UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA - NÍVEL MESTRADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO ESTOMATOLOGIA

FERNANDA DE ANDRADE RIBEIRO

COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES PROTOCOLOS DE FOTOBIOMODULAÇÃO NO REPARO ÓSSEO DE ALVÉOLOS PÓS-EXTRAÇÃO DENTÁRIA DE RATAS COM OSTEOPOROSE PÓS-MENOPAUSA: ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA

PORTO ALEGRE
2026

FERNANDA DE ANDRADE RIBEIRO

COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES PROTOCOLOS DE FOTOBIOMODULAÇÃO NO REPARO ÓSSEO DE ALVÉOLOS PÓS-EXTRAÇÃO DENTÁRIA DE RATAS COM OSTEOPOROSE PÓS-MENOPAUSA: ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Clínica Odontológica com ênfase em Estomatologia.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Trevizani Martins

PORTO ALEGRE
2026

AGRADECIMENTOS

Escrevo esta seção com o objetivo de agradecer a todos que contribuíram para que esta pesquisa fosse desenvolvida com qualidade e com ética, bem como que eu pudesse concluir mais esta etapa acadêmica. Os agradecimentos são destinados a:

Primeiramente, a minha família pelo apoio e incentivo por todos esses anos de estudo. Sem ela, não teria sido a primeira Cirurgiã-Dentista e Mestra em Clínica Odontológica formada em uma Universidade Pública de excelência e com programa de pós-graduação que atingiu o conceito máximo em 2025, que é representado pelo escore 7.

Logo depois, ao meu namorado pelo amor, pelo carinho e pelo incentivo diários. Com você, a jornada é mais feliz. E também a sua família, que me acolheu com carinho em sua vida.

Por conseguinte, ao meu Orientador Marco pelo auxílio com embasamento científico e gentileza pelo ensino e contribuições nesta produção científica. E à Professora Manoela por todo o ensinamento ao longo do mestrado. Os dois são exemplos de Professores e profissionais: responsáveis, gentis, competentes e inteligentíssimos.

Ao WHOC (Wound Healing and Oral Cancer Resear Group) e a todos meus colegas de pesquisa pela equipe acolhedora, dedicada e competente que tenho a honra de fazer parte. Participar de um grupo assim é um privilégio e, sem dúvida, representa os ótimos líderes que nos conduzem pelos caminhos do saber: Professores Marco e Manoela Martins.

À ELOS pela oportunidade para aprender mais sobre laser e suas aplicações clínicas em Odontologia e poder contribuir com pesquisa e ensino aos alunos de graduação e de pós-graduação tal qual com atendimento SUS de excelência aos pacientes atendidos.

Às ratas da pesquisa da Bruna Barcelos Só e também esta que lhes apresento, pois se colocaram à disposição a fim de participarem como arcabouço do embasamento científico sobre uso do laser em osso osteoporótico decorrente de privação hormonal.

Aos Professores da FO-UFRGS, com especial reconhecimento aos da Estomatopatologia da Instituição, pelo conhecimento disponibilizado.

Ao HCPA (Hospital de Clínicas de Porto Alegre) - UFRGS, ao Centro de Pesquisa Experimental (CPE) do HCPA - UFRGS e ao ICBS (Instituto de Ciências Básicas da Saúde) - UFRGS pela estrutura fornecida para realizar a coleta de dados da pesquisa e a sua equipe pelo auxílio durante este processo.

Ao Programa de Pós-Graduação (PPG) da UFRGS, à UFRGS pela oportunidade que, claro, exigiu esforço, renúncias e mérito meu, mas também, acolhimento por parte da instituição e de sua equipe.

Aos meus colegas do PPG da UFRGS pela troca de experiências, de saberes e pelos trabalhos em grupo realizados com afinco.

À UFRGS, que me forma desde a oitava série do ensino fundamental, quando ingressei os estudos no Colégio de Aplicação.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Biofotônica Translacional em Odontologia (INCT-BIOFOTO BUCAL), Brasil, ao qual expresso meus agradecimentos pelo suporte institucional e técnico.

À prática esportiva, em especial à equipe de natação da UFRGS organizada e orientada pelo GPEAEXT (Projeto de Extensão organizado pelo Grupo de Pesquisa em Esportes Aquáticos) e à equipe de Jiu-Jitsu do projeto Bugre Lucena. Os esportes aquático e de luta associados com o reforço muscular melhoraram minha saúde física e mental, tornando-me a cada dia mais saudável e ágil enquanto desenvolvia as atividades acadêmicas.

Aos meus amigos pelos momentos de descontração e pelo encorajamento durante a jornada acadêmica.

À Camila, minha psicoterapeuta, que, desde meados da graduação, tem me ajudado no processo de autoconhecimento e me conduz ao bem-estar psicológico, pois, como escreveu o poeta romano Juvenal em sua Sátira X, “mente sã em corpo são”, desencadeando positivamente em um trabalho e uma vida com êxito.

RESUMO

A osteoporose é uma doença que afeta 500 milhões de pessoas no mundo, com risco e prevalência altos sobretudo em idosas pós-menopausa. Esta doença influencia negativamente na cicatrização óssea após procedimentos cirúrgicos. Na rotina clínica odontológica, a extração dentária ainda é um dos procedimentos mais realizados. A elevada prevalência de extrações dentárias em pacientes idosos e a alta incidência de osteoporose tornam relevante a investigação de estratégias capazes de otimizar o reparo ósseo alveolar em condições de metabolismo ósseo comprometido. Este é um estudo derivado de um estudo guarda-chuva já concluído, cujo objetivo foi avaliar os efeitos de diferentes protocolos de fotobiomodulação (FBM) no reparo ósseo alveolar após exodontia em modelo experimental de osteoporose. Foram analisadas 22 amostras de maxilas de ratas Wistar distribuídas nos grupos SHAM (cirurgia simulada sem osteoporose), OVX (cirurgia, indução de osteoporose e sem tratamento), LLL (tratados com laser de baixa potência), DHPL1W (tratados com laser de alta potência desfocado 1 W) e DHPL2W (laser de alta potência desfocado 2 W). Os protocolos foram aplicados três vezes por semana, com avaliação aos 14 e 28 dias pós-exodontia. Realizaram-se análises histológicas em hematoxilina e eosina e Picrosirius Red sob luz polarizada, além de análise histomorfométrica da área de colágeno trabecular. Em ambos os tempos, o grupo OVX apresentou atraso no reparo ósseo alveolar, com menor neoformação óssea, trabéculas mais delgadas, maior presença de espaços medulares e menor maturação colágena em comparação ao grupo SHAM. Todos os grupos tratados com fotobiomodulação demonstraram melhora no reparo ósseo em relação ao grupo OVX. Os grupos DHPL1W e DHPL2W apresentaram maior deposição colágena. No entanto, o grupo DHPL1W apresentou trabéculas mais espessas e melhor organização estrutural, evidenciadas pela birrefringência de coloração vermelha intensa. Conclui-se que a FBM favorece o reparo ósseo alveolar em condições osteoporóticas, sendo o protocolo de laser de alta potência desfocado com 1 Watt de potência superior aos demais avaliados, e que a FBM destaca-se como uma terapia adjuvante promissora, cuja aplicação clínica requer padronização criteriosa dos parâmetros.

Palavras-chave: osteoporose, ovariectomia, fotobiomodulação, extração dentária.

ABSTRACT

Osteoporosis is a disease that affects approximately 500 million people worldwide, with a high risk and prevalence, particularly among postmenopausal elderly women. This disease negatively impacts bone healing following surgical procedures. In routine dental clinical practice, tooth extraction remains one of the most commonly performed procedures. The high prevalence of tooth extractions in elderly patients and the increased incidence of osteoporosis highlight the importance of investigating strategies capable of improving alveolar bone healing under conditions of impaired bone metabolism. This is a study derived from a previously completed umbrella study, whose objective was to evaluate of this study was to evaluate the effects of different photobiomodulation (PBM) protocols on alveolar bone repair following tooth extraction in an experimental model of osteoporosis. Twenty-two maxillary samples from Wistar rats were analyzed and distributed into the following groups: SHAM (sham surgery without osteoporosis), OVX (ovariectomy-induced osteoporosis without treatment), LLL (low-level laser therapy), DHPL1W (defocused high-power laser, 1 W), and DHPL2W (defocused high-power laser, 2 W). Treatment protocols were applied three times per week, with evaluations performed at 14 and 28 days post-extraction. Histological analyses were conducted using hematoxylin and eosin and Picrosirius Red under polarized light, in addition to histomorphometric assessment of trabecular collagen area. At both time points, the OVX group demonstrated delayed alveolar bone healing, characterized by reduced bone neoformation, thinner trabeculae, increased medullary spaces, and lower collagen maturation compared with the SHAM group. All PBM-treated groups showed improved bone repair relative to the OVX group. The DHPL1W and DHPL2W groups exhibited greater collagen deposition. However, the DHPL1W group exhibited thicker trabeculae and superior structural organization, as evidenced by the intense red birefringence observed under polarized light microscopy. It can be concluded that PBM promotes alveolar bone healing under osteoporotic conditions, with the defocused high-power laser protocol at 1 W showing superior performance compared with the other protocols evaluated. Furthermore, PBM stands out as a promising adjunctive therapy, whose clinical application requires careful standardization of treatment parameters.

