

RODRIGO RE POPPI

**EFEITO OSTEOGÊNICO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA ALIADO A  
ENXERTO ÓSSEO NO TRATAMENTO DE DEFEITO PRODUZIDO NO FÊMUR  
DE RATAS OVARIECTOMIZADAS**

CAMPO GRANDE  
2015

RODRIGO RE POPPI

**EFEITO OSTEOGÊNICO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA ALIADO A  
ENXERTO ÓSSEO NO TRATAMENTO DE DEFEITO PRODUZIDO NO FÊMUR  
DE RATAS OVARIECTOMIZADAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Dutra Aydos.

CAMPO GRANDE  
2015

FOLHA DE APROVAÇÃO

RODRIGO RE POPPI

**EFEITO OSTEOGÊNICO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA ALIADO A  
ENXERTO ÓSSEO NO TRATAMENTO DE DEFEITO PRODUZIDO NO FÊMUR  
DE RATAS OVARIECTOMIZADAS**

Aprovado em:

Campo Grande (MS),

BANCA EXAMINADORA

**Prof. Dr. Ricardo Dutra Aydos**

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

**Profa. Dra. Márcia Rodrigues Gorisch**

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

**Profa. Dra. Doroty Mesquita Dourado**

Universidade Anhanguera de Campo Grande

**Prof. Dr. Marcelo Kwiatkoski**

Universidade Estácio de Sá

**Prof. Dr. Renato Silva Nacer**

Centro Universitario da Grande Dourados

## DEDICATÓRIA

A Deus por possibilitar nossa existência, aos Meus pais pelo meu nascimento e minha criação.

A minha mãe, Nilva Re, e meu pai Waldemir Poppi, obrigado por tudo. Essa conquista também é de vocês.

A minha Esposa Karla Martins Avila por compartilhar todos os momentos da minha vida com sabedoria e companherismo.

A todos meus amigos que me estimularam a lidar com as dificuldades.

## **AGRADECIMENTOS**

- Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Dutra Aydos, que doou seu tempo, conhecimento e experiências.
- A Coorientadora Prof. Dra. Landara Schettert Silva pelos ensinamentos e por ilustrar o caminho a ser seguido.
- A todos os Professores da Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento da região Centro Oeste que participaram das etapas desta pesquisa Prof. Dr. Anísio Lima Da Silva, Prof. Dr. Pedro Gregol, Profa. Dra. Doroty Mesquita Dourado, Prof. Dr. Paulo de Tarso Camilo Carvalho e Profa. Dra. Márcia Rodrigues Gorisch.
- Ao Prof. Dr. Baldomero Kato, Prof. Pedro Cassino, participou na realização dos procedimentos metodológicos da pesquisa.

*Não existe o amanhã!*  
*Quem dirá se não é nada...*  
*O que existe é o amor e as pessoas amadas.*  
(RODRIGO RE POPPI)

## RESUMO

**Poppi RR. Efeito osteogênico do laser de baixa potência aliado a enxerto ósseo no tratamento de defeito produzido no fêmur de ratas ovariectomizadas.** Campo Grande; 2015. [Tese – Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

Uma fratura pode representar potenciais alterações musculoesqueléticas e meses de hospitalização, acarretando graves problemas à saúde. Existem sobretudo casos em que o processo de osteogênese pode ser acelerado. O objetivo da pesquisa foi analisar o efeito osteogênico do laser de baixa potência aliado a enxerto ósseo no tratamento de defeito produzidos no fêmur de ratas ovariectomizadas. Foi realizado ovariectomia bilateral em 108 ratas (adultas) de linhagem Wistar e após a comprovação da diminuição da massa óssea, feita através de análise digital da densidade óssea, foi realizada uma perfuração padronizada na diáfise do fêmur (2 mm). Os animais foram divididos em grupos: Laser As-Ga-Al (660nm); Laser In-Ga-Al-P (808nm); Laser aliado a enxerto ósseo em ambos os comprimentos de onda; Grupo Controle com e sem enxerto ósseo. Os animais foram submetidos à eutanásia após 7, 14 e 28 dias. Os segmentos foram destinados à histologia para análise de células ósseas: Trabéculas ósseas, osteoblastos, osteócitos, fibroblastos e colágeno. Foi realizada ainda análise descritiva histológica e a avaliação morfométrica para a quantificação das áreas representativas de osso neoformado. A análise histológica e morfométrica evidenciaram que nos animais tratados com Laser In-Ga-Al-P (808nm) e Laser As-Ga-Al (660nm) apresentaram melhores resultados em relação ao grupo Grupo controle com  $p < 0,05$ . Possibilitando indicar parâmetros de terapia laser para induzir ao aumento de células responsáveis pela proliferação e reparo ósseo.

**Palavras-chave:** Laser de Baixa Potência. Ovariectomia. Enxerto. Reparação Óssea.

## ABSTRACT

**Poppi RR. Osteogenic effect of Low-Level Laser combined with bone graft into the defect produced in the treatment of femur ovariectomizadas rats.** Campo Grande; 2015. [Tese – Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

### **Abstract**

A bone fracture may represent potential bone-muscle alterations and months of hospitalization, leading to grave health issues. There are cases where the osteogenesis process may be accelerated. The aim of the research was to analyze the osteogenic effect of low-level laser in union with bone and absorbable cortical bone membrane grafts in treating defects produced in the femur of female mice submitted to ovariectomy. Bilateral ovariectomy was performed in 108 female (adult) mice of Wistar lineage and after the evidence of reduced bone mass, done through bone density digital analysis; a standard perforation was made on the femur's diaphysis (2mm). The animals divided in groups were treated with As-Ga-Al Laser (660nm); In-Ga-Al-P Laser (808nm) as well as bone and bovine cortical bone membrane grafts. The animals underwent euthanasia after 7, 14 and 28 days. The sections destined to histology were colored with HE for bone cell analysis: bone Trabeculae, Osteoblasts, Osteocytes, Fibroblasts and Collagen. Histological descriptive analysis and morphometric evaluation to quantify the representative areas of neofomed bone were also performed. The histological analysis, when analyzing bone trabeculae, showed that the animals treated with In-Ga-Al-P Laser (808nm) presented better results after 28 days when compared to the As-Ga-Al Laser (660nm) group results. allowing for the identification of ideal laser therapy parameters to induce the increase of cells responsible for bone growth and repair.

**Keywords:** Low-Level Laser, Ovariectomy, Graft, Bone Repair.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Layout da tela do programa computacional sistema digital Digora versão 1.51 utilizado na leitura da densidade óssea, resultado pós-cirúrgico.....35
- Figura 2** - Fotomontagem representativa: A – Tricotomia, B – incisão longitudinal e indentificação, C- ovário identificado e exposto. D- hemostasia ligação da parte superior da tropa E- excisão ovariana, F- procedimento cirúrgico terminado os planos suturados com fio..... 37
- Figura 3-** Fotomontagem representativa: A - incisão cirúrgica com exposição do osso do fêmur e início da confecção da falha óssea; B confecção da falha óssea utilizando broca esférica nº 1016; C - perfuração da cortical do osso até atingir o canal medular; D fêmur dissecado, onde observa-se a falha óssea produzida.....39
- Figura 4 –.** Gen – Mix (Genius Baumer biomaterial division), e Gen Derm (Baumer biomaterial division S/A). .....39
- Figura 5-** Photon Laser III equipamentos LTDA São Carlos – S.P., Brasil.....41
- Figura 6** - Delimitação manual das áreas e mensuração das imagens das lâminas utilizando o programa ImageJ 1.0 for Mac.....43
- Figura 7** - Montagem de fotomicrografias das lâminas obtidas dos animais do G1A- após 07 dias da confecção do defeito: A – Vista geral do local do defeito (↑). HE, 10X. B –Neoformação óssea (\*). HE, 20X. C – Atividade de células (+). HE, 25X.....45
- Figura 8** - Montagem de fotomicrografias das lâminas obtidas dos animais do G2 após 07 dias de Laser Infra Vermelho A – Visão geral do local do defeito, (↑) HE, 10X. B - Camadas concêntricas formando trama para vascularização (\*). 20X C – Tecido recém-formado em organização (+), integração da matriz antiga com a recém formada (↑) 40x. D – Trabéculas ósseas recém-formadas com tecido osteóide (↑).....46
- Figura 09** - Figura 9 - Montagem de fotomicrografias das lâminas obtidas dos animais do G3 após 07 dias de utilização do LVV: A – Vista geral do local do defeito ósseo (↑). HE, 10X. B – Arcabouço ósseo e exsudato nas margens (\*). HE, 20X. C – Tecido ósseo em transformação (+) ocupando os espaços do defeito. HE, 40X. .... 47
- Figura 10** - Gráfico comparativo entre a média e desvio padrão dos escores obtidos pela análise semi-quantitativa de trabéculas ósseas, osteoblastos, matriz osteóide, fibroblastos e matriz colágeno aos 7 dias após a confecção do defeito ósseo..... 47

**Figura 11** - Montagem de fotomicrografias das lâminas obtidas dos animais do G1 após 14 dias de confecção do defeito: A – Vista geral do local do defeito com crescimento ósseo (↑). HE, 10X. B – Presença de lacunas ao centro do defeito osteoblastos nas margens (\*). HE, 20X. C – Tecido ósseo antigo se integrando ao novo em organização (+). Notar a presença de trabéculas neoformadas (↑). HE, 40X.....48

**Figura 12** - Montagem de fotomicrografias das lâminas obtidas dos animais do G3 após 14 dias de realização de tratamento com LVV: A – Vista geral local do defeito demonstrando a neoformação óssea do centro para a parte superior (↑). HE, 10X. B – Demonstra lacunas interligando as margens (\*). C – Osso em processo de maturação (↑), integrado a matriz antiga (+). HE, 40X. D- Canais de Havers em formação (↑). Osso primário em processo de maturação (+), HE, 65X.....49

**Figura 13** - Montagem de fotomicrografias das lâminas obtidas dos animais do Grupo LVV após 14 dias de realização de tratamento: A – Vista geral local do defeito demonstrando a neoformação óssea do centro para a parte superior (↑). HE, 10X. B – Demonstra lacunas interligando as margens (\*). C – Osso em processo de maturação (↑), integrado a matriz antiga (+). HE, 40X. D- Canais de Havers em formação (↑) osso primário em processo de maturação (+), HE, 65X.

.....50

**Figura 14** - Gráfico comparativo entre a média e desvio padrão dos escores de intensidade (0 a 3) obtidos pela análise semi-quantitativa de trabéculas ósseas, osteoblastos, matriz osteóide, fibroblastos e matriz colágeno aos 14 dias após a confecção dos defeitos ósseos. As barras representam o valor médio de cada grupo ± EPM. \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao Grupo Controle. # indica diferença estatisticamente significativa em relação ao Grupo LIV.....51

**Figura 15** – Figura 15 - Gráfico comparativo entre a média e desvio padrão dos escores obtidos pela análise semi-quantitativa de Matriz Colágeno nos períodos de 07 e 14 dias após a confecção do defeito ósseo, \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao período de 07 dias com  $p=0,0253$ .....52

**Figura 16** Montagem de fotomicrografias das lâminas obtidas dos animais do G1 após 28 dias de confecção dos defeitos: A – Vista geral do local do defeito com crescimento ósseo (↑). HE, 10X. B – Neoformação óssea para o interior do defeito (\*). HE, 20X. C – Tecido ósseo imaturo desorganizado (+) ocupando as margens superiores do defeito. HE, 40X.....52

**Figura 17** - Montagem de fotomicrografias das lâminas do G3-28 dias: A - Neoformação óssea nas margens do defeito (↑). HE, 10X. B, C - Notar tecido ósseo primário em formação (\*). HE, 20X. D- Intensa atividade Fibroblástica (↑). E – Matriz osteóide em formação (\*). HE, 40X. F- Osso secundário (+). Notar presença de Canais Havers e Volkmann (↑). HE, 65X. ....53

**Figura 18** - Gráfico comparativo entre a média e desvio padrão dos escores obtidos pela análise semi-quantitativa de trabéculas ósseas, osteoblastos, matriz osteóide, fibroblastos e matriz colágeno aos 28 dias após a confecção do defeito ósseo.....54

**Figura 19** -Montagem de fotomicrografias das lâminas do Grupo LIV-28 dias: A – Área do defeito apresentando neoformação óssea (↑). HE, 10X. B – Tecido em processo de maturação com intensa presença de células ósseas (\*). C – Osso no interior do defeito (\*). HE, 40X. D – Células formando trabéculado ósseo e em processo de maturação (+). HE, 60X.....54

**Figura 20** - Gráfico comparativo entre a média e desvio padrão dos escores de intensidade (0 a 3) obtidos pela análise semi-quantitativa de trabéculas ósseas, osteoblastos, matriz osteóide, fibroblastos e matriz colágeno aos 28 dias após a confecção do defeito ósseo. As barras representam o valor médio de cada grupo  $\pm$  EPM. \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao Grupo Controle e Grupo LIV. Nível de significância  $P < 0,05$ .....55

**Figura 21** - Montagem de fotomicrografias das lâminas dos Grupos avaliados utilizando enxerto ósseo, para o período de 07 dias de observação. Grupo Controle Enxerto, A - Vista geral do local do defeito com crescimento ósseo nas margens (↑) HE, 10X, Grupo LVV+E - B – Vista geral do local do defeito; osso recém-formado nas margens e no centro (↑), Grupo LIV+E. C- Vista geral do local do defeito com presença de células osteoprogenitoras tomando o centro e as margens do defeito (↑), HE, 10X, Grupo Enxerto. D - Presença tecido recém-formado envolvendo parte do enxerto e osso imaturo (\*), HE, 20X, Grupo LVV +E - E- Área de neoformação óssea no centro do defeito integrado ao enxerto envolto por intensa atividade de células osteoprogenitoras (\*), Grupo LIV+E, HE, 20X. F – Presença de intensa atividade de células mesenquimais envolvendo o enxerto; preenchido e integrado por osso imaturo (+), HE, 40X. ....56

**Figura 22** - Gráfico comparativo entre a média e desvio padrão dos escores (0 a +++) obtidos pela análise semi-quantitativa de trabéculas ósseas, osteoblastos, matriz osteóide, fibroblastos e matriz colágeno aos 7 dias após a confecção dos defeitos ósseos e uso de enxerto ósseo. As barras representam o valor médio de cada grupo  $\pm$  EPM. \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao Grupo Controle Enxerto. # indica diferença estatisticamente significativa em relação ao Grupo LIV+E. Nível de significância  $P < 0,05$ .....57

**Figura 23** - Montagem de fotomicrografias dos animais dos Grupos analisados para o período de 14 dias: A e B Grupo- Controle Enxerto – Área total do defeito ósseo. HE, 10X nota-se áreas de osso imaturo nas margens entre osso-enxerto (↑), HE, 40X tecido ósseo recém-formado envolvendo o enxerto (\*). C e D Grupo LVV+E Área total do defeito ósseo. HE, 10X, nota-se trabéculas ósseas, matriz colágena e o osso recém-formado tomando o centro e as margens do defeito (↑), tecido ósseo em maturação, integrado a matriz antiga (\*), HE, 40X. E e F Grupo LIV+E – Área total do defeito ósseo. HE, 10X, nota-se células osteoprogenitoras secretando a matriz osteóide em faixas das margens para o centro do defeito (↑), osso bem organizado com característica lamelar com osteócitos e canais de Havers (+). HE, 40X. ....58

**Figura 24** - Gráfico comparativo entre a média e desvio padrão dos escores obtidos pela análise semi-quantitativa de trabéculas ósseas, osteoblastos, matriz osteóide, fibroblastos e matriz colágeno aos 14 dias após a confecção do defeito ósseo. As barras representam o valor médio de cada grupo  $\pm$  EPM. \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao Grupo Controle Enxerto. Nível de significância  $P < 0,05$ .....59

**Figura 25** -Montagem de fotomicrografias dos animais dos Grupos para o período de 28 dias: A - Grupo Controle Enxerto – Área total do defeito ósseo. HE, 10X. Presença osso nas margens e ao centro ( $\uparrow$ ), B - Tecido ósseo maduro invaginando para o interior do defeito (\*), HE, 40X. C e D– Grupo LVV+E – Área total do defeito ósseo. HE, 10X. Neoformação ocupando o defeito ( $\uparrow$ ), notar osso maduro integrado a matriz antiga (\*), HE, 40X. E - F Grupo LIV+E - Área total do defeito ósseo. HE, 10X. Osso maduro com osteocitos preenchendo o defeito, calo ósseo formado ( $\uparrow$ ), Osso secundario (+) e Canais de Havers esparsos e volumosos (\*). HE, 40X.....60

**Figura 26** - Gráfico comparativo entre a média e desvio padrão dos escores (0 a +++) obtidos pela análise semi-quantitativa de trabéculas ósseas, osteoblastos, matriz osteóide, fibroblastos e matriz colágeno aos 28 dias após a confecção do defeito ósseo. As barras representam o valor médio de cada grupo  $\pm$  EPM. \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao Grupo Controle Enxerto e LVV+E. # indica diferença estatisticamente significativa em relação ao Grupo Controle Enxerto e LIV+E. Nível de significância  $P < 0,05$ .....61

**Figura 27** - Gráfico representando os resultados da porcentagem de neoformação, em relação à área do defeito, para os grupos com e sem enxerto, analisados 7 dias após os procedimentos. As barras representam o valor médio de cada grupo  $\pm$  EPM. \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao Grupo controle. # indica diferença estatisticamente significativa em relação ao Grupo Enxerto. + indica diferença estatisticamente significativa em relação ao Grupo LVV. @ indica diferença estatisticamente significativa em relação ao Grupo LIV. Nível de significância  $P < 0,05$ .....62

**Figura 28** Gráfico representando os resultados da porcentagem de neoformação, em relação à área do defeito, para os grupos com e sem enxerto, analisados 14 dias após os procedimentos. As barras representam o valor médio de cada grupo  $\pm$  EPM. \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao Grupo Controle. # indica diferença estatisticamente significativa em relação ao Grupo Enxerto. Nível de significância  $P < 0,05$ .....64

**Figura 29** Gráfico representando os resultados da porcentagem de neoformação, em relação à área do defeito, para os grupos com e sem enxerto, analisados 28 dias após os procedimentos. As barras representam o valor médio de cada grupo  $\pm$  EPM. \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao Grupo Controle. # indica diferença estatisticamente significativa em relação ao Grupo LIV. + indica diferença estatisticamente significativa em relação ao Grupo LVV. @ indica diferença estatisticamente significativa em relação ao Grupo Enxerto. ® indica diferença estatisticamente significativa em relação ao Grupo LVV+E. Nível de significância  $P < 0,05$ .....63

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	14
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	16
2.1	Osteopore: Considerações gerais	16
2.2	Ovariectomia e Osteoporose	19
2.3	Reparo de lesão em tecido ósseo osteoporótico	20
2.4	Substitutos ósseos	23
2.4.1	Terapia Laser em tecido ósseo e enxertos ósseos	27
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	32
3.1	Objetivo Geral	32
3.2	Objetivos específicos	32
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	33
4.1	Animais de experimentação	33
4.2	Grupos Experimentais	33
4.3	Exame Radiológico e Análise Digital Óssea	35
4.4	Procedimentos cirúrgicos	35
4.5	Ovariectomia	35
4.4.2	Produção dos defeitos ósseos	37
4.6	Laser de Baixa Potência	40
4.6	Procedimentos Histológicos para obtenção das lâminas	40
4.7	Eutanasia	41
4.8	Avaliação histopatológica descritiva	42
4.8	Análise histomorfométrica	43
4.9	Análise estatística	44
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	45
5.1	Avaliação histopatológica descritiva	45
5.1.1	Grupos tratados sem enxerto ósseo	45
5.1.1	Período de 07 dias	45
5.1.2	Período de 14 dias	48
5.1.3	Período de 28 dias	52
5.1.4	Grupos tratados sem enxerto ósseo	55

5.1.5 Período de 07 dias.....	55
5.1.5 Período de 14 dias.....	58
5.1.6 Período de 28 dias.....	60
<b>5.2 Análise histomorfométrica.....</b>	<b>62</b>
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>65</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>70</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>71</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>99</b>



## 1 INTRODUÇÃO

Uma fratura pode representar potenciais alterações musculoesqueléticas e meses de hospitalização, acarretando graves problemas à saúde e altos custos socioeconômicos. A osteoporose reconhecida como um dos maiores problemas de saúde pública do século tem contribuído com o aumento da incidência de fraturas todos os anos (RIERA-ESPINOZA, 2009; SIRIS *et al.*, 2009; PIPI, 2010).

O remodelamento ósseo depende da atividade das células ósseas, para produção de novo tecido, evento crucial ao processo de remodelamento ósseo e recuperação após lesão. Quando ocorre um desequilíbrio entre as células ósseas leva a diminuição da densidade óssea, seguida de intensa diminuição de densidade, osteoporose; a osteoporose principal patologia responsável pelo aumento da incidência de fraturas em todo o mundo (PAPLER, 1997; BEMBEM, 1999; KALFAS 2001; LANNA, 2003; NASCIMENTO, 2003; CORSETTI, 2005; MAEDA, 2005; DINIZ, 2006; HAACH, 2006; SHA *et al.*, 2009; WU *et al.*, 2014; NACER 2015).

Vários estudos vêm investigando os efeitos de tratamentos não invasivos para o controle da redução da massa óssea, reparo e crescimento ósseo. Entre estes, podemos citar a aplicação do laser terapêutico de baixa potência, seus efeitos positivos atuam na aceleração do processo de cicatrização, aumento da vascularização, proliferação celular, maior resistência mecânica no tecido ósseo recém-formado além do aumento da calcificação da matriz óssea (BLAYA *et al.*, 2008; TORRES *et al.*, 2008; MÁRQUEZ MARTÍNEZ *et al.*, 2008; PIPI, 2010; POPPI *et al.*, 2011; BARBOSA *et al.*, 2012; GARCIA *et al.*, 2012; CUNHA, 2012; CARVALHO-LOBATO *et al.*, 2014; PALLOTTA 2014).

De modo que ocorra uma consolidação rápida e sem complicações se faz também fundamental uma estrutura óssea adequada no local da lesão, o uso de enxerto ósseo na prática cirúrgica veio auxiliar à consolidação de fratura, promovendo a formação de calo precoce através de um processo chamado de substituição invasiva, associado ao processo de osteocondução, osteoindução e biocompatibilidade, disponibilizando variedade de materiais como a hidroxiapatita, vidro bioativo, osso liofilizado bovino, carbonato de cálcio, fosfato tricálcio e Polímero de Mamona (BRAZ *et al.*, 2003; FREITAS *et al.*, 2004; TORRES *et al.*,

2008; CAMARGO *et al.*, 2010; Pipi, 2010; ROGERS *et al.*, 2012; CALORI *et al.*, 2011; NACER *et al.*, 2012, 2015). Existem enxertos que trazem em sua composição; osso liofilizado bovino e que diariamente são utilizados em medicina ortopédica e em ortodontia. Sobrepujando características ósseas e fatores diferenciadores, cuja importante função é induzir a transformação das células mesenquimais indiferenciadas em condroblastos e osteoblastos (KIRKER-HEAD, 1995; LIMA *et al.* 2004; MOREIRA, 2004; KVETON & COELHO, 2004; ABDUL *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2005; RESENDE *et al.*, 2006). Assim, o osso bovino é um material muito utilizado pela sua semelhança estrutural e mecânica com o osso humano (HALLMAN, 2008; TORRES *et al.*, 2008)

Favorecer e possibilitar o processo de consolidação é essencial, principalmente para indivíduos em casos graves que necessitam de substituto ósseo em grande quantidade sem que necessite de procedimento cirúrgico. O conhecimento de métodos que estimulem a consolidação de fratura em osso osteoporótico adquire considerável importância. Assim sendo, o objetivo deste estudo foi analisar o efeito osteogênico do laser de baixa potência (In-Ga-Al-P e As-Ga-Al) aliado a enxerto ósseo e membrana reabsorvível de cortical óssea no tratamento de defeito produzido no fêmur de ratas ovariectomizadas, por meio de análise histológica e por morfometria.

## 2.1 Osteoporose: Considerações gerais

A osteoporose, uma doença osteometabólica, decorre de uma alteração do equilíbrio entre formação e reabsorção óssea, intimamente ligada ao avançar da idade e nas mulheres pós-menopausais em decorrência da deficiência do hormônio ovariano, o estrógeno (WARD, 1995; CHANG *et al.*, 2004; ARDILA 2003). Na osteoporose, observa-se que o predomínio da reabsorção óssea acaba levando a redução da densidade mineral óssea (DMO).

A osteoporose é a alteração metabólica mais freqüente acometendo os ossos, caracterizando-se pela diminuição lenta e progressiva da massa óssea. A Organização Mundial de Saúde (OMS) define osteoporose como uma doença esquelética sistêmica caracterizada por diminuição da massa óssea e deterioração microarquitetural do tecido ósseo, com conseqüente aumento da fragilidade óssea e susceptibilidade à fratura (PIPPA, 1996; ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 2000; SHARP; DOHME, 2001; NASCIMENTO, 2003; ARAÚJO *et al.*, 2005; HAACH, 2006). Apresenta caráter multifatorial, que envolve aspectos hormonais, genéticos e nutricionais (HEISS *et al.*, 2008).

A osteoporose é diagnosticada quando se observa alteração na síntese e absorção de tecido ósseo, criando cavidades excessivamente profunda que não consegue ser preenchida suficientemente (BEMBEM, 1999; SEEMAN; EISMAN, 2004; EIS, 2003; NASCIMENTO, 2003; HAACH, 2006). Tornando os ossos mais frágeis e mais suscetíveis a fraturas (ELFFORS, 1998; CARVALHO; CLIQUET, 2003; DINIZ, 2006).

A forma mais comum da doença acomete as mulheres com deficiência de estrogênio, mulheres na pós-menopausa ( LERNER, 2006). Portanto, devido sua prevalência na população mundial a osteoporose tem recebido atenção como grande problema de saúde pública (SIQUEIRA, 2013). As fraturas não são o único inconveniente da osteoporose, já que complicações secundárias podem deixar os pacientes muito debilitados, podendo levar à morte. Sendo sua prevenção essencial para a manutenção da saúde, da qualidade de vida, e da independência durante o envelhecimento (SBEM, 2010).

