

RODRIGO RÉ POPPI

**AVALIAÇÃO DO EFEITO OSTEOGÊNICO DO LASER DE BAIXA
POTÊNCIA (660nm e 808nm) SOBRE DEFEITOS ÓSSEOS
PRODUZIDOS NO FÊMUR DE RATAS SUBMETIDAS À
OVARIECTOMIA**

CAMPO GRANDE
2009

RODRIGO RÉ POPPI

**AVALIAÇÃO DO EFEITO OSTEOGÊNICO DO LASER DE BAIXA
POTÊNCIA (660nm e 808nm) SOBRE DEFEITOS ÓSSEOS
PRODUZIDOS NO FÊMUR DE RATAS SUBMETIDAS À
OVARIECTOMIA**

Dissertação 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 Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Paulo de Tarso Camilo Carvalho

CAMPO GRANDE
2009

FOLHA DE APROVAÇÃO

RODRIGO RÉ POPPI

**AVALIAÇÃO DO EFEITO OSTEOGÊNICO DO LASER DE BAIXA
POTÊNCIA (660nm e 808nm) SOBRE DEFEITOS ÓSSEOS
PRODUZIDOS NO FÊMUR DE RATAS SUBMETIDAS À
OVARIECTOMIA**

Dissertação 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 Mestre.

Resultado _____

Campo Grande (MS), _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Prof.Dr. Anísio Lima da Silva _____

Intituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

Prof^a.Dr^a. Doroty Mesquita Dourado _____

Intituição: Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal - UNIDERP

Prof.Dr. Paulo de Tarso Camilo Carvalho _____

Intituição: Universidade Federal de Sergipe - UFS

DEDICATÓRIA

**A Deus e aos anjos, estando presente em todos os momentos proporcionando
paz a nossa vida.**

**À minha família pela dedicação e presença, exemplos de caráter, determinação e
serenidade em toda vida.**

AGRADECIMENTO

- Ao meu orientador, **Prof. Dr. Paulo de Tarso Camilo Carvalho**, que doou seu conhecimento e experiência, dividindo comigo as preocupações e ansiedades. Minha gratidão, hoje e sempre.
- Ao **Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste**, que através de seus professores e funcionários, possibilitaram a realização de um grande sonho, a concretização desse projeto.
- Aos meus pais **Nilva Ré Poppi e Waldemir Poppi e a todos os familiares** pelo inestimável estímulo ao meu crescimento profissional e pessoal.
- A Jornalista e namorada **Karla Martins de Ávila** pelo amor, amizade, carinho e compreensão das horas não compartilhadas. Obrigado por me acompanhar neste sonho e por compartilhar minhas angustias, por sua plena convicção e força na concretização de nossos objetivos e metas.
- A minha co-orientadora **Prof. Dr. Nilva Ré Poppi** por compartilhar seu vasto conhecimento como docente e pesquisadora. Obrigado por me ensinar a lutar e a conquistar o que acreditamos.
- Ao **Prof. Dr. Pedro Gregol** pela disponibilidade com que auxiliou e colaborou para realização da análise das radiográficas desta pesquisa.
- Ao **Prof. Dr. Anísio Lima da Silva** por seu apoio e inspiração no amadurecimento dos meus conhecimentos e conceitos, pela participação indispensável nesta pesquisa, possibilitando a conclusão desta dissertação.

- Ao **Prof. Dr. Alexandre Nakao Odashiro** pelo empenho, disponibilidade e total competência na execução da análise histológica.
- A **Prof^a. Dr. Doroty Mesquita Dourado** pelo seu apoio, experiência e sensibilidade que a diferencia como educadora e por estar sempre disponível a ajudar.
- A **Prof^a. Dr. Iandara Schettert Silva** pelo importante ensinamento e realização dos procedimentos cirúrgicos realizados nesta pesquisa.
- A **Ana Paula Machado** pela confiança e disponibilidade em auxiliar na conclusão deste estudo.
- A todos os **meus amigos** que ajudaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho em especial a **Renato Silva Nacer**. Obrigado.

“Pessoas verdadeiramente fortes são aquelas que têm pleno domínio sobre a própria mente”.

”Não se limite a pensar em realizar algo. Tenha a convicção de que conseguirá realizá-lo”

Masaharu Taniguchi.

RESUMO

Poppi RR. Avaliação do efeito osteogênico do laser de baixa potencia (808nm e 660nm) sobre defeitos ósseos produzidos no fêmur de ratas submetidas à ovariectomia. Campo Grande; 2009. [Dissertação – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do laser de baixa potência com comprimento de onda de 660nm e 808nm sobre o processo de reparação de defeitos ósseos produzidos no fêmur de ratas submetidas à ovariectomia. Para tanto foi realizada ovariectomia bilateral em 18 ratas de linhagem Wistar distribuídas em grupo controle e irradiado após a comprovação da diminuição da massa óssea através de análise digital da densidade óssea, foi realizado uma perfuração padronizada no fêmur. Os grupos irradiados receberam 120J/cm² dos lasers As-Ga-Al (660nm) e In-Ga-Al-P (808nm). Os animais foram submetidos à eutanásia em 14 e 21 dias após confecção do defeito ósseo. A avaliação histológica dos eventos ocorridos foi feita de forma descritiva, utilizando-se de um método semi-quantitativo através de microscopia óptica. Os resultados nos períodos de 14 e 21 dias mostraram que os grupos irradiados apresentaram superfície osteoblástica, fibroblástica e de osteócitos imaturos, significativamente maiores que o grupo controle ($p < 0,05$). Análise de reação inflamatória mostrou que a TLB foi eficaz, pois, poucas células inflamatórias foram encontradas quando comparadas ao grupo controle com $p < 0,05$. Conclui-se no modelo experimental estudado que ambos os comprimentos de ondas utilizados induziram a proliferação de células responsáveis pela consolidação óssea.

Palavras chave: Ovariectomia, terapia laser de baixa potência, osteogênese, reparação óssea.

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the effect of low level laser with 660nm e 808nm wavelength on the process of reparation of bone defects produced on the femur of female rats submitted to ovariectomy. For such, bilateral ovariectomy was carried out in 18 Wistar female rats distributed in control group and irradiated. After the detection of the reduction of bone mass through digital analysis of bone density, a standardized drilling was carried out on the femur. The irradiated groups received 120 J/cm² from As-Ga-Al (660nm) and In-Ga-Al-P (808nm) lasers. The animals were submitted to euthanasia in 14 and 21 days after the production of the bone defect. The histological evaluation of the occurred events was carried out in a descriptive way, using a semi-quantitative method through optical microscopy. The results in the 14 e 21 days period showed that the irradiated groups presented osteoblastic and fibroblastic surface as well as surface of immature osteocytes significantly bigger than the control group (p). The analysis of inflammatory reaction showed that TLB was effective since a few inflammatory cells were found when compared with the control group with $p < 0.05$. It's concluded in the studied experimental model that both wave lengths used induced the proliferation of cells which are responsible for the bone remodeling.

Key-words: Ovariectomy, Low level Laser Therapy, osteogenesis, Bone Repair.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média dos <i>Scores</i> de intensidade (0 a 3 cruces) para a variável reação inflamatória e osteoblastos dos grupos estudados nos períodos de 14 e 21 dias.....	40
Tabela 2 - Média dos <i>Scores</i> de intensidade (0 a 3 cruces) para a variável osteoblastos dos grupos estudados nos períodos de 14 e 21 dias.....	43
Tabela 3 - Média dos <i>Scores</i> de intensidade (0 a 3 cruces) para a variável osteócitos imaturos dos grupos estudados nos períodos de 14 e 21 dias.....	45
Tabela 4 – Média dos <i>Scores</i> de intensidade (0 a 3 cruces) para a variável fibroblastos dos grupos estudados nos períodos de 14 e 21 dias.....	47
Tabela 5 – Média dos <i>Scores</i> de intensidade (0 a 3 cruces) para a variável fibrose dos grupos estudados nos períodos de 14 e 21 dias.....	49

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Layout da tela do programa computacional sistema digital Digora versão 1.51 utilizado na leitura da densidade óssea , resultado pré-cirúrgico.....33
- Figura 2 – Layout da tela do programa computacional sistema digital Digora versão 1.51 utilizado na leitura da densidade óssea , resultado pós-cirúrgico.....33
- Figura 3 – Fotomontagem representativa: A – Tricotomia da região abdominal lateral; B – Incisão longitudinal abaixo da ultima costela e exposição do ovário; C - Ovário identificado e exposto; D – Ligação da parte superior da tropa com fio de seda nº 4; E – Excisão ovariana juntamente com a gordura circundante; F – Sutura final.....35
- Figura 4 – Fotomontagem representativa : A - incisão cirúrgica com exposição do osso do fêmur e inicio da confecção da falha óssea; B confecção da falha óssea utilizando broca esférica nº 1016; C - perfuração da cortical do osso ate atingir o canal medular; D fêmur dissecado, onde observa-se a falha óssea produzida.....36
- Figura 5 – Protocolo de irradiação com laser InGaAlP.....37
- Figura 6 – Protocolo de irradiação com laser AsGaAl.....37
- Figura 7 – Photon Laser III equipamentos LTDA São Carlos – S.P., Brasil.....38
- Figura 8 – Scores de intensidade (0 a 3 cruzes).....39
- Figura 9 – Gráfico comparativo das médias e desvio padrão dos escores obtidos pela análise semi-quantitativa do processo inflamatório aos 14 dias após a

confecção dos defeitos ósseos. * $p < 0,05$ teste t de Student em comparação com o grupo controle.....	41
Figura 10 – Gráfico comparativo das médias e desvio padrão dos escores obtidos pela análise semi-quantitativa do processo inflamatório aos 21 dias após a confecção dos defeitos ósseos. * $p < 0,05$ teste t de Student em comparação com o grupo controle.....	42
Figura 11 – Gráfico comparativo das médias e desvio padrão dos escores obtidos pela análise semi-quantitativa dos osteoblastos aos 14 dias após a confecção dos defeitos ósseos. * $p < 0,05$ teste t de Student em comparação com o grupo controle.....	43
Figura 12 – Gráfico comparativo das médias e desvio padrão dos escores obtidos pela análise semi-quantitativa dos osteoblastos aos 21 dias após a confecção dos defeitos ósseos.....	44
Figura 13 – Gráfico comparativo das médias e desvio padrão dos escores obtidos pela análise semi-quantitativa dos osteócitos aos 14 dias após a confecção dos defeitos ósseos. * $p < 0,05$ teste t de Student em comparação com o grupo controle.....	45
Figura 14 – Gráfico comparativo das médias e desvio padrão dos escores obtidos pela análise semi-quantitativa dos osteócitos aos 21 dias após a confecção dos defeitos ósseos. * $p < 0,05$ teste t de Student em comparação com o grupo controle.....	46
Figura 15 – Gráfico comparativo das médias e desvio padrão dos escores obtidos pela análise semi-quantitativa dos fibroblastos aos 14 dias após a confecção dos defeitos ósseos.....	47

Figura 16 – Gráfico comparativo das médias e desvio padrão dos escores obtidos pela análise semi-quantitativa dos fibroblastos aos 21 dias após a confecção dos defeitos ósseos. * $p < 0,05$ teste t de Student em comparação com o grupo controle.....48

Figura 17 – Gráfico comparativo das médias e desvio padrão dos escores obtidos pela análise semi-quantitativa da fibrose aos 14 dias após a confecção dos defeitos ósseos.....49

Figura 18 – Gráfico comparativo das médias e desvio padrão dos escores obtidos pela análise semi-quantitativa da fibrose aos 21 dias após a confecção dos defeitos ósseos.....50

Figura 19 – Montagem de fotomicrografia das lâminas obtidas dos animais ovariectomizados após 14 dias da realização dos defeitos ósseos: A e B - grupo tratado com laser AsGaAl 808 nm infravermelho observar a presença de canis de Havers (HC), osso secundário (B2°), infrintação leucócitaria, intensa proliferação de osteócitos(seta). C e D – grupo tratado com laser InGaAlP 660nm vermelho visível, observar a presença de canais de Havers(HC), proliferação de adipocitos, formação de medula óssea (MO), osteócitos (seta), presença de osso secundário(B 2°). F e G – grupo controle, observar a presença de osteoblastos (seta), e condroblastos. Hematoxilina e Eosina - Barra de escala 20µm.....51

Figura 20 – Montagem de fotomicrografia das lâminas obtidas dos animais ovariectomizados após 21 dias da realização dos defeitos ósseos: A e B - grupo tratado com laser AsGaAl 808 nm infravermelho observar a presença de osso neoformado (NB), osso primário(B1°), Vasos sanguíneos(Vb)e osteocítos(seta). C eD – grupo tratado com laser InGaAlP 660nm vermelho visível, observar a presença de neoformação óssea (NB), proliferação de vasos sanguíneos (Vb), tecido conjuntivo fibroso(FC) osteocítos (seta),

presença de osso secundário(B 2º). F e G – grupo controle, observar a presença de osteoblastos (seta), vasos sanguíneos neoformado(Vb), osso primário(Bº) e secundário(B 2º) em G osteocítos (setas). Hematoxilina e Eosina - Barra de escala 20µm.....52

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO.....	11
2 - REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1 - Tecido Ósseo	12
2.2 - Tipos de Tecido Ósseo.....	15
2.3 - Reparo de Lesão do Tecido Ósseo	17
2.4 - Fatores que Influenciam a Reparação Óssea	19
2.5 - Osteoporose.....	21
2.5.1 - Remodelação em tecido ósseo osteoporótico.....	25
2.5.2 - Ovariectomia e Osteoporose.....	26
2.6 - Terapia Laser de Baixa Potência.....	27
3 - OBJETIVOS.....	30
3.1 - Objetivo Geral.....	30
3.2 - Objetivo Específico.....	30
4 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1 - Animais de Experimentação.....	31
4.2 - Grupos Experimentais.....	31
4.3 - Exame Radiológico.....	32
4.4 - Procedimentos Cirúrgicos.....	34
4.4.1 - Ovariectomia.....	34
4.4.2 - Produção dos defeitos ósseos.....	35
4.4 - Laser de Baixa Potência.....	37
4.5 - Procedimentos Histológicos.....	39
4.6 - Análise Estatística dos Dados.....	39
5 - RESULTADOS.....	40
6 - DISCUSSÃO.....	53
7 - CONCLUSÃO.....	60
REFERENCIAS.....	61

1 INTRODUÇÃO

A resposta do osso ao trauma consiste de uma seqüência ordenada e bem diferenciada de eventos, que resulta na cicatrização do tecido lesado de forma bastante semelhante à sua estrutura inicial (BUCKWALTER; CRUESS, 1993; JUNQUEIRA *et al.*, 1995; DOBBS *et al.*, 1999). Uma fratura pode ocorrer por vários motivos um deles é a osteoporose, causando milhares de fraturas todos os anos, sendo reconhecida através de estudos epidemiológicos como um dos maiores problemas de saúde pública da atualidade (WARD, 1995; ELFFORS, 1998; CARVALHO; CLIQUET, 2003; OLIVEIRA, 2003; CHANG *et al.*, 2004; LIPS & VAN SCHHOOR, 2005; GARDNER *et al.*, 2005; HAACH, 2006; OTT, 2004; RIERA-ESPINOZA, 2009; SIRIS *et al.*, 2009).

Lorrain e colaboradores (2003) relatam que o tratamento da fratura é um dos fatores mais importantes para a manutenção da qualidade de vida e que apenas metade das vítimas de fraturas osteoporóticas volta a ter total autonomia.

No Brasil as fraturas osteoporóticas têm representado uma elevada parcela no orçamento do país. Em estudo realizado Araújo e colaboradores (2005) relatam que a estimativa do custo direto com hospitalização para tratamento da fratura osteoporótica do fêmur proximal para o Sistema Suplementar de Saúde totalizou R\$ 12 milhões, no período entre julho de 2003 e junho de 2004. Um dos fatores para o aumento dos gastos é a dificuldade no tratamento decorrente de má consolidação da fratura.

O remodelamento ósseo depende da atividade integrada dos osteoblastos, para produção de tecido neo-formado e os osteoclastos para destruição do tecido, ambos os eventos cruciais ao processo no decorrer do crescimento ósseo normal, ou após lesão. Quando ocorre um desequilíbrio entre osteoclastos e osteoblastos leva a osteoporose (PAPLER, 1997; BEMBEM, 1999; KALFAS 2001; LANNA, 2003; NASCIMENTO, 2003; DINIZ, 2006; HAACH, 2006; SHA *et al.*, 2009).

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 e aumento da vascularização, proliferação celular, maior resistência mecânica no tecido ósseo neoformado além do aumento da calcificação da matriz óssea (CARNEVALLI, 2001; CONLAN *et al.*, 1996; SILVA JÚNIOR *et al.*, 2002; NICOLAU *et al.*, 2003; NASCIMENTO, 2003; LIRANI, 2004; LANDA, 2005; PRETEL *et al.*, 2007; CERQUEIRA *et al.*, 2007; BLAYA *et al.*, 2008; TORRES *et al.*, 2008; OBRADOVIĆ *et al.*, 2008; MÁRQUEZ MARTÍNEZ *et al.*, 2008).

