

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

ADALBERTO VIEIRA CORAZZA

OS EFEITOS BIOMODULADORES DA FOTOTERAPIA E DO  
TREINAMENTO RESISTIDO NO TECIDO MUSCULAR E ÓSSEO DE  
RATAS OVARIECTOMIZADAS

Tese de Doutorado apresentada a  
Faculdade de Odontologia de  
Piracicaba, da UNICAMP, para  
obtenção do Título de Doutor em  
Biologia Buco-Dental, área de  
concentração em Anatomia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Ferreira Caria

Este exemplar corresponde à  
versão final da Tese defendida pelo  
aluno, e orientada pelo Prof. Dr.  
Paulo Henrique Ferreira Caria

---

Assinatura do Orientador

PIRACICABA, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
MARILENE GIRELLO – CRB8/6159 - BIBLIOTECA DA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

C81e	<p>Corazza, Adalberto Vieira, 1975- Os efeitos biomoduladores da fototerapia e do treinamento resistido no tecido muscular e ósseo de ratas ovariectomizadas / Adalberto Vieira Corazza. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2012.</p> <p>Orientador: Paulo Henrique Ferreira Caria.</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p>1. Osteoporose. 2. Sarcopenia. 3. Envelhecimento. I. Caria, Paulo Henrique Ferreira, 1972- II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.</p>
------	---

**Título em Inglês:** Biomodulators effects of phototherapy and resistance training in the bone and muscle tissue of ovariectomized rats

**Palavras-chave em Inglês:** Osteoporosis, Sarcopenia, Aging

**Área de concentração:** Anatomia

**Titulação:** Doutor em Biologia Buco-Dental

**Banca examinadora:**

Paulo Henrique Ferreira Caria [Orientador]

Adriana Pertille

Rosane de Fátima Zanirato Lizarelli

Felippe Bevilacqua Prado

Marcio de Moraes.

**Data da defesa:** 27-02-2012

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Buco-Dental



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 27 de Fevereiro de 2012, considerou o candidato ADALBERTO VIEIRA CORAZZA aprovado.

Prof. Dr. PAULO HENRIQUE FERREIRA CARIA

Profa. Dra. ADRIANA PERTILLE

Profa. Dra. ROSANE DE FATÍMA ZANIRATO LIZARELLI

Prof. Dr. FELIPPE BEVILACQUA PRADO

Prof. Dr. MARCIO DE MORAES

## **Dedicatória**

Ao meu filho Victor, por me proporcionar muitas alegrias e ser fonte de inspiração em vários momentos da vida.

À amada esposa Lilian, por confiar, incentivar e ser eterna companheira.

Aos meus pais por toda dedicação, carinho e ensinamentos aplicados a mim.

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus por me conduzir próximo de pessoas que contribuem para o meu crescimento emocional, intelectual e científico, para que assim eu possa retribuir este processo junto à sociedade.

Agradeço aos meus pais por tamanha dedicação na minha formação como homem.

Agradeço a minha família, principalmente a minha esposa e meu filho pela paciência nos momentos de ausência e pelo amor.

Ao Prof. Dr. Paulo Henrique Ferreira Caria, meu orientador e amigo, sou grato por me receber na área da anatomia, com toda sua competência e sabedoria, conduzindo-me à produção deste trabalho e por todo suporte científico na área acadêmica.

Ao Prof. Dr. Vanderlei S. Bagnato agradeço por transmitir o entusiasmo em discutir ciência e pelo suporte técnico e científico neste estudo.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba sob a diretoria do Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior.

À Prof. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula de Souza Pardo, coordenadora do programa de pós-graduação em Biologia Buco-Dental.

Aos amigos e ex-alunos Felipe Furlan, Júlio César Domingues, Luís Vaz de Lima Júnior e Mariana Sabino Bortolozzo agradeço pela colaboração durante o procedimento experimental.

Ao Professor Dr. Felipe B. Prado, funcionários e colegas da morfologia expresse os meus sinceros agradecimentos por todo o apoio científico e amizade em todos os momentos.

Ao Professor Francisco C. Groppo por dividir os seus conhecimentos estatísticos e de pesquisador, muito obrigado.

À Profa. Dr. Adriana Pertille agradeço pelas orientações, aconselhamentos e a amizade.

À Profa. Keila M. R. Duarte do Instituto de Zootecnia de Nova Odessa agradeço por todo o auxílio na análise bioquímica deste trabalho.

À Profa. Dra. Cíntia Pereira Machado Tabchoury pelo auxílio na análise bioquímica.

Ao professor Pedro Duarte Novaes expesso os meus sinceros agradecimentos pelo auxílio prestado.

Ao Prof. Dr. Francisco Haiter por disponibilizar o setor de radiologia para análises radiográficas.

As técnicas Eliene e Cidinha pelas orientações nos procedimentos de rotina histológicos. Muito obrigado.

“Aprenda como se você fosse viver para sempre. Viva como se você fosse morrer amanhã.”