Um estudo publicado por Araujo, 2005 sobre o custo médio da hospitalização por paciente para tratamento cirúrgico de fratura osteoporótica de quadril revelou uma cifra de R\$ 24.000,00 no sistema privado de saúde brasileiro e mostrou que apenas 24% dos pacientes receberam tratamento clínico, inclusive medicamentoso, para osteoporose após a fratura. A população brasileira está propensa a desenvolver osteoporose, estimativas revelam que a patologia aumentou de 7,5 milhões, em 1980, para 15 milhões, em 2000 (SBEM, 2010).

A perda de massa óssea pode ser evidenciada através de exames diagnóstico, pois, as perdas de massa óssea podem ser observadas por meio das alterações na densidade do osso cortical e trabecular como a radiografia (Raio-X). O raio-X é o método de escolha para a verificação de fraturas, por ser simples e acessível.

O sistema digital Digora (versão 1.51) tem sido muito utilizado em estudos, com recursos de manipulação de imagem e obtenção de medidas de distância e densidade radiográfica (WHITE *et al.*, 1999; SALZEDAS *et al.*, 2002; CANOVA *et al.*, 2003; MEURER *et al.*, 2003; LICKS *et al.*, 2004; GIOVANINI *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2007). A radiologia é utilizada na área da saúde como um exame complementar no diagnóstico de patologias ósseas. Os avanços da imagem digital têm constituído uma alternativa na detecção de perdas ósseas.

A medida da qualidade de vida relacionada à saúde em pacientes com osteoporose tem sido alvo de estudos nos últimos anos, com o intuito de determinar as mudanças necessárias para obtenção do bem-estar do paciente (CARVALHO *et al.*, 2001; CVIJETIC *et al.*, 2002; GARDNER *et al.*, 2005; YOH *et al.*, 2005; ARANHA *et al.*, 2006; CORTET *et al.*, 2006). A prevenção das fraturas osteoporóticas é um dos fatores mais importantes na manutenção da qualidade de vida (LIPS; VAN SHOOR, 2005; OLIVEIRA, 2003; GARDNER *et al.*, 2005). Projeta-se que as fraturas somente as osteoporóticas no Brasil alcancem 600.000 por ano, sendo 400.000 vertebrais e 200.000 femorais (CARNEIRO, 2001). Estima-se que o número de fraturas de quadril na população mundial cresça de 1,26 milhões em 1990 para 2,6 milhões em 2025 e para 4,5 milhões em 2050 (GULLBERG *et al.*, 1997; HAACH, 2006).

As fraturas osteoporóticas vertebrais são responsáveis por grande comprometimento estético, as da extremidade proximal do fêmur são as mais

graves, com maior número de seqüelas e mortalidade elevada no primeiro ano (MENDONÇA; ALVES, 2004; GARDNER *et al.*, 2005). Este tipo de fratura representa perda significativa da autonomia onde cerca de metade dos indivíduos torna-se incapaz de deambular e um quarto necessita de cuidado domiciliar prolongado (ARANHA *et al.*, 2006). O risco da fratura proximal de fêmur nas mulheres caucasianas, na fase pós-menopausa é de 14-17% e esse risco aumenta com o avanço da idade (EDDY *et al.*, 1998; PARKER & PALMER, 1995; CRANNEY, 2003; ARAÚJO *et al.*, 2005).

A osteoporose afeta uma grande quantidade de pessoas e a prevalência aumenta com a idade da população. Nos Estados Unidos atualmente existem 10 milhões de indivíduos com a doença e mais 18 milhões têm massa óssea baixa; 80% dos acometidos são mulheres. Segundo a Organização Mundial de Saúde (2000), um terço das mulheres brancas acima dos 65 anos apresenta a doença (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 2000).

Os fatores que aumentam os riscos de osteoporose são: idade pós-menopausa, raça caucasiana ou asiática, tabagistas, alcoolistas, portadores de insuficiência renal crônica, baixo peso, baixo índice corporal, menopausa precoce, menarca tardia, sedentarismo, história prévia de fratura após os cinquenta anos, história familiar de osteoporose, baixos níveis de testosterona, ingestão deficiente de cálcio, muito café, baixa exposição ao sol, doenças que afetem o metabolismo ósseo, como o hiperparatireoidismo primário e o uso crônico de corticosteróide (ARAÚJO *et al.*, 2005; DINIZ, 2006).

Em pesquisa realizada Amadei *et al.*, (2006) relata que a diminuição dos níveis de estrógeno altera tanto o processo de remodelação quanto o de reparação, embora nem todos os mecanismos estejam completamente elucidados.

Houve uma crescente demanda por cuidados com os pacientes osteoporóticos, isso provocou uma expansão dos serviços de avaliação e tratamento da osteoporose. Desta forma, buscar medidas mais avançadas para as possíveis complicações da osteoporose, como é o caso das fraturas, tornou-se de vital importância.

## 2.2 Ovariectomia e Osteoporose

Um modelo experimental que simula a deficiência estrogênica pós-menopausa em mulheres é a ovariectomia de ratas, a qual resulta na diminuição dos níveis de estrógeno. Como resultado, a ovariectomia causa perda óssea em ossos como maxila, mandíbula, fêmur, entre outros. Contudo, considerando-se que os sinais apresentados pelas mulheres acometidas pela doença não são idênticos aos que ocorrem nas ratas neste modelo, considera-se apropriada, a utilização do termo osteopenia que reflete a diminuição da massa óssea nestes animais em decorrência da deficiência estrogênica (PRADO, 2008).

Estudando diferentes tempos de ovariectomia e orquiectomia (ratos machos), Most et al. perceberam que em cultura de células a deficiência estrogênica causa aumento transitório na osteoclastogênese. Sete dias após a cirurgia, o potencial osteoclastogênico das células de medula hematopoiética foi acentuado e se estabilizou após 30 dias de deficiência hormonal. Seriam estas células, as responsáveis por uma fase precoce de rápida perda óssea.

Para Colombo e colaboradores (2003), cirurgia dos ovários nas mulheres, ha maior perda de taxa óssea, sugerindo que os hormônios gonadais desempenham importante função na prevenção da perda óssea.

Como já foi visto varias são as dificuldades enfrentadas para que ocorra uma boa remodelação em tecido ósseo osteoporótico. As pesquisas buscam a melhor forma de tratamento, e para isso é necessário à utilização de cobaias para indução da osteoporose sendo importantes que as alterações encontradas no modelo experimental estudado se assemelhem as encontradas em humanos.

A ovariectomia é um procedimento cirúrgico o qual é retirado o(s) ovário(s), o que reduz os níveis séricos de estrógeno e progesterona. O estrógeno e a progesterona são hormônios sexuais femininos estão ligados direta ou indiretamente aos osteoclastos, estes hormônios produzidos principalmente nos ovários, sendo responsáveis pela manutenção das características femininas durante a vida (COLOMBO *et al.*, 2003).

A osteoporose induzida pela castração embora seja decorrente principalmente da redução na aposição óssea, tem-se depois de três meses aumento da reabsorção óssea, potencializando a osteopenia (SERAKIDES, 2001).

O modelo de ratas ovariectomizadas para estudos da perda de massa óssea pós menopausa é bem aceito, sendo o modelo preconizado pelo Food and Drug Administration (FDA) para estudos pré-clínicos de drogas para prevenção e intervenção da osteoporose (KODAMA, 2003; MELLO; GOMIDE, 2005; CANETTIERI, 2006; RENNO, 2006; POPPI et al., 2012).

Embora não haja um animal que atenda a todos os requisitos de modelo ideal, ratas ovariectomizadas (ovx) têm sido utilizadas como modelo animal de osteoporose experimental, pois, fornecem dados fundamentais semelhantes aos observados no esqueleto adulto pós-menopáusicos (BOHIC, 2000; SERAKIDES, 2001; KODAMA, 2003; COLOMBO *et al.*, 2003; LILL *et al.*, 2003; DUARTE, 2004; PYTLIK *et al.*, 2004; MELLO; GOMIDE, 2005; JAIME *et al.*, 2005; LECOQ *et al.*, 2006; AMADEI *et al.*, 2006; CANETTIERI, 2006; RENNO, 2006; DINIZ et al., 2009).

### **2.3 Reparo de lesão em tecido ósseo osteoporótico**

O numero de casos de fraturas no mundo tem aumentado, um fato a ressaltar é que com o avanço da idade, os ossos tornam-se finos e relativamente quebradiços (BANDEIRA et al., 2006; OTT, 2004). A osteoporose há anos vem causando milhares de fraturas no mundo e representa um elevado custo no orçamento dos países.

O osso apresenta como funções primária: Suporte, Depósito de minerais e lipídios, produção de células sanguínea proteção, sistema de alavancas – (MARTINI, 1998; KATCHBURIAN; ARANA, 1999; KESSEL, 2001) (BEZERRA, 2005).

O tecido ósseo é constituído de 90% de fibras colágenas tipo I e outras proteínas que representam 10%. Na osteoporose as fibras colágenas foram observadas alinhadas frouxa e irregularmente com espaços alargados, algumas delas começando a evidenciar diferentes graus de defeitos entre elas (YUN SHEN et al., 2009).

Histologicamente existem dois tipos de tecido ósseo: imaturo e maduro as diferenças são as organizações tridimensionais em suas fibras colágenas (FREITAS, 2001).

O tecido ósseo primário é o primeiro tecido ósseo a aparecer na formação da estrutura óssea. A matriz neste estágio apresenta feixes entrelaçados de fibras colágenas, sem organização definida. O tecido ósseo secundário substitui gradativamente o tecido ósseo primário pela deposição gradual de estratos ou camadas de matriz, que o transformam da forma trabecular para lamelar (YU *et al.*, 1997).

MOSEKILDE *et al.*, 1995 relataram que a porção cortical óssea dos ratos perde o sistema Haversiano; responsável pela passagem de vascularização e, por isso, esses animais possuem pouca remodelação de osso intracortical. A perda óssea pós-menopausa devido à deficiência de estrogênio leva a uma perda desproporcional entre o osso cortical e o trabecular, sendo maior neste último (Riggs (1991).

A cicatrização de defeito ósseo é utilizada em muitas experiências clássicas tratando-se de influências de medidas para melhorar a regeneração óssea (PARISIEN *et al.* 1995; PINHEIRO *et al.*, 2001; CARVALHO *et al.*, 2002; SILVA JÚNIOR *et al.*, 2002; NASCIMENTO, 2003; RENNO, 2006; CANETTIERI, 2006).

A osteoporose pós-menopausa é uma doença silenciosa na qual há diminuição da produção de hormônios sexuais, reduzindo a formação da matriz protéica onde é depositado o cálcio, diminuindo a aposição por uma diminuição da ação osteoblástica, ocorrendo perda de conexões entre as trabéculas ósseas criando grandes cavernas de reabsorção (SERAKIDES, 2001; LANNA, 2003; ARDILA, 2003).

ARDILA, 2003, em seu estudo destaca que o estrogênio pode alterar a velocidade de crescimento osteoblástica, além, de inibir a PGE2 (prostaglandina E2) e alterar a síntese e secreção de proteínas responsáveis pela ativação de fatores que diminuem a reabsorção óssea (*TGF-B, Transforming growth factor Beta*). Os receptores E2 controlam 70% da reabsorção óssea.

A porosidade do osso é importante, pois afeta diretamente as características mecânicas do tecido osso lamelar e osso esponjoso (HALL, 2000). O tecido ósseo é sua estrutura interna possui canais medulares e transversos de *Havers* e os canais

de *Volkman* (KODAMA, 2003; TORTORA, 2000). Em resposta a modificações das forças a que está submetido o osso tende a resistir “imóvel” ou deformar-se. As forças ou cargas superiores ao limite elástico ósseo e pouco tempo de recuperação podem levar á deformações plásticas permanentes ou fraturas (GUYTON, 1988).

Nos períodos iniciais do reparo, o ácido ribonucléico (RNA) mensageiro do IGF-I foi expresso pelas células mesenquimais, por condrócitos imaturos, pré-osteoblastos, osteoblastos e osteócitos no calo ósseo. Após duas semanas de reparo, os osteoblastos continuavam a expressar IGF-I. Tal fator parece estar envolvido na proliferação e diferenciação de osteoblastos e condrócitos, atuando como um fator mitogênico autócrino e parácrino durante o reparo ósseo. Apesar de ser encontrado em menores quantidades quando comparado como IGF-II, o IGF-I promove maior síntese de colágeno, sendo mais ativo sobre o tecido ósseo.

O reparo de lesão de tecido ósseo osteoporótico continua representando um problema para os cirurgiões, paciente e ao Sistema Único de Saúde. Os implantes ortopédicos normalmente carecem de características básicas dos tecidos vivos, como capacidade de auto-reparo e manter um adequado suprimento sanguíneo, e capacidade de modificar a sua estrutura e propriedades em resposta a fatores ambientais como, por exemplo, cargas mecânicas.

O mecanismo de ligação do tecido ao biomaterial é diretamente relacionado ao tipo de resposta tecidual que ocorre na interface tecido/biomaterial. Nenhum material implantado em tecidos vivos pode ser considerado totalmente inerte, porque sempre haverá algum tipo de resposta nos tecidos provocada pela inserção do material.

No entanto, o que torna um material bioinerte elegível é a sua capacidade de ser tolerado pelo organismo, com mínima formação de envoltório fibroso no sítio de implantação, e ausência de resposta local do sistema imunológico (RIGO *et al.*, 1999). Outra consideração observada nos materiais bioinertes é a presença escassa de células fagocitárias na interface, com rápida resposta fagocitária e formação de uma pseudocápsula ao redor do implante, imperceptível em muitos casos. Os suportes que proporcionam ligações de natureza química entre o material e o tecido ósseo são bioativos e induzem osteointegração. Os materiais reabsorvíveis, após permanecerem em contato com os tecidos, são degradados, solubilizados ou

fagocitados pelo organismo ao longo do tempo, possibilitando osteocondução e uma ligação mais próxima entre o biomaterial e o tecido (DUARTE *et al.*, 2006).

O substrato ideal é aquele que mimetiza a matriz extracelular do tecido hospedeiro de forma que ele possa agir como um guia tridimensional para promover ataque, multiplicação, migração e função por parte das células. De uma maneira geral, as propriedades desejáveis em um material para crescimento ósseo podem ser resumidas da seguinte forma (AGRAWAL & RAY, 2001):

1. Ser biocompatível e bioativo;
2. Ser biodegradado à medida que o processo de reparação ou regeneração ocorre;
3. Ter porosidade e ser permeável para permitir uma difusão apropriada;
4. Possuir poro com tamanho adequado para prover crescimento do tipo celular a que se destina;
5. Possuir adequada propriedade mecânica para o meio a que se destina;
6. Oferecer uma superfície condutiva para a aderência celular;
7. Facilitar ou, se possível, induzir a formação pelas células semeadas;
8. Ter habilidade de conduzir sinais biomoleculares, como fatores de crescimento;

Quanto à biodegradação, esse substrato deve ser degradado no corpo humano a uma taxa que possa ser controlada, e a resultante da degradação deve ser não-tóxica, biocompatível e ser facilmente excretada pelo corpo (WANG, 2003).

## **2.4 Substitutos ósseos**

Diversas substâncias demonstraram propriedades de acelerar ou iniciar o processo de reparo, induzindo a osteogênese. Estas substâncias são utilizadas como material de implante osteoindutor, apresentando potencial osteogênico e quimiotático, sendo estas propriedades atribuída à presença de proteínas ósseas morfogenéticas, presentes nestes tecidos (BRAGA *et al.*, 1999; KHAN *et al.*, 2001; BODEN *et al.*, 2002; MOREIRA, 2004; MACHADO *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2005; RESENDE *et al.*, 2006; BALDINI ET AL., 2011; BALDINE *et al.*, 2011; CALORI *et al.*, 2011; SCHMITT *et al.*, 2012).

Preenchimentos de defeitos ósseos pós-traumáticos podem exigir enxertos ósseos, se tornando um procedimento comum no mundo somando 2,2 milhões de cirurgias (CALORI et al., 2011; GIANNOUDIS et al., 2005; CUNHA, 2012).

Para auxiliar no reparo ou formar novo osso, vários materiais implantares são utilizados, em odontologia e medicina (COCHRAN *et al.*, 1997; SANDHU & KHAN, 2002; MOREIRA, 2004; CHIN, 2004; MACHADO *et al.*, 2005). Os materiais que simplesmente fornecem um arcabouço para o crescimento vascular e posteriormente calcificação são conhecidos como osteocondutores. Os materiais denominados osteoindutores possuem fatores de crescimento, que regulam a proliferação celular de tecidos diferenciados. Os morfogenes, incluindo a proteína óssea morfogenética, são osteoindutores controladores de substância que iniciam o desenvolvimento de tecidos, órgãos e sistemas pela indução de células indiferenciadas a conversão fenotípica (LOURENÇO, 2002; BALDINI et al., 2011; CALORI et al., 2011; CUNHA 2013).

Osteogênese também é importante no reparo e consolidação de faturas por caracterizar, a capacidade de formar novo osso a partir de osteoblastos viáveis presentes no próprio enxerto ou osso (HERFORD, 2011; OLIVEIRA et al., 2012).

Os primeiros experimentos foram realizados para estudar a reparação óssea em 1938, por Lavander, que relatou inicialmente a implantação de fragmentos ósseos vivos de 1,0 a 1,5 cm de comprimento tanto subcutaneamente quanto intramuscularmente, Lavander concluiu que havia uma substância possível de ser extraída do osso e capaz de ativar células mesenquimais para formação tecido ósseo (LOURENÇO, 2002).

A descoberta chave foi encontrada por Marshall Urist (1965), constituiu na implantação de fragmentos ósseos desmineralizados tanto subcutaneamente quanto intramuscularmente em animais. Estes fragmentos possuíam a capacidade de induzir a formação óssea ectópica. A auto-indução ocorre quando uma célula indutora – um monócito – atua sobre uma célula induzida – um macrófago ou um pericito - causando a diferenciação tanto para uma célula osteoprogenitora quando para uma célula condroprogenitora (URIST, 1965; CHIN, 2004).

Um estudo posterior revelou que a pulverização das partículas ósseas, levava à inativação da propriedade morfogenética óssea, muito provavelmente pela formação de radicais livres da absorção de energia e quebra da cadeia molecular,

ambas levando à desnaturação protéica. Estes estudos auxiliaram a confirmação que a propriedade osteoindutora na matriz óssea era o resultado de uma proteína óssea morfogenética não colagênica (SYFTESTAD & URIST, 1979; LOURENÇO, 2002; RESENDE *et al.*, 2006).

Segundo Wozney (1992), as BMPs são proteínas encontradas em altas concentrações no tecido ósseo e são consideradas as responsáveis pela habilidade indutiva e regenerativa dos enxertos ósseos desmineralizados (RESENDE *et al.*, 2006).

Os enxertos ósseos heterógeno, são materiais ósseos porosos derivados dos ossos de animais como, por exemplo, o boi. Este material pode ser fabricado de diferentes texturas, tamanhos e formas (GARG, 1999).

A extração de enxerto é obtida de vários animais, como bois, porcos, renas, cães e coelhos (URIST, 1965; BESSHO *et al.*, 1990; BESSHO *et al.*, 1992; NAKASHIMA, 1992; JORTIKKA *et al.*, 1993; ROSEN & THIES, 1995; COCHRAN *et al.*, 1997; SANDHU & KHAN, 2002; MACHADO *et al.*, 2005). Os materiais produzidos para a utilização na regeneração óssea devem apresentar um controle rigoroso na sua fabricação, no que diz respeito às suas propriedades físicas, químicas e mecânicas, a fim de permitir uma resposta celular previsível ao material enxertado (GARG, 1999).

Mais de 250.000 enxertos de ossos são realizados, anualmente nos EUA, fazendo com que este seja o segundo tipo de enxerto mais comum (KENLEY *et al.*, 1993; MOREIRA, 2004).

O enxerto alógeno é obtido dos tecidos de cadáveres humanos que são processados em condições de esterilidade e armazenamento em várias formas e tamanhos nos bancos de ossos humanos. Este tipo de enxerto possui algumas limitações: dificuldade de obtenção de osso humano viável em quantidade, proibição em vários países da comercialização de produtos de órgãos e tecidos humanos, além da possibilidade de transmissão de doenças (GONÇALVES *et al.*, 1998 (SASSIOTO *et al.*, 2003).

O enxerto autógeno é a retirada do material do próprio paciente, também é uma alternativa, porém sua aquisição agrega riscos ao paciente, incluindo incisão cirúrgica adicional, aumento da morbidade pós-operatória e enfraquecimento do local doador. Além disso, ocorrem circunstâncias na qual a quantidade de enxerto

autógeno disponível é insatisfatória, como nas crianças e nos adultos submetidos a procedimentos operatórios anteriores (BRAGA *et al.*, 1999; WALSH *et al.*, 2000; KHAN *et al.*, 2001; BUDDECKE *et al.*, 2001; SASSIOTO, 2004; MOREIRA, 2004; CHIN, 2004).

Todas as modalidades de enxerto estão sujeitas à influência de fatores inerentes ao organismo receptor, como a tensão de oxigênio, desnutrição protéica, doenças metabólicas, hormônios e vitaminas (GREENBAUM & KANAT, 1993; GUARNIERO *et al.*, 1996; GUARNIERO *et al.*, 2003).

Para Toriumi & Robertson (1993) um dos fatores mais importantes que podem determinar o sucesso ou fracasso de enxertos ósseos indutores em cirurgias reconstrutivas é a eficiência do material carreador. O carreador ideal deve aumentar a exposição dos tecidos do hospedeiro à substância de crescimento e assegurar uma distribuição uniforme sem permitir que o material implantado ultrapasse os limites do sítio. O carreador deve ser absorvido na medida em que for ocorrendo à formação óssea. Além disso, deve ser seguro, biodegradável, biocompatível e formulado para permitir tamanho e formas adequados para o enxerto (GONÇALVES *et al.*, 1998).

Enxerto ósseo composto de origem bovina, obtido a partir de uma porção inorgânica medular, orgânica cortical e um aglutinante natural composto de colágeno ósseo desnaturalizado; Composto por proteína, mineral e aglutinante natural. A manutenção da estrutura original do tecido ósseo confere resistência e permite osteocondução; A matriz orgânica cortical otimiza a reabsorção, enquanto a matriz inorgânica medular confere resistência ao leito; na maioria nos enxertos o material enxertado corre o risco de sair do sítio retardando o processo de consolidação. Existem no mercado produtos que evitam esse processo; como a membrana reabsorvível de cortical óssea bovina; por ser reabsorvível; sua permeabilidade permite a troca de nutrientes e impede a invaginação de células não osteogênicas; atua como barreira para o tecido mole e ao mesmo tempo estabiliza a falha permitindo a remodelação óssea; Possui estudos clínicos que demonstra a eficácia e segurança. Material de fácil manipulação, flexível e permite ajuste após hidratação com soro fisiológico; Barreira biológica natural osteoprotetora.

Os carreadores mais utilizados são materiais a base de fosfato de cálcio, como as hidroxiapatitas, fosfato tricalcio, e o cálcio.

A hidroxiapatita devido a sua excelente biocompatibilidade e bioatividade originada durante a aplicação ou após a implantação se tornou de grande importância nas áreas médica e odontológica (ROSS *et al.*, 1995; DAMIEN *et al.*, 2003; ABDUL *et al.*, 2004).

A associação de hidroxiapatita com fibras colágenas é responsável pela dureza e resistência do tecido ósseo. Quando é feita a remoção do cálcio, os ossos mantêm sua forma intacta, tão flexível quanto os tendões, este procedimento é realizado quando se deseja produzir cortes (no osso), para Análises Histomorfológicas (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

O cimento de hidroxiapatita facilita o contorno ósseo, podendo ser implantada sob a forma de blocos ou grânulos, apresenta similaridade com a composição do osso mineral e capacidade osteoindutora (DUJOVNY *et al.*, 1997; DAMIEN *et al.*, 2003; RESENDE *et al.*, 2006).

Ripamonti & Reddi, (1994), afirmaram que a engenharia de regeneração tecidual tem se desenvolvido rapidamente no campo da biologia celular e molecular. Os grandes processos recentes na elucidação da biologia molecular das BMPs e seus receptores ajudaram na promoção e entendimento de um grande campo de uso futuro para as BMPs.

## **2.5 Efeito da TLBP sobre a osteogênese**

O reparo ósseo é um processo regenerativo altamente complexo e, essencialmente, uma repetição de eventos de desenvolvimento. Com técnicas de tratamento mais avançadas pode-se facilitar e/ou acelerar este processo. O tecido ósseo esta em constante remodelamento é um processo dinâmico entre reabsorção e formação.

O acometimento de uma lesão no tecido ósseo, traumática ou cirúrgica, é seguido por seqüências histológica definida, destinada a reparar a lesão. Podemos considerar o processo de consolidação de um osso como ocorrendo em cinco estágios: hematoma, proliferação, calo ósseo, consolidação remodelação e a seguir,

substituído por osso secundário ou lamelar (KAPLAN et al., 1994; LIRANI, 2004; AMADEI *et al.*, 2006; LUSTBERG, 2012 TESETOP).

À medida que o tecido celular cresce de cada fragmento, este amadurece, e as células básicas dão origem aos osteoblastos os condroblastos formam cartilagem em certas regiões da lesão. Os osteoblastos depositam uma matriz intercelular de colágeno e polissacarídeos que logo se torna impregnada de sais de cálcio para formar o osso não amadurecido do calo da fratura (CROCI, 1997; CROCI *et al.*, 2003).

A consolidação pode ocorrer diretamente entre as superfícies dos ossos e não precisa ocorrer através do calo externo ou do calo endosteal como em um osso cortical (CROCI *et al.*, 2003).

A palavra laser é um acrônimo com origem na língua inglesa: *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* (Amplificação de Luz por Emissão Estimulada de Radiação), cuja teoria é do físico Albert Einstein, que em seu artigo “Zur Quantum Theories der Strahlung”, de 1917, expôs os princípios físicos da emissão estimulada (fenômeno laser), sendo este classificado como de “alta potência” e em “baixa potência” (COOMBE *et al.*, 2001; VINCK *et al.*, 2003; LIRANI, 2004; LANDA, 2005). Esta radiação é eletromagnética não ionizante, sendo um tipo de fonte luminosa com características bastante distintas daquelas de uma luz fluorescente ou de uma lâmpada comum (TATARUNAS *et al.*, 1998).

Os lasers são classificados de acordo com o material que é excitado, como lasers gasosos (CO<sub>2</sub> Argônio, Hélio-Neônio, Excimer, Kriptônio), lasers sólidos (Rubi, Neodímio), lasers líquidos (Rodamina) e lasers diodo ou semicondutores (Arseniato de Gálio-Alumínio e Gálio-Alumínio Índio e Fósforo). O laser diodo é um *chip* semicondutor que funciona como um diodo elétrico, sendo a região ativa formada por materiais semicondutores diferentes.