Keywords: osteoporosis; ovariectomy; photobiomodulation; tooth extraction.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....9
2. OBJETIVO.....34
2.1 OBJETIVO GERAL.....34
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....34
3. JUSTIFICATIVA.....34
4. HIPÓTESES.....35
4.1 HIPÓTESE DE NULIDADE.....35
4.2 HIPÓTESE ALTERNATIVA.....35
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....35
5.1 DELINEAMENTO.....35
5.2 LOCAL DE ORIGEM DO ESTUDO.....35
5.3 LOCAIS DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO.....36
5.4 ASPECTOS ÉTICOS.....36
5.5 AMOSTRA.....36
5.6 HISTOTÉCNICA.....41
5.7 COLORAÇÃO POR HEMATOXILINA E EOSINA (HE) E MONTAGEM HISTOLÓGICA.....41
5.8 COLORAÇÃO POR PICROSIRIUS RED (PSR) E MONTAGEM HISTOLÓGICA.....42
5.9 CAPTURA DAS IMAGENS DAS LÂMINAS HISTOLÓGICAS.....42
5.10 ANÁLISE MICROSCÓPICA DESCRITIVA.....43
5.11 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA.....43
5.11.1 *ANÁLISE DA ÁREA TOTAL DE COLÁGENO DAS TRABÉCULAS ÓSSEAS MAXILARES*.....44
6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....45
7. RESULTADOS.....46
7.1 ANÁLISE MORFOLÓGICA DO OSSO ALVEOLAR EM 14 DIAS.....46
7.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA DO OSSO ALVEOLAR EM 28 DIAS.....48
7.3 AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA ORGANIZAÇÃO E DA MATURAÇÃO COLÁGENA POR COLORAÇÃO PICROSIRIUS RED SOB LUZ POLARIZADA EM 14 DIAS.....50
7.4 AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA ORGANIZAÇÃO E DA MATURAÇÃO COLÁGENA POR COLORAÇÃO PICROSIRIUS RED SOB LUZ POLARIZADA EM 28 DIAS.....50
7.5 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DA ÁREA DE TRABÉCULAS ÓSSEAS EM 14 DIAS.....51
7.6 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DA ÁREA DE TRABÉCULAS ÓSSEAS EM 28 DIAS.....52
9. DISCUSSÃO.....53
10. CONCLUSÃO.....56
REFERÊNCIAS.....59

LISTA DE ACRÔNIMOS E DE SIGLAS

ATP – Adenosina trifosfato
BV/TV – Volume ósseo/volume total
FBM/PBM – Fotobiomodulação
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IGF-1 – Fator de crescimento semelhante à insulina 1
IL-1; IL-6 e IL-11 – Interleucinas 1, 6 e 11
IOF – International Osteoporosis Foundation (Fundação Internacional da Osteoporose)
Laser – Light amplification by stimulated emission of radiation (Aplicação de luz proveniente de fontes coerentes)
LED – Aplicação de luz proveniente de fontes não coerentes
LRP5 – Lipoproteína de baixa densidade 5
M1 – Fenótipo macrófago 1
M-CSF – Fator estimulador de colônias de macrófagos
MRONJ – Osteonecrose dos Ossos Maxilares associada a Medicamentos
NO – Óxido nítrico
OCN – Osteocalcina
OPG – Osteoprotegerina
OVX – Cirurgia de ovariectomia
PCNA – Antígeno nuclear de células em proliferação
PSR - Picrosirius
PTH – Paratormônio
RANK – Receptor fator nuclear kappaB
RANKL – Ligante do fator nuclear kappa B
RNA – Ácido ribonucleico
RUNX-2 – Fator de transcrição relacionado a Runt 2
SERMS – Modulador seletivo dos receptores de estrógeno
SIA/SUS – Sistema de Informações Ambulatoriais do Sistema Único de Saúde
TABNET/DATASUS – Tabela de Procedimentos Odontológicos do SUS
TGF-β – Fator de crescimento transformador beta
TNF-α – Fator de necrose tumoral alfa
VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular
Vitamina D – Colecalciferol

WNT/β catenina – Via canônica

WNT/Ca^{2+} – Via não canônica

1. INTRODUÇÃO

A extração dentária permanece como um dos procedimentos mais frequente realizado na prática clínica odontológica, sobretudo em decorrência de condições crônicas altamente prevalentes, como cárie dentária e doença periodontal. No Brasil, dados oficiais do Sistema de Informações Ambulatoriais do Sistema Único de Saúde (SIA/SUS) indicam que mais de 1,1 milhão de exodontias foram realizadas em 2022, evidenciando o impacto desse procedimento na atenção primária e secundária em saúde bucal (Ministério da Saúde/DATASUS, 2023). Os Sistemas Nacionais de Informação em Saúde permitem o registro e a análise desses procedimentos por meio de códigos específicos da Tabela de Procedimentos Odontológicos do SUS (TABNET/DATASUS), embora os microdados consolidados referentes ao ano de 2023 ainda não estejam integralmente disponíveis no TABNET/DATASUS, o que limita análises nacionais mais recentes. No que concerne à população idosa, levantamentos epidemiológicos nacionais apontam que, apesar de avanços na preservação dentária ao longo das últimas décadas, uma parcela expressiva de idosos ainda apresenta perdas dentárias acumuladas e necessidade de intervenções cirúrgicas, especialmente em contextos de maior vulnerabilidade socioeconômica e de presença de doenças bucais avançadas (BRASIL 2003; BRASIL 2010; BRASIL 2023). Esse cenário adquire maior relevância diante do acelerado envelhecimento populacional, uma vez que se estima que uma em cada seis pessoas no mundo terá 60 anos ou mais até 2030 e que, até 2050, a população global nessa faixa etária alcançará aproximadamente 2,1 bilhões de indivíduos, com crescimento expressivo do contingente de 80 anos ou mais (WHO, 2024). Associada a esse processo, observa-se maior prevalência de condições sistêmicas, como a osteoporose, que podem influenciar diretamente o planejamento e a tomada de decisão em procedimentos odontológicos invasivos (IOF, 2024), reforçando a necessidade de adaptação dos sistemas de saúde e das estratégias assistenciais para atender adequadamente uma população progressivamente mais idosa e clinicamente complexa (WHO, 2024). Nesse cenário, torna-se fundamental compreender os mecanismos biológicos envolvidos no reparo ósseo, especialmente após intervenções cirúrgicas frequentes na prática odontológica, como a extração dentária.

Reparo ósseo após a extração dentária

A extração dentária é um procedimento cirúrgico recorrente, e espera-se que, após sua realização, o alvéolo e os tecidos moles adjacentes evoluam para um reparo completo. Entretanto, devido à anatomia do alvéolo, não ocorre a união primária dos bordos da ferida, caracterizando um processo de cicatrização por segunda intenção. Nesse contexto, tanto o tecido ósseo quanto os tecidos moles seguem as etapas clássicas da cicatrização: inflamação, epitelização, fibroplasia e remodelação. Na primeira semana, iniciam-se os processos de fechamento da ferida, com destaque para a fase inflamatória, marcada pela migração de leucócitos responsáveis pela remoção de contaminantes da área do coágulo. Concomitantemente, ocorre a fase de fibroplasia e epitelização, caracterizada pela proliferação de fibroblastos, formação de novos vasos capilares e migração dos bordos epiteliais ao longo das paredes do alvéolo. Por fim, tem início a fase de remodelação, marcada pela substituição progressiva do tecido inicial por tecido ósseo mais organizado. Na segunda semana, ocorre deposição de osteóide no osso alveolar que reveste o alvéolo e pode ocorrer a epitelização completa. A terceira e quarta semana mantêm os processos iniciados na primeira semana: epitelização de grandes alvéolos e reabsorção da crista e nova deposição de osso trabecular. De 4 a 6 meses após a extração ocorre a reabsorção da lâmina dura e completa remodelação e em 1 ano observa-se radiograficamente apenas um halo de tecido fibroso sobre a crista alveolar edêntula

Este processo ocorre espontaneamente em pessoas saudáveis quando o protocolo de extração e de biossegurança é respeitado (HUPP, 2021; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Todavia, doenças como a osteoporose podem interferir no reparo ósseo e desencadear uma alteração na sequência ou na taxa de consolidação e retardo no tempo de reparo (ILIZUKA; MILLER; MARKS, 1992), como já observado por Latimer et al. (2024), em estudo experimental com ratas ovariectomizadas submetidas à cirurgia de implante dentário no alvéolo do primeiro molar superior, alterações sistêmicas no metabolismo ósseo podem impactar diretamente os processos de reparo e osseointegração.

Osteoporose

Nesse contexto, destaca-se a osteoporose, uma doença osteometabólica caracterizada pela diminuição da densidade mineral óssea e pela deterioração da microarquitetura do tecido ósseo, resultando em aumento da fragilidade esquelética e do risco de fraturas (NIH CONSENSUS DEVELOPMENT PANEL, 2001). Evidências mais recentes demonstram que a fragilidade óssea depende não apenas da quantidade de osso, mas também de sua qualidade

estrutural e material, com impacto direto na resistência mecânica (COMPSTON et al., 2019). A condição pode ser classificada em osteoporose primária, associada ao envelhecimento e à deficiência estrogênica pós-menopausa, e osteoporose secundária, relacionada a doenças inflamatórias crônicas, distúrbios endócrinos, doenças da medula óssea, síndromes de má absorção, imobilização prolongada, baixo peso corporal, além do uso de medicamentos como glicocorticoides, bem como fatores comportamentais, incluindo tabagismo e consumo excessivo de álcool (EASTELL et al., 2016; COSMAN et al., 2014).

