreas de ortodontia e periodontia (Jaime *et al.*, 2005), pois estudos sugerem que a osteoporose esteja relacionada com periodontite (Otomo-Corgel, 2012; Martínez-Maestre *et al.*, 2010; Dodd e Rowe, 2013), com perda dental e com atrofia do processo alveolar (Daniell, 1983; Gur *et al.*, 2003; Yoshihara *et al.*, 2005; Drozdowska *et al.*, 2006; Erdogan *et al.*, 2011; Moedano *et al.*, 2011).

O impacto da fratura osteoporótica é enorme, não só para os indivíduos, mas para o serviço de saúde, economia e população como um todo. Por isso, é necessário desenvolver estratégias preventivas e terapêuticas, tanto para toda a população como para aqueles com maior risco para esta doença (Harvey *et al.*, 2013).

Para uma maior qualidade de vida existem alguns tratamentos que auxiliam na tentativa de diminuir a perda de osso bem como estimular a massa óssea, como por exemplo, a prática de exercícios físicos, a reposição de estrógeno e a utilização de compostos bisfosfonatos (Da Paz *et al.*, 2001), porém novos tratamentos têm sido pesquisados, como a laserterapia em baixa intensidade que utiliza baixas irradiâncias de luz que são capazes de influenciar o comportamento celular, por meio de efeitos fotofísicos, fotoquímicos e fotobiológicos nas células dos tecidos irradiados (Karu, 1989).

A luz era utilizada como um meio de tratamento de doenças desde os primórdios da humanidade. Os gregos utilizavam a helioterapia, e os chineses também utilizavam a luz do sol para o tratamento do câncer, doenças de pele e psicose, mas foi Gordon Gold que criou o laser baseado nos princípios de Einstein datados de 1917 (Maluf *et al.*, 2005). A palavra laser é um acrônimo originário da língua inglesa cujo significado é *Light amplification by stimulated emission of radiation* e que traduzido significa “amplificação de luz por emissão estimulada de radiação” (Catão, 2004).

Existem três tipos de lâseres: de baixa, média e alta intensidade, no qual cada um tem sua própria característica e função para tratamentos na área da saúde. Os lâseres de alta intensidade são utilizados para procedimentos cirúrgicos, com efeitos térmicos com capacidade de realizarem cortes, vaporização e hemostasia. Os de média intensidade são utilizados para tratamentos fisioterápicos e os de baixa intensidade para tratamentos terapêuticos, os quais possuem características analgésicas, anti-inflamatórias e bioestimuladoras (Barros *et al.*, 2008).

Os resultados positivos do laser em baixa intensidade começaram a ser demonstrados por meio de pesquisas clínicas realizadas por Mester em 1966.

O laser em baixa intensidade tem a capacidade de ajudar o organismo diminuindo as dores e as reações inflamatórias, reduzindo o edema e auxiliando na bioestimulação, contribuindo para a regeneração tecidual (Maluf, 2005). Para isto o laser estimula os linfócitos, ativa os monócitos, eleva a produção de ATP mitocondrial além de estimular várias outras células (Lins *et al.*, 2010).

Na área da saúde, mais especificamente na área da odontologia, os lâseres em baixa intensidade mais utilizados na terapêutica são os de Hélio-Neônio (He-Ne), cujo comprimento de onda é de 632,8 nm, ou seja, na faixa de luz visível (luz vermelha) e o de Arseneto Gálio-Alumínio (GaAlAs), ou laser de diodo, com comprimento de onda de 780-830 nm, ou seja, se situa fora do espectro de luz visível (luz infravermelha) (Catão, 2004).

O laser de Hélio – Neônio é a mistura desses dois gases, pode ser indicado para lesões superficiais e profundas, porém é mais eficaz em lesões superficiais, sendo utilizado na odontologia e na dermatologia ajudando nos processos de cicatrização e reparação, nos processos inflamatórios e de dores (Genovese, 2007).

O laser de Arseneto Gálio-Alumínio é produzido pela estimulação de um diodo semicondutor, formado por arseneto, gálio e alumínio, e pode ser indicado para lesões superficiais e profundas, sendo mais eficaz em lesões profundas (Genovese, 2007), como por exemplo, nos casos de perda óssea.

Análises patofisiológicas de perda óssea são realizadas utilizando animais, como por exemplo, roedores, porcos, cães e primatas, porém a resposta desses animais em pesquisas não é 100% igual a uma resposta em humanos, pois existem diferenças fisiológicas entre eles. Assim, cada pesquisa a ser feita deve utilizar o animal que mais se assemelha com o humano (Thorndike e Turner, 1998).

No caso da osteoporose os ratos são animais bastante utilizados, pois sua estrutura óssea é muito semelhante a dos humanos. Além disso, estes animais são de baixo custo, de fácil manuseio, possuem vida mais curta podendo realizar a simulação de envelhecimento ósseo, e em fêmeas, a ovariectomia bilateral, possibilita a indução da osteoporose, por meio de uma menopausa artificial (Thorndike e Turner, 1998).

Apesar das pesquisas demonstrarem o potencial osteogênico da LLLI os seus parâmetros de utilização ainda não foram definidos. Diferentes tipos de laser em baixa intensidade têm sido utilizados, com diferentes potências, doses (densidades de energia), números de aplicações e tempos, necessitando de estudos em busca de uma padronização com relação a sua utilização.

PROPOSIÇÃO

2. PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar, por meio de análise qualitativa e análise quantitativa (estereológica), a eficácia do laser em baixa intensidade, em defeitos ósseos em calvárias de ratas com modelo experimental para a osteoporose, tratadas com diferentes doses (20 J/cm² e 30 J/cm²) e diferentes números de aplicações (3, 6 e 12 sessões)

MATERIAL E MÉTODO

3. MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizadas 54 ratas Wistar pesando aproximadamente 300g. Os animais procedentes do Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto. Foram mantidos em número de três animais por caixa de polietileno, com temperatura ambiente controlada entre máxima de 24 e mínima de 23°C e com timer programado para doze horas de iluminação diária. Estes receberam ração e água “ad libitum”.

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - Protocolo nº 11.1.639.53.5 (Anexo 1).

3.1 Realização da cirurgia de ovariectomia bilateral

Após a primeira semana as ratas foram ovariectomizadas bilateralmente.

Os animais foram pesados e anestesiados com a solução anestésica de xilazina (Coopazine, Schering-Plough/Coopers, Cotia, SP, Brasil) e cloridrato de cetamina (Dopalen) anestésico geral, fornecido pela Ceva Brasil (Paulínia, SP, Brasil), na proporção de 75mg/Kg de cloridrato de cetamina e de 10mg/Kg de xilazina, injetada por via intramuscular.

Após a anestesia, os animais foram submetidos à tricotomia das regiões laterais, e em seguida, foi feita a antissepsia dos locais que seriam incisionados com álcool iodado (PVPI).

Foram realizadas incisões cutâneas bilaterais e o tecido muscular foi divulsionado para a exposição dos ovários (Figura 1a) e excisão dos mesmos (Figura 1b), (Kalu, 1991). Procedeu-se então à sutura dos tecidos com fio de seda 4.0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil) de modo a fechar devidamente as margens do retalho (Figura 1c e d).

Figura 1. a) Excisão do ovário. b) Ovário completamente excisionado. c) Sutura do peritônio e da musculatura. d) Aspecto após finalização da sutura.

Em seguida, cada animal recebeu em dose única, via intramuscular, 0,1 mL/100 g de penicilina (Pentabiotic Veterinário Pequeno Porte - Fort Dodge®, Campinas, SP, Brasil) (Figura 2). Quando as ratas estavam acordando da anestesia, foi administrado via intramuscular, 0,2mL/100g do anti-inflamatório Banamine® (Injetável Pet - Schering-Plough, Cotia, SP, Brasil).

Figura 2. Administração de pentabiótico via intramuscular

Os animais foram mantidos em número de três por caixa, por cento e cinquenta dias, e receberam ração e água “ad libitum”. Ficaram sob observação constante, sendo feita a limpeza de suas caixas, com troca da maravalha, três vezes por semana.

3.2 Avaliação do efeito da ovariectomia: exame do ciclo estral e exame macroscópico dos cornos uterinos

Após 14 dias, foi realizado o exame do ciclo estral por meio da coleta de líquido vaginal por um período consecutivo de 5 dias, sempre pela manhã. Com o auxílio de uma micropipeta acoplada a uma ponteira pequena, foi introduzida uma dose de solução salina (cerca de 1mL) no interior da vagina da rata. Logo após, a solução foi rapidamente aspirada e o conteúdo foi transferido para uma lâmina de vidro para observação imediata em microscópio óptico (Hoar e Hickman, 1975; Marcondes *et al.*, 2002); (Figura 3).

De acordo com a literatura, esta técnica é ideal para investigar as mudanças ocorridas no ciclo reprodutivo. O período do ciclo estral das ratas dura de 4 a 5 dias e pode ser dividido

em quatro fases: metaestro, diestro, proestro e estro. Em cada uma das fases, há o predomínio de determinado hormônio sexual e de um tipo celular. As células predominantes podem ser observadas nos esfregaços da vagina. Na fase metaestro, há o predomínio de leucócitos e a presença de algumas células epiteliais anucleadas remanescentes. Nesta fase inicia-se o aumento da secreção de estrógeno e o primeiro pico de progesterona. Na fase diestro predominam basicamente leucócitos e há presença de algumas células epiteliais nucleadas, sendo marcada pelo final do primeiro pico de progesterona e por baixos níveis de estrógeno. Na fase proestro há o aumento do número de células epiteliais nucleadas e o desaparecimento quase completo dos leucócitos, concomitante com o pico de secreção de estrógeno e o segundo pico de progesterona. Na fase estro há o predomínio de células epiteliais queratinizadas da camada córnea e o nível de estrógeno retorna aos valores basais (Hoar e Hickman, 1975; Marcondes *et al.*, 2002). Os animais utilizados neste estudo e que foram submetidos a ovariectomia bilateral, permaneceram sempre na fase diestro que é marcada pelo final do primeiro pico de progesterona e baixos níveis de estrógeno (Figura 4).

Figura 3. Coleta do fluido vaginal.

Figura 4. Fotomicrografia do fluido vaginal não corado, de rata na fase diestro, com predominância de leucócitos (Objetiva 10×).