As radiações são diferenciadas pelo comprimento de onda, pois todas consistem do mesmo tipo de energia. Podemos dividir o espectro em três partes: radiação infravermelha, luz visível e radiação ultravioleta. Nos últimos anos os aparelhos laser apresentam comprimento de onda variando entre 630nm a 685nm e 790nm a 904nm.

A fluência (ou densidade de energia ou ainda, dosimetria), é o resultado do produto da potência óptica (expressa em Watts), pelo tempo de duração da sessão,

expresso em segundos, dividido pela área da secção transversal do feixe laser, expressa em centímetro quadrado.

A chave da operação do laser está no processo de emissão estimulada, previsto por Albert Einstein em 1917. A luz laser é gerada através de um componente o fóton, os elétrons situados nos vários níveis de energia após serem provocados por uma energia de excitação giram ao redor do átomo, com a agitação, os eletros passam para níveis superiores, no entanto tendem a permanecerem estáveis, voltando de níveis e assim liberando fótons (DINIZ, 2006).

Uma característica fundamental dos átomos é que eles emitem e absorvem luz em frequências bem definidas, que é consequência de apenas poderem existir em determinados estados quânticos, cada estado com sua energia específica. A luz de um laser, como a luz de qualquer outra fonte resulta de emissão radiativa dos átomos. As características da luz laser são monocromaticidade, colimação, brilhancia, direcionalidade e coerência. Então, a luz gerada pelo laser possui um único comprimento de onda, com uma amplitude muito limitada, raios de luz que são paralelos e as ondas de luz emitidas se situam perfeitamente no tempo e no espaço.

Mester foi o primeiro pesquisador a investigar a aplicação clínica experimental do laser em baixa potencia, tanto *in vitro* como clinicamente. Em um de seus estudos, compara a evolução de feridas por queimaduras em animais, concluindo que a terapia laser promovia efeitos sistêmicos (MESTER *et al.*, 1983).

Estudos em *vivo* e em *vitro* afirmam que a terapia LBP estimula a atividade de osteoblastos, fibroblastos e osteoclastos na área irradiada (LUBART *et al.*, 1993; RIGAU 1996; GROSSMAN *et al.*, 1998; TAMURA *et al.*, 1998; GROSSMAN *et al.*, 2000; DORTBUDAK, 2000; CARNEVALLI, 2001; COOMBE *et al.*, 2001; NICOLAU *et al.*, 2003; RENNO, 2006; ABOELSAAD *et al.*, 2008).

De acordo com Nicolau *et al.*, (2003) a terapia LBP aumenta a atividade de reabsorção e formação óssea em fraturas de fêmures de ratos, cinco dias após a cirurgia o volume ósseo e a superfície de osteoclastos do grupo tratado eram maiores que o controle e em quinze dias pós-cirúrgicos a superfície de osteoblastos e a taxa de aposição mineral eram também estatisticamente maiores no grupo tratado com laser.

Diniz JS *et al.*, em seu estudo analisou o efeito da terapia com laser em combinação com bifosfonatos na estrutura do osso osteopênico. Os 35 ratos fêmeas Wistar divididos em grupos e submetidos a tratamento com laser gálio-alumínio-arsênio, 830 nm, 50 mW e 4 J / cm<sup>2</sup> nos segmentos vertebrais. Ambos os tratamentos foram realizados ao longo de um período de 8 semanas. Na associação entre laser e bisfosfonato, o volume de osso trabecular foi significativamente maior nas vértebras irradiadas. Concluiu que a terapia a laser local associada com tratamento com bifosfonatos sistêmica é o melhor método para inverter a osteopenia vertebral causada pela ovariectomia.

Em pesquisa realizada Piheiro e colaboradores (2003) afirmam que a terapia LBP pode aumentar a liberação de fatores de crescimento, os quais estimulam a diferenciação e proliferação celular, possibilitando a maior deposição da matriz.

A terapia LBP é um método aceito pela Food and Drug Administration (FDA) como tratamento clínico eficaz para cicatrização de tecidos, por ser amplamente estudado, porém, seu uso em seres humanos ainda não foi aprovado pela FDA (VINCK *et al.*, 2003; LIRANI & LAZARETTI-CASTRO, 2005).

O estudo de soluções que favoreçam a regeneração óssea é de vital importância, pois a perda óssea, derivada da osteoporose, pode ser agravada por seqüelas de traumas, processos patológicos ou após determinados procedimentos cirúrgicos. Em função disso, o processo de reparo ósseo tem sido ao longo dos anos, motivo de varias pesquisas e diversos métodos de tratamento têm sido preconizados como o uso do laser de baixa potência visando um efeito de biomodulação positiva sobre o reparo de um defeito ósseo (CONLAN *et al.*, 1996; DAVID *et al.*, 1996; DICKISON *et al.*, 1998; OZAWA *et al.*, 1998; LIMEIRA JUNIOR, 2001; PINHEIRO *et al.*, 2001; NICOLAU, 2001; SILVA JÚNIOR *et al.*, 2002; NASCIMENTO, 2003; NICOLAU *et al.*, 2003; KHADRA *et al.*, 2004; LIRANI, 2004; LANDA, 2005; CERQUEIRA *et al.*, 2007; PRETEL *et al.*, 2007; BLAYA *et al.*, 2008; TORRES *et al.*, 2008; OBRADOVIĆ *et al.*, 2008; MÁRQUEZ MARTÍNEZ *et al.*, 2008; DINIZ *et al.*, 2009, Se-Jeong Pyo *et al.*, 2012).

Estudos realizados utilizando o laser relatam seus efeitos na estimulação de diferentes tipos de células, sendo capaz de promover um aumento da síntese de DNA e da síntese de proteínas. Além de promover a reabsorção de exsudatos, aumentar a deposição de colágeno, melhora da vascularização, regeneração

nervosa e a cicatrização de úlceras cutâneas (GONÇALVES & PARIZOTTO, 1998; TATARUNAS, 1998; FREITAS, 2001; PAZ *et al.*, 2001; TORRICELLI *et al.*, 2001; LOPES, 2002; SALGADO, 2002; CARVALHO *et al.*, 2003; MARCON & SANFELICE, 2005; RENNO, 2006).

Warren *et al.* demonstraram que o tipo I expressão de colagénio foi aumentado em culturas de curto prazo. Portanto, a hipóxia pode ter um duplo efeito em colagénio do tipo I expressão. No entanto, é interessante que o colágeno tipo I expressões eram em grande parte afetada pelo LBI em nossos sistemas. Hirata *et al.* demonstraram que LLLT aumentos de colágeno tipo I expressão em células osteoblásticas. Além disso, laser de baixa intensidade estimula a mineralização via aumentou BMPs nas células osteoblásticas.

Schwartz-Filho *et al.*, (2011) observaram em estudo *in vitro* a influência da terapia laser de baixa intensidade na osteogênese de células osteogênicas da calvárias de rato a irradiação laser usando (InGaAlP), no comprimento de onda de 685 nm, potência de 35 mW, nas doses 25, 77 e 130 J / cm<sup>2</sup> (7, 22 e 37 s, respectivamente). Os parâmetros avaliados foram curva de crescimento (4, 7, e 11 dias) e formação nodular de matriz mineralizada (14 dias). Seus resultados não mostraram diferenças significativas relacionadas com a curva de crescimento (4, 7, e 11 dias). Dentro de 14 dias, as culturas osteogênicas mostraram áreas com matriz calcificada, com diferenças entre as doses de 25 e 130 J / cm<sup>2</sup>. Concluíram que a irradiação laser 685nm (25, 77 e 130 J / cm<sup>2</sup>) não influenciou o crescimento e proliferação celular, embora o processo extracelular de mineralização possa ter seu padrão alterado pelo LBI em culturas de células osteogênicas.

Como exposto acima existem evidências científicas que demonstram os efeitos biológicos positivos do laser de baixa intensidade, no entanto escaça as literatura que demostram de forma clara a relação do laser com tecido ósseo osteoporótico e enxerto ósseo e quais os parâmetros devem ser utilizados.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Analisar o efeito osteogênico do laser de baixa potência aliado a enxerto ósseo e membrana reabsorvível de cortical óssea no tratamento de defeito produzido no fêmur de ratas ovariectomizadas.

#### **3.2 Objetivos Especificos**

Analisar através de técnica morfométrica o quociente entre a área de neoformação e a área total do defeito observando a neoformação óssea na interface osso-enxerto e no crescimento de tecido ósseo em direção ao centro do defeito.

Analisar através de técnicas histológicas as características do processo de osteogênese e neoformação tecidual, os aspectos morfológicos e estruturais a quantidade de trabéculas ósseas, osteoblastos, tecido osteoide, fibroblastos e colágeno em defeito ósseo tratados com estimulação laser de baixa potência aliado a enxerto ósseo no fêmur de ratas ovariectomizadas.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

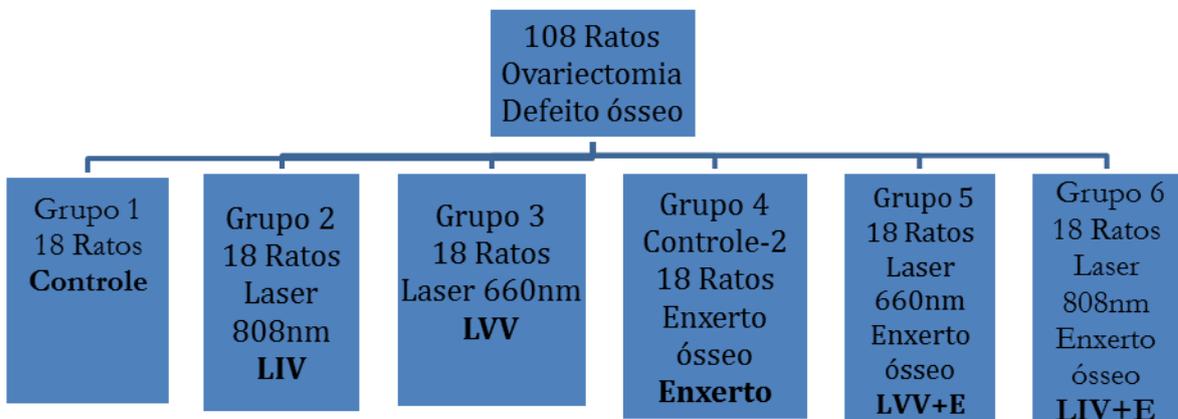
### 4.1 Animais de Experimentação

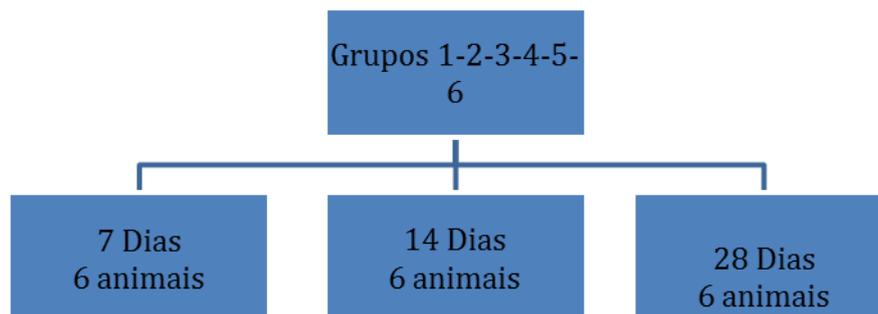
A amostra foi composta por 108 ratas (*Rattus norvegicus*), da linhagem Wistar, com peso corpóreo variando entre 230 a 350 gramas, adultos procedentes do Biotério da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul- UFMS, Campo Grande, MS.

O presente projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Mato grosso do Sul protocolo nº 388 de 13/12/2011 (Anexo-A).

### 4.2 Grupos Experimentais

Todos os 108 animais foram submetidos a ovariectomia e ao defeito ósseo, posteriormente divididos igualmente em grupos e subdivididos pelos dias de eutanásia conforme figuras abaixo:





### 4.3 Análise Radiológica e Digital Óssea

A técnica radiológica foi realizada com o aparelho de raios X marca Dabi Atlante, indústria Médico Odontológica, modelo Spectro (70x) e classe I - tipo B comum. Programado com 40 kVp (pico de quilovoltagem), com distância diafragma/chassis (foco-filme) de 70cm e o tempo de exposição de 0,25 mAs (miliampère-segundo). O animal foi contido e posicionado e foram obtidas radiografias simples em incidência ântero-posterior (AP).

O processamento (revelação, fixação, lavagem e armazenamento) foi feito em câmara escura e tanque com solução processadora reveladora e fixadora (Kodak Rp-X-Omat para 38 litros) em temperatura ambiente. A revelação dos filmes (Dental Filme Speed E - tamanho 3,1x 4,1cm<sup>2</sup>) foi manual e padronizado da seguinte forma:

- Vinte segundos (20) no revelador
- Banho intermediário por trinta segundos (30) em água corrente
- Dez minutos (10) na solução fixadora
- Banho final por cinco minutos (5) em água corrente
- Secagem até que a solução evapore naturalmente

Após a secagem os filmes foram armazenados em cartões com etiqueta informando o número do animal, data da realização da tomada radiológica e do processamento. Todos os procedimentos radiográficos ocorreram na sala de Raios-X da UFMS.

O procedimento radiológico foi realizado em duas etapas, as quais ocorreram da seguinte maneira: os animais foram submetidos ao primeiro exame radiográfico em seguida foi realizado o primeiro procedimento cirúrgico (ovariectomia), transcorridos os sessenta dias com os animais em repouso, o exame radiológico foi repetido.

Estas radiografias foram posteriormente analisadas pelo sistema digital Digora versão 1.51 for Windows da Orion Corporation SOREDEX (Finland) onde foram estabelecidas áreas de leitura da densidade com o mesmo tamanho e localização.

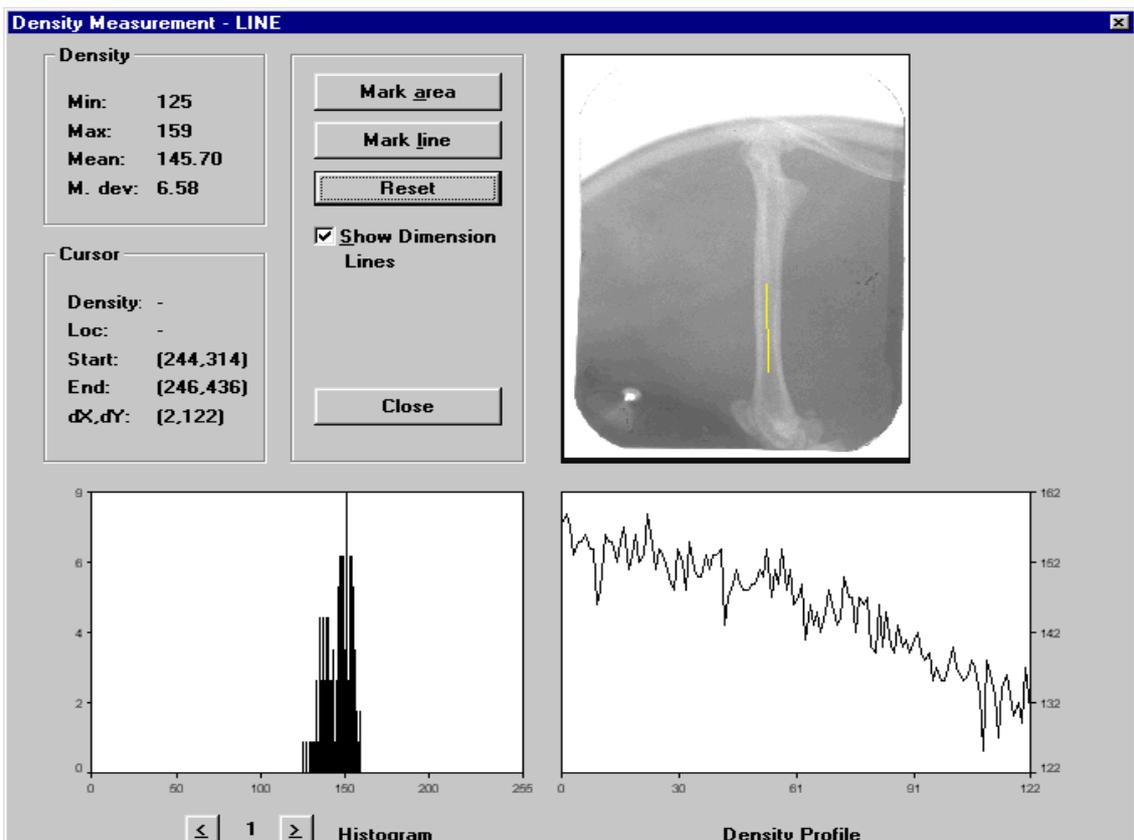


Figura 1. Layout da tela do programa computacional sistema digital Digora versão 1.51 utilizado na leitura da densidade óssea, resultado pós-cirúrgico.

## 4.4 Procedimentos Cirúrgicos

### 4.4.1 Ovariectomia

Para realização da ovariectomia bilateral os animais foram submetidos à anestesia dissociativa composta por cetamina a 5% e Xilazina a 2% associado a (opióide) Morfina na proporção 1:2 em doses de 0,10 – 0,15 ml/100g de peso corpóreo por via peritônio. Após a anestesia os animais foram posicionados em plano cirúrgico em decúbito ventral e foi realizada a tricotomia da região abdominal lateral seguida de antisepsia com álcool iodado. A pele e a musculatura foram incisadas longitudinalmente, na linha média próximo da região renal abaixo da última costela, e o ovário identificado e exposto. Foi realizada a hemostasia através da ligação da parte superior da trompa com fio de seda nº 4 Ethicon – Johnson & Johnson e excisão ovariana juntamente com a gordura circundante, o oviduto e uma pequena porção do útero. Terminado o procedimento cirúrgico os planos foram suturados com fio absorvível catagute nº 4 e a pele com fio de seda nº 4.

Os animais submetidos à ovariectomia receberam analgésico pós-operatório que foi realizada com buprenorfina na dose 0,05 mg/kg, por via intramuscular e antiinflamatório diclofenaco de sódio por via intramuscular na coxa posterior esquerda do animal, após prévia antissepsia com álcool iodado à 2%, utilizando-se seringa e agulha de insulina. Esta administração foi realizada logo após o fechamento da parede abdominal e posteriormente de 12/12 h durante 4 dias consecutivos na proporção de 10mg/kg/dia.

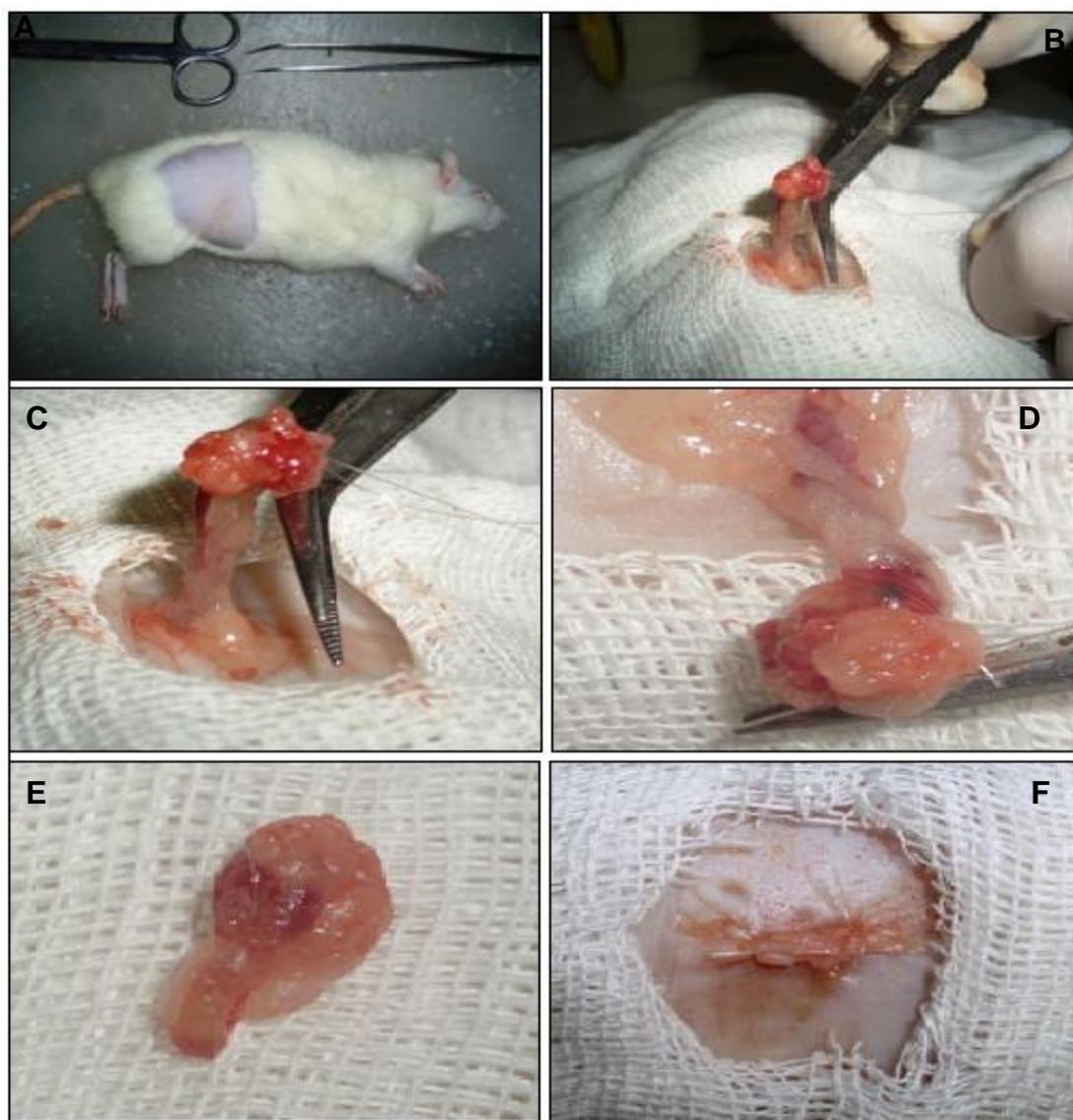


Figura 2 – Fotomontagem representativa: A – Tricotomia, B – incisão longitudinal e identificação, C- ovário identificado e exposto. D- hemostasia ligação da parte superior da trompa E- excisão ovariana, F- procedimento cirúrgico terminado os planos suturados com fio.

#### 4.4.2 Produção dos defeitos ósseos

A produção dos defeitos ósseos foi iniciada após a comprovação de osteoporose, que foi realizada por exames radiológicos feitos antes e depois da ovariectomia e comparados através do Software Digora 1.51.

O protocolo cirúrgico foi realizado por médicos veterinários no Hospital Veterinário da UFMS no mês de fevereiro de 2012. Após exame semiológico

realizado pelos Médicos Veterinários, os animais receberam medicação pré-anestésica de Ketamina a 5% (50mg/kg) (Sepso Ind. E Com. Ltda, Jacarei, SP) e Xilasina a 2% (10mg/kg) (Sepso Ind. E Com. Ltda, Jacarei, SP), via intra-peritoneal e para a manutenção anestésica foi administrado Isoflurano, por via inalatória, através de um cone facial com oxigênio e vaporizador universal com fluxo de 1 L.min<sup>-1</sup>.

Constatado o plano anestésico, os animais foram posicionados para raspagem dos pêlos na face lateral do membro inferior direito. Sob técnica asséptica, foi feito acesso à diáfise do fêmur na face proximal (crânio-lateral) para confecção do defeito ósseo. Após a exposição óssea, foi realizado um defeito de 2mm de diâmetro empregando uma broca diamantada do tipo esférica nº 1016 (KG Sorensen), de baixa rotação 4.000 RPM sob irrigação constante com soro fisiológico perfurando a cortical do osso até atingir o canal medular. Em seguida nos grupos 2, 5 e 6 o defeito foi preenchido com uma pasta formada por substância osteoindutora Gen – Mix (Genius Baumer biomaterial division), compósito de enxerto ósseo de origem bovina obtido a partir de uma porção orgânica medular, orgânica cortical e um aglutinante natural composto de colágeno ósseo desnaturalizado; a presença do aglutinante natural (colágeno), quando aglutinado ao sangue ou soro fisiológico, homogeneizado com solução salina 9%. Para que o biomaterial não sofra dispersão os defeitos serão recobertos com membrana biológica constituída de cortical óssea bovina descalcificada Gen Derm (Baumer biomaterial division S/A). Após estes procedimentos realizar-se-á síntese por planos com nylon poliamida 0,30, agulhado.

Imediatamente após a cirurgia e durante 4 dias consecutivos (24/24 horas), os animais receberam medicação anti-inflamatória e analgésica de flunixinina meglumina (Banamine® - Schering-Plough, Indústria Brasileira) administrado via intra-peritoneal na dose de 1,1 mg/kg.