Mahatma Gandhi

## RESUMO

O treinamento resistido (TR) é utilizado para prevenir e recuperar a sarcopenia e a osteoporose e, a terapia por Diodos Emissores de Luz - Light Emitting Diodes Therapy (LEDT) age como preventivo e curativo de lesões osteoneuromioarticulares. Essas premissas definiram como propósito desse estudo avaliar a associação da LED com o TR na prevenção da sarcopenia e da osteoporose em ratas ovariectomizadas. Setenta ratas Wistar foram divididas em sete grupos (n=10/grupo): controle-sedentária-ovariectomizada (CO); controle-sedentária sem-ovariectomizada (CS); exercitada-ovariectomizada (EOV); exercitada sem-ovariectomia (ES); LEDT ovariectomizada (LOV); LEDT exercitada ovariectomizada (LEO) e LEDT e exercitada sem-ovariectomia (LES). As ratas saltaram dentro de um cilindro com água aquecida (4 séries de 10 repetições, com 30 s de repouso entre as séries) e sobrecarga de 50% a 80% da massa corpórea, durante 12 semanas. A LEDT foi de  $850 \pm 10$  nm, 100 mW, 120 J/cm<sup>2</sup> e área do feixe de luz com 0,5 cm<sup>2</sup>, e irradiada em único ponto com contato direto no centro do trocanter maior do fêmur direito. Nos grupos EOV, LOV e LEO, em relação ao grupo CO, houve aumento do volume muscular no reto femoral direito indicado pela histomorfometria assim como no IGF-1, citocinas inflamatórias do tipo interleucina 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), nas análises laboratoriais. Na análise das citocinas, o grupo LEO apresentou aumento significativo (p<0,05) na concentração de interleucina-6 quando comparadas aos demais grupos e, reduziu significativamente a concentração de lactato sérico em relação ao grupo EOV enquanto carregava carga de 70% a 80% da massa corporal. A fração de volume e espessura do osso trabecular foram maiores no grupo EOV em relação ao CO (p < 0,05). A associação da LEDT ao exercício resistido colaborou para aumento do volume ósseo em ratas com 15 meses de idade sem-ovariectomia (p < 0,05). A fototerapia atenuou o declínio da função muscular durante o treinamento resistido de alta intensidade e preveniu a sarcopenia. A associação da fototerapia ao treinamento resistido em ratas sem ovariectomia aumentou volume ósseo em relação ao treinamento isolado. Nas ratas ovariectomizadas o exercício isolado ou associado a LEDT preveniram a osteopenia.

Palavras Chaves: Fototerapia, LEDT, osteopenia, ovariectomia, sarcopenia e treinamento resistido.

## ABSTRACT

Resistance training (RT) is used to prevent and recover sarcopenia and osteoporosis and Light Emitting Diode Therapy (LEDT) acts as a preventive and curative osteoneuromioarticulate injuries. The purpose of this study was evaluate the association of LEDT with TR to prevent sarcopenia and osteoporosis in depressed hormone rats. Seventy Wistar rats were divided into seven groups (n = 10): control-sedentary ovariectomized (CO), control-sedentary sham-ovariectomized (CS), resistance training ovariectomized (TO), resistance training sham-ovariectomized (TS), LEDT-sedentary ovariectomized (L), LEDT plus resistance training ovariectomized (LTO) and LEDT plus resistance training sham-ovariectomized (LTS). Rats jumped into a cylinder with warm water (4 sets of 10 times for 30 seconds rest between sets) and over 50% to 80% of body mass for 12 weeks. The LEDT was  $850 \pm 10$  nm, 100 mW,  $120 \text{ J/cm}^2$  and the area of the light beam with  $0.5 \text{ cm}^2$ , and irradiated in the center of the greater trochanter of the right femur. Groups EOV, LOV LEO comparet to the CO group has increase rectus femoris muscle volume indicated by histomorphometry as well as in IGF-1, inflammatory cytokines like interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha, in laboratory tests. The cytokines analysis, the LEO group showed significant increase ( $p < 0.05$ ) in the concentration of interleukin-6 compared to other groups and significantly reduced the serum concentration of lactate in relation to the EOV, while carrying a load of 70% to 80% of body mass. The volume fraction and trabecular thickness were higher in the EOV compared to CO group ( $p < 0.05$ ). The association of LEDT with resistance exercise contributed to the increase in bone volume in rats 15 months old non-ovariectomized ( $p < 0.05$ ). Phototherapy attenuate the decline in muscle function during high-intensity resistance training and prevented sarcopenia. The combination of phototherapy with resistance training in sham-ovariectomized rats increased bone volume in relation to training alone. In ovariectomized rats osteopenia was prevented by exercise.

**Keywords:** Phototherapy, LEDT, osteopenia, ovariectomy, sarcopenia and resistance training.

## Lista de Abreviatura e Siglas

ATP	<i>Adenosine Tri-phosphate</i> / Tri-fosfato de Adenosina
VO/VT	Fração de Volume Ósseo Trabecular
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> / Ácido Desoxirribonucléico
Ep.Tb	Espessura Trabecular
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i> / Fator de crescimento fibroblástico
IGF-1	<i>Insulin-like Growth Factor 1</i> / Fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1
IL-1	<i>Interleukin -1</i> / Interleucina-1
IL-6	<i>Interleukin -6</i> / Interleucina-6
J/cm <sup>2</sup>	Joule por centímetro ao quadrado
LASER	<i>Light Amplification Stimulation Emission Radiation</i> / Amplificação da Luz por Emissão Estimulada da Radiação
LEDT	<i>Light Emitting Diode Therapy</i> / Terapia por Diodo Emissor de Luz
LLLT	<i>Low Level Laser Therapy</i> / Laserterapia de Baixa Intensidade
mW	mili Watts
nm	nanometros
Sp.Tb	Separação Trabecular
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor-beta</i> / Fator de crescimento tumoral do tipo beta
TNF- $\alpha$	<i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i> / Fator alfa de necrose tumoral
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
USP	Universidade Estadual de São Paulo
VEGF	<i>Vascular Endothelial Groth Factor</i> / Fator de crescimento endotelial vascular

## SUMÁRIO

<b>I. Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>II. Capítulos</b>	
Capítulo 1. Phototherapy and Resistance Training Prevent Sarcopenia in Ovariectomized Rats.....	7
Capítulo 2. Fototerapia e treinamento resistido na prevenção da osteopenia em ratas .....	28
<b>III. Conclusões.....</b>	<b>44</b>
<b>IV. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>45</b>
<b>V. Anexos</b>	
Anexo 1. Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais.....	52
Anexo 2. Comprovante de submissão do artigo.....	53
<b>VI. Apêndice</b>	
1. Descrição do Procedimento Experimental.....	54

## I. INTRODUÇÃO

A evolução exponencial da população mundial foi acompanhada pelo aumento no número de idosos. Este fenômeno ocorreu com maior incidência em países desenvolvidos há cerca de cinco décadas e recentemente nos países em desenvolvimento, sendo o envelhecimento um dos maiores desafios contemporâneo da saúde pública (Jugdutt, 2012).