Durante o processo de eutanásia dos animais, o efeito da ovariectomia também foi avaliado por meio do exame macroscópico dos cornos uterinos. Assim, antes do sacrifício, foi realizada uma incisão na região abdominal para localização destas estruturas. Os animais ovariectomizados bilateralmente apresentavam os cornos uterinos finos, atróficos e anêmicos (Chicarelli *et al.*, 2007); (Figura 5).

Figura 5. Cornos uterinos atrofiados confirmando o sucesso da ovariectomia.

3.3 Realização dos defeitos ósseos e tratamentos associados

Após cento cinquenta dias pós-ovariectomização bilateral foram criados os defeitos ósseos na calvária. Os animais foram pesados e anestesiados com a solução anestésica de xilazina (Coopazine, Schering-Plough/Coopers, Cotia, SP, Brasil) e cloridrato de cetamina (Dopalen, Ceva Brasil - Paulínia, SP, Brasil) na proporção de 75mg/Kg de cloridrato de cetamina e de 10mg/Kg de xilazina, injetada por via intramuscular. Foi feita a tricotomia, aplicação de álcool iodado e uma incisão sagital de aproximadamente 1 cm de extensão na região do osso parietal direito, com lâmina de bisturi estéril número 24, previamente montada em cabo de bisturi número 4, de modo a expor a região óssea (Figura 6a).

Com a calota devidamente exposta (Figura 6b), criou-se um defeito ósseo na região central do osso parietal esquerdo, afastado da região da sutura sagital mediana. Para isso utilizou-se uma broca trefina de 5 mm de diâmetro adaptada em contra-ângulo e com o auxílio de um motor elétrico para implantes (Dentscler, Ribeirão Preto, SP, Brasil), ajustado em 3000

rpm, com constante e abundante irrigação com soro fisiológico 0,9%, procedeu-se à perfuração, criando-se um defeito cilíndrico de 5 mm de diâmetro e 1 mm de profundidade, estando esta dimensão dentro dos padrões citados na literatura (Figura 6c e d).

Figura 6. Em A: realização da incisão sagital na região lateral da calvária (osso parietal direito). Em B: aspecto da incisão sagital na região lateral da calvária (osso parietal direito). Em C: confecção do defeito no osso parietal esquerdo com a broca trefina de 5 mm de diâmetro e sob constante irrigação. Em D: aspecto da calvária seccionada.

Procedeu-se então à sutura dos tecidos. A pele do animal, juntamente com o periósteo foi reposicionada à sua posição original, suturada com fio de seda 4.0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil), de modo a fechar devidamente as margens do retalho (Figura 7). Em seguida, cada animal recebeu, via intramuscular, uma única dose (0,1 mL/100 g) de penicilina (Pentabiotic Veterinário Pequeno Porte - Fort Dodge®, Campinas, SP, Brasil).

Figura 7.Aspecto da sutura na calvária.

Após o procedimento cirúrgico, os animais foram divididos aleatoriamente em nove grupos contendo seis animais cada, de acordo com o tipo de tratamento que receberiam (Quadro 1) e ficaram sob observação constante, sendo feita a limpeza de suas caixas, com troca da maravalha, três vezes por semana.

Quadro 1. Tratamentos a que foram submetidos os animais

Grupos	Tratamentos
1	defeito ósseo (controle) - simulação de aplicação de laser - 3 sessões
2	defeito ósseo + aplicação de laser (20 J/cm ²) - 3 sessões
3	defeito ósseo + aplicação de laser (30 J/cm ²) - 3 sessões
4	defeito ósseo (controle) - simulação de aplicação de laser - 6 sessões
5	defeito ósseo + aplicação de laser (20 J/cm ²) - 6 sessões
6	defeito ósseo + aplicação de laser (30 J/cm ²) - 6 sessões
7	defeito ósseo (controle) - simulação de aplicação de laser - 12 sessões
8	defeito ósseo + aplicação de laser (20 J/cm ²) - 12 sessões
9	defeito ósseo + aplicação de laser (30 J/cm ²) - 12 sessões

Aplicação de laser

Foi utilizado o aparelho Twin Laser (Mm Optics, São Carlos, SP, Brasil) com as seguintes especificações: frequência de 50/60 Hz, voltagem de 100~240 V, potência óptica máxima de 70 mW, dosagem máxima de 315 J/cm², comprimento de onda de 780 nm, meio semiconductor de Arseneto Gálio-Alumínio (AsGaAl).

Os animais foram pesados e anestesiados com a solução anestésica de xilazina (Coopazine, Schering-Plough/Coopers, Cotia, SP, Braisl) e cloridrato de cetamina (Dopalen, Ceva Brasil - Paulínia, SP, Brasil) na proporção de 75mg/Kg de cloridrato de cetamina e de 10mg/Kg de xilazina, injetada por via intramuscular, e foram aplicadas 3, 6 e 12 sessões de laser. Os protocolos de irradiação iniciaram-se 24 horas após o procedimento cirúrgico e foram realizados a cada 48 horas. A aplicação foi feita na área correspondente à região do defeito ósseo. Os animais que receberam 3 sessões de laser, foram sacrificados no 7º dia após a criação do defeito ósseo; os que receberam 6 sessões de laser, no 13º dia; e os que receberam 12 sessões de laser foram sacrificados no 25º dia após a criação do defeito (Fávaro-Pípi *et al.*, 2011).

A aplicação de laser seguiu os seguintes parâmetros:

Densidade de energia (dose)	20 J/cm ²	20 J/cm ²	20 J/cm ²	30 J/cm ²	30 J/cm ²	30 J/cm ²
Potência utilizada	40 mW	40 mW	40 mW	40 mW	40 mW	40 mW
Tempo de aplicação total	100s	100s	100s	150s	150s	150s
Tempo de aplicação por ponto	20s	20s	20s	30s	30s	30s
Área do feixe laser de saída	0,04 cm ²	0,04 cm ²	0,04 cm ²	0,04 cm ²	0,04 cm ²	0,04 cm ²
Comprimento de onda	780 nm (ir)	780 nm (ir)	780 nm (ir)	780 nm (ir)	780 nm (ir)	780 nm (ir)
Tipo de laser	AsGaAl diodo	AsGaAl diodo	AsGaAl diodo	AsGaAl diodo	AsGaAl diodo	AsGaAl diodo
Número de aplicações	3	6	12	3	6	12
Número de pontos de aplicação	5	5	5	5	5	5
Energia depositada por ponto	0,8	0,8	0,8	1,2	1,2	1,2
Energia depositada na lesão por dia	4,0 J	4,0 J	4,0 J	6,0 J	6,0 J	6,0 J
Energia acumulada de todas as sessões	12,0 J	24,0 J	48,0 J	18,0 J	36,0 J	72,0 J
Intensidade de energia (Irradiância)	1,0 W/cm ²	1,0 W/cm ²	1,0 W/cm ²	1,0 W/cm ²	1,0 W/cm ²	1,0 W/cm ²
Modo de emissão	Contínuo	Contínuo	Contínuo	Contínuo	Contínuo	Contínuo
Direção de aplicação	Perpendicular	Perpendicular	Perpendicular	Perpendicular	Perpendicular	Perpendicular
Forma de aplicação	Com contato	Com contato	Com contato	Com contato	Com contato	Com contato

Para se estabelecer com precisão a área do defeito ósseo, a pele do animal foi tracionada e foi feita palpação permitindo assim a sua correta localização. Foram feitas na pele do animal, quatro marcações com tinta vermelha, que serviram como pontos de referência (Figura 8a). O defeito ósseo foi irradiado em 5 pontos, sendo quatro pontos na periferia, intercalados às marcações vermelhas e uma aplicação central. Foi utilizado o comprimento de onda de 780 nm (infravermelho), com 40 mW de potência (Figura 8b).

Figura 8. Em A: Pontos de referência marcados com tinta vermelha no limite do defeito ósseo. Em B: Aplicação do laser na área periférica do defeito ósseo.

Para evitar contaminações cruzadas e como medida de higiene, a ponta ativa do laser foi protegida com plástico (PVC) descartável. A colocação do filme de PVC foi feita de tal forma que o mesmo ficasse bem esticado, evitando a difusão do feixe de luz na saída da caneta.

Os animais dos grupos controles foram anestesiados na mesma quantidade de vezes que os animais dos grupos irradiados e foi simulada a aplicação do laser (0 J/cm^2).

3.4 Obtenção das peças

Sacrifício dos animais

Para o sacrifício, os animais receberam, via intramuscular, overdose da solução anestésica de xilazina (Coopazine, Schering-Plough/Coopers, Cotia, SP, Brasil) e cloridrato

de cetamina (Dopalen, Ceva Brasil - Paulínia, SP, Brasil) na proporção de 150mg/Kg de cloridrato de cetamina e de 10mg/Kg de xilazina. A calvária foi seccionada e removida. Foram obtidos fragmentos ósseos que continham o defeito ósseo com margem de segurança (Figura 9).

Figura 9. Amostra de tecido ósseo contendo a área cicatricial e tecido ósseo remanescente adjacente (margem de segurança).

3.5 Processamento histológico

Após a coleta dos fragmentos, estes foram imersos em formaldeído a 4% tamponado, por 24 horas. Em seguida, os espécimes foram descalcificados em EDTA+TRIS a 0,5M, e as soluções foram trocadas a cada dois dias. Após o período de descalcificação (30 dias), a ação do ácido foi neutralizada em uma solução de sulfato de sódio a 5%, por 24 horas. Após esse período os fragmentos foram desidratados em séries crescentes de álcoois, diafanizados em xilol e embebidos em parafina. Foram, então, realizados cortes verticais ao tecido com espessura de 5 μ m. Estes foram corados em Tricrômio de Masson o que permitiu uma avaliação morfológica detalhada do tecido ósseo neoformado (análise qualitativa).

Para a análise quantitativa, os fragmentos foram desidratados em séries crescentes de álcoois (70% por 2 horas e 90% por 2 horas), infiltrados por álcool 95% e historesina por 3 horas e em historesina pura por mais 3 horas. Para emblocar o material, utilizou-se a historesina associada ao polimerizador, em estufa a 37°C, overnight. Foram, então, realizados cortes verticais ao tecido com 2,5 µm de espessura. Estes foram corados em Hematoxilina e Eosina e Sirius Red.

3.6 Análise qualitativa ao microscópio de luz

A análise qualitativa das lâminas permitiu avaliar o osso neoformado na área de criação do defeito ósseo, bem como diferenciar o osso existente e o neoformado nos grupos experimentais. Foi utilizado um microscópio de luz DM 4000B (Leica, Wetzlar, Alemanha), acoplado a uma câmera digital de vídeo DFC 310 FX (Leica, Wetzlar, Alemanha) para captura das imagens as quais foram analisadas em objetivas de 10×, 20× e 40×.