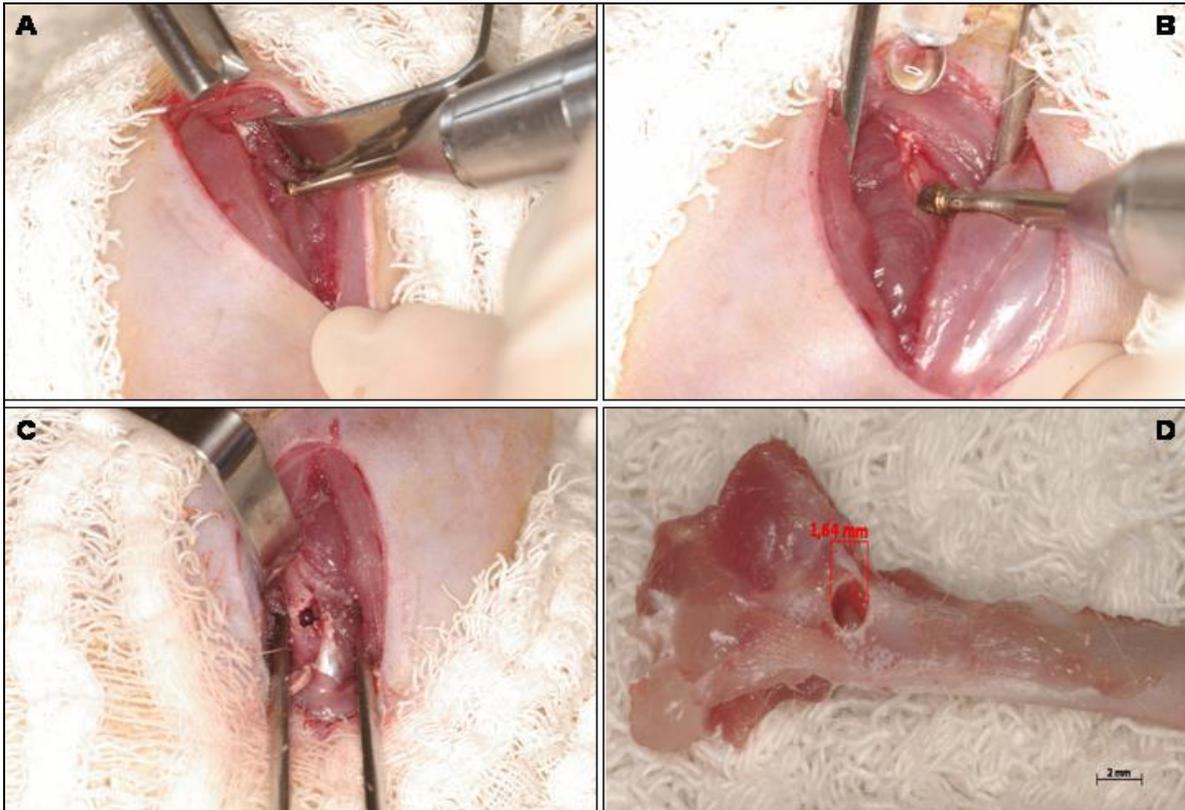


Figura 3. Fotomontagem representativa: A - incisão cirúrgica com exposição do osso do fêmur e início da confecção da falha óssea; B confecção da falha óssea utilizando broca esférica nº 1016; C - perfuração da cortical do osso até atingir o canal medular; D fêmur dissecado, onde observa-se a falha óssea produzida.

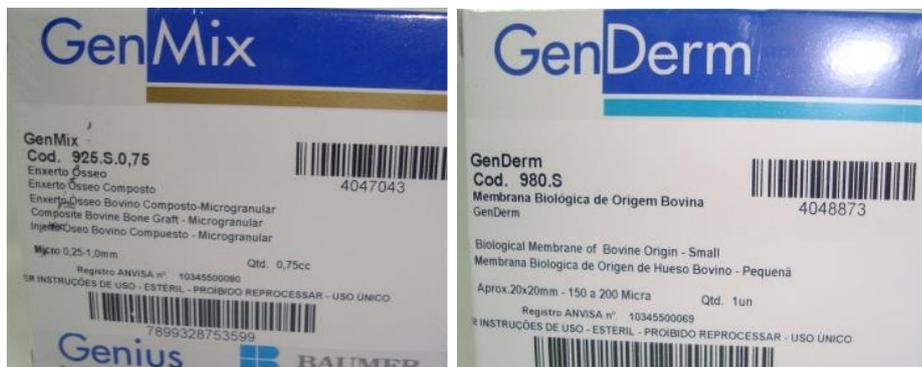


Figura 4 – Gen – Mix (Genius Baumer biomaterial division), e Gen Derm (Baumer biomaterial division S/A).

#### 4.5 Lasers de baixa potência

Os grupos, 3, 4, 5 e 6 no segundo dia de pós-operatório (defeito ósseo) foi iniciado o tratamento com irradiação laser, o aparelho utilizado foi um Photon Laser III (D.M.C. Equipamentos LTDA São Carlos – S.P., Brasil), diodo que é um semicondutor com meio ativo de InGaAlP (Laser vermelho) e AsGaAl (Laser Infravermelho) com emissão contínua conforme os parâmetros abaixo.

Emissor visível	Laser vermelho
Densidade de energia (DE)	130J/cm <sup>2</sup>
Potência	100 mW
Comprimento de onda	660nm
Modo de Aplicação	Pontual
Tempo	44 segundos por ponto

Protocolo de irradiação com laser InGaAlP.

Emissor visível	Laser Infravermelho
Densidade de energia (DE)	130J/cm <sup>2</sup>
Potência	100 mW
Comprimento de onda	808nm
Modo de Aplicação	Pontual
Tempo	44 segundos por ponto

Protocolo de irradiação com laser AsGaAl.

Os animais tratados receberam irradiação transcutânea a partir do primeiro dia da cirurgia, uma aplicação por dia em cinco pontos por aplicação destes: um ponto do lado direito do defeito, um ponto no lado esquerdo, um ponto na parte superior e inferior e um ponto realizado sobre o defeito ósseo.



Figura -5 Photon Laser III equipamentos LTDA São Carlos – S.P., Brasil.

As aplicações foram realizadas por um mesmo pesquisador, com laser a 90 graus, os animais não sofreram nenhum tipo de anestesia para tal procedimento. Os animais foram submetidos à eutanásia após 7, 14 e 28 dias.

#### **4.6 Eutanásia**

Decorrido o período de observação de 7, 14, 28 dias, os animais foram submetidos à eutanásia com injeção intraperitoneal letal Tiopental Sódico (Cristalia – Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda. – Campinas, SP) na dose de 120mg/ml.

Após serem cuidadosamente dissecados os tecidos moles suprajacentes, os fêmures dos animais foram desarticulados, removidos, e em seguida as peças foram avaliadas macroscopicamente com o objetivo de observar a condição do implante e, posteriormente, foram imersas em frascos herméticos, individuais, com formol tamponado a 10% e encaminhadas para estudo histopatológico.

## 7.7 Procedimentos Histológicos

Os animais foram identificados, pesados em seguida os fêmures testados foram retirados para análise histológica e histomorfométrica.

Os segmentos destinados à histologia foram fixados em formol a 10% por 24 horas. Após este período, descalcificados por EDTA, incluídos em blocos de parafina e submetidos a cortes transversais de 5 µm de espessura preparando-se lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina. Toda a extensão do defeito foi seccionada seqüencialmente com cortes no sentido longitudinal de tal modo que a região central do defeito cirúrgico fosse avaliada.

A avaliação histológica dos eventos ocorridos foi feita de forma descritiva, utilizando-se de um método semi-quantitativo baseado no conhecimento dos aspectos relacionados à normalidade e foi seguido requisitos utilizados por Leonel *et al.*, (2004) e Abo Elsaad *et al.*, (2008). Foi utilizado para análise um microscópio óptico de luz. Alguns parâmetros foram verificados para determinar os efeitos osteogênicos da terapia laser de baixa potência aliado a enxerto ósseo bovino em fêmur de ratas osteoporóticas para tanto, estes se basearam: trabéculas ósseas, osteoblastos, tecido osteoide, fibroblastos e colágeno.

Para quantificar as variáveis foi utilizado um sistema de Scores de intensidade zero a três cruces no período de eutanásia dos animais (7, 14 e 28 dias) classificadas conforme figura abaixo.

Ausente	(Ø)
Pouca Presença	(+)
Moderada Presença	(++)
Intensa Presença	(+++)

Scores de intensidade (0 a 3 cruces).

#### 4.8 Análises histomorfométrica

As áreas totais do implante e de neoformação óssea foram calculadas por meio da delimitação manual das áreas e a mensuração foi realizada utilizando o programa ImageJ 1.0 (Figura 6). As medidas iniciais das áreas (pixels) foram convertidas para  $\mu\text{m}$ , na proporção de um para 6,25 (1 pixel = 6,25  $\mu\text{m}$ ). Para análise estatística foram consideradas as proporções de neoformação óssea, através do quociente entre a área de neoformação e a área total do defeito proporção de osso neoformado: área de osso neoformado/área total do defeito, sendo expressas em porcentagem.

As imagens das lâminas destinadas à histomorfometria foram capturadas em aumento de 10X, que possibilitou um campo de visão amplo, permitindo a observação geral da área do defeito e dos tecidos adjacentes (Figura 6).

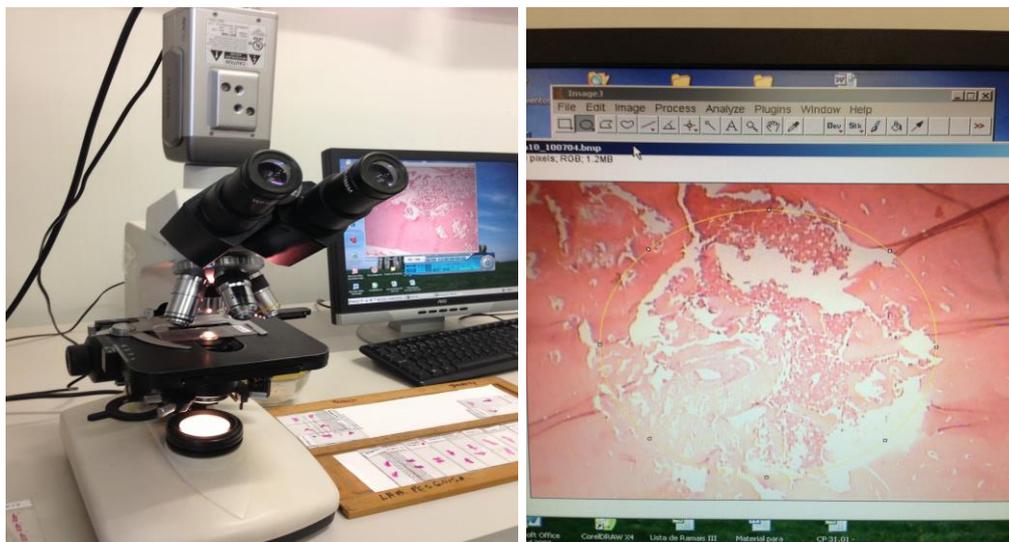


Figura 6 – Delimitação manual das áreas e mensuração das imagens das lâminas utilizando o programa ImageJ 1.0.

#### **4.9 Avaliação histopatológica descritiva**

As observações e considerações histopatológicas foram realizadas por um especialista em histopatologia animal, que recebeu as lâminas de forma cega, sem identificação de grupo e período de eutanásia. As imagens de cada campo foram obtidas a partir de um microscópio de luz Olympus® Japan - BX41 com uma câmera fotográfica acoplada de 10 mega pixel.

Os aspectos avaliados na análise microscópica basearam-se, fundamentalmente, na observação de neoformação óssea na interface osso-enxerto e no crescimento de tecido ósseo em direção ao centro do defeito. Outros critérios como a presença de células inflamatórias, tipo de tecido na área do defeito presença de fibroblastos, formação tecido fibroso, presença de osteoblastos, osteócitos e osteoclastos também foram considerados.

#### **4.10 Análise estatística**

Os dados foram inicialmente avaliados quanto à hipótese de normalidade de distribuição. Foi realizada a compilação das leituras de forma categórica onde foi aplicado o teste G para independência, verificando a dependência das leituras em relação aos grupos e aos tempos analisados os dados foram analisados estatisticamente através do Software BioEstat 5.0.

Os dados foram organizados de forma a se comparar os valores em porcentagem de neoformação óssea em relação à área do defeito por meio de análise histomorfométrica. As comparações intergrupos foram realizadas utilizando-se o Teste de Kruskal-Wallis e pós-teste t Student. O nível de significância considerado foi de 95% ( $p < 0,05$ ).

As características do processo de osteogênese e neoformação tecidual, os aspectos morfológicos e estruturais foram analisados e os resultados foram expressos de forma descritiva.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Avaliação histopatológica semi-quantitativa e descritiva

#### 5.1.1 Grupos tratados sem o uso de enxerto ósseo

##### 5.1.1.1 Período de 07 dias

Nos animais controle, observaram-se, aos 07 dias, áreas de neoformação óssea na borda lateral para o centro do defeito, nota-se formação de tecido ósseo imaturo e formação trabéculas ósseas em pequena intensidade (Figura 7).

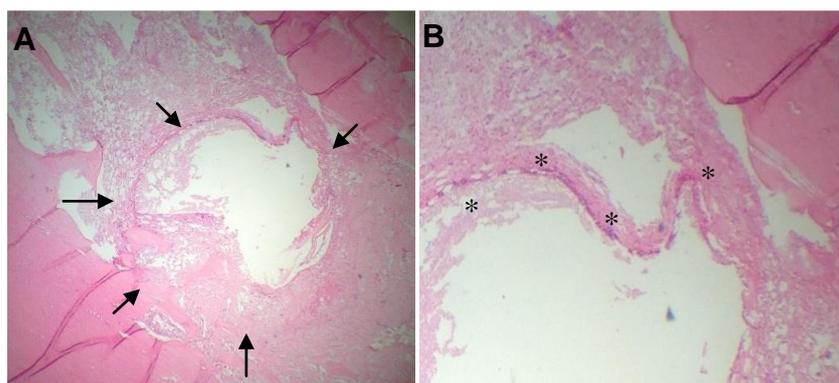


Figura 7 - Montagem de fotomicrografias das lâminas obtidas dos animais do G1A- após 07 dias da confecção do defeito: A – Vista geral do local do defeito (↑). HE, 10X. B – Neoformação óssea (\*). HE, 20X. C – Atividade de células (+). HE, 25X.

Os animais do Grupo 2 - LIV receberam irradiação laser de baixa potência em comprimento de onda de 880nm. Observou-se neste grupo que o defeito ósseo foi ocupado por células ósseas, possuindo fibras colágenas se dispondo em camadas concêntricas em torno de canais centrais; formando a matriz primária, células inflamatórias escassas. Observou-se, ainda, grande proximidade e contato do tecido ósseo em formação com o osso cortical antigo (Figura 8).

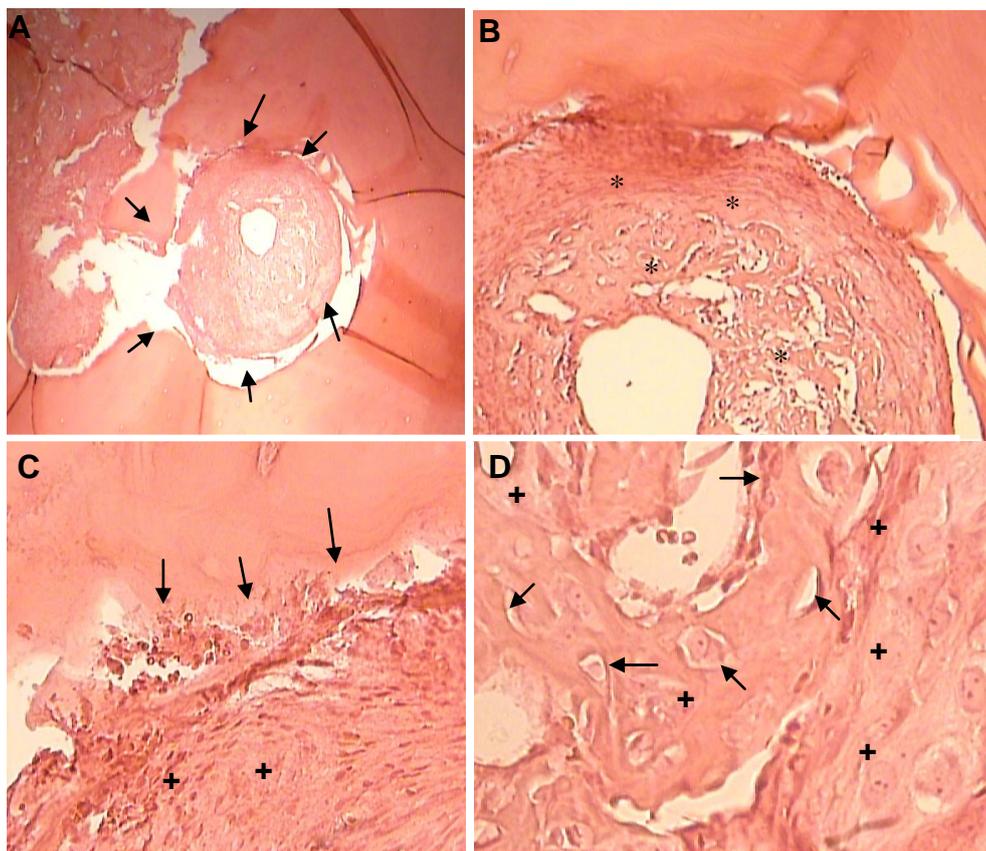


Figura 08 - Montagem de fotomicrografias das lâminas obtidas dos animais do G2 após 07 dias de Laser Infra Vermelho A – Visão geral do local do defeito, (↑) HE, 10X. B - Camadas concêntricas formando trama para vascularização (\*). 20X C – Tecido recém-formado em organização (+), integração da matriz antiga com a recém formada (↑) 40x. D – Trabéculas ósseas recém-formadas com tecido osteóide (↑).

Nos animais do Grupo-3 Laser Vermelho Visível (LVV), observou-se, aos 07 dias, intensa área de neoformação óssea no centro do defeito. Nota-se intensa atividade osteogênica em direção ao interior do defeito com formação da trama óssea unindo as margens, com tecido ósseo em formação (Figura 9).

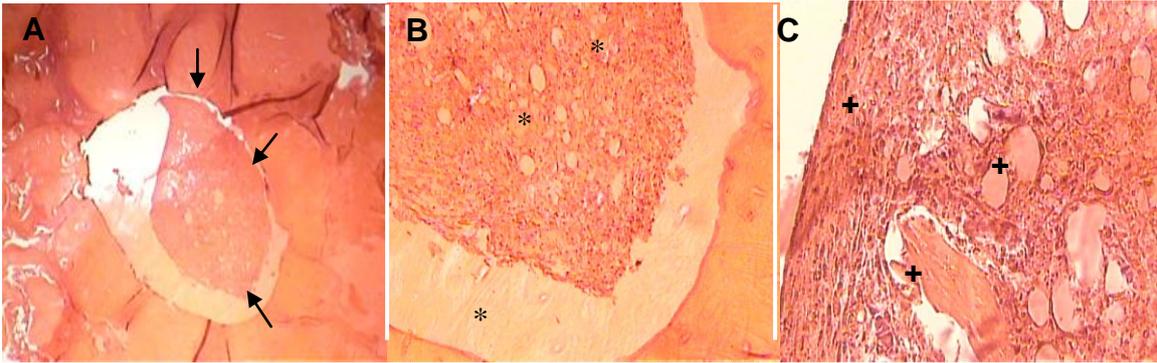


Figura 9 - Montagem de fotomicrografias das lâminas obtidas dos animais do G3 após 07 dias de utilização do LVV: A – Vista geral do local do defeito ósseo (↑). HE, 10X. B – Arcabouço ósseo e exsudato nas margens (\*). HE, 20X. C – Tecido ósseo em transformação (+) ocupando os espaços do defeito. HE, 40X.

A análise histológica semiquantitativa no período de 07 dias nos grupos tratados com Laser Vermelho Visível e Infravermelho evidenciou valores superiores de trabéculas ósseas, osteoblastos, osso primário, matriz colágena e tecido osteóide, presença de fibroblastos volumosos e poucas células características de processo inflamatório na comparação com o grupo controle (Figura 10).

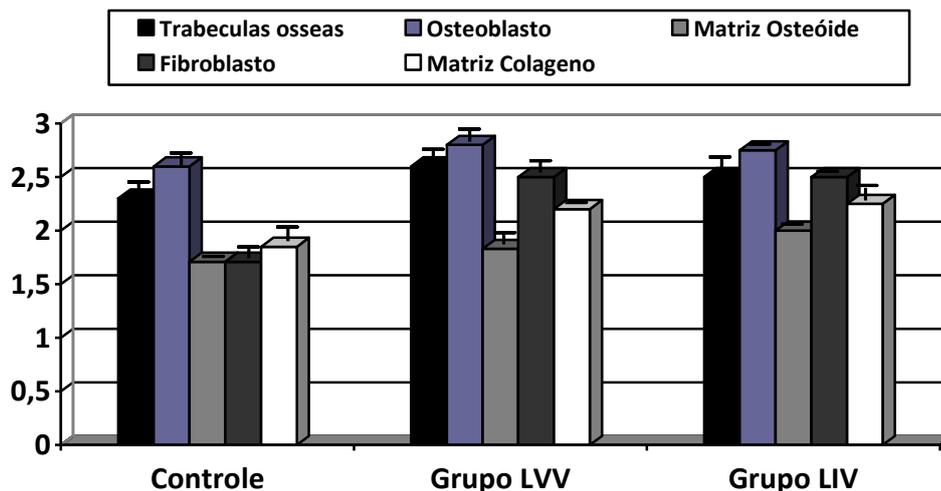


Figura 10 - Gráfico comparativo entre a média e desvio padrão dos escores de intensidade (0 a 3) obtidos pela análise semi-quantitativa de trabéculas ósseas, osteoblastos, matriz osteóide, fibroblastos e matriz colágeno aos 7 dias após a confecção do defeito ósseo com  $P < 0.05$ .

### 5.1.1.2 Período de 14 dias

Nos animais controle, a análise histológica evidenciou no período de 14 dias, áreas de neoformação óssea com tecido invaginando a área interna e buscando a parte central do defeito (Figura 11).

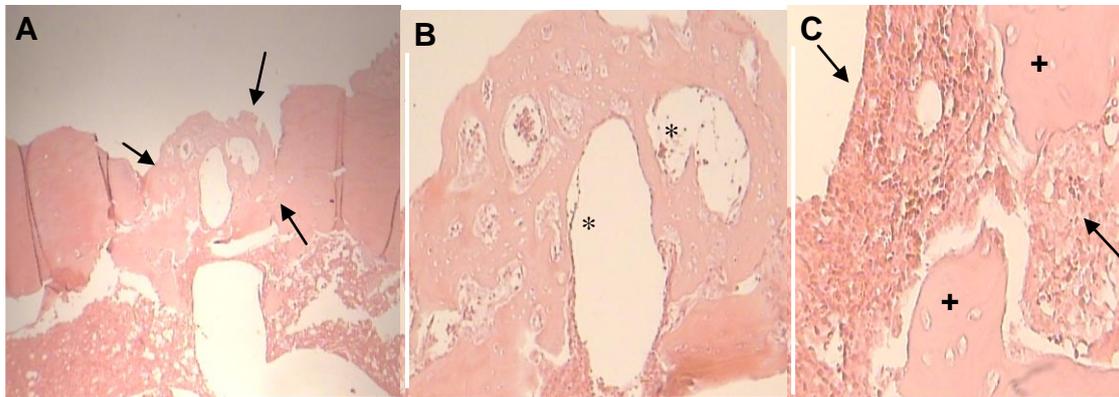


Figura 11 - Montagem de fotomicrografias das lâminas obtidas dos animais do Controle após 14 dias de confecção do defeito: A – Vista geral do local do defeito com crescimento ósseo (↑). HE, 10X. B – Presença de lacunas ao centro do defeito osteoblastos nas margens (\*). HE, 20X. C – Tecido ósseo antigo se integrando ao novo em organização (+). Notar a presença de trabéculas neoformadas (↑). HE, 40X.

Os animais do Grupo LIV houve intensa neoformação óssea nas bordas do defeito, com áreas ocupadas por osso bem organizado nas margens para região central, notou-se angiogênese e intensa vascularização oriundas do canal medular. Observou-se atividade de células osteoprogenitoras fibroblastos e osteoblastos (Figura 12).

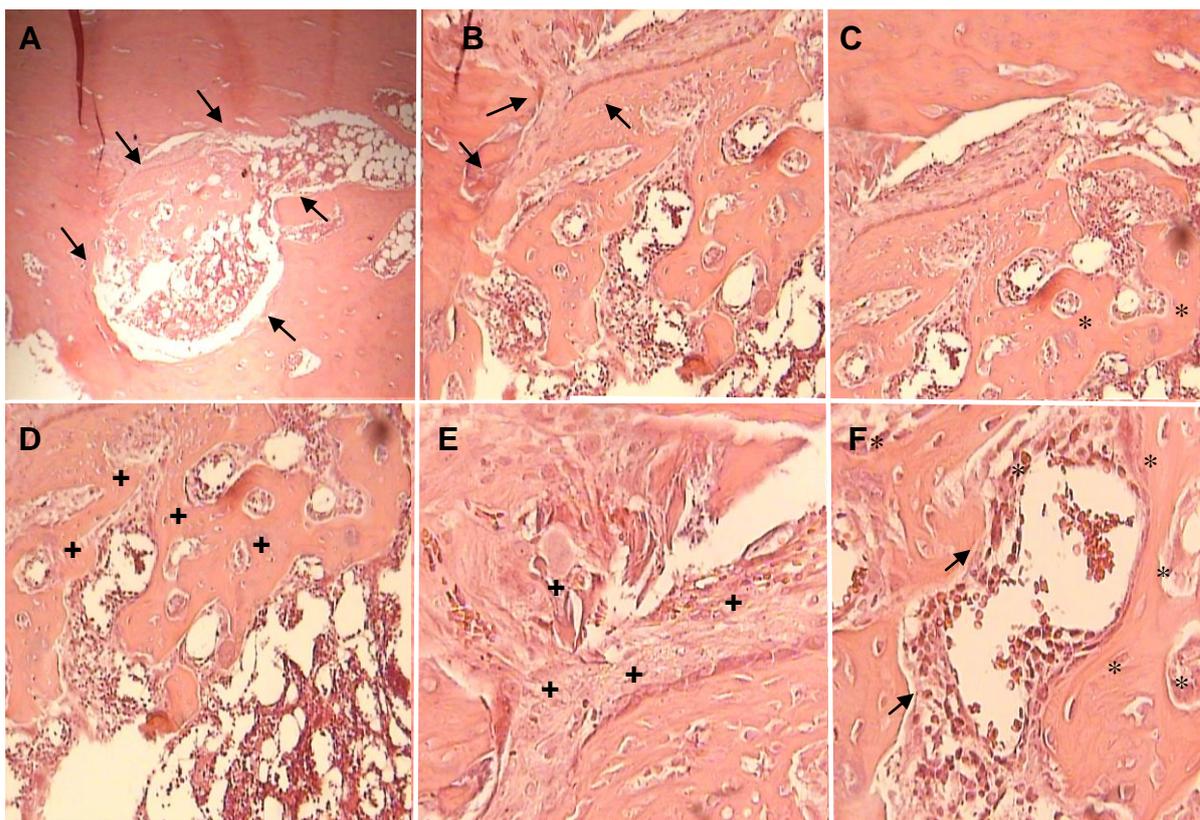


Figura 12 - Montagem de fotomicrografias das lâminas do Grupo LIV-14: A – Defeito ósseo, apresentando neoformação óssea ao redor e no seu interior (↑). HE, 10X. B – Tecido ósseo neoformado integrado a margem do defeito (↑). HE, 20X. C e D- Osso secundário em formação (\*) e tecido osteoide (+), E e F – Processo de neoformação vinda na margem para dentro do defeito, integrando o osso novo ao antigo (+), formação organizada de tecido ósseo com trabéculas ósseas e intensa atividade de células osteoprogenitorase (↑) com osteoblastos sintetizando osso presença de osteócitos e canais de Haverns (\*). HE, 40X.