A estimativa da prevalência e da incidência da osteoporose

Uma revisão sistemática e meta-análise conduzida por Salari N et al. (2021), que incluiu 86 estudos com uma amostra total de 103.334.579 indivíduos, estimou que a prevalência global de osteoporose foi de aproximadamente 18,3%, sendo menor nas Américas (12.4%) quando comparada à Europa (18.6%), à Ásia (16.7%) e à África (39.5%). O estudo também evidenciou diferenças relevantes entre os sexos, sendo a prevalência em mulheres maior, cerca de 23.1%. Resultados semelhantes foram observados em outra revisão sistemática realizada por Xiao PL et al. (2022), confirmando maior prevalência de osteoporose no sexo feminino, especialmente entre mulheres mais velhas. Ao avaliar a prevalência da osteoporose em adultos mais velhos, Salari N et al. (2021) observaram que a prevalência em mulheres chega a 35.3%, cenário diferente para a prevalência em homens idosos, que está em 12,5%.

A doença representa um relevante problema de saúde pública no país, uma vez que, segundo estimativas da International Osteoporosis Foundation (IOF, 2025), aproximadamente 500 milhões de pessoas vivem com osteoporose no mundo. A International Osteoporosis Foundation (IOF) destaca que a osteoporose é uma doença amplamente subdiagnosticada, responsável por impactos significativos na qualidade de vida da população, o que motivou a criação de campanhas globais de conscientização sobre seu diagnóstico, tratamento e prevenção, incluindo o Dia Mundial da Osteoporose, celebrado anualmente em 20 de outubro. De acordo com a mesma instituição, uma em cada três mulheres e um em cada cinco homens com 50 anos ou mais apresentarão fraturas relacionadas à osteoporose ao longo da vida. Estima-se que, globalmente, ocorram cerca de 37 milhões de fraturas osteoporóticas por ano, com projeções indicando aumento expressivo da incidência dessas fraturas até 2050, particularmente em decorrência do envelhecimento populacional (IOF, 2025; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2026).

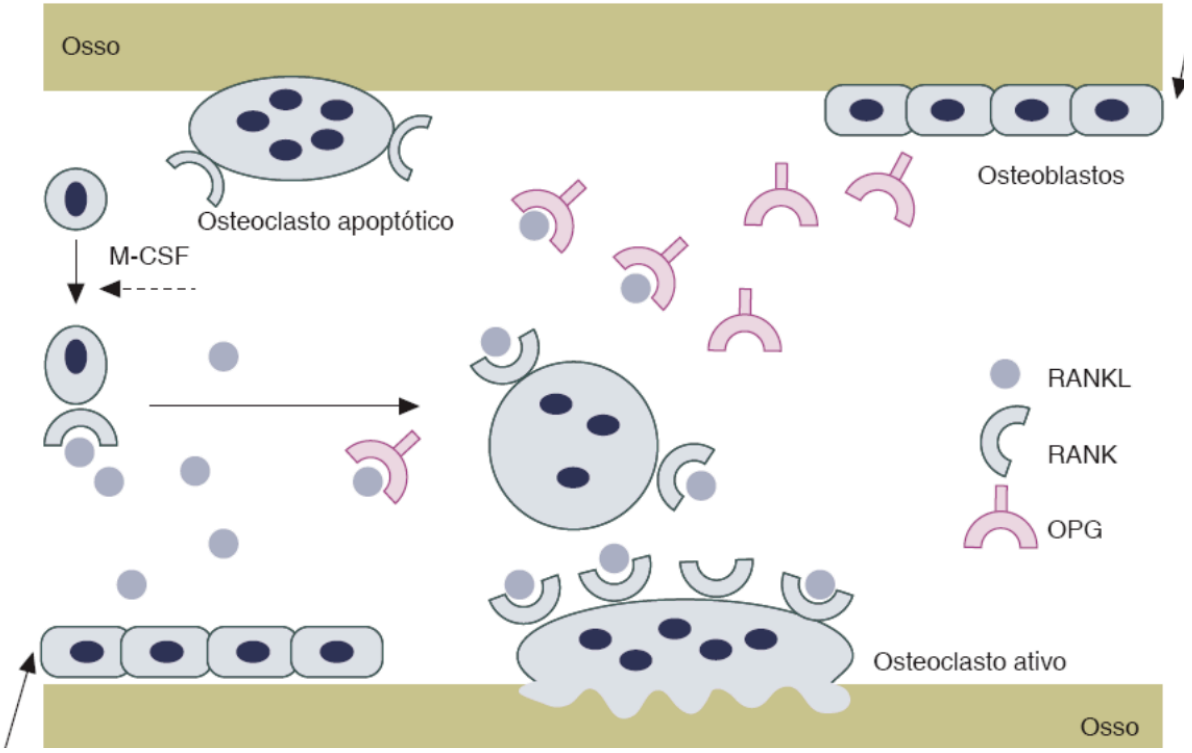
Embora não existam dados nacionais diretos que permitam mensurar a incidência anual da osteoporose no Brasil, estimativas indiretas baseadas na prevalência da doença e na dinâmica demográfica da população fornecem informações relevantes sobre sua magnitude e tendência de crescimento. Dados demográficos indicam que a população brasileira com 50 anos ou mais apresenta crescimento acelerado, reflexo do envelhecimento populacional observado nas últimas décadas, conforme projeções do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2024). Esse cenário sugere um aumento contínuo do número absoluto de novos casos de osteoporose ao longo dos anos, ainda que a incidência anual específica da doença não seja mensurada diretamente, reforçando sua relevância como problema de saúde pública e a necessidade de estratégias de prevenção, diagnóstico precoce e manejo adequado no país.

Em função do envelhecimento populacional e da elevada prevalência da osteoporose em indivíduos idosos, a doença constitui um importante problema de saúde pública, com repercussões clínicas relevantes, inclusive para o planejamento de procedimentos cirúrgicos odontológicos e a avaliação do risco de complicações ósseas. (DINIZ; BATISTA; DE CARVALHO, 2020; COMPSTON et al., 2019).

Fisiopatologia da osteoporose

O processo fisiopatológico da osteoporose envolve a regulação da atividade dos osteoclastos, que ocorre por meio de mecanismos intracelulares mediados pela ativação do receptor do fator nuclear kappa B (RANK), presente na superfície dessas células. As células osteoblásticas produzem dois mediadores essenciais nesse processo: a osteoprotegerina (OPG) e o ligante do receptor do fator nuclear kappa B (RANKL). O receptor RANK é ativado pelo ligante produzido pelas células osteoblásticas (RANKL). O RANKL, ao ligar-se ao receptor RANK, inicia o processo de reabsorção óssea. Já a OPG compete com o receptor RANK pela capturação do RANKL. Quando OPG consegue apreender RANKL, impede a sua ligação com o receptor RANK e, como consequência, bloqueia a ativação do osteoclasto. De maneira resumida, resulta de uma desregulação no ciclo de remodelação óssea fisiológica neste sistema OPG/RANKL. Esta desregulação proporciona um aumento na atividade osteoclástica reabsortiva e uma redução de atividade osteoblástica de formação de matriz óssea, resultando em uma perda progressiva de volume ósseo (DINIZ; BATISTA; DE CARVALHO, 2020). O sistema OPG/RANKL está demonstrado na Figura 1.

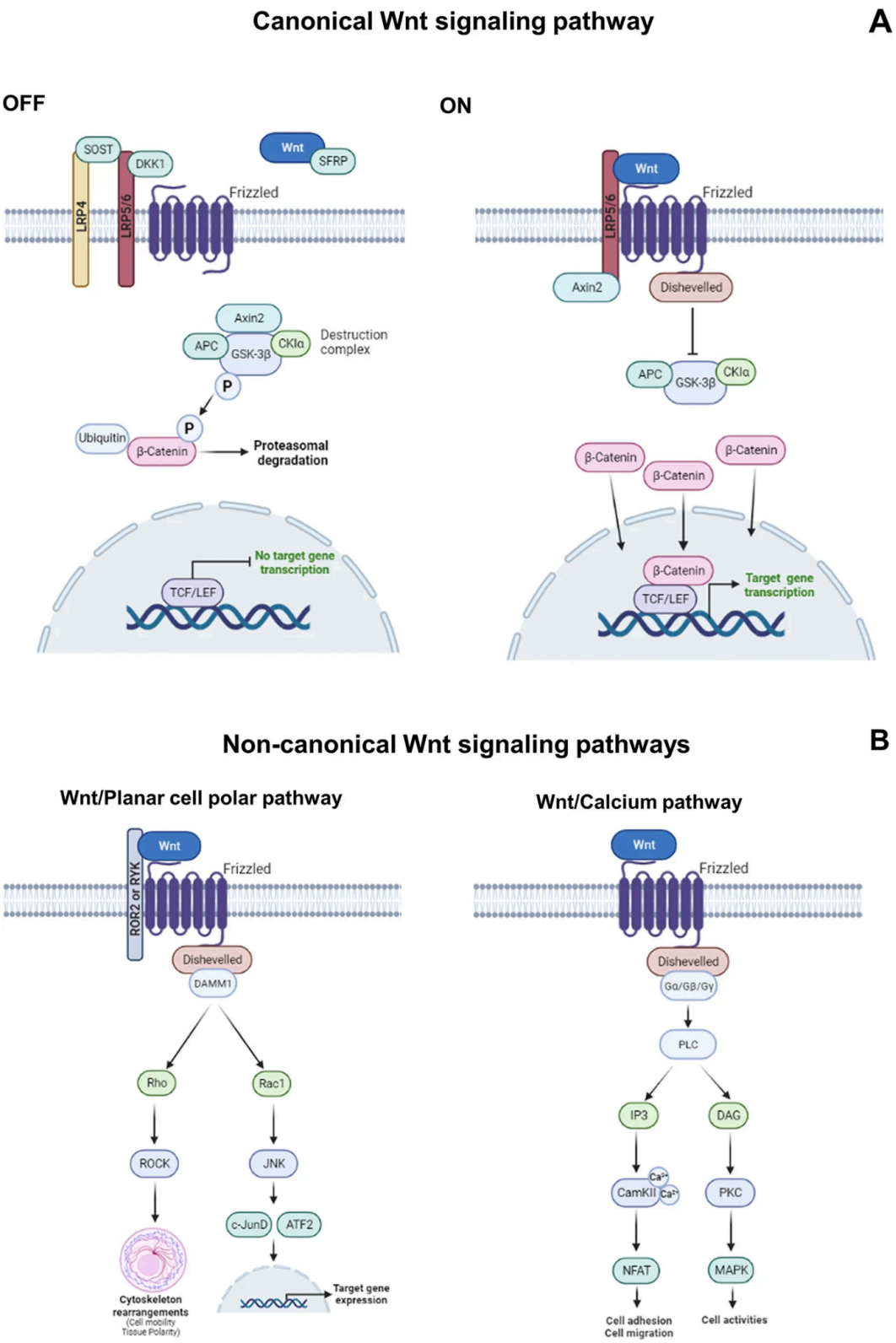
FIGURA 1: SISTEMA OPG/RANKL



Fonte: DINIZ; BATISTA; DE CARVALHO, 2020.