Existem situações em que o processo de reparo das fraturas pode ser acelerado, assegurando rápido retorno da função músculo-esquelética e diminuindo o risco de complicações. Diante desta perspectiva, o conhecimento de métodos que estimulem a consolidação de fratura adquire considerável importância.

Baseado nos efeitos do laser nos tecidos biológicos levantou-se a hipótese de que a Terapia Laser de Baixa Potência (LBP) poderia auxiliar no processo de osteogênese de ratas osteoporóticas. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do laser terapêutico, utilizado em dois diferentes comprimentos de onda, 660nm e 808nm, sobre defeito ósseo realizado no fêmur de ratas ovariectomizadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tecido Ósseo

Os ossos se formam no embrião de um esboço constituído por tecido cartilaginoso e por tecido membranoso que representam o osso primário e secundário. Com o tempo, tais esboços começam a se ossificar e o processo de ossificação inicia-se em pontos particulares, os centros de ossificação (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

Por ocasião do nascimento, os ossos estão quase inteiramente no estado cartilaginoso. A ossificação se processa durante toda a infância e adolescência e só

está completa depois do 24º ano de idade. Então todo o esqueleto tornou-se ósseo (BEZERRA, 2005).

O tecido ósseo e seus elementos esqueléticos são muito mais do que apenas uma rede de fixação de músculos possuindo grande variedade de funções vitais. Somando ao suporte do peso corporal, ossos e músculos mantêm a posição corporal para produzir movimentos precisos e controlados. Sem o esqueleto para resistir, a contração das fibras musculares seria incapaz de, por si só, fazer-nos andar, sentar ou correr. Sem algo para tracioná-los, os músculos simplesmente iriam ser curtos e redondos (MARTINI, 1998; BEZERRA, 2005).

O osso apresenta como funções primária:

- Suporte – o esqueleto fornece suporte estrutural para todo o corpo. Ossos individualmente ou em grupos dão estruturas e proteção para tecidos moles e órgãos;

- Depósito de minerais e lipídios – o tecido ósseo tem a função de estocar minerais e íons inorgânicos que contribuem para a osmolaridade dos fluidos corporais. O esqueleto estoca energia ao armazenar lipídeos nas áreas da medula óssea amarela;

- Produção de células sanguínea – as células vermelhas e brancas do sangue, bem como outros elementos sanguíneos são produzidos na medula óssea vermelha que preenche a cavidade interna de muitos ossos.

- Proteção – muitos órgãos e tecidos delicados são cercados por elementos esqueléticos. O tórax protege o coração e os pulmões, o crânio engloba o cérebro, as vértebras protegem o cordão espinhal e a pélvis embala delicadamente os órgãos do sistema reprodutivo e digestivo.

- Sistema de alavancas – muitos ossos funcionam como alavancas que podem alterar a magnitude e direção das forças gerada durante as contrações musculares, transformando-as em movimentos corporais (MARTINI, 1998; KATCHBURIAN; ARANA, 1999; KESSEL, 2001).

A matriz orgânica contribui com 30% do peso do osso e tem como principal componente a molécula de colágeno tipo I (95%), da qual se origina a molécula de tropocolágeno. Este, por sua vez, consiste de três cadeias polipeptídicas que enrolam em hélice e estão unidas entre si por meio de pontes de hidrogênio (DUARTE, 1977; SOUSA, 2003). As moléculas de tropocolágeno agregam-se entre si e formam as

fibrilas que exibem várias moléculas de tropocolágeno unidas como se fosse a de um cabo de aço. As fibrilas apresentam propriedades elásticas e se localizam nas direções dos esforços predominantes dos ossos. Dessa forma, de modo a resistir a esforços, é importante que elas permaneçam ligadas entre si. Esta estabilidade é dada por moléculas de mucoproteínas e complexos proteína-mucopolissacarídeos (BEZERRA, 2005).

As características ósseas de resistência, dureza e elasticidade são dadas pela associação dos cristais de hidroxiapatita (componente mineral mais importante do osso – 65% do peso do osso) com fibras de colágenas. O osso é forte, um pouco flexível e muito resistente a fraturas (DUARTE, 1977; DOBLARÉ *et al.*, 2004).

As células que compõe o tecido ósseo são: osteoblastos, osteócitos e osteoclastos e as células osteoprogenitoras. A parte orgânica da matriz óssea é sintetizada pelos osteoblastos, portanto, células responsáveis pela formação do osso. Este processo é denominado osteogênese (YU *et al.*, 1997, SILVA, 2000).

À medida que os osteoblastos são circundados pela matriz óssea que secretam, deixam de ser células poligonais e desenvolvem extensões longas e delgadas. Neste momento, o metabolismo dessas células se altera, cessam a síntese de matriz óssea e passam a ser chamadas osteócitos. Os osteócitos situam-se em cavidades ou lacunas no interior da matriz, mas mantém comunicação entre si através dos longos prolongamentos citoplasmáticos, que se intercalam e estabelecem vias de transporte de nutrientes e metabólitos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999; KATCHBURIAN & ARANA, 1999; FREITAS, 2001; KESSEL, 2001).

As células osteoprogenitoras que derivam de células mesênquimais são encontradas na superfície óssea durante o crescimento normal ou durante a remodelação óssea, pode ser considerada uma célula de reserva que permanece em repouso até diferenciar-se, podendo se transformar em osteoblastos e produzir matriz óssea (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

As células responsáveis pelo remodelamento ósseo são os osteoclastos. São células multinucleadas portadoras de grande quantidade de enzimas digestivas e capazes de erodir o tecido ósseo ao atacar a matriz, e, desta forma, participam do processo de remodelação do tecido e da regulação dos níveis plasmáticos de cálcio. A

matriz óssea recém formada constitui a porção orgânica não calcificada e recebe o nome de tecido osteóide (YU *et al.*, 1997).

Verifica-se um pequeno grau de atividade contínua osteoblástica em todos os ossos vivos (cerca de 4% de todas as superfícies, num dado momento), de modo que ocorre formação constante de pelo menos certa quantidade de osso novo (GUYTON, 1993).

A deposição e a absorção contínuas desempenham algumas funções fisiológicas importantes. Em primeiro lugar, o osso adapta habitualmente sua força ao grau do estresse ósseo. Em segundo lugar, mesmo a forma do osso pode ser reorganizada para a sustentação adequada das forças mecânicas, pela deposição e absorção óssea, de acordo com o tipo de estresses. Em terceiro lugar, como de osso velho torna-se relativamente fraco e quebradiço, é necessário à formação de nova matriz orgânica à medida que a matriz antiga sofre degeneração. Dessa maneira, é mantida a rigidez normal do osso (GUYTON, 1988; DUNCAN; TURNER, 1995; GROSS *et al.*, 1997). Com efeito, ossos de crianças, em que a velocidade de absorção e de deposição é mais rápida, são pouco quebradiços em comparação com os ossos do indivíduo idoso, quando a atividade de absorção e deposição fica lenta (CARVALHO *et al.*, 2002; BEZERRA, 2005).

Em estudo realizado Carvalho e colaboradores (2002) relataram que ao submeter o osso a uma carga externa, é possível observar número aumentado de osteoblastos na região do periósteo.

Segundo Haach (2006) ossos de atletas ficam consideravelmente mais pesados que os das outras pessoas. Além disso, se a pessoa tiver uma das pernas engessadas, mas continuar a andar com a perna oposta, o osso da perna engessada fica fino e sofre descalcificação de até 30% dentro de algumas semanas, enquanto o osso oposto permanece espesso, portanto o balanço entre as atividades das células é muito importante, porque se a atividade osteoclástica predomina, o osso fica mais frágil, por outro lado, se a atividade osteoblástica predomina, o osso torna-se muito forte e denso.

2.2 Tipos de Tecido Ósseo

Histologicamente existem dois tipos de tecido ósseo: imaturo (ou primário ou trabecular) e maduro (ou secundário ou lamelar). Os dois tipos são muito parecidos possuem as mesmas células e os mesmos constituintes da matriz óssea, o que os diferencia 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, contendo grande número de osteócitos irregularmente distribuídos no interior das trabéculas ósseas neo-formadas. Os osteoblastos são produtores da matriz óssea trabecular (YU *et al.*, 1997).

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. Sua principal característica é apresentar fibras colágenas organizadas em lamelas, dispostas paralelamente umas às outras, em camadas concêntricas em torno de um canal central, denominado canal de *Havers*, por onde correm vasos sanguíneos e nervos (YU *et al.*, 1997).

Os canais medulares de *Havers* comunicam-se entre si com a cavidade medular, e com a parte externa do osso por canais transversais ou oblíquos, os canais de *Volkman* (KODAMA, 2003). Todas as lacunas do sistema haversiano estão interconectadas por finíssimos canais denominados canalículos, possibilitando o suprimento por fluidos nutritivos que provêm dos vasos do canal haversiano para os capilares (TORTORA, 2000).

A porosidade do osso é importante, pois afeta diretamente as características mecânicas do tecido. Com seu conteúdo mineral mais alto, o osso lamelar é mais rígido, o que lhe permite um maior estresse, porém menos sobrecarga ou deformação relativa que o osso trabecular. Por ser mais esponjoso que o osso cortical, consegue suportar mais sobrecarga antes de sofrer fratura (HALL, 2000).

O tecido ósseo apesar da sua resistência e de sua dureza é muito elástico, sendo capaz de remodelar sua estrutura interna em resposta a modificações das forças a que está submetido normalmente. Quando uma força é aplicada, o osso tende a resistir “imóvel” ou deformar-se. Quando a força não ultrapassa o limite elástico do osso, toda deformação elástica é recuperada no menor tempo possível após a retirada da carga ou força. As forças ou cargas superiores ao limite elástico ósseo e pouco tempo de recuperação podem levar á deformações plásticas permanentes ou fraturas (GUYTON, 1988).

2.3 Reparo de Lesão do Tecido Ósseo

A regeneração óssea é um dos processos de reparo mais importantes do corpo porque o osso, assim como o fígado, é um dos poucos órgãos aptos a sofrer regeneração espontânea em vez de apenas restaurar uma estrutura. Os ossos longos regeneram de duas formas distintas: por formação de calo ósseo de origem tanto periosteal como endosteal e por regeneração haversiana direta (KAPLAN et al., 1994; AMADEI et al., 2006).

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

(1) - Hematoma, imediatamente após a lesão, ocorre um sangramento que é seguido pela formação de coágulos que interrompem o fluxo sanguíneo local

(2) - Estagio de proliferação subperiosteal e endosteal, após quarenta e oito horas iniciam-se o processo de proliferação das células osteogênicas, os osteoblastos, dão origem às trabéculas ósseas constituídas por osso primário

(3) - Calo ósseo, as trabéculas ósseas ainda frágeis pouco a pouca vão sendo formadas origina-se assim à formação do calo ósseo

(4) - Estágio de consolidação, formação e/ou reconstituição dos vasos sanguíneos que irão suprir o tecido ósseo em processo de regeneração, através de brotamento de vasos pré-existent

(5) - Remodelação o calo é remodelado e, a seguir, substituído por osso secundário ou lamelar. O processo é denominado angiogênese e é acompanhado por intensa atividade dos osteoclastos (KAPLAN et al., 1994; LIRANI, 2004; AMADEI et al., 2006).

Devemos enfatizar, no entanto, que estes estágios não são demarcados de maneira nítida, e que dois ou mais estágios de consolidação podem ocorrer ao mesmo tempo em diferentes partes do osso (CROCI, 1997; CROCI et al., 2003).

A característica mais óbvia nos estágios iniciais da reparação é a proliferação de células da superfície profunda do periósteo próximo à fratura. Tais células são as precursoras dos osteoblastos, que posteriormente deverão sedimentar a substância intercelular. Formam um colar de tecido ativo que circunda cada fragmento e cresce em direção ao outro fragmento (KATO et al., 1998).

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).

O osso primário que forma o calo primário transforma-se gradualmente pela ação dos osteoblastos em um osso mais amadurecido, com estrutura lamelar típica. Quando a consolidação está completa, o osso recém formado forma em geral, um colar bulboso que circunda o osso e oblitera o canal medular. O calo é em geral pequeno quando os fragmentos ósseos estiverem em posição anatômica (SANTOS NETO; VOLPON, 1984).

A ossificação endocondral se dá a partir do centro de ossificação primário é onde ocorre o crescimento da cartilagem, com o crescimento os condrócitos da parte intermediária amadurecem e secretam substância intercelular. Este fato levará os condrócitos à morte e grandes lacunas serão formadas, por onde passaram vasos sanguíneos levando nutrientes para a formação da matriz óssea através dos

condroblastos. Assim vão se formando as trabéculas que a princípio formam osso esponjoso (primário). A cavidade medular é formada quando a parte central não é mais necessária para sustentação e assim reabsorvida pelos osteoclastos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

O processo de formação óssea intramembranoso ocorre através da diferenciação das células mesênquimais indiferenciadas e fibroblastos em células osteogênicas que podem se diferenciar em osteoblastos (formadores de matriz óssea) e dividir-se formando mais células osteogênicas. A ossificação ocorre através da deposição óssea feita pelos osteoblastos localizados no interior do periósteo. Com isso há formação de novo osso trabecular ou esponjoso, que gradativamente se tornara osso maduro ou lamelar, não até que novas lamelas de osso maduro preencham os espaços entre as trabéculas (JUNQUEIRA; CARNEIRO 1999).

A consolidação de um osso esponjoso fraturado segue um padrão diferente daquela do osso cortical. Como o osso tem uma textura esponjosa uniforme e não tem canal medular, há uma área de contato mais ampla entre os fragmentos que é a trama de trabéculas que permite uma penetração mais fácil do tecido ósseo e sua formação. 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 resposta do osso à fratura, perfuração, infecção, interrupção da fonte sangüínea e às lesões de expansão é relativamente limitada. O osso inerte deve ser reabsorvido, e o osso novo deve ser formado, ocorrendo crescimento de vasos sangüíneos na área envolvida (GUYTON, 1993; NICOLAU, 2001). Ao contrario das fraturas, os defeitos são menos propensos a fatores mecânicos e obstruções do suprimento sangüíneo. 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).

O reparo ósseo é um processo regenerativo altamente complexo e, essencialmente, uma repetição de eventos de desenvolvimento. Estes eventos incluem

a ação de diferentes tipos celulares de proteínas e uma expressão genética ativa que restaura a integridade natural dos ossos. No entanto, com técnicas de tratamento mais avançadas pode-se facilitar e/ou acelerar este processo.

2.4 Fatores que Influenciam a Reparação Óssea

Vários fatores podem influenciar na consolidação de uma fratura têm-se algumas possíveis Complicações:

- ▶ Infecção
- ▶ Deslocamento do fragmento da fratura
- ▶ Novo traumatismo
- ▶ Doença articular
- ▶ Anormalidade de tecido mole como inchaço, enfisema subcutâneo e atrofia.

Nos casos de presença de infecção ocorre uma reação no tecido mole e um padrão mais desigual de perda de densidade óssea ocorre, neste caso, é importante estar amparado por exames radiológicos e análise dos sinais clínicos (JOHNON; DECAMP, 1999; SOUSA, 2003).

A perda de suprimento sangüíneo pelo trauma ou infecção pode resultar na formação de um seqüestro. Assim que a fratura se consolida o seqüestro permanecerá denso e suas margens serão distintas enquanto outros fragmentos de fraturas mostram evidências de proliferação óssea ou absorção. Um seqüestro amplo pode interferir com o reparo da fratura enquanto seqüestros menores podem ser revascularizados ou absorvidos (WASSERMAN *et al.*, 1996; SOUSA, 2003).

As fraturas podem apresentar reparos em velocidades diferentes, quando uma fratura não se consolida no tempo previsto e não apresenta sinais de progresso, tem-se uma união retardada (WASSERMAN *et al.*, 1996).

A desnutrição protéica, quando o defeito excede o tamanho crítico para aquela região, idade e espécie a ser tratada são variáveis importantes em se tratando de

reparação óssea, pois podem dificultar tratamentos ortopédicos (LOURENÇO, 2002; OLIVEIRA, 2003; GUARNIERO *et al.*, 2003; PADULA *et al.*, 2003).

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 Osteopenia é o processo de ossificação inadequada que ocorre com os seres humanos, tendo inicio entre 30 e 40 anos. Quando a redução da massa óssea é suficiente para comprometer a função normal, chamamos o processo de osteoporose (MARTINI, 1998; SZEJNFELD, 1998).

A osteoporose é causa de milhares de fraturas todos os anos no mundo todo e representa um elevado custo no orçamento dos países.

2.5 Osteoporose

A ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS) considera a osteoporose o segundo maior problema de assistência sanitária no mundo depois das enfermidades cardiovasculares e 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. A osteoporose é a alteração metabólica mais freqüente acometendo os ossos, caracterizando-se pela diminuição lenta e progressiva da massa óssea (PIPPA, 1996; ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 2000; SHARP; DOHME, 2001; NASCIMENTO, 2003; ARAÚJO *et al.*, 2005; HAACH, 2006).