Nos animais do Grupo LVV que receberam irradiação laser de baixa potencia comprimento de onda de 660nm Laser Vermelho Visível, observou-se aos 14 dias o aumento do crescimento ósseo no interior do defeito, presença de trabeculado ósseo e tecido ósseo em formação. A ocupação óssea no interior do defeito ocorreu, vinda da parte endosteal, com osso integrado a matriz cortical antiga (Figura 13).

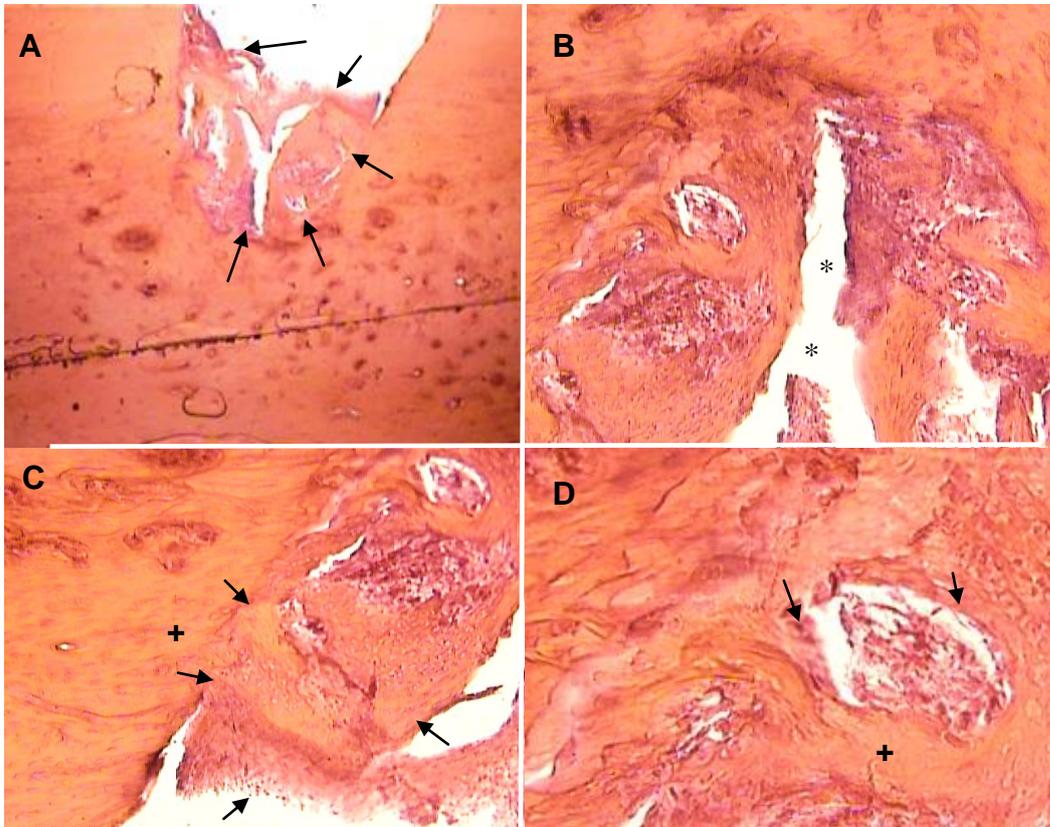
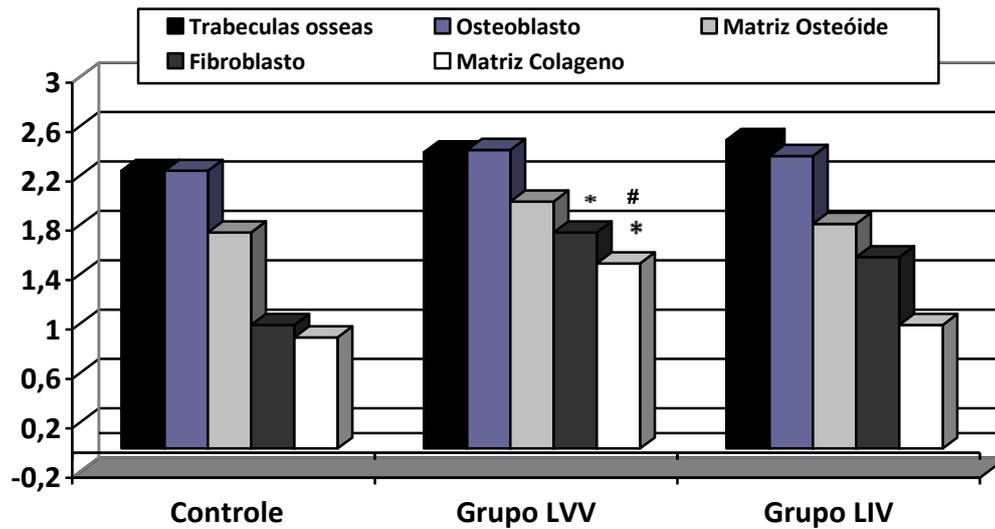


Figura 13 - Montagem de fotomicrografias das lâminas obtidas dos animais do Grupo LVV após 14 dias de realização de tratamento: A – Vista geral local do defeito demonstrando a neoformação óssea do centro para a parte superior (↑). HE, 10X. B – Demonstra lacunas interligando as margens (\*). C – Osso em processo de maturação (↑), integrado a matriz antiga (+). HE, 40X. D- Canais de Havers em formação (↑) osso primário em processo de maturação (+), HE, 65X.



Fig

ura 14 - Gráfico comparativo entre a média e desvio padrão dos escores de intensidade (0 a 3) obtidos pela análise semi-quantitativa de trabéculas ósseas, osteoblastos, matriz osteóide, fibroblastos e matriz colágeno aos 14 dias após a confecção dos defeitos ósseos. As barras representam o valor médio de cada grupo  $\pm$  EPM. \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao Grupo Controle. # indica diferença estatisticamente significativa em relação ao Grupo LIV.

A análise histológica semiquantitativa evidenciou no período de 14 dias nos grupos tratados com Laser Vermelho Visível e Infravermelho valores superiores de trabéculas ósseas, osteoblastos, matriz colágeno, tecido osteóide e poucas células características de processo inflamatório na comparação com o grupo controle,  $P < 0.05$ , como mostra a Figura 14.

Na análise entre os períodos estudados observou-se um aumento na quantidade de matriz colágena no Grupo tratado com Laser Infravermelho no períodos entre 07 e 14 dias com significância de  $p=0,0253$  (Figura 15).

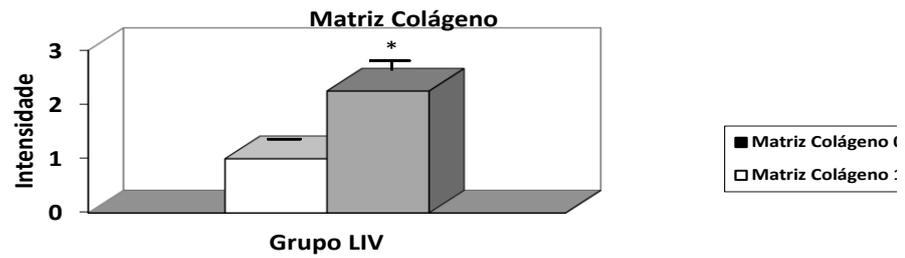


Figura 15 - Gráfico comparativo entre a média e desvio padrão dos escores obtidos pela análise semi-quantitativa de Matriz Colágeno nos períodos de 07 e 14 dias após a confecção do defeito ósseo, \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao período de 07 dias com  $p=0,0253$ .

### 5.1.1.3 Período de 28 dias

Observou-se que os animais controle aos 28 dias apresentaram área de neoformação óssea nas bordas superiores do perioosteio em direção ao centro do defeito, sem o seu preenchimento total. Nota-se pouca presença de células no interior do defeito (Figura 16).

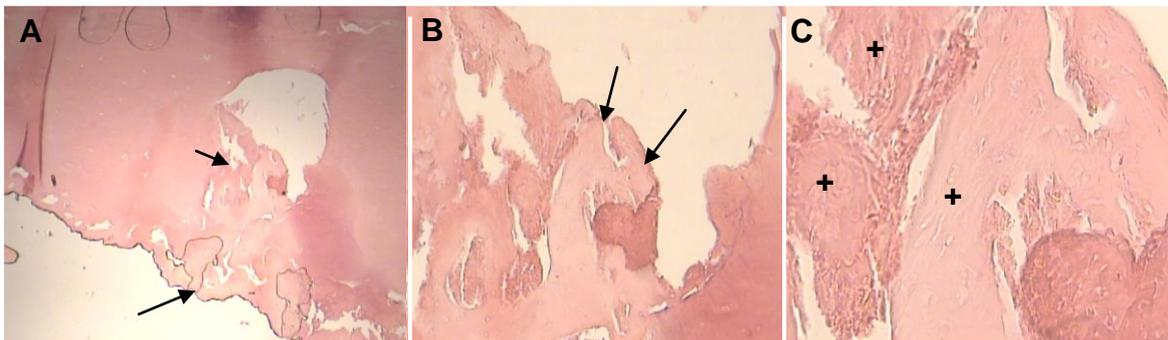


Figura 16 - Montagem de fotomicrografias das lâminas obtidas dos animais do Grupo Controle após 28 dias de confecção dos defeitos: A – Vista geral do local do defeito com crescimento ósseo ( $\uparrow$ ). HE, 10X. B – Neoformação óssea para o interior do defeito (\*). HE, 20X. C – Tecido ósseo imaturo desorganizado (+) ocupando as margens superiores do defeito. HE, 40X.

A avaliação histológica dos animais do Grupo LVV - 28 dias revela neoformação óssea ao redor do defeito, com intensa atividade fibroblástica formando matriz colágena em direção ao interior do defeito, caracterizando a formação da matriz óssea imatura que esta dando lugar ao tecido ósseo maduro com osteocitos e canais de vascularização (Figura 17).

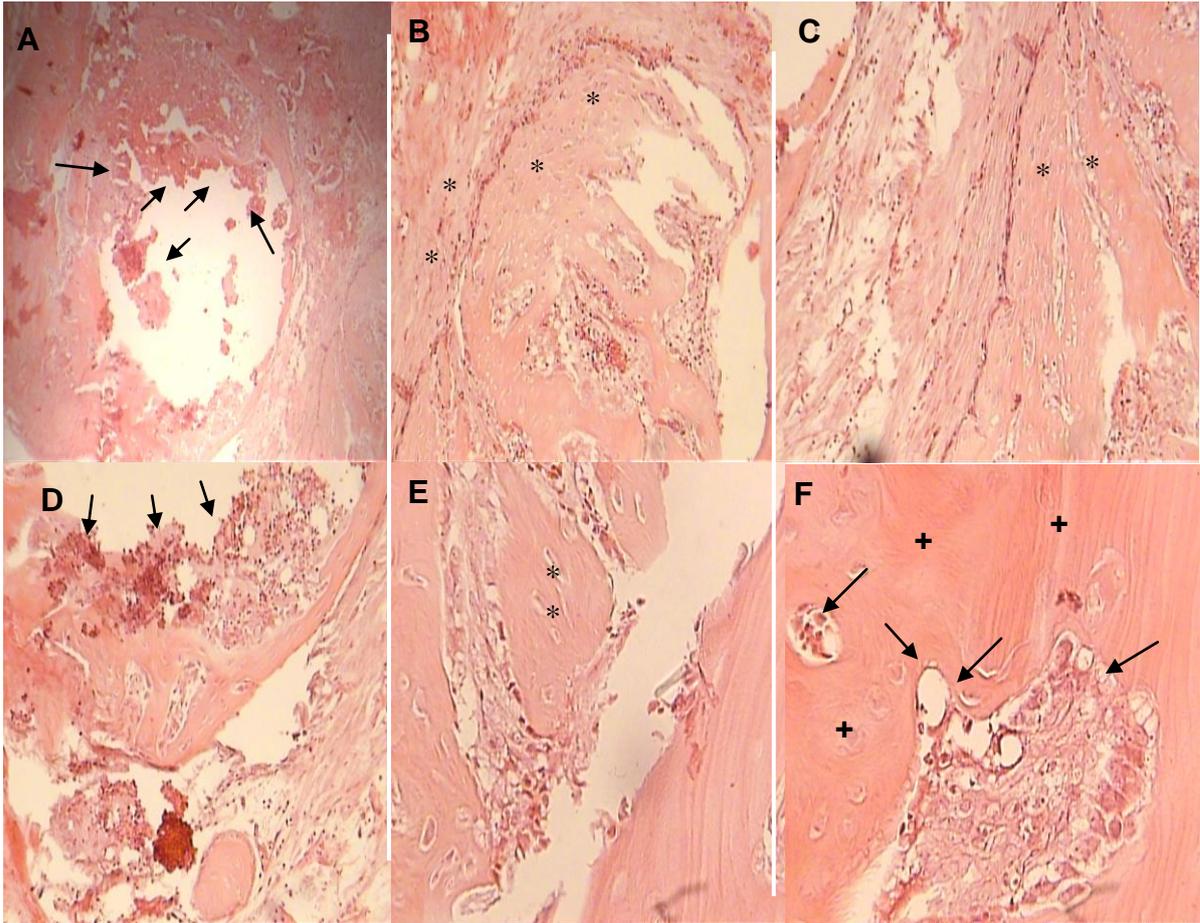


Figura 17 - Montagem de fotomicrografias das lâminas do G3-28 dias: A - Neoformação óssea nas margens do defeito (↑). HE, 10X. B, C - Notar tecido ósseo primário em formação (\*). HE, 20X. D- Intensa presença Fibroblástica (↑). E - Matriz osteóide em formação (\*). HE, 40X. F- Osso secundário (+). Notar presença de Canais Havers e Volkmann (↑). HE, 65X.

Foi observado para os animais do Grupo LVV um aumento progressivo na quantidade de fibroblastos do tratamento no período de 14 dias para o de 28 dias, com relevância estatística,  $p=0,0164$  (Figura 18).

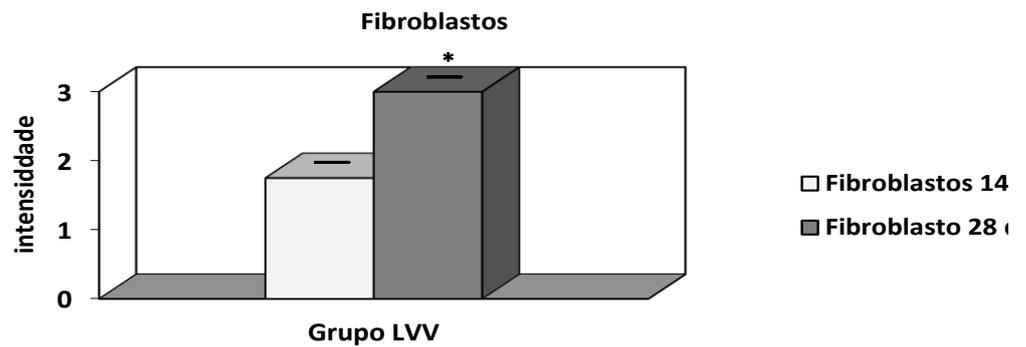


Figura 18 - Gráfico comparativo entre a média e desvio padrão dos escores obtidos pela análise semi-quantitativa de fibroblastos 14 e 28 dias após a confecção do defeito ósseo. \* Demonstra aumento progressivo na quantidade de fibroblastos para o Grupo LVV no período de 14 para 28 dias com  $p=0,0164$ .

Os animais Grupo LIV tratados por 28 dias apresentaram preenchimento do defeito por osso em processo de maturação (Figura 19).

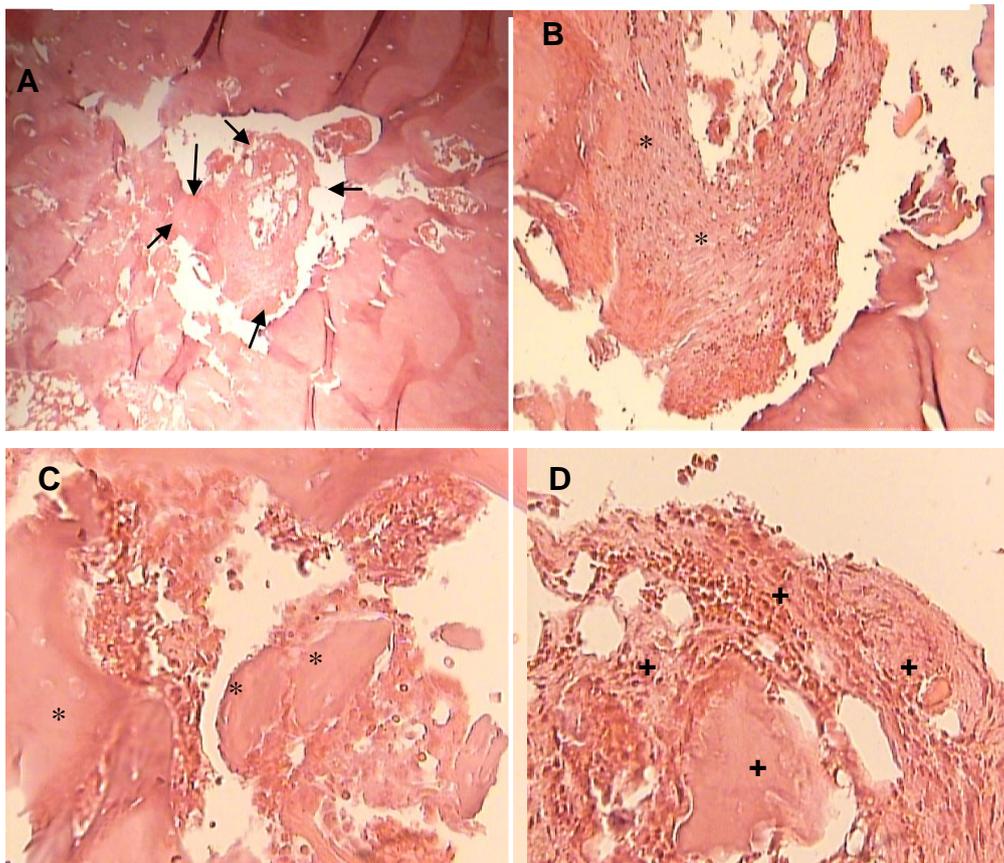


Figura 19 - Montagem de fotomicrografias das lâminas do Grupo LIV-28 dias: A – Área do defeito apresentando neoformação óssea (↑). HE, 10X. B – Tecido em processo de maturação com intensa presença de células ósseas (\*). C – Osso no interior do defeito (\*). HE, 40X. D – Células formando trabéculado ósseo e em processo de maturação (+). HE, 60X.

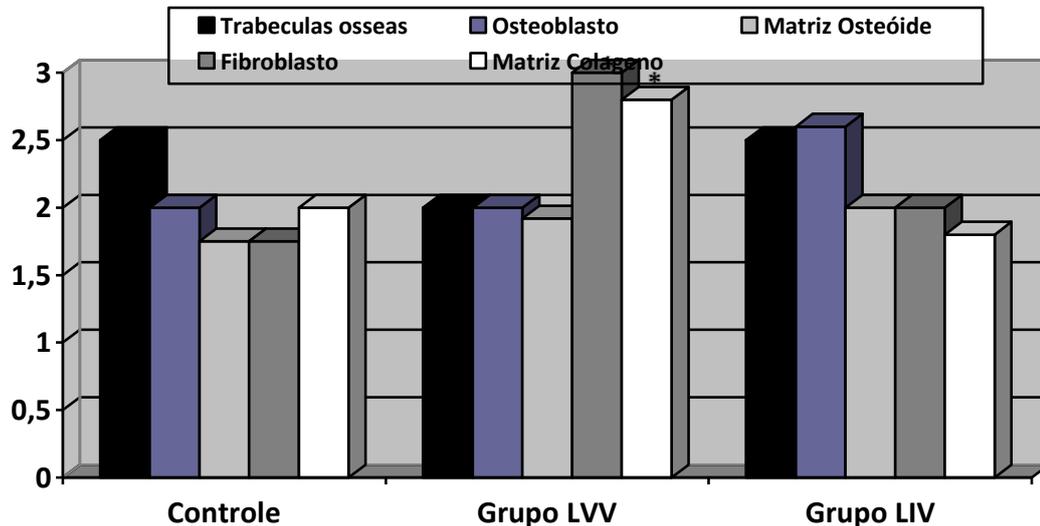


Figura 20 - Gráfico comparativo entre a média e desvio padrão dos escores de intensidade (0 a 3) obtidos pela análise semi-quantitativa de trabéculas ósseas, osteoblastos, matriz osteóide, fibroblastos e matriz colágeno aos 28 dias após a confecção do defeito ósseo. As barras representam o valor médio de cada grupo  $\pm$  EPM. \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao Grupo Controle e Grupo LIV. Nível de significância  $P < 0,05$ .

## 5.1.2 Grupos analisados que receberam enxerto ósseo

### 5.1.2.1 Grupos analisados para período de 07 dias

Na análise histológica dos fêmures na região do defeito ósseo, nos animais Grupo controle Enxerto, tratado com enxerto ósseo observou-se ao período 07 dias, pequenas áreas de neoformação óssea na interface osso-enxerto. Além de tecido ósseo recém-formado nas margens do defeito ósseo, mas com pequeno contato com osso antigo, nota-se discreta presença de células ósseas em direção ao interior do defeito ósseo (Figura 21-A e D).

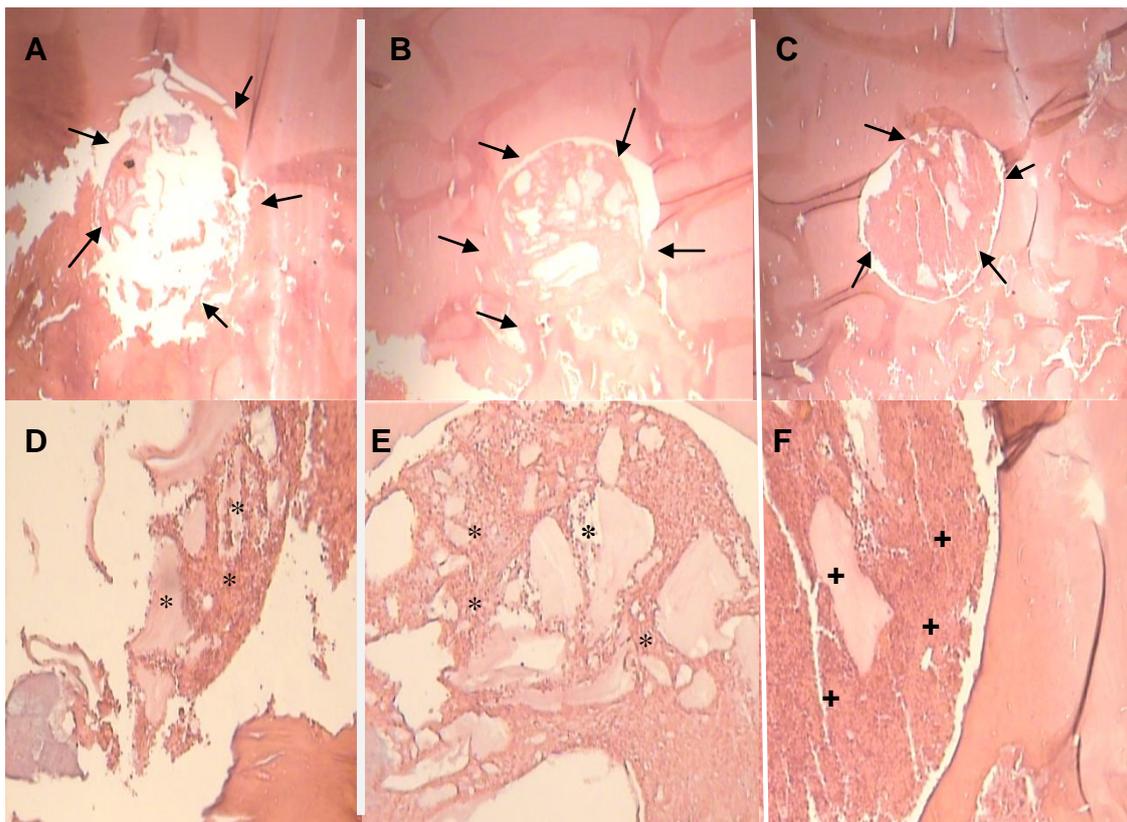


Figura 21 - Montagem de fotomicrografias das lâminas dos Grupos avaliados utilizando enxerto ósseo, para o período de 07 dias de observação. Grupo Controle Enxerto, A - Vista geral do local do defeito com crescimento ósseo nas margens (↑) HE, 10X, Grupo LVV+E - B - Vista geral do local do defeito; osso recém-formado nas margens e no centro (↑), Grupo LIV+E. C- Vista geral do local do defeito com presença de células osteoprogenitoras tomando o centro e as margens do defeito (↑), HE, 10X, Grupo Enxerto. D - Presença tecido recém-formado envolvendo parte do enxerto e osso imaturo (\*), HE, 20X, Grupo LVV +E - E- Área de neoformação óssea no centro do defeito integrado ao enxerto envolto por intensa atividade de células osteoprogenitoras (\*), Grupo LIV+E, HE, 20X. F - Presença de intensa atividade de células mesenquimais envolvendo o enxerto; preenchido e integrado por osso imaturo (+), HE, 40X.

As lâminas dos animais pertencentes ao Grupo LVV+E, com 07 dias de tratamento mostraram crescimento ósseo ao redor e no interior do enxerto, vindo da margem inferior para o centro e vice-versa, abundante atividade de células osteoprogenitoras e colágeno que posteriormente dará lugar à tecido ósseo secundário. Nota-se, a osteointegração, e osteocondução. Não foram notados sinais inflamatórios (Figura 21-B e E).

Os achados histológicos referentes ao Grupo LIV+E, no período de 07 dias evidenciam células mesenquimais indiferenciadas, envolvendo as áreas de neoformação óssea, preenchendo a parte interna do defeito. Note-se ainda a

absorção e osteointegração do tecido ósseo enxertado sendo preenchido por tecido ósseo recém-formado (Figura 21- C e F).