3.7 Análise quantitativa – Estereologia

A análise estereológica foi feita em colaboração com o Laboratório de Estereologia Estocástica e Anatomia Química (LSSCA) do Departamento de Cirurgia da FMVZ/USP, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Antonio Augusto Coppi.

Para a obtenção de secções isotrópicas e uniformemente aleatórias, foi confeccionado o “isector”, que é um método prático de obtenção de um molde esférico (Figura 10a e b). A amostra de tecido ósseo foi colocada no “isector” e embebida com resina. Uma vez que a resina estivesse polimerizada com a amostra de tecido ósseo, retirou-se a esfera, e em uma

superfície lisa, a mesma foi empurrada em direção a uma superfície verticalizada, para que a esfera batesse na mesma e voltasse, até parar de girar. Desta maneira, qualquer região da esfera teria a mesma oportunidade de ser escolhida. Após a esfera ter parado, fez-se uma marca em seu longo eixo e emblocou-se a mesma em historesina. As secções com 2,5 μm de espessura começaram a ser feitas na região marcada pela tinta (Nyengard e Gundersen, 1992).

Figura 10. Em a: “isector” confeccionado em silicone para a obtenção das esferas. Em b: vista aproximada do “isector”, onde foi inserida a amostra de tecido ósseo.

Foram estimados os seguintes parâmetros: volume do tecido de reparação do defeito (V_{tr}), densidade de volume das trabéculas (V_{vt}), volume total das trabéculas ósseas neoformadas (V_{tot}), densidade numérica de osteócitos (N_{vost}), número total de osteócitos (N_{toost}), volume médio dos osteócitos (V_{nost}), densidade de superfície das trabéculas (S_{vt}) e superfície de área das trabéculas (S_{at}).

Para a obtenção de uma amostra significativa de cada animal realizou-se o “fractionator”, no qual em uma tabela de aleatoriedade, fracionou-se as lâminas de uma maneira que se conseguisse uma amostra de todas as regiões de interesse para posteriormente serem fotografadas.

O volume do tecido de reparação foi estimado pelo Método de Cavalieri. Foram utilizadas imagens obtidas em objetiva 2,5 $\times$ e sobre estas inseridas um sistema-teste para a

contagem dos pontos que recaíam sobre o tecido de reparação que preenchia o defeito. Após a contagem foi utilizada a seguinte fórmula.

$$V_{tr.} = \sum pE \times a(p) \times t \times f$$

Onde: $\sum pE$ é a somatória de pontos que tocavam o tecido de reparação

$a(p)$ é a área associada ao ponto

t é a espessura média do corte

f é a fração de secções feitas para o animal

Para o cálculo da densidade de volume das trabéculas ósseas neoformadas foram obtidas imagens com objetiva de 2,5× o que possibilitou a visualização de toda a área do defeito. As imagens foram organizadas no aplicativo PowerPoint e sobre estas inseriu-se o sistema-teste (em forma de cruz). Foi feita a contagem dos pontos (representados pela cruz) que recaíam sobre o tecido ósseo neoformado e dos pontos que recaíam sobre o tecido de reparação (Figura 11) e calculou-se a razão entre eles.

$$V_{vt.} = \sum pT / \sum pE$$

Onde: $\sum pT$ é a somatória de pontos sobre as trabéculas ósseas neoformadas

$\sum pE$ é a somatória de pontos que tocavam o tecido de reparação

Figura 11. Sistema-teste utilizado sobre imagem histológica obtida em objetiva de 2,5× para a contagem de pontos do osso neoformado e do tecido de reparação do defeito. Coloração: Hematoxilina e Eosina. +: Pontos que recaem no tecido de reparação; ±: Pontos sobre o osso neoformado.

Para o volume total das trabéculas ósseas neoformadas multiplicou-se o volume do tecido de reparação pela densidade de volume da trabécula óssea neoformada.

$$V_{toi} = V_{tr} \times V_{Vt}$$

Onde: V_{tr} é o volume do tecido de reparação do defeito

V_{Vt} é a densidade de volume da trabécula óssea neoformada

Para o cálculo da densidade numérica de osteócitos foi utilizado o método do “disector” físico (lâminas que possuíam dois cortes consecutivos, formando-se pares), no qual foram fotografadas em microscópio em objetiva de 40×. Foi necessário um estudo piloto para saber a quantidade de “disectors” que deveriam ser utilizados para atingir o número mínimo de 100 osteócitos (Gundersen *et al.*, 1988). Foram obtidos no mínimo 5 e no máximo 10 pares de fotografias de cada lâmina, sendo que a mesma região encontrada no quadrante da imagem

de referência deveria ser exatamente a mesma da “look-up” (secção espaçada a uma determinada altura da secção de referência) formando-se assim seus pares. Todas as imagens obtidas possuíam a “frame” que delimitava a área a ser contada. As imagens dos “disectors” foram montadas no aplicativo PowerPoint, no qual utilizou-se o método de contagem “two-way”. Este método consistiu em contar quantos osteócitos desapareciam da secção de referência para a secção “look-up” e em seguida realizou-se o procedimento inverso, e contou-se quantos osteócitos desapareciam da secção “look-up” para a secção de referência.

A densidade numérica de osteócitos por volume foi estimada pela seguinte fórmula:

$$N_{vo} = \sum Q^- / a(f) \times h$$

Onde: $\sum Q^-$ é a somatória do número de núcleos de osteócitos

$a(f)$ é a área da “frame”

h é a altura do “disector”

Figura 12. Esquema representativo do método de contagem “two way”. No quadro à esquerda os círculos amarelos representam os osteócitos da secção de referência. À direita (secção “look up”) pode-se observar que três osteócitos que apareciam na secção de referência, não apareciam na secção “look up” (representados pelo X vermelho). Da mesma forma os osteócitos que apareciam na secção “look up” e que não apareciam na secção de referência estão representados por um X azul. Assim neste exemplo foram contados quatro osteócitos.

Após a substituição dos valores na fórmula e a resolução da mesma, o resultado obtido foi dividido por 2 devido a aplicação do método “two-way” na contagem dos osteócitos.

O número total de osteócitos foi estimado multiplicando-se a densidade numérica de osteócitos pelo volume total do tecido de reparação do defeito.

$$N_{toost} = N_{vost} \times V_{tr}$$

Onde: N_{vost} é a densidade numérica de osteócitos

V_{tr} é o volume do tecido de reparação do defeito

Para a estimativa do volume médio dos osteócitos foi necessário o cálculo da densidade de volume dos osteócitos (V_{vost}). Imagens das regiões de osso neoformado foram obtidas em objetiva de 20×, permitindo a nítida visualização dos osteócitos. As imagens foram montadas no aplicativo PowerPoint e sobre as mesmas inseriu-se um sistema-teste (em forma de cruz). Contou-se os pontos que recaíam sobre os osteócitos e os pontos que recaíam sobre as trabéculas ósseas neoformadas realizando-se assim a razão entre a somatória destes.

$$V_{vost} = \sum p_{Ost} / \sum p_T$$

Onde: $\sum p_{Ost}$ é a somatória de pontos sobre os osteócitos

$\sum p_T$ é a somatória de pontos sobre as trabéculas ósseas neoformadas

Figura 13. Sistema-teste utilizado sobre imagem histológica obtida em objetiva de 40× para a contagem de pontos que recaíam sobre os osteócitos (+). Coloração: Hematoxilina e Eosina.

O volume médio dos osteócitos foi obtido por meio da razão entre a densidade de volume dos osteócitos e densidade numérica dos osteócitos.

$$Vn_{ost} = Vv_{ost} / Nv_{ost}$$

Onde: Vv_{ost} é a densidade de volume dos osteócitos

Nv_{ost} é a densidade numérica dos osteócitos

Para a densidade de superfície das trabéculas utilizou-se as mesmas imagens capturadas em objetiva de 20×. As mesmas foram montadas no aplicativo PowerPoint e inseriu-se sobre as mesmas um sistema-teste de linhas. Contou-se o número de intersecções

entre as linhas do sistema-teste e o tecido ósseo e utilizou-se a somatória de pontos estabelecidas para o cálculo da densidade de volume da trabéculas.

$$S_{vt} = 2\sum I / \ell \sum pE$$

Onde: $\sum I$ é a somatória das intersecções com o tecido ósseo

ℓ é o comprimento da linha associada a um ponto do sistema-teste

$\sum pE$ é a somatória de pontos que tocam o tecido de reparação que preenche o defeito

Figura 14. Sistema-teste utilizado sobre imagem histológica obtida em objetiva de 40× para a contagem de intersecções com o tecido ósseo neoformado. Intersecções estão representadas pelo círculo vermelho. Coloração: Hematoxilina e Eosina.

A superfície de área das trabéculas foi obtida por meio da multiplicação da densidade de superfície das trabéculas pelo volume do tecido de reparação.

$$Sa_t = Sv_t \times V_{tr}$$

Onde: Sv_t é a densidade de superfície das trabéculas

V_{tr} é o volume do tecido de reparação do defeito

3.8 Análise da quantidade total de colágeno

A análise da quantidade total de colágeno (Área de Colágeno – A_c) foi realizada em cortes de historesina corados com Sirius Red (Figura 15).

Foram obtidas imagens em objetiva de 10× com o auxílio do microscópio DM4000B (Leica, Wetzlar, Alemanha) com câmera DFC 310 FX (Leica, Wetzlar, Alemanha) acoplada e conjunto óptico para polarização (Leica, Wetzlar, Alemanha). Estas foram analisadas utilizando o software Qwin Plus (Leica, Wetzlar, Alemanha) com o objetivo de estimar a área de fração ocupada pelas fibras colágenas.

Figura 15. Imagem histológica do tecido ósseo da calvária de ratas ovariectomizadas. Coloração: Sirius Red. Objetiva: 20×.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

Análise Qualitativa

Grupos 3 sessões - G1 (0 J/cm²), G2 (20 J/cm²) e G3 (30 J/cm²)

No grupo G1 observou-se a presença de uma camada densa de tecido conjuntivo próxima à periferia do defeito ósseo e vasos sanguíneos adjacentes (Figura 16). Em maior aumento ficou evidente a organização do tecido conjuntivo constituído de grande quantidade de fibroblastos com aspecto fusiforme e densas fibras colágenas (Figura 17).