Outra via de sinalização que também influencia a produção de substrato ósseo é a WNT. Esta via é regulada pela proteína esclerostina, produzida pelo osteócito. A esclerostina liga-se ao receptor de lipoproteína de baixa densidade 5 (LRP5) e às proteínas de Frizzled na superfície dos osteoblastos e das células precursoras, bloqueando a ativação da via WNT. Três vias de sinalização WNT existem: 1) a via canônica (WNT/β catenina); 2) a via não canônica (WNT/Ca^{2+}) e 3) a via não canônica de polaridade celular plana. As duas primeiras vias **(Figura 2)** estão envolvidas na formação óssea, com as várias cascatas da classificação binária interagindo entre si, sendo a primeira predominante na diferenciação osteoblástica e a segunda através do controle de níveis de cálcio intracelulares e nas fases posteriores da diferenciação osteoblástica (DINIZ; BATISTA; CARVALHO, 2020; ABUNÁ, 2019; MARINI et al., 2023).

FIGURA 2: VIAS CANÔNICAS E NÃO CANÔNICAS DO SISTEMA WNT



Fonte: MARINI et al., 2023.

A influência do sexo biológico e do envelhecimento na osteoporose primária

Há diversos fatores que podem interferir no sistema OPG/RANKL, mas, tratando-se de sexo e envelhecimento, há peculiaridades para estes tópicos. Para os homens, a

testosterona e o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) são efeitos protetores do micro e da macroestrutura dos ossos, da qualidade e da mineralização do colágeno, da resistência e da reabsorção óssea fisiológica. Por outro lado, as mulheres reduzem a produção de estrógeno, o que também reduz a densidade óssea, pois este hormônio não consegue mais inibir a esclerostina, suprimir o RANKL e regular a produção de citocinas inflamatórias, resultando em maior atividade osteoclástica (DINIZ; BATISTA; DE CARVALHO, 2020).

No envelhecimento, há aumento do hormônio paratormônio (PTH), que diminui a produção de vitamina D pela pele. A quantidade reduzida de vitamina D diminui a quantidade de receptores intestinais de vitamina D e, por sua vez, diminui consequentemente a absorção intestinal de cálcio. Ademais, há aumento da produção de citocinas pelos osteócitos senescentes, apoptóticos ou disfuncionais, que contribuem para os processos de osteoclastogênese, degradação da matriz, reabsorção óssea focal e porosidade cortical. (DINIZ; BATISTA; DE CARVALHO, 2020).

No sexo feminino, o envelhecimento associa-se à deficiência estrogênica, além do acúmulo de comorbidades e de hábitos disfuncionais ao longo da vida. A redução dos níveis de estrogênio desencadeia alterações metabólicas e imunoinflamatórias caracterizadas pelo aumento da produção de citocinas pró-reabsortivas, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e as interleucinas 1, 6 e 11 (IL-1; IL-6 e IL-11), bem como pelo aumento da expressão de mediadores osteoclastogênicos, incluindo o ligante do receptor ativador do fator nuclear κB (RANKL) e o fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), produzidos por células estromais e osteoblásticas (TELLA; GALLAGHER, 2013). Paralelamente, observa-se redução da atividade osteoblástica, com diminuição da produção de fatores anabólicos, como o fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) e o fator de crescimento transformador beta (TGF-β), além de redução da síntese de pró-colágeno, comprometendo a formação da matriz óssea e contribuindo para a perda progressiva de massa óssea (DINIZ; BATISTA; de CARVALHO, 2020).

O comportamento da osteoporose nos ossos maxilares e no alvéolo

Uma revisão sistemática com meta-análise de Lee et al. (2019) analisou a microarquitetura da mandíbula de ratas ovariectomizadas. Foram encontrados 1160 estudos, mas incluídos apenas 16. Comparado ao grupo controle, os pesquisadores observaram menor volume ósseo, espessura trabecular e densidade mineral e maior separação trabecular, variáveis não relacionadas com a idade das ratas. Todas as alterações na microarquitetura

parecem ocorrer com longos períodos pós-indução de ovariectomia. No entanto, o período para que ocorram essas mudanças estruturais na mandíbula é inconclusivo.

Para as maxilas, sabe-se que esses ossos são afetados antes da mandíbula pela doença osteoporose (OSTERHOFF et al., 2016), mas não existe uma revisão sistemática com e sem meta-análise que avalie a alteração da sua microarquitetura em ratas ovariectomizadas. Alguns estudos observaram alterações, como redução de volume interradicular das raízes do segundo molar superior (CHATTERJEE et al., 2021).

Outra revisão sistemática conduzida por Só et al. (2021) investigou os efeitos da osteoporose na reparação do alvéolo dentário após extração, com base em estudos pré-clínicos. Foram incluídos 25 estudos, a maioria utilizando ratas submetidas à ovariectomia (OVX) como modelo de indução da osteoporose. A extração de molares superiores foi a mais frequente, fornecendo dados relevantes sobre a maxila. A maioria dos estudos demonstrou que a osteoporose compromete a cicatrização óssea, com menor volume de osso neoformado, pior qualidade trabecular e maior separação entre trabéculas. Métodos como histomorfometria, microCT e imunohistoquímica foram amplamente empregados para avaliar os diferentes aspectos da reparação. Apesar dos achados consistentes, os autores destacaram grande heterogeneidade metodológica entre os estudos, incluindo ausência de confirmação da osteoporose especificamente na maxila. Concluíram que o fenótipo osteoporótico parece prejudicar a reparação do alvéolo dentário, mas reforçaram a necessidade de padronização nos modelos experimentais.

Processo diagnóstico da osteoporose

O processo diagnóstico avalia a evidência de fratura por fragilidade através de exames radiográficos e a densidade óssea através de exame de densitometria da coluna lombar, do fêmur total, do colo do fêmur ou do terço médio do rádio. Realiza-se rastreio populacional com densitometria em mulheres a partir dos 65 anos de idade e em homens a partir dos 70 anos de idade ou com fatores de risco identificados na consulta clínica. Exames laboratoriais são solicitados para identificar causas secundárias ou monitorar o tratamento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2026).

Tratamento da osteoporose

O tratamento para a osteoporose inclui medidas não farmacológicas e protocolos personalizados farmacológicos para cada paciente. Embora deva-se avaliar cada caso

singularmente, medidas não medicamentosas e suplementação de cálcio e de vitamina D são priorizadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2026).

O tratamento não medicamentoso inclui exercícios físicos com ação da gravidade e que estimulem aumento do equilíbrio, da resistência e da força; prevenção de quedas através da revisão de medicamentos associados ao risco de quedas, da avaliação de problemas neurológicos, de distúrbios visuais e auditivos e de medidas de segurança ambiental, bem como orientação para evitar tabagismo e consumo de álcool (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2026).

No que tange o tratamento medicamentoso desta doença, ele é baseado no aconselhamento do controle da ingesta de cálcio, da suplementação de vitamina D (colecalciferol) e da prescrição medicamentosa. A ingestão de cálcio, que pode ser obtida pela dieta ou por suplementação, é recomendada na faixa de 1000 a 1.200 mg de cálcio elementar diárias fracionadas em doses de 500 mg. E a vitamina D, orienta-se a ingestão de 800 a 1.000 UI diária ou semanal de 7.000 UI para a grande maioria dos pacientes. Idosos, entretanto, podem necessitar de doses maiores, podendo chegar a 2.000 UI diárias ou 14.000 UI semanais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2026).

Além disso, duas classes principais de medicamentos estão disponíveis para o manejo farmacológico da osteoporose. A primeira é composta pelos fármacos antirreabsortivos, que podem ser divididos em hormonais, bisfosfonatos e biológicos. Entre os hormonais incluem-se os medicamentos utilizados na terapia de reposição hormonal (TRH), como os estrógenos e a testosterona; a calcitonina (hormônio tireoidiano) e o raloxifeno (modulador seletivo dos receptores de estrógeno — SERMS). A categoria dos bisfosfonatos é dividida em nitrogenados e não nitrogenados, alquílicos e heterocíclicos. Os agentes biológicos incluem o denosumabe (ligante do receptor ativador do RANKL). A segunda é composta pelos anabólicos, que incluem teriparatida, análogo do hormônio da paratireoide (PTH), e abaloparatida (similar ao hormônio PTH). A teriparatida não é recomendada rotineiramente no Brasil para uso em pacientes com osteoporose grave. Por fim, o medicamento Romosozumabe é considerado um agente antirreabsortivo e anabólico, com indicação em condições de osteoporose grave. (OLIVEIRA, L. G. et al., 2021; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2026).