A análise histológica apresentada mostrou que os animais com defeito preenchido por enxerto ósseo aliado com laser Infravermelho (808nm) e Vermelho Visível (660nm) apresentaram melhores resultados na avaliação de trabéculas ósseas quando comparado ao grupo controle, os melhores resultados foram para o LVV com  $p= 0,0192$  (Figura 22).

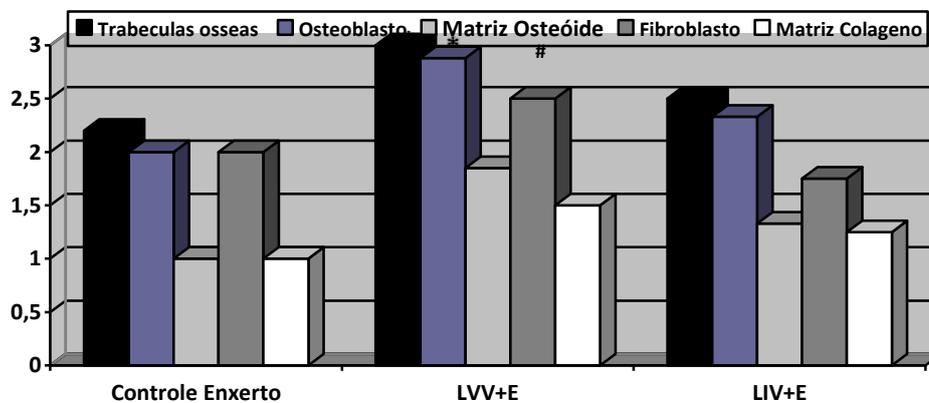


Figura 22 - Gráfico comparativo entre a média e desvio padrão dos escores (0 a +++) obtidos pela análise semi-quantitativa de trabéculas ósseas, osteoblastos, matriz osteóide, fibroblastos e matriz colágeno aos 7 dias após a confecção dos defeitos ósseos e uso de enxerto ósseo. As barras representam o valor médio de cada grupo  $\pm$  EPM. \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao Grupo Controle Enxerto. # indica diferença estatisticamente significativa em relação ao Grupo LIV+E. Nível de significância  $P < 0,05$ .

### 5.1.2.2 Grupos analisados para o Período de 14 dias

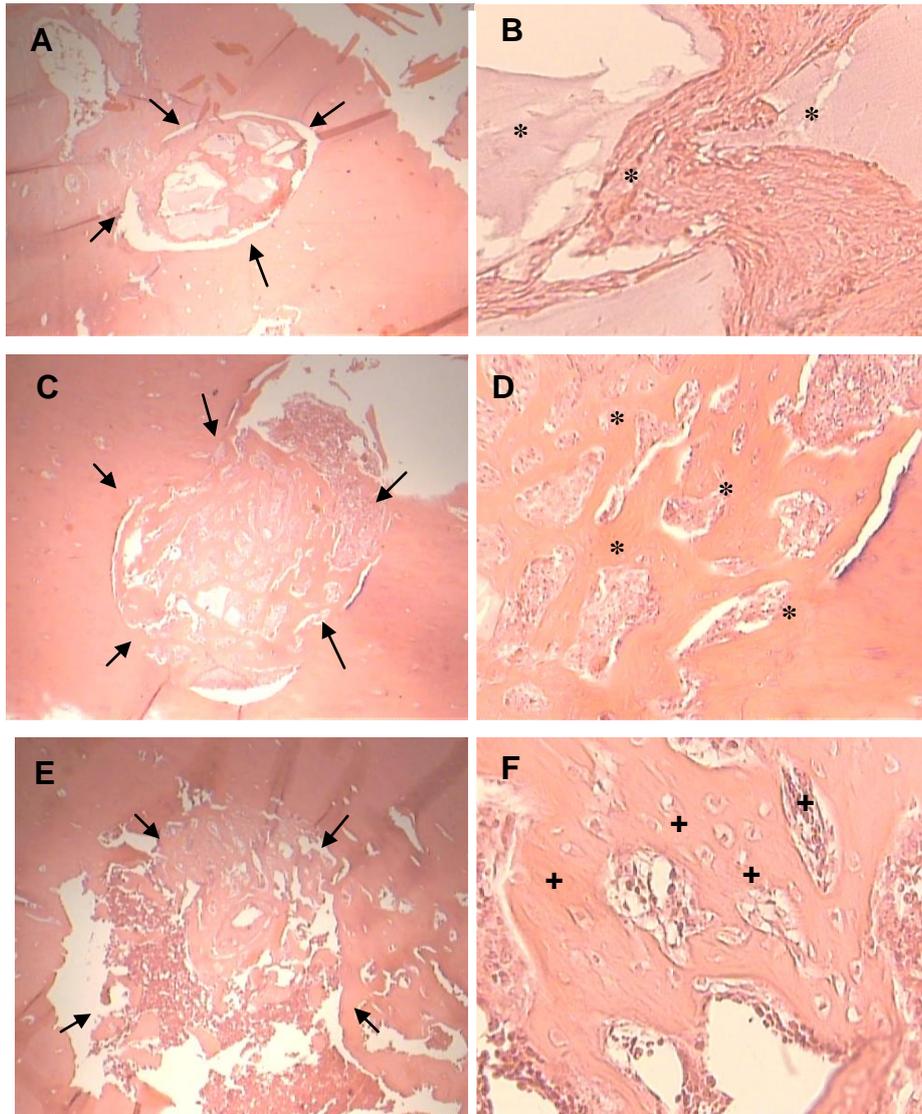


Figura 23 - Montagem de fotomicrografias dos animais dos Grupos analisados para o período de 14 dias: A e B Grupo- Controle Enxerto – Área total do defeito ósseo. HE, 10X nota-se áreas de osso imaturo nas margens entre osso-enxerto (↑), HE, 40X tecido ósseo recém-formado envolvendo o enxerto (\*). C e D Grupo LIV+E Área total do defeito ósseo. HE, 10X, nota-se trabéculas ósseas, matriz colágena e o osso recém-formado tomando o centro e as margens do defeito (↑), tecido ósseo em maturação, integrado a matriz antiga (\*), HE, 40X. E e F Grupo LIV+E – Área total do defeito ósseo. HE, 10X, nota-se células osteoprogenitoras secretando a matriz osteóide em faixas das margens para o centro do defeito (↑), osso bem organizado com característica lamelar com osteócitos e canais de Havers (+). HE, 40X.

Nos animais do controle Enxerto, observaram-se áreas de tecido imaturo no interior do defeito e partes de enxerto sendo absorvidos e envolvidos por células (Figura 23 A e B).

Ao período de 14 dias, os animais do grupo LVV+E; apresentaram trabeculado do osso com matriz colágena e osso em processo de organização nas margens e no interior do defeito, vindo de diferentes direções interligando o centro do defeito, sobre o enxerto ocorreu formação de novo osso, unindo-se a matriz antiga (Figura 23 C e D).

Foi observado neoformação óssea ocorrendo das margens para o interior em animais cujo defeito ósseo foi preenchido por enxerto bovino ósseo aliado a irradiação laser de baixa potência infravermelha LIV+E. Nota-se osso com características lamelar e intensa presença das células osteoprogenitoras, grande quantidade de osteócitos aprisionados na matriz bem vascularizada (Figura 23 - E e F).

A análise histológica apresentada mostrou que os animais com defeito preenchido por enxerto ósseo aliado com laser Infravermelho (808nm) e Vermelho Visível (660nm) apresentaram melhores resultados na avaliação de trabéculas ósseas quando comparado ao grupo controle, com significância estatística de  $p=0,0037$  e  $p=0,0024$  respectivamente (Figura 24).

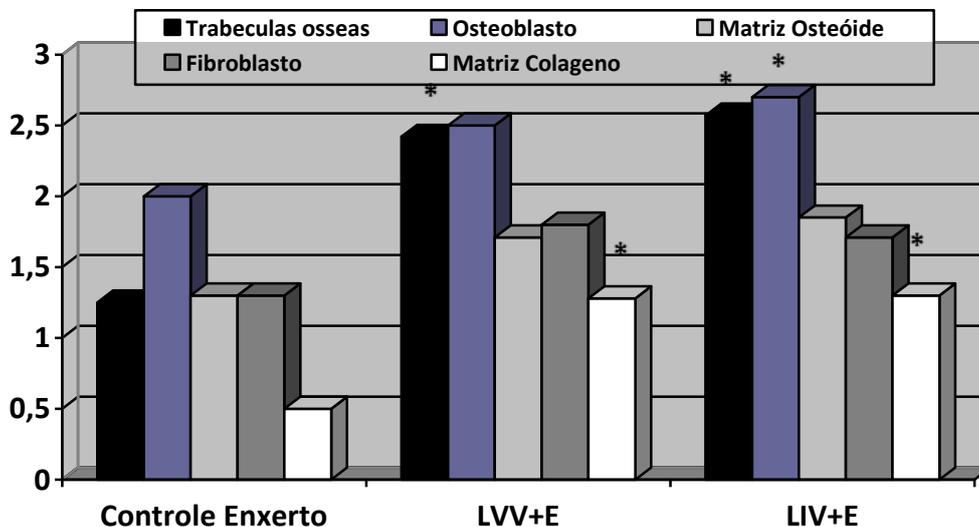


Figura 24 - Gráfico comparativo entre a média e desvio padrão dos escores obtidos pela análise semi-quantitativa de trabéculas ósseas, osteoblastos, matriz osteóide, fibroblastos e matriz colágeno aos 14 dias após a confecção do defeito ósseo. As barras representam o valor médio de cada grupo  $\pm$  EPM. \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao Grupo Controle Enxerto. Nível de significância  $P < 0,05$ .

### 5.1.2.3 Grupos analisados para o período de 28 dias

Nos animais do Grupo Controle Enxerto observou-se aos 28 dias áreas de neoformação óssea tecido ósseo nas margens em direção ao centro, presença de tecido osteóide.

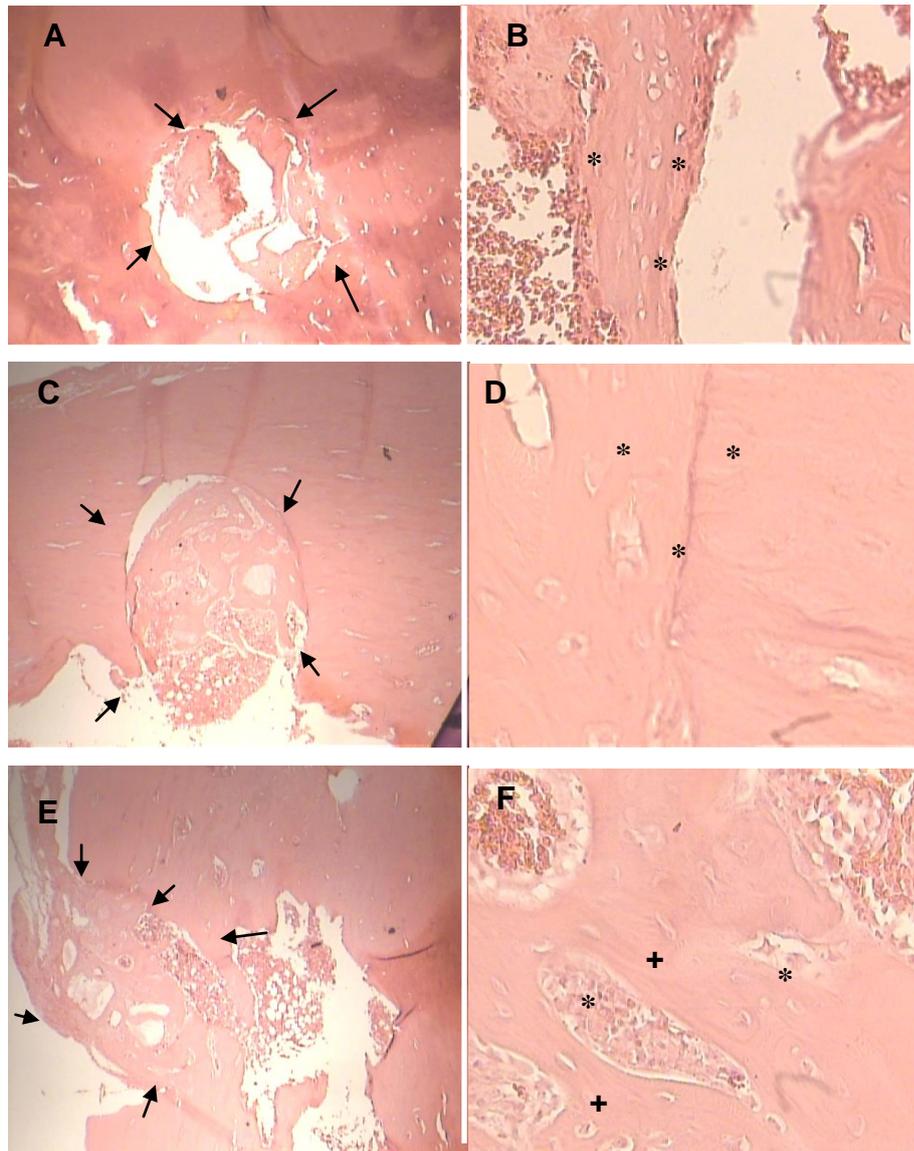


Figura 25 - Montagem de fotomicrografias dos animais dos Grupos para o período de 28 dias: A - Grupo Controle Enxerto – Área total do defeito ósseo. HE, 10X. Presença osso nas margens e ao centro (↑), B - Tecido ósseo maduro invaginando para o interior do defeito (\*), HE, 40X. C e D– Grupo LVV+E – Área total do defeito ósseo. HE, 10X. Neoformação ocupando o defeito (↑), notar osso maduro integrado a matriz antiga (\*), HE, 40X. E - F Grupo LIV+E - Área total do defeito ósseo. HE, 10X. Osso maduro com osteócitos preenchendo o defeito, calo ósseo formado (↑), Osso secundario (+) e Canais de Havers esparsos e volumosos (\*). HE, 40X.

Os animais do Grupo LVV+E, apresentaram intensa neoformação óssea, preenchendo o defeito e permitindo o contato entre as margens. Observa-se ainda rede vascular intensa através das lacunas e canais de irrigação.

Após 28 dias tratamento com irradiação laser de baixa potência Laser Infravermelho e enxerto ósseo, os animais apresentaram preenchimento do defeito ósseo com a comunicação entre as bordas e o centro do defeito, formada por canais de vascularização canais de Havers. Nota-se ainda um tecido maduro e bem organizado com intensa quantidade de osteócitos, demonstrando o potencial osteogênico da Irradiação laser no tecido ósseo de ratas ovariectomizadas.

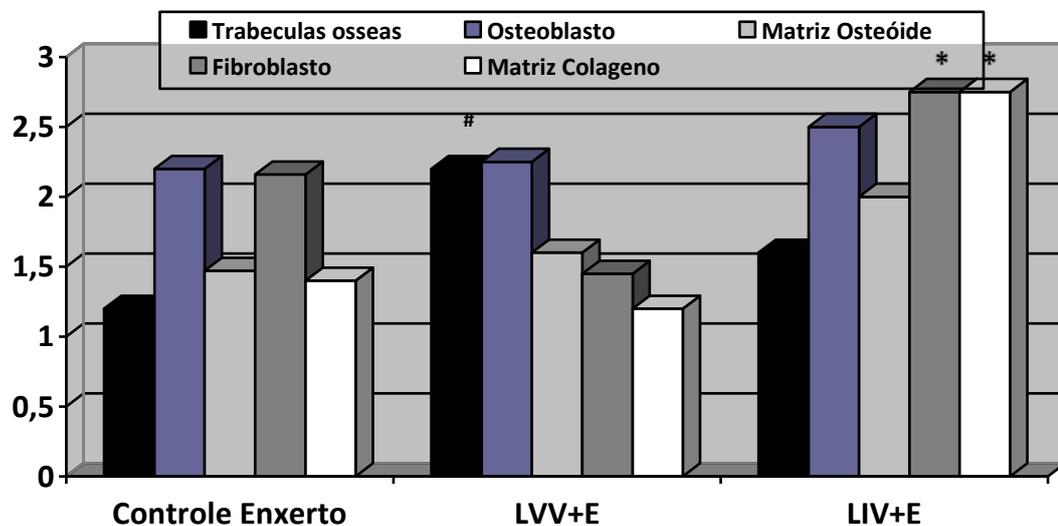


Figura 26 - Gráfico comparativo entre a média e desvio padrão dos escores (0 a +++ ) obtidos pela análise semi-quantitativa de trabéculas ósseas, osteoblastos, matriz osteóide, fibroblastos e matriz colágeno aos 28 dias após a confecção do defeito ósseo. As barras representam o valor médio de cada grupo  $\pm$  EPM. \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao Grupo Controle Enxerto e LVV+E. # indica diferença estatisticamente significativa em relação ao Grupo Controle Enxerto e LIV+E. Nível de significância  $P < 0,05$ .

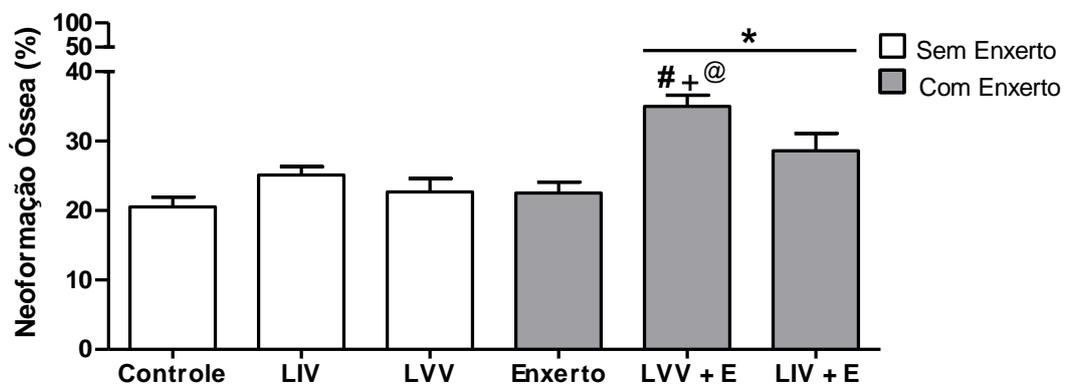
A análise histológica apresentada mostrou que os animais com defeito preenchido por enxerto ósseo aliado com laser Infravermelho (808nm) e Vermelho Visível (660nm) apresentaram melhores resultados quando comparado ao grupo controle, quando avaliado formação de trabéculas ósseas sendo os melhores resultados para o grupo LVV com significância estatística de  $p = 0,0478$  (Figura 23).

Na análise entre os períodos estudados observou-se um aumento na quantidade de fibroblastos no grupo LIV+E nos períodos de 07 para 28 dias

$p=0,0399$  e 14 para 28 dias  $p=0,0339$ . Demonstrando ainda aumento progressivo de colágeno de 07 a 14 dias  $p=0,0399$  e 14 a 28 dias  $p=0,0141$ .

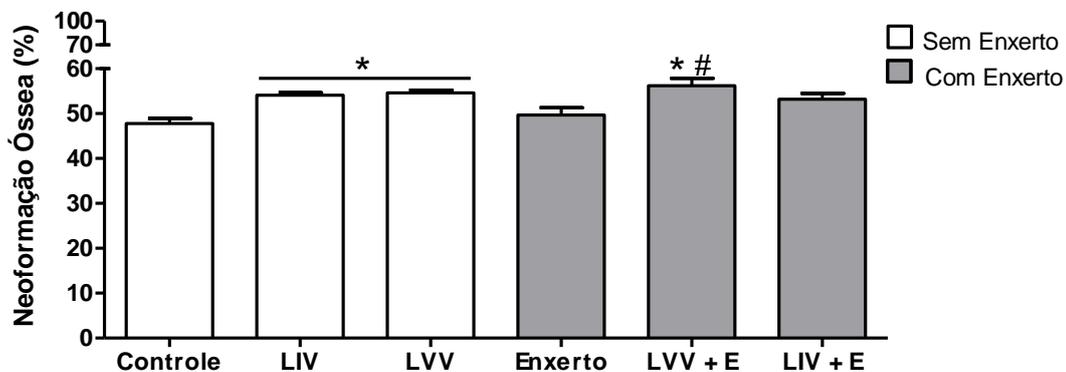
## 5.2 Análise Histomorfométrica

Os resultados da Histomorfometria na análise de osso recém-formado no período de 07 dias demonstraram no Grupo controle 20,2% do defeito preenchido por osso recém-formado, enquanto para os grupos tratados com laser Vermelho Visível e Laser Infravermelho os resultados foram de 22,7% e 25,3% respectivamente. Quando avaliado os Grupos tratados com enxerto ósseo para o mesmo período, o Grupo Enxerto mostrou 23,2 de preenchimento, nos grupos tratados com Laser Vermelho Visível e Infravermelho apresentaram 35,0% e 28,6% respectivamente (Figura 25).



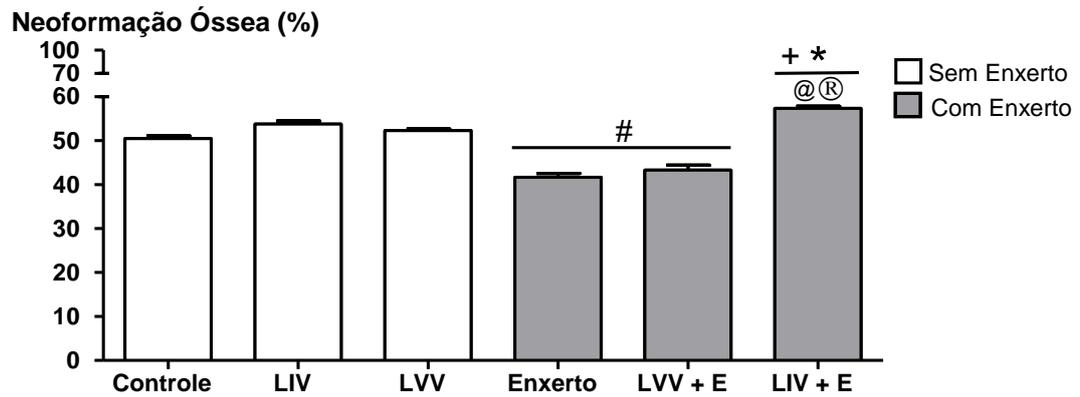
**Figura 27 - Gráfico representando os resultados da porcentagem de neoformação, em relação à área do defeito, para os grupos com e sem enxerto, analisados 7 dias após os procedimentos.** As barras representam o valor médio de cada grupo  $\pm$  EPM. \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao Grupo controle. # indica diferença estatisticamente significativa em relação ao Grupo Enxerto. + indica diferença estatisticamente significativa em relação ao Grupo LVV. @ indica diferença estatisticamente significativa em relação ao Grupo LIV. Nível de significância  $P < 0,05$ .

Os resultados da Histomorfometria na análise de osso recém-formado no período de 14 dias demonstraram no Grupo controle 47,8% do defeito preenchido por osso, para os grupos tratados com Laser de baixa potência com comprimento de onda no espectro do Vermelho Visível e Laser Infravermelho os resultados foram de 54,6% e 54.1% respectivamente. Quando avaliado os Grupos tratados com enxerto ósseo para o mesmo período o Grupo controle Enxerto mostrou 49,7% de preenchimento enquanto nos grupos tratados com Laser Vermelho Visível e Laser Infravermelho apresentaram 56,2% e 53,2% respectivamente como demonstrado na Figura 26.



**Figura 28 - Gráfico representando os resultados da porcentagem de neoformação, em relação à área do defeito, para os grupos com e sem enxerto, analisados 14 dias após os procedimentos.** As barras representam o valor médio de cada grupo  $\pm$  EPM. \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao Grupo Controle. # indica diferença estatisticamente significativa em relação ao Grupo Enxerto. Nível de significância  $P < 0,05$ .

Os resultados no período de 28 dias demonstraram no Grupo Controle 50,0% do defeito preenchido por osso, enquanto para os grupos tratados com laser de baixa potência Vermelho Visível e Laser Infravermelho os resultados foram de 52.3% e 53.8% respectivamente. Quando avaliado os Grupos tratados com enxerto ósseo para o mesmo período o Grupo Controle Enxerto mostrou 41,7 de preenchimento enquanto nos grupos tratados com Laser Vermelho Visível e Laser Infravermelho apresentaram 43,3% e 57,4% respectivamente (Figura 27).



**Figura 29** - Gráfico representando os resultados da porcentagem de neoformação, em relação à área do defeito, para os grupos com e sem enxerto, analisados 28 dias após os procedimentos. As barras representam o valor médio de cada grupo  $\pm$  EPM. \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao Grupo Controle. # indica diferença estatisticamente significativa em relação ao Grupo LIV. + indica diferença estatisticamente significativa em relação ao Grupo LVV. @ indica diferença estatisticamente significativa em relação ao Grupo Enxerto. ® indica diferença estatisticamente significativa em relação ao Grupo LVV+E. Nível de significância  $P < 0,05$ .

Na análise histomorfométrica para médias de porcentagem de neoformação na relação entre todos os grupos avaliados para os períodos de 07 e 14 dias os melhores resultados foram para do Grupo tratado com Enxerto e LVV, 35.0% e 56.2% respectivamente, enquanto para o período de 28 dias os animais do grupo Enxerto e LIV apresentaram os melhores resultados quando comparado aos demais grupos com 57,4% de preenchimento.

## 6 DISCUSSÃO

A retirada bilateral dos ovários conduz a uma diminuição dos níveis de estrógeno o que induz à uma diminuição da da massa óssea; osteopenia e osteoporose. Este método é utilizado por ser eficaz e de fácil realização (RENNO, 2006; DUARTE, 2004; PYTLIK et al., 2004; CANETTIERI, 2006; AMADEI *et al.*, 2006; POPPI et al., 2011).

Optamos por utilizar neste estudo tecido ósseo osteoporótico, de forma que os animais estariam num mesmo estado biológico. Os dados obtidos da análise radiológica evidenciaram que a ovariectomia (OVX) bilateral induziu a diminuição da densidade óssea de forma eficaz. Os valores de densidade óssea sessenta dias após a ovariectomia foram significativamente menores que os iniciais (Kruskal-Wallis  $p < 0,05$ ). A avaliação desse parâmetro foi efetuada tomando-se como intervalo  $dx$  e  $dy = 2.124$ , onde foram estabelecidas áreas de leitura da densidade com o mesmo tamanho e localização sendo o ponto de referência à diáfise do fêmur.