A OMS (2000) também define que na osteoporose a densidade mineral óssea está 2,5 desvios padrão abaixo dos valores da normalidade. Deste modo é classificada pelos seus graus de severidade: normal, osteopenia, osteoporose, e osteoporose severa.

A osteoporose ocorre quando os osteoclastos criam uma cavidade excessivamente profunda que não consegue ser preenchida suficientemente ou quando os osteoblastos não conseguem preencher uma cavidade de reabsorção

normal (BEMBEM, 1999; SEEMAN; EISMAN, 2004; EIS, 2003; NASCIMENTO, 2003; HAACH, 2006). Ossos saudáveis são caracterizados por osso trabecular esponjoso constituindo por milhares de travess interconectadas fortemente entre si. Na osteoporose, o osso cortical se afina gradualmente e os buracos do osso trabecular se tornam cada vez maiores e irregulares. A diminuição de massa óssea, principalmente observada nos ossos trabeculares, torna os ossos mais frágeis e mais suscetíveis a fraturas (ELFFORS, 1998; CARVALHO; CLIQUET, 2003; DINIZ, 2006).

A perda de massa óssea levando a osteoporose é um processo praticamente inevitável do envelhecimento. A osteoporose atinge geralmente mulheres pós-menopausais em decorrência da deficiência do hormônio ovariano, o estrógeno. (WARD, 1995; CHANG *et al.*, 2004; ARDILA 2003).

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

Segundo a National Osteoporosis Foundation (2006), estão indicados para o estudo da massa óssea: mulheres na perimenopausa que estejam cogitando usar terapia de reposição hormonal; indivíduos com mais de 65 anos; pacientes com alterações radiológicas sugestivas de osteopenia; indivíduos com deficiência de hormônios sexuais; pacientes em uso de corticoterapia crônica; hipertireoidismo primário e para controle de eficácia da terapia.

A radiografia (Raio-X) é uma ferramenta de auxílio para o diagnóstico da osteoporose, pois as perdas de massa óssea podem ser observadas por meio das alterações na densidade do osso cortical e trabecular. O raio-X é o método de escolha para a verificação de fraturas, por ser simples e acessível.

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 às radiografias convencionais e oferecido opções na detecção de perdas ósseas. 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 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).

Uma das formas de tratamento na osteoporose é preventiva. O uso de agentes anti-reasortivos como é o caso do raloxifeno, estrógeno e os bifosfonatos são de

importante auxílio minimizando o risco de fraturas (LANNA, 2003; JAIME *et al.*, 2005; DINIZ *et al.*, 2009).

Estudos demonstram o efeito estimulatório da calcitonina sobre o crescimento do tecido ósseo decorrente da inibição da atividade osteoclástica, o que torna a calcitonina um importante aliado no tratamento da osteoporose (CANAVERO *et al.*, 2000; SHARP & DOHME, 2001; RUSSO, 2001; NASCIMENTO, 2003).

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.

O modelamento e remodelamento de ossos são regulados principalmente pela interação entre fatores genéticos, influências bioquímicas e hábitos de vida, como a nutrição, os quais interferem no comportamento de células ósseas e fatores reguladores envolvidos no crescimento e manutenção do sistema esquelético. Portanto, a alimentação equilibrada pode ajudar na prevenção de doenças ósseas, como a osteoporose. Além disso, a subnutrição aumenta o risco de quedas, as quais podem gerar fraturas, principalmente em ossos mais frágeis (CARVALHO *et al.*, 2002; YOH *et al.*, 2005).

Segundo Cook e colaboradores (1999), a osteoporose é um problema clínico e social de relevância, com sérias conseqüências clínicas. Frequentemente os pacientes apresentam limitações para exercer normalmente suas atividades profissionais, sociais e de lazer, e apresentam uma afecção emocional importante.

Alcoólicos crônicos apresentam alterações do metabolismo de vitamina D. Todas às alterações provocadas pelo consumo de álcool contribuem para uma redução de formação óssea, o que resulta em osteopenia (LAITINEN; VÄLIMÄKI, 1991).

A efetividade dos tratamentos farmacológicos para osteoporose é limitada, principalmente no que diz respeito à proteção do colo femoral (HAACH, 2006). Para Frost (1997) a maioria dos agentes não mecânicos (hormônios, minerais, vitaminas entre outros) pode ajudar nas respostas ósseas ao carregamento mecânico, mas não podem substituí-lo.

Alguns tratamentos medicamentosos envolvem certo grau de risco para o paciente, como por exemplo, o aumento do risco de desenvolver câncer de mama gerado pela reposição de estrógenos (FONTANA; DELMAS, 1999; CORTET *et al.*, 2006).

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.

2.5.1 Remodelação em tecido ósseo osteoporótico

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 também um aumento da ativação dos novos sítios de remodelação, com isso há perda de conexões entre as trabéculas ósseas criando grandes cavernas de reabsorção (SERAKIDES, 2001; LANNA, 2003; ARDILA, 2003).

Os estrogênios podem 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 (ARDILA, 2003).

Em estudo realizado Diniz e colaboradores (2009), relata que a velocidade da reconstrução óssea esta relacionada a fatores como níveis de fósforo e cálcio ionizantes no soro, ph local (o ph baixo favorece reabsorção mineral), hormônio paratireoideano (PTH) e níveis de vitamina D e calcitonina. A quantidade de cálcio no sangue regula a qualidade do osso, pois controla a entrada e saída desse elemento no tecido.

A vitamina D também é importante para o osso por facilitar a absorção de cálcio e de fósforo e estimular a atividade osteoblastica, outra vitamina importante é a vit.-E eficaz para manter o desenvolvimento normal ósseo e beneficiar a massa óssea de idosos, além de aumentar a formação de osso trabecular (BANDEIRA, 2006).

Os hormônios da paratireóide são muito importantes, pois regulam o cálcio no organismo quando necessário. Estão envolvidos na homeostase do cálcio quando a uma diminuição dos níveis de cálcio sanguíneos, o hormônio é liberado com intuito de ativar a vitamina D, que se acopla no cálcio e o leva até o osso (DINIZ et al., 2009).

2.5.2 Ovariectomia e Osteoporose

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 a utilização de cobaias para indução da osteoporose é importante 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).

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-menopáusico (KALU, 1991; HIETALA, 1993; ARIAS; SZEJNFELD, 1997; 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)

2.6 Terapia Laser de Baixa Potência

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 (CO₂ 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.

Através de estudos, Mester foi o primeiro pesquisador a investigar a aplicação clínica experimental do laser em baixa potência, 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 e colaboradores (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

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 várias 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)

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).

Como exposto acima existem muitas evidências científicas que demonstram os efeitos biológicos positivos do laser de baixa intensidade sobre o tecido ósseo. No entanto, é difícil saber qual o comprimento de onda, a dose de energia, potência e tempo necessário para estimular a osteogênese. Levando em consideração os diferentes estados biológicos como, por exemplo, o osteoporótico. Além do que não está claro se a irradiação laser de baixa potência estimula células mesenquimais a se diferenciarem e a produzirem matriz óssea. A energia da luz laser pode ser uma forma econômica de tratar uma série de alterações ósseas de maneira eficiente.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliação do efeito osteogênico do Laser de baixa potencia (808nm e 660nm) sobre defeito ósseo produzido no fêmur de ratas submetidas à ovariectomia.

3.2 Objetivo Especifico

Analisar histologicamente a estimulação do laser de baixa potência (InGaAlP e AsGaAl) em dois comprimentos de ondas distintos (660nm e 808nm) no tratamento de fraturas de fêmur de ratas osteoporóticas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais de Experimentação

A amostra foi composta por 18 ratas (*Rattus norvegicus albinus*), da linhagem *Wistar*, com peso corpóreo variando entre 230 a 350 gramas, adultos procedentes do Biotério da Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal - UNIDERP, Campo Grande, MS.

Os animais foram confinados em gaiolas de 0,15m², e mantidos em fotoperíodo de 12 horas, temperatura e umidade mantidas por ar condicionado, ruídos mínimos, ração sólida e água “*ad libitum*”, ficando sob observação por um período de dois dias, antes da utilização no experimento.

O presente projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e todos os procedimentos experimentais foram realizados em conformidade com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) protocolo nº 137/2007.

4.2 Grupos Experimentais

Todos os animais disponíveis foram submetidos ao primeiro procedimento cirúrgico (Ovariectomia) e posteriormente divididos em grupos:

- Grupo 1 (N = 6): Foi realizado a Ovariectomia e defeito ósseo (ovariectomia controle), (OC).

- ▶ Grupo 2 (N = 6): Foi realizado a Ovariectomia, defeito ósseo tratado com Laser Vermelho Visível (OV).
- ▶ Grupo 3 (N = 6): Foi realizado a Ovariectomia, defeito ósseo tratado com Laser Infra Vermelho (OI).

Em seguida todos os grupos foram subdivididos pelos dias em que foram sacrificados e os subgrupos resultantes denominados: Grupo 1- OC14 e OC 28; Grupo 2- OV 14 e OV 28; Grupo 3- OI 14 e OI 28.

4.3 Exame Radiológico

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). Os animais foram posicionados em decúbito dorsal e foram obtidas radiografias simples em incidência ântero-posterior (AP).

O processamento (revelação, fixação, lavagem, e armazenamento) realizado 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 3,1x4,1cm²) 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 evaporasse naturalmente

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

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 noventa 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 e 2).

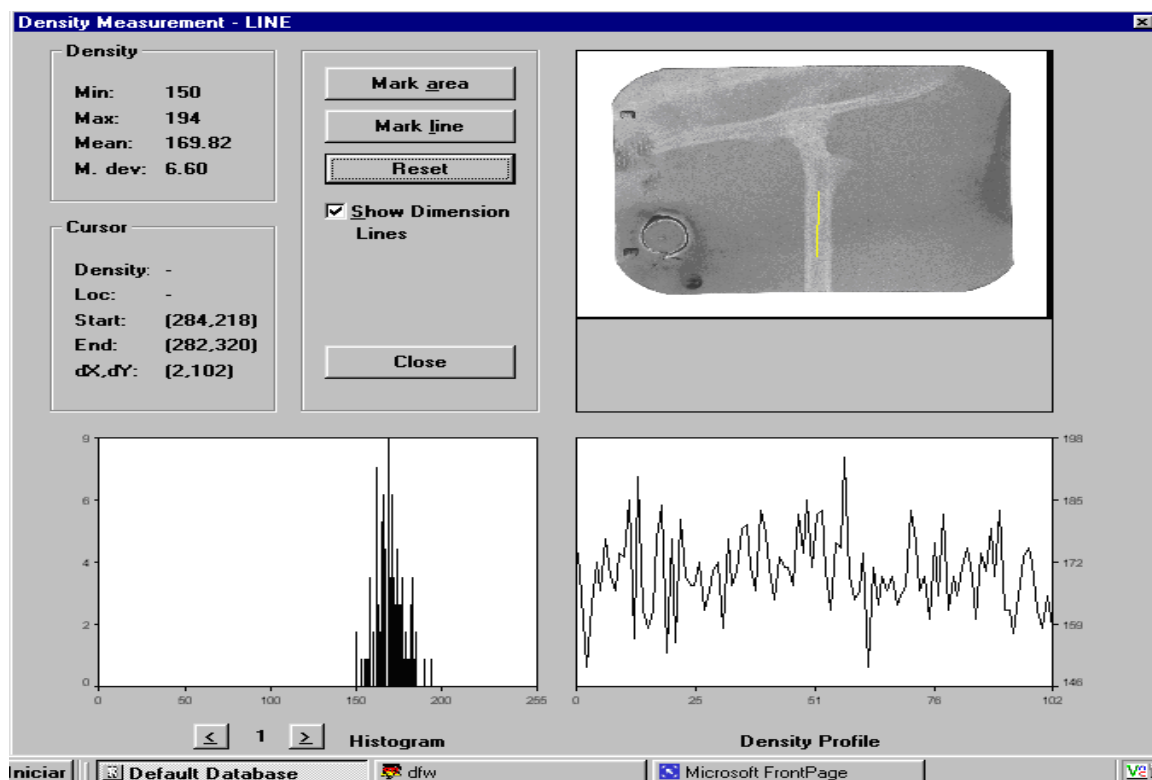


Figura 1. Layout da tela do programa computacional sistema digital Digora versão 1.51 utilizado na leitura da densidade óssea , resultado pré-cirúrgico.

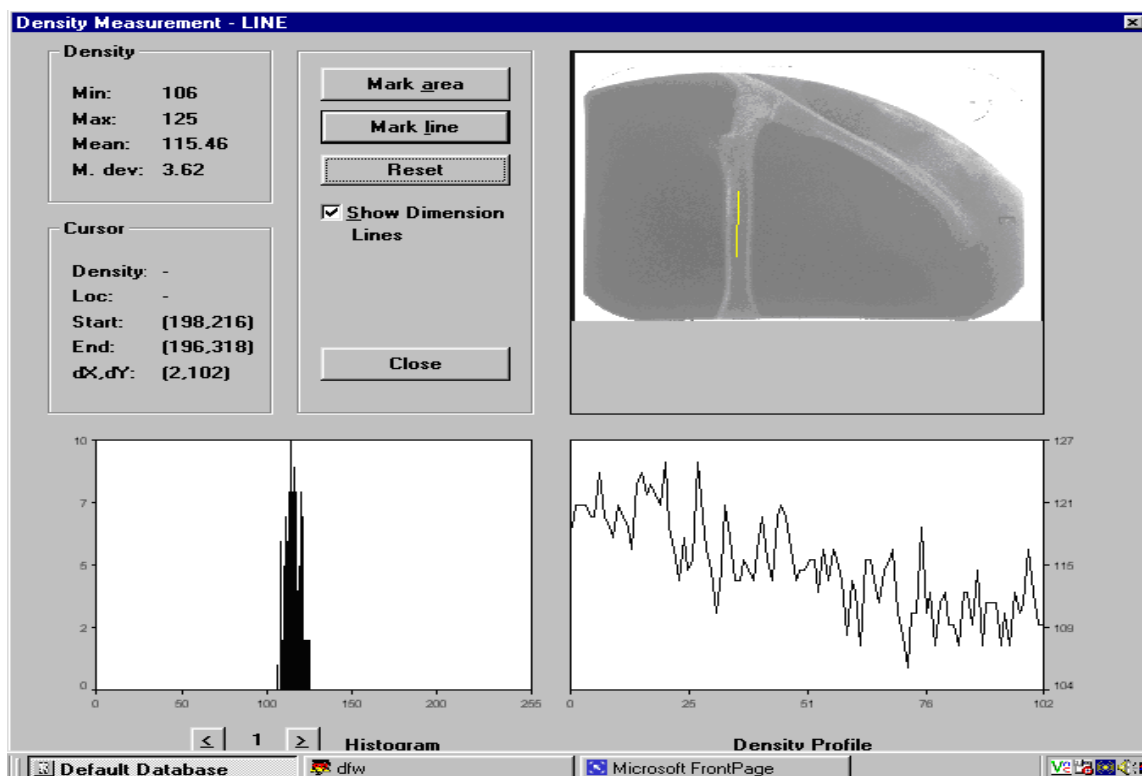


Figura 2. Layout da tela do programa computacional sistema digital Digora versão 1.51 utilizado na leitura da densidade óssea, resultado pós-cirúrgico.

4.4 Procedimentos Cirúrgicos

4.4.1 Ovariectomia

Para realização da ovariectomia Bilateral os animais foram submetidos à anestesia dissociativa composta por Quetamina a 5% e Xilazina a 2% na proporção 1:2 em doses de 0,10 – 0,15 ml/100g de peso corpóreo. Após a anestesia os animais foram posicionados em plano cirúrgico em decúbito ventral e foi realizada a tricotomia da região abdominal lateral seguida de anti-sepsia com álcool iodado. A pele e a musculatura foram incisadas longitudinalmente, na linha média próximo da região renal abaixo da ultima costela, e o ovário identificado e exposto. Foi realizada a hemostasia através da ligação da parte superior da tropa 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 catégute nº 4 e a pele com fio de seda nº 4. (Figura 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.