Os cortes histológicos da calvária do grupo G2 evidenciaram a presença de uma neoformação óssea próxima à periferia do defeito ósseo (Figura 18). Osteócitos alojados em lacunas da matriz osteóide, assim como osteoblastos de revestimento no tecido ósseo neoformado foram observados, juntamente com diversos capilares e tecido conjuntivo circunjacente em organização para posterior formação de matriz óssea (Figura 19).

O grupo G3 também apresentou tecido ósseo neoformado na periferia do defeito criado no protocolo experimental (Figura 20). Na Figura 21 observou-se o aspecto trabeculado do osso neoformado com presença de cavidades medulares, assim como a presença de osteoblastos de revestimento adjacentes às trabéculas ósseas e osteócitos alojados em lacunas da matriz óssea neoformada.

Figura 16. Imagem histológica representativa do Grupo Controle (0 J/cm^2 – 3 sessões), região periférica do defeito ósseo. OR: osso remanescente; TC: tecido conjuntivo e VS: vaso sanguíneo. Coloração: Tricrômio de Masson. Objetiva: 20 $\times$.

Figura 17. Imagem histológica representativa do Grupo Controle (0 J/cm^2 – 3 sessões), região periférica do defeito ósseo. FC: fibras colágenas e Fb: fibroblastos. Coloração: Tricrômio de Masson. Objetiva: 40 $\times$.

Figura 18. Imagem histológica representativa do Grupo 20 J/cm² (3 sessões), região periférica do defeito ósseo. OR: osso remanescente e ON: osso neoformado. Coloração: Tricrômio de Masson. Objetiva: 20×.

Figura 19. Imagem histológica representativa do Grupo 20 J/cm² (3 sessões), região periférica do defeito ósseo. C: capilar; L: lacuna; Oc: osteócito; Ob: osteoblasto e TCo: tecido conjuntivo em organização. Coloração: Tricrômio de Masson. Objetiva: 40×.

Figura 20. Imagem histológica representativa do Grupo 30 J/cm² (3 sessões), região periférica do defeito ósseo. OR: osso remanescente e ON: osso neoformado. Coloração: Tricrômio de Masson. Objetiva: 20×.

Figura 21. Imagem histológica representativa do Grupo 30 J/cm² (3 sessões), região periférica do defeito ósseo. ON: osso neoformado; CM: cavidade medular; L: lacuna; Oc: osteócito e Ob: osteoblasto. Coloração: Tricrômio de Masson. Objetiva: 40×.

Grupos 6 sessões – G4 (0 J/cm²), G5 (20 J/cm²) e G6 (30 J/cm²)

No grupo G4 observou-se a presença de tecido ósseo neoformado que foi encontrado próximo às paredes do defeito ósseo. Observou-se também que o tecido conjuntivo na região da periferia do defeito era uma extensão do perióstio (Figura 22). Na Figura 23 verificou-se a presença de capilares nas cavidades medulares e no tecido conjuntivo adjacente. Osteoblastos associados ao tecido ósseo neoformado e osteócitos alojados em lacunas osteocíticas amplas evidenciaram a imaturidade óssea.

No grupo G5, próximo às paredes ósseas remanescentes, também constatou-se a presença de tecido ósseo neoformado, que apresentou-se com aspecto trabeculado com inúmeros osteoblastos em sua superfície (Figura 24). No interior das trabéculas observou-se osteócitos alojados em lacunas e a presença de vasos sanguíneos. Próximo às trabéculas ósseas notou-se a presença de tecido conjuntivo em organização para formação de matriz óssea (Figura 25).

No grupo G6, assim como nos anteriores, pôde ser observado na periferia do defeito um tecido ósseo neoformado com aspecto trabeculado e cavidades medulares, além de tecido conjuntivo como uma extensão do perióstio (Figura 26). A estes achados adicionou-se a presença de osteoblastos revestindo as trabéculas e osteócitos alojados em lacunas. Próximo às trabéculas ósseas, verificou-se a presença de tecido conjuntivo em organização para posterior formação de matriz óssea (Figura 27).

Figura 22. Imagem histológica representativa do Grupo Controle (0 J/cm^2 – 6 sessões), região periférica do defeito ósseo. OR: osso remanescente; ON: osso neoformado; P: periósteo e TC: tecido conjuntivo. Coloração: Tricrômio de Masson. Objetiva: 20 $\times$.

Figura 23. Imagem histológica representativa do Grupo Controle (0 J/cm^2 – 6 sessões), região periférica do defeito ósseo. C: capilar; CM: cavidade medular; L: lacuna; Oc: osteócito e Ob: osteoblasto. Coloração: Tricrômio de Masson. Objetiva: 40 $\times$.

Figura 24. Imagem histológica representativa do Grupo 20 J/cm² (6 sessões), região periférica do defeito ósseo. OR: osso remanescente; ON: osso neoformado; CM: cavidade medular e Ob: osteoblasto. Coloração: Tricrômio de Masson. Objetiva: 20×.

Figura 25. Imagem histológica representativa do Grupo 20 J/cm² (6 sessões), região periférica do defeito ósseo. TCo: tecido conjuntivo em organização; L: lacuna; Oc: osteócito e VS: vaso sanguíneo. Coloração: Tricrômio de Masson. Objetiva: 40×.

Figura 26. Imagem histológica representativa do Grupo 30 J/cm² (6 sessões), região periférica do defeito ósseo. OR: osso remanescente; P: periósteo; ON: osso neoformado; CM: cavidade medular e TC: tecido conjuntivo. Coloração: Tricrômio de Masson. Objetiva: 20×.

Figura 27. Imagem histológica representativa do Grupo 30 J/cm² (6 sessões), região periférica do defeito ósseo. L: lacuna; Oc: osteócito; Ob: osteoblasto e TCo: tecido conjuntivo em organização. Coloração: Tricrômio de Masson. Objetiva: 40×.

Grupos 12 sessões – G7 (0 J/cm²), G8 (20 J/cm²) e G9 (30 J/cm²)

No grupo G7 também observou-se a presença de tecido ósseo neoformado com grande quantidade de capilares próximos às paredes do defeito ósseo. O tecido conjuntivo na região da periferia do defeito era uma extensão do periósteo (Figura 28). Em maior aumento ficou evidente a presença de osteócitos em lacunas osteocíticas amplas indicando a imaturidade óssea e osteoblastos circundando o tecido ósseo neoformado (Figura 29).

No grupo G8, próximo às paredes ósseas remanescentes, constatou-se a presença de tecido ósseo neoformado de aspecto trabeculado, com vasos no seu interior e presença de osteoblastos em sua superfície com osteócitos alojados em lacunas. O tecido conjuntivo estava organizado como extensão do periósteo para posterior formação de matriz óssea (Figuras 30 e 31).

O grupo G9 apresentou tecido ósseo neoformado próximo às paredes ósseas remanescentes, com a presença de osteoblastos revestindo as trabéculas e osteócitos alojados em lacunas. Próximo às trabéculas ósseas, o tecido conjuntivo se encontrava em organização para formação de matriz óssea (Figuras 32 e 33). Este grupo foi o único que apresentou osso neoformado na região central do defeito.

Figura 28. Imagem histológica representativa do Grupo Controle ($0 \text{ J/cm}^2 - 12$ sessões), região periférica do defeito ósseo. OR: osso remanescente; ON: osso neoformado; P: periósteo; TC: tecido conjuntivo e C: capilar. Coloração: Tricrômio de Masson. Objetiva: 20 $\times$.

Figura 29. Imagem histológica representativa do Grupo Controle ($0 \text{ J/cm}^2 - 12$ sessões), região periférica do defeito ósseo. L: lacuna; Oc: osteócito e Ob: osteoblasto. Coloração: Tricrômio de Masson. Objetiva: 40 $\times$.

Figura 30. Imagem histológica representativa do Grupo 20 J/cm² (12 sessões), região periférica do defeito ósseo. OR: osso remanescente; ON: osso neoformado; CM: cavidade medular; VS: vaso sanguíneo; P: periósteo e TCo: tecido conjuntivo em organização. Coloração: Tricrômio de Masson. Objetiva: 20×.

Figura 31. Imagem histológica representativa do Grupo 20 J/cm² (12 sessões), região periférica do defeito ósseo. L: lacuna; Oc: osteócito; Ob: osteoblasto; CM: cavidade medular e TCo: tecido conjuntivo em organização. Coloração: Tricrômio de Masson. Objetiva: 40×.

Figura 32. Imagem histológica representativa do Grupo 30 J/cm² (12 sessões), região periférica do defeito ósseo. OR: osso remanescente; ON: osso neoformado e TCo: tecido conjuntivo em organização. Coloração: Tricrômio de Masson. Objetiva: 20×.

Figura 33. Imagem histológica representativa do Grupo 30 J/cm² (12 sessões), região periférica do defeito ósseo. L: lacuna; Oc: osteócito; Ob: osteoblasto e TCo: tecido conjuntivo em organização. Coloração: Tricrômio de Masson. Objetiva: 40×.

Análise Quantitativa - Grupos 3 sessões

Os resultados encontrados na análise quantitativa dos Grupos de 3 sessões estão representados na Tabela 1 e nos Gráficos de 1 a 5. Pôde-se verificar que, para os parâmetros V_{tr} , V_{vt} , V_{tot} , N_{toost} , S_{vt} , S_{at} e A_c , os valores médios do Grupo que recebeu 20 J/cm² foram significativamente maiores que os do Grupo Controle (0 J/cm²) ($p < 0,05$). Os animais que receberam 30 J/cm² também apresentaram valores médios significativamente maiores que o Grupo Controle para a V_{vt} e V_{tot} ($p < 0,05$). Os resultados da N_{vost} e do V_{nost} dos Grupos que receberam 20 J/cm² e 30 J/cm² não apresentaram significância estatística quando comparados ao Grupo Controle.

Tabela 1. Médias e erros-padrão do volume do tecido de reparação (V_{tr}); densidade de volume das trabéculas (V_{vt}), volume total das trabéculas ósseas neoformadas (V_{tot}), densidade numérica de osteócitos (N_{vost}), número total de osteócitos (N_{toost}), volume médio dos osteócitos (V_{nost}), densidade de superfície das trabéculas (S_{vt}), superfície de área das trabéculas (S_{at}) e área de colágeno (A_c) nos grupos de 0 J/cm², 20 J/cm² e 30 J/cm² – 3 sessões.