Observou-se um ganho de massa corporal crescente nos animais após serem submetidos à ovariectomia. Efeito este comprovado em outros estudos, o que sugere que com a diminuição da produção hormonal pelos ovários ocorra o aumento da massa corporal como compensação (CANETTIERI, 2006; POPPI et al., 2011).

Em estudo realizado com tomografia computadorizada e histomorfometria para avaliar tíbias de ratas ovariectomizadas, Prado et al., 2008 encontrou decréscimo de até 27% na conectividade óssea entre cinco e oito dias após a ovariectomia. Este fenômeno parece estabilizar-se até 30 dias e novamente tem um pico no nível de deterioração que se estende até 50 dias após a ovariectomia. Contudo, os níveis do marcador de reabsorção óssea avaliado na urina dos animais tiveram um acréscimo no décimo terceiro dia após a ovariectomia, que foi gradativamente maior até o último período avaliado de 50 dias.

O comportamento biológico dos enxertos ósseos é divergente ainda mais em se tratando de fratura osteoporótica, diferentes tipos de enxertos ósseos e biomateriais são testados aliado a técnicas não invasivas de tratamento, visando possibilitar e acelerar o reparo ósseo. Neste sentido aliar enxerto ósseo a laser de baixa potência tornou-se essencial visto as suas vantagens descobertas. Atuando na

aceleração do processo de cicatrização, proliferação celular, maior resistência mecânica no tecido ósseo recém-formado, além do aumento da calcificação da matriz óssea (BLAYA *et al.*, 2008; TORRES *et al.*, 2008; MÁRQUEZ MARTÍNEZ *et al.*, 2008; PIPI, 2010; POPPI *et al.*, 2011; BARBOSA *et al.*, 2012; GARCIA *et al.*, 2012; CUNHA, 2012; CARVALHO-LOBATO *et al.*, 2014; PALLOTTA 2014).

Para avaliar o processo de consolidação do defeito optou-se em utilizar dois tipos de laser, um no espectro do vermelho visível com comprimento de onda 660nm, densidade de 130J/cm<sup>2</sup> e potência de 100mw, e outro no infravermelho com comprimento de onda 808nm, densidade de 130J/cm<sup>2</sup> e potência de 100mw. Foi eleita a técnica pontual de aplicação do laser sobre o tecido ósseo pela possibilidade de aproximar a ponteira do aparelho em direção à área lesada exercendo leve pressão sobre os tecidos. Foram realizados cinco pontos de aplicação, ao redor e em cima do defeito, 44 segundos por ponto; totalizando três minutos e 40 segundos por dia de aplicação. Baseado nos resultados estatísticos encontrados, os parâmetros e métodos utilizados mostraram-se eficaz para estimular o processo de osteogênese, elevando a quantidade de células ósseas, no local do defeito acelerando a proliferação celular, absorção e integração do enxerto com a estrutura óssea do fêmur nos períodos 07, 14, 28 dias.

Para o período de 07 dias observou-se que os animais tratados com irradiação laser infravermelhos, apresentaram preenchimento do defeito com células potencialmente ativas, fibras colágenas inicialmente sendo dispostas em camadas concêntricas em torno de um canal central, células inflamatórias escassas. Observou-se grande proximidade e contato do tecido ósseo em formação com o osso cortical antigo. Nos animais que receberam irradiação laser Vermelho Visível (LVV), observou-se aos 07 dias, intensa área de neoformação óssea no centro do defeito. Intensa formação óssea em direção ao interior do defeito com formação da trama óssea, mas com um espaço ainda a ser preenchido, apresentando resultados melhores que o grupo controle.

A análise histológica apresentada mostrou que os animais com defeito preenchido por enxerto ósseo aliado com laser Infravermelho 808nm e Vermelho Visível 660nm apresentaram melhores resultados quando comparado ao grupo controle, quando avaliado formação de trabéculas ósseas com significância estatística de  $p < 0,05$ . O que demonstra os efeitos favoráveis da irradiação Laser de

baixa potência na estimulação osteogênica nas células de tecido ósseo osteoporótico, aliados a enxerto ósseo bovino liofilizado no tratamento de defeito no fêmur de ratas. A osteocondução existiu, pois o enxerto favoreceu o preenchimento do defeito ósseo por trabéculas ósseas e o laser acelerou esse processo pela presença de osso neoformado avançando em diferentes direções.

O resultado da análise histológica quando avaliado a matriz colágena mostrou que os animais com defeito preenchido por enxerto ósseo aliado com laser apresentaram resultados melhores estatisticamente que o grupo controle Enxerto, para o período de 28 dias com significância de  $p < 0,05$ . Nota-se ainda na relação entre os grupos tratados com enxerto e laser quando comparados entre si; LVV mostrou resultados melhores nos períodos de 07 e 14 dias e o LIV resultados estatisticamente favoráveis nos períodos de 28 dias com  $p < 0,05$ . O que pode sugerir parâmetros de terapia laser para períodos agudo, subagudo e crônico. Sendo o efeito fotoquímico biomodulador importante em um período inicial e o efeito fotofísico estimulador da produção de ATP, por conseguinte a mitose das células; em um período posterior.

Baseado nos resultados pode-se sugerir que a luz Laser agiu na indução da produção de novo osso auxiliando a chegada e diferenciação das células. Acelerando a integração entre as margens do defeito provavelmente ao facilitar a angiogênese, passagem de nutrientes e células de defesa, controlando o processo inflamatório e permitindo uma veloz formação da trama óssea.

Na região dos defeitos ósseos dos grupos irradiados foi encontrada intensa atividade fibroblástica e formação de colágeno que serve de arcabouço para formação de canais de Havers, onde existe formação óssea e potencial maturação conferindo maior rigidez ao tecido. Podendo concluir que o laser acelerou a velocidade de produção do colágeno e fibroblastos. Os resultados encontrados corroboram com os estudos que mostram que TLB induzem a proliferação celular, relatam ainda a liberação de fator de crescimento dos fibroblastos *in vitro* e *in vivo* (GROSSMAN *et al.*, 2000; JANSEN *et al.*, 2001; CARNEVALLI 2001; SCHWARTZ-FILHO 2011).

Na análise histomorfométrica para médias de porcentagem de neoformação na relação entre todos os grupos avaliados para o período de 07 e 14 dias de tratamento, o Laser Vermelho Visível aliado a enxerto ósseo, apresentou melhores

resultados  $35.0 \pm 0,2$  e  $56.2 \pm 0.3$  respectivamente, enquanto para período de 28 dias o melhor resultado foi do grupo 6 tratado com laser Infravermelho e aliado a enxerto ósseo,  $57,4 \pm 0,1$ . O que sugere a indicação de parâmetros de terapia laser com comprimento de onda distinto para os diferentes eventos do processo inflamatório. Em pesquisa realizada Fávaro-pipi et al., encontrou resultados parecidos avaliando o laser de 830 nm e demonstrando seus efeito positivo sobre a reparação óssea, a produção de uma maior quantidade de osso recém-formado e um aumento da vascularização na local da fratura.

Com metodologia similar Tim *et al.*, 2013 observou através de análise por Histomorfometria a partir de imagens digitalizadas do defeito, a quantidade de osso recém-formado. Em 30 dias após a cirurgia, os autores relatam que as bordas da lesão ainda podiam ser observadas, com uma quantidade moderada de osso recém-formado e remodelação óssea trabécula cercado por tecido de granulação.

No presente estudo a dose escolhida  $130 \text{ J/cm}^2$  mostrou-se eficaz em ambas as terapias. Outros estudos encontraram resultados similares utilizando  $120 \text{ J/cm}^2$  sugerindo um provável efeito dose dependente onde doses maiores seriam mais eficazes na estimulação óssea (DORTBUDAK 2000; RENNO 2006; DINIZ et al., 2007; PINHEIRO et al., 2003 POPPI et al., 2011).

Roberta Tim C. 2013 em pesquisa realizada estudou os efeitos da terapia laser de baixa intensidade (LBI) na formação óssea, imunossupressão de fatores osteogênicos, propriedades biomecânicas em um modelo de defeito ósseo em tibial de ratos. Sessenta ratos masculinos foram distribuídos em grupo controle e grupo irradiado laser. Os animais foram sacrificados em 15, 30 e 45 pós-lesão. A análise histológica e análise morfométrica mostraram que os animais tratados não apresentaram infiltrados inflamatórios e uma organização do tecido melhor em 15 e 30 dias pós-cirurgia. Maior quantidade de osso recém-formado foi observada aos 15 dias pós-cirurgia. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos no teste de carga máxima em qualquer período avaliado.

A análise histológica evidenciou que nos animais tratados com laser LVV e LIV sem o uso de enxerto ósseo, apresentaram melhores resultados em relação ao grupo controle Grupo Controle quando avaliado neoformação óssea e quantidade de células osteoprogenitoras no local do defeito, o que sugere a facilitação exercida

pela luz laser na chegada de células ósseas, modulando o processo, o mesmo ocorreu quando foi avaliada a presença de osteoblastos.

Na presente pesquisa a energia da Terapia a laser de baixa intensidade causou uma bioestimulação favorecendo as substâncias e células a multiplicar-se, estes resultados corroboram com os de Pierangelo Angeletti et al., 2009 os pesquisadores destacam que sua energia também aumenta a quantidade de ATP; melhorando o tecido e a reparação; equilibrando a produção de fibroblastos e de colágeno e aumentos circulação sanguínea periférica.

O mecanismo pelo qual a estimulação age no tecido ósseo osteoporótico não é ainda inteiramente compreendido, dúvidas existem em relação às quais parâmetros utilizar, sendo a fase inflamatória importante na escolha dos parâmetros como comprimento de onda e dose.

Nota-se a escassez de estudos que utilizem tratamentos em osso com osteoporose, com intuito de aperfeiçoar o tratamento das fraturas, buscando diferentes tipos de enxertos e implantes, aliados a terapias não invasivas como a laser terapia em diferentes comprimentos de da, na proliferação de células, neoformação óssea e força mecânica óssea, em períodos maiores que 28 dias.

Nesta situação criar formas de auxiliar a deposição óssea é importante em se tratando de fraturas em osso osteoporótico. Buscando parâmetros ideais para induzir ao aumento de células responsáveis pela proliferação e reparo ósseo, além de investigar o sinergismo entre as formas de tratamentos; como enxertos ósseos e terapia laser.

## 7 CONCLUSÕES

Após análise, conclui-se no modelo experimental estudado, que as Terapias Lasers de Baixa Potência; 808nm e 660nm dose 130/jcm<sup>2</sup> aliado a enxerto ósseo e membrana de cortical óssea no tratamento de defeito produzido no fêmur de ratas ovariectomizadas; possibilitou o aumento do processo de neoformação, proliferação e diferenciação de células ósseas responsáveis pela formação da nova matriz óssea, para os períodos estudados.

Através das análises histológica e morfométrica pode-se concluir que o grupo submetido a enxerto ósseo e tratados com Laser Vermelho Visível 660nm dose 130/jcm<sup>2</sup> apresentou melhores resultados nos períodos 7 e 14 dias. O grupo tratado com enxerto ósseo e Laser Infravermelho apresentaram os melhores resultados no período de 28 dias, estatisticamente significativo  $P < 0,05$ . Concluindo assim que a Terapia Laser de Baixa Potencia sobre enxerto ósseo em defeito de ratas osteopenicas, induz o processo de reparo; permitindo o seu preenchimento para os períodos de 07, 14 e 28 dias.

## 8 REFERENCIAS

Abdul, R., N. H.; Al-Salihi, K.A.; Samsudin, A. R. An in vivo study of a locally – manufactured hydroxyapatite – based material as bone replacement material. *Med J Malaysia.*, 2004; 59:119-20.

AboElsaad NS, Gadalla LMA, Ragab LI, Zalata KR. Effect of soft laser and bioactive glass on bone regeneration in the treatment of bone defects (an experimental study). *Lasers Med Sci.* 2008;24(3):433-7.

Amadei SU, Silveira VAS, Pereira AC, Carvalho YR, Rocha RF. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea, *J Bras Patol Med Lab.* 2006; 42(1): 5-12.

Anneroth G, Hall G, Rydén H, Zetterqvist L. The effect of low-energy infrared laser radiation on wound healing in rats. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 1988; 26:12–17.

Aranha LLM, Canelo MJA, Sardón AM, Montes DMJ, González SMC. Qualidade de vida relacionada à saúde em espanholas com osteoporose. *Rev. Saúde Pública.* 2006; 40(2):298-303.

Araújo DV, Oliveira JHA, Bracco OL. Custo da fratura osteoporótica de fêmur no sistema suplementar de saúde brasileiro. Departamento de Medicina Interna, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), *Arq Brás Endocrinol Metab.* 2005; 49(6).

Ardila EA. Massa Osea el Climaterio, Rev. de Menopausia, 2003. Disponível em: [http://encolombia.com/Meno\\_II\\_vol\\_II\\_masa\\_osea.htm](http://encolombia.com/Meno_II_vol_II_masa_osea.htm). Acesso em: 20 jan. 2009.

Arias MVB, Szejnfeld VL. Modelos animais de osteoporose. Ver. Brás. Reumatol. 1997; 37(6): 335-338.

Bandeira, F. Griz L, Dreyer P, Eufrazino C, Bandeira C, Freese E. Vitamin D deficiency: a global perspective. Arq Brás Endocrinol Metab. 2006;50(4):640-646.

Babuccu, N. Keklikog̃lu, M. Baydog̃an, A. Kaynar: Cumulative effect of low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound on bone repair in rats. Int. J. Oral Maxillofac. Surg. 2014; 43: 769–776.

Bembem DA. Exercise interventions for prevention in postmenopausal Women. J. Oklahoma State Med. Assoc. 1999; 92(2): 66-70.

Bessho K, Tagawa, T. Murata M. Comparison of bone matrix-derived bone morphogenetic proteins from various animals. J Oral Maxillofac Surg, 1992;50:496-501.

Bessho K.; Tagawa T.; Murata M. Purification of rabbit bone morphogenetic protein derived from bone, dentin, and wound tissue after tooth extraction. J Oral Maxillofac Surg, 1990;48( 2):162-169.

Bezerra JB. Estudo dos efeitos do ultra-som de baixa intensidade e do exercício físico sobre a consolidação de fraturas em ratos diabéticos. Dissertação apresentada

ao programa de pós-graduação interunidades Bioengenharia – escola de Engenharia se são Carlos (Mestrado), 2005.

Blaya DS, Guimarães MB, Pozza DH, Weber JB, de Oliveira MG. Histologic study of the effect of laser therapy on bone repair. *J Contemp Dent Pract.* 2008 Sep 1;9(6):41-8.

Boden SD.; Andersson GB.; Anderson DG., Overview of bone morphogenetic proteins for spine fusion. *Spine.* 2002;27(1).

Bohic S. Comparization of the trabeculas rat boe mineral: effect of ovariectomy and biphosphonate treatment. *Bone.* 2000; 26(4): 341-348.

Braga FJC.; Silva GM.; König JRB.: Obtenção de matriz mineral de osso bovino e a comprovação de sua biocompatibilidade. *Rev Bras Cir Protese Implant,*1999;6: 43-49.

Braz F, Rahal SC, Rocha NS, Biasl ETF. Emprego de matriz óssea orgânica bovina e hidroxiapatita no reparo de defeito induzido em crânio de ratos. *Acta Cir. Bras.* 2003;18(1):19-24.

Buckwalter JÁ, Cruess RL. “A cura dos tecidos músculo-esqueléticos” in Rockwood C.A., Jr., Green D.P., Bucholz R.W.: *Fraturas em adultos.* São Paulo, Manole. 1993; 179-219.

Canavero E, Januário AL, Sallum EA, Novaes PD, Nociti Junior FH. Avaliação histométrica da ação local da calcitonina de salmão no processo de reparo ósseo: estudo em ratos. *Pesqui Odontol Brás.* 2000; 14(2):183-7.

Canova GC, Canova GC, Oliveira RC, Carneiro E, Silva RM, Brunini SHS, Letra AMG, Tavano O, Bramante CM, Pereira JC, Granjeiro JM. Analysis of conventional and digital (Digora) radiographic methods for identification of the mineralized barrier after pulpotomy in dogs. *Cienc Odontol Bras*. 2003;6(4):1-8.

Canettieri ACV. Reparação óssea em fêmures de ratas Ovariectomizadas sob a ação local do alendronato Sódico, da hidroxiapatita e da associação alendronato com a hidroxiapatita [Tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 2006.

Carneiro RA. Epidemiological aspects of osteoporosis in Brazil. *Bone*. 2001;29(3):298.

Carnevali CMM. Efeito da radiação do diodo laser (830nm) em cultura de fibroblastos (CHO-K1) [dissertação]. São José dos Campos, SP: Faculdade de Engenharia Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba; 2001.

Carvalho DC. Ação do Ultra-som de baixa Intensidade em ossos de ratos Osteopenicas [Dissertação]. São Carlos: Universidade de São Paulo; 2001.

Carvalho DCL, Rosim GC, Gama LOR, Tavares MR, Tribioli RA, Santos IR, Cliquet Jr A. Tratamentos não farmacológicos na estimulação da osteogênese. *Rev Saúde Pública*. 2002; 36(5):647-54.

Carvalho DCL, Cliquet AJ. Ação do ultra-som de baixa intensidade sobre ossos de ratas osteopênicas *Acta Ortop Brás*. 2003;11(1):17-24.

Carvalho PTC, Mazzer N, Siqueira JFR, Ferreira JVL, Silva IS. Análise de fibras colágenas através da morfometria computadorizada em feridas cutâneas de ratos submetidos a irradiação do laser Henê. *Fisiot. Brás.* 2003; 4(4):253-258.

Carvalho-Lobato P, Garcia VJ, Kasem K, Ustrell-Torrent JM, N-Walton VT, Manzanares-Céspedes MC, Tooth Movement in Orthodontic Treatment with Low-Level Laser Therapy: A Systematic Review of Human and Animal Studies. *Photomedicine and Laser Surgery* 2014; 32( 5): 302–309.

Cerqueira A, Silveira RL, Oliveira MG, Sant'ana Filho M, Heitz C. Bone tissue microscopic findings related to the use of diode laser (830nm) in ovine mandible submitted to distraction osteogenesis. *Acta Cirúrgica Brasileira.* 2007; 22 (2):92-97.

Chang KP, Center JR, Nguyen TV, Eisman JA. Incidence of hip and other osteoporotic fractures in elderly men and women: Dubbo osteoporosis epidemiology study. *Journal of Bone and Mineral Research.* 2004; 19(4): 532-536.

Chang-Yong Ko, Dongyeon Kang, Dong hyeon Seo, Yeonhang Ryu, Byungjo Jung, Han-Sung Kim Yonsei UNIV., Wonju, Gangwon, Korea, Republic of doi Improvement of osteoporotic bone quality through minimally invasive laser therapy :10.1016/j.bone.2010.01.047

Abstracts / Bone 46 (2010) S9–S83

Chellini F, Sassoli C, Nosi D, Deledda C, Tonelli P, Zecchi-Orlandini S, Formigli L, Giannelli M Low pulse energy Nd:YAG laser irradiation exerts a biostimulative effect on different cells of the oral microenvironment: "An in vitro study". *Lasers SurgMed* 2010 42(6):527– 539.

Chin VKL., Avaliação Histológica da Reparação Óssea Induzida por Osso Bovino Desmineralizado,, em Defeitos Bicorticais na Mandíbula de Ratos, com ou sem

Membranas de Colágeno Cálcicas. Dissertação (mestrado), Faculdade de Odontologia de São Paulo, 2004.

Cochran DL.; Nummikoski PV.; Jones AA.; Makins SR.; Turek TJ.; Buser D.,  
Radiographic analysis of regenerated bone around endosseous implants in the canine using recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 1997;12:739-748.

Colombo CED, Ferreira SCX, Junqueira JC, Balducci i, Carvalho YR. Influência da ovariectomia na atrofia e regeneração da glândula parótida: estudo histológico em ratas, *Cienc Odontol Brás*, out./dez. 2003; 6(4): 70-78.

Conlan MJ, Rapley JW, Copp CM. Biostimulation of wound healing by low-energy laser irradiation. A review. *J Clin Periodontol*. 1996; 23: 492-496.

Cook DJ, Guyatt GH, Adachi JD, Epstein RS, Juniper EF, Austin P A et al.  
Development and validation of the mini-osteoporosis quality of life questionnaire (OQLQ) in osteoporosis women with back pain due to vertebral fractures. *Osteoporos Int*. 1999;10(3):207-13.

Cooper C, Westlake S, Harvey N, Dennison E. Developmental origins of osteoporotic fracture. *Adv Exp Med Biol*. 2009; 639:217-36.

*Coombe AR, Ho C-TG, Philips JR, Chapple CC, Yum LWP, Darendeliler MA, Hunter . The effects of low level laser irradiation on osteoblastic cells. Clin. Orthod.2001;.4; 3–14.*

Cortet B, Orcel P, Roux C. Que faire devant une ostéoporose post-ménopausique ?, Assessment and treatment of post-menopausal osteoporosis *Revue du Rhumatisme*. 2006; 73:863–868.

Cranney A. Treatment of postmenopausal osteoporosis. *BMJ*. 2003; 327(16): 355-6.

Croci AT. Retarde de consolidação e pseudoartrose. *Acta Ortop Brás*.1997; 5: 26-34.

Croci AT, Camargo OP, Bitar G, Pereira SLB, Moreira M, Freitas JRS. Efeito do concentrado de plasma em falhas ósseas provocadas em fêmures de camundongos como estimulação de formação óssea. Estudo experimental, *Acta ortop. bras*. 2003;11(4):230-239.

Cvijetic S, Mestrovic T, Crkvenac A, Davila S, Korsic M. Quality of life in osteoporotic patients with hip fracture and without fracture. *Arh Hig Rada Toksikol*. 2002; 53(4):257-62.

David R, Nissan M, Cohen I, Soudry M. Effect of low-power He-Ne laser on fracture healing in rats. *Lasers Sug. Med*. 1996; 19:458-464.

Dickson G, Clingen C, Taggart H, Bone mineral density of repairing femoral fractures (osteotomies) after low level laser therapy (LLLT) at 830nm wavelength. *World Association for Laser Therapy, Kansas City , Usa*, 1998: 23-26.

Diniz JS. Efeito do laser de baixa potência (GaAlAs) associado ao uso do Biofosfonato em tecidos ósseos de ratas ovariectomizadas, analisado por Espectroscopia Raman e Histomorfometria [dissertação]. São José dos Campos, SP: Faculdade de Bioengenharia da Universidade do Vale do Paraíba; 2006.

Diniz JS, Nicolau RA, Ocarino NM, Magalhães FC, Oliveira Pereira RD, Serakides R. Effect of low-power gallium-aluminum-arsenium laser therapy (830 nm) in combination with bisphosphonate treatment on osteopenic bone structure: an experimental animal study, *Lasers Med Sci* 2009; 24:347–352.

Dobbs MB, Buckwalter J, Saltzman C. Osteoporosis: the increasing role of the orthopaedist. *Iowa Orthop J.* 1999; 19:43-52.

Doblaré M, García, J M, Gómes MJ. Modeling bone tissue fracture and healing: a review. *Engineering Fracture Mechanics*, New York, 2004;71(13):1809-1840.

Dortbudak O. Biostimulation of bone marrow cells with a diode soft laser, *Clinical Oral Implants Research.* 2000; 11(6), 540-45.

Duarte LR. Estimulação ultra-sônica do calo ósseo [Tese de Livre-docência]. São Carlos: Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo; 1977.

Duarte PM. Alendronate may protect against increased periodontitis-related bone loss in estrogen-deficient rats. *J Periodontol*, 2004; 75(9):1196-202.

Duncan RL, Turner CH, Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcif Tissue Int.* 1995;57:344-58.

Eddy DM, Johnston CCJR, Cummings SR. Osteoporosis: Review of the evidence for prevention, diagnosis, and treatment and cost-effectiveness analysis. *Osteoporos Int.* 1998;8:1-88.

Eis SR. Diagnostico da Osteoporose: Recursos e Otimização da Pratica Clinica. *Clinica Ortopédica.* 2003;4(2):283-315.

Elffors I. Osteoporotic fractures due to osteoporosis. Impacts of a frilty pandemic in an aging world. *Aging (Milano).* 1998;10:191-204.

Fernandes RG. Estudo da ação local do alendronato sódico, da hidroxiapatita e da associação do alendronato sódico com a hidroxiapatita, no reparo ósseo de fêmures de ratos [Tese]. São José dos Campos; Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista, 2005.

Fontana A, Delmas PD. Bone and hormones, estrogen and antiestrogen: action on osteoporosis. *Press. Med.* 1999;28:555-558.

Fávaro-Pipi E, Ribeiro DA, Ribeiro JU, Bossini P, Oliveira P, Parizotto NA, Tim C, Araújo HSS, Rennó ACM Lowlevel laser therapy induces differential expression of osteogenic genes during bone repair in rats. *Photomed Laser Surg* 2011, 9:311–317.

Freitas IGF. Ação do laser de HeNe na osteogênese [TESE]. Campinas Faculdade de Engenharia Elétrica e Computação da Universidade Estadual de Campinas; 2001.

Frost HM. Defining osteopenias and osteoporoses: Another view (with insights from a new paradigm). *Bone.* 1997; 20(5):385-391.

Fujimoto K, Kiyosaki T, Mitsui N, Mayahara K, Omasa S, Suzuki N, Shimizu N. Low-intensity laser irradiation stimulates mineralization via increased BMPs in MC3T3-E1 cells. *Lasers Surg Med* 2010; 42:519–526

Gardner MJ, Brophy RH, Demetrakopoulos D, Koob J, Hong R, Rana A, Lin JT, Lane JM. Intervenção para Reforçar o Tratamento da Osteoporose após Fratura do Quadril *The Journal of Bone and Joint Surgery (American)*. 2005;87: 3-7.

Garg AK. 1999. Grafting materials in repair and restoration. In: LYNCH SE.; Genco, RJ.; Marx RE. *Tissue engineering: application in maxillofacial surgery and periodontics*. Chicago: Quintessence Books, 1999:83-101.

Genovese WJ, Varandas ET. O uso do laser CO2 em cirurgia bucal. *Abo Nacional*. 2000;8(2):312-317.

Giordano V, Knackfuss IC, Gomes RDC, Giordano M, Mendonça RG, Coutinho F. Influência do laser de baixa energia no processo de consolidação de fratura de tíbia: estudo experimental em ratos. *Rev Bras Ortop*. 2001;36(5):174-178.

Giovanini EG, Salzedas LMP, Sundefeld MLMM. Avaliação da densidade radiográfica de defeito periodontal em suínos utilizando imagem digital. *Cienc Odontol Brás*. 2007;10 (1): 47-53.