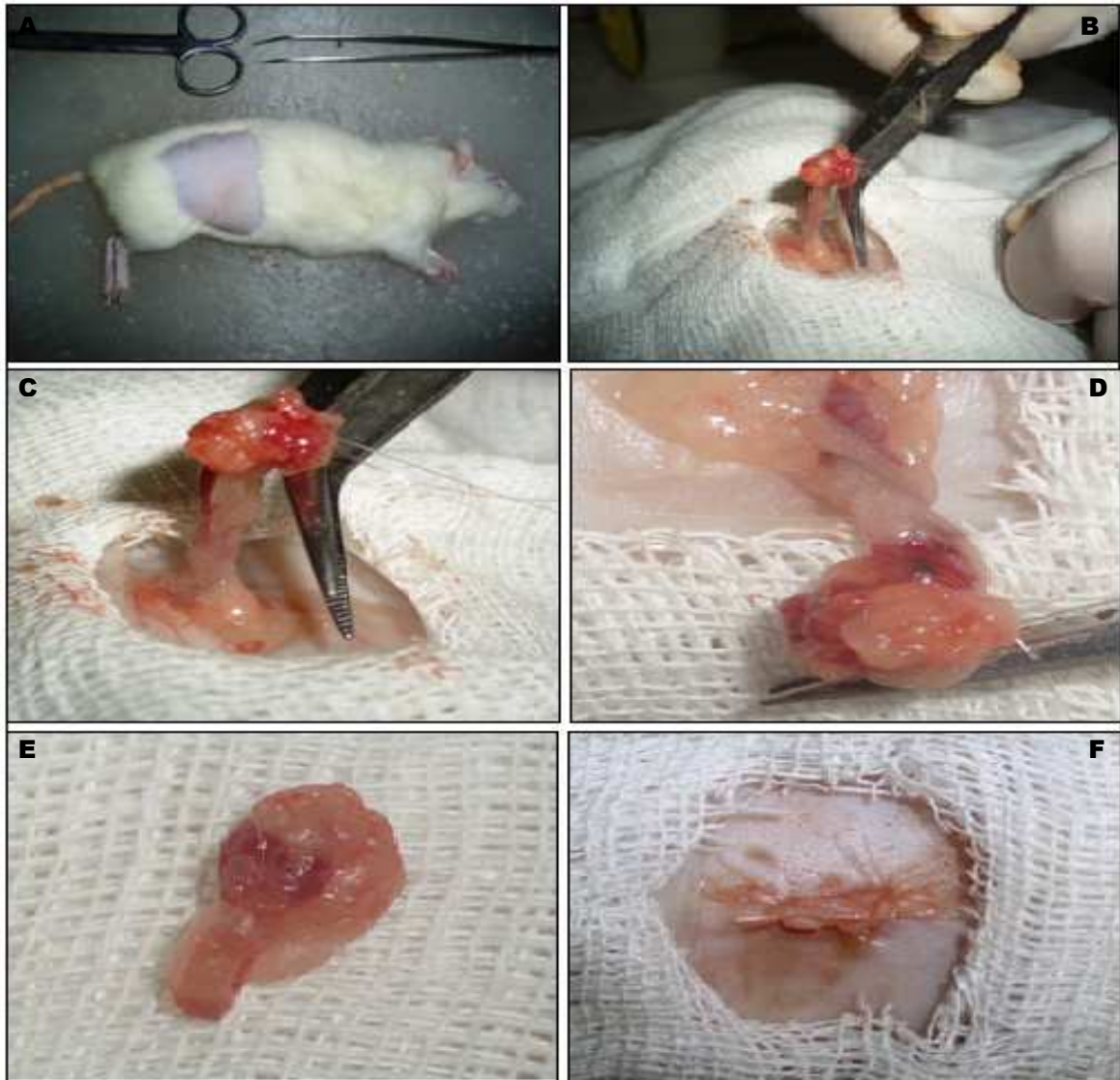


Figura 3. Fotomontagem representativa: A – Tricotomia da região abdominal lateral; B – Incisão longitudinal abaixo da ultima costela e exposição do ovário; C - Ovário identificado e exposto; D – Ligação da parte superior da tropa com fio de seda nº 4; E – Excisão ovariana juntamente com a gordura circundante; F – Sutura final.

4.4.2 Produção dos defeitos ósseos

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

Os animais foram anestesiados com mistura de Ketamina a 5% e Xilasina a 2%, na proporção 1:2, em doses de 0,10-0,15 ml/100g de peso corporal, por via intraperitoneal.

Após o procedimento anestésico, foi realizada a tricotomia da face lateral da coxa direita, em extensão suficiente para permitir a visualização da região a ser abordada. O animal foi, então, posicionado em decúbito ventral, prendendo-se as patas dianteiras e traseiras em abdução, e o local da incisão preparado com anti-sepsia (álcool-iodado).

Foi realizada uma incisão de acesso ao fêmur direito com um bisturi. Após a incisão da fáscia lata, foi localizada a diáfise femoral e na face crânio-lateral a $\pm$ 50mm da epífise proximal realizando um defeito ósseo impregando brocas diamantadas do tipo esférica nº 1016 (KG Sorensen) acopladas em um contra-ângulo odontológico (Kawo - Kawo do Brasil) acionado por motor de implante (Easy Implant – Easy Equipamentos) a 4.000 RPM sob irrigação constante com soro fisiológico perfurando a cortical do osso até atingir o canal medular (Figura 4).

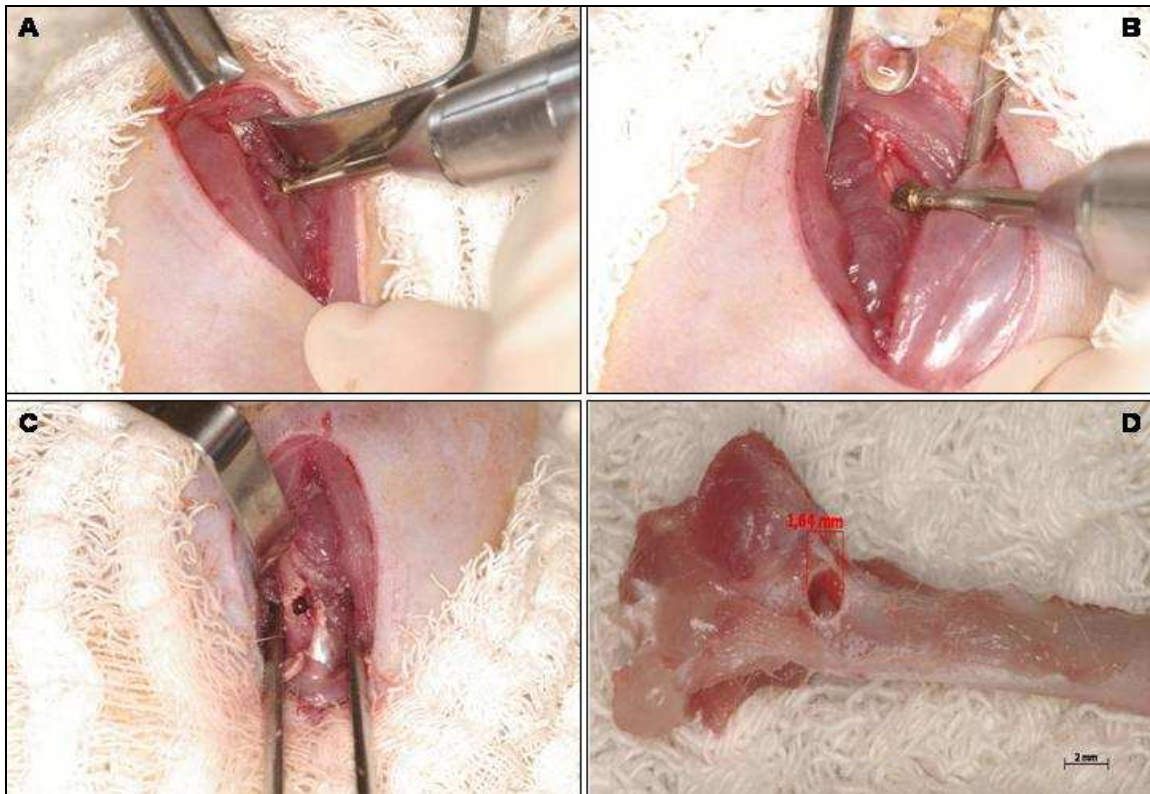


Figura 4. Fotomontagem representativa : A - incisão cirúrgica com exposição do osso do fêmur e início da confecção da falha óssea; B - confecção da falha óssea utilizando broca esférica nº 1016; C - perfuração da cortical do osso ate atingir o canal medular; D - fêmur dissecado, onde observa-se a falha óssea produzida.

4.5 Laser de Baixa Potência

Os grupos OV e OI no segundo dia de pós operatório (defeito ósseo) foi iniciado o tratamento com irradiação laser de baixa potência (Figura 7), 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 continua conforme os parâmetros abaixo. Figuras 5 e Figura 6.

Emissor visível	Laser vermelho
Densidade de energia (DE)	120J/cm ²
Potência	100 mW
Comprimento de onda	660nm
Modo de Aplicação	Pontual
Tempo	33 segundos por ponto
Grupo irradiado	OV

Figura 5 - Protocolo de irradiação com laser InGaAlP.

Emissor visível	Laser Infravermelho
Densidade de energia (DE)	120J/cm ²
Potência	100 mW
Comprimento de onda	808nm
Modo de Aplicação	Pontual
Tempo	33 segundos por ponto
Grupo irradiado	OI

Figura 6 - Protocolo de irradiação com laser AsGaAl.

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 tratados receberam irradiação transcutânea, uma aplicação por dia em oito pontos por aplicação destes: dois pontos do lado direito do defeito, dois pontos no lado esquerdo, um ponto na parte superior e inferior e dois pontos realizados sobre o defeito ósseo.



Figura 7- Photon Laser III equipamentos LTDA São Carlos – S.P., Brasil.

4.6 Procedimentos Histológicos

Os animais foram identificados, pesados e posteriormente submetidos a eutanásia com dose letal de 200mg/Kg de pentobarbital sódico, em seguida os fêmures testados foram retirados para análise histológica.

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 fora 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 seguindo requisitos utilizados por Leonel e colaboradores (2004) e Abo Elsaad e colaboradores (2008). Foi utilizado para esta análise um microscópio óptico de luz. Alguns parâmetros foram verificados para determinar os

efeitos osteogênicos da terapia laser de baixa potência em ratas osteoporóticas, estes se basearam: reação inflamatória, osteoblasto, osteócitos imaturos, fibroblasto e fibrose. Para quantificar as variáveis foi utilizado um sistema de Scores de intensidade zero a três cruzes no período de eutanásia dos animais (14 e 21) classificadas conforme Figura abaixo:

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

Figura 8 – Scores de intensidade (0 a 3 cruzes).

4.7 Análise Estatística dos Dados

Os dados foram inicialmente avaliados quanto à hipótese de normalidade de distribuição. A normalidade foi definida pela aplicação do teste de Shapiro Wilk. O nível de decisão estabelecido em $p < 0,05$. A avaliação comparou a magnitude das variações entre as amostras. O teste utilizado para comparação foi o teste de Kruskal Wallis com pós-teste t Student e o nível de significância estabelecido em $p < 0,05$. Os dados foram analisados estatisticamente no Software BioEstat 5.0.

Resultados

Os dados foram analisados estatisticamente no Software BioEstat 5.0. Foram comparados os dados referentes ao período de 14 e 21 dias para cada grupo e ainda comparados às variáveis estudadas entre os grupos controle e irradiados. Os dados foram inicialmente avaliados quanto à hipótese de normalidade de distribuição. A normalidade foi definida pela aplicação do teste de Shapiro Wilk. O nível de decisão estabelecido em $p < 0,05$. Para os dados avaliados constatou-se predominância de dados com distribuição não normal ($p < 0,05$).

A avaliação comparou a magnitude das variações entre as amostras. O teste utilizado para comparação foi o teste de Kruskal Wallis com pós-teste t Student e o nível de significância estabelecido em $p < 0,05$. Os valores foram dispostos em uma escala ordinal de 0 a 3 cruces conforme intensidade de presença para as variáveis analisadas.

Os dados apresentados na tabela 1 permitem observar que os grupos tratados com LBP apresentaram resultados que demonstram redução do processo inflamatório nos dois períodos (14 e 21 dias) quando analisados pelo teste Kruskal Wallis, obtendo-se na comparação inter grupos $p = 0,0017$ e $p = 0,0018$ ($p < 0,05$) respectivamente, em relação ao grupo controle.

Tabela 1 – Média dos Scores de intensidade (0 a 3 cruces) para a variável reação inflamatória dos grupos estudados nos períodos de 14 e 21 dias.

Reação inflamatória	Osteopenia e defeito ósseo (ODO)			Kruskal Wallis	Pós-teste t Student
	Controle	OI	OV	Valor p	$p < 0,05$
14 Dias	1.5	0.5	0.7	0,0017	Controle vs OI Controle vs OV
21 Dias	1.2	0.3	0.5	0,0018	Controle vs OI Controle vs OV
t Student	0,0039	0,0493	0,0073		

Ø Ausente ; (1) Pouca presença; (2) Moderada presença ; (3) Severa presença

As Figuras 9 e 10 representam a comparação dos resultados a partir das médias e desvio padrão dos escores obtidos pela análise semi-quantitativa do processo inflamatório aos 14 e 21 dias pelo teste t de Student, observa-se que não houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$), entre os grupos tratados com LBP, o que demonstra que ambos apresentaram efeito antiinflamatório.

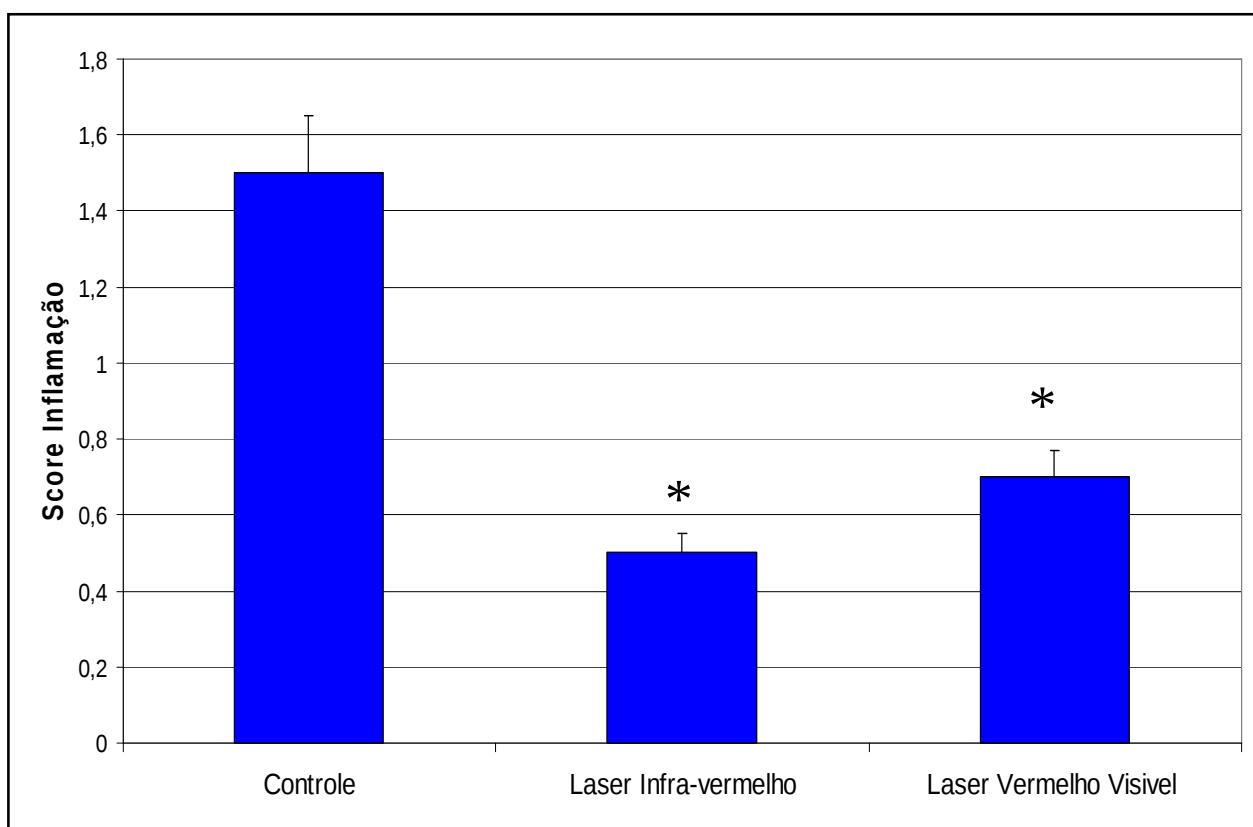


Figura 9. Gráfico comparativo das médias e desvio padrão dos escores obtidos pela análise semi-quantitativa do processo inflamatório aos 14 dias após a confecção dos defeitos ósseos. * $p < 0,05$ teste t de Student em comparação com o grupo controle.