	GRUPOS			<i>p</i>
	0 J/cm ²	20 J/cm ²	30 J/cm ²	
V_{tr} (μm^3)	26583907 $\pm$ 1231228	47284160 $\pm$ 7266247	29351105 $\pm$ 2615988	0,023 - (0-20 J/cm ²)
V_{vt}	0,01734543 $\pm$ 0,011	0,6929673 $\pm$ 0,002	0,05599736 $\pm$ 0,006	0,003 - (0-20 J/cm ²) 0,002 - (0-30 J/cm ²)
V_{tot} (μm^3)	465643 $\pm$ 322934	3358007 $\pm$ 655019	1633588 $\pm$ 236165	0,04 - (0-20 J/cm ²) 0,02 - (0-30 J/cm ²)
N_{vost} (μm^{-3})	0,01170552 $\pm$ 0,0026	0,01649633 $\pm$ 0,0051	0,02206332 $\pm$ 0,0043	Ns
N_{toost}	316204 $\pm$ 76632	1088368 $\pm$ 322861	516392 $\pm$ 179191	0,048 - (0-20 J/cm ²)
V_{nost} (μm^3)	1,75 $\pm$ 0,24	1,83 $\pm$ 0,22	1,95 $\pm$ 0,21	Ns
S_{vt} (μm^{-1})	4,07 $\pm$ 0,51	10,58 $\pm$ 0,44	9,49 $\pm$ 2,73	0,000 - (0-20 J/cm ²)
S_{at} (μm^2)	107891439 $\pm$ 14283362	494341319 $\pm$ 67830807	254614888 $\pm$ 67240043	0,001 - (0-20 J/cm ²)
A_c (μm^2)	0,98 $\pm$ 0,11	1,98 $\pm$ 0,13	1,33 $\pm$ 0,17	0,000 - (0-20 J/cm ²)

Gráfico 1. Em A: volume do tecido de reparação (μm^3) nos Grupos Controle (0 J/cm²), 20 J/cm² e 30 J/cm² - 3 sessões. Em B: densidade de volume da trabécula nos Grupos Controle (0 J/cm²), 20 J/cm² e 30 J/cm² - 3 sessões.

Gráfico 2. Em A: volume total de osso neoformado (μm^3) nos Grupos Controle (0 J/cm²), 20 J/cm² e 30 J/cm² - 3 sessões. Em B: densidade numérica de osteócitos (μm^{-3}) nos Grupos Controle (0 J/cm²), 20 J/cm² e 30 J/cm² - 3 sessões.

Gráfico 3. Em A: número total de osteócitos nos Grupos Controle (0 J/cm²), 20 J/cm² e 30 J/cm² - 3 sessões. Em B: volume médio dos osteócitos (μm³) nos Grupos Controle (0 J/cm²), 20 J/cm² e 30 J/cm² - 3 sessões.

Gráfico 4. Em A: densidade de superfície das trabéculas (μm⁻¹) nos Grupos Controle (0 J/cm²), 20 J/cm² e 30 J/cm² - 3 sessões. Em B: superfície de área das trabéculas (μm²) nos Grupos Controle (0 J/cm²), 20 J/cm² e 30 J/cm² - 3 sessões.

Gráfico 5. Área de colágeno (μm^2) nos Grupos Controle (0 J/cm²), 20 J/cm² e 30 J/cm² - 3 sessões.

Grupo 6 sessões - Os resultados encontrados na análise quantitativa do Grupo de 6 sessões estão representados na Tabela 2 e nos Gráficos 6 a 10. Verificou-se que, para os parâmetros V_{tr} , V_{vt} , V_{tot} , N_{vost} , N_{toost} , S_{vt} , S_{at} e A_c , os valores médios do Grupo que recebeu 30 J/cm² foram significativamente maiores que os do Grupo Controle (0 J/cm²) ($p < 0,05$). Os animais que receberam 20 J/cm² também apresentaram valores médios significativamente maiores que o Grupo Controle para a S_{vt} e S_{at} ($p < 0,05$). Os resultados do V_{nost} dos Grupos que receberam 20 J/cm² e 30 J/cm² não apresentaram significância estatística quando comparados ao Grupo Controle (0 J/cm²).

Tabela 2. Médias e erros-padrão do volume do tecido de reparação (V_{tr}); densidade de volume das trabéculas (V_{vt}), volume total das trabéculas ósseas neoformadas (V_{tot}), densidade numérica de osteócitos (N_{vost}), número total de osteócitos (N_{toost}), volume médio dos osteócitos (V_{nost}), densidade de superfície das trabéculas (S_{vt}), superfície de área das trabéculas (S_{at}) e área de colágeno (A_c) nos grupos de 0 J/cm², 20 J/cm² e 30 J/cm² – 6 sessões.

	GRUPOS			<i>P</i>
	0 J/cm ²	20 J/cm ²	30 J/cm ²	
V_{tr} (μm^3)	35691481 $\pm$ 5408997	45349808 $\pm$ 4270468	53543938 $\pm$ 5691670	0,005 - (0-30 J/cm ²)
V_{vt}	0,03758411 $\pm$ 0,017	0,7014742 $\pm$ 0,008	0,21817882 $\pm$ 0,023	0,000 - (0-30 J/cm ²)
V_{tot} (μm^3)	1655176 $\pm$ 850747	3116841 $\pm$ 400606	11241026 $\pm$ 940084	0,000 - (0-30 J/cm ²)
N_{vost} (μm^{-3})	0,01315568 $\pm$ 0,0045	0,01471286 $\pm$ 0,0013	0,02538590 $\pm$ 0,0000	0,025 - (0-30 J/cm ²)
N_{toost}	515437 $\pm$ 209503	675040 $\pm$ 103849	1359550 $\pm$ 145617	0,011 - (0-30 J/cm ²)
V_{nost} (μm^3)	1,85 $\pm$ 0,25	1,79 $\pm$ 0,24	1,91 $\pm$ 0,22	Ns
S_{vt} (μm^{-1})	25,87 $\pm$ 6,32	53,31 $\pm$ 9,35	96,72 $\pm$ 27,07	0,041 - (0-20 J/cm ²) 0,034 - (0-30 J/cm ²)
S_{at} (μm^2)	1050033624 $\pm$ 338222146	2335204328 $\pm$ 414098557	5069315713 $\pm$ 1456988461	0,043 - (0-20 J/cm ²) 0,028 - (0-30 J/cm ²)
A_c (μm^2)	1,75 $\pm$ 0,22	2,09 $\pm$ 0,23	2,86 $\pm$ 0,23	0,001 - (0-30 J/cm ²)

Gráfico 6. Em A: volume do tecido de reparação (μm^3) nos Grupos Controle (0 J/cm^2), 20 J/cm^2 e 30 J/cm^2 - 6 sessões. Em B: densidade de volume da trabécula nos Grupos Controle (0 J/cm^2), 20 J/cm^2 e 30 J/cm^2 - 6 sessões.

Gráfico 7. Em A: volume total de osso neoformado (μm^3) nos Grupos Controle (0 J/cm^2), 20 J/cm^2 e 30 J/cm^2 - 6 sessões. Em B: densidade numérica de osteócitos (μm^{-3}) nos Grupos Controle (0 J/cm^2), 20 J/cm^2 e 30 J/cm^2 - 6 sessões.

Gráfico 8. Em A: número total de osteócitos nos Grupos Controle (0 J/cm²), 20 J/cm² e 30 J/cm² - 6 sessões. Em B: volume médio dos osteócitos (μm³) nos Grupos Controle (0 J/cm²), 20 J/cm² e 30 J/cm² - 6 sessões.

Gráfico 9. Em A: densidade de superfície das trabéculas (μm⁻¹) nos Grupos Controle (0 J/cm²), 20 J/cm² e 30 J/cm² - 6 sessões. Em B: superfície de área das trabéculas (μm²) nos Grupos Controle (0 J/cm²), 20 J/cm² e 30 J/cm² - 6 sessões.

Gráfico 10 - Área de colágeno (μm^2) nos Grupos Controle (0 J/cm^2), 20 J/cm^2 e 30 J/cm^2 - 6 sessões.

Grupo 12 sessões - Os resultados encontrados na análise quantitativa do Grupo de 12 sessões estão representados na Tabela 3 e nos Gráficos 11 a 15. Pôde-se verificar que, para os parâmetros V_{tr} , V_{vt} , V_{tot} , N_{vost} , N_{toost} , S_{vt} , S_{at} e A_c , os valores médios do Grupo que recebeu 30 J/cm² foram significativamente maiores que os do Grupo Controle (0 J/cm²) ($p < 0,05$). Os animais que receberam 20 J/cm² também apresentaram valores médios significativamente maiores que o Grupo Controle para a S_{at} ($p < 0,05$). Os resultados de V_{nost} dos Grupos que receberam 20 J/cm² e 30 J/cm² não apresentaram significância estatística quando comparados ao Grupo Controle (0 J/cm²).

Tabela 3. Médias e erros-padrão do volume do tecido de reparação (V_{tr}); densidade de volume das trabéculas (V_{vt}), volume total das trabéculas ósseas neoformadas (V_{tot}), densidade numérica de osteócitos (N_{vost}), número total de osteócitos (N_{toost}), volume médio dos osteócitos (V_{nost}), densidade de superfície das trabéculas (S_{vt}), superfície de área das trabéculas (S_{at}) e área de colágeno (A_c) nos grupos de 0 J/cm², 20 J/cm² e 30 J/cm² – 12 sessões.