F.V. Gomes, L. Mayer, F.P. Massotti, C.E. Baraldi, D. Ponzoni, J.B.B. Webber, M.G. de Oliveira: Low-level laser therapy improves peri-implant bone formation: resonance

frequency, electron microscopy, and stereology findings in a rabbit model. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2015; 44: 245–251.

Gonçalves G, Parizotto NA. *Fisiopatologia da Reparação Cutânea: Atuação da Fisioterapia*. *Ver. Bras. Fisiot.* 1998; 4(2): 5-13.

Greenbaum MA., Kanat IO.: Current concepts in bone healing. Review of the literature. *J Am Podiatr Med Assoc*, 1993;83:123-129.

Gross TS, Edwards JL, Mcleod KJ, Rubin CT. Strain gradients correlate with sites of periosteal bone formation. *J Bone Min Res.* 1997;12:982-8.

Grossman N, Schineid N, Reuveni H, Lubart. 780nm low power diode laser irradiation stimulates proliferation of keratinocytes cultures: involvement of reactive oxygen species. *Lasers Surg Med.* 1998; 22:212-218.

Grossman N, Schineid N, Reuveni H, Lubart. He-Ne (630nm) Low Power Laser Irradiation Stimulates Proliferation of Keratinocyte Cultures Involving Reactive Oxygen Species. *Lasers in the Life Sciences.* 2000;9:111-126.

Guarniero R., Barros Filho TEP., Tannuri U., et al: Avaliação da resistência óssea com e sem a administração prévia de calcitonina de salmão em ratos com desnutrição protéica. *Acta Ortop Brás*, 1996;4:23-26.

Guarniero R, Cinagava MY, Santana PJ, Batista A, Oliveira LAA, Rodrigues CJ, Cinagava FT. Influência do componente protéico na consolidação de fraturas: trabalho experimental em ratos, *Acta ortop. bras.* 2003;11(4):206-210.

Gullberg, B.; Johnell, O.; Kanis, J. A. World-wide projection for hip fracture. *Osteoporos Int*, 1997;7:407-413.

Guyton AC. *Tratado de fisiologia médica*. 6<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara; 1988:830.

Guyton AC. *Fisiologia humana e mecanismos das doenças*: 5. ed. Rio de Janeiro; Editora Guanabara koogan, 1993:98-134.

Haach LCA. *Utilização do exercício físico versus ultra-som pulsado de baixa intensidade na manutenção de massa óssea*. Dissertação de Mestrado Programa de Pós Graduação Interunidades em Bioengenharia - Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos. 2006.

Hall, Susan J. *Biomecânica do crescimento e desenvolvimento dos ossos*. In: *Biomecânica básica*. 3.ed. Tradução Giuseppe Taranto. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. cap.4:66-85.

Hirata S, Kitamura C, Fukushima H, Nakamichi I, Abiko Y, Terashita M, Jimi E Low-level laser irradiation enhances BMP-induced osteoblast differentiation by stimulating the BMP/ Smad signaling pathway. *J Cell Biochem* 2010, 111:1445–1452

Hietala EL. The effect of ovariectomy on periosteal bone formation and bone resorption in adults rats. *Bone Miner*. 1993; 20:57-65.

Hourelid NN, Sekhejane PR, Abrahamse H Irradiation at 830 nm stimulates nitric oxide production and inhibits proinflammatory cytokines in diabetic wounded fibroblast cells. *Lasers Surg Med* 2010; 42:494–502.

Jaime APG, Anbinder AL, Lima AP, Prado FA, Balducci I, Rocha RF. Influência da administração local de alendronato sódico no reparo ósseo em calvária de ratas ovariectomizadas. *Cienc Odontol Bras*. 2005; 8 (2):70-9.

Jansen BJH, Van Ruisse F, De Jongh G, Zeeuwen PLJM, Schalkwijk J. Serial Analysis of gene Expression in differentiated cultures of human Epidermal keratinocytes. *The Journal of Investigative Dermatology*. 2001;(1):12-22.

Johnson AL, DeCamp CE. External skeletal fixation: linear fixators. *Vet. Clin. North Am.: Small Anim. Pract.* 1999;29:1135-1152.

Jortikka L.; Marttinen M.; Lindholm TS. Partially purified reindeer (*Rangifer Tarandus*) bone morphogenetic protein has a high bone – forming activity compared with some other artiodactyls. *Clin. Orthop.*,1993;297:33-37.

Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. “Bone” in *Basic histology*. Stanford, Appleton & Lange. 1995:132-151.

Junqueira LC, Carneiro J. Tecido Ósseo. In: *Histologia Básica*. 9 ed. Guanabara Koogan. 1999:111-128.

Junqueira JC, Colombo CED, Martins JS, Ito CYK, Carvalho YR, Jorge AOC. Experimental candidosis and recovery of *Candida albicans* from the oral cavity of ovariectomized rats. *Microbiology and Immunology, Japão*, 2005;49(3):199-207.

Kalfas IH. Principles of bone healing. *Neurosurg Focus*. 2001;10(4):1-4.

Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner*. 1991;15(3):175-91.

Kaplan FS, Hahn GV, Zasloff MA. Heterotopic ossification: Two rare forms and what they can teach us. *J. AM. Acad. Ortho. Surg*, 1994; 2: 288-296.

Katchburian E, Arana V. Tecido ósseo. In: *Histologia e embriologia oral*. São Paulo: Panamericana, 1999; cap 3:40-75.

Kato A, Bishop JE, Norman AW. Evidence for 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 receptor/binding protein in a membrane fraction isolated from a chick tibial fracture-healing callus. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;244:724-727.

Kenley RA.; YIM K., Abrams J.; Ron E. Turek T.; Marden LJ.; Hollonger JO. Biotechnology and bone graft substitutes. *Pharmaceutical Research*, 1993;10:1393-401.

Kessel RG. Tecido conjuntivo: osso e formação óssea. In: *Histologia médica básica: a biologia das células, tecidos e órgãos*. Trad. M.c. Engelhardt. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001; cap.7:129-45.

Kim IS, Cho TH, Kim K, Weber FE, Hwang SJ High power-pulsed Nd:YAG laser as a new stimulus to induce BMP-2 expression in MC3T3-E1 osteoblasts. *Lasers Surg Med* 2010; 42 (6):510–518

Khadra M, Kasem N, Haanaes HR, Ellingsen JE, Lyngstadaas SP. Enhancement of bone formation in rat calvarial bone defects using low-level laser therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004; 97:693-700.

Khan SN.; Sama A.; Sandhu HS.: Bone graft substitutes in spine surgery. *Curr Opin Orthop*, 2001;12:216-222.

Kodama AC. Efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade em um modelo ósseo de ratas ovariectomizadas analisados por meio do ensaio de flexo-compressão. 77p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação Interunidades em Bioengenharia, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.

Kolios L, Sehmisch S, Daub F, Rack T, Tezval M, Stuermer KM, Stuermer EK. Equol but not Genistein Improves Early Metaphyseal Fracture Healing in Osteoporotic Rats. *Planta Med.* 2009 Feb 24.

Laitinen K, Välimäki M. Alcohol and bone. *Calcif Tissue Int., Suppl.* 1991;49:70-73.

Landa LV. Estudo comparativo entre terapia com laser de baixa potência e terapia ultra-sônica na promoção da osteogênese em rádio de coelhos. [Dissertação]. São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba; 2005.

Lanna CMM, Montenegro Jr.,RN, Paula FJA. Fisiopatologia da osteoporose induzida por glicocorticóides. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 2003; 47(1); 9-18.

Lecoq B, Potrel-Burgot C, Granier P, Sabatier JP, Marcelli C. Comparaison de la perte osseuse induite chez la ratte par la suspension, l'ovariectomie, et la combinaison des deux méthodes . *Revue du Rhumatisme*. 2006; 73:277–283.

Leonel ECF, Andrade Sobrinho J, Oliveira Ramalho LT, Porciúna HF, Mangilli, Rapoport. A ação do polímero de mamona durante a neoformação óssea. *Acta Cir Brás*. 2004; 19(4):342-350.

Licks R, Damascena RM, Silveira ID, Costa NP. Comparação dos níveis de cinza de resinas compostas de alta viscosidade por meio de imagens radiográficas digitalizadas. *Rev Odonto Ciência*. 2004;19(43):25-31.

Li WT, Leu YC, Wu JL Red-light light-emitting diode irradiation increases the proliferation and osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Photomed Laser Surg* 28(Suppl 1): 2010; 157–165.

Lill CA et al. Biomechanical evaluation of healing in a non-critical defect in a large animal model of osteoporosis. *J Orthopaedic Res*. 2003;21:836-42.

Limeira Junior FA. Avaliação do reparo ósseo com uso de osso anargônico e membrana reabsorvível após irradiação com Laser de diodo 830nm [Dissertação]. Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia; 2001.

Lips P, Van Schoor, NM. Quality of life in patients with osteoporosis. *Osteoporos Int*, 2005;16:447-455.

Lirani APR. Estudo comparativo dos efeitos do ultra-som e do laser de baixa intensidade no reparo ósseo de tibia de rato [Dissertação]. São Carlos: Universidade de São Paulo; 2004.

Lirani-Galvão AP, Jorgetti V, da Silva OL Comparative study of how low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound affect bone repair in rats. *Photomed Laser Surg* 2006 24:735–740.

Lirani APR, Lazaretti-Castro M. Evidências da Ação de Agentes Físicos Sobre o Metabolismo do Tecido Ósseo e Seus Potenciais Usos Clínicos. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2005; 49(6):891-96.

Lopes CB. Cicatrização óssea periimplantar após Laserterapia em 830nm – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Espectroscopia Ramam no infravermelho próximo (ER-IVP) [Dissertação]. São José dos Campos, SP: Faculdade de Engenharia da Universidade do Vale do Paraíba; 2002.

Lorrain J, Paiement G, Chevrier N, Lalumiere G et al. Population demographics and socioeconomic impact of osteoporotic fractures in Canada. *Menopause.* 2003; 10(3):.228-234.

Lourenço EJV. Avaliação da osteogênese com proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs). Tese de Doutorado apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo. 2002.

Lubart R, Fridmann H, Peled I, Grossman N. Light effect on fibroblast proliferation. *Laser therapy.* 1993; 5:50-57.

Luger EJ, Rochkind S, Wollman Y. Effect of low-power laser irradiation on the mechanical properties of bone fracture healing in rats. *Laser in Surgery and Medicine*. 1998; 22:97-102.

Machado PRM.; Puertas EB.; Taga E.; Nonose N., Utilização da densitometria óssea como método de avaliação dos resultados da utilização de BMP bovina em artrodese de coluna em coelhos. *Acta ortop. bras.*, 2005;13(1).

Marcon K, Edilson Sanfelice A. Efeito do laser GaAlInPno processo de cicatrização de feridas induzidas em ratos. *Rev. Fisiot. FURB*. 2005;1(1):1-8.

Márquez Martínez ME, Pinheiro AL, Ramalho LM. Effect of IR laser photobiomodulation on the repair of bone defects grafted with organic bovine bone. *Lasers Med Sci*. 2008 Jul;23(3):313-7.

Martini, F. H. *Fundamentals of anatomy and physiology*. 4<sup>th</sup>ed. New Jersey: Prentice Hall, 1998.

Mello LCP (*in memoriam*); Gomide LB. Respostas físicas, químicas e biomecânicas do osso de ratas ovariectomizadas submetidas a diversas ingestões de flúor suplementar, *Rev. Nutr.* 2005;18(5):593-600.

Mendonça RNS, Alves JGB. Custos hospitalares com crianças e adolescentes vítimas de traumatismos no Estado de Pernambuco em 1999, *Acta ortop. bras.* 2004;12(3):141-145.

Mester E, Trelles MA, Mester A, Mayayo E. Laserterapia Revision de datos experimentales y resultados clínicos. *Int. Clinica Laser*. 1983: 8-13.

Meurer MI, Meurer E, Yurgel LS, Costa NP. Análise da densidade óssea em região parassinfisária de mandíbulas humanas: comparação entre níveis de cinza em radiografias digitais (Sistema Digora) e unidades Hounsfield. *Rev Odonto Ciência*. 2003; 18(40):179-86.

Moreira AA. Estudo da utilização clinica das Proteínas Ósseas Morfogênicas em cirurgias buço-maxilo-facial no Brasil. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (Mestrado), 2004.

Nakashima M. Mitogenic and dentin-inductive effects of crude bone morphogenetic protein from bone and dentin in primary adult pulp cell culture. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 1992;73(4): 484-489.

Nacer RS, Poppi RR, Carvalho PTC, Silva BAK, Odashiro AN, Schettert I, Delben JRJ, Tardivo AS. Castor oil polyurethane containing silica nanoparticles as filling material of bone defect in rats. *Acta Cir. Bras*. 2012; 27(1): 56-62. ISSN 1678-2674. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502012000100010>

Nascimento SB. Estudo densitométrico comparativo da ação da calcitonina e laserterapia em reparação de defeitos ósseos em fêmures de ratos castrados [dissertação]. São José dos Campos, SP: Faculdade de Engenharia Biomédica Universidade do vale do Paraíba; 2003.

National Osteoporosis Foundation (NOF) Physicians's Guide to prevention and treatment of Osteoporosis. 2006. Disponível em <http://www.nof.org/physguide/diagnosis.htm> Acesso em 12 de Jan. de 2009.

Nicolau RA. Efeito do laser de baixa potência (As-Ga-Al) em tecidos ósseo de rato submetido à lesão, analisado por histomorfometria óssea [dissertação]. São José dos Campos, SP: Faculdade de Engenharia Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba; 2001.

Nicolau RA, Jorgetti V, Rigau J, Pacheco RTT, Reis LM, Zângaro RA. Effect of low-power GaAlAs laser (660 nm) on bone structure and cell activity na experimental animal study. *Laser Medicine Science*. 2003; 18(2):85-94.

Obradović RR, Kesić LG, Peševska S. Influence of low-level laser therapy on biomaterial osseointegration: a mini-review. *Lasers Med Sci*. Accepted: 7 May 2008;24(3):447-51.

Oliveira LG. Osteoporose – Conduta Prática para o Diagnostico e Tratamento. *Atualização em Ortopedia, SBOT*. 2003; 3:7-18

Organización Mundial de la Salud - OMS. Informe preliminar y recomendaciones de una comisión de expertos de la Organización Mundial de la Salud sobre una estrategia global para la osteoporosis. *Rev Esp Enfer Metab Óseas*. 2000;9(2):78-83

Ott SM. Ten years of alendronate treatment for osteoporosis in postmenopausal women. *N Engl J Med*. 2004;351:190-2.

Ozawa Y, Shimizu N, Kariya G, Abiko Y. Low-energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells. *Bone* 1998; 22:347-54.

Padula EOC, Andrade ML, Giordano V, Ramalho MV. Aspectos morfológicos do processo de consolidação de fratura em ratos diabéticos. Rev Bras Ortop.2003;38(3):127-136.

Papler PG. Osteoporose e Exercícios. Rev. Hosp. Clin. Fac. Méd.,1997;52:163-170.

Parker MJ, Palmer CR. Prediction of rehabilitation after hip fracture. Age Ageing. 1995;24:60-7.

Parisien M, Cosman F, Mellish RWE, Schbitzer M, J; Silverberg SJ, Shane E, Kimmel D, Recker RR, Bilezikian JP, Lindsay R, Dempster DW. Bone structure in postmenopausal hyperparatiroid, osteoporotic, and normal women. J. Bone Miner. Res. 1995; 10(9): 1393-1399.

Paz LHBC, Falco V, Teng NC, Reis LM, et al. Effects of 17 $\beta$  estradiol or alendronate on the bone densitometry, bone histomorphometry and bone metabolism of ovariectomized rats. Braz J Med Biol Res. 2001; 34:1015-1022.

Pereira AC. Estudo comparativo do processo de reparação óssea em ratos normotensos e hipertensos (SHR) [Dissertação]. São José dos Campos; Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista, 2004

Pierangelo Angeletti, Pereira MX, Gomes HC, Claudia Toyama Hino, Ferreira LM. Effect of low-level laser therapy (GaAIs) on bone regeneration in midpalatal anterior suture after surgically assisted rapid maxillary expansion Oct 16, 2009.

Pinheiro ALB, Limeira Junior F, Gerbi M. Biomodulatory effects of LLLT on bone regeneration. Laser Therapy, 2001; 13: 73-79

Pinheiro ALB, Limeira Júnior FDA, Gerbi MLM, Ramalho LMP, Marzola C, Ponzi EAC. Effect of Low Level Laser Therapy on the Repair of Bone Defects Grafted with Inorganic Bovine Bone. *Braz Dent J.* 2003;14(3): 177-181.

Pippa MGB. Densitometria óssea e osteoporose: importância na clínica médica. *Músculos, movimentos & ossos.* 1996;11:14-18.

Pires Oliveira DA, de Oliveira RF, Zangaro RA, Soares CP Evaluation of low-level laser therapy of osteoblastic cells. *Photomed Laser Surg* 2008; 26(4):401–404.

Poppi RP, Da Silva AL, Nacer RS, Vieira RP, de Oliveira LVF, Faria Junior NS, Carvalho PTC. 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 in Medical Science](#). July 2011; 26 (4): 515-522.

Pytlík M, Kaczmarczyk-Sedlak I, Sliwiński L, Janiec W, Rymkiewicz I. Effect of concurrent administration of alendronate sodium and retinol on development of changes in histomorphometric parameters of bones induced by ovariectomy in rats. *Pol J Pharmacol.* 2004; 56(5):571-9.

Pretel H, Lizarelli RF, Ramalho LT. Effect of low-level laser therapy on bone repair: histological study in rats. *Lasers Surg Med.* 2007 Dec;39(10):788-96.

Resende AC.; Cunha LR.; Saska S.; Roslindo EB.; Minarelli-gaspar AM. Análise biológica da hidroxiapatita após implantação em tíbias de ratos Abril – 2006.

Tim CR, Zambone Pinto KC, Orsini Rossi BR, Fernandes K, Matsumoto MA, Antonio Parizotto NA, Rennó ACM, Low-level laser therapy enhances the expression of osteogenic factors during bone repair in rats Received: 21 March 2013.

Renno ACM. Efeito de um programa de atividade física e do laser de baixa intensidade no fêmur de ratas osteopênicas [Tese]. São Carlos: Faculdade de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos; 2006.

Renno AC, McDonnell PA, Crovace MC, Zanotto ED, Laakso L, Effect of 830 nm laser phototherapy on osteoblasts grown in vitro on biosilicate scaffolds. *Photomed Laser Surg* 2010; 28(1):131–133

Riera-Espinoza G. Epidemiology of osteoporosis in Latin America 2008. *Salud Publica Mex.* 2009;51(1):52-5.

Rigau J. Acción de la luz laser a baja intensidad em La modulación de la función celular [Tese]. Facultad de Medicina Universitat Rovira i Virgili;1996.

Ripamonti U.; Reddi AH. Periodontal regeneration: potential role bone morphogenetic proteins. *J Periodontal Res.*, 1994;29:225-35.

Ripamonti U., Periodontal tissue regeneration by combined applications of recombinant human osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-2. A pilot study in Chacma baboons (*Papio ursinus*). *Eur. J. oral Sciences* 2001;109:241-8.

Rosen V.; Thies RS. The cellular and molecular basis of bone formation and repair. Heidelberg, Springer, 1995.

Russo LA. Osteoporose Pós- Menopausa : Opções Terapêuticas. *Arq Brás Endocrinol Metab.* 2001; 45(4):35-9.

Sassioto MCP., Massaschi CM., Aydos RD., et al.: Estudo morfológico do reparo de defeito ósseo preenchido com enxerto ósseo autógeno ou matriz óssea bovina, em ratos. *Ensaio Ci* 7, 2003:543-550.

Salgado JFM. Avaliação da velocidade do processo de regeneração óssea primária, conjugando a técnica de regeneração óssea guiada com membrana de colágeno aniônico e terapia com laser de baixa potencia [Dissertação]. São José dos Campos, SP: Faculdade de Bioengenharia da Universidade do Vale do Paraíba; 2002.

Salzedas LMP, Bosco JMD, Sundfeld MLMM. Comparação entre os exames radiográfico convencional e digital como meio auxiliar de diagnóstico para avaliação de defeito periodontal em suínos. *Rev Odontol UNESP* 2002 jan./jun.; 31(1):9-23.

Sandhu HS.; Khan SN., Animal models for preclinical assessment of bone morphogenetic proteins in the spine. *Spine* (16 Suppl 1). 2002;27:32-38.

Santos Neto FL, Volpon JB. Experimental nonunion in dogs. Effects of low-level laser therapy (685 nm) at different doses in osteogenic cell cultures *Clin Orthop*. 1984;187: 260-271.

Serakides R. Relação tireóide, gônadas e metabolismo ósseo em ratas adultas hipertireóideas e eutireóideas [Tese]. Belo Horizonte: Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais; 2001.

Seeman E, Eisman JA. Treatment of osteoporosis: why, whom, when and how to treat. *Med J Aust*. 2004; 180(15): 298-303.

Schwartz-Filho HO, Reimer AC, Marcantonio C., Marcantonio Jr.E. Marcantonio RAC. Effects of low-level laser therapy (685 nm) at different doses in osteogenic cell cultures Received: March 2011.

Sha M, Guo Z, Fu J, Li J, Yuan CF, Shi L, Li SJ. The effects of nail rigidity on fracture healing in rats with osteoporosis. *Acta Orthop.* 2009 Feb;80(1):135-8.

Sharp M, Dohme. Consenso Mexicano de Osteoporosis. *La Revista de Investigación Clínica.* 2001; 53(5):469-95.

Silva CMOM. Avaliação da ação do alendronato sódico sobre a reparação óssea na ausência dos hormônios ovarianos [Dissertação]. São Paulo: Universidade Estadual Paulista; 2000.

Silva CR. Efeito da corrente elétrica de baixa intensidade em feridas cutâneas de ratos. [Dissertação]. São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba; 2006.

Silva ARS, Ribeiro ACP, Salzedas LMP, Soubhia, AMP, Sundefeld MLMM. Análise da densidade óssea radiográfica de ratos Submetidos ao alcoolismo crônico utilizando Imagem digital. *Revista Odonto Ciência.* 2007; 22(55): 77-81.

Silva Júnior AN, Pinheiro AL, Oliveira MG, Weismann R, Ramalho LM, Nicolau RA. Computerized morphometric assessment of the effect of low-level laser therapy on bone repair: an experimental animal study. *J Clin Laser Med Surg.* 2002 Apr;20(2):83-7.

Siris ES, Selby PL, Saag KG, Borgström F, Herings RM, Silverman SL. Impact of osteoporosis treatment adherence on fracture rates in North\_America and Europe. *Am J Med.* 2009 Feb; 122(2):3-13.

Sousa VS. Efeito do ultra-som de baixa intensidade sobre a consolidação óssea em fraturas de ossos longos (rádio e ulna, fêmur, tíbia e fíbula) em cães (*Canis familiaris*). Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre, junto a faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2003.

Stein A, Benayahu D, Maltz L, Oron U (2005) Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Photomed Laser Surg* 23(2):161–166

Syftestad G.; Urist, MR. Degradation of bone matrix morphogenetic activity by pulverization. *Clin. Orthop.* 1979;141:281-6.

Szejnfeld, VL. Tratamento da osteoporose baseado em evidências clínicas. *Diagnóstico & Tratamento.* 1998;3:20-26.

Tamura K, Hosoya S, Hiratsuka K, Abiko Y. Enhancement of mouse CDC46 gene expression in the osteoblast by laser irradiation. *Laser Therapy.* 1998; 10:25-32.

Tatarunas AC, Matera JM, Dagli MLZ. Estudo clínico e anatomopatológico da cicatrização cutânea no gato doméstico: utilização do laser de baixa potência GaAs (904 nm). *Acta Cir. Bras.* 1998; 13(2):1-10.

Tortora GJ. O sistema esquelético. In: Corpo humano: fundamentos de anatomia e fisiologia. 4.ed. Trad. de Cláudia L. Zimmer et al. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000. cap.6:98-139.

Torres CS, dos Santos JN, Monteiro JS, Amorim PG, Pinheiro AL. Does the use of laser photobiomodulation, bone morphogenetic proteins, and guided bone regeneration improve the outcome of autologous bone grafts? An in vivo study in a rodent model. *Photomed Laser Surg.* 2008 Aug;26(4):371-7.

Torricelli P. et al., Laser bioestimulation of cartilage: in vitro evaluation. *Biomed Pharmacother.* 2001; 55(2): 117-20.

Vinck EM, Cagnie BJ, Cornelissen MJ, Declereq HA, Cambier DC. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. *Lasers Med Sci.* 2003; 18:95-9.

Walter C, Pabst A, Ziebart T, Klein M, Al-Nawas B Bisphosphonates affect migration ability and cell viability of HUVEC, fibroblasts and osteoblasts in vitro. *Oral Dis* 2011; 17:194–199.

Wang Qi-wei; Chen Z.; Piao YJ. Mesenchymal Stem Cells Differentiate into Tenocytes by Bone Morphogenetic Protein (BMP) 12 Gene Transfer. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2005;100(4):418-422.

Ward JA. Physiologic, health and lifestyle factors associated with femoral neck bone density in older women. *Bone*, 1995; 4:210-8.

Wasserman RH, Kallfez FA, LusT G. Ossos, articulações e líquido sinovial. In: Sweenson, MJ e Reece, WO (ed): *Duke's Fisiologia dos Animais Domésticos*. 11a. edição. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 856p. Cap. 30. 1996:.503-504.

White SC, Yoon DC, Tetradis S. Digital radiography in dentistry: what it should do for you. *J Calif Dent Assoc* 1999 Dec.; 27(2):942-52.

Xu M, Deng T, Mo F, Deng B, Lam W, Deng P, Zhang X, Liu S Low-intensity pulsed laser irradiation affects RANKL and OPG mRNA expression in rat calvarial cells. *Photomed Laser Surg* 2009; 27(2):309–315

Yoh K, Tanaka K, Ishikawa A, Ishibashi T, Uchino Y, Sato Y et al. Health-related quality of life (HRQOL) in japanese osteoporotic patients and its improvement by elcatonin treatment. *J Bone Miner Metab.* 2005; 23(2):167-73.

Yu W, Naim JO, Lanzafame RJ. Effects of photostimulation on wound healing in diabetic mice. *Lasers Surg Med.* 1997;20(1):56–63.

## ANEXOS