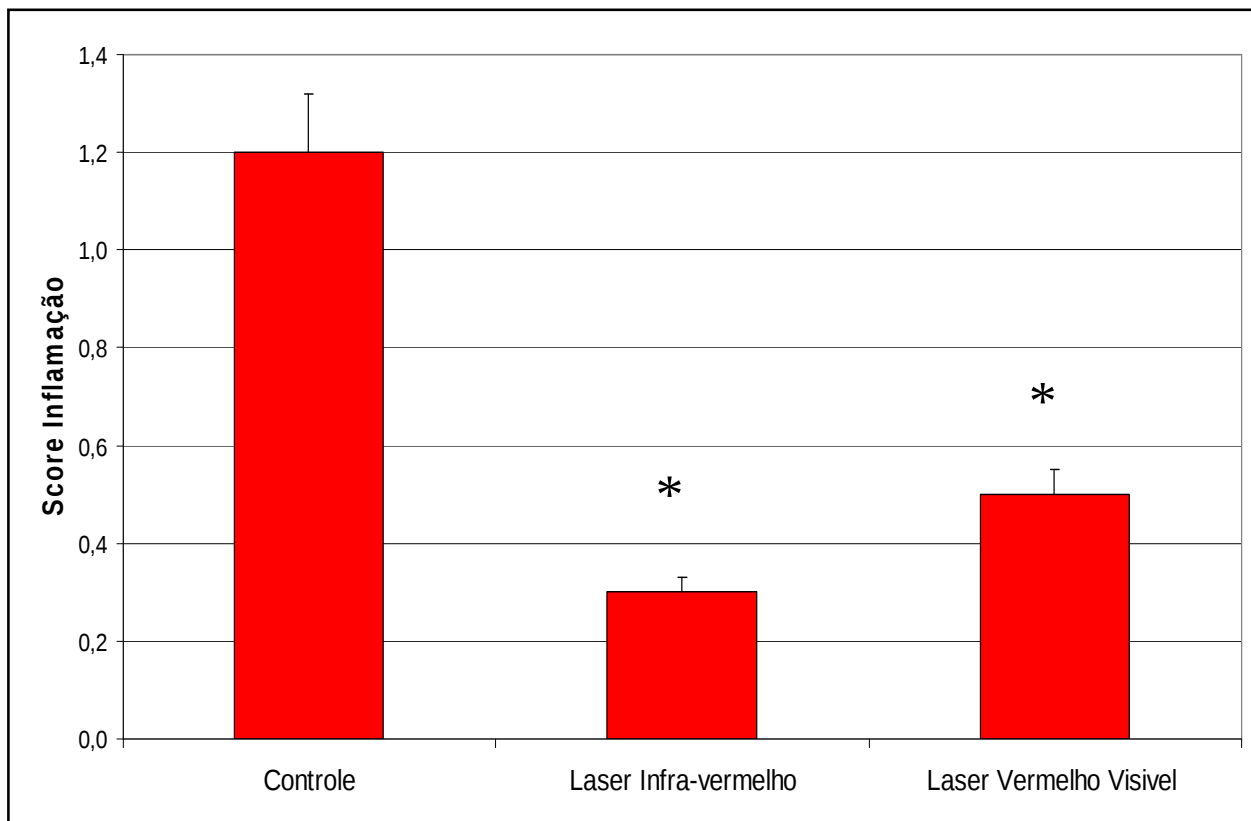


Figura 10. Gráfico comparativo das médias e desvio padrão dos escores obtidos pela análise semi-quantitativa do processo inflamatório aos 21 dias após a confecção dos defeitos ósseos. * $p < 0,05$ teste t de Student em comparação com o grupo controle.

Os dados apresentados na tabela 2 permitem observar que aos 14 dias ocorreu diferença estatística ($p = 0,0026$), com relação ao número de osteoblastos entre os grupos estudados, pelo teste Kruskal Wallis. Sendo que nas análises comparativas das médias e desvio padrão dos escores obtidos pela análise semi-quantitativa dos osteoblastos demonstram que no período de 14 dias (Figura 11) os grupos tratados com laser apresentaram maiores quantidades de osteoblastos, com relação estatística $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle, para o período 21 dias (Figura 12) nota-se uma pequena redução osteoblástica no grupo tratado com LVV em relação ao grupo controle, durante este período não foi observada relações estatística significativas entre os grupos analisados.

Tabela 2 – Média dos Scores de intensidade (0 a 3 cruces) para a variável osteoblastos dos grupos estudados nos períodos de 14 e 21 dias.

Osteoblastos	Osteopenia e defeito ósseo (ODO)			Kruskal Wallis	Pós-teste Student
	Controle	OI	OV	Valor p	p<0,05
14 Dias	2.0	3.0	2.7	0,0026	Controle vs OI Controle vs OV
21 Dias	2.0	2.0	1.7	0,1194	Ns
t Student	Ns	0,0039	0,0073		

Ø Ausente ; (1) Pouca presença; (2) Moderada presença ; (3) Severa presença

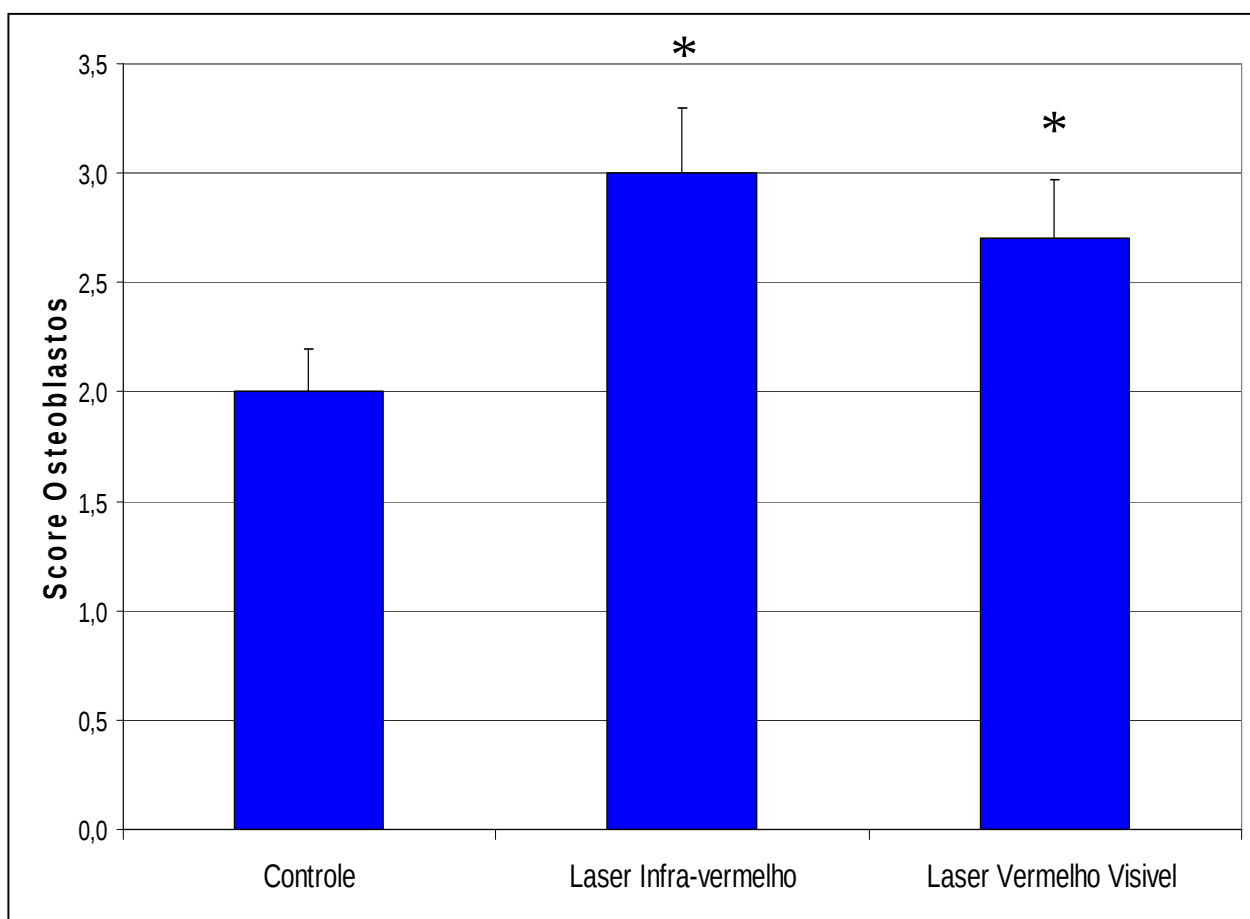


Figura 11. Gráfico comparativo das médias e desvio padrão dos escores obtidos pela análise semi-quantitativa dos osteoblastos aos 14 dias após a confecção dos defeitos ósseos. * $p < 0,05$ teste t de Student em comparação com o grupo controle.

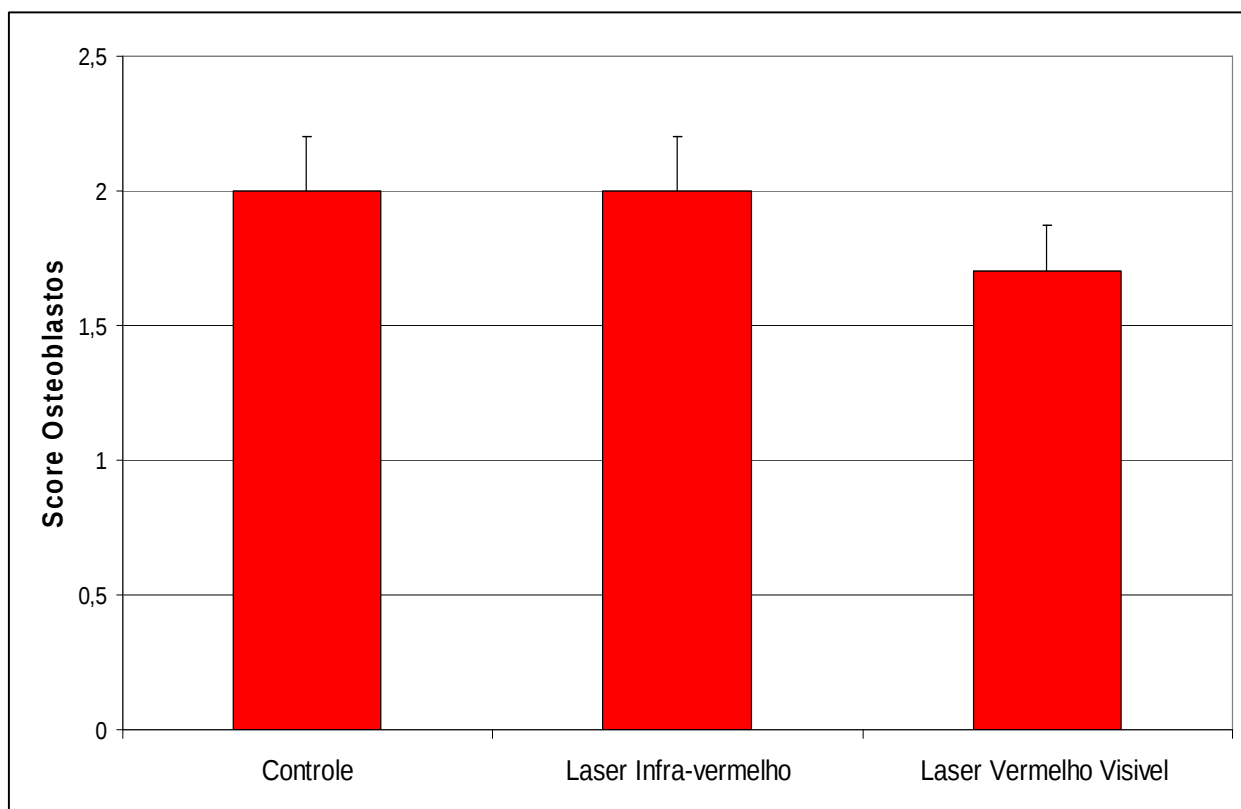


Figura 12. Gráfico comparativo das médias e desvio padrão dos escores obtidos pela análise semi-quantitativa dos osteoblastos aos 21 dias após a confecção dos defeitos ósseos.

A Tabela 3 apresenta Média dos Scores de intensidade para a variável osteócitos imaturos nos períodos de 14 e 21 dias, nota-se, que na análise estatística pelo teste Kruskal Wallis, que existe diferença ($p < 0,05$), entre os grupos estudados com $p = 0,0014$ e $p = 0,0334$ respectivamente. Já pelo teste t de Student ambos os grupos tratados com laser apresentam diferença em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Não foram observadas relações estatísticas significativas entre os grupos tratados.

Tabela 3 – Média dos Scores de intensidade (0 a 3 cruces) para a variável osteócitos imaturos dos grupos estudados nos períodos de 14 e 21 dias.

Osteócitos imaturos	Osteopenia e defeito ósseo			<i>Kruskal Wallis</i>	Pós-teste Student
	Controle	OI	OV	Valor p	p<0,05
14 Dias	1.0	2.7	2.7	0,0014	Controle vs OI Controle vs OV
21 Dias	1.0	1.7	1.7	0,0334	Controle vs OI Controle vs OV
t Student	ns	0,0073	0,0073		

Ø Ausente ; (1) Pouca presença; (2) Moderada presença ; (3) Severa presença

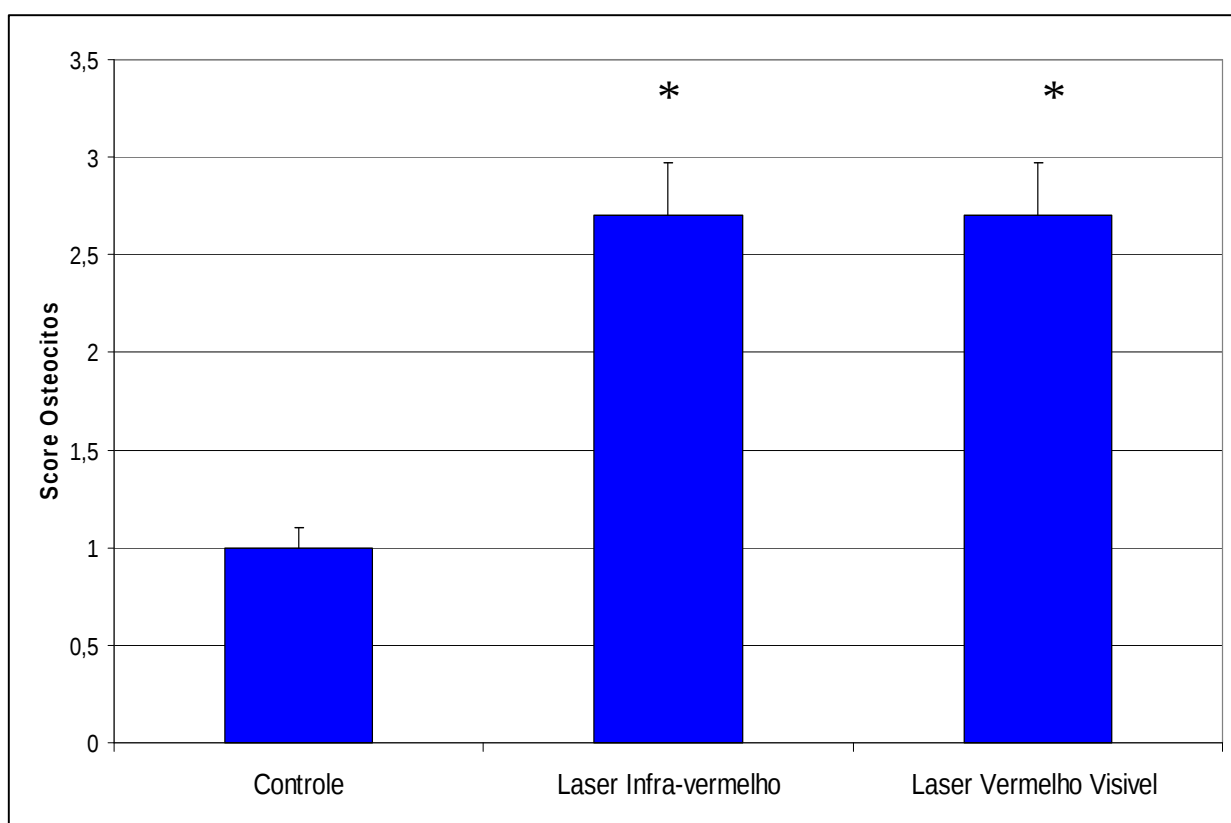


Figura 13. Gráfico comparativo das médias e desvio padrão dos escores obtidos pela análise semi-quantitativa dos osteócitos aos 14 dias após a confecção dos defeitos ósseos. * p< 0,05 teste t de Student em comparação com o grupo controle.