Monitoramento do tratamento da osteoporose

O monitoramento é realizado por acompanhamento clínico e com a solicitação de exames complementares. Nas consultas clínicas, avalia-se se há adesão aos tratamentos

medicamentosos e não-medicamentosos. Já os exames complementares solicitados costumam ser: a densitometria óssea, que é solicitada na primeira avaliação, realizada após o tratamento e repetida a cada 1 a 2 anos até que a massa óssea se estabilize; exames laboratoriais para avaliar vitamina D e cálcio ou para investigar causas que estejam contribuindo para um tratamento ineficaz e radiografia da coluna dorsal e lombar se há perda de altura significativa (superior a 4 centímetros) ou clínica sugestiva de fratura (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2026).

Tratamento medicamentoso da osteoporose e a sua influência na neoformação óssea dos ossos maxilares

As medicações disponíveis para o tratamento dos pacientes com osteoporose podem aumentar o risco para desenvolvimento de alveolite dentária, desencadear atraso no reparo ósseo, comprometimento na osseointegração quando se realiza cirurgia para colocação de implantes dentários e até complicações como a “Osteonecrose dos Ossos Maxilares associada a medicamentos” (MRONJ, em inglês) no pós-operatório odontológico com intervenção cirúrgica em região óssea. Cabe salientar que o risco é maior em pacientes que estão em tratamento oncológico, mas ainda existe em pacientes que recebem doses menores como no tratamento da osteoporose. As principais medicações citadas relacionadas - em especial à osteonecrose dos ossos maxilares associada a medicamentos - são: bisfosfonatos orais, como alendronato, risedronato ou bisfosfonatos parenterais, como ácido zoledrônico, ibandronato, pamidronato; anticorpos monoclonais como denosumabe e romozosumabe. Este risco para complicações pós-operatórias é aumentado em pacientes fumantes; pacientes que ingerem bebidas alcoólicas em grandes quantidades e com frequência; pacientes com má nutrição crônica, com alterações genéticas como osteogênese imperfeita e pacientes com comorbidades, tais quais diabetes, artrite reumatoide, imunocomprometimento, hipertireoidismo não tratado, hipogonaditismo, má absorção, doença renal crônica e câncer; e pacientes em uso de terapias com corticosteroides e esteroides (LATIMER et al., 2024; RUGGIERO et al., 2022; CURTIS et al., 2016).

Os medicamentos antirreabsortivos como os bisfosfonatos e o denosumabe estão relacionados com diversas alterações no metabolismo e no reparo ósseo por longo tempo no organismo, porque diminuem majoritariamente a capacidade dos osteoclastos de absorverem e de degradarem a matriz óssea com o medicamento incorporado pelos osteoblastos ao longo de até quatro décadas (NEVILLE et al., 2025). No entanto, também reduzem na viabilidade e proliferação celular, no aumento de morte celular, redução na diferenciação e da migração celular dos osteoclastos, osteoblastos, osteócitos e condroblastos. Estas alterações celulares

são dose-dependentes e mais graves em usuários de saúde que fazem uso de bisfosfonatos nitrogenados, como pamidronato, alendronato, ibandronato, risedronato e zoledronato (SRIVICHIT et al., 2022; NICOLATOU-GALITIS et al., 2019). Embora haja maiores riscos de complicações nos ossos maxilares associados aos medicamentos antirreabsortivos, há também necessidade de cautela para o medicamento antirreabsortivo e anabólico romozosumabe. A ele é atribuído o risco similar ao do alendronato para formação de osteonecrose dos maxilares, com uma incidência estimada de cerca de 0,05%. Outras alterações desses medicamentos relatadas na literatura incluem redução na angiogênese, na vascularização e na microcirculação durante o reparo ósseo, bem como osteoclastos disfuncionais com o uso do denosumabe (RUGGIERO et al., 2022).

Diante das alterações na dinâmica de remodelação óssea induzidas pelos fármacos utilizados no tratamento da osteoporose e da ausência de protocolos preventivos bem estabelecidos para os períodos iniciais do pós-operatório em modelos de osteoporose induzida por privação hormonal, torna-se relevante investigar abordagens terapêuticas capazes de modular o processo de reparo ósseo alveolar. Nesse contexto, a fotobiomodulação (FBM) tem sido estudada por seus efeitos biológicos sobre a resposta inflamatória, a atividade celular e a neoformação óssea, configurando-se como estratégia potencialmente aplicável ao reparo alveolar em condições sistêmicas comprometidas.

Uso do laser e da FBM para auxiliar a cicatrização óssea pós-extração dentária

Sabe-se por meio de estudos pré-clínicos que condições sistêmicas como a osteoporose retardam e dificultam a cicatrização óssea após a extração dentária (VARGAS-SANCHEZ et al., 2020; SÓ et al., 2021). Na tentativa de contribuir para acelerar a cicatrização e preservar o volume ósseo, na atualidade, estudam-se métodos como a FBM (MAHINTACH, 2024), sobretudo em estágios iniciais da remodelação óssea (LE et al., 2023), e para pacientes com doenças que retardam e dificultam este processo.

Laser é um acrônimo para *light amplification by stimulated emission of radiation*, que, em língua portuguesa, significa amplificação da luz por emissão estimulada de radiação (RIBEIRO, 2020). A FBM é uma modalidade terapêutica baseada na aplicação de luz proveniente de fontes coerentes (laser) ou não coerentes (LED), nos espectros do vermelho (com comprimento de onda variando de 600 a 700 nm) e do infravermelho próximo (de 700 a 1000 nm de comprimento de onda), com o objetivo de modular processos biológicos celulares e teciduais sem produzir efeitos térmicos significativos (DE FREITAS, HAMBLIN, 2016; HAMBLIN, 2016). Diferentemente de terapias fototérmicas, a FBM atua por mecanismos

fotoquímicos e fotobiológicos, nos quais a energia luminosa é absorvida por cromóforos celulares, desencadeando respostas bioenergéticas e metabólicas que promovem analgesia, redução da inflamação e aceleração do reparo tecidual (HAMBLIN, 2017). A FBM é considerada uma terapia não invasiva, não farmacológica, efetiva e sem efeitos colaterais (RIBEIRO, 2020).

A absorção fotônica ocorre principalmente na citocromo c oxidase mitocondrial, promovendo aumento da cadeia respiratória e da produção de adenosina trifosfato (ATP), o que eleva a atividade metabólica celular e favorece processos de reparo e regeneração tecidual (HAMBLIN, 2017; DE FREITAS, HAMBLIN, 2016). O aumento da produção energética está associado também ao incremento da síntese de ácido ribonucleico (RNA) e proteínas, essenciais para a proliferação e diferenciação celular (RIBEIRO, 2022). Outro mecanismo relevante envolve a dissociação do óxido nítrico (NO) da citocromo c oxidase após a irradiação, resultando em melhora do transporte de elétrons, aumento da respiração celular e consequente vasodilatação, com melhora da perfusão tecidual (HAMBLIN, 2017). Paralelamente, a FBM promove modulação das espécies reativas de oxigênio (EROs), reduzindo o estresse oxidativo e exercendo efeito antioxidante, contribuindo para a proteção celular e homeostase tecidual (HAMBLIN, 2017). A FBM também influencia o sistema imunológico e inflamatório por meio da modulação de macrófagos e citocinas. Observa-se redução de marcadores inflamatórios associados ao fenótipo M1 e aumento da liberação de citocinas e de fatores tróficos relacionados à reparação tecidual (HAMBLIN, 2017). Esses efeitos incluem diminuição da apoptose e estímulo à proliferação, migração e adesão celular, contribuindo para aceleração da cicatrização e reorganização tecidual (HAMBLIN, 2017; RIBEIRO, 2022).

Clinicamente, essa cascata biológica se traduz em aceleração da cicatrização de feridas, modulação do processo inflamatório e redução da dor, efeitos amplamente descritos em diferentes tecidos (RIBEIRO, 2020). Em tecidos mineralizados, especialmente no osso alveolar, a FBM estimula a regeneração por meio da proliferação de odontoblastos e osteoblastos, favorecendo a preservação alveolar e melhorando o processo inflamatório pós-operatório (AMAROLI et al., 2020; KULKARNI, MEER, GEORGE, 2019). Portanto, a FBM atua por meio de mecanismos mitocondriais, redox e de sinalização celular que resultam na modulação metabólica, imunológica e regenerativa dos tecidos, caracterizando-se como uma terapia bioenergética não térmica e capaz de promover efeitos terapêuticos relevantes em diferentes contextos clínicos (DE FREITAS, HAMBLIN, 2016; HAMBLIN, 2017).

A literatura científica demonstra de forma consistente que a FBM exerce efeitos biológicos relevantes sobre tecidos mineralizados, particularmente no reparo ósseo alveolar após exodontia (DE FREITAS, HAMBLIN, 2016; AMAROLI et al., 2020). Estudos experimentais recentes evidenciam melhora significativa de parâmetros microestruturais ósseos, incluindo o aumento do índice BV/TV (volume ósseo/volume total), que representa a fração volumétrica de tecido ósseo mineralizado presente dentro da região analisada e constitui um dos principais indicadores quantitativos da neoformação óssea (BOUXSEIN et al., 2010; SONG et al., 2023).

Em modelo experimental de exodontia em ratos, Song et al. (2023) demonstraram que a aplicação de laser GaAlAs 980 nm promoveu aumento significativo do BV/TV (volume ósseo/volume total) e da densidade mineral óssea após 28 dias, além de elevação da atividade de fosfatase alcalina, indicando maior formação e maturação óssea. Esses achados reforçam que a PBM atua estimulando precocemente o metabolismo osteoblástico e acelerando o processo de reparo alveolar.