No início da década de 1980, a World Health Statistic Annuals (WHSAs) analisou que o Brasil em 1950 era o 16º país com maior contingente de idosos no mundo (2 milhões) e projetou que no ano de 2000 seria o sétimo (14 milhões) e sexto em 2025 (32 milhões) (Garrido e Menezes, 2002). Em um intervalo de 25 anos - 1980 a 2005, o crescimento total da população foi de 55,3% e o referente a idosos na faixa etária com mais de 60 anos superou 126,3% e acima de 80 anos aumentou 246% (Inouye et al., 2008).

O resultado parcial do Censo 2010, divulgado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) demonstra que o Brasil tem 18 milhões de pessoas acima de 65 anos, com crescimento na participação relativa da população de 4,8% em 1991, passando a 5,9% em 2000 e chegando a 7,4% em 2010. A expectativa de vida feminina passou de 73,9 anos em 1999 para 77 anos em 2009. Entre os homens, a elevação foi de 66,3 anos para 69,4 anos no mesmo período de análise.

Concomitante às modificações observadas na pirâmide populacional, às doenças próprias do envelhecimento se tornaram mais evidentes na sociedade. Estas se fundamentam na teoria bioquímica do envelhecimento (desgaste, acúmulo de toxinas, radicais livres e telomérica ou contagem programada) com referência na indução de lesões no DNA, células, tecidos e órgãos que conduzem ao declínio da capacidade funcional do idoso (Ahmed, Matsumura e Cristian 2005). Dentre as várias patologias do envelhecimento, a sarcopenia e osteoporose demonstram grande impacto na restrição funcional e podem determinar comorbidades no idoso (Silva et al., 2006).

### **Sarcopenia**

Desde que Rosenberg (1989) utilizou o termo sarcopenia, do grego: “sarco” (músculo) e penia (perda), os estudos procuram identificar as relações do envelhecimento com a redução da força e massa muscular (Rosenberg, 2011), cujo risco e perda da capacidade funcional é duas vezes maior em homens e três vezes em mulheres (Bauer e Sieber, 2008).

A sarcopenia tem início a partir dos 40 anos, com redução da massa muscular (8% por década) e força (10 a 15% da força por década) até os 70 anos (Malafarina et al., 2012). Estes percentuais promovem um forte impacto sobre o estado funcional, quedas e mortalidade nos idosos (Visser et al., 2011). Com isso a despesa de saúde com sarcopenia nos Estados Unidos da América foi estimada em 18 milhões de dólares no ano de 2000 (Janssen et al., 2004).

O envelhecimento provoca a perda progressiva e irreversível de neurônios, visto que os neurônios motores alfa diminuem a inervação nas fibras musculares, resultando na redução da coordenação, precisão motora e força muscular (Roubenoff, 2000). Isto favorece aumento do sedentarismo no idoso, principalmente em situações de repouso na cama, determinando a restrição na síntese proteica e diminuição da massa muscular (Kortebein et al., 2007). Além disso, a degeneração muscular durante o envelhecimento está associada com a disfunção mitocondrial devido as lesões no DNA mitocondrial (mtDNA) e ao sistema anormal de transporte de elétron com progressivo encurtamento de telômeros (Oliveira et al., 2010).

A gênese da sarcopenia também é influenciada pelo aumento circulante de citocinas inflamatórias do tipo fator alfa de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleucinas 1 e 6 (IL-1 e 6) no idoso (Thomas, 2010). Estas mudanças na função imune estimulam a produção progressiva de cortisol que reduzem a produção do hormônio do crescimento (GH), fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1 (IGF-1) e hormônios sexuais masculinos e femininos (Solerte et al., 2008).

As mulheres após a menopausa são duplamente prejudicadas na sarcopenia devido a redução dos estrogênios (estrone, estradiol e estriol) (Enns and Tiidus, 2008) e do eixo GH/IGF-1 (somatopausa) (Lamberts et al., 1997; Goldspink, 2007). Nesta situação, diante da redução na massa e força muscular é necessária atenção aos cuidados preventivos e curativos para evitar as possíveis comorbidades associadas à sarcopenia na mulher.

## **Osteoporose**

A osteoporose é um distúrbio osteometabólico caracterizado pela diminuição de massa óssea e desarranjo de sua microarquitetura, conduzindo à fragilidade do osso e aumento do risco de fraturas (Christiansen, 1995). A Organização Mundial da Saúde (OMS) definiu osteoporose como todos os casos cujos valores na absormetria de um feixe puntiforme de radiação gama, emitidos por uma fonte externa e com dois níveis de

energia, apresentem redução estatisticamente significativa de mais de 2,5 desvios padrões em relação a uma tabela de normalidade. Caso ocorram medidas que matematicamente apresentem redução situada entre 0 (zero) e até 2,5 (dois e meio desvios padrões) é diagnosticado osteopenia, sendo considerada a relação de transição na redução da massa óssea de um indivíduo de massa óssea normal para um osteoporótico (Ianetta, 2006).

Os dados epidemiológicos dos estados membros da União Européia (1998), demonstram aumento no número de idosos com 80 anos e proporcional aumento na ocorrência das fraturas osteoporóticas. A incidência nas fraturas de quadril, associadas à redução da massa óssea, passará de 414,1 milhões no ano de 2000 para 972 milhões em 2050, representando um aumento de 134,0% (Lanzillotti et al., 2003). Nos Estados Unidos da América 6 milhões de mulheres e 2 milhões de homens são afetados pela osteoporose e, quase 14 bilhões de dólares são gastos por ano para tratamento das fraturas ósseas que ocorrem frequentemente nestes grupos (Banu et al., 2012).