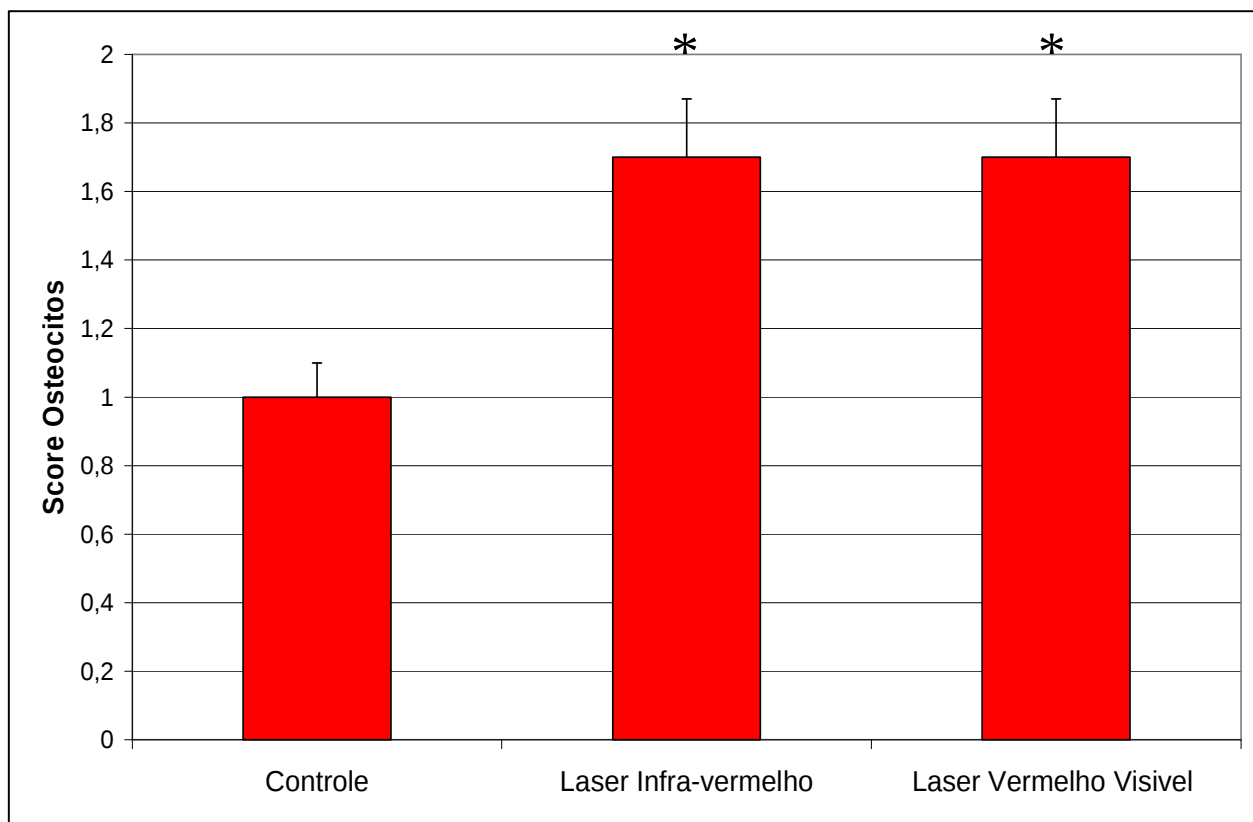


Figura 14. Gráfico comparativo das médias e desvio padrão dos escores obtidos pela análise semi-quantitativa dos osteócitos aos 21 dias após a confecção dos defeitos ósseos. * $p < 0,05$ teste t de Student em comparação com o grupo controle.

Na tabela 4 podemos observar a comparação entre as médias dos scores obtidos a partir da análise dos fibroblastos. A análise estatística entre os grupos aos 14 dias pelo teste Kruskal Wallis não apresentou relações estatísticas significativas ($p=0,0530$), No entanto aos 21 dias, análise estatística entre os grupos estudados apresentou ($p= 0,0027$), No teste t de Student apenas o grupo tratado com laser Vermelho (660nm) apresentou diferença estatisticamente significativa com ($p<0,05$) quando comparado ao grupo controle. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos tratados (660nm e 808nm) e nem entre os períodos analisados.

Tabela 4 – Média dos Scores de intensidade (0 a 3 cruces) para a variável fibroblastos dos grupos estudados nos períodos de 14 e 21 dias.

Fibroblastos	Osteopenia e defeito ósseo			Kruskal Wallis	Pós teste Student
	Controle	OI	OV	Valor p	p<0,05
14 Dias	0.0	1.0	2.0	0,0530	Ns
21 Dias	0.0	0.7	2.3	0,0027	Controle vs OV
t Student	ns	Ns	ns		

Ø Ausente ; (1) Pouca presença; (2) Moderada presença ; (3) Severa presença

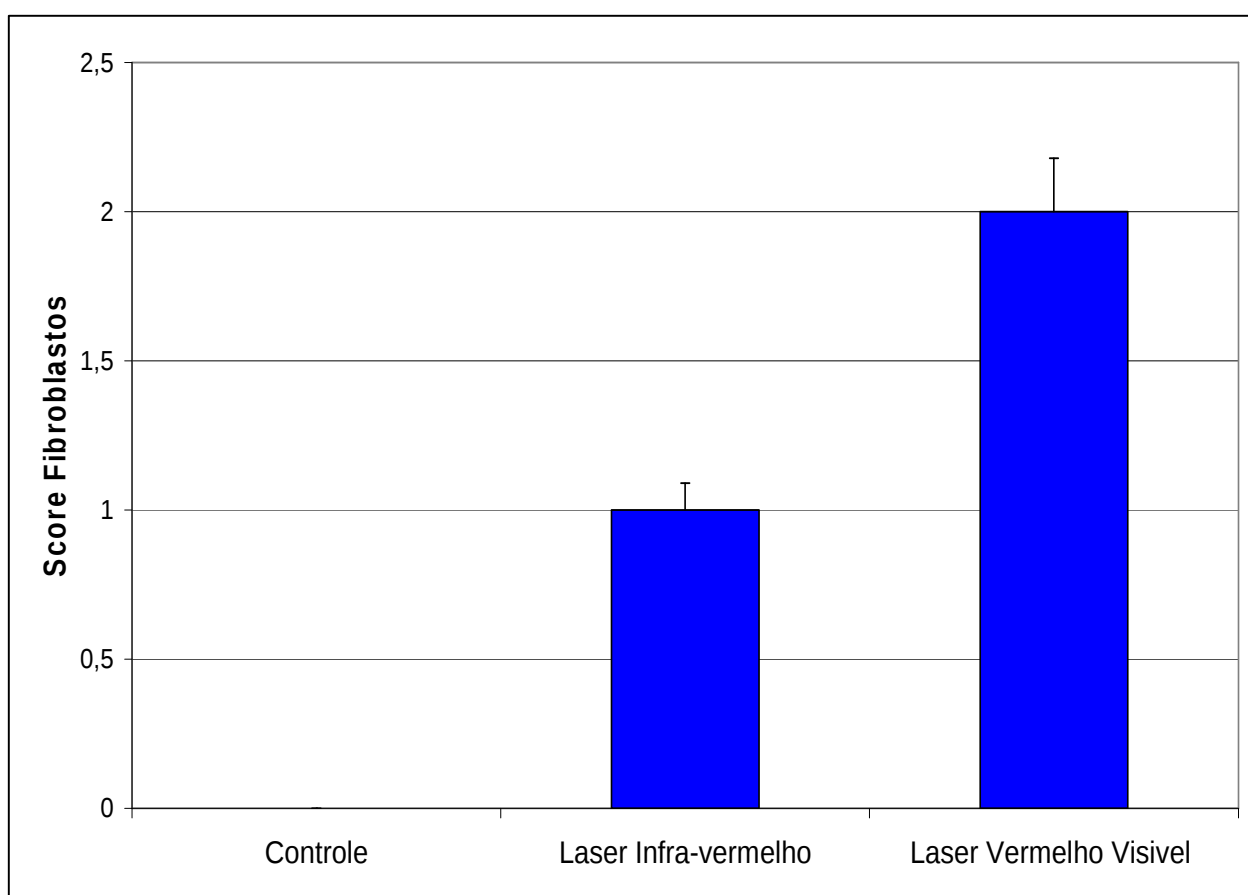


Figura 15. Gráfico comparativo das médias e desvio padrão dos escores obtidos pela análise semi-quantitativa dos fibroblastos aos 14 dias após a confecção dos defeitos ósseos.

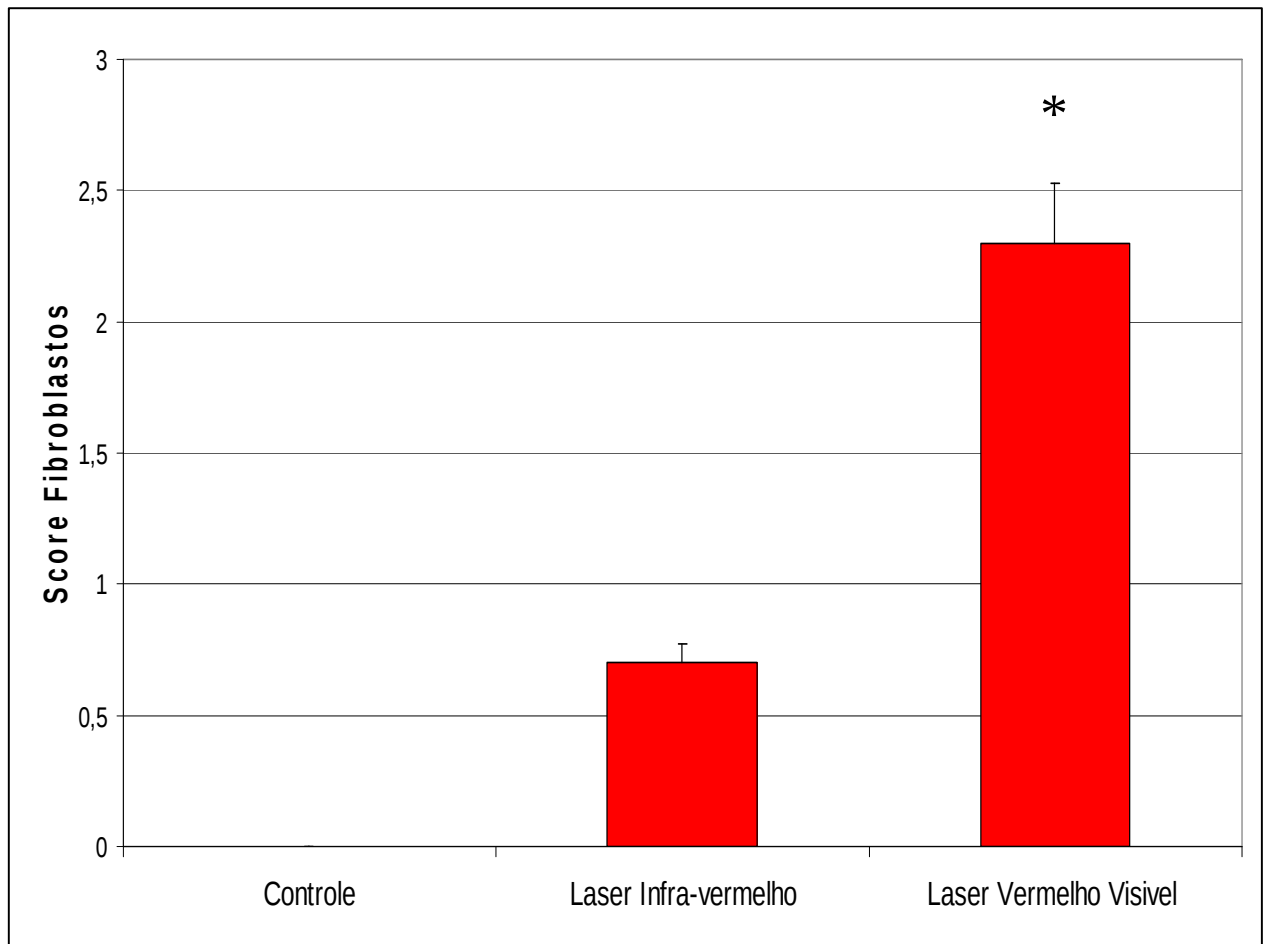


Figura 16. Gráfico comparativo das médias e desvio padrão dos escores obtidos pela análise semi-quantitativa dos fibroblastos aos 21 dias após a confecção dos defeitos ósseos. * $p < 0,05$ teste t de Student em comparação com o grupo controle.

Na Tabela 5 pode-se observar a comparação entre as médias dos scores obtidos a partir da análise semi-quantitativa para a variável fibrose não encontraram relações estatísticas significativas entre os grupos analisados somente entre os períodos 14 ($p=0,5314$) e 21 dias($p=0,3040$).

Tabela 5 – Média dos Scores de intensidade (0 a 3 cruces) para a variável fibrose dos grupos estudados nos períodos de 14 e 21 dias.

Fibrose	Osteopenia e defeito ósseo			Kruskal Wallis	Pós teste Student
	Controle	OI	OV	Valor p	p<0,05
14 Dias	0.0	0.7	0.0	0,5314	ns
21 Dias	1.0	0.7	0.7	0,3040	ns
t Student	0,0039	ns	0,0250		

Ø Ausente ; (1) Pouca presença; (2) Moderada presença ; (3) Severa presença

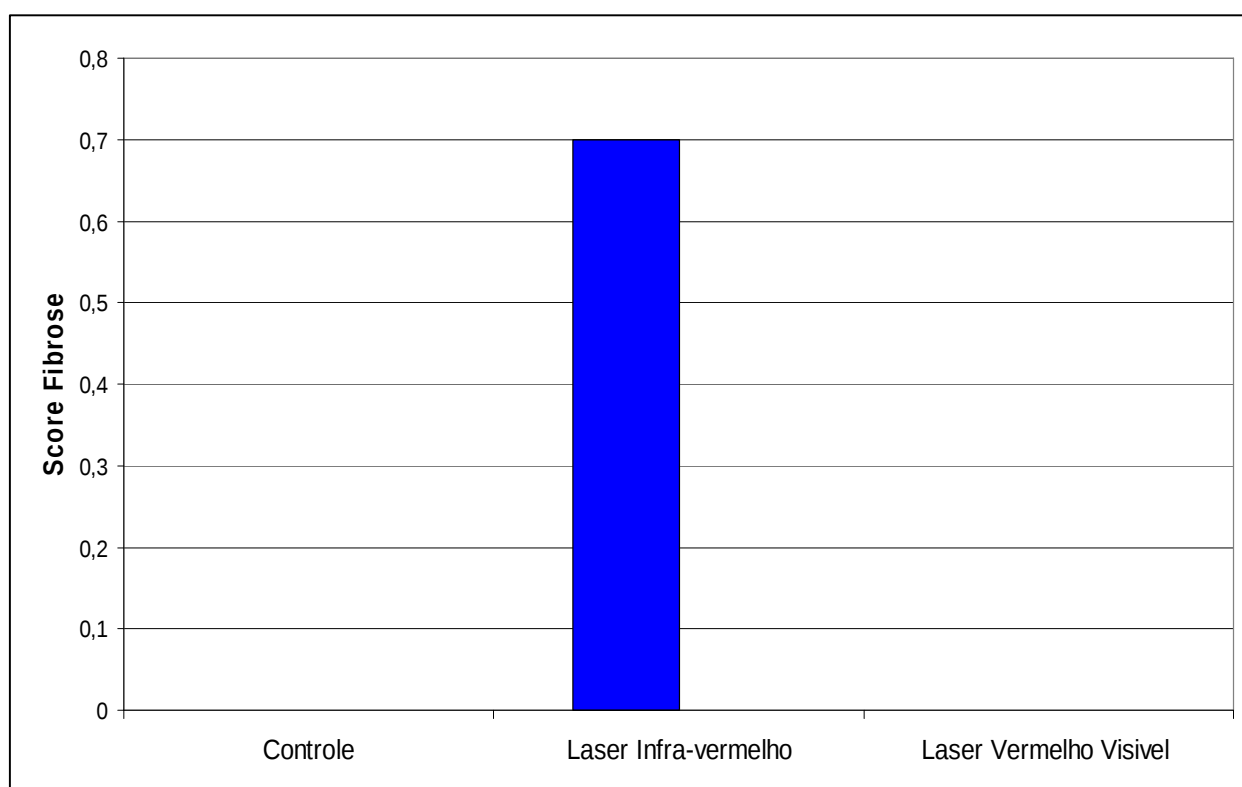


Figura 17. Gráfico comparativo das médias e desvio padrão dos escores obtidos pela análise semi-quantitativa da fibrose aos 14 dias após a confecção dos defeitos ósseos.

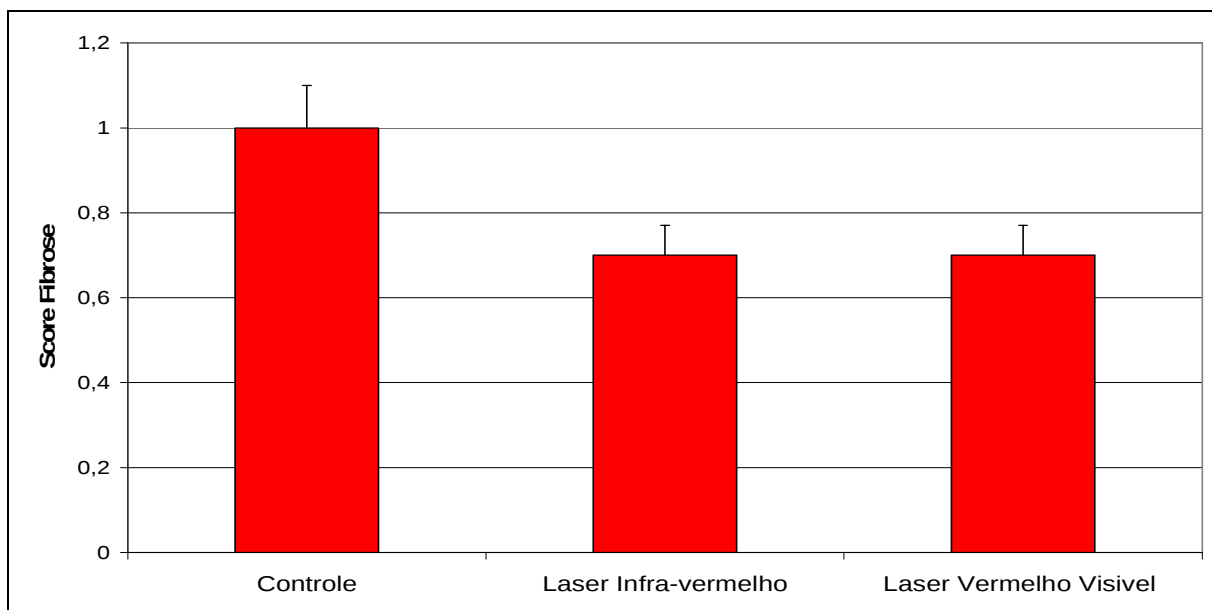


Figura 18. Gráfico comparativo das médias e desvio padrão dos escores obtidos pela análise semi-quantitativa da fibrose aos 21 dias após a confecção dos defeitos ósseos.