	GRUPOS			<i>p</i>
	0J	20J	30J	
V_{tr} (μm^3)	49487172 $\pm$ 3546312	53140948 $\pm$ 2007593	65539607 $\pm$ 3668795	0,014 - (0-30 J/cm ²)
V_{vt}	0,18454371 $\pm$ 0,0013	0,19258678 $\pm$ 0,02	0,24445 $\pm$ 0,006	0,000 - (0-30 J/cm ²)
V_{tot} (μm^3)	9143651 $\pm$ 703053	10278867 $\pm$ 1208984	15994567 $\pm$ 906558	0,000 - (0-30 J/cm ²)
N_{vost} (μm^{-3})	0,01773278 $\pm$ 0,0065	0,01832286 $\pm$ 0,0015	0,03128005 $\pm$ 0,0041	0,025 - (0-30 J/cm ²)
N_{toost}	863040 $\pm$ 294120	978422 $\pm$ 100967	2047451 $\pm$ 309730	0,024 - (0-30 J/cm ²)
V_{nost} (μm^3)	1,81 $\pm$ 0,14	1,84 $\pm$ 0,08	1,93 $\pm$ 0,13	Ns
S_{vt} (μm^{-1})	32,37 $\pm$ 5,78	51,18 $\pm$ 6,30	125,58 $\pm$ 38,10	0,042 - (0-30 J/cm ²)
S_{at} (μm^2)	1615094032 $\pm$ 312368019	2720915909 $\pm$ 353422693	7727706053 $\pm$ 1939727706	0,047 - (0-20 J/cm ²) 0,014 - (0-30 J/cm ²)
A_c (μm^2)	2,60 $\pm$ 0,26	3,06 $\pm$ 0,23	4,20 $\pm$ 0,42	0,023 - (0-30 J/cm ²)

Gráfico 11. Em A: volume do tecido de reparação (μm^3) nos Grupos Controle (0 J/cm^2), 20 J/cm^2 e 30 J/cm^2 - 12 sessões. Em B: densidade de volume da trabécula nos Grupos Controle (0 J/cm^2), 20 J/cm^2 e 30 J/cm^2 - 12 sessões.

Gráfico 12. Em A: volume total de osso neoformado (μm^3) nos Grupos Controle (0 J/cm^2), 20 J/cm^2 e 30 J/cm^2 - 12 sessões. Em B: densidade numérica de osteócitos (μm^{-3}) nos Grupos Controle (0 J/cm^2), 20 J/cm^2 e 30 J/cm^2 - 12 sessões.

Gráfico 13. Em A: número total de osteócitos nos Grupos Controle (0 J/cm²), 20 J/cm² e 30 J/cm² - 12 sessões. Em B: volume médio dos osteócitos (μm³) nos Grupos Controle (0 J/cm²), 20 J/cm² e 30 J/cm² - 12 sessões.

Gráfico 14. Em A: densidade de superfície das trabéculas (μm⁻¹) nos Grupos Controle (0 J/cm²), 20 J/cm² e 30 J/cm² - 12 sessões. Em B: superfície de área das trabéculas (μm²) nos Grupos Controle (0 J/cm²), 20 J/cm² e 30 J/cm² - 12 sessões.

Gráfico 15 - Área de colágeno (μm^2) nos Grupos Controle (0 J/cm^2), 20 J/cm^2 e 30 J/cm^2 - 12 sessões.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A gravidade da osteoporose em humanos deve-se à sua alta incidência, suas complicações a longo prazo, alto índice de mortalidade associado à dramática diminuição da qualidade de vida assim como alto custo de tratamento. A necessidade de uma melhor compreensão da natureza multifatorial desta doença e o desenvolvimento de novos métodos preventivos e terapêuticos tornam necessários a utilização de modelos animais com a presença de osteopenia (Lelovas *et al.*, 2008).

Assim, este estudo utilizou o modelo experimental para a osteoporose para verificar a ação do laser em baixa intensidade, sob diferentes doses e números de sessões, em defeitos ósseos criados em calvária de ratas e analisadas por meio da estereologia.

De acordo com Kalu *et al.* (1991) as características da perda óssea em ratas ovariectomizadas são muito semelhantes àsquelas encontradas em mulheres na pós-menopausa, tornando este modelo real, confiável e muito útil para simular a osteoporose humana. Após a ovariectomia, ocorre a ausência do estrógeno, hormônio que favorece o desenvolvimento e a maturação óssea em humanos e animais, pois este apresenta capacidade protetora frente às citocinas osteoclásticas (IL-1, IL-6 e TNF- α) impedindo a reabsorção óssea exagerada (Krum e Brown, 2008). Na menopausa, este efeito protetor é perdido. As semelhanças nas respostas patofisiológicas entre o esqueleto humano e o do rato, combinadas com as facilidades de sua criação aliado ao seu baixo custo, fazem do rato um modelo valioso na pesquisa da osteoporose (Lelovas *et al.*, 2008). É importante ressaltar que a ovariectomia por si só não induz à osteopenia e consequentemente osteoporose, mas sim, o tempo de espera associado à ovariectomia.

Os pesquisadores, na sua grande maioria, utilizam a epífise proximal da tíbia, o colo do fêmur e vértebras da região lombar como modelos experimentais, onde os tempos de espera pós-ovariectomia necessários para indução da osteopenia são bem menores.

Segundo Wronski et al. (1988 e 1989a) a epífise proximal da tíbia perde significativa quantidade de osso 14 dias pós-ovariectomização; no colo do fêmur a perda ocorre após 30 dias (Li *et al.*, 1997) e na vértebra, após 60 dias (Wronski *et al.*, 1989b). Neste estudo, a utilização de um modelo experimental para osteoporose em um osso do crânio (osso parietal), teve por finalidade contribuir com a área da odontologia, pois os ossos da calvária e da mandíbula são similares sob o ponto de vista anatômico, por consistirem de uma camada de osso medular envolto por duas corticais ósseas. Assim, a confecção de defeitos ósseos mandibulares podem ser representados, para fins de pesquisa, por meio das feridas ósseas produzidas na calvária dos ratos (Schimitz e Hollinger, 1986).

O tempo de espera pós-ovariectomização utilizado neste estudo, foi bem maior do que os tempos utilizados para outros ossos, e está de acordo com a literatura, pois segundo Rawlinson *et al.* (2009) a osteoporose na maxila, na mandíbula e nos ossos da calvária, somente acontece após um tempo de aproximadamente 150 dias após a excisão bilateral dos ovários em ratas que recebem alimentação normal.

A estereologia é uma ferramenta que permite a partir de medições ou contagens de elementos estereológicos de imagens planas de estruturas tridimensionais, produzir informações sobre as características da estrutura original, ou seja, consegue transformar aspectos bidimensionais em aspectos tridimensionais (Silva, 2007). Assim, por meio desta ferramenta, pode-se estimar o volume, e não somente a área de tecido ósseo neoformado. Porém, a estereologia é fundamentalmente estatística e os métodos dependem de um plano de amostragem cuidadosa e uma teoria de amostragem sólida. Os métodos estereológicos não podem ser aplicados a menos que uma amostra aleatória seja obtida (Howard e Reed, 2005). Neste estudo, as secções de nossas amostras foram obtidas de forma uniformemente aleatórias e isotrópicas, por meio do “isector” que permitiu o início dos cortes do tecido ósseo em diferentes pontos do defeito.

A ação do laser tem sido estudada em muitos tecidos, e seus efeitos estimulatórios tem sido comprovados por vários autores (Karu e Lubart, 2000), inclusive no tecido ósseo, com modelos experimentais para a osteoporose ou não (Renno *et al.*, 2006; Pretel *et al.*, 2007, Pires-Oliveira *et al.*, 2010; Poppi *et al.*, 2011; Siessere *et al.*, 2011; Bossini *et al.*, 2012; Rosa *et al.*, 2012). Porém, o mecanismo regulatório exato do laser sobre os tecidos não é totalmente compreendido (Karu e Lubart, 2000). Os tecidos, mais apropriadamente os cromóforos que o compõem, absorvem a luz gerada pelo laser causando alterações no metabolismo das células (Karu e Lubart, 2000), como aceleração das reações químicas celulares, acarretando alteração na produção de oxigênio molecular e ATP, o qual pode promover o aumento da síntese de RNA e DNA (Stein *et al.*, 2005) e consequentemente aumenta a atividade mitótica das células.

A maioria dos parâmetros estereológicos avaliados neste estudo foram maiores nas ratas que foram tratadas com laser, seja na dose de 20 J/cm² ou na de 30 J/cm² quando comparados aos respectivos controles.

No grupo de 3 sessões evidenciou-se valores significativamente maiores para os parâmetros V_{tr} , V_{vt} , V_{tot} , N_{toost} , S_{vt} , S_{at} e A_c no grupo em que foi aplicado 20 J/cm².

Apesar dos animais deste grupo terem sido sacrificados numa fase bastante inicial do reparo, no sétimo dia após a confecção do defeito, pôde-se verificar que o laser foi benéfico, aumentando o volume do tecido de reparação, a densidade de volume e o volume total das trabéculas, assim como o número total de osteócitos, a densidade de superfície e a superfície de área das trabéculas e a área de colágeno, quando comparado ao controle. Nossos resultados são concordes com os de Soares *et al.* (2014) que utilizaram a mesma densidade de energia diária que a nossa (20 J/cm²) e mesmo comprimento de onda (780 nm) e verificaram que a associação do laser ao biomaterial resultou em estágios mais avançados de reparação óssea.

Possivelmente o laser na densidade de energia por nós utilizada tenha alterado o metabolismo celular, induzindo a maior formação de matriz óssea pelos osteoblastos que reflete-se num aumento do volume e da área de osso neoformado, bem como no número total de osteócitos e aumento da quantidade de colágeno total.

Com o mesmo objetivo ao deste estudo, ou seja, de verificar a fase inicial da cicatrização óssea, porém com metodologia e modelos experimentais diferentes, Fernandes *et al.* (2013) avaliaram defeitos ósseos não críticos quando o laser de AsGaAl (100 J/cm²) foi aplicado por 1, 2, 3 e 5 sessões. Estes autores verificaram melhor organização tecidual no local do defeito e neoformação óssea no terceiro e quinto dias pós-cirurgia, fato também observado neste estudo. Nesta pesquisa, verificou-se que a aplicação de laser, levou à formação de maior quantidade de tecido de reparação, confirmado pelo maior valor do V_{tr} quando comparados aos controles assim como a neoformação óssea quando aplicadas apenas 3 sessões de laser.

No grupo de 6 sessões evidenciou-se valores significativamente maiores para os parâmetros V_{tr} , V_{vt} , V_{tot} , N_{vost} , N_{toost} , S_{vt} , S_{at} e A_c no grupo em que foi aplicado 30 J/cm² ao invés de 20 J/cm² como no grupo de 3 sessões. O mesmo se repetiu para o grupo de 12 sessões, onde os parâmetros analisados no grupo de 30 J/cm² mostraram valores significativamente maiores. Nossos resultados, mais uma vez, estão de acordo com a literatura, pois Almeida *et al.* (2013) também verificaram que o laser aplicado em 5 pontos, na dose de 6 J/cm² (30 J/cm² no total) favoreceu o processo de cicatrização em defeitos ósseos criados em calvária de ratos.