De forma semelhante, Noda et al. (2016) observaram que a utilização de laser diodo pulsado de alta frequência resultou em maior fechamento epitelial, aumento do volume ósseo trabecular e maior expressão de marcadores de proliferação e diferenciação osteoblástica, como OCN e antígeno nuclear de células em proliferação (PCNA) PCNA, confirmando que a PBM exerce papel relevante principalmente nas fases iniciais da cicatrização.

A dependência dos efeitos biológicos em relação aos parâmetros de irradiação também foi demonstrada por Park et al. (2015), que identificaram aumento tempo-dependente na expressão de fator de transcrição relacionado a Runt 2 (RUNX-2), colágeno tipo I, osteocalcina (OCN) e VEGF com maior duração de exposição à luz. Isto indica que ajustes na dose e no tempo de aplicação influenciam diretamente o potencial osteogênico da terapia.

Estudos comparativos entre comprimentos de onda reforçam a relevância da penetração tecidual na resposta biológica. Fan et al. (2024) observaram maior angiogênese e expressão gênica osteogênica com laser de 980 nm em comparação ao 810 nm, sugerindo maior impacto molecular do infravermelho próximo nas fases iniciais da regeneração. Em modelos de comprometimento sistêmico, como diabetes, Dalirsani et al. (2021; 2024) demonstraram que comprimentos de onda na faixa de 808 nm — isoladamente ou combinados — promovem maior formação óssea, aumento de vascularização e redução de fibrose, indicando que a PBM pode atenuar condições que retardam a cicatrização.

Adicionalmente, a FBM mostrou efeitos benéficos em contextos de risco para osteonecrose e atraso reparacional. Gonçalves et al. (2023) evidenciaram aumento de osso

vital e melhora da microarquitetura óssea em animais tratados com bisfosfonato, enquanto Korany et al. (2012) observaram maior deposição de colágeno e formação óssea em alvéolos previamente irradiados. Por outro lado, em modelo de osteoporose severa associada à periodontite apical, Troian-Michel et al. (2025) demonstraram que a FBM isolada não foi suficiente para reverter completamente o prejuízo reparacional, indicando limites terapêuticos em condições sistêmicas avançadas.

A comparação entre fontes de luz também evidencia que tanto laser quanto LED podem ser eficazes. De Lima Luna et al. (2025) mostraram que o LED promove resposta óssea mais precoce, enquanto o laser favorece maior maturação óssea tardia, sugerindo perfis biológicos distintos dependendo da coerência da luz. Em conjunto, essas evidências indicam que a fotobiomodulação atua por meio da modulação inflamatória, estímulo à atividade osteoblástica, organização da matriz extracelular, aumento do volume ósseo/volume total (BV/TV) e regulação do processo de remodelação óssea. Entretanto, a heterogeneidade dos parâmetros de irradiação e protocolos experimentais reforça a necessidade de padronização metodológica e da realização de ensaios clínicos adicionais para consolidação de recomendações baseadas em evidência.

Organização e maturação da matriz colágena no reparo ósseo alveolar e sua avaliação por meio da técnica de coloração com Picrosirius Red

Sabe-se que o tecido ósseo apresenta componentes orgânicos e inorgânicos. Dentre os conteúdos orgânicos do tecido ósseo, predomina o colágeno na matriz orgânica - em especial o tipo I. Esta matriz de colágeno desempenha papel fundamental na estrutura e também no mecanismo de mineralização que ocorre de forma dinâmica neste tecido. Em relação à mineralização, ela inicia-se com a liberação de vesículas da matriz pelos osteoblastos, contendo íons cálcio e fosfato, que favorecem a formação inicial de cristais de hidroxiapatita em escala nanométrica. À medida que esses cristais aumentam de volume, ocorre o rompimento das vesículas e sua deposição ao longo das fibras colágenas previamente sintetizadas pelos osteoblastos, promovendo a consolidação da matriz mineralizada (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2023).

Relembrando a sequência temporal da neoformação óssea do alvéolo dentário, segundo Hupp (2021), que segue as etapas de inflamação, seguida pela epitelização, depois pela fibroplasia e, por fim, a remodelação. Durante a fase de fibroplasia, há intensa deposição de fibras colágenas delgadas que constituem o arcabouço para a subsequente mineralização, enquanto na fase de remodelação ocorre reorganização, espessamento e maturação

progressiva dessas fibras, juntamente com mineralização de parte delas, culminando na formação de trabéculas ósseas mais espessas e estruturalmente estáveis. Assim, a adequada deposição e maturação da matriz colágena representam eventos centrais para a qualidade do osso neoformado no alvéolo dentário.

Para a análise da organização e maturação das fibras colágenas, faz-se necessária a utilização de abordagens metodológicas capazes de quantificar o tecido ósseo neoformado e também qualificar sua organização estrutural, especialmente no que se refere à matriz colágena. Nesse contexto, a técnica de coloração de tecidos histológicos com picrosirius red permite avaliar o colágeno. Ainda, ela pode ser avaliada sob microscópio de luz polarizada com fundo escuro e contribui para a identificação de fibras fortemente birrefringentes, que estão em vermelho e representam um colágeno mais denso, e fibras fracamente birrefringentes, que são verde-alaranjadas e caracterizam um colágeno mais imaturo (GITIRANA, 2024).

Dessa forma, a análise do colágeno por picrosirius red e picrosirius sob luz polarizada podem configurar-se como ferramentas adequadas para investigar a qualidade estrutural do osso neoformado, permitindo estudar se a fotobiomodulação influencia não apenas a quantidade de tecido formado, mas também o padrão de organização e maturação da matriz colágena em modelo experimental que simula condições sistêmicas adversas, como o caso da osteoporose. Tal abordagem contribui para ampliar a interpretação dos processos de reparo ósseo, possibilitando uma análise mais refinada da qualidade do tecido formado frente a intervenções terapêuticas, como a fotobiomodulação, em modelos experimentais. Para fins de melhor entendimento das evidências científicas disponíveis, foram construídas a Tabela 1 e 2 para sumarização dos dados sobre estudos pré-clínicos in vivo e estudos clínicos em humanos, respectivamente, que avaliaram os efeitos da fotobiomodulação no reparo de cicatrização óssea alveolar.

2. OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Comparar os efeitos de diferentes protocolos de fotobiomodulação no padrão histomorfométrico do reparo ósseo alveolar em ratas com osteoporose induzida.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar comparativamente a área ocupada por fibras colágenas na matriz óssea alveolar nos períodos de 14 e 28 dias após a exodontia nos diferentes grupos experimentais;

Avaliar e comparar nos diferentes grupos o arranjo e a organização das fibras colágenas na matriz óssea por meio da coloração de Picrosirius red e microscopia de luz polarizada;

Comparar a frequência de matrizes com diferentes espessuras de fibras colágenas entre os grupos submetidos aos diferentes protocolos de FBM.

3. JUSTIFICATIVA

Diante da elevada prevalência de extrações dentárias, do envelhecimento populacional global e da alta incidência de osteoporose em mulheres idosas, torna-se essencial compreender como essa condição pode afetar o reparo ósseo alveolar. Embora existam evidências sobre o comprometimento da cicatrização óssea em modelos osteoporóticos, ainda são escassos os estudos que investigam intervenções terapêuticas capazes de modular positivamente esse processo. A FBM tem se mostrado promissora na regeneração óssea, no controle da inflamação e na aceleração da cicatrização. No entanto, há uma ampla variabilidade nos protocolos utilizados e poucos dados sobre sua aplicação em indivíduos osteoporóticos, principalmente em modelos com confirmação óssea maxilar da doença. Além disso, não há consenso sobre qual fonte de luz e parâmetros irradiantes seriam mais eficazes no contexto do reparo ósseo comprometido. Assim, este estudo justifica-se pela necessidade de avançar no conhecimento sobre os efeitos da fotobiomodulação no reparo alveolar em condições osteoporóticas, contribuindo para a construção de protocolos clínicos baseados em evidências. A utilização de análises histomorfométricas permite uma avaliação quantitativa e

precisa da neoformação óssea, sendo fundamental para validar a eficácia dos diferentes protocolos testados.

4. HIPÓTESES

4.1 HIPÓTESE DE NULIDADE

A hipótese nula é que não há diferença estatisticamente significativa no reparo ósseo alveolar entre grupos tratados com os diferentes protocolos de laser em comparação ao grupo controle negativo.

4.2 HIPÓTESE ALTERNATIVA

Espera-se que haja diferença estatisticamente significativa no reparo ósseo alveolar em pelo menos um dos grupos tratados com protocolo de laser quando comparado ao grupo controle negativo.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 DELINEAMENTO

Esta pesquisa é um estudo experimental, controlado, em modelo animal.

O presente estudo constitui um subprojeto vinculado ao projeto de pesquisa guarda-chuva intitulado “Reparo ósseo de alvéolos dentários pós-extração em ratas ovariectomizadas: uma revisão sistemática da literatura e análise do efeito de diferentes protocolos de fotobiomodulação”, desenvolvido no Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O projeto principal foi elaborado com o objetivo de investigar os efeitos da fotobiomodulação sobre o reparo ósseo em diferentes condições experimentais, sendo que esta dissertação aborda especificamente a comparação entre diferentes protocolos de irradiação no padrão histomorfométrico do reparo ósseo alveolar em ratas com osteoporose induzida.

5.2 LOCAL DE ORIGEM DO ESTUDO

O estudo foi realizado primordialmente na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (FO-UFRGS), no Departamento de Odontologia Conservadora, área de Patologia Bucal.