Nos cortes histológicos obtidos a partir dos fêmures das ratas ovariectomizadas dos grupos tratados com laser corados por Hematoxilina e Eosina, observa-se um preenchimento destes defeitos por osso trabecular, nota-se grande quantidade de osteócitos e osteoblastos mais alinhados, formação de canais de *Hanvers* caracterizando osso lamelar, discreta reação inflamatória e grande quantidade de vasos sanguíneos neoformados. No grupo controle também ocorreu preenchimento do defeito ósseo, observar presença de osteoblastos depositando matriz óssea, osteócitos e condroblastos, porém em menores quantidades. Figura 19.

Observa-se nos grupos tratados com LBP grande quantidades de osteócitos aprisionados nas lacunas dentro de trabéculas ósseas no interior da matriz sugere a maturação do tecido ósseo neoformado, presença de canais de Hanvers e osso secundário, nota-se discreta quantidade de tecido conjuntivo fibroso rodeado por células osteoprogenitoras. No grupo controle nota-se a presença de osteoblastos formando osso primário, osteócitos, osso secundário, vasos sanguíneos neoformados e tecido conjuntivo fibroso com aspecto mais denso e envolto por poucos grupos celulares. Observa-se nos grupos tratados formação óssea com aspecto mais consistente, compacto e com maior quantidade de células responsáveis pela osteogênese. Figura 20.

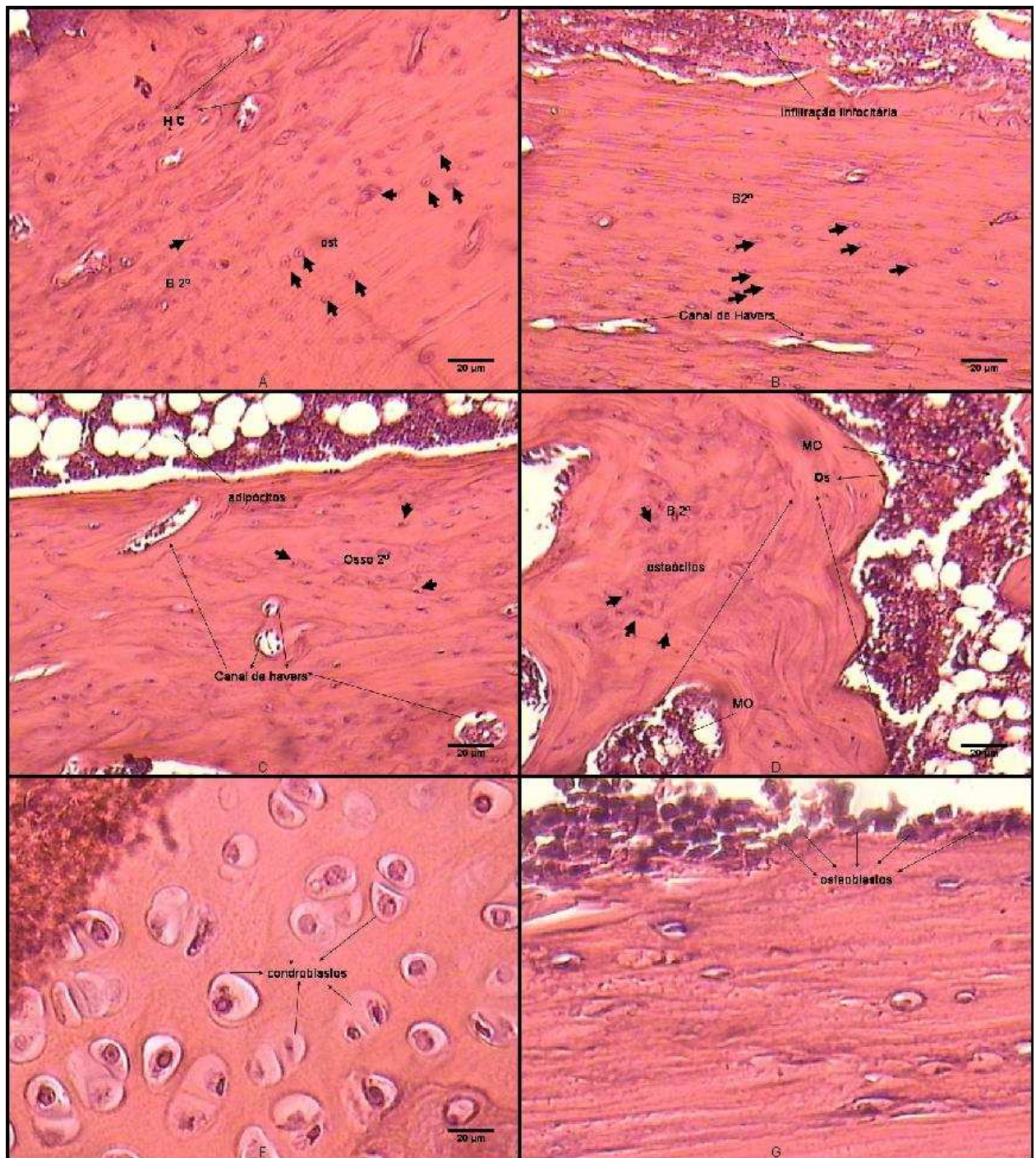


Figura 19. Montagem de fotomicrografia das lâminas obtidas dos animais ovariectomizados após 14 dias da realização dos defeitos ósseos: A e B - grupo tratado com laser AsGaAl 808 nm infravermelho observar a presença de canais de Havers (HC), osso secundário (B2°), infiltração leucocitária, intensa proliferação de osteócitos(seta). C e D – grupo tratado com laser InGaAlP 660nm vermelho visível, observar a presença de canais de Havers(HC), proliferação de adipócitos, formação de medula óssea (MO), osteócitos (seta), presença de osso secundário(B 2°). F e G – grupo controle, observar a presença de osteoblastos (seta), e condroblastos. Hematoxilina e Eosina - Barra de escala 20µm.

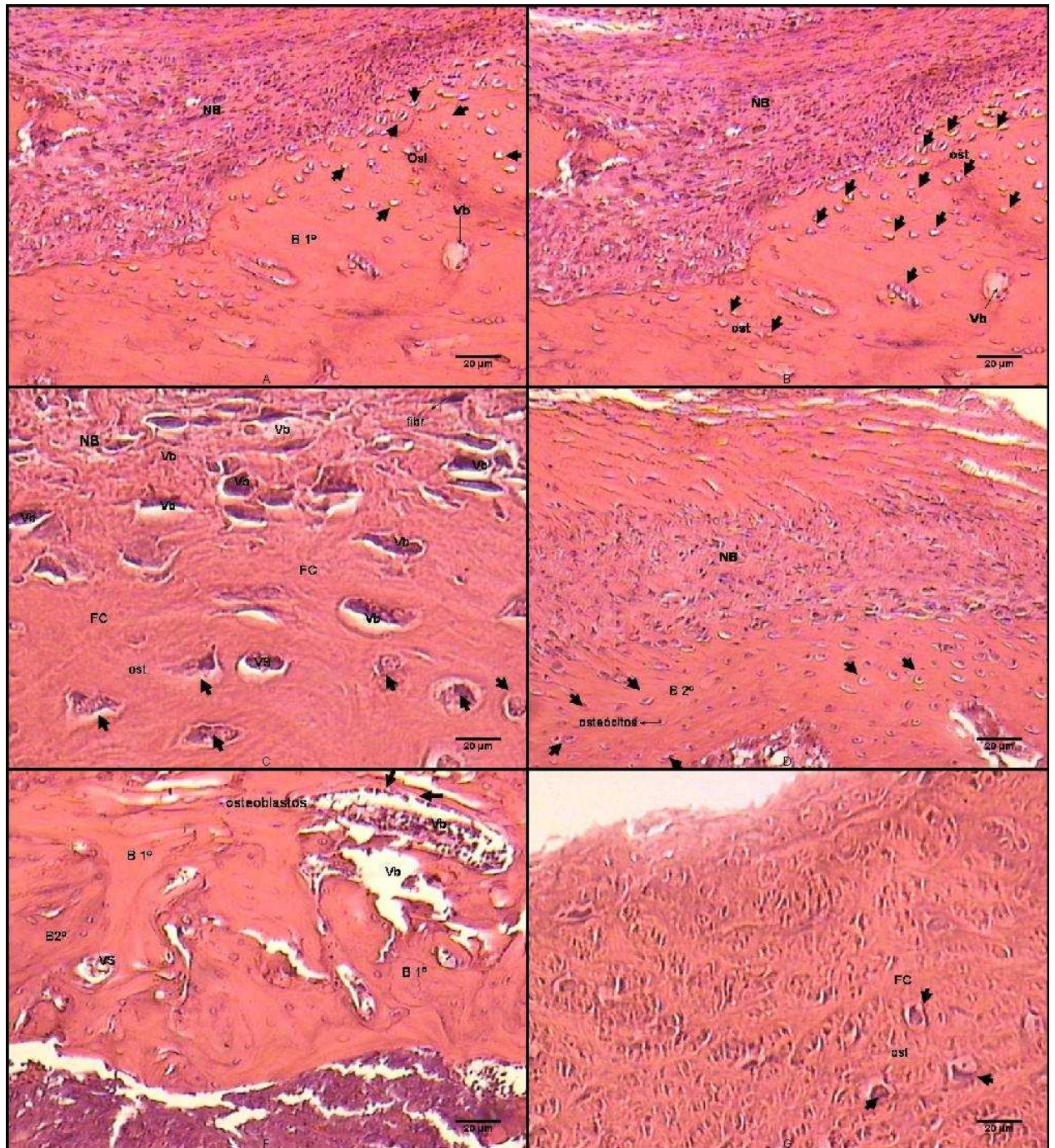


Figura 20. Montagem de fotomicrografia das lâminas obtidas dos animais ovariectomizados após 21 dias da realização dos defeitos ósseos: A e B - grupo tratado com laser AsGaAl 808 nm infravermelho observar a presença de osso neoformado (NB), osso primário(B1°), Vasos sanguíneos(Vb)e osteócitos(seta). C e D – grupo tratado com laser InGaAlP 660nm vermelho visível, observar a presença de neoformação óssea (NB), proliferação de vasos sanguíneos (Vb), tecido conjuntivo fibroso(FC) osteócitos (seta), presença de osso secundário(B 2°). E e F – grupo controle, observar a presença de osteoblastos (seta), vasos sanguíneos neoformado (Vb), osso primário(B°) e secundário(B 2°) em G osteócitos (setas). Hematoxilina e Eosina - Barra de escala 20µm.

Discussão

O processo de osteogênese é uma resposta especializada do organismo no qual é amparado por diferentes tipos celulares, dependentes de um equilíbrio fisiológico para que possam formar uma nova estrutura com mesma constituição e função. Qualquer desequilíbrio nesta fase será responsável principalmente pela alteração da resistência óssea, fato este que ocorre em diversas condições patológicas como a osteoporose, que têm sido objeto de diversas investigações (WARD, 1995; LORRAIN *et al.*, 2003; CHANG *et al.*, 2004; HAACH, 2006; RIERA-ESPINOZA, 2009; SIRIS *et al.*, 2009; KOLIOS *et al.*, 2009).

Alguns estudos têm sido realizados com o objetivo de encontrar um “padrão gold” de tratamento para a osteoporose e para a reparação de fratura osteoporótica, principal complicação desta patologia (GULLBERG *et al.*, 1997; OLIVEIRA, 2003; LORRAIN *et al.*, 2003; CARVALHO & CLIQUET, 2003; LIPS; VAN SCHHOOR, 2005; GARDNER *et al.*, 2005; OTT, 2004; HAACH, 2006; SHA *et al.*, 2009; DINIZ *et al.*, 2009; COOPER *et al.*, 2009). Em se tratando de uma doença que a cada dia atinge maior prevalência e visando a qualidade de vida relacionada à saúde de indivíduos com osteoporose, a terapia laser de baixa potência tem se mostrado uma importante ferramenta de auxílio à regeneração óssea, pois seus efeitos facilitariam este processo (OZAWA *et al.*, 1998; COOMBE *et al.*, 2001; PINHEIRO *et al.*, 2001; CARVALHO *et al.*, 2002; SILVA JÚNIOR *et al.*, 2002; NASCIMENTO, 2003; VINCK *et al.*, 2003; NICOLAU *et al.*, 2003; LIRANI, 2004; LANDA, 2005; SILVA, 2006; 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). Entretanto, o estado funcional dos diferentes tipos de tecido do organismo e os diferentes protocolos de terapia laser utilizados, dificultam o estabelecimento de parâmetros de tratamento ideais. Sendo assim, a busca de um protocolo ideal de terapia LBP que facilite a deposição óssea se torna cada vez mais importante. Diante do exposto este estudo teve como objetivo avaliar o efeito osteogênico do Laser de baixa potencia InGaAlP e

AsGaAl (660nm e 808nm) sobre defeito ósseo produzido no fêmur de ratas submetidos a ovariectomia (OVX).

No presente estudo foram utilizadas ratas da linhagem Wistar, submetidos à ovariectomia bilateral. A retirada de ambos os ovários acarreta em diminuição dos níveis de estrógeno induzindo a osteoporose. Este método é vastamente utilizado por ser eficaz e de fácil realização (KALU, 1991; ARIAS; SZEJNFELD, 1997; BOHIC, 2000; SERAKIDES, 2001; NICOLAU, 2001; COLOMBO *et al.*, 2003; DUARTE, 2004; PYTLIK *et al.*, 2004; MELLO; GOMIDE, 2005; RENNO, 2006; CANETTIERI, 2006; AMADEI *et al.*, 2006; DINIZ *et al.*, 2009).

Optamos por utilizar um grupo controle osteoporótico, de forma que os animais de todos os grupos estariam num mesmo estado biológico, evitando desta forma utilizar como controle a área contralateral, o que poderia levar a resultados ineficazes de terapia LBP, justificado pelo provável efeito sistêmico gerado pela terapia (DAVID *et al.* 1996; RIGAU, 1996; NICOLAU, 2001).

Os avanços da imagem digital têm constituído uma alternativa às radiografias convencionais e oferecido opções na detecção de perdas ósseas. 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). Utilizando-se o software Digora neste trabalho pode-se observar que a ovariectomia (OVX) bilateral demonstrou-se eficaz, induzindo a diminuição da densidade óssea uma vez que os exames radiológicos realizados noventa dias após a OVX apresentaram parâmetros (densidade) significativamente menores ($p < 0,001$) quando comparados aos exames radiológicos realizados antes da cirurgia.

Para a verificação do efeito osteogênico da terapia laser de baixa potência foram confeccionados defeitos ósseos de 2,00mm na diáfise proximal do fêmur. O defeito ósseo só foi realizado após a comprovação de osteoporose. Estudos recentes mostram que a diáfise proximal do fêmur se trata de osso metabolicamente mais ativo e assim mais susceptível a ação de estímulos mecânicos e fisiológicos, sendo uma das regiões de maior incidência de alterações causadas pela osteoporose em humanos (BRAZ *et*

al., 2003; PEREIRA, 2004; FERNANDES, 2005; JAIME *et al.*, 2005; CANETTIERI, 2006; DINIZ *et al.*, 2009).

Observou-se um ganho de massa corporal nos animais após serem submetidos à ovariectomia. Alguns autores sugerem que o aumento da massa corporal após a OVX em ratas é um mecanismo de compensação da perda óssea (HIETALA, 1993; PAZ *et al.*, 2001; DINIZ, 2006; CANETTIERI, 2006). Ratas ovariectomizadas têm uma deposição excessiva de gordura corporal e um aumento da formação periosteal, contribuindo para o aumento da massa corporal (RENNO, 2006). Junqueira e colaboradores (2005) e Canettieri (2006) relataram que um dos indícios para comprovação do sucesso da ovariectomia é o aumento da massa corporal, o ganho de peso.