A utilização neste estudo de 3, 6 e 12 sessões para a aplicação do laser, tem por base os estudos de Fávaro-Pipi *et al.* (2011), que utilizaram o mesmo número de sessões de aplicação do laser em animais saudáveis, porém a densidade de energia era diferente. Nossos resultados corroboram com os resultados destes pesquisadores no que diz respeito a aplicação

de laser por 6 e 12 sessões, onde estes verificaram, após aplicarem a densidade de energia de 50 J/cm², uma acentuada formação óssea quando comparados aos controles e divergem no que diz respeito a aplicação do laser por 3 sessões, pois, apesar de termos encontrado osso imaturo, houve uma significativa formação óssea nas ratas ovariectomizadas expostas ao laser, quando comparadas ao controle, fato não observado por Fávaro-Pipi *et al.* (2011).

A presença de maior formação óssea nos grupos onde foi aplicado o laser em baixa intensidade, provavelmente explica-se pelo fato do mesmo estimular a atividade dos osteoblastos e sua maturação como foi demonstrado por Stein *et al.* (2005) em estudo *in vitro* e que indiretamente também foi comprovado por este estudo *in vivo*, pois o número total de osteócitos foi significativamente maior quando aplicado o laser na densidade de energia de 20 J/cm² por 3 sessões e na densidade de energia de 30 J/cm² nos grupos em que foram aplicados 6 e 12 sessões.

Sabe-se que o osteócito é uma célula-alvo importante do hormônio estrógeno e que o aumento de apoptose dos osteócitos seguida de uma deficiência de estrógeno ocasiona o aumento da remodelação e da reabsorção óssea (Khosla *et al.*, 2012). O osteócito é uma importante fonte de RANKL no tecido ósseo (Xiong *et al.*, 2011; Nakashima *et al.*, 2011) e é possível que a apoptose dos osteócitos resulte num aumento de RANKL no microambiente ósseo, devido a uma liberação de RANKL dos osteócitos apoptóticos ou pela ação dos osteócitos apoptóticos sobre os osteócitos vizinhos viáveis. Como tivemos uma maior formação óssea após a aplicação do laser, podemos deduzir que maior quantidade de osteoblastos se diferenciaram e conseqüentemente foram envolvidos pela matriz óssea, aumentando o número de osteócitos, diminuindo a interferência do ciclo de apoptose dos osteócitos e liberação de RANKL provocado pela ausência de estrógeno.

O maior número de osteoblastos e conseqüentemente de osteócitos encontrados neste estudo após a aplicação do laser, talvez possa ser explicado pelo aumento da expressão de

BMP-9 (proteína óssea morfogenética 9), RUNX-2 (fator de transcrição 2 com domínio Runt) e COX-2 (ciclo-oxigenase-2) como observado por Tim *et al.* (2014) em ratos saudáveis. As BMPs (proteínas ósseas morfogenéticas) são muito importantes para a diferenciação de osteoblastos e regeneração óssea (Proff e Römer, 2009), e dentre elas, a BMP-9 é uma das mais potentes osteoindutoras (Kang *et al.*, 2004). O RUNX-2 é o primeiro fator de transcrição necessário para a determinação da linhagem dos osteoblastos; induz a diferenciação de células mesenquimais multipotentes em osteoblastos imaturos e desencadeia a expressão de genes importantes da matriz óssea durante os estágios iniciais da diferenciação de osteoblastos (Komori, 2010) e a COX-2 contribui para um recrutamento precoce de pré-osteoblastos e osteoblastos (Tim *et al.*, 2014). Assim, é muito provável que em ratas com modelo experimental para a osteoporose, como as deste estudo, o laser aplicado nas densidades de energia de 20J/cm² (3 sessões) e 30 J/cm² (6 e 12 sessões) também tenha estimulado a expressão de BMP-9, RUNX-2 e COX-2.

Assim como neste estudo, Saad *et al.* (2010) também verificaram uma maior neoformação óssea em ratas ovariectomizadas após aplicação de laser, bem como maior número de osteoblastos, menor número de osteoclastos, maior deposição de cálcio e fosfatase alcalina no tecido ósseo. No soro destes animais encontraram maiores níveis de cálcio, fósforo inorgânico, fosfatase alcalina e osteocalcina (marcadores de formação óssea) e menores níveis de deoxipiridinolina (U-DPD) (marcador de reabsorção óssea).

Outra explicação para a maior neoformação óssea e quantidade de colágeno encontrada neste estudo, estaria baseada no gene MAP1A que promove a estruturação de microtúbulos e a sua expressão funcional. Os microtúbulos desempenham importante papel na divisão celular, na forma da célula e na sua polaridade, no movimento celular, no transporte intracelular, na transdução de sinal e na síntese e secreção de colágeno. Assim, o aumento da expressão do gene MAP1A pelo laser em baixa intensidade pode ser um dos mecanismos

moleculares envolvidos na aceleração da formação óssea. O laser em baixa intensidade aumenta a expressão do gene MAP1A e modula a associação de microtúbulos e a estrutura funcional de microtúbulos, que por sua vez, estimula a proliferação e diferenciação dos osteoblastos (Kanenari *et al.*, 2011).

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Diante dos resultados estereológicos obtidos neste estudo, é lícito concluir que:

1. Houve neoformação óssea nos grupos que receberam as doses de 20 e 30 J/cm² quando comparados com os respectivos grupos controles (0 J/cm²).
2. Os animais que receberam 20 J/cm² por 3 sessões mostraram parâmetros estereológicos melhores do que os animais que receberam 30 J/cm² por 3 sessões.
3. Os animais que receberam 20 J/cm² por 6 e 12 sessões não apresentaram parâmetros estereológicos tão bons como os animais que receberam 30 J/cm² por 6 e 12 sessões.

Tendo em vista os resultados obtidos, entendemos que, a aplicação do laser, quando avaliada ao longo do tempo, mostrou parâmetros estereológicos melhores para os animais que receberam a dose de 30 J/cm² quando comparada aos animais que receberam a dose de 20 J/cm².

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ACIOLE, J.M. dos S. et al. Assessment of the LED phototherapy on femoral bone defects of ovariectomized rats: a Raman spectral study. **Lasers Med Sci**, v. 29, n. 3, p. 1269-1277, May. 2014.

ALMEIDA, A.L. et al. The effect of low-level laser on bone healing in critical size defects treated with or without autogenous bone graft: an experimental study in rat calvaria. **Clin Oral Implants Res.**, v. 25, n. 10, p. 1131-1136, Aug. 2013.

AMADEI, S.U. et al. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. **J Bras Patol Med Lab**, v. 42, n. 1, p. 5-12. Feb. 2006.

BOSSINI, P. S. et al. Low level laser therapy (830nm) improves bone repair in osteoporotic rats: similar outcomes at two different dosages. **Exp Gerontol**, v. 47, n. 2, p. 136-42, Feb 2012.

CATÃO, M. H. C. V. Os benefícios do laser de baixa intensidade na clínica odontológica na estomatologia. **Revista Brasileira de Patologia Oral**, v. 3, n. 4, p. 214-218, Out-Dez 2004.

COSTA-PAIVA, L. et al. Prevalence of osteoporosis in postmenopausal women and association with clinical and reproductive factors. **Rev. Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.25, n. 7, Aug. 2003.

CHICARELLI, M. et al. Effect of gamma rays on the bone repair process in rats with estrogen deficiency. **Braz Oral Res.**, v. 21, p.75-80, Jan-Mar 2007.

DA PAZ, L. H. et al. Effect of 17beta-estradiol or alendronate on the bone densitometry, bone histomorphometry and bone metabolism of ovariectomized rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 34, n. 8, p. 1015-22, Aug 2001.

DANIELL, H. W. Postmenopausal tooth loss. Contributions to edentulism by osteoporosis and cigarette smoking. **Arch Intern Med**, v. 143, n. 9, p. 1678-82, Sep 1983.

DE BARROS, F. C. et al. Laser de baixa intensidade na cicatrização periodontal. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 7, n. 1, p. 85-89 Abr. 2008.

* De acordo com a norma técnica da abnt nbr 6023 – informação e documentação – referências – elaboração (ago./2000). abreviatura de periódicos segundo norma técnica da abnt nbr 6032 – abreviação de título de periódicos e publicações seriadas (ago./1989).

DEPPE, H.; STEMBERGER, A. Effects of laser-modified versus osteopromotively coated titanium membranes on bone healing: a pilot study in rat mandibular defects. **Lasers Med Sci**, v. 18, n. 4, p. 190-5, Jan. 2004.

DODD, D. Z.; ROWE, D. J. The relationship between postmenopausal osteoporosis and periodontal disease. **J Dent Hyg**, v. 87, n. 6, p. 336-44, Dec 2013.

DROZDZOWSKA, B.; PLUSKIEWICZ, W.; MICHNO, M. Tooth count in elderly women in relation to their skeletal status. **Maturitas**, v. 55, n. 2, p. 126-31, Sep 20 2006.

ERDOGAN, M. O. et al. Association of estrogen receptor alpha and collagen type I alpha 1 gene polymorphisms with bone mineral density in postmenopausal women. **Osteoporos Int**, v. 22, n. 4, p. 1219-25, Apr 2011.

FAVARO-PIPI, E. et al. Low-level laser therapy induces differential expression of osteogenic genes during bone repair in rats. **Photomed Laser Surg**, v. 29, n. 5, p. 311-7, May 2011.

FRAZÃO, P.; NAVEIRA, M. Prevalência de osteoporose: uma revisão crítica. **Rev Bras Epidemiol.**, v.9, n.2, Jun. 2006.

FERNANDES, K. R. et al. Effects of low-level laser therapy on the expression of osteogenic genes related in the initial stages of bone defects in rats. **J Biomed Opt**, v. 18, n. 3, Mar 2013.

GARNERO, P. et al. Increased bone turnover in late postmenopausal women is a major determinant of osteoporosis. **J Bone Miner Res**, v. 11, n. 3, p. 337-49, Mar 1996.

GENOVESE, W.J. Laser de baixa intensidade – aplicações terapêuticas em odontologia. São Paulo, p. 130, 2007.

GUNDERSEN, H.J. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. **APMIS**, v. 96, n. 10, p.857-881, Oct 1988.

GUR, A. et al. The relation between tooth loss and bone mass in postmenopausal osteoporotic women in Turkey: a multicenter study. **J Bone Miner Metab**, v. 21, n. 1, p. 43-7, Jan 2003.

HARVEY, N.; DENNISON, E.; COOPER, C. The epidemiology of osteoporotic fractures. in: Rosen, C.J. ed. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral Metabolism*. Ames: Wiley-Blackwell, 2013. p. 348-356.