5.3 LOCAIS DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO

O processamento histológico e a confecção das lâminas coradas pela técnica de hematoxilina e eosina (HE) foram realizados no Laboratório de Patologia Bucal da UFRGS. As lâminas coradas pela técnica de Picrosirius Red foram preparadas no laboratório do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS/UFRGS). A captura das imagens histológicas foi realizada na Unidade de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

5.4 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo integra um projeto guarda-chuva aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sob parecer nº 2020-0238, do qual deriva este subprojeto. Ele também foi encaminhado à Comissão de Pesquisa (COMPESQ) da Faculdade de Odontologia da UFRGS.

5.5 AMOSTRA

Foram utilizadas amostras provenientes do estudo de doutorado intitulado “Reparo ósseo de alvéolos dentários pós-extração em ratas ovariectomizadas: uma revisão sistemática da literatura e análise do efeito de diferentes protocolos de fotobiomodulação”, conduzido pela Drª. Bruna Barcelos Só.

As amostras consistiram em maxilas de ratas fêmeas (*Rattus norvegicus albinus, linhagem Wistar*), previamente divididas em cinco grupos experimentais (Tabela 3):

- Grupo SHAM (GS): submetido à cirurgia simulada de ovariectomia e de exodontia, sem tratamento.
- Grupo Controle Osteoporose (OVX): submetido à ovariectomia e à exodontia, sem tratamento.
- Grupo Laser de baixa potência (LLL): submetido à ovariectomia, à exodontia e ao tratamento intraoral com laser GaAlAs 808 nm, 0,1 W (Laser DMC Therapy EC).
- Grupo Laser de alta potência desfocado GeminiEVO® Dual 1W (DHPL1W): submetido à ovariectomia, à exodontia e à irradiação extraoral com laser de diodo 810 + 980 nm, 1W,.

- Grupo Laser de alta potência desfocado GeminiEVO® Dual 2W (DHPL2W): submetido à ovariectomia, à exodontia e à irradiação extraoral com laser de diodo 810 + 980 nm, 2 W.

Os protocolos de fotobiomodulação foram aplicados três vezes por semana, sendo os dias de aplicação segunda, quarta e sexta-feira. Os períodos pós-operatórios analisados foram de 14 e 28 dias. Os protocolos e os parâmetros utilizados estão descritos na tabela 4.

Com base em um cálculo amostral prévio, o tamanho da amostra foi definido em 60 ratas, distribuídas uniformemente em cinco grupos experimentais(n = 12) por grupo). Porém, duas ratas foram perdidas durante o procedimento, no grupo LLL com pós-operatório de 14 dias e no grupo DHPL1W com pós-operatório de 28 dias. Ao final, foram analisados 58 pares de maxilas (116 maxilas). Para este estudo, foram selecionadas entre quatro e cinco unidades por grupo experimental, totalizando 47 amostras avaliadas. Os grupos que contiveram 4 unidades foram o OVX de 14 dias de pós-operatório e o grupo LLL com 28 dias de pós-operatório. O planejamento inicial previa cinco unidades por grupo (50 amostras), porém, considerando a proximidade do término do período do mestrado e a obtenção de resultados estatisticamente consistentes, optou-se pelo encerramento antecipado da seleção amostral.

TABELA 3. DIVISÃO DAS AMOSTRAS DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

	SHAM	**OVX**	**LLL**	**DHPL1W**	**DHPL2W**
Ovariectomia?	Não	Sim	Sim	Sim	Sim
Extração dentária?	Não	Sim	Sim	Sim	Sim
Tratamento com laser?	Não	Não	Sim	Sim	Sim
Região de aplicação	-	-	Intraoral	Extraoral	Extraoral
N amostral	14 e 28D N=5	14D N=4/ 28D N=5	14D N=5/28D N=4		14D N=4/ 28D N=5

Nota: 14D- 14 dias de pós-operatório/ 28D- 28 dias de pós-operatório/ N=5- número de ratas por grupo amostral é de 5/ N=4- número de ratas por grupo amostral é 4.

TABELA 4. PARÂMETROS DE FBM UTILIZADOS NOS PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Parâmetros	LLL	DHPL1W	DHPL2W
Tipo de fonte	Laser diodo GaAlAs	Laser diodo GaAlAs	Laser diodo GaAlAs
Comprimento de onda (nm)	808±10	810 + 980 (50 %/50 %)	810 + 980 (50 %/50 %)
Modo de operação	Contínuo	Superpulsado	Superpulsado
Frequência (Hz)	50/60	50	50
Duração do pulso (ms)	Contínuo	2	2
Potência de pico (W)	0.1	100	100
Potência média (W)	0,1	1	2
Área do spot (cm^2)	0.028	4.92	4.92
Formato do feixe	Redondo	Redondo	Redondo
Irradiância (W/cm^2)	3.57	0.203	0.407
Fluência (J/cm^2)	107	6.1	6.1

Tempo de exposição (s)	30	30	15
Energia total por ponto (J)	3	30	30
Número de pontos irradiados	1	1	1
Técnica de aplicação	Intraoral, contato	Extraoral, desfocado	Extraoral, desfocado
Tipo de aplicação	Pontual	Pontual	Pontual
Equipamento	DMC Therapy EC (DMC)	GeminiEVO® (Ultradent)	GeminiEVO® (Ultradent)
Frequência das sessões	Segunda, quarta e sexta-feira	Segunda, quarta e sexta-feira	Segunda, quarta e sexta-feira
Períodos avaliados	14 e 28 dias	14 e 28 dias	14 e 28 dias

5.6 HISTOTÉCNICA

As peças encontravam-se previamente fixadas em solução de formalina a 10%. Durante a etapa macroscópica, foram removidos os excessos ósseos e tecidos adjacentes, mantendo-se apenas a porção alveolar e o osso basal das amostras, que foram acondicionadas em cassetes identificados conforme o protocolo original do estudo, com acréscimo da porção sagital de cada unidade amostral — direta ou esquerda. A região de interesse para a análise histológica determinada foi o centro da peça e o corte realizado foi transversal para obter uma imagem coronal para envolver toda a região da coroa até o ápice do dente. A escolha se baseou de acordo com estudos anteriores, como de Biguetti (2023) e colaboradores e Livizuto e colaboradores (2010).

A descalcificação foi realizada por imersão em solução de Anna Morse (citrato de sódio a 20% associado a ácido fórmico a 30%, na proporção 1:1), com monitoramento diário da consistência e trocas regulares da solução. Após a descalcificação, os espécimes foram lavados em água corrente, submersos em água corrente por 30 minutos, desidratados em séries crescentes de álcool, diafanizados em xilol e incluídos em parafina tipo paraplast.

Foram obtidos cortes histológicos com espessura de 3 μm em micrótomo rotatório. As lâminas foram coradas pelas técnicas de hematoxilina e eosina (HE), conforme protocolo do Laboratório de Patologia Bucal da FO-UFRGS, e pela técnica especial de Picrosirius Red, realizada no laboratório do ICBS/UFRGS.

5.7 COLORAÇÃO POR HEMATOXILINA E EOSINA (HE) E MONTAGEM HISTOLÓGICA

A coloração em HE da lâmina confeccionada foi realizada conforme o protocolo do Laboratório de Patologia Bucal da FO-UFRGS, que é realizado de acordo com as seguintes etapas:

1) Imersão total em xilol por 15 minutos;
2) Imersão total em xilol por 10 minutos;
3) Imersão total em álcool por 5 minutos;
4) Imersão total em álcool por 5 minutos;
5) Lavagem em água - 1 passagem;
6) Imersão total em solução de hematoxilina por 3 minutos;
7) Lavagem em água - 3 passagens;
8) Imersão total em eosina;
9) Imersão total em álcool por 2 minutos;

10) Imersão total em álcool por 2 minutos;
11) Imersão total em álcool por 2 minutos;
12) Imersão total em xilol por 10 minutos;
13) Imersão total em xilol por 10 minutos.

Após a finalização do processamento, procedeu-se à montagem das lâminas por meio da aplicação de uma gota de meio de montagem Entellan® sobre o corte histológico, seguida da colocação cuidadosa da lamínula. A lamínula foi posicionada de forma gradual e inclinada, permitindo o espalhamento uniforme do meio e evitando a formação de bolhas de ar. Esse procedimento garantiu a adequada vedação do material, preservação da coloração e qualidade óptica da preparação para análise microscópica.

5.8 COLORAÇÃO POR PICROSIRIUS RED (PSR) E MONTAGEM HISTOLÓGICA

A coloração por Picrosirius Red foi realizada de acordo com as instruções do fabricante (EasyPath Diagnósticos, código EP-11-20011).

Após a finalização do processamento, as lâminas foram submetidas à montagem histológica para preservação do material e adequada visualização microscópica de forma semelhante ao passo de montagem histológica da coloração por HE.

5.9 CAPTURA DAS IMAGENS DAS LÂMINAS HISTOLÓGICAS

A captura foi realizada com microscópio óptico Olympus BX51. Foram capturadas imagens das lâminas histológicas com coloração HE, PSR e PSR sob luz polarizada das regiões distal, central e mesial dos alvéolos dentários com ampliação de 10x na lente objetiva do microscópio óptico **(Figura 3)**. Após a captura das imagens, as fotos das lâminas de picrosirius foram utilizadas para estabelecer o planejamento da área morfológica a ser descrita e quantificada.

