

**UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**EDUARDO DONATO ALVES**

**FOTOBIMODULAÇÃO EM RATAS INDUZIDAS À SÍNDROME DO OVÁRIO  
POLICÍSTICO: ESTUDOS IN VIVO E IN VITRO**

**Araraquara - SP**

**2019**

**EDUARDO DONATO ALVES**

**FOTOBIMODULAÇÃO EM RATAS INDUZIDAS À SÍNDROME DO OVÁRIO  
POLICÍSTICO: ESTUDOS IN VIVO E IN VITRO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal da Universidade de Araraquara – UNIARA – como parte do requerimento para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

**Área de concentração:** Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal

**Orientador:** Prof. Dr. Luís Henrique Montezor

**Araraquara - SP**

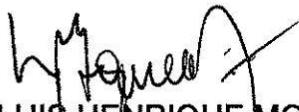
**2019**

## EDUARDO DONATO ALVES

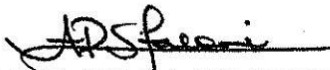
Dissertação apresentada a Universidade de Araraquara - UNIARA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Araraquara, 22 de janeiro de 2020.

### BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. LUIS HENRIQUE MONTREZOR (Orientador)  
Universidade de Araraquara - UNIARA



Profª Drª ANA PAULA DE SOUZA FALONI  
Universidade de Araraquara - UNIARA



Drª CAMILA LINHARES TAXINI  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal - UNESP.

## FICHA CATALOGRÁFICA

A478f Alves, Eduardo Donato

Fotobiomodulação em ratas induzidas à síndrome do ovário policístico: estudos in vivo e em vitro/Eduardo Donato Alves. – Araraquara: Universidade de Araraquara, 2020.

67f.

Dissertação (Mestrado)- Curso de Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal – Universidade de Araraquara

Orientador: Prof. Dr. Luís Henrique Montrezor

1. Biotecnologia. 2. Testosterona. 3. Osteoblasto. 4. Medula óssea.  
5. Ovário. I. Título.

CDU 577.1:66

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho em memória de meu pai, Agnaldo Donato Alves, que faleceu no dia 30 de junho de 2019, 1 mês antes do meu exame de qualificação e também em memória de minha amiga Profa. Dra. Marisa Chahud, que partiu no dia 17 de fevereiro de 2020.

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente à Profa. Dra. Teresa Kazuko Muraoka, Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas da Uniara, se não fosse por ela eu não teria feito esse trabalho. À minha mãe, Ivone Ferreira Donato Alves e ao meu namorado Bruno Felipe Oliveira por todo apoio que me deram nesse tempo.

Agradeço ao meu orientador, o Prof. Dr. Luís Henrique Montezor, pela paciência e por toda a dedicação comigo e com o todo o projeto.

Agradeço aos alunos do Curso de Ciências Biológicas que me acompanharam durante os experimentos: Rebeca Gall Amin, Gabriel Rodrigues Piccart, Kamile Bausells Ferrari, Matheus Daniel Lollato, Daniel Costa de Carvalho, João Antonio Donadoni, Matheus Heiderich Moreno e João Vitor Zaccaro Valala. Desse trabalho surgiram grandes amizades.

Agradeço às professoras que participaram como Banca de Avaliação na Qualificação: Profa. Dra. Bruna Galdorfini Chiari Andréo e Profa. Dra. Mônica Rosas da Costa lemma. Agradeço também às professoras que participaram da Banca de Avaliação na Defesa do trabalho: Profa. Dra. Ana Paula de Souza Faloni e a Profa. Dra. Camila Linhares Taxini.

Agradeço aos professores que colaboraram com a pesquisa: Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto, Profa. Dra. Janete Aparecida Anselmo-Franci e Prof. Dr. Jorge Alberto Achcar.

Agradeço às funcionárias da Uniara, Aline Cristina Bertato Calseverino, Sandra Regina Pavaneli, Me. Renata Aquino de Carvalho e Laura Comito Brabetz por todo auxílio que me deram.

Agradeço aos meus amigos Prof. Dr. Olavo Nardy, Me. Gabriela Gomes Cardoso Gastaldi, Luiz Guilherme Dércore Benevenuto e Me. Cesar Augusto Feliciano por todo apoio.

Agradeço à Universidade de Araraquara - UNIARA, ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal - QUIMMERA, aos órgãos de fomento: Capes, CNPq, Fapesp (processo: 2016/02811-4) e ao Curso de Biologia da UNIARA.

# FOTOBIMODULAÇÃO EM RATAS INDUZIDAS À SÍNDROME DO OVÁRIO POLICÍSTICO: ESTUDOS IN VIVO E IN VITRO

## Resumo

A Síndrome do Ovário Policístico (SOP) é uma endocrinopatia que afeta aproximadamente 10% das mulheres quando chegam na idade reprodutiva. O desequilíbrio da dinâmica óssea pode desencadear patologias como osteopetrose, osteopenia e osteoporose. A fotobimodulação (FBM) é uma terapia que utiliza formas não ionizantes de fontes de luz, nos parâmetros de espectro de luz visível e infravermelho. Diante de informações relacionadas às alterações ovarianas e sistêmicas decorrentes da SOP, a utilização da FBM surge como uma possibilidade de restabelecimento das atividades ovarianas. O objetivo do trabalho foi estudar os efeitos da FBM sobre as atividades ovarianas in vivo e o comportamento de osteoblastos in vitro, em ratas Wistar adultas induzidas à SOP. As ratas foram induzidas à SOP com dose única de Valerato de Estradiol (VE) e separadas em grupos: Controle, SOP, Laser e SOP/Laser para três tempos experimentais: 30, 45 e 60 dias. O laser foi aplicado no comprimento de onda de 830 nm na potência de 60 mW, numa dose de 1 Joules(J)/ponto, por 18 segundos, 3 vezes por semana. Ao final de cada período experimental, após a eutanásia de cada grupo, os ovários foram coletados para análises do índice gonadosomático e da massa ovariana. O plasma sanguíneo foi utilizado para analisar os níveis de glicose, insulina e testosterona. Os fêmures foram utilizados para obtenção das células tronco mesenquimais. As células foram mantidas em cultura por 10 dias e, posteriormente diferenciadas em osteoblastos, na ausência e na presença de testosterona, nas concentrações de  $10^{-3}$  M e  $10^{-9}$  M. Analisou-se a multiplicação e a diferenciação celular, a formação de nódulos de mineralização e quantificou-se a fosfatase alcalina para dois períodos de cultura, 7 e 14 dias. Conclui-se, com os resultados do presente trabalho, que o modelo de indução à SOP por VE foi eficaz, demonstrando os sinais referentes à síndrome. A FBM auxiliou na regulação dos níveis plasmáticos de testosterona, insulina e glicose, modulou o ganho de massa corporal e reparou as atividades ovarianas das ratas induzidas à SOP e submetidas à FBM. Além disso, a FBM modulou, ora estimulando ora inibindo, as atividades das células ósseas de forma direta e indireta (tanto in vivo como in vitro).

**Palavras-chave:** Biotecnologia; Testosterona; Osteoblasto; Medula Óssea; Ovário.

# PHOTOBIMODULATION IN RATS INDUCED TO POLYCYSTICAL OVARY SYNDROME: IN VIVO AND IN VITRO STUDIES

## Abstract

Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) is an endocrinopathy that affects approximately 10% of women when they reach reproductive age. The imbalance of bone dynamics can trigger pathologies such as osteopetrosis, osteopenia and osteoporosis. Photobiomodulation (FBM) is a therapy that uses non-ionizing forms of light sources, in the parameters of visible and infrared light spectrum. In the face of information related to ovarian and systemic changes resulting from PCOS, the use of FBM appears as a possibility to reestablish ovarian activities. The objective of the work was to study the effects of FBM on ovarian activities in vivo and the behavior of osteoblasts in vitro, in adult Wistar rats induced by PCOS. The rats were induced to PCOS with a single dose of Estradiol Valerate and separated into groups: Control, PCOS, Laser and PCOS / Laser for three experimental times: 30, 45 and 60 days. The laser was applied at a wavelength of 830 nm at a power of 60 mW, in a dose of 1 Joules (J) / point, for 18 seconds, 3 times a week. At the end of each experimental period, after the euthanasia of each group, the ovaries were collected for analysis of the gonadosomatic index and the ovarian mass. Blood plasma was used to analyze glucose, insulin and testosterone levels. Femurs were used to obtain mesenchymal stem cells. The cells were maintained in culture for 10 days and later differentiated into osteoblasts, in the absence and presence of testosterone, in concentrations of  $10^{-3}$  M and  $10^{-9}$  M. Cell multiplication and differentiation, formation of mineralization nodules and alkaline phosphatase was quantified for two culture periods, 7 and 14 days. It is concluded, with the results of the present study, that the model of LOS PCOS induction was effective, demonstrating the signs referring to the syndrome. FBM helped in the regulation of plasma testosterone, insulin and glucose levels, modulated body mass gain and repaired the ovarian activities of rats induced to PCOS and submitted to FBM. In addition, FBM modulated, sometimes stimulating and sometimes inhibiting, the activities of bone cells directly and indirectly (both in vivo and in vitro).

**Keywords:** Biotechnology; Testosterone; Osteoblast; Bone Marrow; Ovary.



## Sumário

<b>1 – Introdução .....</b>	<b>11</b>
<b>1.1 – Síndrome do Ovário Policístico .....</b>	<b>11</b>
<b>1.2 – Dinâmica óssea e esteroides sexuais.....</b>	<b>12</b>
<b>1.3 - Modelos animais para estudo da Síndrome do Ovário Policístico (SOP)..</b>	<b>14</b>
<b>1.4 – Fotobiomodulação .....</b>	<b>16</b>
<b>2. Justificativa.....</b>	<b>17</b>
<b>3 - Objetivos .....</b>	<b>18</b>
<b>3.1 - Geral.....</b>	<b>18</b>
<b>3.2 - Específicos.....</b>	<b>18</b>
<b>4 – Metodologia .....</b>	<b>19</b>
<b>4.1. Experimentos in vivo .....</b>	<b>19</b>
<b>4.1.1. Indução da SOP .....</b>	<b>20</b>
<b>4.1.2. Fotobiomodulação com Laser de baixa intensidade.....</b>	<b>20</b>
<b>4.1.3. Protocolo Experimental.....</b>	<b>20</b>
<b>4.1.4. Eutanásia.....</b>	<b>21</b>
<b>4.1.5. Coleta de materiais biológicos .....</b>	<b>21</b>
<b>4.1.6. Índice Gonadossomático - IGS .....</b>	<b>21</b>
<b>4.1.7. Dosagem plasmática de Testosterona .....</b>	<b>22</b>
<b>4.1.8. Dosagem da Glicose plasmática.....</b>	<b>22</b>
<b>4.1.9. Dosagem da Insulina plasmática .....</b>	<b>22</b>
<b>4.2. Experimentos in vitro.....</b>	<b>22</b>
<b>4.2.1. Obtenção das CTM e diferenciação em osteoblastos .....</b>	<b>22</b>
<b>4.2.2. Contagem celular, viabilidade celular e formação de nódulos de mineralização .....</b>	<b>23</b>
<b>4.2.3. Fosfatase alcalina .....</b>	<b>24</b>
<b>4.3. Análise Estatística .....</b>	<b>25</b>
<b>5 – Resultados .....</b>	<b>25</b>
<b>5.1. Resultados in vivo.....</b>	<b>25</b>
<b>5.2. Resultados in vitro .....</b>	<b>38</b>
<b>6 – Discussão.....</b>	<b>53</b>
<b>7 – Conclusões .....</b>	<b>58</b>
<b>8 – Anexos.....</b>	<b>59</b>
<b>9 – Referências .....</b>	<b>60</b>

## Lista de abreviaturas e Siglas

**C** – Grupo controle

**Ca<sup>2+</sup>** - Íons de Cálcio

**CEUA-UNIARA** – Comitê de Ética no Uso de Animais – Universidade de Araraquara

**CO<sub>2</sub>** – Gás Carbônico

**CONCEA** – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

**CTM** – Células tronco mesenquimais

**CYP11A1** – Enzima de Clivagem da Cadeia Lateral do Colesterol (P450scc)

**CYP17** – 17 $\alpha$ -hidroxilase

**DHT** – Di-Hidrotestosterona

**DMEM** – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

**E2** – Estradiol

**EA** – Eletro-acupuntura

**FBM** – Fotobiomodulação

**HAM** – Hormônio anti-Mülleriano

**HE** - Hematoxilina-Eosina

**HSB3B** – 3  $\beta$ -hidroxisteroide desidrogenase

**IR** – Infravermelho

**L** – Grupo de tratamento com laser

**LEDs** – Diodos emissores de luz

**LH** – Hormônio Luteinizante

**LLLT** – Laser de baixa intensidade

**NaHCO<sub>3</sub>** – Bicarbonato de Sódio

**NO** – Óxido nítrico

**P4** – Progesterona

**pH** – Potencial Hidrogeniônico

**RANKL** – Proteína ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B

**RIE** – radioimunoensaio

**RUNX -2** – Fator de transcrição relacionado ao Runx 2

**S** – Grupo induzido à SOP

**SL** – Grupo induzido à SOP e tratado com laser

**SOP** – Síndrome do Ovário Policístico

**STAR** – Proteína reguladora aguda da esteroidogênese

**T** – Testosterona

**VE** – Valerato de Estradiol

## **1 – Introdução**

### **1.1 – Síndrome do Ovário Policístico**

A SOP, também conhecida como Síndrome de Stein-Leventhal, recebe esse nome por ter sido relatada pela primeira vez em 1935 por Stein e Leventhal (Carmina et al., 2006). Essa doença é uma endocrinopatia que afeta aproximadamente 10% das mulheres quando chegam na idade reprodutiva (Eherman, 2012; Azziz, 2017).

Os sintomas mais comuns da SOP são hirsutismo, obesidade, acne, alopecia androgênica, anovulação crônica associada a distúrbio menstrual e infertilidade (Nacul et al., 2003), podendo causar depressão e ansiedade, já que os sintomas afetam a autoestima. A SOP também pode ocasionar um maior risco do desenvolvimento de doenças cardiovasculares e diabetes mellitus. Pelo menos 50% das mulheres com SOP são obesas e a maioria, senão todas, apresenta resistência à insulina ou hiperinsulinemia ou hiperandrogênia (Silva et al., 2006; Escobar-Morraele, 2018).

Uma característica importante da SOP é o aumento da pulsatilidade do hormônio luteinizante (LH), que estimula a síntese de androgênios nas células da teca do folículo ovariano. Estudos realizados in vivo e in vitro sugerem que as células da teca de mulheres com SOP são mais estimuladas para converter precursores androgênicos em androstenediona e testosterona do que as células da teca de mulheres sem a síndrome (Ferreira et al., 2008).

Atualmente existem vários métodos de tratamento para SOP. O uso de pílulas anticoncepcionais ajuda a suavizar os sintomas por conter hormônios sintéticos, regulando os níveis plasmáticos dos andrógenos e assim, diminuindo a acne e o excesso de pêlos. A eletro-acupuntura (EA) é um método não farmacológico conhecido por iniciar uma série de reações ao nível espinal e centralmente no cérebro. Tem sido demonstrado que repetidos tratamentos com EA de baixa frequência induz ovulações regulares em mais de um terço das mulheres afetadas pela SOP, normalizando os parâmetros endócrinos e neuroendócrinos, sem quaisquer efeitos colaterais negativos (Manni et al., 2005; Wu et al., 2010; Maliqueo et al., 2017; Kuang et al., 2018; Kokosar et al., 2018).

Compreender a etiologia da SOP é importante para identificar biomarcadores e então, trabalhar em novas terapias. Embora muitos estudos estejam sendo realizados em humanos, os estudos com modelos animais são indispensáveis para entender mecanismos fisiopatológicos desta síndrome (Azziz, 2017; Caldwell et al., 2017; Marcondes et al., 2017).

As causas indutoras da SOP ainda são desconhecidas, mas, o excesso de andrógenos é uma característica fundamental. Estudo realizado em camundongos hiperandrogenizados aponta que as ações diretas de andrógenos nos neurônios são necessárias para o desenvolvimento de importantes características reprodutivas e metabólicas da SOP, destacando a importância da ação neuroendócrina dos andrógenos extra-ovarianos no desenvolvimento da SOP (Caldwell et al., 2017).

Diversos componentes da SOP podem estar relacionados com a densidade óssea. O desequilíbrio hormonal, principalmente de andrógenos e insulina, sugere correlação entre SOP e osteoporose. A hiperinsulinemia, por elevar os níveis plasmáticos de andrógenos, é um dos fatores que está relacionado à SOP. Além disso, níveis plasmáticos elevados de insulina estão relacionados a respostas anormais dos receptores de insulina dos osteoblastos, reduzindo a formação óssea e aumentando a reabsorção óssea pelos osteoclastos (Krishnan e Muthusami, 2017).

De acordo com os Critérios de Rotterdam para diagnóstico clínico da SOP, foi publicado em conjunto pelas Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva e Sociedade Europeia de Reprodução Humana e Embriologia em 2004 e revisado em 2012 os seguintes critérios: hiperandrogenismo clínico e/ou laboratorial, oligo-amenorreia e critérios ultrassonográficos apresentando ovários policísticos. Portanto, para o melhor diagnóstico da SOP, a paciente ou também o animal induzido a doença deve apresentar pelo menos 2 dos 3 sinais e sintomas (Febrasgo, 2018)

## **1.2 – Dinâmica óssea e esteroides sexuais**

O esqueleto ósseo passa por diversos mecanismos de renovações estruturais e funcionais ao longo da vida. Esses mecanismos são essenciais para o desenvolvimento e a manutenção do tamanho, da forma e da integridade óssea. Para

que o equilíbrio do osso seja mantido, precisa ocorrer a reabsorção óssea, realizada pelos osteoclastos, e a síntese da nova matriz óssea, produzida pelos osteoblastos. O desequilíbrio nesta dinâmica óssea pode desencadear patologias como osteopetrose, osteopenia e osteoporose (Zaidi, 2007; Gómez-Ambrosi et al., 2008).

Alguns estudos realizados na década de 1940, relacionam deficiência de androgênios e estrogênios com deficiências no metabolismo ósseo. Tais estudos visaram a compreensão das ações dos hormônios esteroides sobre o esqueleto ósseo saudável e também relacionadas às patologias. Os estrogênios e os androgênios diminuem o número de ciclos de remodelação óssea por meio da redução da taxa de ativação dos osteoblastos e dos osteoclastos, modulando a transcrição de genes responsáveis pela osteoclastogênese e replicação e/ou diferenciação de células mesenquimais (Martin et al., 2015).

O estradiol (E2) impede a osteoclastogênese, inibindo o fator de transcrição RUNX-2 e diminuindo a reabsorção óssea, mediante a inserção da proteína ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL) nas membranas dos osteoblastos (Martin et al., 2015). Existem correlações entre a osteoporose, a idade e os níveis plasmáticos de E2. Em decorrência do estresse mecânico funcional, existem adaptações ósseas iniciadas por osteócitos mecanossensíveis que sinalizam quimicamente para a ativação dos mecanismos de formação óssea. Tais mecanismos são dependentes de E2 e, principalmente em decorrência da redução dos níveis plasmáticos de E2, há redução da formação óssea e maior probabilidade de fraturas. Os níveis plasmáticos de E2 e testosterona (T) diminuem com o aumento da idade em ambos os sexos, contribuindo com a redução da massa óssea e com o aumento dos riscos de fraturas (Klein-Nulend et al., 2015).

Os andrógenos modulam eventos fisiológicos que controlam as atividades ósseas e musculares em mulheres. Existem ações diretas, que são consequência da ligação da T aos seus receptores nucleares das células ósseas e também as ações indiretas, que dependem da conversão da T em E2 (Balasch et al., 2003). As evidências clínicas das ações androgênicas sobre a massa óssea de mulheres com hirsutismo, doença do ovário policístico e tumores ovarianos secretores de andrógenos, demonstram aumento na densidade óssea (Gregoriou et al., 2000; Zborowski et al., 2000; Castelo-Branco et al., 2003). Os receptores de andrógenos estão presentes em osteoclastos, osteoblastos e osteócitos; portanto, esses esteroides têm ações sobre reabsorção

óssea, síntese da matriz óssea e manutenção desta matriz (Balasch, 2003). Os andrógenos estimulam a proliferação e a diferenciação dos osteoblastos, além de elevar a síntese de proteínas da matriz extracelular e estimular a mineralização (Notelovitz, 2002 a,b; Brancaglião et al., 2017).

Os progestágenos atuam na prevenção das perdas ósseas; contudo, os mecanismos de ação são bem menos compreendidos do que as ações androgênicas e estrogênicas. Os receptores de progesterona (P4) foram identificados em osteoblastos e osteoclastos humanos (Slootweg et al., 1992; Wei et al., 1993), porém, ainda não é claro se as atividades dos progestágenos no osso podem ser atribuídas às suas ações progestacionais ou por outras ações (Balasch, 2003; Krishnan e Muthusami, 2017).

### **1.3 - Modelos animais para estudo da Síndrome do Ovário Policístico (SOP)**

Embora a etiologia da SOP ainda seja de origem desconhecida, modelos animais induzidos à SOP por diferentes hormônios têm-se mostrado importantes ferramentas para a compreensão da fisiopatologia da síndrome. É comum encontrar na literatura trabalhos que propõem a utilização de animais, por exemplo, ratos e camundongos para estudos relacionados à SOP (Ryu et al., 2019).

Fêmeas de camundongos obesas são mais propensas ao desenvolvimento de ovários policísticos e à infertilidade. Fêmeas que eram igualmente férteis às suas irmãs de ninhada (controle), começaram a ganhar peso após a puberdade, tornando-se significativamente obesas entre 3-6 meses de idade e, aproximadamente, 25% delas tornaram-se inférteis aos 9 meses de idade (Ande et al., 2017).

Não existe um modelo animal que seja totalmente eficaz para estudar a SOP; contudo, a exposição de ratas à luz contínua pode induzir à SOP. Os animais apresentaram hiperandrogenismo, que é uma característica fundamental observada na SOP, os pesos corporais diminuíram e houve aumento de massas ovariana e uterinas. O ciclo estral das ratas expostas à luz ambiente contínua foi desordenado e ocorreram alterações semelhantes às alterações observadas em outros modelos animais para estudo de ovários policísticos, acompanhadas de perda de pêlos e

letargia, e os níveis séricos de testosterona aumentaram significativamente (Kang et al., 2015).

A indução à SOP pode ser realizada no pré-natal e no pós-natal. Fêmeas de camundongos prenhes tratadas com hormônio anti-Mulleriano (HAM) no pré-natal tiveram filhotes fêmeas com excesso de testosterona plasmática. Foi observado diminuição do metabolismo placentário de testosterona em estradiol, resultando em masculinização das fêmeas filhotes expostas a este ambiente hormonal durante a gestação. Tais variações hormonais são causas dos sinais observados na SOP durante a vida adulta (Tata et al., 2018).

Estudo utilizando ratas Wistar adultas induzidas à SOP por Valerato de Estradiol mostrou aumento da massa corporal, redução da massa do ovário e redução do índice gonadosomático. Os níveis plasmáticos de P4 e T foram aumentados, e o nível plasmático de LH diminuiu com a aplicação de FBM. O número de folículos ovarianos e corpos lúteos aumentaram e a estimulação pela FBM diminuiu o número de cistos ovarianos, assim, regulando as características reprodutivas e endócrinas das ratas (Alves et al. 2019).

Modelos animais que utilizam hormônios esteroides como di-hidrotestosterona (DHT), T, VE e inibidores de enzimas esteroidogênicas (Letrozol) para o desenvolvimento pós-natal de fenótipo associado à SOP têm sido propostos (Tabela 1). Contudo, é importante reconhecer que tais hormônios podem ser metabolizados e seus produtos podem ser ativos para diversas vias sinalizadoras em diferentes tecidos. Por exemplo, a T pode ser aromatizada em estradiol e mediar efeitos celulares ao interagir com receptores de estrógenos. Assim como a T, a DHT pode ser metabolizada à 3  $\beta$ -diol e modular efeitos celulares via receptores estrogênicos do tipo beta (Padmanabhan e Veiga-Lopez, 2013)

**Tabela 1** – Presença de características clínicas da SOP em modelos animais. OK – característica presente. Adaptado de Walters et al. (2019).

<b>Características clínicas da SOP</b>	<b>Mulheres com SOP</b>	<b>Modelo de roedores com SOP</b>	<b>Modelo de ovelhas com SOP</b>	<b>Modelo de primatas com SOP</b>
Ciclos irregulares ou aciclicidade	Ok	Ok	Ok	Ok
Oligo ou anovulação	Ok	Ok	Ok	Ok
Morfologia de ovários policísticos	Ok	Ok	Ok	Ok
Hiperandrogenismo	Ok	Ok	Ok	Ok
Hipersecreção de LH	Ok	Ok	Ok	Ok
Dinâmica folicular alterada	Ok	Ok	Ok	Ok
Aumento de adiposidade	Ok	Ok	AUSENTE	Ok
Dislipidemia	Ok	Ok	Não significativo	Ok
Resistência à insulina	Ok	Ok	Ok	Ok
Esteatose hepática não alcoólica	Ok	Ok	Ok	Ausente

#### **1.4 – Fotobiomodulação**

A fotobiomodulação (FBM) é a terapia que utiliza formas não ionizantes de fontes de luz, incluindo lasers, diodos emissores de luz (LEDs) e luz de amplo espectro, nos parâmetros de luz visível e infravermelho. É um processo não-térmico que envolve fatores endógenos nos cromóforos e provocam eventos fotofísicos e fotoquímicos em diversas escalas biológicas. Esse processo resulta em benefícios terapêuticos, incluindo o alívio da dor e redução do processo inflamatório, imunomodulação e promoção da cicatrização de feridas e regeneração de tecidos (Tsai e Hamblin, 2017).

Terapias com FBM vêm sendo investigadas e utilizadas nas práticas clínicas por biomodularem as funções celulares, em animais e humanos, tanto in vivo como in vitro. O crescimento e proliferação celular são eventos fisiológicos importantes estudados na utilização clínica de FBM (Gao e Xing, 2009). O aumento na proliferação celular tem sido demonstrado in vitro para diversos tipos de células, como fibroblastos, queratinócitos, osteoblastos humanos, linfócitos, células-tronco mesenquimais (CTM),



células de Schwann de ratos e células endoteliais venosas e arteriais (Khadra et al., 2005).

A radiação emitida pelo laser age nos processos metabólicos das células-alvo, produzindo efeitos bioestimulantes que resultam na ocorrência de eventos celulares e vasculares, os quais parecem modular os processos de reparo dos tecidos lesionados (Lins et al., 2010). Evidências apontam que a irradiação da luz infravermelha (IR), pode ter função importante no sentido de induzir a regeneração de tecidos lesionados. A FBM em comprimento de onda do infravermelho vem sendo utilizada na prática clínica pois induz a proliferação de células do tecido alvo (Araújo et al., 2013). Além disso, a luz IR é mais versátil do que outros comprimentos de onda eletromagnética, podendo induzir efeitos de estimulação neural, além de promover benefícios terapêuticos em células ou tecidos (Tsai e Hamblin, 2017). A FBM estimula a cicatrização e também a síntese de colágeno, promove a regeneração do músculo esquelético, diminui a resposta inflamatória e aumenta a formação de vasos sanguíneos nas feridas do tecido muscular esquelético (Stein et al., 2005).

Os efeitos fotobiomoduladores podem ser divididos em diretos e indiretos, sendo os diretos aqueles observados logo após a fototerapia, e os efeitos indiretos são observados horas ou dias após a exposição ao laser (Castro-e-Silva et al., 2003). As respostas fotobiológicas são determinadas pela absorção de energia pelos cromóforos (moléculas fotoceptoras) durante a irradiação de luz. Os efeitos fisiológicos induzidos por luz IR originam-se a partir de dois tipos principais de fotoceptores, a citocromo c oxidase e a água intracelular. Os fótons são absorvidos e a luz é convertida em sinais que podem estimular processos biológicos. A ação da luz é sobre a dinâmica da água nas membranas mitocondriais das células-alvo modulando as vias de sinalização relacionadas com a produção de espécies reativas de oxigênio, ATP,  $Ca^{2+}$ , NO (óxido nítrico) e pH (Karu, 2008).

## **2. Justificativa**

A dinâmica óssea é mantida ao longo da vida por diversos fatores endógenos; há modulações nervosas, endócrinas, parácrinas, autócrinas e humorais. Os

mecanismos celulares que determinam o equilíbrio dinâmico entre osteoblastos, osteoclastos e osteócitos é essencial para a manutenção da dinâmica óssea ao longo da vida. A compreensão funcional desses mecanismos é alicerce para a compreensão da dinâmica do tecido ósseo e também é base para compreender as modificações decorrentes de algumas patologias, não somente aquelas com origem nos ossos, mas, também, patologias que podem alterar a dinâmica óssea. Desta forma, a utilização de modelos animais in vivo e culturas de células in vitro que mimetizem a SOP, tornam-se ferramentas interessantes para estudos que correlacionam alterações ósseas com uma endocrinopatia relevante que acomete milhares de mulheres ao redor do mundo, justificando, inclusive, a característica translacional do estudo.

Diante de informações relacionadas às alterações ovarianas e sistêmicas decorrentes da SOP, a utilização da FBM com laser de baixa intensidade (LLLT) surge como uma possibilidade de restabelecimento das atividades ovarianas. Segundo nossas hipóteses, suportadas por trabalhos científicos que utilizam a FBM com LLLT para tratamento de lesões teciduais e orgânicas, assim como estímulo à regeneração tecidual; tal terapia foi empregada in vivo para analisarmos a possibilidade de restabelecimento das atividades ovarianas nas ratas induzidas à SOP, assim como seus reflexos no tecido ósseo in vitro.

### **3 - Objetivos**

#### **3.1 - Geral**

O objetivo geral do presente estudo foi analisar os efeitos da fotobiomodulação com laser de baixa intensidade sobre as atividades ovarianas in vivo e o comportamento de CTM in vitro, em ratas Wistar adultas induzidas à SOP.

#### **3.2 - Específicos**

A – Estudar os efeitos da FBM com LLLT sobre a instalação da SOP;

B - Obter células-tronco mesenquimais de fêmures de ratas controles, induzidas à SOP e submetidas à FBM com LLLT, e diferenciá-las em osteoblastos in vitro;

C - Analisar os efeitos in vitro da T sobre a dinâmica dos osteoblastos (contagem celular, viabilidade celular e formação de nódulos de mineralização) obtidos de ratas controles, induzidas à SOP e submetidas à FBM com LLLT.

## **4 – Metodologia**

### **4.1. Experimentos in vivo**

Foram utilizadas ratas Wistar adultas, com pesos iniciais entre 300 - 400g. Os animais foram obtidos do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP-USP, e mantidos no Biotério da Universidade de Araraquara - UNIARA, em condições controladas de temperatura ( $22 \pm 2^\circ \text{C}$ ) e luminosidade (ciclos 12h x 12h). Água e ração foram oferecidas *ad libitum*. Todos os animais foram pesados no início, semanalmente e no final de cada etapa experimental. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas vigentes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UNIARA), sob protocolo nº 030/2016.

Os ciclos estrais foram realizados diariamente por meio de esfregaços vaginais. Em resumo, as ratas foram contidas manualmente e, com o auxílio de um conta gotas, foi introduzido e retirado da vagina, cerca de 10  $\mu\text{L}$  de soro fisiológico. Posteriormente, este lavado vaginal foi colocado em uma lâmina histológica e as células presentes neste conteúdo foram examinadas em microscópio óptico na lente objetiva de 10x para identificar a fase do ciclo estral (pró-estro, estro, metaestro e diestro) (Marcondes et al., 2002). Foram utilizadas para os experimentos as fêmeas que apresentaram, ao menos, quatro ciclos estrais normais e consecutivos.

#### **4.1.1. Indução da SOP**

A indução para ovário policístico foi feita com dose única de valerato de estradiol (VE) (Sigma-Aldrich). O hormônio foi dissolvido em óleo mineral e administrado i.m. na dose de 2 mg/0,2 mL/rata (Brawer et al., 1986; Pereira et al., 2014; Montrezor et al., 2015). Os animais do grupo controle receberam injeção intramuscular de 0,2 mL de óleo mineral. Após a injeção hormonal, os animais foram divididos em grupo 30 dias após indução; grupo 45 dias após indução e grupo 60 dias após indução. Para cada grupo de animais tratados, houve um grupo de animais controle. As datas propostas após a indução fizeram referência ao tempo necessário para que fosse instalada a SOP nos animais (Brawer et al., 1986; Montrezor et al., 2015).

#### **4.1.2. Fotobiomodulação com Laser de baixa intensidade**

Os animais foram contidos manualmente e irradiados com laser no comprimento de onda de 830 nm, com potência entre 60 mW, numa dose de 1 Joules(J)/ponto, por 18 segundos, sobre a região abdominal, realizando uma transiluminação sobre cada ovário 3 vezes na semana, totalizando 2 J de energia por animal irradiado/por dia de aplicação. As aplicações foram realizadas por 4 semanas para o grupo 30 dias após indução da SOP, 6 semanas para o grupo 45 dias após indução da SOP e 8 semanas para o grupo 60 dias após indução da SOP. Para que os animais se adaptassem à manipulação, os mesmos foram manuseados diariamente (dois minutos) durante uma semana antes da irradiação.

#### **4.1.3. Protocolo Experimental**

Após a indução à SOP com o VE as ratas foram divididas em 12 grupos (n=5) de acordo com o tempo após a indução (30, 45 e 60 dias) de acordo com o tratamento (C, S, L e SL), denominados C30, C45 e C60 (grupos controle), S30, S45 e S60 (grupos SOP), L30, L45 e L60 (grupos laser) e SL30, SL45 e SL60 (grupos SOP/laser).

#### **4.1.4. Eutanásia**

A eutanásia foi realizada com anestesia geral injetável (Xilazina 5 mg/Kg e Ketamina 50 mg/Kg de peso corporal, i.m.), ao final dos períodos experimentais.

#### **4.1.5. Coleta de materiais biológicos**

Após a eutanásia, foi coletado sangue (punção cardíaca e/ou do arco aórtico) de todos os animais. O sangue foi centrifugado (3000 rpm x 20 minutos a 4° C) para a obtenção do plasma que foi congelado a -20° C para às análises de T, fosfatase alcalina e glicose com *kits* comerciais específicos.

Após a eutanásia, foi realizada uma incisão na parede abdominal de todas as ratas para a coleta dos ovários. Os mesmos foram pesados e fixados em solução de formaldeído 4% (preparada a partir do paraformaldeído) em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2, à temperatura ambiente por 24 horas. Em seguida, os ovários foram lavados em água corrente por 2 horas, desidratados em graduações crescentes de álcool (70°, 80°, 90° e 100° GL), diafanizados em xilol, infiltrados e incluídos em parafina.

Para análise morfológica em microscopia de luz, visando a comprovação da formação de cistos ovarianos, cortes histológicos seriados de 5 micras de espessura foram obtidos e corados com Hematoxilina-Eosina (HE). As lâminas foram confeccionadas no Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu.

#### **4.1.6. Índice Gonadossomático - IGS**

Imediatamente antes da eutanásia foram mensuradas as massas corpóreas dos animais e posteriormente dos ovários, após a retirada e limpeza dos tecidos adjacentes dos mesmos. Os valores obtidos foram utilizados para a determinação do índice gonadossomático: [(massa dos ovários/massa corpórea) x100].

#### **4.1.7. Dosagem plasmática de Testosterona**

A dosagem plasmática de testosterona foi realizada com *kit* comercial de radioimunoensaio (RIE) com duplo anticorpo. Os limites inferiores para as detecções de T foram 5,0 ng/mL. A variação do coeficiente intra-ensaio foi de 4%. As dosagens foram realizadas no Laboratório da Profa. Dra. Janete Aparecida Anselmo-Franci, na Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

#### **4.1.8. Dosagem da Glicose plasmática**

Para a dosagem da glicose plasmática, foi utilizado um monitor de glicemia da marca Accu-Chek® Performa, seguindo as instruções do fabricante. As tiras de teste utilizadas foram específicas para o modelo do aparelho. Uma gota de sangue obtida da punção cardíaca ou do arco aórtico imediatamente após a eutanásia foi utilizada para o teste. O sangue foi adicionado à tira de teste que foi inserida no aparelho para a mensurar a glicemia.

#### **4.1.9. Dosagem da Insulina plasmática**

A dosagem plasmática da insulina foi realizada com kit comercial ELISA (insulina – Millipore), seguindo instruções do fabricante. A leitura da placa foi realizada no Departamento de Fisiologia e Patologia, no Laboratório da Profa. Dra. Débora Simões de Almeida Colombari, na Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista – UNESP – Araraquara.

### **4.2. Experimentos in vitro**

#### **4.2.1. Obtenção das CTM e diferenciação em osteoblastos**

Após a eutanásia, os fêmures esquerdos das ratas dos grupos Controle e experimentais foram removidos, dissecados e transferidos para tubos Falcon

contendo meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), suplementado com fungizona, penicilina e estreptomicina. Em ambiente estéril (fluxo laminar), as epífises dos fêmures foram retiradas e foi realizada a lavagem (*flushing*) da medula com meio de cultura para obtenção das CTM. As células foram acondicionadas em garrafas de cultura de 100 mL. Foi feito um “pool” de células obtidas dos animais Controle e tratados e as mesmas foram mantidas em diferentes garrafas (C, S, L e SL) em estufa a 37° C, 5% CO<sub>2</sub> e 95% de ar atmosférico. O meio de cultura foi trocado a cada 48 horas até que as células atingissem confluência de 70-80%.

A diferenciação das CTM em osteoblastos foi induzida com meio de diferenciação osteogênico (ácido ascórbico, β-glicerofosfato e dexametasona) (Maniatopoulos et al., 1988), adicionado ao meio controle (DMEM, suplementado com glicose, insulina, NaHCO<sub>3</sub>, L-glutamina, 10% de soro fetal bovino, fungizona, penicilina e estreptomicina). As células foram cultivadas (em triplicatas) em placas de 48 poços, na densidade inicial de 1 x 10<sup>3</sup> células/poço/200 μL de meio, em estufa (37° C; 5% CO<sub>2</sub> e 95% de ar atmosférico), em períodos experimentais de 7 e 14 dias a partir da adição do meio osteogênico, na ausência e na presença de T, nas concentrações de 10<sup>-3</sup> M e 10<sup>-9</sup> M. Tais concentrações de T mimetizam níveis plasmáticos normais e elevados, respectivamente. Os níveis elevados do esteroide mimetizam as concentrações plasmáticas na SOP. O dia zero foi considerado o dia em que as células foram semeadas nas placas, na presença do meio de diferenciação osteogênico. O meio de cultura foi trocado a cada 72 horas, alicotado e congelado (-20° C) para posteriores análises de fosfatase alcalina.

#### **4.2.2. Contagem celular, viabilidade celular e formação de nódulos de mineralização**

Ao final dos períodos experimentais in vitro (7 e 14 dias), a contagem celular foi realizada com contador celular Bio-Rad TC20™. A viabilidade celular foi realizada por ensaio colorimétrico MTT brometo de {[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]}, um sal que é reduzido por proteinases mitocondriais, ativas apenas em células viáveis. Aliquotas de MTT (100 μL – 0,5 mg/mL) foram

adicionadas aos poços das placas de culturas celulares que foram incubadas por 4 h. Após esse período, as culturas foram lavadas com tampão fosfato salina (PBS) e foi adicionado 1 mL de solução de isopropanol ácido em cada poço para a solubilização completa do precipitado formado. Alíquotas de 50 µL foram retiradas dos poços e transferidas para placa de 96 poços para medida colorimétrica em espectrofotômetro (570 nm) (Mosmann, 1983).

Para as análises da formação dos nódulos de mineralização, ao final de cada período de cultura (7 e 14 dias) os poços tiveram seus respectivos meios de cultura retirados, foram lavados com PBS gelado e preenchidos com formaldeído a 10% (v/v) por 30 minutos. Após a espera, os poços foram lavados com água deionizada, sendo adicionado 1 mL da solução de Vermelho de Alizarina (*Alizarin Red*), que cora em vermelho áreas de mineralização ricas em  $Ca^{2+}$ . Os poços contendo solução de Alizarina passaram por uma nova lavagem com água deionizada e, após sua secagem em temperatura ambiente, foi acrescentado 450 µL da solução de ácido acético a 10% (v/v) e as placas foram mantidas em agitação por 30 minutos. Posteriormente, foi adicionado 150 µL de  $NH_4OH$  a 10% em todos os poços. Em seguida, 50 µL de cada poço foi transferido para poços de microplacas (96 poços) para medida colorimétrica em leitor de microplacas em comprimento de ondas de 405 nm. A quantificação da mineralização foi realizada de acordo com o método descrito por Gregory (2004).

#### **4.2.3. Fosfatase alcalina**

Os meios de culturas coletados a cada 72 horas durante os períodos experimentais (item 4.2.1) foram utilizados para as dosagens de fosfatase alcalina, utilizando *kit* comercial (Labest), seguindo as descrições do fabricante. O princípio do *kit* envolve a liberação de timolftaleína e fosfato inorgânico a partir de p-timolftaleína monofosfato, reação da qual participa a enzima fosfatase alcalina.



### **4.3. Análise Estatística**

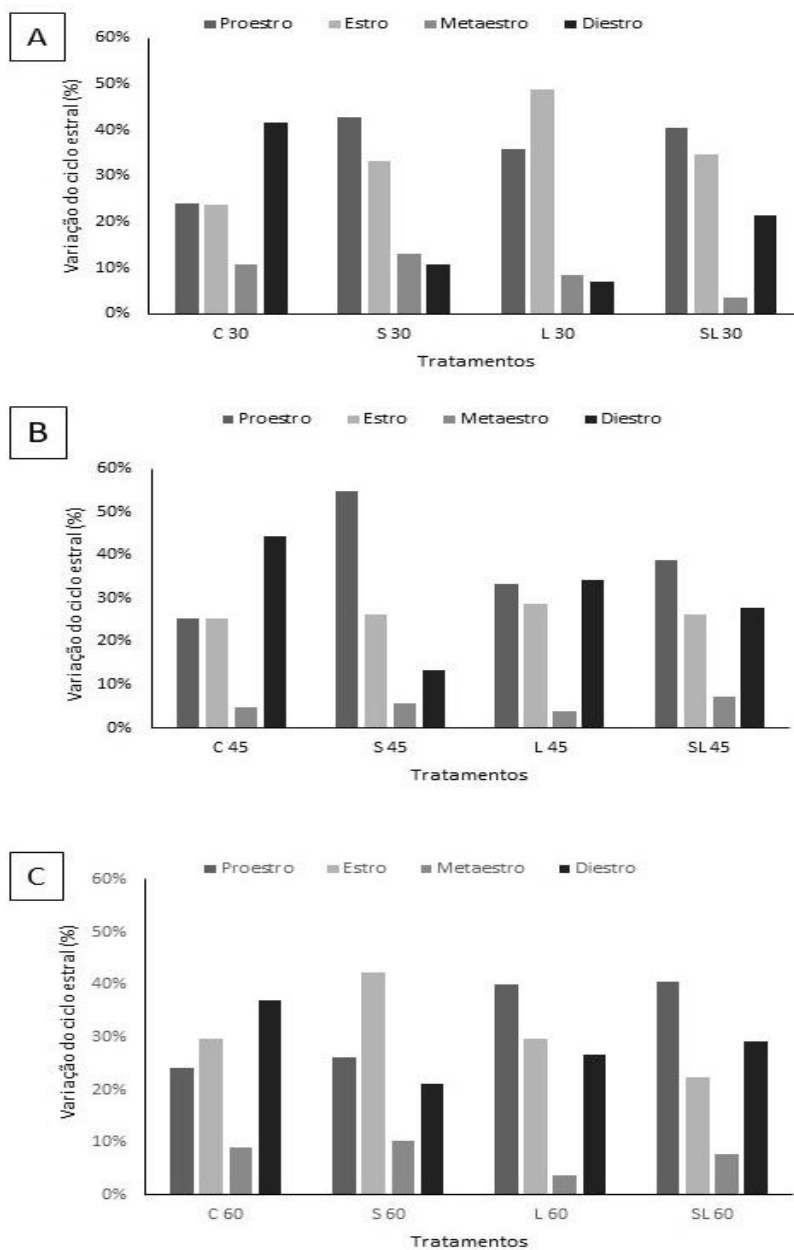
As análises estatísticas foram realizadas por meio de teste paramétrico ou não-paramétrico, para dados independentes e mais de duas amostras (ANOVA), seguido de teste Fisher para comparações das médias. O nível de significância estatística estabelecido foi de 5%.

## **5 – Resultados**

### **5.1. Resultados in vivo**

Os resultados in vivo serão apresentados de acordo com as variáveis analisadas para cada tempo experimental.

**Figura 1** – Variação do ciclo estral das ratas (em porcentagem) para todos os tratamentos nos tempos de 30 dias (A), 45 dias (B) e 60 dias (C) após a indução à SOP.



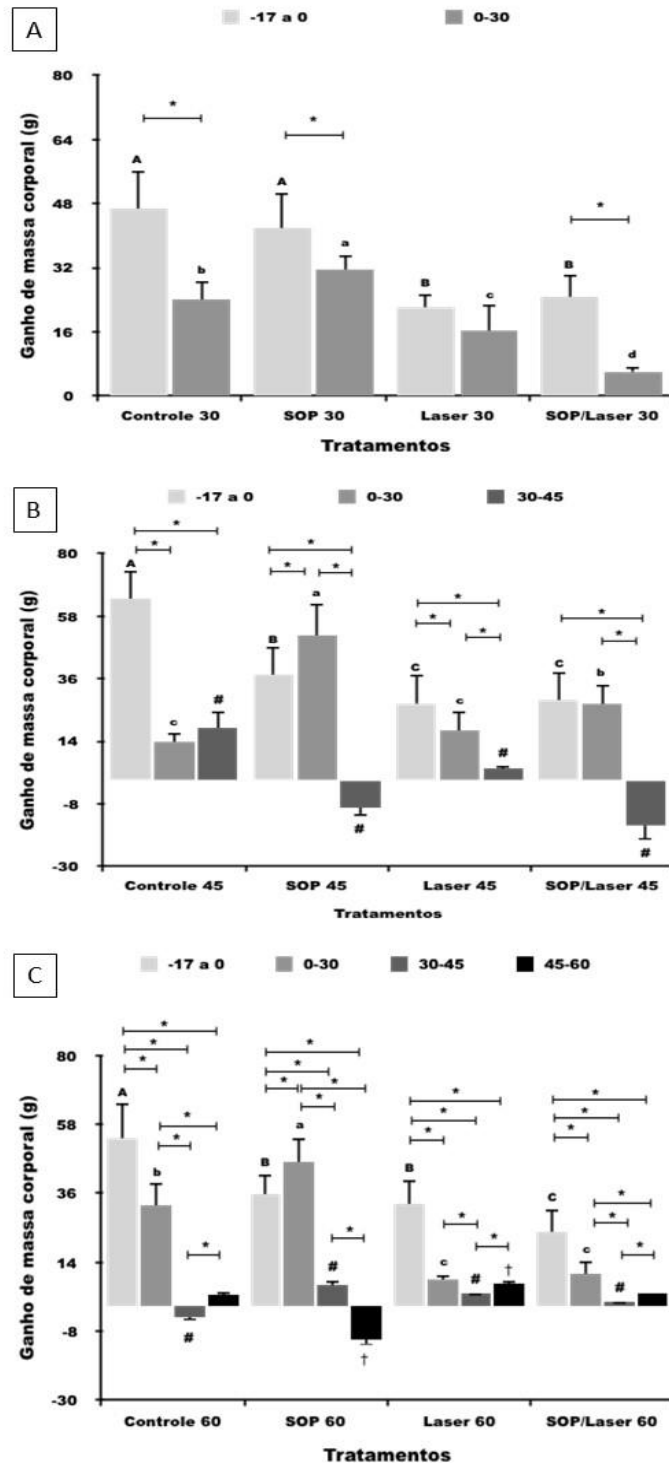
As variações dos ciclos estrais das ratas de todos os grupos experimentais podem ser observadas na figura 1. Nota-se que para os grupos controle de todos os tempos experimentais, 30 dias (Fig. 1A), 45 dias (Fig. 1B) e 60 dias (Fig. 1C), os ciclos apresentaram fases em porcentagens semelhantes. Contudo, em todos os tratamentos, para os 3 tempos experimentais, observa-se variações nas fases dos ciclos estrais em relação aos grupos controle.

No tempo experimental de 30 dias, o grupo Controle esteve em fase de Proestro e Estro em 24% do tempo, em Metaestro por 11% e Diestro por 42% do tempo experimental. O grupo SOP apresentou-se em Proestro por 43% do tempo, em Estro por 33%, em Metaestro por 13% e em Diestro por 11% do tempo de experimentação. O grupo Laser apresentou-se em 36% do tempo em fase de Proestro, 49% em Estro, 8% em Metaestro e 7% em Diestro. Por fim, o grupo SOP/Laser esteve em 40% do tempo em fase de Proestro, 35% em Estro, 4% em Metaestro e 21% em Diestro.

Para os animais do grupo 45 dias, o grupo Controle esteve 25% do tempo em fase Proestro, 25% em Estro, 5% em Metaestro e 44% em Diestro. O grupo SOP apresentou 55% do tempo em fase de Proestro, 26% em Estro, 6% em Metaestro e 13% em Diestro. No grupo Laser, as ratas estiveram em Proestro por 33% do tempo, em Estro por 29%, em Metaestro por 4% e em Diestro por 28% do tempo. O grupo SOP/Laser apresentou 39% do tempo em Proestro, 26% em Estro, 7% em Metaestro e 28% em Diestro.

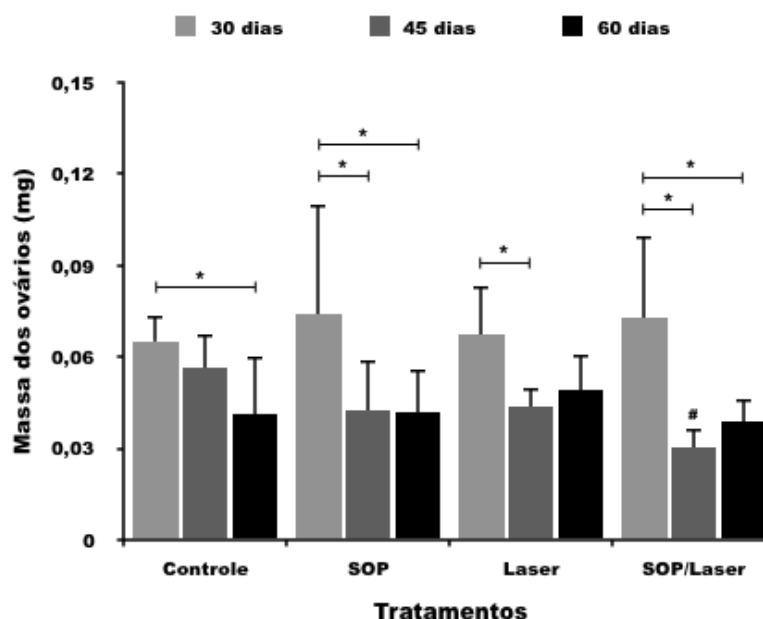
No tempo experimental de 60 dias, o grupo Controle este em fase de Proestro por 24% do tempo, em Estro por 30%, em Metaestro por 9% e em Diestro por 37% do tempo. O grupo SOP apresentou-se por 26% do tempo em fase de Proestro, 42% em Estro, 10% em Metaestro e 21% em Diestro. As ratas do grupo Laser permaneceram em fase de Proestro por 40% do tempo, em Estro por 30%, em Metaestro por 4% e em Diestro por 27% do tempo experimental. Já no grupo SOP/Laser, as ratas estiveram 41% do tempo em fase de Proestro, 22% em Estro, 8% em Metaestro e 29% em Diestro.

**Figura 2** – Ganho de massa corporal (g) das ratas dos grupos controle, SOP, Laser e SOP/Laser para os tempos 30 dias (A), 45 dias (B) e 60 dias (C). Os dados são apresentados como média  $\pm$  DPM (n=5). Letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre os tratamentos no intervalo de tempo -17 a 0 dias. Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre os tratamentos no intervalo de tempo 0-30 dias. # indica diferença entre os tratamentos no intervalo de tempo 30-45 dias. † indica diferença entre os tratamentos no intervalo de tempo 45-60 dias. \* indica diferença dos intervalos de tempo em cada tratamento.  $p < 0,05$ .



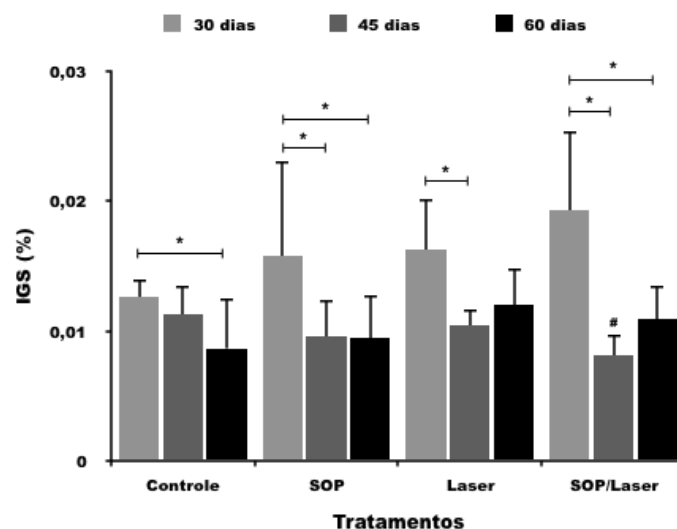
A figura 2 demonstra a média de ganho de massa corporal dos animais para todos os tratamentos nos tempos de 30 (A), 45 (B) e 60 (C) dias. As análises foram realizadas em períodos de tempo: antes da indução à SOP (-17 a 0), 30 dias após a indução (0 - 30), entre trinta e quarenta e cinco dias após a indução (30 - 45) e entre quarenta e cinco e sessenta dias após a indução à SOP (45 - 60). De acordo com a figura 2, nota-se que, com exceção dos grupos SOP 45 dias ( $437,2 \pm 40,1$  g) (Fig. 2B) e SOP 60 dias ( $446,0 \pm 22,7$  g) (Fig. 2C), todos os demais grupos apresentaram redução média do ganho de massa corporal após a indução à SOP. Além disso, para todos os três tempos experimentais, os grupos SOP apresentaram o maior ganho médio de massa corporal entre o período de 0 a 30 dias após a indução à síndrome. Por fim, para os grupos SOP nos tempos experimentais de 45 dias, período entre 30 e 45 dias (Fig. 2B) e 60 dias, período entre 45 e 60 dias (Fig. 2C), observa-se que houve perda de massa corporal. Tal redução foi influenciada de maneira dual pelo tratamento com laser, ou seja, acentuada no grupo SOP/Laser 45 ( $373,6 \pm 27,4$  g) e revertida no grupo SOP/Laser 60 ( $353,2 \pm 12,2$  g).

**Figura 3** – Massa dos ovários (mg) das ratas dos grupos controle, SOP, Laser e SOP/Laser ao longo do período experimental (30, 45 e 60 dias). Os dados são apresentados como média  $\pm$  DPM (n=5). \* indica diferença entre os tempos no mesmo tratamento. # indica diferença entre os tratamentos no mesmo tempo (45 dias).  $p < 0,05$ .



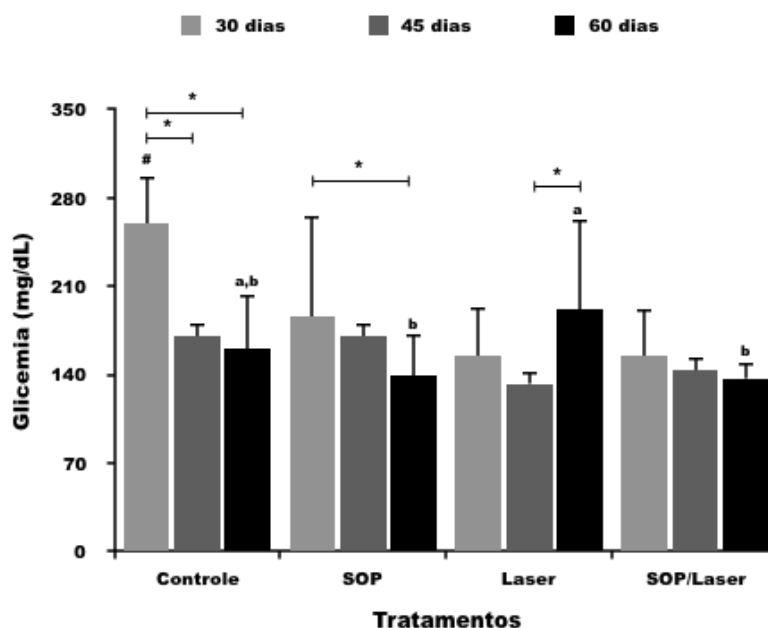
A figura 3 demonstra a variação média da massa ovariana entre os tratamentos e os tempos experimentais. Pode-se observar, no grupo controle, que houve diferença estatística significativa entre os tempos 30 ( $0,06500 \pm 0,00851$  mg) e 60 dias ( $0,04145 \pm 0,01890$  mg), sendo maior para o tempo 30 dias. No grupo SOP, houve diferença significativa entre os tempos 30 dias ( $0,0738 \pm 0,0361$  mg) e 45 dias ( $0,04261 \pm 0,01608$  mg) e também entre os tempos 30 dias ( $0,0738 \pm 0,0361$  mg) e 60 dias ( $0,04188 \pm 0,01424$  mg). Para ambas comparações, a massa ovariana foi maior no tempo 30 dias. Para o grupo que recebeu as aplicações com o laser, houve diferença significativa entre os tempos de 30 ( $0,06746 \pm 0,01585$  mg) e 45 dias ( $0,04354 \pm 0,00609$  mg), com maior massa ovariana observada no tempo 30 dias. No grupo SOP/Laser houve diferença estatística significativa entre os tempos 30 dias ( $0,0730 \pm 0,0265$  mg) e 45 dias ( $0,03020 \pm 0,00607$  mg) e entre os tempos 30 dias ( $0,0730 \pm 0,0265$  mg) e 60 dias ( $0,03856 \pm 0,00774$  mg). Em ambas as comparações a maior massa foi observada no tempo 30 dias. A diferença estatística entre os tratamentos foi significativa apenas para o tempo 45 dias. Nota-se o grupo SOP/Laser com a menor massa ovariana.

**Figura 4** – Índice gonadossomático (IGS (%)) das ratas dos grupos controle, SOP, Laser e SOP/Laser ao longo do período experimental (30, 45 e 60 dias). Os dados são apresentados como média  $\pm$  DPM (n=5). \* indica diferença entre os tempos no mesmo tratamento. # indica diferença entre os tratamentos no mesmo tempo (45 dias).  $p < 0,05$ .



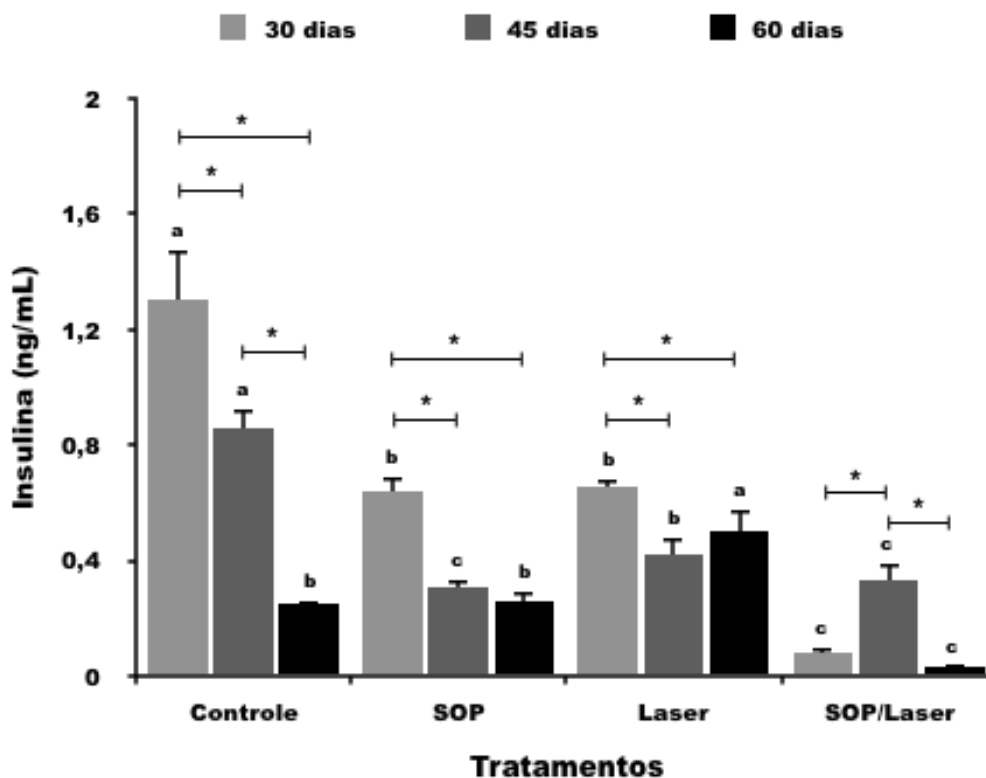
Observa-se na figura 4 a variação média do IGS para os tempos e tratamentos experimentais. No grupo controle, pode-se observar que houve diferença estatística significativa entre os tempos 30 e 60 dias, sendo o IGS maior no tempo 30 dias. No grupo SOP houve diferença entre os tempos 30 dias ( $0,01582 \pm 0,001379 \%$ ) e 45 dias ( $0,00958 \pm 0,00279 \%$ ) e também houve diferença entre os tempos 30 dias ( $0,01582 \pm 0,001379 \%$ ) e 60 dias ( $0,00946 \pm 0,00334 \%$ ). Em ambas as comparações o IGS foi maior no tempo 30 dias. Para o grupo Laser, nota-se diferença estatística significativa entre os tempos 30 ( $0,01626 \pm 0,00392 \%$ ) e 45 dias ( $0,010467 \pm 0,001244 \%$ ), sendo maior para tempo 30 dias. No grupo SOP/Laser, houve diferença significativa entre os tempos 30 ( $0,01936 \pm 0,00605 \%$ ) e 45 dias ( $0,008095 \pm 0,001648 \%$ ) e entre os tempos 30 ( $0,01936 \pm 0,00605 \%$ ) e 60 dias ( $0,01097 \pm 0,00253 \%$ ). Em ambas as comparações, o tempo 30 dias apresenta maior IGS. A diferença estatística significativa entre os tratamentos foi observada somente no tempo 45 dias, onde o grupo SOP/Laser apresentou o menor IGS.

**Figura 5** – Glicemia (mg/dL) das ratas dos grupos controle, SOP, Laser e SOP/Laser ao longo do período experimental (30, 45 e 60 dias). Os dados são apresentados como média  $\pm$  DPM (n=5). \* indica diferença entre os tempos no mesmo tratamento. Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre os tratamentos no mesmo tempo (60 dias). # indica diferença entre os tratamentos no mesmo tempo (30 dias).  $p < 0,05$ .



As variações médias da glicemia dos animais entre os tempos e os tratamentos experimentais estão apresentadas na figura 5. Pode-se observar que houve diferença estatística significativa no grupo controle entre os tempos 30 dias ( $260,2 \pm 37,0$  mg/dL) e 45 dias ( $171,0 \pm 42,9$  mg/dL) e também entre os tempos de 30 dias ( $260,2 \pm 37,0$  mg/dL) e 60 dias ( $160,6 \pm 42,3$  mg/dL), sendo a maior glicemia para o tempo 30 dias, em ambas as comparações. No grupo SOP houve diferença significante entre os tempos 30 dias ( $186,2 \pm 79,7$  mg/dL) e 60 dias ( $139,4 \pm 32,4$  mg/dL), com maior glicemia para o tempo 30 dias. Para o grupo Laser, a diferença significativa foi maior no tempo 60 dias ( $191,4 \pm 71,3$  mg/dL) comparada ao grupo 45 dias ( $132,8 \pm 19,98$  mg/dL). Quando comparado os efeitos dos tratamentos no mesmo tempo, todos os tratamentos diminuíram significativamente a glicemia em relação ao grupo controle no tempo 30 dias ( $260,2 \pm 37,0$  mg/dL). Para o tempo 60 dias, o grupo Laser ( $191,4 \pm 71,3$  mg/dL) apresentou a maior glicemia, comparado aos grupos SOP ( $139,4 \pm 32,4$  mg/dL) e SOP/Laser ( $137,00 \pm 12,63$  mg/dL), que não diferiram entre si.

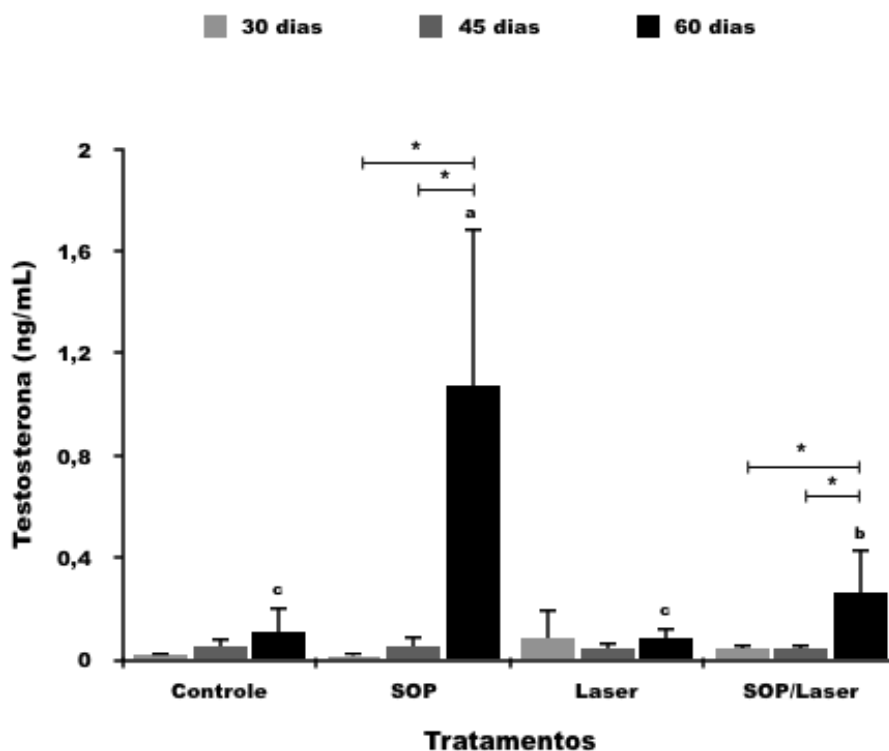
**Figura 6** – Concentrações plasmáticas de insulina (ng/mL) das ratas dos grupos controle, SOP, Laser, SOP/Laser, ao final dos tempos experimentais: 30, 45 e 60 dias. Os dados são apresentados como média  $\pm$  DPM (n=5). Letras minúsculas diferentes indicam diferença no mesmo tempo entre os tratamentos. \* indica diferença entre os tempos no mesmo tratamento.  $p < 0,05$ .





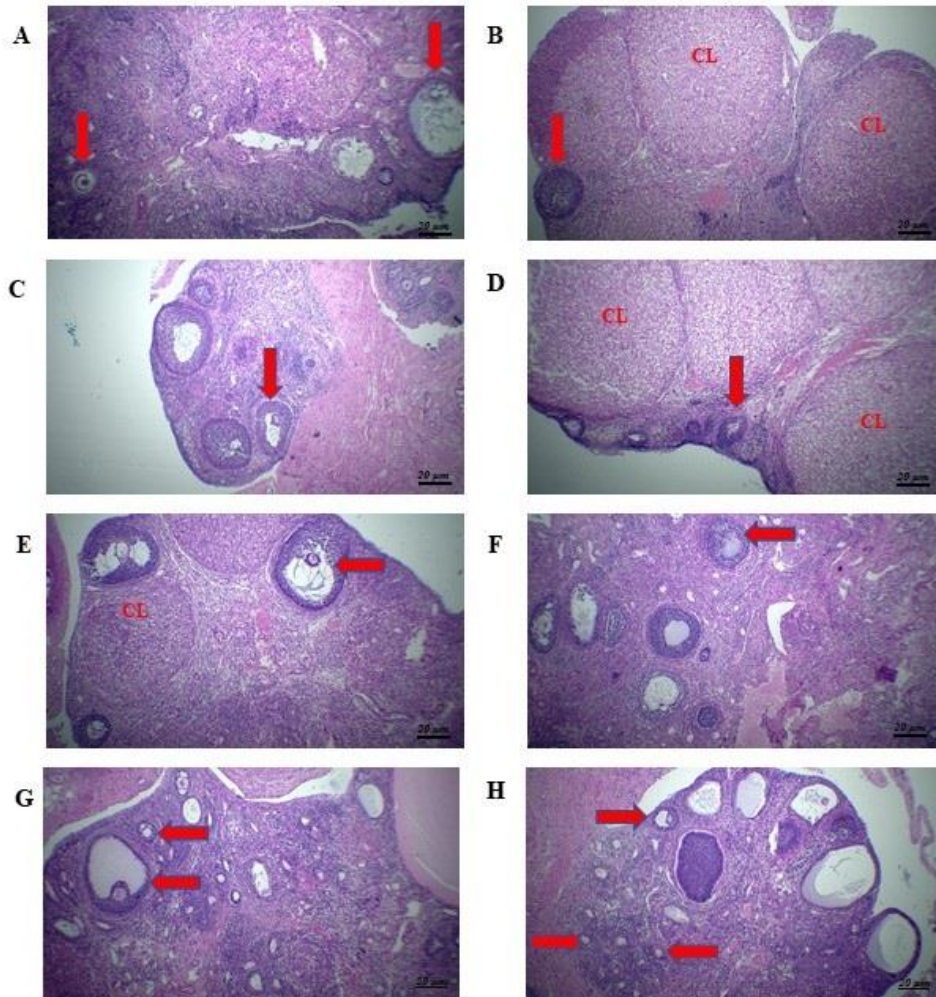
A figura 6 apresenta os resultados das variações plasmáticas de insulina dos animais sacrificados após 30, 45 e 60 dias do início dos tratamentos. Observa-se que, todos os tratamentos influenciaram significativamente nas variações plasmáticas da insulina em relação ao grupo Controle. Aos 30 dias, todos os grupos tiveram concentrações menores de insulina em relação ao grupo controle ( $1,3024 \pm 0,1745$  ng/mL), e o grupo SOP/Laser ( $0,0798 \pm 0,01607$  ng/mL) obteve o menor valor. O grupo Controle 45 dias ( $0,856 \pm 0,0631$  ng/mL) apresentou a maior concentração plasmática do hormônio e a menor concentração plasmática foi observada no grupo SOP 45 dias ( $0,304 \pm 0,0241$  ng/mL). A insulinemia do tratamento 60 dias foi reduzida no grupo SOP/Laser ( $0,03 \pm 0,0057$  ng/mL) e apresentou maior média no grupo Laser ( $0,4994 \pm 0,0744$  ng/mL), ambos em relação ao grupo Controle ( $0,2486 \pm 0,01383$  ng/mL). Na comparação dos efeitos dos tempos no mesmo tratamento, observa-se redução da insulinemia ao longo do tempo para o grupo Controle (30 dias =  $1,3024 \pm 0,1745$  ng/mL; 45 dias =  $0,856 \pm 0,0631$  ng/mL e 60 dias =  $0,2486 \pm 0,0138$  ng/mL) e para o grupo SOP (30 dias =  $0,6396 \pm 0,0453$  ng/mL; 45 dias =  $0,304 \pm 0,0241$  ng/mL e 60 dias =  $1,075 \pm 0,412$  ng/mL). Para o tratamento Laser, a maior concentração de insulina foi observada no tempo 30 dias ( $0,6524 \pm 0,0281$  ng/mL) e a menor no tempo 45 dias ( $0,0424 \pm 0,0513$  ng/mL). Por fim, para o tratamento SOP/Laser, a maior concentração do hormônio foi observada no tempo 45 dias ( $0,3338 \pm 0,0573$  ng/mL) e a menor concentração no tempo 60 dias ( $0,03 \pm 0,0057$  ng/mL).

**Figura 7** – Testosterona plasmática (ng/mL) das ratas dos grupos controle, SOP, Laser e SOP/Laser ao longo do período experimental (30, 45 e 60 dias). Os dados são apresentados como média  $\pm$  DPM (n=5). \* indica diferença entre os tempos no mesmo tratamento. Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre os tratamentos no mesmo tempo (60 dias).  $p < 0,05$ .



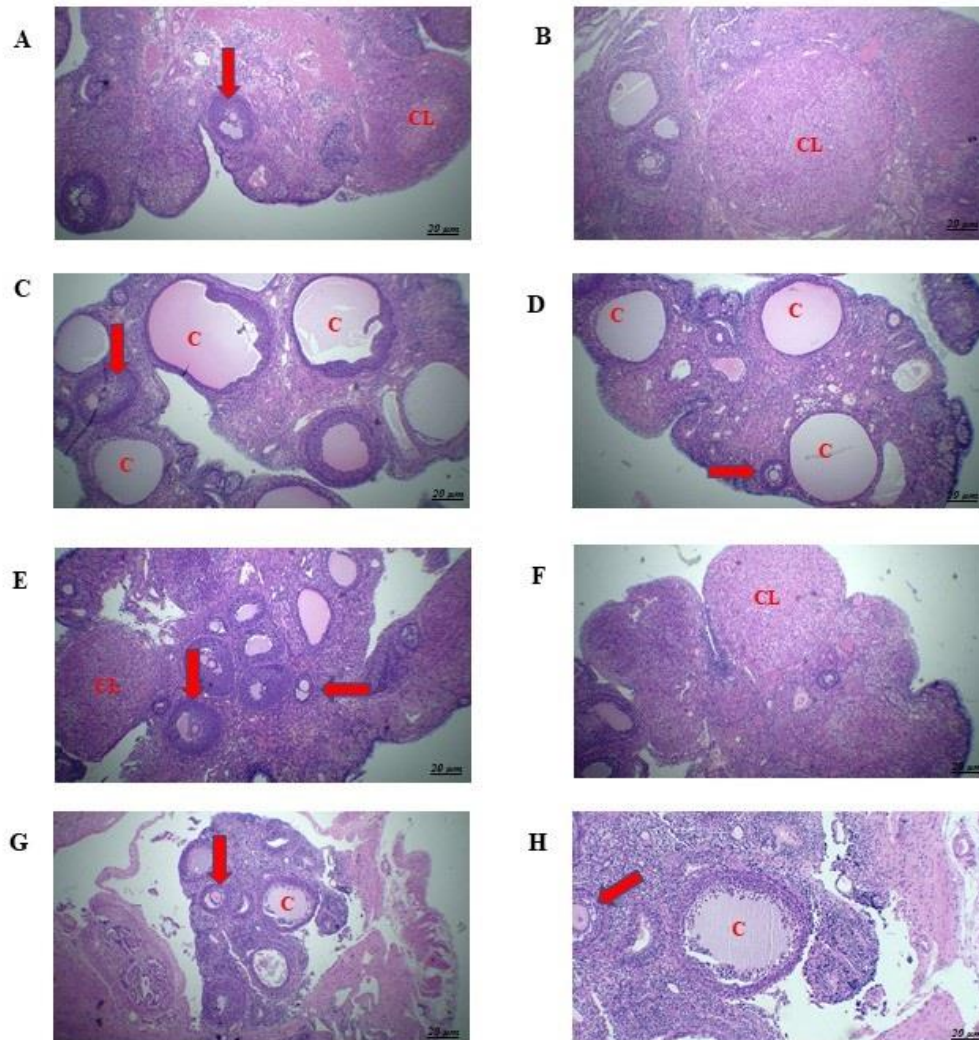
A figura 7 mostra as variações plasmáticas de testosterona entre os animais para os tempos e tratamentos estudados. Pode-se observar que houve diferença estatística significativa no grupo SOP entre os tempos 30 ( $0,01568 \pm 0,00869$  ng/mL) e 60 ( $1,075 \pm 0,612$  ng/mL) dias e também entre os tempos 45 ( $0,0491 \pm 0,0465$  ng/mL) e 60 ( $1,075 \pm 0,612$  ng/mL) dias. Para ambas as comparações, a maior concentração de T foi observada no tempo 60 dias. Variação semelhante foi observada no grupo SOP/Laser. Houve diferença estatística significativa entre os tempos 30 ( $0,04172 \pm 0,0187$  ng/mL) e 60 ( $0,2653 \pm 0,1706$  ng/mL) dias e também entre os tempos 45 ( $0,04136 \pm 0,0166$  ng/mL) e 60 ( $0,2653 \pm 0,1706$  ng/mL) dias, sendo a maior média de T para o tempo 60 dias. Quando comparado os efeitos dos tratamentos no mesmo tempo, observa-se diferença significativa apenas para o tempo 60 dias, com maior média para o grupo SOP ( $1,075 \pm 0,612$  ng/mL) e a menor para o grupo Laser ( $0,0836 \pm 0,0444$  ng/mL).

**Figura 8** – Fotomicrografias dos cortes histológicos representativos dos ovários das ratas após 30 dias de experimentos. A-B – controle; C-D – SOP; E-F – Laser; G-H – SOP/Laser. Setas vermelhas indicam folículos. CL – Corpos lúteos. Hematoxilina-Eosina. Aumento de 10x.



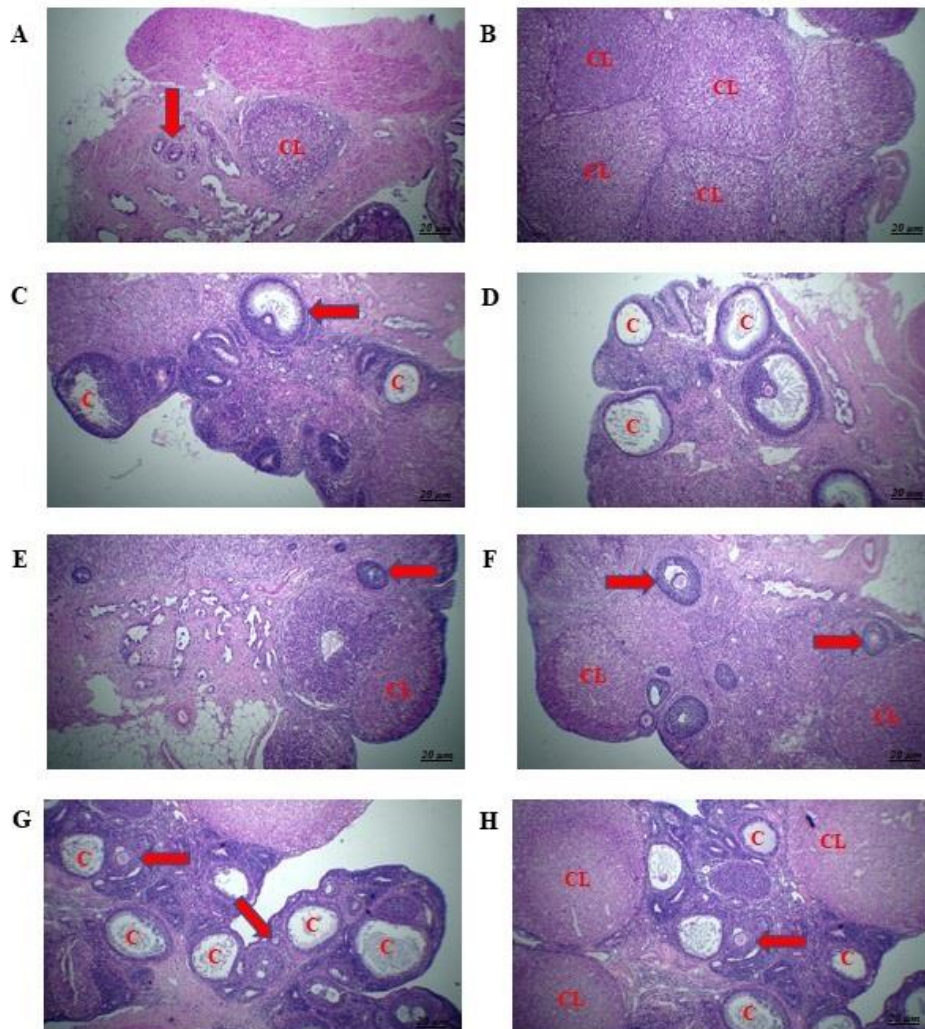
A figura 8 apresenta as fotomicrografias dos ovários das ratas sacrificadas após 30 dias do início dos experimentos. Nota-se a presença de folículos em diversos estágios de desenvolvimento e de corpos lúteos para todos os tratamentos propostos e para o grupo Controle.

**Figura 9**– Fotomicrografias dos cortes histológicos representativos dos ovários das ratas após 45 dias de experimentos. A-B – controle; C-D – SOP; E-F – Laser; G-H – SOP/Laser. Setas vermelhas indicam folículos. CL - Corpos lúteos. C – Cistos foliculares. Hematoxilina-Eosina. Aumento de 10x.



A figura 9 mostra as fotomicrografias representativas dos ovários das ratas após 45 dias do início dos tratamentos. Nota-se maior quantidade de cistos foliculares nos ovários das ratas do grupo SOP (Fig. 9 C-D) comparado com os demais grupos. Nos animais do grupo Laser (Fig. 9 E-F) observa-se menos cistos foliculares e nota-se a presença de folículos e corpos lúteos. No grupo SOP/Laser (Fig. 9 G-H) nota-se a presença de cistos; contudo, também é possível observar a presença de folículos ovarianos. Os ovários do grupo Controle (Fig. 9 A-B) não apresentam cistos.

**Figura 10** – Fotomicrografias dos cortes histológicos representativos dos ovários das ratas após 60 dias de experimentos. A-B – controle; C-D – SOP; E-F – Laser; G-H – SOP/Laser. Setas vermelhas indicam folículos. CL – Corpos lúteos. C – Cistos foliculares. Hematoxilina-Eosina. Aumento de 10x.



Observa-se na figura 10 as fotomicrografias indicando os ovários das ratas após 60 dias de experimento. Nota-se que o grupo Controle apresenta folículos, corpos lúteos e ausência de cistos foliculares (Fig. 10 A-B). Nota-se a presença de cistos foliculares nos ovários das ratas do grupo SOP (Fig. 10 C-D). Os ovários dos animais submetidos à FBM (grupo Laser) não apresentam cistos, apenas folículos e corpos lúteos (Fig. 10 E-F), assim como os ovários induzidos à SOP e submetidos ao laser (grupo SOP/Laser) apresentam cistos; contudo, também há presença de folículos e corpos lúteos (Fig. 10 G-H).

## 5.2. Resultados in vitro

Os resultados serão apresentados da seguinte forma: as diferenças das variáveis por tempo de experimento in vivo (30, 45 e 60 dias), para cada grupo experimental in vivo (Controle, SOP, Laser e SOP/Laser) em cada tempo de cultura in vitro (7 e 14 dias).

**Tabela 2** - Contagem de células tronco mesenquimais obtidas de medula óssea de ratas após 30, 45 e 60 dias de indução à SOP, tratadas com laser e, posteriormente, cultivadas por 10 dias in vitro. Os resultados são apresentados em média  $\pm$  DPM. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre os tratamentos no mesmo tempo. \* indica diferenças entre os tempos para o mesmo tratamento.  $p < 0,05$ .

TRATAMENTOS	30 DIAS	45 DIAS	60 DIAS
Controle	132.250 $\pm$ 3.890 <sup>b</sup>	1.600.100 $\pm$ 14.000 <sup>a*</sup>	1.480.000 $\pm$ 84.500 <sup>a</sup>
SOP	13.400 $\pm$ 849 <sup>d</sup>	691.600 $\pm$ 16.400 <sup>b</sup>	1.238.000 $\pm$ 232.000 <sup>b*</sup>
Laser	205.000 $\pm$ 7.070 <sup>a</sup>	558.000 $\pm$ 56.600 <sup>c</sup>	829.000 $\pm$ 24.000 <sup>c*</sup>
SOP/Laser	29.750 $\pm$ 2.890 <sup>c</sup>	736.700 $\pm$ 34.400 <sup>b*</sup>	305.000 $\pm$ 10.100 <sup>d</sup>

Ao final de cada período experimental in vivo, os fêmures foram retirados, limpos e as células tronco mesenquimais da medula foram obtidas. Observa-se na tabela 2 a variação média do número de células tronco mesenquimais após 10 dias de cultura in vitro, antes do plaqueamento, para todos os tratamentos e os tempos experimentais in vivo.

Em relação ao efeito tempo para o mesmo tratamento: o grupo Controle 45 dias apresentou a maior média (1.600.100  $\pm$  14.000 células). Para os grupos SOP (1.238.000  $\pm$  232.000 células) e Laser (829.000  $\pm$  24.000 células) nota-se maiores médias aos 60 dias. O grupo SOP/Laser apresentou maior média no tempo 45 dias (558.000  $\pm$  56.600 células).

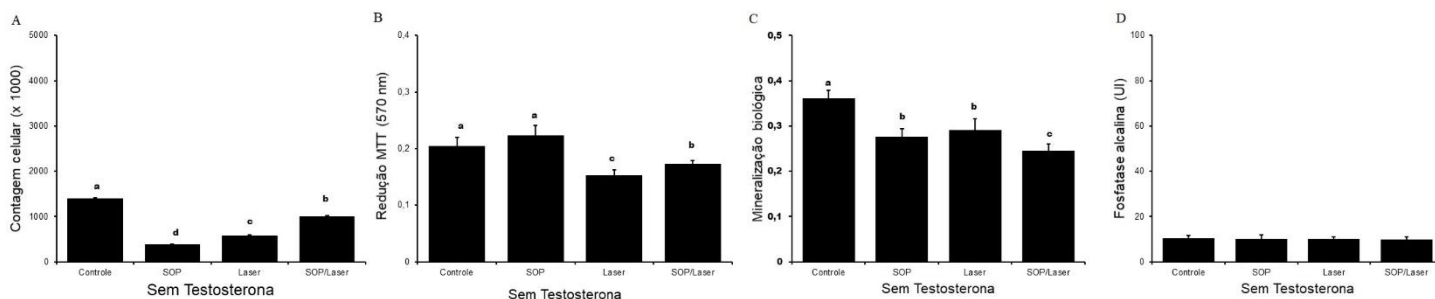
Em relação ao efeito tratamento no mesmo tempo: nota-se que para o tempo 30 dias a maior média foi para o grupo Laser (205.000  $\pm$  7.070 células) e a menor média foi para o grupo SOP (13.400  $\pm$  849 células), havendo diferenças significantes entre os tratamentos e o grupo Controle (132.250  $\pm$  3.890 células). Para os tratamentos no tempo 45 dias, a maior média foi para o grupo Controle (1.600.100  $\pm$  14.000 células) e a menor média para o grupo Laser (558.000  $\pm$  56.600 células). Já os tratamentos no

tempo 60 dias, a maior média foi para o grupo Controle (1.480.000 ± 84.500 células) e a menor média para o grupo SOP/Laser (305.000 ± 10.100 células).

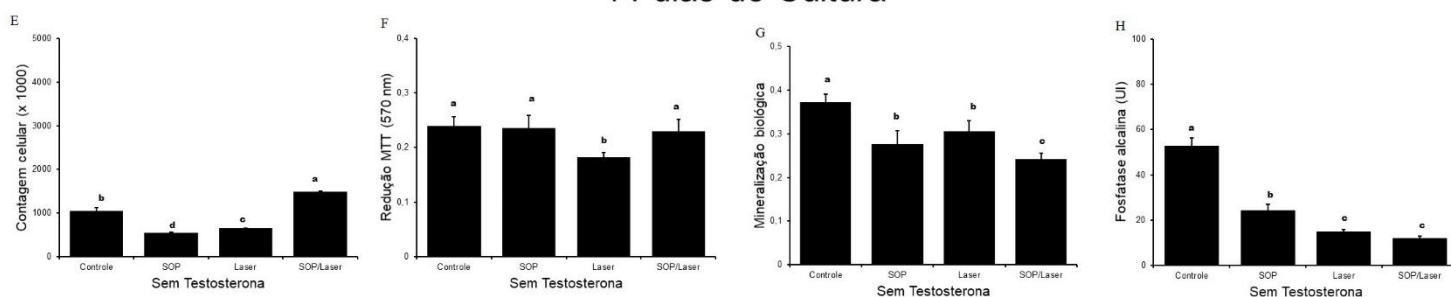
### Resultados in vitro para o tempo de 30 dias in vivo.

**Figura 11** – Contagem celular (A e E), viabilidade celular (B e F), mineralização (C e G) e fosfatase alcalina (D e H) após 7 e 14 dias de cultura, na ausência de testosterona. As variáveis são referentes ao tempo 30 dias de experimentos in vivo. Os dados são apresentados como média ± DPM (n=3). Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre os tratamentos. p<0,05.

#### 7 dias de Cultura



#### 14 dias de Cultura



A figura 11 mostra os resultados para 7 e 14 dias de cultura no tempo de 30 dias in vivo, na ausência de testosterona.

**Contagem celular: 7 dias de cultura:** maior contagem para o grupo Controle (1.407.000 ± 2.000 células) e menor contagem para o grupo SOP (385.000 ± 7.000 células) (Fig.11A). **14 dias de cultura:** maior contagem celular para o grupo SOP/Laser (1.487.000 ± 12.000 células) e a menor contagem foi observada no grupo SOP

(550.000 ± 16.000 células), ambos também em relação ao Controle (1.052.000 ± 67.000 células) (Fig.11E).

**Viabilidade celular: 7 dias de cultura:** maior viabilidade para o grupo SOP (0,223 ± 0,0183) e a menor média foi observada para o grupo Laser (0,15367 ± 0,00907), ambos em relação ao grupo Controle (0,20467 ± 0,01537) (Fig.11B). **14 dias de cultura:** a maior média foi observada para o grupo Controle (0,23967 ± 0,01644) e a menor para o grupo Laser (0,18233 ± 0,00869) (Fig.11F).

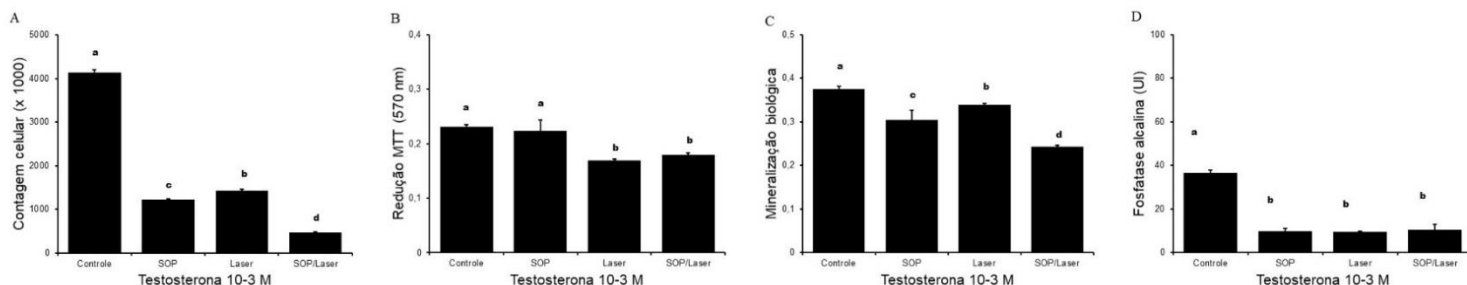
**Mineralização: 7 dias de cultura:** todos os tratamentos reduziram a mineralização em relação ao grupo Controle (0,3607 ± 0,0176), sendo a menor média para o grupo SOP/Laser (0,24567 ± 0,01457) (Fig.11C). **14 dias de cultura:** também foi observada redução da mineralização em todos os tratamentos comparados ao grupo Controle (0,372 ± 0,0187), com a menor média para o grupo SOP/Laser (0,242 ± 0,013) (Fig.11G).

**Fosfatase alcalina: 7 dias de cultura:** não houve diferenças significantes entre os tratamentos (Fig.11D). **14 dias de cultura:** a maior concentração média de fosfatase foi observada no grupo Controle (52,66 ± 3,75 UI) e a menor média foi observada no grupo SOP/Laser (12,165 ± 0,715 UI) (Fig.11H).

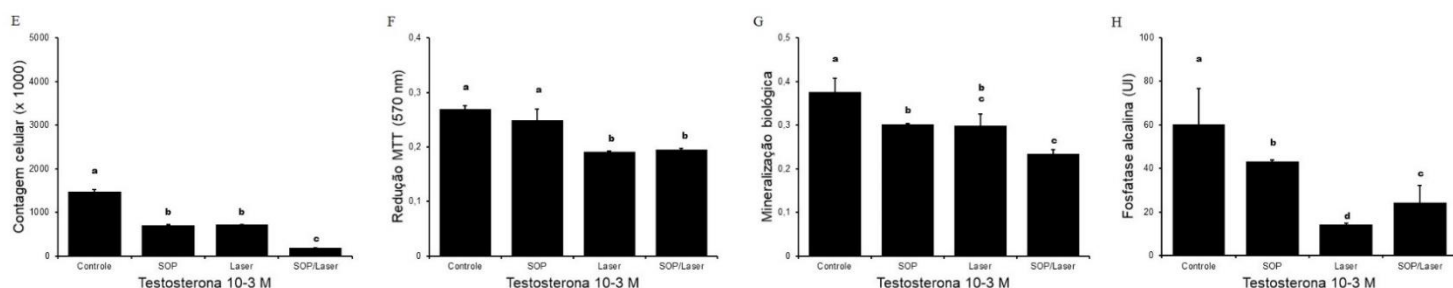


**Figura 12** – Contagem celular (A e E), viabilidade celular (B e F), mineralização (C e G) e fosfatase alcalina (D e H) após 7 e 14 dias de cultura, na presença de  $10^{-3}$  M de testosterona. As variáveis são referentes ao tempo 30 dias de experimentos in vivo. Os dados são apresentados como média  $\pm$  DPM (n=3). Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre os tratamentos.  $p < 0,05$ .

### 7 dias de Cultura



### 14 dias de Cultura



Quando as células foram desafiadas com  $10^{-3}$  M de testosterona, observou-se:

**Contagem celular: 7 dias de cultura:** a maior contagem celular foi observada para o grupo Controle ( $4.143.000 \pm 58.000$  células) e a menor contagem para o grupo SOP/Laser ( $465.000 \pm 22.000$  células) (Fig.12A). **14 dias de cultura:** maior contagem celular para o grupo Controle ( $1.470.000 \pm 51.000$  células) e a menor contagem foi observada no grupo SOP/Laser ( $177.000 \pm 4.000$  células) (Fig.12E).

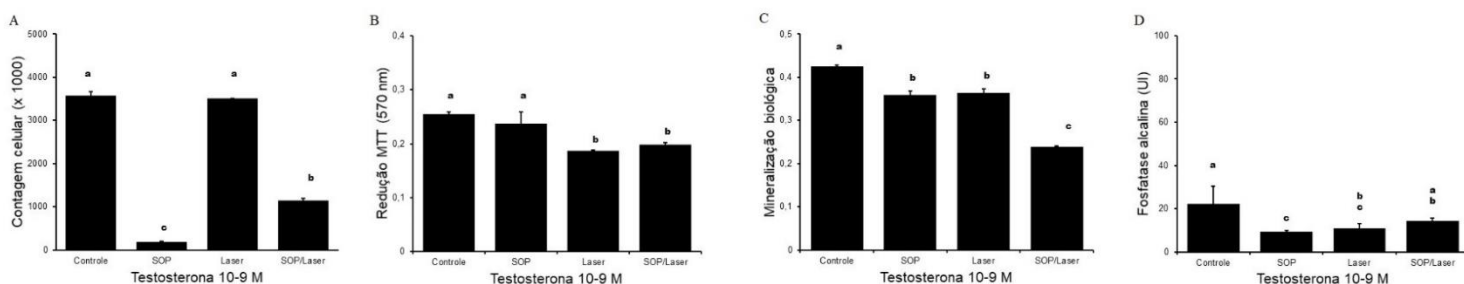
**Viabilidade celular: 7 dias de cultura:** maior viabilidade para o grupo Controle ( $0,231 \pm 0,00361$ ) e a menor média foi observada para o grupo Laser ( $0,16933 \pm 0,00208$ ) (Fig.12B). **14 dias de cultura:** a maior média foi observada para o grupo Controle ( $0,269 \pm 0,00624$ ) e a menor para o grupo Laser ( $0,19133 \pm 0,00115$ ) (Fig.12F).

**Mineralização: 7 dias de cultura:** todos os tratamentos reduziram a mineralização em relação ao grupo Controle ( $0,375 \pm 0,00608$ ), sendo a menor média para o grupo SOP/Laser ( $0,24267 \pm 0,00404$ ) (Fig.12C). **14 dias de cultura:** também foi observada redução da mineralização em todos os tratamentos comparados ao grupo Controle ( $0,3767 \pm 0,03$ ), com a menor média também para o grupo SOP/Laser ( $0,23433 \pm 0,00987$ ) (Fig.12G).

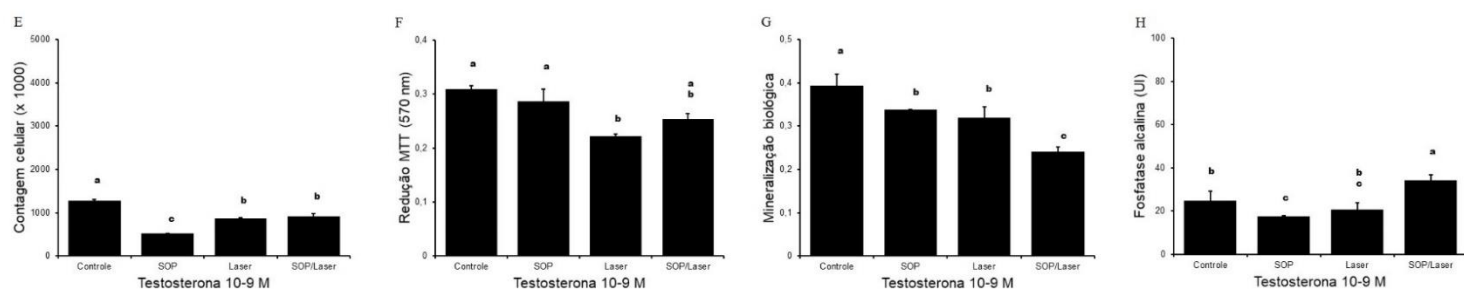
**Fosfatase alcalina: 7 dias de cultura:** todos os tratamentos diminuíram as concentrações de fosfatase em relação ao grupo Controle ( $36,62 \pm 1,404$  UI), sem diferenças entre si (Fig.12D). **14 dias de cultura:** a maior concentração média de fosfatase foi observada no grupo Controle ( $60,28 \pm 16,37$  UI) e a menor média foi observada no grupo Laser ( $14,399 \pm 0,487$  UI) (Fig.12H).

**Figura 13** – Contagem celular (A e E), viabilidade celular (B e F), mineralização (C e G) e fosfatase alcalina (D e H) após 7 e 14 dias de cultura, na presença de  $10^{-9}$  M de testosterona. As variáveis são referentes ao tempo 30 dias de experimentos in vivo. Os dados são apresentados como média  $\pm$  DPM (n=3). Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre os tratamentos.  $p < 0,05$ .

### 7 dias de Cultura



### 14 dias de Cultura



Quando se adicionou testosterona na concentração  $10^{-9}$  M, observou-se:

**Contagem celular: 7 dias de cultura:** a maior contagem foi observada no grupo Controle ( $3.568.000 \pm 100.000$  células) e menor contagem para o grupo SOP ( $189.000 \pm 8.000$  células) (Fig.13A). **14 dias de cultura:** maior contagem celular para o grupo Controle ( $1.271.000 \pm 29.000$  células) e a menor contagem foi observada no grupo SOP ( $523.000 \pm 5.000$  células) (Fig.13E).

**Viabilidade celular: 7 dias de cultura:** maior viabilidade observada no grupo Controle ( $0,25467 \pm 0,00462$ ) e a menor média foi observada para o grupo Laser ( $0,18633 \pm 0,00231$ ) (Fig.13B). **14 dias de cultura:** a maior média foi observada para o grupo Controle ( $0,30967 \pm 0,00513$ ) e a menor para o grupo Laser ( $0,222 \pm 0,004$ ) (Fig.13F).

**Mineralização: 7 dias de cultura:** todos os tratamentos reduziram a mineralização em relação ao grupo Controle ( $0,42467 \pm 0,00404$ ), sendo a menor média para o grupo SOP/Laser ( $0,23967 \pm 0,00115$ ) (Fig.13C). **14 dias de cultura:** também foi observada redução da mineralização em todos os tratamentos comparados ao grupo Controle ( $0,3933 \pm 0,0266$ ), com a menor média para o grupo SOP/Laser ( $0,24133 \pm 0,01115$ ) (Fig.13G).

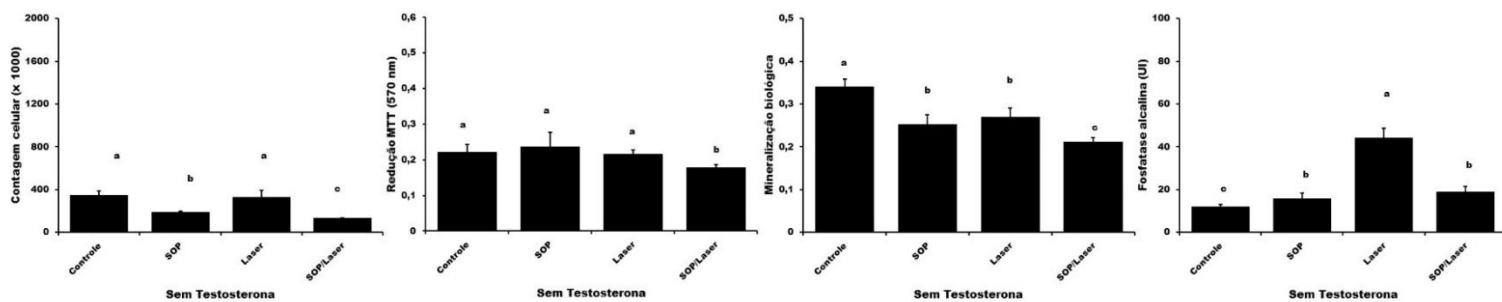
**Fosfatase alcalina: 7 dias de cultura:** a maior média foi observada no grupo Controle ( $22,22 \pm 8,22$  UI), a menor média para fosfatase foi observada no grupo SOP ( $9,43 \pm 0,438$  UI) (Fig.13D). **14 dias de cultura:** a maior concentração média de fosfatase foi observada no grupo SOP/Laser ( $34,18 \pm 2,54$  UI) e a menor média foi observada no grupo SOP ( $17,591 \pm 0,417$  UI) (Fig.13H).

### **Resultados in vitro para o tempo de 45 dias in vivo.**

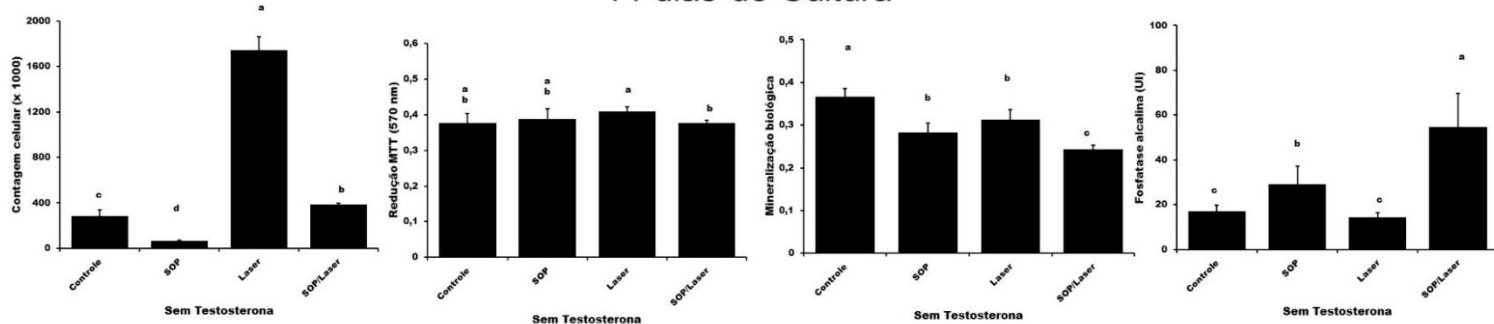
Para as culturas realizadas na ausência de testosterona, observou-se:

**Figura 14** – Contagem celular (A e E), viabilidade celular (B e F), mineralização (C e G) e fosfatase alcalina (D e H) após 7 e 14 dias de cultura, na ausência de testosterona. As variáveis são referentes ao tempo 45 dias de experimentos in vivo. Os dados são apresentados como média  $\pm$  DPM (n=3). Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre os tratamentos.  $p < 0,05$ .

### 7 dias de Cultura



### 14 dias de Cultura



**Contagem celular: 7 dias de cultura:** a maior contagem foi observada no grupo Controle ( $349.000 \pm 35.000$  células) e a menor contagem foi observada no grupo SOP/Laser ( $131.000 \pm 2.000$  células) (Fig.14A). **14 dias de cultura:** maior contagem celular para o grupo Laser ( $1.743.000 \pm 117.000$  células) e a menor contagem foi observada no grupo SOP ( $67.000 \pm 3.000$  células) (Fig.14E).

**Viabilidade celular: 7 dias de cultura:** a viabilidade foi reduzida somente no grupo SOP/Laser ( $0,17933 \pm 0,0075$ ) em relação a todos os grupos, inclusive o Controle ( $0,223 \pm 0,0191$ ) (Fig.14B). **14 dias de cultura:** a maior média foi observada para o grupo Laser ( $0,409 \pm 0,0142$ ) e a menor para o grupo SOP/Laser ( $0,3773 \pm 0,008$ ) (Fig.14F).

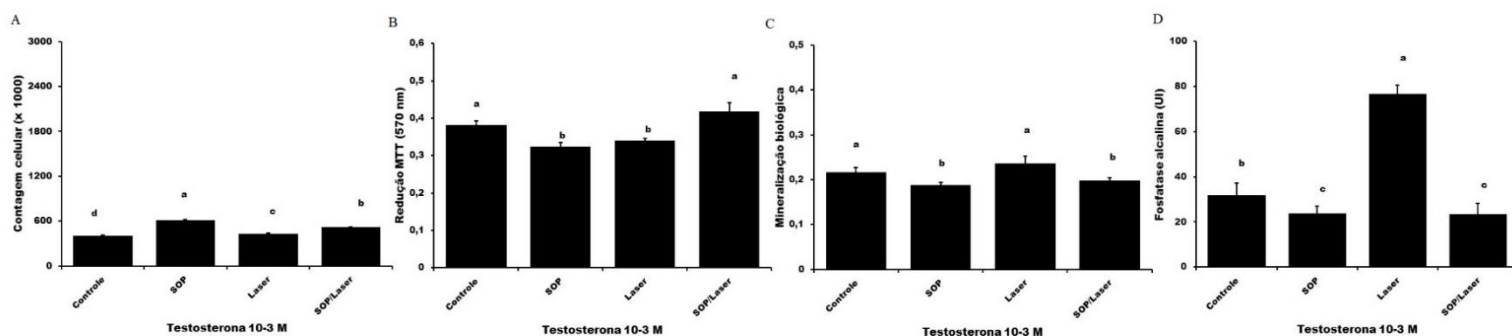
**Mineralização: 7 dias de cultura:** todos os tratamentos reduziram a mineralização em relação ao grupo Controle ( $0,34167 \pm 0,0172$ ), sendo a menor média para o grupo SOP/Laser ( $0,212 \pm 0,0095$ ) (Fig.14C). **14 dias de cultura:** também foi

observada redução da mineralização em todos os tratamentos comparados ao grupo Controle ( $0,3673 \pm 0,0176$ ), com a menor média para o grupo SOP/Laser ( $0,2443 \pm 0,0081$ ) (Fig.14G).

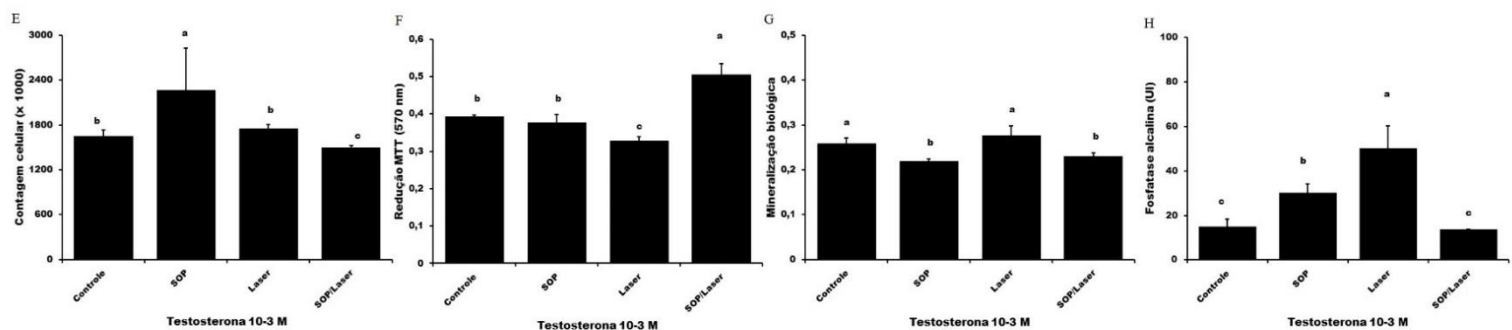
**Fosfatase alcalina: 7 dias de cultura:** todos os grupos apresentaram maiores concentrações de fosfatase em relação ao grupo Controle ( $12,187 \pm 0,764$  UI), a maior média foi observada no grupo Laser ( $44,36 \pm 4,29$  UI) (Fig.14D). **14 dias de cultura:** a maior concentração média de fosfatase foi observada no grupo SOP/Laser ( $54,6 \pm 15,01$  UI) e a menor média foi observada no grupo Laser ( $14,25 \pm 2,08$  UI) (Fig.14H).

**Figura 15** – Contagem celular (A e E), viabilidade celular (B e F), mineralização (C e G) e fosfatase alcalina (D e H) após 7 e 14 dias de cultura, na presença de  $10^{-3}$  M de testosterona. As variáveis são referentes ao tempo 45 dias de experimentos in vivo. Os dados são apresentados como média  $\pm$  DPM (n=3). Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre os tratamentos.  $p < 0,05$ .

### 7 dias de Cultura



### 14 dias de Cultura



Quando se adicionou testosterona na concentração  $10^{-3}$  M nas culturas de osteoblastos, nota-se:

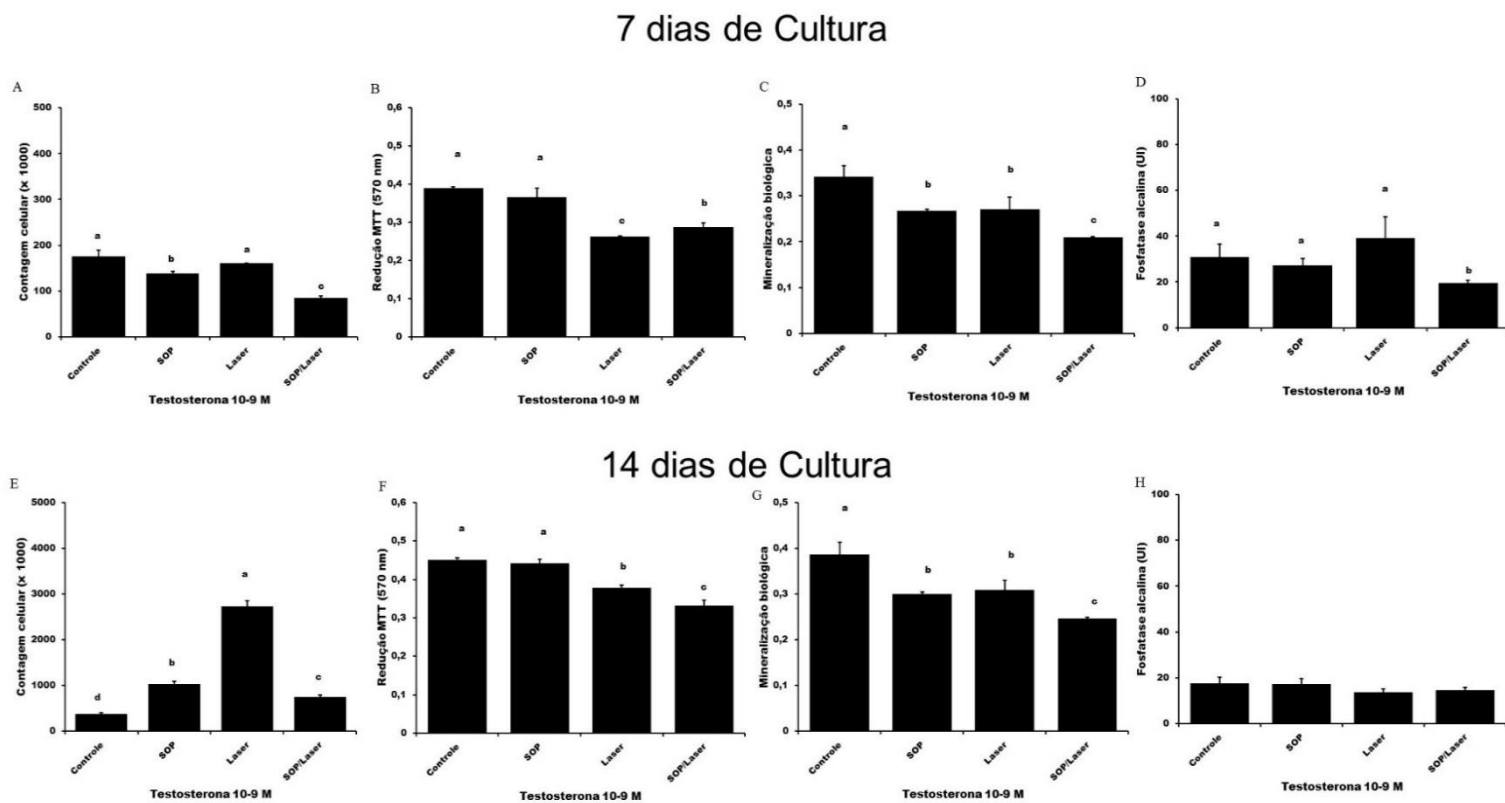
**Contagem celular: 7 dias de cultura:** a maior contagem foi observada no grupo SOP ( $612.000 \pm 12.000$  células) e a menor contagem foi observada no grupo Controle ( $402.000 \pm 8.000$  células) (Fig.15A). **14 dias de cultura:** maior contagem celular para o grupo SOP ( $2.262.000 \pm 562.000$  células) e a menor contagem foi observada no grupo SOP/Laser ( $1.495.000 \pm 32.000$  células) (Fig.15E).

**Viabilidade celular: 7 dias de cultura:** a viabilidade foi maior no grupo SOP/Laser ( $0,4173 \pm 0,0242$ ), que não diferiu significativamente do grupo Controle ( $0,382 \pm 0,011$ ). A menor viabilidade foi observada no grupo SOP ( $0,323 \pm 0,0121$ ) (Fig.15B). **14 dias de cultura:** a maior média foi observada para o grupo SOP/Laser ( $0,5057 \pm 0,0277$ ) e a menor média para o grupo Laser ( $0,3287 \pm 0,0095$ ) (Fig.15F).

**Mineralização: 7 dias de cultura:** a maior média foi observada no grupo Laser ( $0,236 \pm 0,0173$ ) e a menor média foi observada no grupo SOP ( $0,188 \pm 0,0056$ ) (Fig.15C). **14 dias de cultura:** mineralização muito semelhante ao tempo de 7 dias de cultura, a maior média foi observada no grupo Laser ( $0,2763 \pm 0,0215$ ) e a menor média foi observada no grupo SOP ( $0,22 \pm 0,004$ ) (Fig.15G).

**Fosfatase alcalina: 7 dias de cultura:** a maior média foi observada no grupo Laser ( $76,56 \pm 3,92$  UI) e a menor média foi observada no grupo SOP/Laser ( $23,33 \pm 4,75$  UI) (Fig.15D). **14 dias de cultura:** a maior concentração média de fosfatase foi observada no grupo Laser ( $50,19 \pm 10,08$  UI) e a menor média foi observada no grupo SOP/Laser ( $13,676 \pm 0,253$  UI) (Fig.15H).

**Figura 16** – Contagem celular (A e E), viabilidade celular (B e F), mineralização (C e G) e fosfatase alcalina (D e H) após 7 e 14 dias de cultura, na presença de  $10^{-9}$  M de testosterona. As variáveis são referentes ao tempo 45 dias de experimentos in vivo. Os dados são apresentados como média  $\pm$  DPM (n=3). Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre os tratamentos.  $p < 0,05$ .



Após a adição de testosterona na concentração  $10^{-9}$  M nas culturas de células:

**Contagem celular: 7 dias de cultura:** a maior contagem foi observada no grupo Controle ( $176.000 \pm 13.000$  células) e a menor contagem foi observada no grupo SOP/Laser ( $85.000 \pm 4.000$  células) (Fig.16A). **14 dias de cultura:** todos os grupos tiveram maior contagem celular que o grupo Controle ( $374.000 \pm 35.000$  células), sendo que a maior média foi observada no grupo Laser ( $2.732.000 \pm 118.000$  células) (Fig.16E).

**Viabilidade celular: 7 dias de cultura:** em relação ao grupo Controle ( $0,39 \pm 0,0035$ ), a viabilidade foi reduzida em todos os grupos, sendo menor no grupo Laser ( $0,2623 \pm 0,0021$ ) (Fig.16B). **14 dias de cultura:** semelhante à cultura de 7 dias, em relação ao grupo Controle ( $0,45 \pm 0,0062$ ), a viabilidade foi reduzida em todos os grupos, sendo menor no grupo SOP/Laser ( $0,332 \pm 0,0139$ ) (Fig.16F).

**Mineralização: 7 dias de cultura:** a maior média foi observada no grupo Controle ( $0,342 \pm 0,0244$ ) e a menor média foi observada no grupo SOP/Laser ( $0,209 \pm 0,0027$ ) (Fig.16C). **14 dias de cultura:** mineralização muito semelhante ao tempo de 7 dias de cultura, a maior média foi observada no grupo Controle ( $0,386 \pm 0,0267$ ) e a menor média foi observada no grupo SOP/Laser ( $0,2463 \pm 0,0025$ ) (Fig.16G).

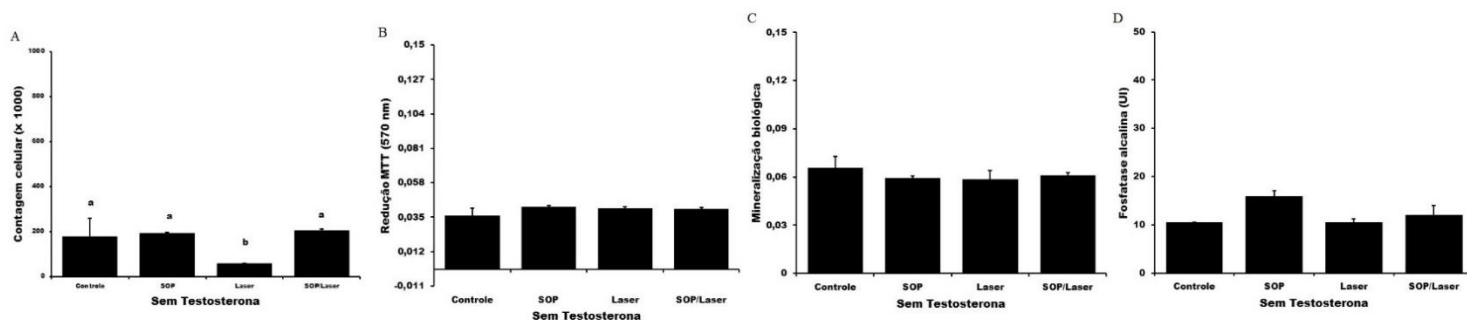
**Fosfatase alcalina: 7 dias de cultura:** a maior média foi observada no grupo Laser ( $39,15 \pm 9,18$  UI) e a menor média foi observada no grupo SOP/Laser ( $19,494 \pm 1,097$  UI) (Fig.16D). **14 dias de cultura:** Não houve diferenças significantes entre os grupos.

**Resultados in vitro para o tempo de 60 dias in vivo.**

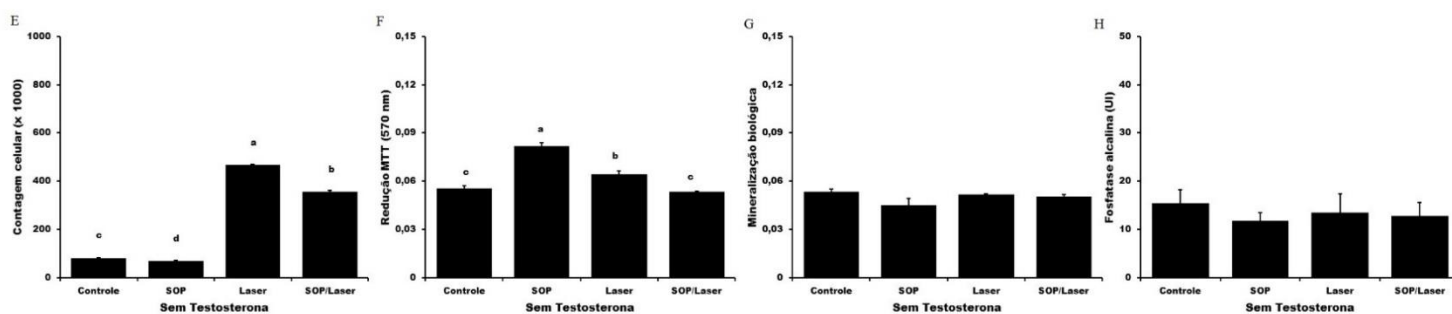


**Figura 17** – Contagem celular (A e E), viabilidade celular (B e F), mineralização (C e G) e fosfatase alcalina (D e H) após 7 e 14 dias de cultura, na ausência de testosterona. As variáveis são referentes ao tempo 60 dias de experimentos in vivo. Os dados são apresentados como média  $\pm$  DPM (n=3). Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre os tratamentos.  $p < 0,05$ .

### 7 dias de Cultura



### 14 dias de Cultura



Na ausência de testosterona, observa-se:

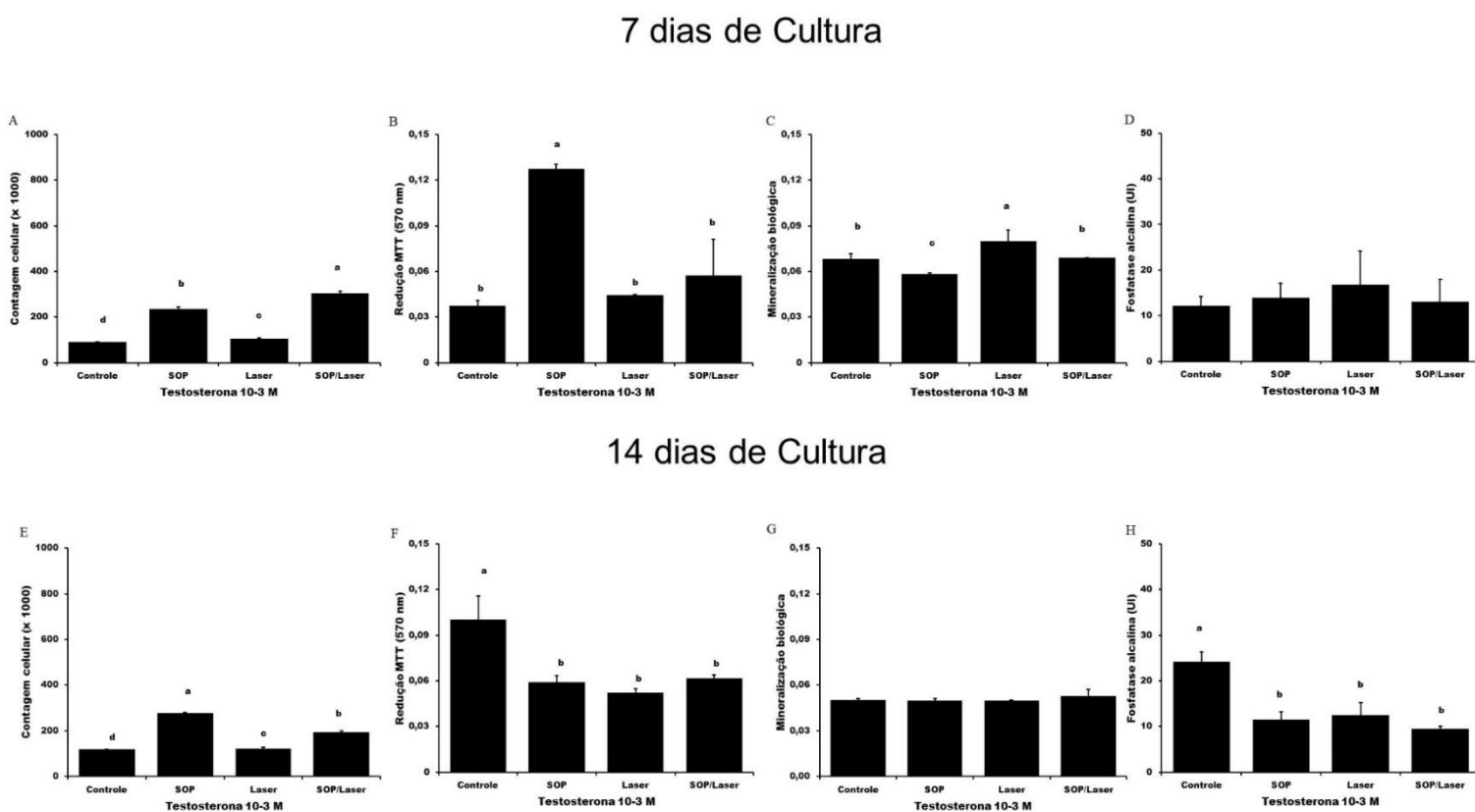
**Contagem celular: 7 dias de cultura:** não houve diferença estatística significativa entre os grupos de tratamento, exceto para o grupo Laser ( $59.000 \pm 1.000$  células) que obteve a menor média (Fig.17A). **14 dias de cultura:** maior contagem celular para o grupo Laser ( $467.000 \pm 2.000$  células) e a menor contagem foi observada no grupo SOP ( $70.000 \pm 900$  células) (Fig.17E).

**Viabilidade celular: 7 dias de cultura:** não houve diferença significativa entre nenhum grupo (Fig.17B). **14 dias de cultura:** a maior média foi observada para o grupo SOP ( $0,082 \pm 0,002$ ) e a menor para o grupo SOP/Laser ( $0,0533 \pm 0,000577$ ) (Fig.17F).

**Mineralização: 7 dias de cultura:** não foi observado diferença significativa entre os grupos (Fig.17C). **14 dias de cultura:** não houve variações significantes para a mineralização (Fig.17G).

**Fosfatase alcalina:** não houve diferença significativa entre os grupos em nenhum dos tempos de cultura.

**Figura 18** – Contagem celular (A e E), viabilidade celular (B e F), mineralização (C e G) e fosfatase alcalina (D e H) após 7 e 14 dias de cultura, na presença de  $10^{-3}$  M de testosterona. As variáveis são referentes ao tempo 60 dias de experimentos in vivo. Os dados são apresentados como média  $\pm$  DPM (n=3). Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre os tratamentos.  $p < 0,05$ .



Na presença de  $10^{-3}$  M de testosterona:

**Contagem celular: 7 dias de cultura:** maior contagem para o grupo SOP/Laser ( $304.000 \pm 8.000$  células) e menor contagem para o grupo Controle ( $90.000 \pm 1.000$  células) (Fig.18A). **14 dias de cultura:** maior contagem celular para o grupo SOP

(278.000 ± 2.000 células) e a menor contagem foi observada no grupo Controle (118.000 ± 2.000 células) (Fig.18E).

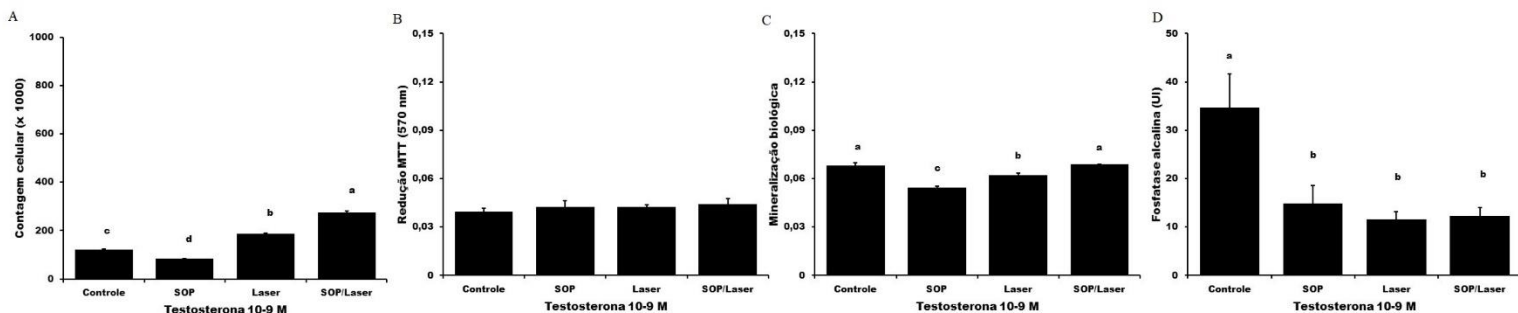
**Viabilidade celular: 7 dias de cultura:** a maior viabilidade celular foi observada no grupo SOP (0,12733 ± 0,00306) e a menor média foi observada no grupo Controle (0,03733 ± 0,00379) (Fig.18B). **14 dias de cultura:** todos os tratamentos reduziram a viabilidade em relação ao grupo Controle (0,1 ± 0,01572) (Fig.18F).

**Mineralização: 7 dias de cultura:** a maior mineralização foi observada no grupo Laser (0,07967 ± 0,0075) e a menor média foi para o grupo SOP (0,05833 ± 0,00058) (Fig.18C). **14 dias de cultura:** não houve variações significantes para a mineralização (Fig.18G).

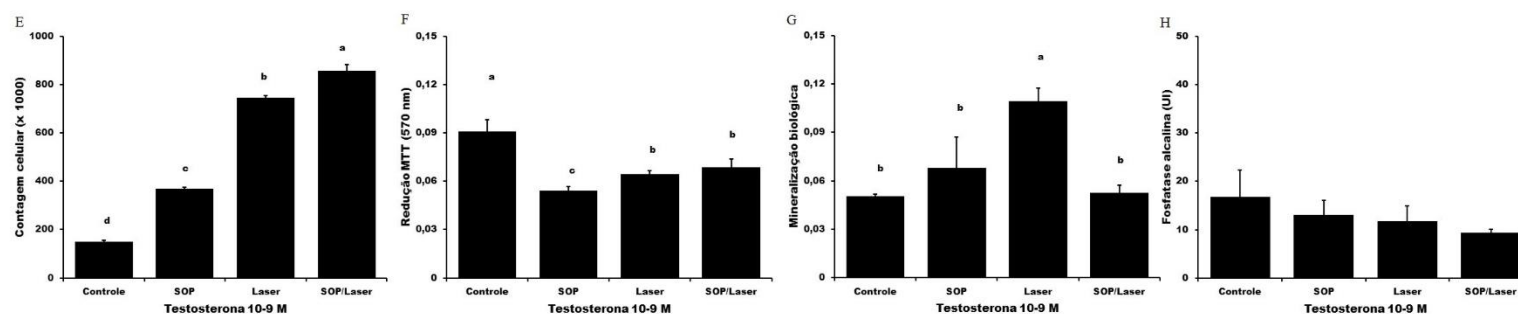
**Fosfatase alcalina: 7 dias de cultura:** não houve variações significantes entre os grupos (Fig.18D). **14 dias de cultura:** todos os tratamentos reduziram a média de fosfatase em relação ao grupo Controle (24,22 ± 2,07 UI) (Fig.18H).

**Figura 19** – Contagem celular (A e E), viabilidade celular (B e F), mineralização (C e G) e fosfatase alcalina (D e H) após 7 e 14 dias de cultura, na presença de  $10^{-9}$  M de testosterona. As variáveis são referentes ao tempo 60 dias de experimentos in vivo. Os dados são apresentados como média  $\pm$  DPM (n=3). Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre os tratamentos.  $p < 0,05$ .

### 7 dias de Cultura



### 14 dias de Cultura



Quando a testosterona foi adicionada às culturas, na concentração de  $10^{-9}$  M, observou-se:

**Contagem celular: 7 dias de cultura:** maior contagem para o grupo SOP/Laser ( $276.000 \pm 5.000$  células) e menor contagem para o grupo SOP ( $84.000 \pm 1.000$  células) (Fig.19A). **14 dias de cultura:** todos os tratamentos estimularam a proliferação celular, com maior média para o grupo SOP/Laser ( $857.000 \pm 26.000$  células) (Fig.19E).

**Viabilidade celular: 7 dias de cultura:** não houve variações significantes para a viabilidade celular entre os grupos (Fig.19B). **14 dias de cultura:** todos os grupos apresentaram redução da viabilidade em relação ao grupo Controle ( $0,091 \pm 0,007$ ), a menor média foi observada no grupo SOP ( $0,054 \pm 0,00265$ ) (Fig.19F).

**Mineralização: 7 dias de cultura:** a maior mineralização foi observada no grupo SOP/Laser ( $0,069 \pm 0$ ) e a menor média foi para o grupo SOP ( $0,05467 \pm 0,00058$ ), ambos em relação ao Controle ( $0,06833 \pm 0,00153$ ) (Fig.19C). **14 dias de cultura:** o único grupo em que houve aumento da mineralização foi o Laser ( $0,10933 \pm 0,00839$ ) (Fig.19G).

**Fosfatase alcalina: 7 dias de cultura:** em relação ao grupo Controle ( $34,62 \pm 7,01$  UI), todos os grupos reduziram as médias da fosfatase alcalina. **14 dias de cultura:** não houve diferença significativa entre os grupos.

## 6 – Discussão

O presente trabalho utilizou modelo animal com ratas Wistar adultas induzidas à SOP com dose única de valerato de estradiol. Os resultados obtidos mostram alterações no ciclo estral, na massa corporal, na massa ovariana, no IGS, na glicemia, na insulinemia, na morfologia ovariana e nas concentrações plasmáticas de T entre os tratamentos utilizados e ao longo dos períodos experimentais.

Trabalhos mostram que diversos modelos animais têm sido propostos para estudos relacionados à síndrome do ovário policístico (Shi e Vine, 2012; Walters et al., 2012; Kuang et al., 2018; Krishnan e Muthusami, 2017; Tamandon et al., 2018; Tata et al., 2018; Alves, et al., 2019; Ryu et al., 2019; Torres et al., 2019). De acordo com o método utilizado para a indução da SOP, via de administração de hormônios, tempo de exposição aos hormônios, idade dos animais e duração do experimento, pode haver diferenças nos resultados obtidos (Noroozadeh et al. al., 2017).

A massa corporal de animais induzidos à SOP pode aumentar ou reduzir, dependendo do modelo animal e do método de indução (Maneräs et al., 2007; Van Houten et al., 2012 Caldwell et al., 2014; Ma et al., 2017). Não há consenso na literatura, inclusive para mulheres. Há mulheres com SOP que são obesas e mulheres com SOP que estão com massa corporal normal de acordo com a altura e a idade (Carmina e Lobo, 2007). Os resultados do presente estudo demonstram que os animais apresentaram alterações no ganho de massa corporal ao longo dos tempos experimentais, principalmente as fêmeas induzidas à SOP durante 30 dias após a

indução. Todos os animais estavam com maior massa corporal nas datas das eutanásias comparadas à data de indução à SOP (dados não mostrados); contudo, os tratamentos apresentaram influência sobre o ganho de massa de acordo com os períodos experimentais. Pode-se sugerir que os resultados corroboram com a literatura e demonstram alterações metabólicas sobre a massa corporal induzidas pelo modelo hormonal utilizado.

Outra alteração metabólica que tem sido estudada na SOP é a hiperglicemia. Porém, assim como a massa corporal, os resultados não são conclusivos. Não houve aumento na glicemia de jejum em ratas induzidas à SOP, com síndrome metabólica (SM) e tratadas com metformina e flutamida (Kupreeva et al., 2019). A resistência à insulina (RI) e a hiperinsulinemia compensatória é comum em mulheres com SOP e em animais induzidos à SOP. A RI causa hiperglicemia que, associada a hiperinsulinemia, estimula a secreção hipofisária de LH e, por consequência, aumenta a síntese de T pelas células da teca ovarianas (Dunaif, 1997; Homburg, 2009; Dumitrescu et al., 2015). Os resultados apresentados no presente estudo mostram que a glicemia foi reduzida nos animais controle e SOP e foi estimulada pelo tratamento com laser após 60 dias da indução à SOP. Tais resultados, associados à massa corporal e à hiperandrogenemia, podem sugerir que alterações metabólicas e esteroidogênicas ovarianas estimulam um ciclo vicioso, ou seja, o aumento da testosterona plasmática pode modular as atividades dos adipócitos e das células  $\beta$ -pancreáticas, resultando em alterações da massa corporal e dos níveis plasmáticos de insulina e de glicose que podem estimular a síntese de testosterona, continuando o ciclo vicioso.

Os resultados do presente estudo mostram que as variações da glicemia e insulinemia dos animais experimentais não apresentam correlações funcionais no tempo 30 dias. A glicemia de todos os animais dos grupos experimentais foi menor ao grupo controle; entretanto, a insulinemia não apresentou correlações funcionais à glicemia. Após 45 dias de experimentos, todos os grupos tiveram redução da insulinemia. E, aos 60 dias, os animais submetidos ao laser apresentaram aumento nas concentrações plasmáticas de insulina. Tais resultados, até o momento, são inconclusivos e podem sugerir que o modelo animal utilizado seja mais indicado para estudos relacionados às alterações endócrino reprodutivas e não seja o mais indicado para estudar alterações metabólicas relacionadas à SOP.

A SOP é uma endocrinopatia muito comum entre mulheres em idade reprodutiva e é caracterizada por distúrbios metabólicos e reprodutivos. Mulheres com SOP apresentam anormalidades no metabolismo dos hormônios esteroides ovarianos, principalmente de estrogênios e androgênios (Zborowski et al., 2000; Baptiste et al., 2010; Krishnan e Muthusami, 2017). O hiperandrogenismo é uma característica típica da SOP, tanto em mulheres quanto em animais, e muitas vezes é resultado de alterações da esteroidogênese folicular, podendo ou não causar redução da fertilidade (Chen et al., 2015). O presente trabalho demonstra níveis elevados de T nos animais induzidos à SOP, principalmente após 60 dias da indução. Estudos mostram efeitos desse hormônio sobre o sistema reprodutivo feminino, principalmente, influenciado pelo tempo de exposição à T (Abbott et al., 2005; Wu et al., 2010; Noroozadeh et al., 2017, Astapova et al., 2019). Pode-se sugerir, no presente estudo, que as alterações observadas na massa dos ovários e no IGS, ambas diminuídas, possam ser decorrentes das alterações na esteroidogênese ovariana, principalmente pelo aumento plasmático de T, pois esse hormônio influencia a dinâmica ovariana, tanto a esteroidogênese quanto a foliculogênese. Desta forma, a massa ovariana pode ter sido reduzida e, como o IGS correlaciona tal massa com a massa corporal, houve reduções em ambas as variáveis.

Mulheres com SOP (Frank et al., 2003), roedoras e ovelhas induzidas à SOP com andrógenos (Sharma et al., 2002; Wu et al., 2010) apresentam aumento do volume ovariano e/ou morfologia ovariana multifolicular. Ratas induzidas à SOP com DHT apresentam ciclos irregulares, aumento no tamanho dos ovários, presença de folículos antrais atrésicos, cistos foliculares com hipertecose e redução na quantidade de células da granulosa, além de poucos corpos lúteos (Mannerås et al. 2007). Os resultados do presente estudo mostram que os ovários das ratas induzidas à SOP apresentaram maior número de cistos e menor número de corpos lúteos e folículos, principalmente aos 45 e 60 dias após indução. Esses dados associados ao aumento nas concentrações plasmáticas de T, principalmente no grupo SOP 60 dias, mostram que há alterações ovarianas compatíveis àquelas relacionadas à síndrome, ou seja, alterações morfológicas (principalmente os cistos) e endócrinas (aumento da T).

Alterações nos níveis plasmáticos de T, no caso o hiperandrogenismo, pode alterar a dinâmica folicular e alterar os ciclos estrais das ratas (Brawer et al., 1986; Montrezor et al., 2015). Os resultados obtidos no presente trabalho mostram que as fêmeas

tratadas apresentaram alterações nos ciclos estrais comparadas às fêmeas dos grupos controle. Tais alterações podem ou não ser acompanhadas de infertilidade (Chen et al., 2015; Ryu et al., 2019). Não é possível confirmar tal relação pois as ratas não foram desafiadas à reprodução, por não ser objetivo do trabalho. Contudo, pode-se associar as alterações dos ciclos estrais das ratas, principalmente quando relacionadas às mudanças ovarianas, morfológicas e endócrinas, dependentes da elevação plasmática de T.

A FBM tem sido aplicada em estudos *in vivo* e *in vitro* para pesquisas básicas e clínicas. As principais ações da FBM estão relacionadas com as ações do laser de baixa intensidade sobre os fotoceptores presentes nas membranas mitocondriais (Karu, 2008). Resultados prévios do nosso laboratório demonstraram que a FBM reduziu o número de cistos ovarianos e aumentou o número de corpos lúteos nos ovários de ratas induzidas à SOP (Alves et al., 2019). Os resultados do presente estudo replicaram os resultados anteriores, pois houve diminuição do número de cistos ovarianos após o tratamento com o laser nos animais induzidos à SOP. Além disso, os resultados mostram que a FBM reduziu o aumento da testosterona plasmática induzido pela SOP, além de modular o ganho de massa corporal. A síntese dos andrógenos ovarianos é dependente da ação do LH sobre a cascata bioquímica de ações das enzimas mitocondriais das células da teca: proteína reguladora aguda da esteroidogênese (STAR), P450<sub>scc</sub> (CYP11A1), 17 $\alpha$ -hidroxilase (CYP17) e 3  $\beta$ -hidroxisteroide desidrogenase (HSB3B) (Kozłowska et al., 2013; Pan et al., 2015). Desta forma, como a FBM foi aplicada sobre os ovários das ratas, sugere-se que as ações dessa estimulação sobre a atividade de enzimas mitocondriais tenham modulado as atividades das enzimas esteroidogênicas e reduzido a síntese de T. E, por conseguinte, pode-se sugerir que a redução da T modulou de forma dual a atividade lipogênica nos adipócitos, revertendo a perda de massa corporal nas ratas do grupo 60 dias após indução à SOP e intensificando a perda de massa corporal nas ratas do grupo 45 dias após a indução.

De acordo com resultados do nosso laboratório, a dinâmica óssea de ratas induzidas a SOP com VE mostrou alterações, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Houve redução na carga máxima e do ponto de fratura nos fêmures das ratas induzidas à SOP e também houve redução na formação dos nódulos de mineralização *in vitro* (Bonfá et al., 2017). Com a intenção de analisar se as células tronco mesenquimais



extraídas da medula óssea dos animais poderiam indicar *in vitro*, alterações refletidas dos tratamentos *in vivo*, nossos resultados confirmaram nossa hipótese. Comparados ao grupo Controle, o número de células obtidas das medulas ósseas dos animais induzidos a SOP foi significativamente menor após 10 dias de cultura. De forma generalizada, a contagem de osteoblastos, a formação de nódulos de mineralização e a atividade da fosfatase alcalina foram menores para os grupos induzidos a SOP após 7 e 14 dias de cultura em meio de diferenciação, exceto a atividade da fosfatase alcalina nas culturas de células obtidas dos animais após 45 dias de indução à SOP. O teste da viabilidade celular da redução do MTT confirmou que as células se mantiveram viáveis durante os períodos de cultura, apesar das alterações observadas. Resultados semelhantes foram observados quando as células foram desafiadas com duas concentrações de T ( $10^{-3}$  M e  $10^{-9}$  M). Resultados obtidos em nosso laboratório mostraram que células OSTEO-1 cultivadas por até 21 dias na presença de esteroides ovarianos, inclusive testosterona (Brancaglião et al., 2017), apresentaram comportamentos biológicos diferentes das células do presente estudo, sugerindo que a indução à SOP *in vivo* compromete as células da linhagem óssea da medula e parte dos seus comportamentos biológicos *in vitro*, após diferenciação em osteoblastos.

Alterações no comportamento biológico das células *in vitro*, oriundas dos animais tratados *in vivo* também foram observadas com base nas variáveis analisadas. De maneira resumida, sugere-se que osteoblastos mantidos *in vitro*, na ausência e na presença de T, demonstram viabilidade ao longo dos períodos de cultura e que os tratamentos *in vivo* com FBM influenciaram o comportamento biológico desses osteoblastos *in vitro*, sugerindo que culturas de células de medula óssea podem ser utilizadas para estudos morfológicos, funcionais e moleculares relacionados à SOP. Um estudo utilizando FBM em culturas de osteoblastos oriundas de ratos induzidos a Diabetes Mellitus (DM), que é uma doença caracterizada por hiperglicemia, aumento do estresse oxidativo e alterações nas atividades de reparo tecidual, atrasando o reparo tecidual ósseo, mostrou que a FBM diminuiu a atividade de fosfatase alcalina e da mineralização nos grupos induzidos à DM em relação às culturas controle, confirmando o efeito negativo da DM no potencial osteogênico (Copete, 2019).

## **7 – Conclusões**

O modelo de indução à SOP por VE foi eficaz, demonstrando os sinais referentes à síndrome. A FBM auxiliou na regulação dos níveis plasmáticos de testosterona, insulina e glicose, modulou o ganho de massa corporal e reparou as atividades ovarianas das ratas induzidas à SOP e submetidas à FBM. Além disso, a FBM modulou, ora estimulando ora inibindo, as atividades das células ósseas de forma direta e indireta (tanto in vivo como in vitro).

## 8 – Anexos



Centro Universitário de Araraquara

Rua Voluntários da Pátria, 1309 - Centro - Araraquara - SP  
CEP 14801-320 - Caixa Postal 68 - Fone/Fax: (16) 3301-7100

www.uniara.com.br

### COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

**Parecer do projeto sob o protocolo: nº. 030/16**

**Título do Projeto:** Laserterapia e terapia celular em ratas induzidas à síndrome do ovário policístico.

**Pesquisador responsável:** Prof. Dr. Luís Henrique Montrezor

#### PARECER

O Projeto de Pesquisa intitulado “**Laserterapia e terapia celular em ratas induzidas à síndrome do ovário policístico**”, sob sua responsabilidade, com a participação dos colaboradores Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizzoto e Michele Andrade de Barros foi analisado por este Comitê.

O projeto tem por objetivo estudar os efeitos da laserterapia e da terapia celular sobre a dinâmica óssea *in vitro* e *in vivo* num modelo de ratas induzidas à Síndrome do Ovário Policístico (SOP).

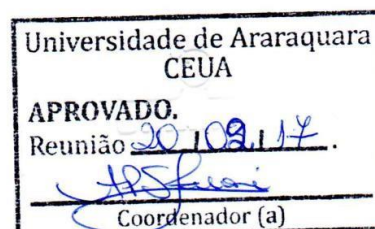
A análise do referido projeto mostra que está devidamente instruído conforme as normas que regulamentam as pesquisas envolvendo animais de experimentação.

Este Comitê apresenta **parecer favorável**, sendo assim, o projeto está **APROVADO** para a sua execução.

Os autores, ao concluírem o trabalho devem encaminhar ao CEUA-UNIARA o Relatório Final de Atividades, na íntegra contendo os resultados e conclusões obtidas.

Araraquara, 13 de março de 2017.

Relator/Parecerista



## 9 – Referências

ABBOTT, D.H.; BARNETT, D.K.; BRIUNS, C.M.; DUMESTIC, D.A.; Androgens excess fetal programming of female reproduction: a developmental aetiology for polycystic ovary syndrome? **Hum Reprod Update**. v11, p.357-374, 2005.

ALVES, E.D.; BONFÁ, A.L.O.; PIGATTO, G.R.; ANSELMO-FRANCI, J.A.; ACHCAR, J.A.; PARIZOTTO, N.A.; MONTREZOR, L.H.; Photobiomodulation can improve ovarian activity in polycystic ovary syndrome-induced rats. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**. v194, p.6-13, 2019.

ANDE, S.R.; NGUYEN, K.H.; XU, Y.X.Z.; MISHRA, S.; Prohibitin-induced obesity leads to anovulation and polycystic ovary in mice. **Biology Open**. v6, p.825-831, 2017.

ARAÚJO, T.G.; OLIVEIRA, O.; TOBAR, N.; SAAD, M.J.; MOREIRA, L.R.; REIS, E.R.; et al. Liver regeneration following partial hepatectomy is improved by enhancing the HGF/Met axis and Akt and Erk pathways after low-power laser irradiation in rats. **Lasers Med. Sci**. v28, n6, p.1511-1517, 2013.

ASTAPOVA, O.; MINOR, B.M..N; HAMMES, S.R.; Physiological and pathological androgen actions in the ovary. **Endocrinology**. v160, n5, p1166-1174, 2019.

AZZIZ, R. Animal models for PCOS – not the real thing. **Nature Reviews Endocrinology**. v13, n7, p.382-384, 2017.

BALASCH, J. Sex steroids and bone: current perspectives. **Hum. Reprod. Update**. v3, p.201-222, 2003.

BAPTISTE, C.G.; BATTISTA, M.C.; TROTTIER, A.; BALLARGEON, J.P. Insulin and hyperandrogenism in women with PCOD. **Journal of Steoid Biochemistry and Mollecular Biology**. v122, p.1-22, 2010.

BONFÁ, ALO. Fenótipo osteoblástico, biofísica e biomecânica do tecido ósseo em um modelo de ratas induzidas à síndrome do ovário policístico: estudos in vivo e in vivo. **Dissertação de Mestrado**. Universidade de Araraquara – UNIARA. 58p., 2017.

BRANCAGLIÃO, L.F.C.; BONFÁ, A.L.O.; LEMOS, J.E.S.; ROCHA, N.F.; GONÇALVES, V.M.; MONTREZOR, L.H. Effects of ovarina steroids on osteoblast viability and mineralization. **Asian Journal of Biology**. v2. n3 p.1-18, 2017.

BRAWER, J.R.; MUNOZ, M.; FAROOKHI, R.; Development of the polycystic ovaria condition (PCO) in the estradiol valeratetreated rat. **Bio. Reprod.** v35, n3 p.647-655, 1986.

CALDWELL, A.S.; CALDWELL A.S.L.; EDWARDS, M.C.; DESAI, R.; JIMENEZ, H.; GILCHRIST, R.B.; HANDELSMAN, D.J.; WALTERS, K.A. Neuroendocrine androgen action is a key extraovarian mediator in the development of polycystic ovary syndrome. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**. v114, p.3334–3343, 2017.

CALDWELL, A.S.L.; MIDDLETON, L.J.; JIMENEZ, M.; DESAI, R.; MCMAHON, A.C.; ALLAN, C.M.; HANDELSMAN, D.J.; WALTERS, K.A. Characterization of reproductive, metabolic and endocrine features of polycystic ovary syndrome in female hyperandrogenic mouse models, **Endocrinology**. v155, n8, p.3146–3159, 2014.

CARMINA, E.; LOBO, R.A. Prevalence and metabolic characteristics of adrenal androgen excesso in hyperandrogenic women with diferente phenotypes. **J. Endocrinol. Investig.** v30, p.111–116, 2007.

CARMINA, E.; ROSATO, F.; JANNI, A.; RIZZO, M.; LONGO, R.A. Extensive clinical experience: relative prevalence of different androgen excess disorders in 950 women referred because of clinical hyperandrogenism. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** v91 p.2–6, 2006.

CASTELO-BRANCO, C.; GÓMEZ, O.; PONS, F.; MARTINEZ DE OSABA, M.J.; BALASCH, J.; VANRELL, J.A. Secreting ovarian tumors may protect women from osteroporosis. **Gynecol. Oncol.** v88 p.149-152, 2003.

CASTRO-E-SILVA, O.; ZUCOLOTO, S.; MARCASSA, L.G.; MARCASSA, J.; KURACHI, C.; MELO, C.A.S.; RAMALHO, F.S.; BAGNATO, V.S. Spectral response for laser enhancement in hepatic regeneration for hepatectomized rats. **Laser Surg. Med.** v32 p.50-53, 2003.

CHEN, M.J.; CHOU, C.H.; CHEN, C.U.; YANG, W.S.; YANG, Y.S.; HO, H.N. The effect of androgens on ovarian follicle maturation: Dihydrotestosterone suppress FSH-stimulated granulosa cell proliferation by upregulating PPAR gama-dependent PTEN expression. **Scientific Reports** v5, p.1-13, 2015.

COPETE, I.N.; BUENO, N.P.; SOUZA, A.T.P.; MARQUES, M.M.; MINIELLO, T.G.; FERRAZ, E.P.; Efeito da terapia de fotobiomodulação na diferenciação osteoblástica de células-tronco mesenquimais de ratos diabéticos. **Brazilian Oral Research** [S.l: s.n.], 2019.

DUMITRESCU R, MEHEDINTU C, BRICEAG I, PURCAREA VL, HUDITA D. The polycystic ovary syndrome: Na update on metabolic and hormonal mechanisms. **J Med Life**. v8, n2, p.142-145, 2015.

DUNAIF, A. Insulin resistance and the polycystic ovarian syndrome; mechanism and implications for pathogenesis. **Endocrinol Rev**. v18, p.774–800, 1997.

EHRMANN, D.A. Polycystic ovary syndrome. **N. Engl. J. Med**. v352, p.1223–1236, 2012.

ESCOBAR-MORRAELE, HF. Polycystic ovary syndrome: definition, aetiology, diagnosis and treatment; **Nature Reviews Endocrinology**. v14, p.270–284, 2018.

FEBRASGO; Síndrome dos ovários policísticos. -- São Paulo: Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia (FEBRASGO), (Série, Orientações e Recomendações FEBRASGO, no.4/Comissão Nacional Especializada em Ginecologia Endócrina). 103p. 2018.

FERREIRA, J.A.S.; FERNANDES, C.E.; MELO, N.R.; AZEVEDO, L.H.; PEIXOTO, S. Síndrome dos ovários policísticos: uma visão atual. **Feminina**. v36, n8, p.477-483, 2008.

FRANKS, S.; ROBERTS, R.; HARDY, K.; Gonadotrophin regimens and oocyte quality in women with polycystic ovaries. **Reprod. Biomed. Online**. 6:181-184, 2003.

GAO, X.; XING, D. Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. **J. Biom. Sci**. v16, n4, p.1-16, 2009.

GÓMEZ-AMBROSI, J.; RODRÍGUEZ, A.; CATÁLAN, V.; FRÜHBECK, G. The bone-adipose axis in obesity and weight loss. **Obes. Surg**. v18, p.1134-1143, 2008.

GREGORIOU, O.; KOUSKOUNI, E.; BAKAS, P.; KONIDARIS, S.; PAPADIAS, K.; KALOVIDOURIS, A.; CREATSAS, G. Bone mineral density in women with idiopathic hirsutism. **Gynecol. Endocrinol.** v14, p.364-368, 2000.

GREGORY, C.A.; GUNN, W.G.; PEISTER, A.; PROCKOP, D.J.; An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. **Analytical Biochemistry.** 239(1):77-84, 2004.

HOMBURG, R. Androgen circle of polycystic ovary syndrome. **Hum Reprod.** v24, p.1548–1555, 2009.

KANG, X.; JIA, L.; SHEN, X. Manifestation of Hyperandrogenism in the Continuous Light Exposure-Induced PCOS Rat Model; **Biology Open.** v6 p.825-831, 2015.

KARU, T.I. Mitochondrial signaling in mammalian cells activated by red and nearIR radiation. **Photochem. Photobiol.** v84, n5, p.1091–1099, 2008.

KHADRA, M.; LYNSTADAAS, S.P.; HAANAES, H.R.; MUSTAFA, D. Determining optimal dose of laser therapy for attachment and proliferation of human oral fibroblasts cultured on titanium implant material. **J. Biome. Mater. Res.** v73A, p.55-62, 2005.

KLEIN-NULEND, J.; VAN-OERS, R.F.M.; BAKKER, A.D.; BACABAC, R.G. Bone cell mechanosensitivity, estrogen deficiency and osteoporosis. **J. Biomechanics.** v48, p.855-865, 2015.

KOKOSAR, M.; BENRICK, A.; PERFILYEV, A.; NILSSON, E.; KÄLLMAN, T.; OHLSSON, C.; et al. A Single Bout of Electroacupuncture Remodels Epigenetic and Transcriptional Changes in Adipose Tissue in Polycystic Ovary Syndrome. **Scientific reports.** v8, n1, p.1878, 2018.

KOSLOWSKA, A.; WOJTKIEWICZ, J.; MAJEWSKI, M.; JANA, B. The noradrenergic innervation and steroidogenic activity of porcine cystic ovaries. **Physiol Res.** v62, p.421-433, 2013.

KRISHNAN, A.; MUTHUSAMI, S. Hormonal alterations in PCOS and its influence on bone metabolism. **J. Endocrinol.** V232, n2, p.99-113, 2017.

KUANG, H.Y.; LI, Y.; ZHANG, H.P.; LEGRO, R.S.; STENER-VICTORIN, E. Data Do Not Support Effectiveness of Acupuncture for Improving Live Birth Rate in Women with

Polycystic Ovary Syndrome. **Chinese journal of integrative medicine.** v24, n5, p.399-400, 2018.

KUPREEVA, M.; DIANE, A.; LEHNER, R.; WATTS, R.; GHOSH, M.; PROCTOR, S.; VINE, D. Effect of metformin and flutamide on insulin, lipogenic and androgen-estrogen signaling and cardiometabolic risk in a PCOS-prone metabolic syndrome rodent model. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** v316, p.16-33, 2019.

LINS, R.D.A.U.; DANTAS, E.M.; LUCENA, K.C.R.; CATÃO, M.H.C.V.; GRANVILLE-GARCIA, A.F.; NETO, L.G.C. Efeitos bioestimulantes do laser de baixa potência no processo de reparo. **An. Bras. Dermatol.** v85, n6, 2010.

MA, Y.; ANDRISSE, S.; CHEN, Y.; CHILDRESS, S.; XUE, P.; WANG, Z.; JONES, D.; KO, C.M.; WU, S. Androgen receptor in the ovary theca cells plays a critical role in androgen-induced reproductive dysfunction. **Endocrinology.** v158, n1, p.98–108, 2017.

MALIQUEO M, BENRICK A, MARCONDES RR, JOHANSSON J, SUN M, STENER-VICTORIN E. Acupuncture does not ameliorate metabolic disturbances in the P450 aromatase inhibitor-induced rat model of polycystic ovary syndrome. **Experimental physiology.** v102, n1, p.113-127, 2017.

MANNERÄS, L.; CAJANDERS, S.; HOLMÄNG, A.; SELESKOVIC, Z.; LYSTIG, T.; LÖNN, M.; STENERVICTORIN, E. A new rat model exhibiting both ovarian and metabolic characteristics of polycystic ovary syndrome. **Endocrinology.** v148, n8, p.3781–3791, 2007.

MANIATOPOULOS, C.; SODEK, J.; MELCHER, A.H.; Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. **Cell Tissue Res.** 254(2):317-330, 1988

MANNI L, LUNDEBERG T, HOLMÄNG A, ALOE A, STENER-VICTORIN E. Effect of electro-acupuncture on ovarian expression of alpha (1)- and beta (2)-adrenoceptors, and p75 neurotrophin receptors in rats with steroid-induced polycystic ovaries. **Reproductive Biology and Endocrinology.** v3, p.1-21, 2005.

MARCONDES, F.K.; BIANCHI, F.; TANNO, A. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Braz. J. Biol.** 62(4): 609-614, 2002.



MARCONDES, R.R.; MALIQUEO, M.; FORNES, R.; BENRICK, A.; HU, M.; IVARSSON, N.; CARLSTRÖM, M.; CUSHMAN, S.W.; STENKULA, K.G.; MACIEL, G..AR.; STENER-VICTORIN, E. Exercise differentially affects metabolic functions and white adipose tissue in female letrozole- and dihydrotestosterone-induced mouse models of polycystic ovary syndrome. **Mol. Cel. Endocrinol.**, v448, p.66-76, 2017.

MARTIN, A.; XIONG, J.; KOROMILA, T.; II, J.S.; CHANG, S.; SONG, Y.S.; MILLER, J.L.; HAN, C.Y.; KOSTENUIK, P.; KRUM, S.A.; CHIMGE, N.O.; GABE, Y.; FRENKEL, B. Estrogens antagonize RUNX2-mediated osteoblast-driven osteoclastogenesis through regulating RANKL membrane association. **Bone**. v75, p.96-104, 2015.

MONTREZOR, L.H.; CARVALHO, D.; DIAS, M.B.; ANSELMO-FRANCI, J.A.; BÍCEGO, K.C.; GARGAGLIONI, L.H. Hypoxic and Hypercapnic ventilatory responses in rat with polycystic ovaries. **Resp. Physiol. Neurobiol.** v217, p.17-24, 2015.

MOSMANN, T.; Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol Methd.** 65(1-2):55-63, 1983.

NACUL, A.; COMIM, F.; SPRITZER, P.M. Neuroendocrine aspects of the polycystic ovary syndrome. **Arq Bras Endocrinol Metab.** v47, n4, 2003.

NOROOZZADEH, M.; BEHBOUDI-GANDEVANI, S.; ZADEH-VAKILI, A. TEHRANI FR (2017) Hormone-induced rat model of polycystic ovary syndrome: A systematic review. **Life Science.** v191, p.259-272, 2017.

NOTELOVITZ, M. Androgen effects on bone and muscle. **Fertil. Steril.** v77, n4, p.34-41, (a), 2002.

NOTELOVITZ, M. Overview of bone mineral density in postmenopausal women. **J. Reprod. Med.** v47, n1, p.71-81, (b), 2002.

PADMANABHAN, V.; VEIGA-LOPEZ, A. Sheep models of polycystic ovary syndrome phenotype. **Mol. Cell Endocrinol.** 373:8-20, 2013.

PAN, J.X.; ZHANG, J.Y.; KE, Z.H.; WANG, F.F.; BARRY, J.A.; HARDIMAN, P.J.; QU, F. Androgens as double-edged swords: Induction and suppression of follicular development. **Hormones.** v14, n2, p.190-200, 2015.

PEREIRA, V.M.; HONORATO-SAMPAIO, K.; MARTINS, A.S.; REIS, F.M.; REIS, A.M.; Downregulation of natriuretic peptide system and increased steroidogenesis in rat polycystic ovary. **Peptide**. v60, p.80-85, 2014.

RYU, Y.; KIM, S.W.; KIM, Y.Y.; KU, S.Y. Animal Models for Human Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) Focused on the Use of Indirect Hormonal Perturbations: A Review of the Literature. **Int. J. Mol. Sci.** v20, n11, p.1-20, 2019.

SHARMA, T.P.; HERKIMER, C.; WEST, C.; YE, W.; BIRCH, R.; ROBINSON, J.E.; FOSTER, D.L.; PADMANABHAN, V.; Fetal programming: prenatal androgen disrupts positive feedback actions of estradiol but does not affect timing of puberty in female sheep. **Biol. Reprod.** 66:924-933, 2002.

SHI, D.; VINE, D.F. Animal model of polycystic ovary syndrome: a focused review of rodent models in relationship to clinical phenotypes and cardiometabolic risk. **Fert Steril.** v98, n1, p.185-193, 2012.

SILVA, R.C.; PARDINI, D.P.; KATER, C.E. Síndrome dos Ovários Policísticos, Síndrome Metabólica, Risco Cardiovascular e o Papel dos Agentes Sensibilizadores da Insulina. **Arq Bras Endocrinol Metab.** v50, n2, p.281-290, 2006.

SLOOTWEG, M.C.; EDERVEEN, A.G.H.; SCHOT, L.P.C.; SCHOONEN, W.G.E.J.; KLOOSTERBOER, H.J. Oestrogen and progestogen synergistically stimulate human and rat osteoblast proliferation. **J. Endocrinol.** v133, p.5-8, 1992.

STEIN, A.; BENAYAHU, D.; MALTZ, L.; ORON, U. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. **Photomed. Laser Surg.** v23, n2, p.161-166, 2005.

TAMADON, A.; HU, W.; CUI, P.; MA, T.; TONG, X.; ZHANG, F.; LI, X.; SHAO, L.R.; FENG, Y. How to choose the suitable animal model of polycystic ovary syndrome? **Trad Med Mod Med.** v1, n2, p.95-113, 2018.

TATA, B.; MIMOUNI, N.E.H.; BARBOTIN, A.L.; MALONE, A.S.; LOYENS, A.; PIGNY, P.; DEWAILLY, D.; CATTEAU-JONARD, S.; SUNDSTRÖM-POROMAA, I.; PILTONEN, T.T.; BELLO, F.D.; MEDANA, C.; PREVOT, V.; CLASADONTE, J.; GIACOBINI, P. Elevated prenatal anti-Müllerian hormone reprograms the fetus and induces polycystic ovary syndrome in adulthood. **Nature Medicine.** v24, p.834-846, 2018.

TSAI, S.R.; HAMBLIN, M.R. Biological effects and medical applications of infrared radiation. **J. Photochem. Photobiol. B: Biology**, v170, p.197-207, 2017.

TORRES, P.J.; HO, P.S.; ARROYO, P.; SAL, L.; CHEN, A.; KELLEY, S.T.; THACKRAY, V.G. Exposure to a healthy gut microbiome protects against reproductive and metabolic dysregulation in a PCOS mouse model. **Endocrinol.** v160, n5, p.1193-1204, 2019.

VAN HOUTEN, E.I.; KRAMER, P.; MCLUSKEY, A.; KARELS, B.; THEMME, A.P.; VISSER, J.A. Reproductive and metabolic phenotype of a mouse model of PCOS. **Endocrinology**. v153, n6, p.2861–2869, 2012.

WALTERS, K.A.; ALLAN, C.M.; HANDELSMAN, D.J. Rodent models for human polycystic ovary syndrome. **Biol. Reprod.** v86 n5, p.1-12, 2012.

WALTERS, K.A.; RODRIGUEZ, P.V.; AFLATOUNAIN, A.; HANDELSMAN, D.J. Androgens and ovarian function: translation from basic discovery research of clinical impact. **J. Endocrinol.** 242(2): R23-R50, 2019.

WEI, L.L.; LEACH, M.N.; MINER, R.S.; DEMERS, L.M. Evidence for progesterone receptors in human osteoblast-like cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v195, p.525-532, 1993.

WU, X.Y.; LI, Z.L.; WU, C.Y.; LIN, Y..M; LIN, H.; WANG, S.H.; XIAO, W.F. Endocrine traits of polycystic ovary syndrome in prenatally androgenized female Sprague-Dawley rats. **Endocr J.** v57, n3, p.201-209, 2010.

ZAIDI, M. Skeletal remodeling in health and disease. **Nat Med.**; 13:791–801, 2007.

ZBOROWSKI, J.V.; CAULEY, J.A.; TALBOTT, E.O.; GUZICK, D.S.; WINTERS, S.J. Bone mineral density, androgens and the polycystic ovary: the complex and controversial issue and androgenic influence in female bone. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** v67, p.937-943, 2000.