HOAR, W.; HICKMAN, C.P. Ovariectomy and the estrous cycle of the rat. In: W Hoar & CP Hickman, editors. *General and comparative physiology*. 2.ed. New Jersey: Prentice-hall; 1975. p.260-265.

HOWARD, C.V.; REED, M.G. **Unbiased stereology**. 2nd ed. Liverpool: QTP Publications; 2005.

JAIME, A. P. G. et al. The influence of local delivery of alendronate sodium on regeneration of calvarial defects in ovariectomized rats. **Ciênc. Odontol. Brás**, v. 8, n. 2, p. 70-79, Apr-Jun 2005.

JUNQUEIRA L.C.; CARNEIRO, J. *Histologia básica*. 10. ed. Brasil: Rio de Janeiro; 2004. p.136-153.

KALU, D. N. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. **Bone Miner**, v. 15, n. 3, p. 175-91, Dec 1991.

KANENARI, M.; ZHAO, J.; ABIKO, Y. Enhancement of microtubule-associated protein-1 Alpha gene expression in osteoblasts by low level laser irradiation. **Laser Ther**, v. 20, n. 1, p. 47-51, 2011.

KANG, Q. et al. Characterization of the distinct orthotopic bone-forming activity of 14 BMPs using recombinant adenovirus-mediated gene delivery. **Gene Ther**, v. 11, n. 17, p. 1312-20, Sep 2004.

KARU, T.I.; LUBART, R. Effects of low-power light on biological systems. **V. SPIE Proc.**, v.4159, p.1–17, July 2000.

KARU, T. Photobiology of low-power laser effects. **Health Phys.**, v.56, n.5, p.691-704, May 1989.55

KHOSLA, S.; OURSLER, M. J.; MONROE, D. G. Estrogen and the skeleton. **Trends Endocrinol Metab**, v. 23, n. 11, p. 576-81, Nov 2012.

KO, C.Y. et al. Low-level laser therapy using the minimally invasive laser needle system on osteoporotic bone in ovariectomized mice. **Medical Engineering e Physics**, v. 35, n. 7, p. 1015-1019, July. 2013.

KO C.Y.; SEO, D.H.; KIM, H.S. Deterioration of bone quality in the tibia and fibula in growing mice during skeletal unloading: gender-related differences. **J Biomech Eng.** v. 133, n. 11, Nov. 2011.

KOMORI, T. Regulation of osteoblast differentiation by Runx2. **Adv Exp Med Biol**, v. 658, p. 43-9, 2010.

KRUM, S. A.; BROWN, M. Unraveling estrogen action in osteoporosis. **Cell Cycle**, v. 7, n. 10, p. 1348-52, May 2008.

LELOVAS, P.P. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. **Comp Med.**, v.58, n.5, p.424-30, Oct. 2008.

LI, M.; SHEN, Y.; WRONSKI, T. J. Time course of femoral neck osteopenia in ovariectomized rats. **Bone**, v. 20, n. 1, p. 55-61, Jan 1997.

LINS, R.D.A.U., et al. Efeitos bioestimulantes do laser de baixa potência no processo de reparo. **An Bras Dermatol.**, v. 85, n. 6, p. 849-855, 2010. Aug. 2010.

MALUF, A. P. et al. The Use of Low Intensity Laser in Lower Third Molar Tooth Sur-Utilização de Laser Terapêutico em Exodontia de Terceiros Molares Inferiores. **RGO**, v. 54, n. 2, p. 182-184, Jun. 2005.

MANOLAGAS, S. C. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. **Endocr Rev**, v. 21, n. 2, p. 115-37, Apr 2000.

MARCONDES, F.K.; BIANCHI, F.J.; TANNO, A.P. Determination of the estrous cycle phases of rats: Some helpful considerations. **Braz J Biol.**, v.62, n.4, p.609-614, 2002.

MARTINEZ-MAESTRE, M. A. et al. Periodontitis and osteoporosis: a systematic review. **Climacteric**, v. 13, n. 6, p. 523-9, Dec 2010.

MESTER E. The use of the laser beam in therapy. **Orv Hetil**, v. 107, n. 22, p. 1012-1016, May 1966.

MOEDANO, D. E. et al. Osteoporosis, the risk of vertebral fracture, and periodontal disease in an elderly group in Mexico City. **Gerodontology**, v. 28, n. 1, p. 19-27, Mar 2011.

National Osteoporosis Foundation. NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. <http://nof.org/news>.

NAKASHIMA, T. et al. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. **Nat Med**, v. 17, n. 10, p. 1231-4, Oct 2011.

OTOMO-CORGEL, J. Osteoporosis and osteopenia: implications for periodontal and implant therapy. **Periodontol 2000**, v. 59, n. 1, p. 111-39, Jun 2012.

OURIQUE, S. A. M.; ITO, A. Y.; SUAREZ, O. F. Osteoporosis in Implantology: the Actual State of the Question. **Revista Brasileira de Implantodontia & Prótese sobre Implantes**, v. 12, n. 47/48, p. 237-245. 2005.

PINHEIRO, M. de M.; EIS, S. R. Epidemiology of osteoporotic fractures in Brazil: what we have and what we need. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 54, n. 2, Mar 2010.

PIRES-OLIVEIRA, D. A. et al. Laser 904 nm action on bone repair in rats with osteoporosis. **Osteoporos Int**, v. 21, n. 12, p. 2109-14, Dec 2010.

POPPI, R.R. et al. Evaluation of the osteogenic effect of low-level laser therapy (808 nm and 660 nm) on bone defects induced in the femurs of female rats submitted to ovariectomy. **Lasers Med Sci.**, v. 26, n. 6, p. 515-522, 2011.

PRETEL, H.; LIZARELLI, R. F.; RAMALHO, L. T. Effect of low-level laser therapy on bone repair: histological study in rats. **Lasers Surg Med**, v. 39, n. 10, p. 788-96, Dec 2007.

PROFF, P.; ROMER, P. The molecular mechanism behind bone remodelling: a review. **Clin Oral Investig**, v. 13, n. 4, p. 355-62, Dec 2009.

RAWLINSON, S. C. et al. Ovariectomy vs. hypofunction: their effects on rat mandibular bone. **J Dent Res**, v. 88, n. 7, p. 615-20, Jul 2009.

RENNO, A. C. et al. Effects of 830-nm laser light on preventing bone loss after ovariectomy. **Photomed Laser Surg**, v. 24, n. 5, p. 642-5, Oct 2006.

ROSA, A. P. et al. Effects of the combination of low-level laser irradiation and recombinant human bone morphogenetic protein-2 in bone repair. **Lasers Med Sci**, v. 27, n. 5, p. 971-7, Sep 2012.

SAAD, A. et al. Possible role of low level laser therapy on bone turnover in ovariectomized rats. **Endocr Regul**, v. 44, n. 4, p. 155-63, Oct 2010.

SCHMITZ, J. P.; HOLLINGER, J. O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. **Clin Orthop Relat Res**, n. 205, p. 299-308, Apr 1986.

SIESSERE, S. et al. Application of low-level laser irradiation (LLLI) and rhBMP-2 in critical bone defect of ovariectomized rats: histomorphometric evaluation. **Photomed Laser Surg**, v. 29, n. 7, p. 453-8, Jul 2011.

SILVA, A.G.P. Curso de introdução à estereologia ppgecm 2007, www.aulas.e-agps.info/estereologia/estereologia.pdf.

SOARES, L.G. et al. Influence of the $\lambda 780\text{nm}$ laser light on the repair of surgical bone defects grafted or not with biphasic synthetic micro-granular hydroxylapatite+Beta-Calcium triphosphate. **J Photochem Photobiol B**, v.131, p.16-23, 2014.

STEIN, A. et al. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. **Photomed Laser Surg**, v. 23, n. 2, p. 161-6, Apr 2005.

THORNDIKE. E. A.; TURNER A. S. In search of an animal model for postmenopausal diseases. **Front Biosci**, v. 16, n. 3, April. 1998.

TIM, C. R. et al. Low-level laser therapy enhances the expression of osteogenic factors during bone repair in rats. **Lasers Med Sci**, v. 29, n. 1, p. 147-56, Jan 2014.

VOLPON, J. B. Fundamentos de Ortopedia e Traumatologia, 1 ed. Brasil: São Paulo; 2014. p 9-11.

WRIGHT, N. C. et al. The Recent Prevalence of Osteoporosis and Low Bone Mass in the United States Based on Bone Mineral Density at the Femoral Neck or Lumbar Spine. **J Bone Miner Res**, Apr 26 2014.

WRONSKI, T. J.; CINTRON, M.; DANN, L. M. Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats. **Calcif Tissue Int**, v. 43, n. 3, p. 179-83, Sep 1988.

WRONSKI, T. J.; DANN, L. M.; HORNER, S. L. Time course of vertebral osteopenia in ovariectomized rats. **Bone**, v. 10, n. 4, p. 295-301, 1989.

WRONSKI, T. J. et al. Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton. **Calcif Tissue Int**, v. 45, n. 6, p. 360-6, Dec 1989.

XIONG, J. et al. Matrix-embedded cells control osteoclast formation. **Nat Med**, v. 17, n. 10, p. 1235-41, Oct 2011.

YAMADA, M. R.; ELIAS, R. Osteoporose e sua Importância na Odontologia. **Revista Internacional de Estomologia**, v. 2, n.5, p. 23-28, 2005.

YOSHIHARA, A. et al. The relationship between bone mineral density and the number of remaining teeth in community-dwelling older adults. **J Oral Rehabil**, v. 32, n. 10, p. 735-40, Oct 2005.

ANEXO

ANEXO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 11.1.639.53.5), intitulado "Influência de diferentes Doses e Número de Aplicações do Laser em Baixa Intensidade no Reparo de Defeitos Ósseos em Calvária de Ratas Wistar com Modelo Experimental para a Osteoporose", de autoria de **Selma Siéssere**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 01/06/2011.

This is to certify that the work (Protocol number 11.1.639.53.5), entitled: "Influência de diferentes Doses e Número de Aplicações do Laser em Baixa Intensidade no Reparo de Defeitos Ósseos em Calvária de Ratas Wistar com Modelo Experimental para a Osteoporose", by **Selma Siéssere**, is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the *Campus* of Ribeirão Preto – USP, and was approved in the meeting, June 01, 2011.

Ribeirão Preto, 6 de junho de 2011.

Presidente da CEUA
Profa.Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro