

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

# Efeitos de um programa de atividade física e do laser de baixa intensidade no fêmur de ratas osteopênicas

Aluna: Ana Cláudia Muniz Renno  
Orientador: Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto

São Carlos-SP  
2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

# Efeitos de um programa de atividade física e do laser de baixa intensidade no fêmur de ratas osteopênicas

Aluna: Ana Cláudia Muniz Renno  
Orientador: Prof. Dr. Nivaldo A. Parizotto

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Fisioterapia, área de concentração: Processos de Avaliação e Intervenção em Fisioterapia.

São Carlos-SP  
2006

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

R414ep

Renno, Ana Cláudia Muniz.

Efeitos de um programa de atividade física e do laser de baixa intensidade no fêmur de ratas osteopênicas / Ana Cláudia Muniz Renno. -- São Carlos : UFSCar, 2006.  
643 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2006.

1. Medicina experimental - rata. 2. Osteoporose. 3. Ovariectomia. 4. Atividade física. 5. Laser de baixa potência I.  
Título.

CDD: 619.93 (20<sup>a</sup>)

Dedico este trabalho a minha  
família que sempre me apoiou e  
esteve presente em todos os  
momentos.

### **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto, pela orientação nesse trabalho. Minha  
mais profunda admiração ao exemplo de profissionalismo e competência. Agradeço por

sua paciência, por sua compreensão, por sua simplicidade e humildade e pelo incentivo constante.

A Prof. Dra. Liisa Laakso e a Prof. Dra. Ann Mcdonnell pelo exemplo de competência e respeito ao ensino e a pesquisa, pelo incentivo científico e pelo papel de fundamental importância no meu desenvolvimento profissional e acadêmico. Agradeço acima de tudo pela cordialidade, paciência e respeito com que me trataram durante meu estágio no exterior.

Ao Prof. Dr. Jorge Oishi pela ajuda nas análises estatísticas mas sobretudo pelo papel fundamental que teve durante toda a minha formação. Obrigada por estar sempre disponível a ajudar, obrigada por sua compreensão e amizade, obrigada por ser um exemplo profissional.

Aos amigos Paulo Bossini e Fernanda Mendes pela ajuda imprescindível durante a realização desse projeto. Muito obrigada por companhia e amizade.

A amiga Renata Neves Granito, pelo incentivo constante, pela sua compreensão e sobretudo, pela sua amizade e por todos os momentos compartilhados.

As amigas Renata Passareli Tirico, Nadia Slemer e Roberta Carreira pelo auxílio na coleta de dados, pela presença e incentivos constantes.

Aos (ex e atuais) membros do Laboratório de Eletrotermofototerapia: Paulo Bossini, Fernanda Mendes, Patrícia Carrinho, Ana Claudia Salate, Woulber Herickson, Paulo Koeke, Charles Taciro, Renata Tirico, Roberta Carreira, Olga Sueli, Nádia Slemer e Davilene pela ajuda e amizade, contribuindo de maneira indispensável à realização desse trabalho;

Ao biólogo José Antonio Zuanon pela sua ajuda durante a realização das análises histológicas mas principalmente pela sua paciência, pelo tempo dedicado a este trabalho e por sua amizade.

Ao Professor Dr. Carlos Bennati Neto (UNESP-Araraquara) pelo auxílio na realização das análises histológicas.

Aos professores doutores Alberto Cliquet Junior (USP-São Carlos /UNICAMP), Jorge Oishi (UFSCAR), Rosane de Fátima Zanirato Lizzareli (USP- São Carlos) e Leani Souza Máximo Pereira (UFMG) por aceitarem participar da Banca Examinadora desse trabalho.

Aos professores doutores Patrícia Driusso, Alberto Cliquet Junior e Jorge Oishi pelas contribuições e sugestões no exame de qualificação.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Keico Okino Nonako por permitir a utilização do aparelho do teste de flexão.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo por ter disponibilizado seu laboratório (Laboratório de Farmacologia, Bioquímica e Biologia Molecular/Departamento de Ciências Fisiológicas - UFSCar) pela utilização do espectrofotômetro.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela Bolsa de doutorado-sanduíche concedida.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Fisioterapia da UFSCar, pelo auxílio no desenvolvimento deste estudo.

As minhas queridas amigas-irmãs e companheiras de república Karina Gramani, Renata Granito, Tatiane Lopes e Luciana Cofiel por toda a compressão e incentivo,

durante a realização deste trabalho. Obrigada acima de tudo por todos os maravilhosos momentos compartilhados.

Aos amigos Patrícia Driusso, Daniela Cristina Leite de Carvalho, Flávia Faganello, Marcelo Navega e Cristiane Rodrigues Pedroni por me acompanharem durante toda a minha trajetória. Muito obrigada pelo incentivo e por toda ajuda que tanto contribuíram para que este momento se tornasse realidade.

A todos os outros amigos, que de forma direta ou indireta, me auxiliaram na conclusão deste trabalho.

## SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	i
Lista de Tabelas.....	ii
Resumo .....	iii
Abstract.....	v
<b>CONTEXTUALIZAÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>ESTUDO I: Os efeitos do laser 830nm, utilizado em duas densidades de energia, nas propriedades biomecânicas dos fêmures de ratas osteopênicas.....</b>	<b>1</b>
Introdução.....	4
Introdução.....	5

Materiais e Métodos.....	6
Análise Estatística.....	10
Resultados.....	10
Discussão.....	13
<b>ESTUDO II: Os efeitos do laser 830 nm no fêmur de ratas osteopênicas submetidas a um programa de atividade física.....</b>	<b>17</b>
Introdução.....	18
Materiais e Métodos.....	19
Análise Estatística.....	24
Resultados.....	24
Discussão.....	28
<b>ESTUDO III: Os efeitos do laser em culturas de células osteoblásticas.....</b>	<b>31</b>
Introdução.....	32
Materiais e Métodos.....	33
Análise Estatística.....	35
Resultados.....	35
Discussão.....	37
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>39</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>41</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>46</b>
<b>ANEXO 1</b> Estudo I.....	<b>47</b>
<b>ANEXO 2</b> Estudo II.....	<b>48</b>
<b>ANEXO 3</b> Estudo III.....	<b>49</b>
<b>ANEXO 4</b> Dados.....	<b>50</b>
<b>ANEXO 5</b> Cálculos das propriedades geométricas do fêmur.....	<b>56</b>

## CONTEXTUALIZAÇÃO

A ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS) define a osteoporose como uma “doença esquelética sistêmica caracterizada por diminuição da massa óssea e deterioração microarquitetural do tecido ósseo, com conseqüente aumento da fragilidade óssea.”<sup>1</sup>.

A fratura óssea é a principal conseqüência da osteoporose. As fraturas mais comuns são as vertebrais, das extremidades distais do rádio (fraturas de Colles) e as do colo do fêmur<sup>2</sup>. Atingindo cerca de um terço das mulheres pós-menopausais, a osteoporose tornou-se uma das doenças osteometabólicas mais comuns, sendo responsável por um alto índice de morbidade e mortalidade entre os idosos, com enormes repercussões sociais e econômicas e provocando grande impacto na qualidade de vida e grau de independência nos indivíduos acometidos<sup>3</sup>.

Uma vez instalada a osteoporose, os tratamentos atuam geralmente na redução da perda de massa óssea, com pouco ganho real. O tratamento de base para a manutenção da massa óssea envolve medicamentos inibidores da reabsorção óssea (calcitonina, bifosfanatos e estrógenos), estimuladores da formação óssea (vitamina D e fluoreto de sódio) e substâncias adjuvantes (cálcio e diuréticos tiazídios)<sup>4</sup>. Essas diversas alternativas podem ser prescritas isoladamente ou concomitantemente para potencializar o tratamento.

Além disso, vários trabalhos vêm investigando os efeitos de tratamentos não-invasivos na osteoporose. A utilização do ultra-som de baixa intensidade<sup>5</sup> e o uso de campos eletromagnéticos <sup>6</sup> vem apresentando resultados positivos na prevenção da perda de osso e na manutenção de massa óssea. A irradiação eletromagnética produzida

pelo laser terapêutico de baixa intensidade também tem sido estudada e parece ter um efeito estimulante na osteogênese e estimulação da proliferação e diferenciação celular.

A LLLT é capaz de aumentar a atividade osteoblástica<sup>7</sup>, estimular a síntese de RNA e DNA e a síntese de proteínas, promover a diferenciação precoce de células osteoprogenitoras em osteoblastos maduros<sup>8</sup>, aumentar a atividade da fosfatase alcalina, entre outras<sup>9,10</sup>. Esses efeitos parecem contribuir para uma aceleração no processo de consolidação de fraturas ósseas<sup>11</sup>.

Outro tipo de intervenção terapêutica que vem sendo utilizada no tratamento da osteoporose é a atividade física. A atividade física desempenha um importante papel na prevenção da perda de massa óssea e seus efeitos têm sido amplamente estudados, tanto em modelos humanos, quanto em modelos animais<sup>4</sup>.

O exercício físico gera uma sobrecarga mecânica no tecido ósseo que por sua vez constitui um fator de estímulo à osteogênese, afetando diretamente as características estruturais e geométricas do osso, contribuindo para a manutenção e ganho de massa óssea<sup>12</sup>.

No entanto apesar das evidências de que o laser terapêutico e que o exercício físico tenham a capacidade de estimular a osteogênese, ainda há a necessidade de se estabelecer os exatos mecanismos com os quais eles atuam nesse tecido. Além disso, ainda há uma grande controvérsia a respeito de quais os melhores parâmetros e tipos de LLLT a serem utilizados, bem como quais os protocolos de exercícios físicos mais adequados para que melhores resultados possam ser atingidos<sup>13</sup>.

Baseado nesses dados, este trabalho teve por objetivo investigar os efeitos de um programa de atividade física e do laser terapêutico de baixa potência, bem como avaliar os efeitos dos dois tratamentos associados no fêmur de ratas osteopênicas, por meio da análise de parâmetros físicos, biométricos, biomecânicos e histológicos. Além disso,

esse trabalho também teve o objetivo de investigar os efeitos do laser na proliferação celular de osteoblastos, através de um trabalho *in vitro*.

Para isso, foram realizados três estudos diferentes. O primeiro estudo teve como avaliou os efeitos do laser, 830 nm, utilizado em 2 diferentes densidades de energia, no fêmur de ratas osteopênicas. O segundo estudo avaliou os efeitos de um programa de atividade física de alta intensidade no tecido ósseo de ratas osteopênicas, bem como os efeitos de dois tratamentos associados (treinamento físico e LLLT) nestes animais. E o terceiro estudo verificou os efeitos de dois comprimentos de ondas diferentes na proliferação celular e na atividade da fosfatase alcalina em osteoblastos (MC3T3), *in vitro*.

O primeiro artigo intitulado “Os efeitos do laser 830nm, utilizado em duas densidades de energia, nas propriedades biomecânicas dos fêmures de ratas osteopênicas” foi aceito pelo periódico “Photomedicine and Laser Surgery” e tem previsão de ser publicado na edição de abril de 2006 (ANEXO 1). O segundo artigo é intitulado “Os efeitos de um programa de atividade física e da associação da atividade física com o laser terapêutico no fêmur da ratas osteopênicas” e foi submetido ao periódico “Canadian Journal of Applied Physiology” em novembro de 2005 (ANEXO 2). O terceiro estudo constituiu um estudo paralelo e foi desenvolvido através do programa de bolsa-sanduíche da CAPES. Este estudo foi realizado no laboratório de Microbiologia e de Cultura Celular, do departamento de Ciências, da Griffith University, Brisbane/ Austrália sob supervisão da Prof. Dra. Ann McDonnell em associação com o departamento de Fisioterapia da Griffith University, Gold Coast/ Austrália, sob supervisão da Prof. Dra. Liisa Laakso e é intitulado “Os efeitos do laser terapêutico, 830 nm e 780 nm, na proliferação celular de osteoblastos”. Este estudo está em fase de finalização e nesta tese estão apresentados alguns dos seus resultados

parciais (ANEXO 3). Os estudos e os dados relativos aos estudos estão apresentados a seguir:

## **ESTUDO I**

---

### **OS EFEITOS DO LASER 830nm, UTILIZADO EM DUAS DENSIDADES DE ENERGIA, NAS PROPRIEDADES BIOMECÂNICAS DOS FÊMURES DE RATAS OSTEOPÊNICAS**

## INTRODUÇÃO

A osteoporose é caracterizada por uma diminuição da massa óssea resultando em um aumento da fragilidade óssea e da susceptibilidade de fraturas<sup>14</sup>. Ela representa um dos maiores problemas de saúde da atualidade e está relacionada a altos índices de morbidade e mortalidade<sup>12</sup>.

Após a instalação da osteoporose, os tratamentos visam a manutenção e a redução da perda de massa óssea. O tratamento de base envolve medicamentos inibidores da reabsorção óssea (calcitonina, bifosfanatos e estrógenos), estimuladores da formação óssea (vitamina D e fluoreto de sódio) e cálcio. Vários trabalhos vêm investigando os efeitos de tratamentos não-invasivos para o controle da redução da massa óssea<sup>5</sup>. Entre estes, podem ser citados o ultra-som de baixa intensidade<sup>5</sup>, as correntes elétricas<sup>6</sup>, programas de atividade física e a aplicação do laser terapêutico de baixa potência (LLLT)<sup>14</sup>.

Vários autores afirmam que o laser possui efeitos estimulantes em diferentes tipos de células, sendo capaz de promover um aumento da síntese de DNA e da síntese de proteínas. Foi observado também que a LLLT pode promover a reabsorção de exsudatos, aumentar a deposição de colágeno, acelerar a regeneração nervosa e a cicatrização de úlceras cutâneas<sup>7,15</sup>.

No tecido ósseo, o laser parece ser efetivo para estimular a proliferação celular e para acelerar o processo de consolidação de fraturas. Trelles e Mayayo<sup>10</sup> afirmam que o laser HeNe (4 mW, 2.4 J.cm<sup>-2</sup>) promoveu um aumento da vascularização e uma aceleração da consolidação óssea em ratos. Os mesmos resultados foram encontrados

por Pinheiro et al.<sup>16</sup> e Freitas et al.<sup>9</sup> que evidenciaram que o reparo de fraturas ósseas foi acelerado como resultado do tratamento com LLLT.

Em relação a culturas de células, os efeitos estimulantes do laser também têm sido evidenciados. Luger et al.<sup>7</sup>, Tamura et al.<sup>11</sup> e Ozawa et al.<sup>8</sup> demonstraram um efeito positivo do laser HeNe na proliferação celular e no aumento da síntese de DNA em cultura de osteoblastos.

Baseado nos efeitos do laser nos tecidos biológicos, levantou-se a hipótese de que o LLLT poderia ser eficiente para aumentar a massa óssea de ratas osteopênicas. Portanto, o objetivo deste estudo foi determinar os efeitos do laser terapêutico, utilizado em duas diferentes densidades de energia,  $60 \text{ J.cm}^{-2}$  e  $120 \text{ J.cm}^{-2}$ , nas propriedades físicas e na força biomecânica do fêmur de ratas osteopênicas.

## **Material e Métodos**

Neste estudo foram utilizadas 60 ratas Wistar (idade média 12 semanas,  $\pm 250 \text{ g}$ ). Os animais foram divididos em 6 grupos, com 10 animais cada: controle padrão (SC), ovariectomia controle (OC); Intacto irradiado com a dose de  $120 \text{ J.cm}^{-2}$  (I120); ovariectomia irradiado com a dose de  $120 \text{ J.cm}^{-2}$  (O120); intacto irradiado com a dose de  $60 \text{ J.cm}^{-2}$  (I60) e ovariectomia irradiado com a dose de  $60 \text{ J.cm}^{-2}$  (O60).

Os animais foram mantidos em condições naturais de umidade e temperatura, no biotério do Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos. Os animais foram alimentados com ração comercial e tinham livre acesso a água.

Para a realização da ovariectomia (OVX), os animais foram submetidos a anestesia composta por Ketamina ( $95 \text{ mg/kg}$ ) e Xilazina 2% ( $12 \text{ mg/kg}$ ). Logo após, os animais foram tricotomizados e foram realizadas incisões translombares bilaterais, o que possibilitou a localização e a retirada dos ovários. Após esses procedimentos, foram realizadas suturas internas e externas com fio cirúrgico (Catgut 4.0). Os animais dos

grupos intacto foram submetidos a uma simulação da cirurgia, com realização das incisões mas sem a retirada dos ovários.

Depois da cirurgia, todos os animais foram mantidos em caixas com 5 animais, durante 8 semanas com o intuito de induzir o quadro de osteopenia<sup>18</sup>.

A aplicação do laser (iniciada no 61<sup>o</sup> dia após a ovariectomia) foi realizada, de forma pontual, no ponto médio do fêmur, entre o trôcanter maior e o côndilo lateral. O aparelho utilizado foi um modelo portátil de Laser (Teralaser, DMC<sup>®</sup> São Carlos, SP, Brazil), classe 3B, modalidade As-Ga-Al, diodo, com o comprimento de onda de 830nm, emissão contínua, potência de saída de 100 mW, diâmetro do feixe de 0,6 mm, divergência de 1,5<sup>o</sup>, na densidade de energia de 60 J.cm<sup>-2</sup> e 120 J.cm<sup>-2</sup>, com tempo de irradiação de 17 e 34 s, respectivamente.

Os pontos irradiados foram demarcados previamente ao início do tratamento. Para essa demarcação, os animais foram sedados e foi realizada a tricotomia bilateral das patas posteriores. Em seguida, os trôcanteres e os côndilos laterais foram localizados. Por meio de um paquímetro digital, a distância entre os côndilos e os trôcanteres foi medida e o ponto médio dessa distância foi marcado, com uma caneta demográfica. Os pontos eram remarcados a cada sessão e a tricotomia era realizada semanalmente.

Após as 8 semanas de tratamento, os animais foram sacrificados com uma overdose de anestésico. O sucesso da cirurgia foi verificado por meio de necropsia, na qual foi confirmado a ausência dos ovários<sup>19, 20</sup>.

Os fêmures direitos foram removidos e os tecidos moles adjacentes foram retirados para a análise.

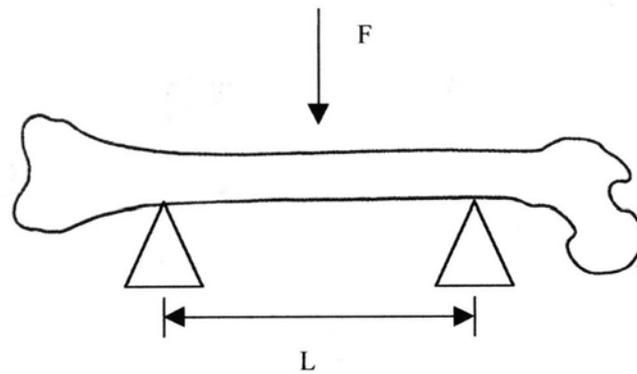
### **Avaliações**

**Massa Corpórea:** foram ponderadas as massas obtidas no início do experimento, quando os animais apresentavam aproximadamente 5 meses de idade e ao final do experimento, quando estes apresentavam aproximadamente 7 meses de idade.

**Comprimento do fêmur:** O comprimento total do fêmur foi mensurado por meio de um paquímetro digital (Bron-Sharp, erro de medida = 0,1%), do trôcanter maior até o côndilo lateral.

**Teste mecânico:** este teste foi realizado no laboratório de Fisiologia Humana da Universidade Federal de São Carlos. Os ensaios biomecânicos foram realizados numa máquina de ensaio universal Instron (Instron cop, Cantn, MA, 4444 model) em temperatura ambiente.

Para a realização do teste foi utilizada a célula de carga com capacidade máxima de 1 KN e pré-carga de 5 N. Para a realização do ensaio, as extremidades do fêmur ficaram apoiadas em dois roletes com diâmetro de 3,0 mm, suportados por apoios distanciados de 21,70 mm. A força foi aplicada perpendicularmente ao eixo longitudinal do osso, no meio da distância entre os dois apoios, por uma haste cilíndrica (Figura 1). Da curva carga vs deformidade foram obtidas a carga máxima (N), a rigidez (N/mm) e a energia de absorção (mJ).



**FIGURA 1. Vista esquemática do teste de flexão de três pontos. L: distância entre barras (13 mm), F: força perpendicular no ponto medial do fêmur.**

**Propriedades Físicas:** Após a realização do teste de flexão a três pontos, os fêmures direitos foram colocados em um dissecador durante 24 horas, com a finalidade de retirar o ar dos poros. Em seguida os fêmures foram pesados e o peso úmido foi obtido. Após esse procedimento, os ossos foram desidratados em uma estufa (marca Funbec), a 100° C durante 24 horas, e o peso seco foi obtido. Os ossos então foram colocados em uma Mufla a 800° C, durante 24 horas para a obtenção do peso de cinzas. Todas as medidas foram obtidas através de uma balança eletrônica de precisão (marca Chyo). A densidade óssea e o volume ósseo foram calculados pelo princípio de Arquimedes<sup>21</sup>.

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados estatisticamente através de técnicas descritivas, tais como tabelas e gráficos, na forma de médias e desvios padrão. Na comparação entre os grupos foi utilizada a análise de variância (ANOVA) e nos casos significativos, o teste de Duncan foi utilizado para discriminar as diferenças. As análises foram realizadas no programa EXCEL e no software STATISTICA.

Para as conclusões das análises estatísticas foi utilizado o nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ).

## RESULTADOS

A tabela 1 apresenta os valores da massa corporal média inicial e final e da variação da massa corporal dos diferentes grupos durante o experimento.

**Tabela 1: Massa corporal**

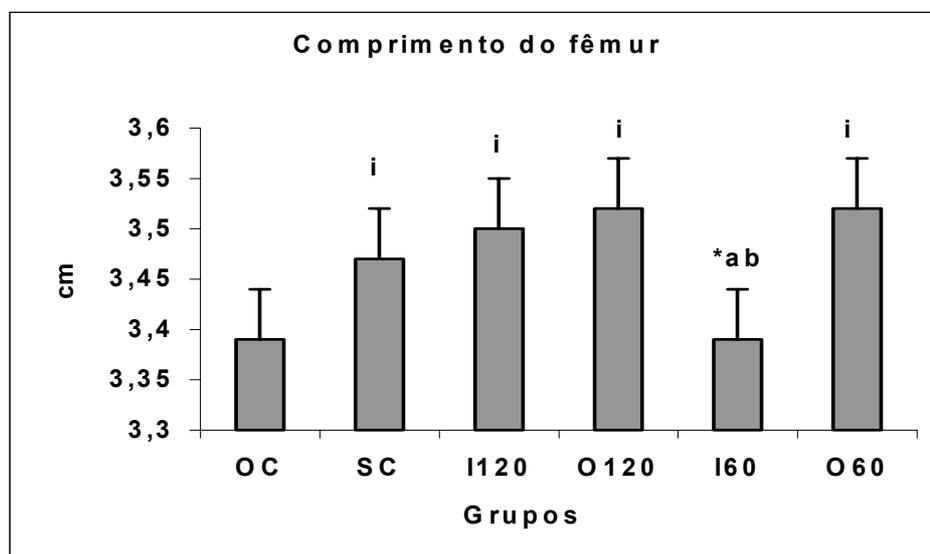
Grupos (n)	Massa Inicial (g)	Massa Final (g)	Aumento da massa corporal (g)
OC	245 ± 5,5	310,5 ± 7,5*	65,5 ± 2*
SC	256,5 ± 14,11	287,5 ± 17,9	31,5 ± 3,7
I120	251,55 ± 9,5	282,5 ± 16,6	31,95 ± 15,4
O120	258,2 ± 11,72	309,2 ± 12,01 <sup>*a</sup>	49 ± 15,1 <sup>*a</sup>
O60	250,25 ± 7,4	305,12 ± 12,4 <sup>*d</sup>	55 ± 10,6 <sup>*d</sup>
I60	260,8 ± 4,5	290 ± 13,3	30 ± 14,14

i vs OC; \* vs SC; a vs I120; b vs O120; c vs O60; d vs I60.

A massa corporal inicial dos animais não apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparadas entre si. Pode ser observado ainda que os animais dos grupos que foram submetidos a ovariectomia apresentaram valores significativamente maiores para a massa corporal final e uma variação da massa corporal durante o experimento quando comparados com os outros grupos. Além disso, os animais dos grupos osteopênicos irradiados, não apresentaram diferença quando comparado com os

animais dos grupos intactos irradiados demonstrando que o laser não teve efeito nesta variável.

A figura 2 apresenta os valores obtidos para o comprimento do fêmur.



<sup>i</sup> vs OC; \* vs I120; a vs O120; b vs O60.

**Figura 2: Comprimento do fêmur**

Pode ser observado nesta figura que a OVX atuou de maneira negativa no crescimento ósseo uma vez que os valores apresentados pelos animais do grupo OC foram estatisticamente menores quando comparados com os valores apresentados pelos animais dos outros grupos, com exceção feita ao grupo I60. Além disso, os animais do grupo I60 apresentaram valores menores quando comparados com os grupos O120 e O60.

A tabela 2 apresenta os dados obtidos no teste de flexão.

**Tabela 2: Propriedades biomecânicas**

Grupo	Carga Máxima (N)	Energia de absorção (mJ)	Rigidez (N/mm)
OC	94,70 ± 19,48	0,057 ± 0,0074	192,68 ± 26,43
SC	108,67 ± 13,64 <sup>i</sup>	0,055 ± 0,022	230,1 ± 35,143 <sup>i</sup>
I120	105,67 ± 14,03 <sup>i</sup>	0,053 ± 0,023	214,14 ± 36,06
O120	109,68 ± 8,24 <sup>i</sup>	0,056 ± 0,014	210,366 ± 24,67
I60	105,49 ± 13,86 <sup>i</sup>	0,054 ± 0,010	205,69 ± 34,136
O60	91,44 ± 14,744 <sup>*ab</sup>	0,045 ± 0,0109	157,6 ± 44,094 <sup>i*ab</sup>

<sup>i</sup> vs OC; \* vs SC; a vs I120; b vs O120; c vs O60; d vs I60

Os valores de carga máxima apresentados pelos animais dos grupos OC e O60 foram estatisticamente menores quando comparado com os animais dos grupos SC, I120, O120 e I60 ( $p= 0,00369, 0,0139, 0,041$  e  $0,0123$ , respectivamente em relação ao OC). Os grupos SC, I120, O120 e I60 não apresentaram diferenças significativas quando comparados entre si. Além disso, pode ser observado nesta tabela que os animais do grupo O60 apresentaram valores significativamente menores nas variáveis carga máxima e rigidez quando comparados com os outros grupos.

A tabela 3 apresenta os valores obtidos nas propriedades físicas do fêmur.

**Tabela 3: Propriedades físicas do fêmur**

Grupo	Peso úmido (g)	Peso seco (g)	Peso de cinzas (g)	Volume ósseo (cm <sup>3</sup> )	Densidade óssea (g/cm <sup>3</sup> )
OC	0,77 ± 0,07	0,44 ± 0,04	0,3 ± 0,03	0,52 ± 0,05	1,49 ± 0,02
SC	0,85 ± 0,07 <sup>i</sup>	0,50 ± 0,05 <sup>i</sup>	0,34 ± 0,04 <sup>i</sup>	0,57 ± 0,04 <sup>i</sup>	1,50 ± 0,03
I120	0,84 ± 0,06 <sup>i</sup>	0,49 ± 0,04 <sup>i</sup>	0,33 ± 0,02	0,56 ± 0,05 <sup>i</sup>	1,48 ± 0,03
O120	0,85 ± 0,04 <sup>i</sup>	0,50 ± 0,03 <sup>i</sup>	0,34 ± 0,02 <sup>i</sup>	0,56 ± 0,04 <sup>i</sup>	1,51 ± 0,05
I60	0,85 ± 0,07 <sup>i</sup>	0,49 ± 0,05 <sup>i</sup>	0,31 ± 0,03	0,52 ± 0,06 <sup>i</sup>	1,48 ± 0,02
O60	0,89 ± 0,05 <sup>i</sup>	0,50 ± 0,03 <sup>i</sup>	0,33 ± 0,02	0,61 ± 0,04 <sup>i</sup>	1,48 ± 0,02

<sup>i</sup> vs OC; \* vs SC; a vs I120; b vs O120; c vs O60; d vs I60

Os animais do grupo OC apresentaram valores significativamente menores em relação ao peso úmido, peso seco, peso de cinzas e volume ósseo quando comparado com os outros grupos. Não foram encontradas diferenças significativas entre os outros grupos foram comparados.

## DISCUSSÃO

A ovariectomia em ratos conduz a uma diminuição da massa óssea e um aumento da fragilidade óssea<sup>18</sup>. Os dados apresentados pelos animais do grupo OVX controle mostram que a retirada dos ovários foi eficiente para induzir uma diminuição da força mecânica e dos valores encontrados para as propriedades físicas, uma vez que todos os parâmetros avaliados no grupo OC foram significativamente menores do que os valores apresentados pelos animais do grupo SC, com exceção da massa corporal.

Algumas teorias vêm sendo propostas na tentativa de explicar os mecanismos envolvidos na perda de massa óssea relacionada à OVX em ratos. É sugerido que a OVX é seguida por um aumento no turnover ósseo, o que resulta em uma diminuição da massa óssea. Além disso, a falta de estrógeno parece diminuir a atividade dos osteoblastos e aumentar a ação do osteoclastos<sup>22</sup>.

A diminuição da massa óssea acarreta um significativo aumento da massa corporal<sup>19</sup>. Alguns autores sugerem que o aumento da massa corporal após a OVX em ratos é um mecanismo de compensação da perda de osso trabecular<sup>23</sup>. Ratos ovariectomizados têm uma deposição excessiva de gordura corporal e um aumento da formação periosteal, que contribuiu para o aumento da massa corporal.

Neste estudo os animais do grupo OVX controle apresentaram valores significativamente maiores de massa corporal quando comparado com os outros grupos. Associado a isso, neste estudo não foram encontradas diferenças entre a massa corporal dos animais do grupo OC quando comparadas com os animais osteopênicos irradiados. Isto sugere que LLLT não teve efeito na massa corporal dos animais estudados.

Os valores encontrados para o comprimento do fêmur nos animais dos grupos I120, O120 e O60 foram significativamente maiores que os valores encontrados nos animais dos grupos OC e I60. Esses resultados sugerem que a LLLT foi eficiente para

estimular o crescimento ósseo, tanto na dose de  $60 \text{ J.cm}^{-2}$  quanto na dose de  $120 \text{ J.cm}^{-2}$ . Além disso, pode ser observado que a dose de  $120 \text{ J.cm}^{-2}$  também foi eficiente para estimular o crescimento ósseo tanto nos animais osteopênicos quanto nos animais intactos. Hietala et al<sup>23</sup> não observaram diferença no comprimento do fêmur de ratas osteopênicas. Os mesmos resultados foram encontrados por Monteagudo et al<sup>24</sup> 30 dias após a OVX em ratas com 12 semanas de idade.

A força mecânica é um dos parâmetros mais importantes relacionados ao risco de fratura<sup>19</sup>. Neste estudo este parâmetro foi avaliado através do teste de flexão de três pontos<sup>19,20</sup>. Este teste tem sido amplamente utilizado em trabalhos que investigam os efeitos da OVX na força óssea e em trabalhos que avaliam tipos diferentes de tratamentos em uma série de desordens ósseas, incluindo os efeitos do laser na consolidação de fraturas<sup>19,23</sup>.

Foi observado que a OVX promoveu uma diminuição significativa na força mecânica do fêmur. Estes resultados estão de acordo com os resultados de Peng et al<sup>19</sup> que observaram uma diminuição significativa na carga máxima de ratas ovariectomizadas.

Além disso, os achados encontrados neste trabalho mostram que a dose de  $120 \text{ J.cm}^{-2}$  foi eficiente para preservar a força óssea dos animais após a OVX. O mesmo não foi encontrado nos animais irradiados com a dose de  $60 \text{ J.cm}^{-2}$ .

Muitos autores sugerem que a terapia laser é capaz de promover um aumento da força mecânica após uma fratura<sup>7,10,16</sup>. Estes trabalhos afirmam que a LLLT estimula a atividade de osteoblastos e osteoclastos na área irradiada. De Tejada et al<sup>25</sup> encontraram que o laser é capaz de acelerar a diferenciação de pré-osteoblastos em osteoblastos maduros em áreas de fraturas. Trelles et al<sup>10</sup> verificaram uma maior concentração de tecido conectivo com uma grande presença de osteoblastos na área fraturada, após a

irradiação com laser. Esta maior concentração de osteoblastos poderia estar relacionada com uma maior síntese e deposição de matriz óssea, o que contribuiria para o aumento a força mecânica do tecido ósseo.

No presente estudo, foi observado também uma diminuição significativa nas variáveis da avaliação das propriedades físicas dos animais do grupo OC quando comparado com o grupo controle intacto. Paz et al<sup>15</sup> encontraram uma diminuição do volume de osso trabecular e da densidade do fêmur de ratas ovariectomizadas. O peso de cinzas do grupo OC também foi significativamente menor quando comparado com os grupos SC e O120. Peng et al<sup>19</sup> e Barendolts et al<sup>13</sup> demonstraram que animais ovariectomizados apresentaram valores menores de peso de cinzas quando comparado com o grupo controle. Hietala et al<sup>23</sup> encontraram uma diminuição do peso de cinzas, do volume ósseo e da densidade óssea em ratas ovariectomizadas quando comparadas com os animais do grupo controle.

Quando os valores obtidos na avaliação das propriedades físicas dos animais dos grupos irradiados foram comparados, não foram encontradas diferenças significativas, sugerindo que ambas as doses foram eficientes para aumentar as propriedades físicas após a OVX. Estes resultados concordam com os resultados encontrados por Dickson et al.<sup>26</sup> que mostraram um aumento da densidade mineral óssea, mensurada pela densitometria, em modelos experimentais de fraturas de ratos irradiados com As-Ga-Al, 830 nm, 70 mW, 4 J.cm<sup>-2</sup>.

Os resultados deste estudo sugerem que a LLLT foi capaz de modular o processo de perda óssea relacionada à ovariectomia. Além disso, pode ser sugerido que o laser utilizado na dose de 120 J.cm<sup>-2</sup> teve um efeito estimulatório tanto nas propriedades mecânicas quanto nas propriedades físicas das ratas osteopênicas. A dose de 60 J.cm<sup>-2</sup> foi efetiva somente para manter as propriedades físicas.

Não existem na literatura, dados conclusivos a respeito da melhor dosimetria a ser utilizada na estimulação do tecido ósseo. No presente estudo, foi obtido uma resposta dose-dependente já que a maior dose foi mais eficaz na estimulação do fêmur. Estes resultados corroboram com uma série de trabalhos que verificaram que o laser aplicado em doses e potências altas, promove uma melhor resposta do tecido <sup>8,17, 27</sup>. Quanto ao comprimento de onda, considera-se que a escolha do valor 830 nm foi adequada, visto que o pico de penetração tecidual ocorre no limite do infravermelho próximo. É consenso que os comprimentos de onda mais longos, dentro da faixa do infravermelho próximo (700 nm até 1200 nm) são mais adequados para o tratamento de estruturas mais profundas <sup>26, 28</sup>.

Embora, os efeitos osteogênicos do laser na regeneração óssea já terem sido verificados em estudos prévios, os mecanismos pelos quais a LLLT estimula as células ósseas não são totalmente entendidos. Não está claro se a bioestimulação da formação óssea é decorrente de um efeito nas células mesenquimais, estimulando sua diferenciação em os osteoblastos maduros <sup>27</sup>. Pinheiro et al<sup>16</sup> afirmam que a LLLT pode aumentar a liberação de fatores de crescimento, os quais estimulam a diferenciação e proliferação celular, possibilitando a maior deposição de matriz.

Possivelmente neste estudo, o laser, principalmente na dose de  $120 \text{ J.cm}^{-2}$ , estimulou a diferenciação celular e acelerou a transformação em células maduras, o que poderia ter contribuído para uma maior deposição de matriz óssea. Além disso, a LLLT poderia ter estimulado a atividade dos osteoblastos, que estaria diminuída com a OVX. Estes dois eventos associados poderiam ter diminuído o desequilíbrio entre a reabsorção e a formação óssea, evitando a perda óssea nas áreas irradiadas.

**ESTUDO II**

---

**OS EFEITOS DE UM PROGRAMA DE ATIVIDADE FÍSICA E DA  
ASSOCIAÇÃO DA ATIVIDADE FÍSICA COM O LASER TERAPÊUTICO NO  
FÊMUR DE RATAS OSTEOPÊNICAS**

## INTRODUÇÃO

A osteoporose é uma doença caracterizada por uma diminuição da massa óssea e por uma deterioração microarquitetural do tecido ósseo, levando a uma maior fragilidade e aumentando o risco de fraturas, principalmente na coluna vertebral, no rádio e no fêmur <sup>1</sup>. Recentemente foi reconhecida como um dos maiores problemas de saúde pública da atualidade <sup>29</sup>. Somente nos Estados Unidos, é estimado que mais de 20 milhões de pessoas sejam acometidos por essa doença, com um total de 1,5 milhões de fraturas <sup>30</sup>.

Uma série de medidas e tratamentos vêm sendo desenvolvidos com o intuito de prevenir o desenvolvimento da osteoporose e manter/aumentar a massa óssea em casos em que a doença já esteja instalada. Estes se baseiam principalmente no tratamento medicamentoso <sup>31</sup>. Além disso, vários trabalhos vêm investigando os efeitos de tratamentos não-invasivos na osteoporose, como o ultra-som de baixa intensidade <sup>5, 6</sup>, a aplicação do laser terapêutico de baixa intensidade e programas de atividade física <sup>18</sup>.

O exercício físico exerce um papel fundamental na regulação do metabolismo do tecido ósseo, sendo importante para regular o turnover ósseo, diminuindo a reabsorção e aumentando a formação óssea <sup>32,33</sup>.

Vários protocolos de exercício físico vêm sendo investigados. Alguns autores afirmam que um programa de exercício físico de moderada intensidade, realizado em esteira é eficiente para evitar a perda óssea após a OVX em fêmures de ratos <sup>33,34, 35,36</sup>. Hart et al <sup>37</sup> sugerem que um programa de natação, realizado durante 13 semanas, 5 dias por semana, é capaz de aumentar a massa óssea e a força biomecânica de fêmures de ratas ovariectomizadas. Além disso, Notomi et al <sup>38</sup> afirmam que um programa de atividade física de alta intensidade (saltos) é mais eficiente para aumentar a força e a rigidez dos fêmures de ratos do que exercícios de moderada intensidade.

O laser terapêutico de baixa potência (LLLT) também apresenta efeitos positivos no tecido ósseo. Este recurso parece estimular a proliferação de osteoblastos e acelerar o processo de consolidação de fraturas<sup>7,10,17</sup>. OZAWA et al<sup>8</sup> afirmam que o laser HeNe (4 mW, 2,4 J.cm<sup>-2</sup>, 12 sessões) promoveu um aumento da vascularização e permitiu uma consolidação óssea mais rápida em fraturas de tíbias de ratos. PINHEIRO et al.<sup>16</sup> demonstraram que o laser As-Ga-Al (830 nm), 10 mW, 4,8 J.cm<sup>-2</sup> em fraturas femorais de ratos resultou em uma maior área na região da fratura.

Uma vez que a osteoporose é considerada um dos maiores problemas de saúde pública da atualidade, torná-se cada vez mais importante a investigação de tratamentos que atuem na estimulação da osteogênese e sejam eficazes para aumentar a massa óssea. Diante deste fato e baseado nos efeitos estimulantes do exercício físico e do laser de baixa potência no tecido ósseo, este trabalho teve como objetivo determinar os efeitos de um programa de atividade física nas propriedades físicas e geométricas, na força biomecânica e na concentração de cálcio e fósforo no fêmur de ratas osteopênicas. Além disso, esse trabalho teve também como objetivo verificar os efeitos da associação do exercício físico com o laser de baixa potência nas variáveis analisadas.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Neste estudo foram utilizadas 60 ratas Wistar (idade média 12 semanas,  $\pm$  250 g). Os animais foram divididos em 6 grupos, com 10 animais cada: intacto sedentário (SS); osteopênico-sedentário (OS); intacto treinamento (ST); osteopênico treinamento (OT); intacto treinamento, irradiado com LLLT (STL) e osteopênico treinamento irradiado LLLT (OTL).

Os animais foram mantidos em condições naturais de umidade e temperatura, no biotério do Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos. Os animais foram alimentados com ração comercial e tinha livre acesso a água.

Para a realização da ovariectomia, os animais foram submetidos a anestesia composta por Ketamina e Xilazine (80/10 mg/Kg). Logo após foram tricotomizados e foram realizadas incisões translobares bilaterais, o que possibilitou a localização e a retirada dos ovários. Após esses procedimentos, foram realizadas suturas internas e externas com fio cirúrgico (Catgut 4.0). Os animais dos grupos intactos foram submetidos a uma simulação da cirurgia, com realização das incisões mas sem a retirada dos ovários.

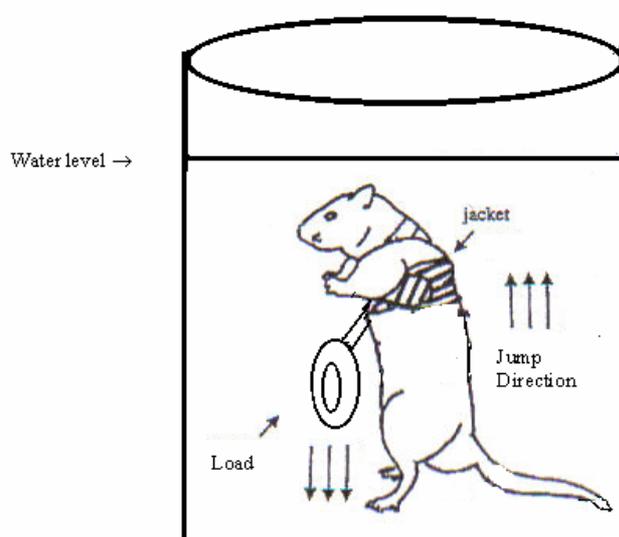
Depois da cirurgia, todos os animais foram mantidos em caixas com 5 animais cada e aguardaram um período de 60 dias, visando a indução do quadro de osteopenia<sup>18</sup>.

**Programa de atividade física:** foi realizado em um tanque circular, de 1 metro de altura, com 50 cm de diâmetro, com aproximadamente 60% do seu conteúdo preenchido com água (30° C). O treinamento foi iniciado no 61° dia após a cirurgia e realizado três vezes por semana, em dias intercalados, durante 8 semanas. Foi feito com a utilização de um colete, que era fixado ao corpo do animal. Para sobrecarregar o animal eram utilizados pesos colocados no colete. Uma vez na água, o peso puxava o animal para o fundo e este era obrigado a saltar. Em cada sessão eram realizadas 4 séries de 10 saltos, com 30 segundos de descanso entre as séries (Figura 1).

A carga com a qual os animais realizavam o treinamento era proporcional ao peso corporal de cada um e progrediu no decorrer do experimento (Tabela 1). Os animais eram pesados uma vez por semana para que a carga fosse ajustada.

**Tabela 1: Programa de exercício físico**

Semanas	Pesos
1 <sup>o</sup> dia	20% da massa corporal
2 <sup>o</sup> dia	30% da massa corporal
3 <sup>o</sup> dia	40% da massa corporal
4 - 7 <sup>o</sup> dias	50% da massa corporal
2 <sup>a</sup>	50% da massa corporal
3 <sup>a</sup> e 4 <sup>a</sup>	60% da massa corporal
5 <sup>a</sup> e 6 <sup>a</sup>	70% da massa corporal
7 <sup>a</sup> e 8 <sup>a</sup>	80% da massa corporal

**FIGURA 1: Vista esquemática representando o protocolo de exercício físico**

O protocolo de atividade física foi elaborado baseado na trabalho de Hornberger and Farrar<sup>39</sup>. Estes autores afirmam que um programa de exercícios físicos progressivos, utilizando pesos fixos ao corpo dos animais (até 80% da carga corporal) é efetivo para induzir uma hipertrofia muscular e aumentar a massa óssea.

**Aplicação do LLLT:** Foi utilizado um modelo portátil Laser (Teralaser, DMC<sup>®</sup> São Carlos, SP, Brazil), classe 3B, modalidade As-Ga-Al, diodo, com o comprimento de onda de 830nm, emissão contínua, potência de saída de 100 mW, diâmetro do feixe de 0,6 mm, divergência de 1,5°, na densidade de energia de 120 J.cm<sup>-2</sup>, com tempo de irradiação de 34s.

A irradiação era feita logo após o treinamento físico. Foi realizada de forma pontual, no ponto médio de ambos os fêmures, entre o trôcanter maior e o côndilo lateral.

Após as 8 semanas de tratamento, os animais foram sacrificados com uma overdose de anestésico. O sucesso da cirurgia foi verificado por meio de necropsia, onde se confirmou a ausência de ovários<sup>19</sup>.

Os fêmures foram removidos e os tecidos moles adjacentes foram retirados para subsequente análise.

### **Avaliações**

**Massa Corpórea:** foram consideradas as massas obtidas no início do experimento, quando os animais apresentavam aproximadamente 5 meses de idade e ao final do experimento, quando estes apresentavam aproximadamente 7 meses de idade.

**Comprimento do fêmur:** foi mensurado por meio de um paquímetro digital (Bron-Sharp, erro de medida = 0,1%), do trocânter maior até o côndilo lateral.

**Teste mecânico:** este teste foi realizado no laboratório de Fisiologia humana da Universidade Federal de São Carlos. Os ensaios biomecânicos foram realizados numa máquina de ensaio universal Instron (Instron cop, Cantn, MA, modelo 444), em temperatura ambiente.

Para a realização do teste foi utilizada a célula de carga com capacidade máxima de 1 KN e pré-carga de 5 N. Para a realização do ensaio, as extremidades do fêmur ficaram apoiadas em dois roletes com diâmetro de 3,0 mm, suportados por apoios

distanciados de 21,70 mm. A força foi aplicada perpendicularmente ao eixo longitudinal do osso, no sentido pósterio-anterior, no meio da distância entre os dois apoios, por uma haste cilíndrica. Da curva carga vs deformidade foram obtidas a carga máxima (N), a rigidez (N/mm) e a energia de absorção (mJ).

**Propriedades Físicas:** Após a realização do teste de flexão a três pontos, os fêmures direitos foram colocados em um dissecador durante 24 horas, com a finalidade de retirar o ar dos poros. Em seguida os fêmures foram pesados e o peso úmido foi obtido. Após esse procedimento, os ossos foram desidratados em uma estufa (marca Funbec), a 100° C durante 24 horas, e o peso seco foi obtido. Os ossos então foram colocados em uma Mufla a 800° C, durante 24 horas para a obtenção do peso de cinzas. Todas as medidas foram obtidas através de uma balança eletrônica de precisão (marca Chyo). A densidade óssea foi calculada pelo princípio de Archimedes <sup>21</sup>.

**Concentração de cálcio e fósforo:** foram mensuradas a partir do peso de cinzas através da espectrofotometria.

**Propriedades geométricas:** os fêmures esquerdos foram fixados em formalina e descalcificados (solução descalcificadora de Morse-Citrato de Sódio a 20% e Ácido Fórmico a 50%). Após esse procedimento os ossos foram cortados no ponto médio e as duas metades foram incluídas em blocos de parafina. Para a confecção das lâminas histológicas, foram realizados cortes de 5 mc. Em seguida estes foram corados com Tricômio de Masson e fotografados através de uma câmera acoplada a um microscópio (OLYMPUS), com aumento de 40 X. Para a realização da análise das propriedades geométricas foi utilizada um software de análise de imagem (Imagelab<sup>16</sup>). Através deste software foi possível calcular a área de secção transversal, a área medular e os diâmetros maior e menor. Para calcular essas medidas, todas as fotos foram padronizadas no mesmo tamanho (800 mc de largura x 640 mc de altura).

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados estatisticamente através de técnicas descritivas, tais como tabelas e gráficos, na forma de médias e desvios padrão. Na comparação entre os grupos foi utilizada a análise de variância (ANOVA) e nos casos significantes, o teste de Duncan foi utilizado para discriminar as diferenças.

Para as conclusões das análises estatísticas foi utilizado o nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ).

## RESULTADOS

A tabela 2 apresenta os valores da massa corporal média inicial e final e a variação da massa corporal durante o experimento dos diferentes grupos.

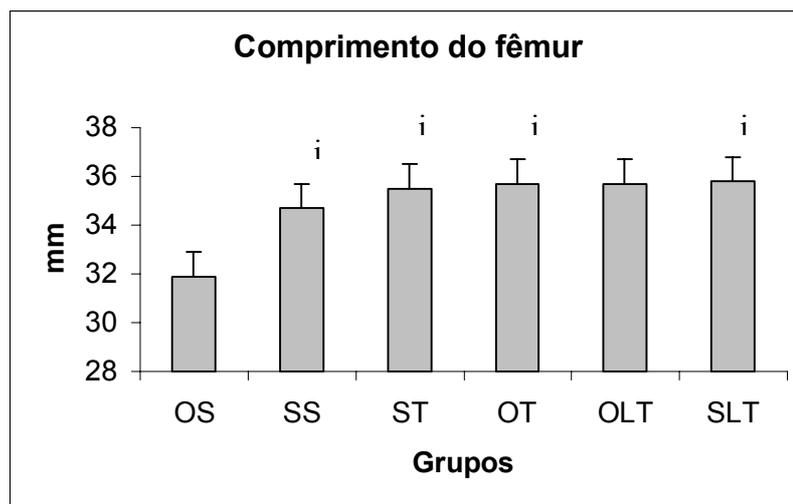
**Tabela 2: Massa corporal**

Grupos	Massa Inicial (g)	Massa Final (g)	Aumento da massa corporal (g)
OS	248 ± 6,6	305,5 ± 8,5	57,5 ± 2
SS	246,5 ± 14,11	285,5 ± 17,9 <sup>i</sup>	38,5 ± 3,7 <sup>i</sup>
ST	255,5 ± 13,54	288,8 ± 14,65 <sup>i</sup>	33,3 ± 0,2 <sup>i</sup>
OT	249,2 ± 5,7	302,4 ± 11,84* <sup>a</sup>	53,2 ± 6,1* <sup>a</sup>
OTL	257,25 ± 7,4	305,12 ± 12,4* <sup>a</sup>	47,87 ± 10,6*
STL	259,8 ± 4,5	296 ± 13,3 <sup>i</sup> * <sup>c</sup>	36,2 ± 14,14 <sup>ib</sup>

<sup>i</sup> vs OS; \* vs SS; <sup>a</sup> vs ST; <sup>b</sup> vs OT; <sup>c</sup> vs OTL.

Pode ser observado que a massa corporal inicial dos animais de todos os grupos não apresentou diferença estatisticamente significativa. Ainda de acordo com essa tabela, pode ser observado que os animais dos grupos ovariectomizados apresentaram valores significativamente maiores para a massa corporal final e para variação da massa corporal durante o experimento quando comparados com os animais dos grupos controle.

A figura 2 apresenta os valores obtidos para o comprimento do fêmur dos grupos experimentais.



<sup>i</sup> vs OS;

**Figura 2: Comprimento do fêmur**

De acordo com esta figura, pode ser verificado que o grupo OS apresentou valores médios significativamente menores do comprimento do fêmur quando comparados com os animais dos outros grupos. Nenhuma outra diferença foi observada entre os demais grupos.

A tabela 3 apresenta as propriedades geométricas do fêmur.

**Tabela 3: Propriedades geométricas do fêmur**

Grupos	Área de secção transversal (mm <sup>2</sup> )	Área do canal medular (mm <sup>2</sup> )	Diâmetro maior (mm)	Diâmetro menor (mm)
OS	3,7± 0,26	2,0 ±0,14	3,1± 0,26	2,3 ± 0,26
SS	4,7±0,2 <sup>i</sup>	2,5±0,25 <sup>i</sup>	3,7±0,4 <sup>i</sup>	2,6±0,12 <sup>i</sup>
ST	4,9± 0,35 <sup>i</sup>	2,4± 0,19 <sup>i</sup>	4± 0,15 <sup>i</sup>	2,3± 0,14*
OT	4,7 ±0,32 <sup>i</sup>	2,2± 0,15 <sup>a</sup>	3,9 ±0,16 <sup>i</sup>	2,3±0,1*
OLT	5,05 ±0,5 <sup>i</sup>	2,31± 0,14	3,7 ±0,27 <sup>i</sup>	2,4 ±0,18*
SLT	4,7 ±0,41 <sup>i</sup>	2,5 ±0,18	3,6± 0,18 <sup>i</sup>	2,3 ±0,18*

<sup>i</sup> vs OS; \* vs SS; <sup>a</sup> vs ST; <sup>b</sup> vs OT; <sup>c</sup> vs OLT.

Pode ser observado que a OVX teve um efeito negativo em relação as propriedades geométricas do fêmur, uma vez que os valores da área de secção transversal, do canal medular e do diâmetro maior dos animais do grupo OS foram significativamente menores quando comparados com os valores apresentados pelos animais do grupo SS. Em relação ao diâmetro menor, o grupo SS apresentou valores

estatisticamente maiores que os outros grupos. Ainda de acordo com esta tabela, pode ser verificado que o programa de exercícios teve um efeito positivo nas propriedades geométricas do fêmur, já que não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas quando os animais treinados foram comparados com os animais do grupo ST. Além disso, também não foram encontradas diferenças entre os animais dos grupos somente treinados e os animais dos grupos treinados e irradiados.

Na tabela 4 estão apresentadas os valores obtidos para as propriedades físicas dos fêmures direitos dos grupos experimentais.

**Tabela 4: Propriedades físicas do fêmur**

Grupos	Peso úmido (g)	Peso seco (g)	Peso de cinzas (g)	Densidade óssea (g/cm <sup>3</sup> )
OS	0,44 ± 0,04	0,3 ± 0,003	0,52 ± 0,05	1,5 ± 0,02
SS	0,50 ± 0,05 <sup>i</sup>	0,34 ± 0,004 <sup>i</sup>	0,57 ± 0,04 <sup>i</sup>	1,50 ± 0,03
ST	0,58 ± 0,05 <sup>i*</sup>	0,41 ± 0,004 <sup>i*</sup>	0,60 ± 0,04 <sup>i</sup>	1,56 ± 0,02 <sup>i*</sup>
OT	0,57 ± 0,03 <sup>i*</sup>	0,39 ± 0,02 <sup>i*</sup>	0,59 ± 0,04 <sup>i</sup>	1,57 ± 0,02 <sup>i*</sup>
OTL	0,56 ± 0,05 <sup>i*</sup>	0,39 ± 0,04 <sup>i*</sup>	0,56 ± 0,06 <sup>i</sup>	1,57 ± 0,02 <sup>i*</sup>
STL	0,55 ± 0,02 <sup>i*</sup>	0,38 ± 0,02 <sup>i*</sup>	0,60 ± 0,05 <sup>i</sup>	1,55 ± 0,02 <sup>i*</sup>

<sup>i</sup> vs OS; \* vs SS; a vs ST; b vs OT;

Pode ser observado que os animais osteopênicos sedentários apresentaram valores estatisticamente menores para o peso seco, peso de cinzas e volume ósseo quando comparados com o grupo controle sedentário. Os animais dos grupos treinados e dos grupos treinados e irradiados apresentaram valores significativamente maiores na avaliação das propriedades físicas quando comparados com os animais do grupo SS, indicando o efeito positivo do exercício. Nenhuma diferença estatística foi observada entre os animais dos grupos treinados e treinados e irradiados.

A tabela 5 apresenta os valores obtidos no teste de flexão de três pontos.

**Tabela 5: Propriedades Biomecânicas**

Grupos	Carga Máxima (N)	Energia de absorção (mJ)	Rigidez (N/mm)
OS	89,16 ± 14,89	57,12 ± 6,65	186,59 ± 26,62
SS	109,67 ± 13,6 <sup>i</sup>	61 ± 14 <sup>i</sup>	232,1 ± 35,14 <sup>i</sup>
ST	129,78 ± 42 <sup>i*</sup>	77,8 ± 12,9 <sup>i*</sup>	253,31 ± 38,2 <sup>i</sup>
OT	124,97 ± 13,23 <sup>i</sup>	65,33 ± 13,4 <sup>i</sup>	231,89 ± 54,8 <sup>i</sup>
OTL	117,28 ± 13,52 <sup>i</sup>	65,2 ± 12,3 <sup>i</sup>	248,27 ± 25,21 <sup>i</sup>
STL	123,09 ± 10,47 <sup>i</sup>	70,05 ± 7,1 <sup>i</sup>	248,2 ± 40,33 <sup>i</sup>

<sup>i</sup> vs OS; \* vs SS; a vs ST; b vs OT;

Os animais do grupo OS apresentaram valores estatisticamente menores para as variáveis analisadas no teste de flexão em comparação com os outros grupos, indicando que a OVX foi eficiente para promover a diminuição da força do fêmur. Além disso, os animais osteopênicos treinados e treinados e irradiados não apresentaram diferença estatística em relação aos grupos controle e nem quando comparados entre si. Isso indica que o laser não teve efeito adicional na força óssea dos animais osteopênicos treinados.

A tabela 6 mostra os valores do conteúdo de cálcio e fósforo.

**Tabela 6: Conteúdo de cálcio e fósforo**

Grupos	Cálcio (mg/ Kg)	Fósforo (mg/ kg )
OS	332,50 ± 16,59	159,96 ± 13,65
SS	367 ± 25,80 <sup>i</sup>	160,39 ± 13,08
ST	375,71 ± 20,70 <sup>i</sup>	160,55 ± 8,64
OT	368,66 ± 17,78 <sup>i</sup>	153,59 ± 13,71
OLT	371,61 ± 15,00 <sup>i</sup>	155,38 ± 8,15
SLT	382,04 ± 17,5 <sup>i</sup>	169,73 ± 6,02

<sup>i</sup> vs OS; \* vs SS; a vs ST; b vs OT.

De acordo com essa tabela os animais osteopênicos sedentários apresentaram uma concentração de cálcio significativamente menor quando comparados aos outros grupos. Nenhuma outra diferença para a análise de cálcio foi encontrada. Em relação a análise de fósforo, pode ser observada também que não houve uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais.

## **DISCUSSÃO**

Os resultados apresentados neste estudo mostram que a OVX foi eficaz para induzir o quadro de osteopenia nos animais estudados uma vez que todos os parâmetros apresentados pelos animais do grupo OS foram significativamente menores quando comparados com o grupo controle, exceção feita a massa corporal. Além disso, pode ser observado que o programa de exercício físico teve um efeito positivo no tecido ósseo dos fêmures dos animais osteopênicos. Entretanto, os animais que foram submetidos aos dois tratamentos associados não apresentaram diferença estatística quando comparados com os animais somente treinados, indicando que o laser não foi capaz de promover efeito adicional no tecido ósseo destes animais osteopênicos.

Os animais ovariectomizados apresentaram valores significativamente maiores para a massa corporal quando comparados com os outros animais. Esses resultados corroboram com os encontrados por outros autores que também observaram um aumento da massa corporal após a OVX <sup>19,23, 32</sup>. Este incremento parece ser um mecanismo de compensação para a perda de massa óssea. A maior massa corporal em animais ovariectomizados leva a um aumento da carga mecânica que age no esqueleto, o que consiste em um fator estimulador para o aumento da massa óssea <sup>40</sup>.

O programa de atividade física proposto não foi eficiente para prevenir o ganho de massa corporal decorrente da OVX. Além disso, foi observado que o laser associado ao exercício não promoveu nenhum efeito nesta variável.

Os animais osteopênicos exercitados apresentaram maiores valores para a força mecânica, propriedades físicas e geométricas e conteúdo de cálcio dos fêmures das ratas osteopênicas. Programas de exercícios físicos têm um efeito positivo no tecido ósseo de animais osteopênicos<sup>41</sup>. Dependendo do tipo, da intensidade e da frequência com a qual o exercício é realizado, este é capaz de estimular a formação óssea e aumentar a força mecânica<sup>32,33</sup>.

Vários estudos investigando os efeitos do exercício físico no tecido ósseo vêm sendo realizados. Protocolos de exercícios constituídos por caminhada ou natação são eficazes para aumentar a massa óssea em humanos e ratos<sup>42,43</sup>. Embora o ambiente aquático crie uma diminuição da força gravitacional que age no tecido ósseo, a natação promove um estímulo mecânico adequado, aumentando a massa óssea (principalmente devido a hipertrofia muscular)<sup>43</sup>.

O protocolo de exercícios proposto neste estudo foi realizado em um ambiente aquático, com diminuição da força de gravidade. Apesar disto, este protocolo teve um efeito positivo nos fêmures dos animais estudados. Portanto, pode ser sugerido que esse efeito positivo esteja relacionado a hipertrofia muscular decorrente do exercício. Alguns autores afirmam que as contrações musculares têm um papel fundamental na regulação do metabolismo ósseo já que ela atua diretamente no osso, promovendo uma sobrecarga e estimulando a osteogênese<sup>41,42</sup>. Com isso, uma maior massa muscular promoveria uma maior sobrecarga no tecido ósseo e constituiria um estímulo para a formação óssea.

A terapia laser não foi teve efeito adicional no fêmur dos animais osteopênicos exercitados, uma vez que os valores encontrados para os animais treinados e treinados e irradiados não apresentaram diferenças estatísticas.

A ação do laser vem sendo demonstrada em uma série de trabalhos <sup>7, 44</sup>. Seus efeitos são baseados na absorção da luz pelo tecido, que determina modificações no metabolismo celular <sup>44</sup>. Quando o laser é aplicado nos tecidos, a luz é absorvida por estruturas fotorreceptoras chamadas cromóforos <sup>44,45</sup>. Uma vez absorvida, a luz induz uma aceleração nas reações químicas celulares, que irão alterar a produção de oxigênio molecular e ATP, aumentando a síntese de DNA. Estas modificações são responsáveis pelos efeitos cicatrizantes, anti-inflamatórios e analgésico do laser <sup>46</sup>. No tecido ósseo, vários autores afirmam que o laser estimula a proliferação celular e acelera o processo de consolidação óssea <sup>8,9,16,47</sup>.

Duas hipóteses podem ser propostas na tentativa de explicar a falta de efeitos adicionais do laser no fêmur das ratas osteopênicas exercitadas. Pode ser sugerido que os parâmetros utilizados não foram adequados para promover uma resposta adicional do tecido ósseo exercitado. Além disso, pode ser sugerido que a falta de efeito adicional do laser pode estar relacionada também a alta intensidade do programa de atividade física utilizado, que determinou que a capacidade de resposta do tecido a outro tipo de estímulo (neste caso o LLLT) ficou saturada, impedindo a melhora adicional.

**ESTUDO III**

---

**OS EFEITOS DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA EM CULTURAS DE  
CÉLULAS OSTEoblásticas**

## INTRODUÇÃO

A terapia laser de baixa intensidade (LLLT) tem sido utilizada, desde 1960, com fins terapêuticos, como um tratamento seguro e efetivo para uma série de condições patológicas nos mais diversos tecidos, incluindo o tecido nervoso, o tecido muscular e tecidos conjuntivos<sup>44</sup>.

São atribuídos a LLLT três principais efeitos fisiológicos, sendo eles: Efeito anti-inflamatório, efeito analgésico e efeito cicatrizante<sup>45</sup>

Alguns estudos vêm sendo realizados no intuito de investigar a ação da LLLT no tecido ósseo, principalmente em culturas de células ósseas e em reparos de fraturas. Diversos autores evidenciaram uma aceleração e/ou potencialização da reparação óssea mediante o emprego da LLLT. MESTER et al. (1985), sugerem que as vias metabólicas são as responsáveis por este efeito cicatrizante, em decorrência principalmente do aumento da disponibilidade de ATP nas células.

Pinheiro et al.<sup>16</sup> evidenciaram que a LLLT (laser AsGaAl, 830nm, 16 J/cm<sup>2</sup>) promoveu uma aceleração do processo de reparação óssea, alterando a população de osteoclastos e osteoblastos no local. Resultados semelhantes foram encontrados por LUGER et al.<sup>7</sup> também em fraturas de tíbias de rato utilizando o laser He-Ne (632,8 nm, 35 mW, 297 J/cm<sup>2</sup>).

Em relação a culturas de células ósseas, o laser parece estimular a proliferação destas células, principalmente por promover um aumento na síntese de DNA, da síntese protéica e elevação da atividade da fosfatase<sup>7,8,9</sup>.

De acordo com os estudos apresentados, há evidências concretas do efeito favorecedor da irradiação laser no reparo de fraturas ósseas e na diferenciação e proliferação de células osteoblásticas em culturas de células. Apesar disto, os mecanismos através dos quais a LLLT interage com o tecido ósseo e os parâmetros

ideais para a estimulação deste tecido ainda não estão totalmente esclarecidos. Com isso, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da irradiação laser, utilizado em dois comprimentos de onda e aplicado em várias densidades de energia, em culturas de osteoblastos.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

Para a realização deste estudo, foram utilizadas células osteoblásticas provenientes da calvária de ratos Wistar recém-nascidos. As células foram cultivadas em frascos específicos para cultura celular, com suplemento nutricional Dulbecco's Minimum Essential Medium (D-MEM) (Gibco), e foram armazenados em uma estufa (Sanyo Model MCO-15AC), com 5% CO<sub>2</sub>/95% ar, a 37°C.

As culturas celulares foram monitoradas diariamente por meio de um microscópio de luz invertida para observação do crescimento celular. Ao atingirem a confluência, as células foram tripsinizadas (para remoção das células aderidas à superfície dos frascos) e cultivadas em pratos de cultura celular com 96 poços, com suplemento nutricional DMEN, a uma densidade de  $1 \times 10^4$  células/ poço.

Após esse procedimento as células foram incubadas durante 24 horas na estufa e em seguida foram submetidas a irradiação laser.

### **Irradiação**

Foi utilizado um aparelho Laser, com comprimentos de onda de 780nm e 830nm, emissão contínua, potência de saída de 30 mW, nas doses: 0.5, 1, 5 e 10J/cm<sup>2</sup>. Três poços por prato foram irradiados com a mesma intensidade. Além disso, os experimentos foram duplicados. Durante a irradiação, a probe do laser foi fixada perpendicularmente (através de um suporte) acima de cada uma dos poços (Figura 1).

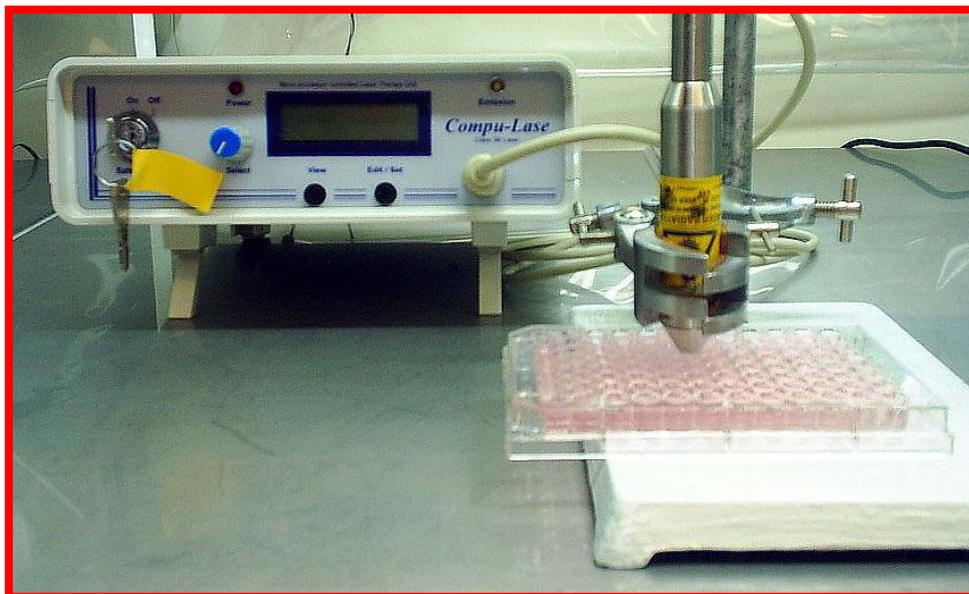
Após a irradiação, as células foram novamente incubadas por 24 horas e em seguida foram submetidas as avaliações.

## **Avaliações**

Para a análise dos efeitos do laser nas células ósseas foram utilizados os seguintes procedimentos:

**Proliferação celular:** foi utilizado um kit para avaliação da proliferação celular (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega Corp.). Os procedimentos para a avaliação foram realizados de acordo com a instruções do fabricante. Após a colocação dos reagentes, os pratos de cultura foram incubados por 2 horas e em seguida, a determinação do número de células viáveis foi obtida por meio de espectrofotometria de absorvância a 490nm.

**Determinação da atividade de fosfatase alcalina:** foi utilizado um kit para avaliação da atividade da fosfatase alcalina (Sigma Corp.) Para sua determinação, as células foram lavadas em PBS, colocadas em uma solução de 50 µl de 0.2% Nonidet P-40 com 1 mM MgCl<sub>2</sub> e foram submetidas a um processo de congelamento e descongelamento. Em seguida, as células foram colocadas em uma solução contendo 150 µl de AP buffer (40 mg de substrato de fosfato dissolvido em 20 ml Alkaline Buffer Solução, diluída em água destilada) e incubadas por 60 min a 37 °C. Por meio de espectrofotometria de absorvância a 405 nm foi feita a dosagem dos níveis enzimáticos em da atividade de fosfatase alcalina.



**Figura 1:** Aplicação do laser

## **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados foram analisados estatisticamente através de técnicas descritivas, tais como tabelas e gráficos, e estão apresentados na forma de porcentagem em relação ao grupo controle. Na comparação entre os grupos foi utilizada a análise de variância (ANOVA) e nos casos significantes, o teste de Duncan foi utilizado para discriminar as diferenças. Para as conclusões das análises estatísticas foi utilizado o nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ).

## RESULTADOS

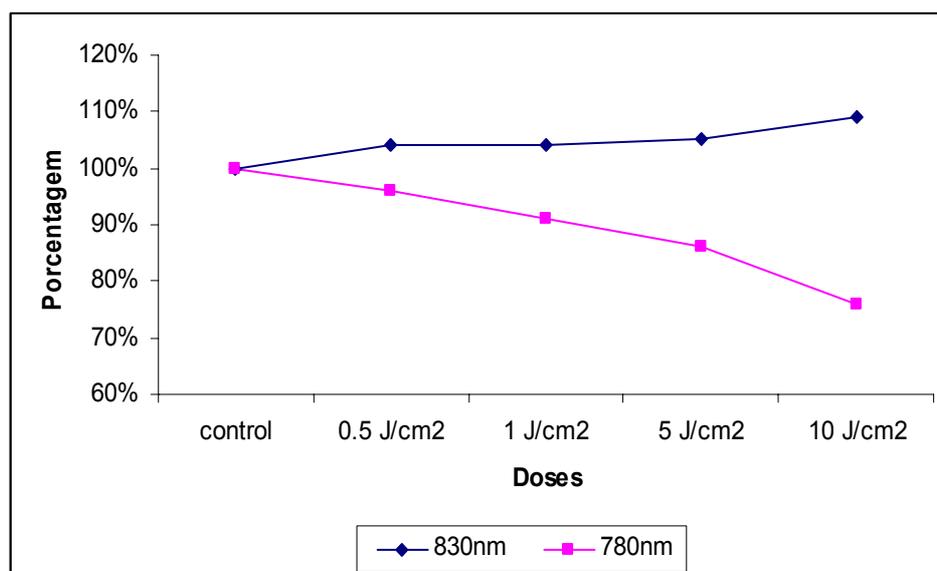
Na tabela 1 e na figura 2 estão apresentados os resultados obtidos na avaliação da proliferação celular, após a irradiação com laser 830nm e 780 nm.

**Tabela 1: Valores da porcentagem de aumento ou diminuição da proliferação celular em relação ao grupo controle**

Comprimento de onda	Dose do Laser				
	Controle não-irradiado	0,5 J/cm <sup>2</sup>	1 J/cm <sup>2</sup>	5 J/cm <sup>2</sup>	10 J/cm <sup>2</sup>
830 nm	100%	104% ± 3%	104% ± 2%	105% ± 2%	109% ± 3%*
780 nm	100%	96% ± 3%	91% ± 4%*	86% ± 5%*	76% ± 3%*

\* vs controle;

De acordo com a tabela 1 e a figura 2, pode ser observado que o laser 830 nm foi eficaz para estimular a proliferação nas células osteoblásticas, mas esse efeito só foi observado na dose de 10 J/cm<sup>2</sup> ( $p \leq 0,05$ ). Em contraste, o laser 780 nm teve um efeito inibitório na proliferação das células osteoblásticas, uma vez que as células irradiadas na dose de 1, 5 e 10 J/cm<sup>2</sup> apresentaram valores significativamente menores quando comparados com o grupo controle.



**Figura 2:** porcentagem média de proliferação celular após a irradiação com laser 780 nm e 830 nm em relação ao grupo controle

Na tabela 2 estão apresentados os resultados obtidos na avaliação da atividade da fosfatase alcalina após a irradiação com laser 830nm e 780 nm

**Tabela 2: Valores da porcentagem de aumento ou diminuição da atividade da fosfatase alcalina em relação ao grupo controle, nas diferentes doses analisadas**

Comprimento de onda	Dose do Laser				
	Controle não-irradiado	0,5 J/cm <sup>2</sup>	1 J/cm <sup>2</sup>	5 J/cm <sup>2</sup>	10 J/cm <sup>2</sup>
830 nm	100%	102% ± 3%	105% ± 5%	102% ± 1%	107% ± 1%*
780 nm	100%	98% ± 3%	98% ± 6%	100% ± 2%	96% ± 2%

\* vs controle;

De acordo com a tabela 2, pode ser observado que o laser 830 nm promoveu um aumento significativo da atividade da fosfatase alcalina, mas somente na dose de 10 J/cm<sup>2</sup>. O laser 780 nm não teve nenhum efeito significativo na atividade da fosfatase alcalina nos osteoblastos.

## DISCUSSAO

Inúmeros estudos vêm sendo realizados e apontam o laser como um recurso capaz de promover efeitos bioestimulatórios nos mais diversos tecidos biológicos, afetando não só a área de aplicação como também as regiões circundantes<sup>7,8,36</sup>.

Os resultados do presente estudo evidenciaram que o laser 830 nm foi eficaz para estimular a proliferação celular e a atividade da fosfatase alcalina nas células osteoblásticas na dose de 10 J/cm<sup>2</sup>. Contrariamente, o laser 780nm teve um efeito inibitório na proliferação celular dos osteoblastos, nas doses de 1, 5 e 10 J/cm<sup>2</sup>.

Estes resultados estão de acordo com os resultados encontrados por Werneck et al<sup>48</sup> que encontram uma resposta dose-dependente das células a irradiação laser. Ozawa et al.<sup>8</sup> e Stein et al<sup>49</sup> também evidenciaram que o laser As-Ga-Al (830 nm) foi eficiente para estimular a proliferação celular de osteoblastos, com um aumento da síntese de DNA e da síntese de proteínas.

Além disso, os efeitos opostos observados na proliferação celular após a irradiação com o laser 830 nm e com o laser 780nm pode ser atribuídos à especificidade celular ao comprimento de onda utilizado. Alguns trabalhos na literatura evidenciam que a resposta das células a irradiação laser é dose-dependente e que estas respondem de formas diferentes a diferentes comprimentos de onda <sup>8,48,49</sup>. Entretanto, os fatores envolvidos neste processo não estão esclarecidos e necessitam outras investigações.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do primeiro estudo indicam que o LLLT teve um efeito positivo nos fêmures das ratas osteopênicas, principalmente na dose de  $120 \text{ J.cm}^{-2}$ , sugerindo que doses maiores são mais eficazes para estimular o tecido ósseo.

O segundo estudo evidenciou que o protocolo de atividade física foi eficiente para aumentar a força óssea, o conteúdo de cálcio e os valores obtidos para as propriedades geométricas e físicas dos fêmures das ratas osteopênicas. Este estudo mostrou também que a associação dos dois tratamentos (treinamento físico e do laser) não promoveu nenhum efeito adicional no tecido ósseo dos animais estudados.

Além disso, os resultados obtidos no terceiro estudo mostraram, *in vitro*, que o laser 830 nm foi eficaz para estimular a proliferação celular dos osteoblastos, principalmente na maior dose utilizada ( $10 \text{ J.cm}^{-2}$ ). Estes achados corroboram com os resultados obtidos *in vivo*. Foi observado também que o laser 780 nm promoveu um efeito inibitório na proliferação dos osteoblastos, suportando as teorias de dose-especificidade das células a comprimentos de onda e parâmetros diferentes.

Como exposto anteriormente, a osteoporose é responsável por um alto índice de morbidade e mortalidade entre os indivíduos acometidos e está relacionada a um alto custo sócio-econômico. Por causa disso, cresce a importância do desenvolvimento de tratamentos que atuem de modo eficaz na prevenção da osteoporose e na redução da perda de massa óssea quando a doença já está instalada.

O laser terapêutico vem surgindo como um recurso capaz de estimular a osteogênese e acelerar o processo de consolidação de fraturas. Apesar disso, por ser de uma tecnologia muito recente, a laserterapia necessita de melhor parametrização das variáveis para se obter os estímulos mais apropriados, pois muitos dos reais efeitos,

limitações e contra-indicação ainda não estão totalmente claros e há muita controvérsia sobre seu mecanismo de ação nos tecidos.

O exercício físico também vem demonstrando eficácia na estimulação do tecido ósseo. Este tipo de intervenção, em geral, envolve um baixo custo, é de fácil realização e de grande aceitabilidade entre os indivíduos osteoporóticos.

Os dados deste trabalho abrem horizontes para outras pesquisas a respeito dos efeitos do laser e da atividade física na osteoporose. Estudos futuros devem ser realizados no intuito de se investigar os efeitos de diferentes comprimentos de onda, doses e formas de aplicação do laser bem como, diferentes protocolos de exercícios físicos, para se definir os parâmetros mais efetivos na estimulação da formação óssea, o que contribuiria para a preservação e aumento da massa óssea em indivíduos osteoporóticos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Consensus Development Conference: Diagnosis, prophylaxis and treatment of osteoporosis. *Osteoporosis. Intr.* 1991; 1:114-17 .
2. Ward, J.A. Physiologic, health and lifestyle factors associated with femoral neck bone density in older women. *Bone*, 1995, 4: S373-378.
3. Forsbach, G.; Santos, A. Densidad óssea y osteoporosis: una opinion. *Ginecol. Obstet*, 1994, 62:201-203.
4. Driusso, P. Os efeitos da prolactina no fêmur de ratas osteopênicas. Tese de doutorado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.
5. Carvalho, D.C. Ação do Ultra-som de baixa Intensidade em ossos de ratos Osteopênicas. Tese de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.
6. Biller, B.M.K.; Bamm, H.B.A.; Rosenthal, D.I.; Saxe, V.C.; Progressive trabecular osteopenia in women with hyperprolactinemic amenorrhea. *J Clin Endocrinol Metab*, 75: 692-697, 1992.
7. Luger, E. J.; Rochkind, S.; Wollman, Y. et al. Effect of low-power laser irradiation on the mechanical properties of bone fracture healing in rats. *Lasers in Surgery and Medicine*, 1998, 22: 97-102.
8. Ozawa, Y.; Shimizo, N.; Kariya, G. Low-energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells. *Bone*, 1998; 22:347-354.
9. Freitas, I.G.F.; Baranauskas, V.; Lasers effects on osteogenesis. *Applied Surface Science*, 2000; 54:548-554.
10. Trelles, M.A.; Mayayo, E., Bone fracture consolidates faster with low-power laser. *Lasers in Surgery and Medicine*, 1987; 7: 36-45.

11. Malmros, B; Mortensen, L; Jensen, M.B. Positive effects of physiotherapy on chronic pain and performance in osteoporosis. *Osteoporos Int*; 1998; 8(3):215-21;.
12. Mitchell, S.L.; Grant, S.; Aitchison, T. Physiological Effects of Exercise on Postmenopausal Osteoporotic Women. *Physiotherapy*, 1998; 84, 75-83.
13. Barengolts EI, Lathon PV, Curry DJ, Kukreja SC. Effects of endurance exercise on bone histomorphometric parameters in intact and ovariectomized rats. *Bone Miner*, 1994; 133-40.
14. Culhan, E.G.; Jimenez, H.A.I.; King, C.B.K. Thoracic kyphosis, rib mobility, and lung volumes in normal women and women with osteoporosis. *Spine*. 1994, 19: 1250-1255.
15. Paz, L.H.B.C.; Falco, V.; Teng, N.C.; Reis, L.M. et al. Effects of 17 $\beta$  estradiol or alendronate on the bone densitometry, bone histomorphometry and bone metabolism of ovariectomized rats. *Braz J Med Biol Res*, 2001; 34:1015-1022.
16. Pinheiro, A.L.B.; Limeira Junior, F.; Gerbi, M. et al. Biomodulatory effects of LLLT on bone regeneration. *Laser Therapy*, 2001; 13, 73-79.
17. Tamura, K.; Hosoya, S.; Hiratsuka, K.; Abiko, Y. Enhancement of mouse CDC46 gene expression in the osteoblast by laser irradiation. *Laser Therapy*, 1998; 10, 25-32.
18. Kalu, D.N. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner*, 1991, 15: 171-192.
19. Peng, Z.; Tuukkanen, H.; Zhang, H.; Jamsa, T, et al. The mechanical strength of bone in different rat models of experimental osteoporosis. *Bone*, 1994; 15: 523-532.
20. MASORO, E. *Handbook of physiology: aging*. Oxford University Press, 1995.
21. Martin, R.B. Effects of simulated weightlessness on bone properties in rats. *Journal of Biomech*, 1990; 23:1021-1029.

22. Wronski, T. J., Dann, L. M., Scott, Cintron, M.. Long-term effects of ovariectomy and anging on the rat skeleton. *Calcifiel Tissue International*, 1989; 45:360; 366.
23. Hietala, E.L. The effect of ovariectomy on periosteal bone formation and bone resorption in adult rats. *Bone Miner*, 1993; 20:57-65.
24. Monteagudo,M.D.; Hernandez, E.R.; Seco, C.; Gonzales-Riola, J. et al Comparison of the robusticity index and bone weight/bone length index with the results of bone densitometry and bone histomorphometry in experimental studies. *Acta Anatomica*, 1997; 160: 195-199.
25. De Tejada, THG; Marin, DR; Soriano, FM, Efecto de la irradiacion con laser de HeNe en el callo de fracture experimental. *Repercussion ultra-structural, morfometrica y hormonal. Rev. Ortop. Traum*: 1990; 34-B: 84-91.
26. Dickson, G.; Clingen, C.; Taggart, H. Bone mineral density of repairing femoral fractures (osteotomies) after low level laser therapy (LLLT) at 830 nm wavelength. *Proceedings 2<sup>nd</sup>. Congress World Association for Laser Therapy, Kansas City, Missouri, USA, Setembro, 23-24, 1998.*
27. Dortbudak, O. Biostimulation of bone marrow cells with a diode soft laser. *Clin Oral Implants Res*, 2000; 16: 540-545.
28. Kawasaki, K.; Shimizu, N. Effects of low-energy laser irradiation on bone remodeling during experimental tooth movement in rats. *Lasers in Surgery and Medicine*, 2000; 26:282-291.
29. Dempster, D.W. Treatments of osteoporosis: How do they reduce the risk of fracture?. *Osteoporosis International* , 2003;14:S1-S1 Suppl. 7.
30. Bagi, C.M.; Wilkie, D.; Georgelos, K.; Williams, D.; Bertolini, D.. Morphological and structural characteristics of the proximal femora in human and rat. *Bone*, 1997; 21: 261-267.

31. Brandi, M.L. New treatment strategies: ipriflavone, strontium, vitamin D metabolites and analogs. *Am J Med*, 1993; 95:69-745.
32. Nordsletten et al. The development of femoral osteopenia in ovariectomized rats is not reduced by high intensity treadmill training: a mechanical and densitometric study. *Calcif Tissue Int*, 1994; 6: 436-42.
33. Myburgh KH, Noakes TD, Roodt M, Hough FS. Effect of exercise on the development of osteoporosis in adult rats. *J Appl Physiol*, 1989;1:14-9.
34. Donahue HJ, Mazzeo RS, Horvath SM . Endurance training and bone loss in calcium-deficient and ovariectomized rats. *Metabolism*, 1988; 8: 741-4.
35. Barengolts, E.I.; Kouznetsova, T.; Segalene, A.; Lathon, P.; Odvina, C.; Kukreja, S.C.; Unterman, T.G.. Effects of progesterone on serum levels of IGF-1 and on femur IGF-1 mRNA in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res*, 1996; 10:1406-12.
36. David, R.; Nissan, M.; Cohen, I.; et al. Effect of low-power He-Ne laser on fracture healing in rats *Lasers in Surgery and Medicine*, 1996; 19, 458-464.
37. Hart, K.J.; Shaw, J.M.; Vajda, E.; Hegsted, M.; Miller, S.C. Swim-trained rats have greater bone mass, density, strength, and dynamics. *J Appl Physiol*, 2000; 14: 1663-8.
38. Notomi, T.; Lee, S.J.; Okimoto, N.; Okazaki, Y.; Takamoto, T.; Nakamura, T.; Suzuki, M.. Effects of resistance exercise training on mass, strength, and turnover of bone in growing rats. *Eur J Appl Physiol*, 2000; 4:268-74.
39. Hornberger, T. A.; Farrar, R. P. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. *Can J. Apl. Physiol*, 2004; 29: 16-31.
40. Marcus, F; Feldman, D. Osteoporosis, Editora Academic Press, San Diego-USA, 1996.

41. Li, C. Y., Jee, S., Chen, A. have a synergistic effect in preventing bone loss in the lumbar vertebrae and femoral neck of the ovariectomized rat., *Calcified tissue international*, 2002, 72:42-49.
42. Frost, H.M. Perspectives-Bones Mechanical Usage Windows. *Bone and Mineral* 1992; 19: 257-271.
43. Iwamoto, J.; Yeh, J.K.; Aloia, J.F. Differential effect of treadmill exercise on three cancellous bone sites in the young growing rat. *Bone*, 1999; 24: 163-169.
44. Baxter GD. Therapeutic lasers: theory and practice. United States of America: Ed. Churchill Livingstone, Pag. -1-19. 1997
45. Karu, T.I.; Lubart, R.. Effects of low-power light on biological systems V. Amsterdam, Netherlands: Proceedings of SPIE, 2000; 41: 1-17.
46. Kitchen, S.S.; Partridge, C.J. A review of level laser therapy. Part I: background, physiological effects and hazards. *Physiotherapy*, 1991; 77: 161-170.
47. Silva Junior, A.; Pinheiro, A.L.; Ramalho, L. Nicolau, R. Computerized Morphometric Assessment of the effect of Low-level laser therapy on bone repair: an experimental animal study. *Journal of Clinical Laser and Surgery*. 2002; 20: (2).
48. Werneck, C.A.; Pinheiro, A. L., Pacheco, M. T., Castro, J. L. Laser Light is capable of Inducing Proliferation of Carcinoma Cells in Clture: a Spectroscopic *in Vitro* Study. *Photomedicine and Laser Surgery*, 2005, 23:300-3003.
49. Stein, N; OROZ, C. Low laser therapy promotes proliferation and differential of human osteoblasts in vitro. *Photomedicine and Laser Surgery*, 2005; 23 (2).

**ANEXOS**

---

ANEXO 1

---

**Effects of 830 nm laser light, used in two doses, on biomechanical properties  
of osteopenic rat femoras**

<sup>1</sup> Renno, A. C, M.,<sup>2</sup> Moura F.,<sup>2</sup> Santos, N.,<sup>3</sup> Bossini, P.,<sup>4</sup> Parizotto, N.

<sup>1</sup> Doctoral degree student of the Department of Physiotherapy, Federal University of São Carlos

<sup>2</sup> Student of Physiotherapy, Federal University of São Carlos

<sup>3</sup> Physical Therapist, Department of Physiotherapy, Federal University of São Carlos

<sup>4</sup> Lecturer, PhD, Department of Physiotherapy, Federal University of São Carlos

Key words: osteoporosis, laser, rats, ovariectomy, bone strength

Running title: laser light on femora of osteopenic rats

### Abstract

**Objective:** The aim of this study was to investigate the effects of low-power laser therapy (LLLT), infrared 830 nm, used in two doses, on femora of ovariectomized (OVX) rats. **Background data:** Osteoporosis has recently been recognized as a major public health problem. Based on the stimulatory effects of LLLT on proliferation of bone cells, we hypothesized that LLLT would be efficient to improve bone mass in OVX rats. **Methods:** It was used 60 females animals, divided into 6 groups: sham-operated control (SC), OVX control (OC); sham-operated irradiated with the dose of 120 J.cm<sup>-2</sup> (I120), OVX irradiated with the dose of 120 J.cm<sup>-2</sup> (O120); sham-operated irradiated with the dose of 60 J.cm<sup>-2</sup> (I60) and OVX irradiated with the dose of 60 J.cm<sup>-2</sup> (O60). Animals were operated at the age of 90 day-old. Laser irradiation initiated 8 weeks after operation and it was performed 3 times a week, during 2 months. Femora were submitted to a biomechanical test and to a physical properties evaluation. **Results:** Maximal load of O120 did not show difference when compared with SC and I120 and it was higher than the O60 group. Wet weight, dry weight and bone volume of O60 and O120 did not show any difference when compared with SC. **Conclusion:** The results of the present study indicate that LLLT had beneficial effects on established osteopenia in OVX rats, mainly at the dose of 120 J.cm<sup>-2</sup>. However, further studies are needed to investigate the effects of different parameters, wavelengths and sessions of applications on OVX rats.

ANEXO 2

---

**The effects of a physical activity program and the association with the infrared-830 nm laser on the femurs of osteopenic rats****<sup>1</sup> Renno, A. C. M., <sup>2</sup> Moura F., <sup>2</sup> Santos, N., <sup>3</sup> Bossini, P., <sup>4</sup> Parizotto, N.**<sup>1</sup> Phd student of the Department of Physiotherapy, Federal University of São Carlos<sup>2</sup> Undergraduate student of Physiotherapy, Federal University of São Carlos<sup>3</sup> Physical Therapist, Department of Physiotherapy, Federal University of São Carlos<sup>4</sup> Lecturer, Phd, Department of Physiotherapy, Federal University of São Carlos

Running title: laser light on femoras of osteopenic rats

Key words: osteoporosis, exercises, ovariectomy, low laser therapy,

**Abstract**

**Objective:** The aim of this study was to investigate the effects of low-power laser irradiation (LLLT), infrared 830 nm, on femoras of exercised osteopenic rats (OVX) rats. **Background data:** Osteoporosis has recently been recognized as a major public health problem. Many treatments for osteoporosis have been proposed, including physical exercise programs. Exercises can increase bone mass and bone strength in normal and osteoporotic bones. Another treatment that has been studied is the low laser therapy (LLLT), which has a stimulatory effect on proliferation of bone cells. We hypothesized that LLLT would be efficient to improve the benefic effect of exercise on bone mass of osteopenic rats. **Methods:** It was used 60 females animals, divided into 6 groups: sham-operated control (SS), OVX control (OC); sham-operated trained (ST), OVX trained (OT); sham-operated trained and irradiated (STL) and OVX trained and irradiated (OTL). The exercise program and the laser irradiation were performed (applied on midshaft shaft of femora), 3 times a week, during 2 months. The exercise program was made in a container, filled with warm water and was consisted of jumps (4 series, with 10 jumps). A low-energy Ga-Al-As laser, 830nm, 100 W/cm<sup>2</sup>, 120 J/cm<sup>2</sup>, was used in this study. Femoras were submitted a physical and geometrical properties evaluation, to a biomechanical test and to calcium and phosphorus evaluation. **Results:** The OVX caused a negative effect on length of femora, geometrical and physical properties and calcium content. The exercise program was able to revert the bone losses due to OVX. However, the LLLT did not improve the beneficial effect of the exercise on the osteopenic rats. **Conclusion:** The OVX animal model used induced bone losses in the femora. The exercise program was able to revert these losses and to improve femora strength. However, concurrent treatments did not produce a more pronounced effect on femora. Since the LLLT presents an osteogenic effects, higher parameters should be investigated in order to verifying if more energy would be able to create an extra osteogenic stimulus (besides exercise).

## ANEXO 3

---

**THE EFFECTS OF 780NM AND 830NM LASER IRRADIATION ON  
OSTEOBLAST CELL PROLIFERATION**

<sup>1-3</sup> Renno, A.C.M., <sup>1</sup>Parizotto, N.A. <sup>2</sup>McDonnell, P.A. and <sup>3</sup>Laakso, E-L.

<sup>1</sup>Physical Therapy Department, Federal University of São Carlos, Brazil;

<sup>2</sup>School of Biomedical and Biomolecular Science,

<sup>3</sup>School of Physiotherapy and Exercise Science, Griffith University, Australia.

**Abstract**

**Objective:** to determine the response of bone cells to laser irradiation, we investigated the dose-response effects of 780 nm and 830nm wavelength laser on cell proliferation of primary osteoblast (MC3T3). **Background data:** Osteoporosis has recently been recognized as a major public health problem. Based on the stimulatory effects of LLLT on proliferation of bone cells, we hypothesized that LLLT would be efficient to improve cell proliferation in osteoblast cells. **Methods:** Neonatal murine calvaria osteoblastic (MC3T3) and human osteosarcoma (MG63) cell lines were employed in this study. Cells were grown in Dulbecco's minimal essential medium (DMEM/F12) containing 10% foetal calf serum and antibiotics (50µg/ml benzylpenicillin, 90µg/ml streptomycin) in 25 cm<sup>2</sup> sterile culture flasks at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator. At confluence, cells were trypsinised with 0.05% trypsin / EDTA solution and passaged using standard tissue culture protocols. For cell proliferation trials, confluent monolayers were trypsinised, then plated onto 96-well plates at a density of 1x10<sup>4</sup> cells/well. **Procedure of Laser Irradiation:** 24 hours after seeding of plates, cells were exposed to low power, athermal, laser irradiation (780nm and 830nm, 30mW, continuous wavelength). A single dose of irradiation was performed at energy densities of 0.5, 1, 5, 10 and 12 J/cm<sup>2</sup>. Twenty-four hours after LLLT, cell proliferation and alkaline phosphatase activity were assessed. **Results:** the 830 nm laser was able to improve cell proliferation and alkaline phosphatase activity in the osteoblasts. In contrast, the 780nm laser a statistically significant decrease in osteoblast proliferation. **Conclusion:** This study adds to the literature regarding wavelength-specificity of LLLT. The regulatory mechanisms of LLLT on tissues remain unclear, but may involve photochemical signaling, with laser light enhancing cell proliferation through changes in mitochondrial physiology, subsequently affecting RNA synthesis. Such effects then alter the expression of various cell regulatory proteins. The contrasting results observed in our studies may be due to cell specificity plus the LLLT wavelength employed. It is possible that the biochemical physiology of the human osteosarcoma line is somewhat altered compared to that of the normal primary murine osteoblast line. However, the reasons for the decreased osteoblastic proliferation and the increased osteosarcoma proliferation remain unclear and warrant further investigation.

**ANEXO 4**

---

**DADOS**

**DADOS DA MASSA CORPORAL**

Massa corporal inicial

<i>OC</i>	<i>CC</i>	<i>IT</i>	<i>OT</i>	<i>IL</i>	<i>OL</i>	<i>OLT</i>	<i>ILT</i>
245	260	260	240	250	230	260	263
240	240	250	240	250	270	255	260
240	260	270	235	265	240	260	265
243	230	260	240	265	250	250	255
240	240	250	240	250	260	265	260
255	250	240	235	270	260	275	255
240	260	230	255	270	260	265	255
230	230	270	235	270	270	260	265
245	265	250	240	275	265	245	255
235	230	270	240	260	280		265

Massa corporal final

<i>OC</i>	<i>CC</i>	<i>IT</i>	<i>OT</i>	<i>IL</i>	<i>OL</i>	<i>OLT</i>	<i>ILT</i>
300	300	300	295	310	310	300	290
280	260	280	290	305	290	290	285
280	300	292	320	295	290	313	300
295	270	315	290	295	310	300	265
290	280	285	295	260	280	312	295
280	295	285	300	315	300	310	310
300	310	280	315	315	290	326	310
285	265	295	305	290	315	290	300
295	300	263	295	305	290		305
280	270	292	320	295			300

## DADOS DA AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICAS

### Peso Umido

<i>OC</i>	<i>CC</i>	<i>IT</i>	<i>OT</i>	<i>IL</i>	<i>OL</i>	<i>ILT</i>	<i>OLT</i>
0,77	0,80	0,96	0,93	0,91	0,85	0,83	0,83
0,68	0,96	1,02	0,91	0,79	0,81	0,88	0,86
0,78	0,79	1,10	0,90	0,85	0,90	0,82	0,93
0,79	0,83	0,92	0,94	0,91	0,89	0,88	0,91
0,73	0,84	0,86	0,78	0,71	0,85	1,08	0,94
0,75	0,80	0,95	0,90	0,79	0,92	0,90	1,02
0,95	0,93	1,00	0,88	0,87	0,78	0,90	0,86
0,80	0,83	0,90	1,00	0,78	0,89	0,79	0,91
0,80	0,99	0,86	0,98	0,92	0,80		1,00
0,68	0,82	0,86	0,96	0,87			0,95

### Peso seco

<i>OC</i>	<i>CC</i>	<i>IT</i>	<i>OT</i>	<i>IL</i>	<i>OL</i>	<i>ILT</i>	<i>OLT</i>
0,435	0,48	0,60	0,57	0,51	0,52	0,52	0,53
0,393	0,58	0,63	0,57	0,45	0,46	0,57	0,53
0,433	0,48	0,70	0,60	0,49	0,50	0,52	0,59
0,451	0,50	0,56	0,59	0,53	0,54	0,57	0,54
0,412	0,45	0,51	0,48	0,42	0,48	0,68	0,56
0,443	0,44	0,60	0,55	0,46	0,57	0,56	0,59
0,543	0,57	0,61	0,55	0,47	0,49	0,57	0,53
0,456	0,46	0,60	0,62	0,46	0,48	0,50	0,57
0,471	0,59	0,51	0,59	0,56	0,48		0,61
0,406	0,47	0,53	0,60	0,52			0,54

### Peso de cinzas

<i>OC</i>	<i>CC</i>	<i>IT</i>	<i>OT</i>	<i>IL</i>	<i>OL</i>	<i>ILT</i>	<i>OLT</i>
0,2441	0,3276	0,42	0,4019	0,3455	0,3555	0,3543	0,3548
0,2862	0,4006	0,44	0,4018	0,3133	0,3173	0,3954	0,3761
0,3072	0,3348	0,50	0,4156	0,3393	0,3292	0,3708	0,4118
0,2852	0,3362	0,40	0,3966	0,3583	0,3748	0,3847	0,3749
0,2887	0,3019	0,36	0,3375	0,2925	0,3238	0,4704	0,3905
0,2625	0,3051	0,42	0,3873	0,3146	0,391	0,39	0,4078
0,258	0,3985	0,43	0,393	0,3174	0,3412	0,3839	0,36
0,2817	0,3205	0,40	0,4355	0,3246	0,3143	0,3342	0,3909
0,2767	0,4066	0,36	0,4098	0,3838	0,3292		0,4255
	0,3252	0,38	0,4195	0,3639			0,3697

**DADOS DO TESTE DE FLEXÃO**

Carga Máxima

<i>OC</i>	<i>CC</i>	<i>IT</i>	<i>OT</i>	<i>IL</i>	<i>OL</i>	<i>OLT</i>	<i>ILT</i>
72	107,7	132,2	130,8	114,6	115,9	101,9	114,7
72	132	140,5	118,4	87,7	99,3	118,4	124,2
65	106,5	172,4	136,1	118,6	109,2	122,4	119,9
106,4	105,1	121,4	107,3	111,6	125,3	114	115,3
90,8	95	112,9	117,9	94	102,7	122,6	130,2
91,8	93,9	134	136,9	85,1	115,8	122,7	129,7
102,3	125,2	142,8	128,1	97,6	106,4	139,9	104,4
99,7	99,2	122	137,8	103,6	102,2	96,4	118,7
103,92	127,1	92,9	135,6	124,2	110,4		136,9
87,7	105	126,7	100,8	119,7			136,9

Energia de absorção

<i>OC</i>	<i>CC</i>	<i>IT</i>	<i>OT</i>	<i>IL</i>	<i>OL</i>	<i>OLT</i>	<i>ILT</i>
54,5	0,0686	0,0667	0,07	0,0691	0,0642	54,1000	0,0723
54,5	0,0724	0,1047	0,08	0,0464	0,0438	89,0000	0,0706
68,9	0,0452	0,1120	0,07	0,077	0,0448	51,2000	0,0617
51,1	0,059	0,0820	0,06	0,062	0,0687	67,3000	0,0716
50,6	0,0487	0,0793	0,06	0,0012	0,0418	67,5000	0,0776
61,9	0,0418	0,0760	0,06	0,0347	0,0821	72,0000	0,0742
59,1	0,0648	0,0666	0,06	0,0405	0,0563	88,6000	0,0615
54,4	0,065	0,0637	0,09	0,0566	0,0406	32,2000	0,0578
66,2	0,0897	0,0483	0,05	0,0693	0,0634		0,0766
<b>50</b>	0,0558	0,0782	0,04	0,0733			0,0766

Rigidez

<i>OC</i>	<i>CC</i>	<i>IT</i>	<i>OT</i>	<i>IL</i>	<i>OL</i>	<i>OLT</i>	<i>ILT</i>
162,2	217	252,70	246,40	235,8	230,8	227,40	234,70
162,2	294,4	277,10	221,10	168,7	183,6	261,60	239,80
200,4	255,8	301,80	243,30	225,3	235,4	274,10	199,20
227,8	193,7	255,00	212,40	254,6	238,8	242,90	219,20
159,1	207,8	207,70	239,00	166,4	189,5	285,40	274,50
180	196,3	267,70	288,20	182	229	245,80	228,40
232,3	279,7	301,90	117,00	219,9	186,6	242,20	209,70
166,4	218	204,40	261,10	198	218,9	206,80	249,10
187,9	246,7	217,10	310,70	214,9	180,7		313,70
187,6	211,6	249,50	179,70	275,8			313,70

Dados obtidos na avaliação da proliferação celular dos osteoblastos após a irradiação com laser 830nm.

<i>Experimento 1</i>	<i>Controle</i>	<i>0,5 J/cm<sup>2</sup></i>	<i>1 J/cm<sup>2</sup></i>	<i>5 J/cm<sup>2</sup></i>	<i>10 J/cm<sup>2</sup></i>
	0,398	0,32	0,56	0,841	0,724
	0,607	0,4	0,695	0,801	0,702
	0,666	0,417	0,738	0,756	0,803
	0,504		0,661	0,724	
	0,454				
	0,678				
	0,48				

<i>Experimento 2</i>	<i>Controle</i>	<i>0,5 J/cm<sup>2</sup></i>	<i>1 J/cm<sup>2</sup></i>	<i>5 J/cm<sup>2</sup></i>	<i>10 J/cm<sup>2</sup></i>
	0,687	0,503	0,633	0,568	0,698
	0,621	0,51	0,546	0,577	0,718
	0,634	0,468	0,557	0,714	0,65
	0,539	0,599	0,726	0,761	0,64
	0,772				

**Dados obtidos na avaliação da proliferação celular dos osteoblastos após a irradiação com laser 780nm.**

<i>Experimento 1</i>	<i>Controle</i>	<i>0,5 J/cm<sup>2</sup></i>	<i>1 J/cm<sup>2</sup></i>	<i>5 J/cm<sup>2</sup></i>	<i>10 J/cm<sup>2</sup></i>
	0,974	1,105	0,831	0,866	0,704
	0,967	0,971	0,829	0,854	0,602
	0,846	0,999	0,85	0,753	0,734
	0,963	0,881	1,01	0,778	
	0,971				
	1,015				
	1,055				
	1,161				

<i>Experimento 2</i>	<i>Controle</i>	<i>0,5 J/cm<sup>2</sup></i>	<i>1 J/cm<sup>2</sup></i>	<i>5 J/cm<sup>2</sup></i>	<i>10 J/cm<sup>2</sup></i>
	0,535	0,445	0,432	0,382	0,404
	0,494	0,529	0,486	0,525	0,449
	0,42	0,549	0,481	0,475	0,396
	0,516		0,497	0,458	0,456
	0,528				
	0,439				
	0,56				
	0,55				
	0,527				

Dados obtidos na avaliação da atividade da fosfatase alcalina dos osteoblastos após a irradiação com laser 830nm.

<i>Experimento 1</i>	<i>Controle</i>	<i>0,5 J/cm<sup>2</sup></i>	<i>1 J/cm<sup>2</sup></i>	<i>5 J/cm<sup>2</sup></i>	<i>10 J/cm<sup>2</sup></i>
	0,515	0,544	0,56	0,598	0,605
	0,603	0,594	0,628	0,58	0,61
	0,583	0,546	0,634	0,506	0,606

<i>Experimento 2</i>	<i>Controle</i>	<i>0,5 J/cm<sup>2</sup></i>	<i>1 J/cm<sup>2</sup></i>	<i>5 J/cm<sup>2</sup></i>	<i>10 J/cm<sup>2</sup></i>
	0,722	0,692	0,695	0,727	0,765
	0,733	0,743	0,725	0,71	0,705
	0,706	0,712	0,723	0,722	0,726

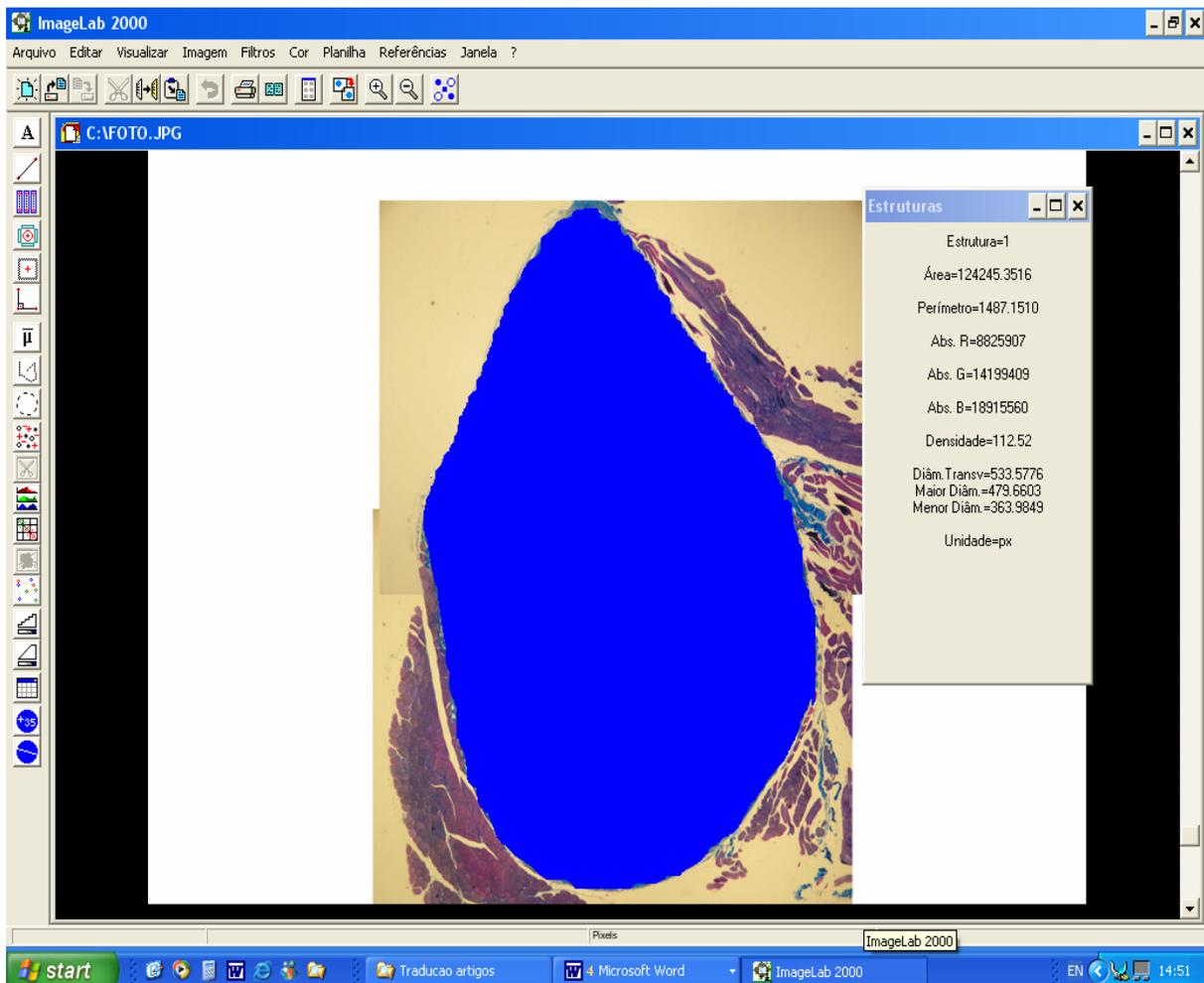
Dados obtidos na avaliação da atividade da fosfatase alcalina dos osteoblastos após a irradiação com laser 780nm.

<i>Experimento 1</i>	<i>Control</i>	<i>0.5 J/cm<sup>2</sup></i>	<i>1 J/cm<sup>2</sup></i>	<i>5 J/cm<sup>2</sup></i>	<i>10 J/cm<sup>2</sup></i>
	0,765	0,808	0,834	0,805	0,777
	0,781	0,749	0,757	0,769	0,745
	0,843	0,776	0,753	0,824	0,78

## ANEXO 5

ANÁLISE DAS PROPRIEDADES GEOMÉTRICAS  
TELA DO SOFTWARE- IMAGELAB

## Cálculo da área de secção transversal e dos diâmetros maiores e menores



## Cálculo da área do canal medular