O risco de osteoporose depende tanto da massa óssea máxima alcançada durante a idade adulta jovem quanto do índice de perda da massa nas épocas posteriores. O pico de massa óssea geralmente não é alcançado antes de 30 anos e o estilo de vida é um importante determinante da probabilidade de desenvolver a osteoporose mais tarde. Dentre os fatores de risco está a ausência de atividade física regular, bem como fatores genéticos e relativos à dieta (Hallberg et al., 1992).

Durante o processo de envelhecimento há diminuição da síntese de vitamina D pela reduzida função renal e hepática que resulta em maior excreção de cálcio, além da redução da função muscular que diminui a ação de cargas mecânicas no sistema ósseo. Ainda, o declínio dos estrogênios na mulher pós-menopausa provoca maior perda óssea comparada aos homens (Ianetta, 2006). Com isto, na mulher há redução da massa óssea acima de 1% ao ano, sendo que há casos em que a redução chega até 5%, tendo em vista que cinco anos após a menopausa a perda poderá superar 25%, caracterizando-se como osteoporose pós-menopausa. Devido à ação dos músculos sobre o osso, a porcentagem de restrição da massa muscular será igual ou até maior a porcentagem de limitação da massa óssea (Russo, 2001).

É reconhecido que a deficiência ou a ausência dos estrogênios é precursora da osteoporose pós-menopausa (St.Pierre et al., 1999). Entretanto, o mecanismo de redução na massa óssea na mulher é multifatorial, podendo incluir hiperparatireoidismo, prejuízos da função osteoblástica e aumento da osteoclastogênese devido aumento de

citocinas inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6) ou deficiências dos fatores de crescimento sistêmicos como fatores de crescimento semelhante à insulina do tipo 1 (IGF-1), fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de transformação do crescimento (TGF- $\beta$ ) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Riggs, 1998).

### **Treinamento resistido de alta intensidade na sarcopenia e osteoporose**

O exercício físico transmite tensão ao esqueleto pelo impacto direto (compressão) e pela contração muscular (tração). A falta de atividade física adequada pode influenciar negativamente o pico de massa óssea e muscular, havendo a necessidade de incentivo à prática esportiva para mulheres em todas as idades (Prince et al., 1995).

O treinamento de força é um importante meio de prevenir a redução da massa óssea (Hakkinen et al., 2001) e muscular (Karagounis et al., 2010), onde desencadeia uma série de respostas no organismo. O exercício estimula a produção do hormônio de crescimento (GH) que induz o fígado a liberar IGF-1, com isso há aumento anabólico sobre o tecido ósseo e muscular (Adamo and Farrar, 2006; Igwebuike et al., 2008; Perrini et al., 2010). Deste modo, devido a elevação do volume muscular, ocorre maior dinâmica da estabilidade das articulações, melhor rendimento das atividades de vida diária e conseqüentemente redução dos riscos de quedas e fraturas osteoporóticas. (Martinelli et al., 2002).

O estresse mecânico do treinamento resistido com intensidade superior a 20% de uma repetição máxima do exercício pode promover restrição do fluxo sanguíneo devido ao aumento da tensão muscular (Petrofsky and Hendershot, 1984), provocando microlesões musculares e aumento de IL-1, IL-6 e TNF-  $\alpha$  (de Salles et al., 2010). As microlesões são importantes no processo de reparo e regeneração muscular devido à fusão das células satélites musculares para induzir a síntese proteica e a recuperação do tecido lesado (Hawke e Garry, 2001).

Neste sentido o treinamento resistido no idoso deve ser aplicado com muita atenção para evitar sobrecarga física. A frequência de realização do exercício físico de três vezes por semana com intervalo de 48 horas entre os dias de treinamento tem demonstrado efeitos positivos para síntese proteica na recuperação dos sinais inflamatórios após exercícios com pesos (Karagounis et al., 2010). A sobrecarga funcional excessiva com treinamento de força pode diminuir a síntese proteica (Seene et al., 2004), com aumento na taxa de catabolismo/anabolismo e redução no volume

muscular. Diante da hipotrofia muscular existe menor tensão óssea, com redução de estímulos aos osteócitos para produção da matriz óssea (Lirani-Galvão e Lazaretti-Castro, 2010).

Outra variável é a evolução no volume e intensidade de treinamento para a exposição dos osteócitos à tensão mecânica, suprimindo a produção de esclerostina, com aumento no efeito osteogênico pela via de sinalização Wnt (Tu et al., 2012). Estas sinalizações ocorrem por efeito piezoelétrico, que transforma sinal mecânico em elétrico para estimular a produção de osteoblastos e colágeno (Lirani-Galvão e Lazaretti-Castro, 2010).

### **Fototerapia de baixa intensidade associada ao exercício físico: Biomodulação**

A medicina baseada em evidências está demonstrando que o exercício físico é uma das alternativas para retardar o envelhecimento e aprimorar a qualidade de vida. Porém, este processo deve ser realizado com cuidados para evitar lesões nos sistemas “ostoneuromioarticular”. Sendo assim, a terapia por luz de baixa intensidade surge como um agente fotobiomodulador na atividade celular com o objetivo de otimizar o anabolismo (Shimizu et al., 2007), melhorar o rendimento físico (Leal Jr et al., 2009), além de prevenir e recuperar funcionalmente as sobrecargas no músculo-esquelético pós-exercício (Sussai et al., 2010).

O Laser de baixa intensidade (LLLT) é a fonte de luz convencionalmente utilizada para o tratamento preventivo e curativo de lesões osteoneuromioarticulares (Muniz-Renno et al., 2006; Cressoni et al., 2010; Rizzi et al., 2010; Saad et al., 2010). Há evidências científicas dos efeitos biomoduladores do laser na atividade mitocondrial (Karu, 2003), produção de creatina-quinase (CK) (Lopes-Martins et al., 2006), citocinas (IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ ) (Mesquita-Ferrari et al., 2011; Pires et al., 2011), fatores de crescimento do tipo IGF-1, FGF e VEGF (Shimizu et al., 2007; Saygun et al., 2008; Nakano et al., 2009) e aumento do fluxo sanguíneo para o tecido irradiado (Schindl 1998).

A maior diferença da LLLT em relação à luz emitida pela LEDT (Terapia por Diodo emissor de luz) é a ausência de coerência e colimação (Bagnato, 2002). Karu (2003) relata que a coerência é perdida ao longo dos primeiros extratos da pele, antes que produza a absorção da luz pelas moléculas fotorreceptoras especializadas (melanina, porfirina, citocromo c oxidase e hemoglobina). Por outro lado, alguns estudos afirmam que a coerência do laser é de fundamental importância para a

promoção dos efeitos terapêuticos proporcionados pela luz (Pöntinen *et al.*, 1996). Atualmente a LEDT é uma forma alternativa a LLLT, por demonstrar respostas fisiológicas semelhantes, boa relação custo-benefício e permite atingir uma área de irradiação maior (Whelan *et al.*, 2001; Vink *et al.*, 2003; Douris *et al.*, 2006; Corazza *et al.*, 2007; Leal Júnior *et al.*, 2009; Leal Júnior *et al.*, 2010).

Durante o envelhecimento, o músculo se torna mais suscetível a lesões oxidativas devido ao desequilíbrio entre produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e capacidade antioxidante, isto ocorre principalmente durante o exercício físico devido a disfunção mitocondrial (Lambertucci *et al.*, 2007). Este fenômeno pode resultar em inflamação, dor tardia após o exercício e degeneração muscular (Aoi *et al.*, 2004). Entretanto, a fototerapia tem ação no reparo do DNA mitocondrial (Karu, 1999) e efeitos antioxidante (Kim *et al.*, 2000), anti-inflamatório (Castano *et al.*, 2007) e analgésico (Whelan *et al.*, 2001) sendo assim, o exercício físico pode ser realizado com maior rendimento físico no idoso. Neste contexto, Paolillo *et al.* (2011) associaram a fototerapia com o exercício aeróbico na esteira ergométrica em mulheres na pós-menopausa, obtendo melhora da capacidade aeróbia, aumento da força do quadríceps e redução da fadiga.

Devido à ausência de informações sobre a ação da LEDT associada ao treinamento resistido no envelhecimento ósseo e muscular, o presente estudo teve como objetivo analisar a associação da LEDT ao treinamento resistido na prevenção da sarcopenia e osteoporose.

Diante do exposto, um primeiro estudo foi realizado para avaliar se a radiação infravermelha emitida por LEDs após o treinamento resistido em ratas ovariectomizadas promove efeitos preventivos na atrofia muscular. Foram analisados o volume muscular, IGF-1, mediadores inflamatórios pelas concentrações musculares de TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e os níveis sanguíneos de lactato.

Em um segundo estudo, o tecido ósseo foi analisado para verificar os efeitos preventivos da osteopenia de ratas ovariectomizadas ou não-ovariectomizadas na associação da fototerapia ao treinamento resistido, tendo como parâmetro de análises a fração de volume ósseo, a espessura e a separação trabecular, além do número de osteoclastos.

## **CAPÍTULO 1**

### **PHOTOTHERAPY AND RESISTANCE TRAINING PREVENT SARCOPENIA IN OVARECTOMIZED RATS**

Adalberto Vieira Corazza, Department of Morphology, Piracicaba Dental School, University of Campinas - UNICAMP. [avcorazza@gmail.com](mailto:avcorazza@gmail.com) University of Campinas - UNICAMP: Av. Limeira, 901 – CEP 13414-903, Piracicaba, SP, Brazil - phone and Fax: +55 19 2106-5332 .

Fernanda Rossi Paolillo, Optics Group from Physics Institute of São Carlos (IFSC), University of São Paulo (USP), Brazil and Biotechnology Program, Federal University of São Carlos (UFSCar), Brazil. [fer.nanda.rp@hotmail.com](mailto:fer.nanda.rp@hotmail.com) University of São Paulo (USP): Av. Trabalhador São-carlense, 400 – Centro, CEP 13560-970, São Carlos, SP, Brazil - phone and Fax: +55 16 33739810.

Francisco Carlos Groppo, Department of Pharmacology, Piracicaba Dental School, University of Campinas – UNICAMP. [fcgroppo@fop.unicamp.br](mailto:fcgroppo@fop.unicamp.br). University of Campinas - UNICAMP: Av. Limeira, 901 – CEP 13414-903, Piracicaba, SP, Brazil - phone and Fax: +55 19 2106-5310.

Fernanda Klein Marcondes, Department of Physiological Sciences, Piracicaba Dental School, University of Campinas – UNICAMP. [fklein@fop.unicamp.br](mailto:fklein@fop.unicamp.br). University of Campinas – UNICAMP: Av. Limeira, 901 – CEP 13414-903, Piracicaba, SP, Brazil - Telephone and Fax: +55 19 2106-5380.

Vanderlei Salvador Bagnato, Optics Group from Physics Institute of São Carlos (IFSC), University of São Paulo (USP), Brazil. [vander@ifsc.usp.br](mailto:vander@ifsc.usp.br) University of São Paulo (USP): Av. Trabalhador São-carlense, 400 – Centro, CEP 13560-970, São Carlos, SP, Brazil - phone and Fax: +55 16 33739810.

Paulo Henrique Ferreira Caria, Department of Morphology, Piracicaba Dental School, University of Campinas (UNICAMP). [phcaria@fop.unicamp.br](mailto:phcaria@fop.unicamp.br) University of Campinas (UNICAMP): Av. Limeira, 901 – CEP 13414-903, Piracicaba, SP, Brazil - phone: +55 19 2106-5332.

## **Abstract**

Sarcopenia caused by reduced hormone levels and motor activity in older women favors joint instability and falls. In this study, we examined whether a resistance training protocol associated with light emitting diode therapy (LEDT) was able to prevent the muscle atrophy and inflammatory effects caused by lower levels of estrogen. Forty female Wistar rats (12 months old, 295-330 g) were bilaterally ovariectomized and divided into four groups (n=10 per group): control-sedentary (C), resistance training (T), LEDT – sedentary (L) and LEDT plus resistance training (LT). Rats were trained to jump in a container with warm water (four sets of 10 repetitions with a 30 s rest between sets) while carrying a load equivalent to 50-80% of their body mass strapped to their back. Training was undertaken three days per week for 12 weeks. The exercise protocol and phototherapy were initiated on day 12 after surgery. The LED device (850 nm, 100 mW, 120 J/cm<sup>2</sup> over an illuminated area of 0.5 cm<sup>2</sup>) was used either alone or after resistance training and performed punctually, through contact mode in one point (10 minutes). The region irradiated was the center of the greater trochanter of the right femur and the middle third of the rectus femoris muscle was subsequently analyzed histomorphometrically by using a stereological method. Blood lactate concentrations were monitored with a lactate analyzer. There were significant increases in the volume density of the rectus femoris muscle of the treated groups (T, LT and L) compared to the control group. There were also significant increases in the concentrations of IGF-1, IL-1 and TNF- $\alpha$  in the muscles of the treated groups. Animals in the LT group showed a significant elevation in IL-6 concentration compared to groups T, L and C. When rats were trained with overloads of: 70-80% of their body mass the post-training lactate concentration was significantly lower in the LT group compared to the T group, indicating photobiomodulation in the former group. These findings suggest that resistance training and LEDT can prevent sarcopenia when the techniques are applied independently or together.

**Keywords:** LEDT; ovariectomy; phototherapy; resistance training; sarcopenia.

## 1. Introduction

Menopause causes metabolic changes in women that are related to a reduction in estrogen production. Estrogen decreases the inflammatory response (Stupika and Tiidus, 2001) and accelerates muscle healing, with the proliferation and activation of muscle fiber satellite cells (Enns and Tiidus, 2008) and expression of the insulin-like growth factor 1 (IGF-1) gene (Goldspink, 2007).

IGF-1 plays a vital role in regulating somatic growth and cellular proliferation, thereby contributing to human longevity (Yang et al., 2005). In aging, somatopause is associated with reduced activity of the hypothalamic-pituitary (GH-IGF) system that decreases growth hormone (GH) production by ~14% per decade after midlife (Lamberts, 1997). This hormone deficit decreases the density of muscle fibers and leads to sarcopenia, a condition characterized by the loss of muscle mass and strength (Marzetti and Leeuwenburg, 2006).

Resistance training (RT) is recognized as a means of preventing and treating sarcopenia in postmenopausal women (Kraemer et al., 1999). However, further studies are required to evaluate the influence of non-invasive physical procedures on the post-exercise repair of muscle microlesions in order to improve muscle hypertrophy in elderly women submitted to resistance training (Waters et al., 2010).

Phototherapy is one of the therapeutic resources used to optimize the physical performance of athletes and the elderly (Baroni et al., 2010; Leal Júnior et al., 2009; Paolillo et al., 2011). Low-level laser therapy (LLLT) is a form of light treatment used to prevent and treat bone, muscle, nerve and joint injuries (Cressoni et al., 2010; Muniz Renno et al., 2006; Rizzi et al., 2010; Wong-Riley et al., 2001). There is evidence that LLLT biomodulates mitochondrial activity (Karu, 2005), creatine kinase (CK) release (Lopes-Martins et al., 2006) and the production of cytokines such as tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin 1 and 6 (IL-1 and IL-6) (Pires et al., 2011; Mesquita-Ferrari et al., 2011) and growth factors such as IGF-1, fibroblast growth factor (FGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) (Nakano et al., 2009; Saygun et al., 2008; Shimizu et al., 2007). Irradiation also increases the local blood flow (Schindl, 1998). An alternative to LLLT is light emitting diode therapy (LEDT), which yields similar results and has an excellent cost-benefit ratio (Corazza et al., 2007; Douris et al., 2006; Whelan et al., 2001).

Given the lack of information on the action of LEDT associated with resistance training on the effects of aging, the aim of this study was to assess the ability of LEDT

to prevent muscle atrophy in ovariectomized rats when used either alone or in association with resistance training. The parameters considered were muscle volume, the muscle concentrations of IGF-1 and inflammatory mediators (IL-1, IL-6 and TNF- $\alpha$ ) and blood lactate levels.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Animals**

Forty female Wistar rats (12 months old, 295-330 g) were housed in plastic cages (five rats per cage) in a temperature-controlled room ( $22 \pm 2$  °C), with lights on from 6 a.m. to 6 p.m. The experiments were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation (CEUA/UNICAMP, protocol number 2115-1), and were done in accordance with the ethical guidelines of the Brazilian Society of Laboratory Animal Science (SBCAL).

### **2.2. Ovariectomy**

Bilateral ovariectomy was done via translumbar incisions under ketamine/xylazine anesthesia (47.5 mg/kg and 12 mg/kg, respectively, i.m.). The uterine tubes were ligated (catgut 4.0) and the ovaries were removed. The efficiency of the surgical procedure was verified by post-mortem dissection to confirm uterine tube atrophy. The rats were randomly divided into four groups (n=10 per group): control-sedentary (C), resistance training (T), LEDT-sedentary (L) and LEDT plus resistance training (LT).

### **2.3. LED therapy**

The prototype LED device used was developed in the Physics Institute of the University of São Paulo (USP), São Carlos, SP, Brazil. The device was operated at 100 mW using a continuous spectral band of  $850 \pm 10$  nm and with 200 mW/cm<sup>2</sup> irradiation over an illuminated area of 0.5 cm<sup>2</sup>. Phototherapy was started post-operatively on day 12. The fluence of 120 J/cm<sup>2</sup> (Muniz-Renno et al., 2006) was performed punctually, through contact mode in one point in the center of the greater trochanter of the right femur for 10 min every 48 h over a 12-week period. The center of the greater trochanter was located by manual palpation and was relabeled every week. In the LT group, phototherapy was applied immediately after training.

## 2.4. Training protocol

For high-intensity resistance training, the rats underwent weightlifting sessions every 48 h over a 12-week period in a container (75 cm high, 30 cm diameter) with water at  $30 \pm 2$  °C. For training, a small backpack filled with lead balls corresponding to 50-80% of the body mass was strapped to the back of each animal. Prior to the exercise sessions, the rats underwent adaptation (in training groups) during which they were subjected to an increasing number of exercise sets (2-4) and repetitions (5-10) (protocol adapted from Cunha et al.,2005) in water every other day for one week (a total of three days). The animals were allowed to rest for 30 s between each set of exercises.

The body mass of the animals was measured preoperatively (12 days before RT), after adaptation (one week) and then on the last day of each of the 12 weeks of resistance training. The modified protocol of Hornberger and Farrar (2004) was used with load weights that were appropriate for the training cycle. The load weight was proportional to each rat's body mass (Fig. 1) and increased from 50% of the body mass (weeks 1 and 2) to 60% (weeks 3-6), 70% (weeks 7-10) and 80% (weeks 11 and 12). The water column height started at 30 cm (week 1) and was increased to 35 cm (week 2) and 40 cm (week 3 onwards). The rats were killed 24 h after the end of the protocol and the rectus femoris muscle was removed for biochemical and histological analyses.

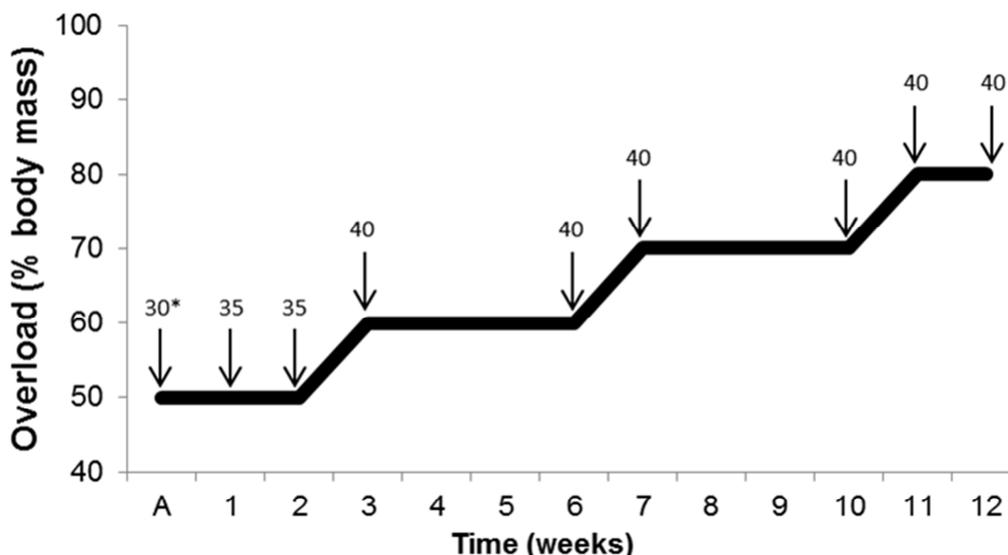


Figure 1: Increase in exercise overload (expressed as a percentage of body mass) during resistance training. The training protocol lasted 12 weeks and was preceded by a period of adaptation (A). (\*) Water level (in cm) in the container used to train the rats.

## **2.5. Parameters evaluated**

### **2.5.1. Histomorphometry**

The middle third of the right rectus femoris muscle was removed and placed in 10% formaldehyde solution for 24 h. The tissue samples were embedded in paraffin blocks and cut into 5- $\mu$ m sections, stained with hematoxylin and eosin and examined by light microscopy (Axioskop 2 Plus, Zeiss, Jena, Germany) coupled to a digital camera (DFC280, Leica, Germany). The images (x20 magnification) were processed using IM50 software (Leica). The muscle volume fractions were determined according to the stereological principles of Weibel et al., (1966) using an image analysis system (Image-Pro, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) and a digital grid with 667 intersections, with one central and two marginal fields in relation to the transverse axis of the middle third of the muscle.

### **2.5.2. IGF-1 and cytokines**

Muscle samples were collected from the right thigh (middle third of the rectus femoris muscle) 24 h after the final training session. The muscles were frozen and stored at -80 °C. Immediately before analysis, the samples were defrosted and cut into cubes ( $\pm$ 1.52 g), with one cube from each animal being macerated in liquid nitrogen and then resuspended in 5 mL of phosphate buffer solution (PBS). The samples were assayed together in triplicate in the tests described below.

#### **2.5.2.1. IGF-1**

The IGF-1 concentration in rectus femoris muscle was measured using a quantitative, high sensitivity (range: 62-6000 pg/mL) ELISA kit (Peprotech Inc., Rock Hill, NJ, USA), according to the manufacturer's instructions.

#### **2.5.2.2. IL-1, IL-6, and TNF- $\alpha$**

Muscle cytokine concentrations were assayed using ELISA kits (Peprotech Inc.), with the absorbance being measured at 450 nm in a microplate reader (ELX 800, Bio-Tek Instruments, Winooski, Vermont, USA). The concentration ranges for the sandwich ELISAs were 16-1000 pg/mL, 62-8000 pg/mL and 63-3000 pg/mL for IL-1, IL-6 and TNF- $\alpha$ , respectively.

### **2.5.3. Lactate concentration**

Blood samples (25  $\mu$ L) were collected immediately before (pre-training) and after (pos-training) resistance training by puncture at the tail tip, at the following times: preoperatively (12 days before resistance training), after adaptation and then on the last day of the 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, 4<sup>th</sup>, 6<sup>th</sup>, 10<sup>th</sup> and 12<sup>th</sup> weeks of resistance training. The lactate

concentrations ( $\text{mmol.L}^{-1}$ ) were determined using a lactate analyzer (Model 1500 Sport Lactate Analyzer, Yellow Springs Instrument Co., Yellow Springs, OH, USA).