Para avaliar o processo de osteogênese em osso osteoporótico optamos em utilizar dois tipos de laser, um no espectro do vermelho com comprimento de onda 660nm, densidade de 120J/cm² e potência de 100mW, e outro no infravermelho com comprimento de onda 808nm, densidade de 120J/cm² e potência de 100mW. Este protocolo foi adotado baseado no fato que nos últimos anos foram os lasers mais utilizados em pesquisas científicas. No entanto ainda há controvérsia, pois, resultados neutros são obtidos na terapia LBP em regeneração de fraturas (ANNEROTH *et al.*, 1988; FREITAS, 2001; GIORDANO *et al.*, 2001).

Neste estudo 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. Esta técnica teve como objetivo aumentar a absorção da energia depositada, pois diminui o efeito de reflexão. Foram realizados oito pontos de aplicação, escolha esta baseada no estudo de Nascimento (2003).

Para a determinação da eficácia da terapia LBP na neoformação óssea de ratas osteoporóticas 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. Estes basearam-se, na presença de células características do processo inflamatório, osteoblastos, osteócitos, fibroblastos e tecido fibroso no local do defeito ósseo durante os períodos observados 14 e 21 dias. Este

protocolo foi baseado nos estudos de Leonel e colaboradores (2004) e Abo Elsaad e colaboradores (2008).

A análise histológica mostrou que os animais tratados com laser Infravermelho (808nm) e vermelho (660nm) apresentaram melhores resultados em relação ao grupo controle nos dois períodos analisados 14 e 21 dias. Na região dos defeitos ósseos dos grupos irradiados foram encontrados valores superiores de osteoblastos, osteócitos imaturos e vasos sanguíneos neoformados, presença de fibroblastos volumosos e poucas células características de processo inflamatório. AboElsaad e colaboradores (2008) encontraram resultados similares utilizando laser infravermelho (830nm) com potência 40 mW, densidade 16 J/ cm² e dose 4J/ cm² em defeito ósseo de ratos.

Os resultados histológicos deste estudo sugerem que o reparo pós lesão em ossos osteoporóticos tratados com laser de baixa potência apresentaram aceleração no processo de osteogênese no período 14 dias. No período subsequente, 21 dias, houve uma pequena queda na quantidade de osteoblastos, porém a quantidade de osteócitos se manteve elevada, o que pode significar um efeito estimulatório sobre a mineralização da matriz osteóide, caracterizando maior quantidade de osso neoformado. Os osteócitos estariam acumulando carbonatos e fosfatos de cálcio a se integrarem, acelerando o processo de formação da matriz óssea e tornando-a mais resistente.

Lill e colaboradores (2003) avaliaram o defeito ósseo em animais ovariectomizados e relataram que além da diminuição da densidade óssea, a osteoporose afeta o ganho de massa mineral óssea pós fratura atuando na fase final do remodelamento, alterando a resistência óssea. Mesmo nestas condições as fraturas podem consolidar-se, porém o processo pode levar mais tempo. Além da fase de mineralização final do calo ósseo, a osteoporose dificulta ainda o período inicial do processo de remodelamento de uma fratura.

Pinheiro e colaboradores (2001) mostraram que o tratamento de lesão no tecido ósseo utilizando laser no infravermelho (830nm) produz melhores resultados comparado ao laser visível (632,8 ou 790nm). Segundo o autor o laser infravermelho apresenta um efeito fotofísico, que faz com que ocorram mudanças nos potenciais de membrana que se traduzem intracelularmente com um incremento da síntese de ATP mitocondrial alterando o metabolismo celular. No laser visível o efeito bioestimulatório

fotoquímico estimula a ativação da síntese de enzimas atuando sobre os lisossomos e as mitocôndrias das células por uma reação química provocada pela luz laser.

Os resultados obtidos por Renno (2006) indicaram que a terapia LBP (830nm) com doses de 120J/cm² e 60J/cm² teve efeito estimulatório nos fêmures sendo capaz de modular o processo de perda óssea de ratas osteopênicas, porém na dose 120J/cm² obtiveram melhores resultados, no que diz respeito ao teste mecânico de três pontos e mensuração do comprimento do fêmur.

No presente estudo a dose escolhida 120J/cm² mostrou-se eficaz em ambas as terapias. Outros estudos encontraram resultados similares sugerindo um provável efeito dose dependente, onde doses maiores seriam mais eficazes na estimulação óssea (DICKISON *et al.*, 1998; TAMURA, 1998; LUGER, 1998; DORTBUDAK, 2000; PINHEIRO *et al.*, 2003; RENNO, 2006; DINIZ *et al.*, 2009).

Estudos mostram que certos comprimentos de onda de terapia LBP induzem a proliferação celular liberando o fator de crescimento dos fibroblastos (GROSSMAN *et al.*, 1998, GROSSMAN *et al.*, 2000) e aumento na proliferação de fibroblastos *in vitro* (CONLAN *et al.*, 1996; JANSEN *et al.*, 2001; CARNEVALLI, 2001). Lubart e colaboradores (1993) observaram o efeito de vários comprimentos de onda na proliferação de fibroblastos, observando que a terapia LBP acelerou significativamente a mitose dessas células, com conseqüente aumento da velocidade de produção do colágeno e fibroblastos. Os dados histológicos obtidos no presente estudo com grupos irradiados com LBP (OIV e OVV) mostraram que a terapia estimulou a proliferação de fibroblastos nos períodos de 14 e 21 dias. Entretanto com comprimento de onda de 660nm no período de 21 dias obteve melhores resultados ($p = 0,0027$), assim os efeitos da irradiação laser vermelho visível (660nm) mostrou maior eficácia na estimulação de fibroblastos (21 dias) provavelmente por um efeito proliferativo ou ativador da síntese protéica.

A reação inflamatória observada através da análise histológica aponta que ambas as terapias (808nm e 660nm) foram eficazes para diminuir o processo inflamatório quando comparadas ao grupo controle (OC), em ambos os períodos analisados 14 e 21 dias. Tal fato sugere que a irradiação laser aumentou a absorção de exudato inflamatório provavelmente através da ativação linfática e

neovascularização ocorrida, suprimindo o tecido ósseo por melhorar o influxo de nutrientes como o cálcio e o fósforo, o que pode levar maior resistência ao osso. Desta forma, o laser atuou como antiinflamatório facilitando o processo proliferativo. Este resultado se assemelha com os encontrados por Genovese (2000), que observou que a terapia LBP apresenta na resposta inflamatória um efeito indireto sobre a microcirculação podendo estimular a neoformação capilar e multiplicação celular.

Coombe e colaboradores (2001) obtiveram um aumento no cálcio intracelular em células osteoplásticas humanas tratadas com terapia laser de baixa intensidade, indicando que estas células respondem positivamente a terapia.

Nossos achados histológicos referentes ao período de 14 dias constataram fibrose apenas no grupo tratado com comprimento de onda 808nm, enquanto para período de 21 dias todos os grupos apresentaram fibrose. No entanto é importante ressaltar que o tecido conjuntivo denso encontrado nos grupos irradiados possui em sua composição tanto fibras colágenas como uma grande população celular que posteriormente poderão se diferenciar em células osteoprogenitoras. Estes resultados não apresentaram relações estatisticamente significativas entre os grupos.

Utilizando um protocolo similar ao presente estudo, Renno (2006) observou que o laser 830nm dose $120\text{J}/\text{cm}^2$ foi eficaz para estimular a proliferação celular e a atividade da fosfatase alcalina nas células osteoblásticas, mas esse efeito só foi observado na dose de $10\text{ J}/\text{cm}^2$. Em contraste, o laser 780nm teve um efeito inibitório na proliferação celular osteoblástica nas doses de 1,5 e $10\text{ J}/\text{cm}^2$.

Na presente pesquisa, quantidades elevadas de osteoblastos encontradas nos grupos irradiados com LBP, podem ser justificadas, através da indução laser a proliferação celular bioestimulando células multipotentes a se diferenciarem em osteoblastos, produtores de matriz óssea. Estes resultados se assemelham aos encontrados em outros estudos (OZAWA *et al.*, 1998; COOMBE *et al.*, 2001; NASCIMENTO, 2003).

Nicolau e colaboradores (2003) utilizaram terapia laser de baixa potência (660nm e $10\text{ J}/\text{cm}^2$) no reparo de defeito ósseo no fêmur de ratos irradiados com 2, 4, 6 e 8 dias e sacrificados nos períodos de 5, 15 e 25 dias. Após análise histomorfométrica os autores concluíram que o laser estimulou a proliferação celular em todos os períodos,

induziu o aparecimento de células osteoblásticas e osteoclásticas, no entanto não alterou significativamente a micro arquitetura óssea.

Ozawa e colaboradores (1998) demonstraram um efeito positivo do LBP na proliferação celular em cultura de osteoblastos utilizando laser AsGaAl (830nm), com densidade de energia de $3,82 \text{ J/cm}^2$ e potência de 500mW. Segundo os autores, a terapia estimulou a proliferação e diferenciação osteoblástica e incremento na formação óssea. Ainda em cultura de células de osteoblastos (derivada de células mesênquimais) Dortbudak e colaboradores (2000) utilizando irradiação laser durante 3, 5 e 7 dias com laser GaAlAs (690nm), por 60 segundos, observaram que a irradiação gerou efeitos bioestimulatórios com diferenças significativas.

De acordo com Lirani (2004), a análise histomorfométrica mostrou que o tecido ósseo tratado com TLB (AsGaAl, 780nm, $112,5 \text{ J/cm}^2$, 30mW) por 12 dias apresentou maior número e superfície de osteoblastos e osteóide, indicando predomínio de fase de formação óssea.

Criar formas de auxiliar a deposição óssea e minimizar as perdas é importante em se tratando da osteoporose que é um processo praticamente inevitável do envelhecimento. Os custos financeiros decorrentes das fraturas osteoporóticas têm sido elevados para o país, assim como os custos sociais. Urge a busca de soluções em caráter definitivo para este grave problema, que, embora não tenha solução imediata, pode ser combatido em várias frentes e cujos resultados far-se-ão sentir a médio e longo prazo. Os estudos até o presente momento são animadores, pois, resultados positivos têm sido obtidos no que tange a relação custo benefício, principalmente no caso de uma região com dificuldades de consolidação.

No que se refere à terapia laser de baixa potência é fundamental que se conheça bem os princípios básicos envolvidos além das técnicas de aplicação e da patologia a ser tratada, pois, os efeitos e o mecanismo de ação do laser são muito complexos e pesquisas nesta área são ainda necessárias. A falta de informação e padronização dos procedimentos dificulta o entendimento e a comparação dos resultados entre os trabalhos realizados na área. Entretanto, não há dúvida que o LBP facilita o processo natural de remodelamento do organismo.

Baseado nos resultados encontrados neste estudo e nas demais literaturas analisadas notou-se a falta de dados que comparem à TLB na proliferação celular, produção de osso neoformado e força mecânica óssea em animais osteoporóticos, utilizando de métodos quantitativos em diferentes períodos, além de um estudo que busque formas de padronizar a utilização de LBP em pesquisas científica.

Sabe-se que a osteoporose é responsável por diversas alterações negativas sobre a estrutura e o remodelamento ósseo. Mesmo nestas condições, os resultados encontrados sugerem que a irradiação laser de baixa potência atuou na fase de reparo ósseo, acelerando o processo inflamatório o que reduziu seu tempo, estimulou ainda a proliferação de células responsáveis pela formação da matriz óssea, proporcionando um calo ósseo mais resistente, nestas condições a terapia laser induziu a biomodulação celular.

Conclusão

Conclui-se no modelo experimental estudado, que as Terapias Lasers de Baixa Potência com comprimentos de onda de 808nm e 660nm foram eficazes na indução da osteogênese.

A análise histológica mostrou que os dois comprimentos de onda estudados (808nm e 660nm) favoreceram o processo de proliferação celular (Osteoblastos, Osteócitos e Fibroblastos), atuando ainda na redução do processo inflamatório. O Laser Vermelho (660nm) mostrou-se mais eficaz para proliferação de fibroblastos.

REFERENCIAS

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. 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.

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

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 de 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.

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

Braz F, Rahal SC, Rocha NS, Biasi 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.

Carnevalli 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 HeNe. Fisiot. Brás. 2003; 4(4):253-258.

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.

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. Retardo 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 Prática Clínica. *Clinica Ortopédica*. 2003;4(2):283-315.

Elffors I. Osteoporotic fractures due to osteoporosis. Impacts of a frailty 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.

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.

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.

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.

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

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, 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^a 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.

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

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.

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.

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.

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.

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 ultrassônica 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.

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 tíbia de rato [Dissertação]. São Carlos: Universidade de São Paulo; 2004.

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 EJ. 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.

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*. 4thed. 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.

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;242:60-7.

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 β 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

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 Boné. Braz Dent J. 2003;14(3): 177-181.

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

Pytlik 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.

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.

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 modulaci3n de la funci3n celular [Tese]. Facultad de Medicina Universitat Rovira i Virgili;1996.

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

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.

Santos Neto FL, Volpon JB. Experimental nonunion in dogs. 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.

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.

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.

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

Wasserman RH, Kallfetz 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.

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.

APÊNDICE

Tabela 1. Médias de densidade óssea utilizando Software Digora 1.51 com um intervalo entre dx e dy = 2.102 no pré cirúrgico e ao 90 dias de pós cirúrgico de ratas submetidas a ovariectomia

Amostra	Pré-cirúrgico	Pós-cirúrgico - 90 dias
1	151,91	139,28
2	176,06	134,21
3	169,70	150,95
4	173,21	164,06
5	185,10	165,44
6	176,20	115,65
7	196,97	173,30
8	183,76	150,20
9	158,33	145,37
10	166,50	151,29
11	186,75	172,21
12	185,17	194,54
13	184,61	141,87
14	184,61	141,87
15	169,82	145,70
16	173,12	145,70
17	175,60	166,21
18	172,59	169,85
Média	176.10	153.80
Desvio Padrão	2.5	4.2

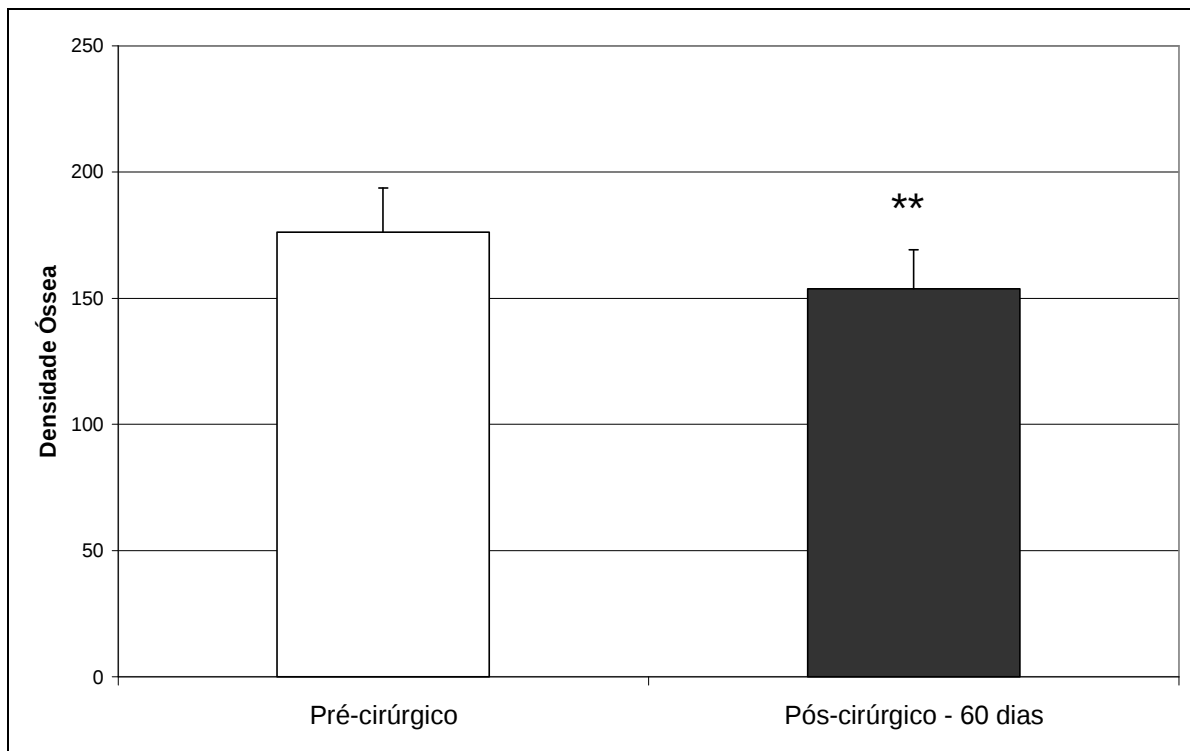


Figura 3 Gráfico comparativo das médias e desvio padrão da leitura da densidade óssea utilizando Software Digora 1.51 com um intervalo entre dx e dy = 2.102 no pré-cirúrgico e ao 90 dias de pós-cirúrgico de ratas submetidas a ovariectomia. ** $p < 0,001$ indica diferença estatisticamente significativa utilizando teste t de student entre a densidade óssea pré-cirúrgica em relação a pós-cirúrgica.