FIGURA 3. ILUSTRAÇÃO DA ETAPA DE FOTOGRAFIA DAS REGIÕES DAS LÂMINAS HE, PICROSIRIUS RED E PICROSIRIUS COM POLARIZAÇÃO

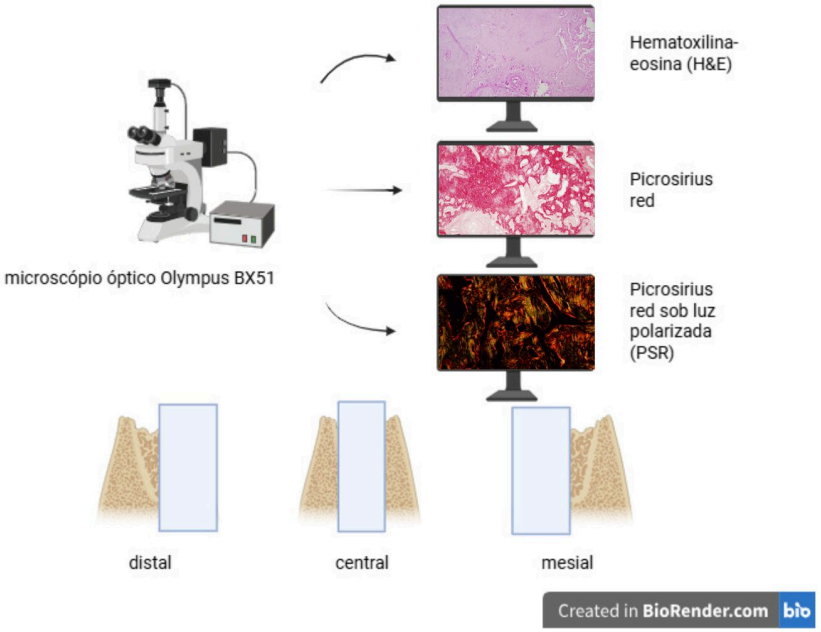


Figura criada usando BioRender.com.

5.10 ANÁLISE MICROSCÓPICA DESCRITIVA

Foram selecionadas imagens representativas nas colorações HE e Picrosirius sob luz polarizada, as quais sofreram análise histológica. A avaliação foi realizada por um avaliador, o qual foi cegado, e consistiu na análise da organização e da maturação do conteúdo orgânico principal das trabéculas ósseas do alvéolo e osso maxilar. Os seguintes critérios foram observados na coloração HE: neoformação óssea com trabéculas imaturas interconectadas e com espaços medulares de diferentes dimensões - podendo ter trabéculas mais ou menos delgadas e espaços medulares preenchidos com mais ou com menos tecido conjuntivo; presença ou ausência de osteócitos incorporados na matriz mineralizada; atividade osteoblástica periférica; celularidade e vascularização do tecido conjuntivo e presença ou ausência de patologia e infiltrado inflamatório. Já, na coloração especial PSR sob luz polarizada, os critérios observados foram os mesmos, associados à análise da birrefringência das fibras colágenas das trabéculas para inferência do seu grau de maturação.

5.11 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

Para realizar a quantificação, foram realizadas algumas etapas. Inicialmente, planejou-se a escolha das imagens representativas por grupo experimental. Para isto, foi elaborada uma sequência de slides utilizando o Google Slides sendo um slide para cada

amostra, o qual conteve as três regiões fotografadas posicionadas lado a lado - mesial, central e distal. Com as três fotos juntas de cada amostra no mesmo slide, foi escolhida a melhor região para a quantificação de cada amostra. Estas imagens escolhidas foram transportadas para o *software* ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) versão 1.54h, que possibilitou a quantificação das áreas de fibras colágenas correspondentes às trabéculas ósseas definidas anteriormente. Os resultados obtidos foram armazenados em planilhas no *Google Sheets*.

Posteriormente, foi realizada uma análise quantitativa e qualitativa do colágeno das trabéculas ósseas. A análise quantitativa consistiu na avaliação da média da área óssea dos grupos estudados nos dois períodos pós-operatórios com posterior realização de uma figura gráfica e a análise qualitativa consistiu na descrição microscópica das imagens fotografadas com a síntese do laudo e montagem de uma prancha fotográfica representativa.

5.11.1 ANÁLISE DA ÁREA TOTAL DE COLÁGENO DAS TRABÉCULAS ÓSSEAS MAXILARES

Primeiramente, foi realizada a avaliação das imagens obtidas por microscópio eletrônico e identificação de uma imagem representativa de cada grupo na coloração de PSR sob luz polarizada. Isto possibilitou definir a quantificação absoluta das fibras colágenas a fim de estimar sua área total.

Esta imagem foi transportada para o *software* ImageJ, desenvolvido pelo National Institutes of Health (Bethesda, MD, USA), versão 1.54h, onde a imagem foi convertida em uma imagem com formato 8-bit. Em seguida, foi realizado o ajuste e ênfase do brilho e do contraste para melhor definição da fibras de colágenos correspondente às trabéculas ósseas. Posteriormente, após foi utilizada a ferramenta Threshold para segmentação de imagens na faixa de 49 a 70, delimitando as regiões de interesse do fundo com base na intensidade de luz branca dos pixels das fibras colágenas, mantendo-se a padronização em relação à imagem original.

A partir da imagem fornecida pelo *Threshold*, foi utilizada a ferramenta *Analyze Particles* para mensurar a área de cada fibra. A faixa da área das partículas analisadas estabelecida foi de 30 μm ao infinito, definida através do método empírico, o qual notou-se que o limite mínimo para ser quantificado poderia ser 30. Ao final, foi gerada uma máscara com a identificação numérica de cada partícula medida. Esta máscara, correspondente à imagem final processada, também forneceu uma planilha contendo os dados individualizados de cada fibra, a qual foi copiada e transportada para o *Google Sheets*.

Como síntese breve do protocolo da análise no *software*, a sequência das etapas realizadas na análise da imagem da lâmina corada em PSR sob luz polarizada, utilizando o software ImageJ, está representada na **Figura 4**.

Figura 4. QUANTIFICAÇÃO DA FOTO REPRESENTATIVA DE CADA GRUPO EXPERIMENTAL ATRAVÉS DA IMAGEM OBTIDA DA LÂMINA COM COLORAÇÃO PICROSIRIUS RED SOB LUZ POLARIZADA

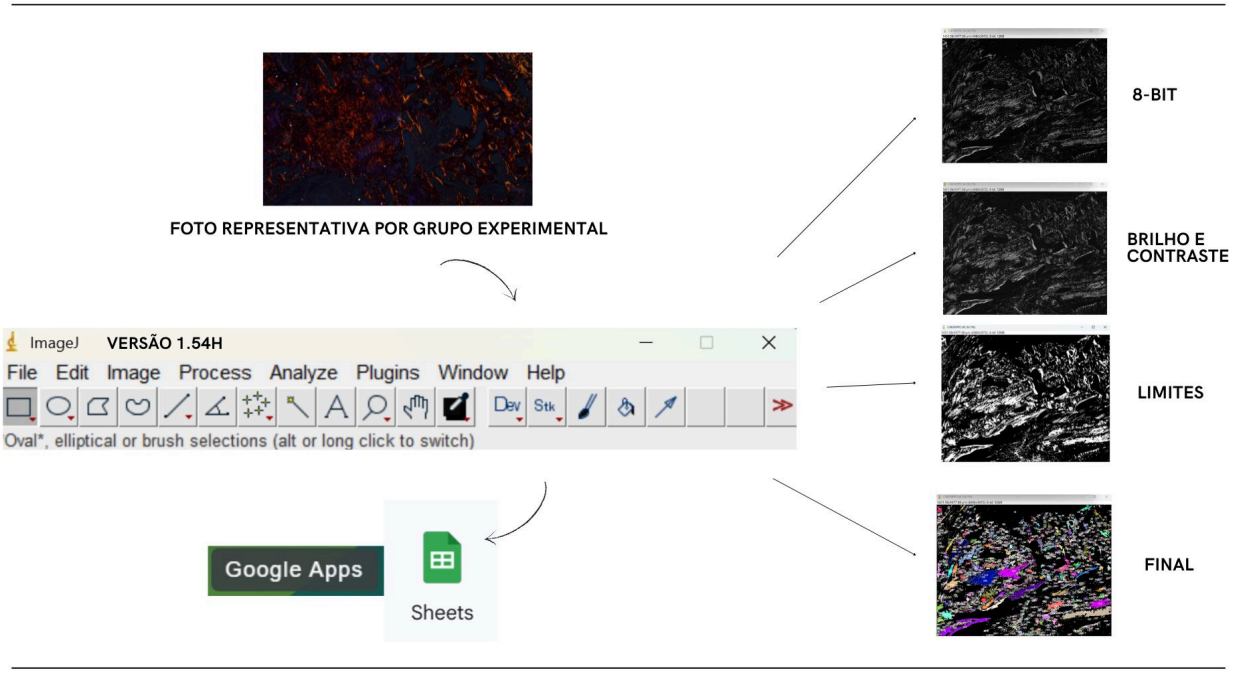


Figura de autoria própria,
com auxílio da Inteligência Artificial do Canva.

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as planilhas das imagens representativas foram usadas para análise quantitativa no *software* GraphPad Prism 8.0.1, desenvolvido pela GraphPad Software, empregando-se o teste estatístico ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Tukey.

Preliminarmente, foram calculadas as médias e os desvios-padrão das variáveis analisadas. Com os resultados, foi feita uma análise descritiva da distribuição dos dados através da análise visual dessas médias e desses desvios-padrão. Por apresentarem homogeneidade, foi escolhido o teste ANOVA de uma via para a avaliar se havia diferenças significativas entre as médias de colágeno total das trabéculas ósseas dos grupos nos dois períodos de pós-operatório independentes. Valores discrepantes (outliers) identificados por critério estatístico previamente estabelecido resultaram na remoção de todos os dados da unidade amostral.

Consecutivamente, com auxílio do *software* GraphPad Prism 8.0.1, foi realizado o teste ANOVA de uma via seguido do post-hoc de Tukey com nível de significância adotado de 5% ($p<0,05$). Os resultados quantitativos foram agrupados e apresentados visualmente como figuras, sendo elas de gráficos e de tabelas.