#### 2.5.4. Statistical analysis

The Levene and Shapiro-Wilk tests were used to analyze the data variance and distribution, respectively. The Friedman test was used to analyze the changes in lactate concentration over time. The Wilcoxon test was used to compare the lactate concentrations in the pre- and post-training periods. The Mann-Whitney test was used to compare groups T and LT over time and the Kruskal-Wallis test was used to compare the lactate, cytokine, IGF-1 and muscle volume fraction data of the four groups at each time point. BioEstat 5.0 software (Fundação Mamirauá, BÉlem, PA, Brazil) was used for all statistical analyses, with the level of significance set at 5%.

### 3. Results

#### 3.1. Muscle volume fraction

After twelve weeks, treated groups showed a significant increase (Kruskal-Wallis test,  $p < 0.05$ ) in the volume fraction of the rectus femoris muscle compared to the control group (Fig. 2), with increases of  $74.1 \pm 5.1\%$ ,  $68.1 \pm 19.7\%$  and  $68.2 \pm 11.5\%$ , for groups L, T and LT compared to group C ( $60.4 \pm 5.5\%$ ).

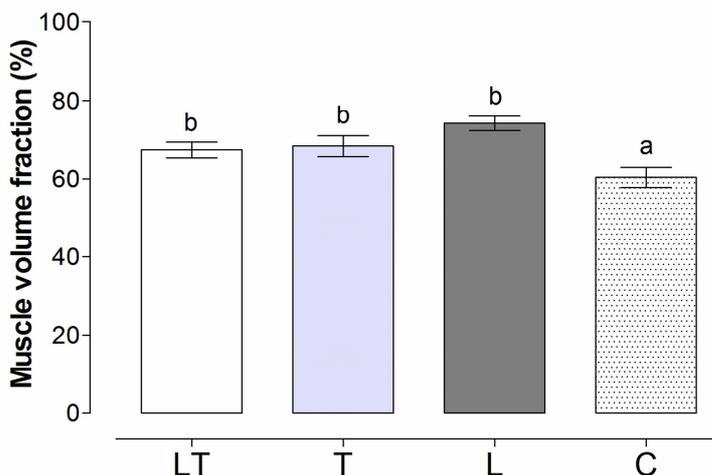


Figure 2. Total muscle volume fraction in the four groups of rats studied. C: control-sedentary, L: LEDT-sedentary, LT: Resistance training and LEDT, T: Resistance training. Columns with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).

### 3.2. IGF-1

There was a significant increase (Kruskal-Wallis test,  $p < 0.05$ ) in the muscle IGF-1 concentration (median  $\pm$  interquartile range) in the LT ( $3.7 \pm 0.19$  ng/g), T ( $3.8 \pm 0.84$  ng/g) and L ( $3.66 \pm 0.67$  ng/g) groups compared to group C ( $1.35 \pm 0.48$  ng/g) (Fig. 3).

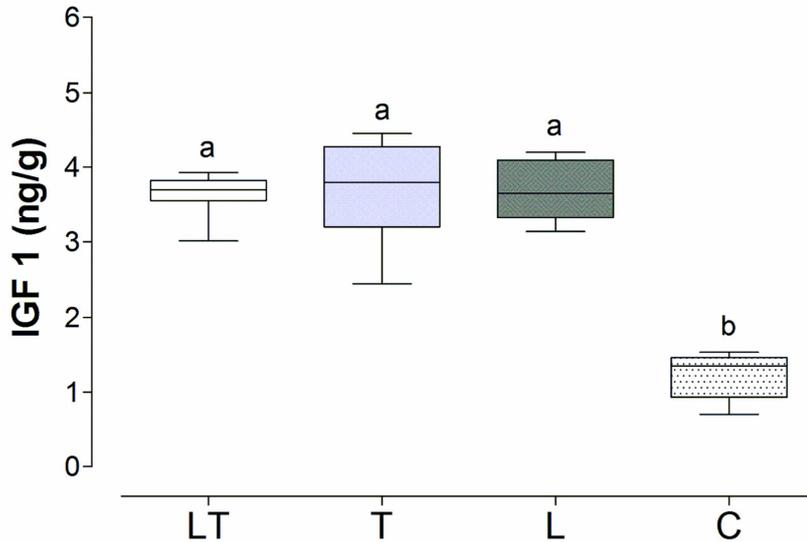


Figure 3. Muscle IGF-1 concentrations in rats after 12 weeks of resistance training. C: control-sedentary, L: LEDT-sedentary, LT: Resistance training and LEDT, T: Resistance training. Columns with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).

### 3.3. Cytokines

The muscle IL-1 concentrations (median  $\pm$  interquartile range) of the LT ( $1.52 \pm 0.06$  ng/g), T ( $1.95 \pm 0.69$  ng/g) and L ( $2.02 \pm 1.53$  ng/g) groups were significantly higher (Kruskal-Wallis test,  $p < 0.05$ ) than in group C ( $0.64 \pm 0.22$  ng/g) (Fig. 4). The muscle TNF- $\alpha$  concentrations in the LT ( $2.68 \pm 0.14$  ng/g), T ( $4.33 \pm 0.31$  ng/g) and L ( $4.58 \pm 0.36$  ng/g) groups were also significantly greater than in group C ( $0.17 \pm 0.43$  ng/g), although the concentration in the LT group was significantly lower than in groups T and L (Fig. 5). The IL-6 concentration in muscles of the LT group ( $4.91 \pm 0.02$  ng/g) was significantly greater than in groups T ( $1.34 \pm 0.59$  ng/g), L ( $2.69 \pm 1.74$  ng/g) and C ( $2.26 \pm 2.72$  ng/g) (Fig. 6).

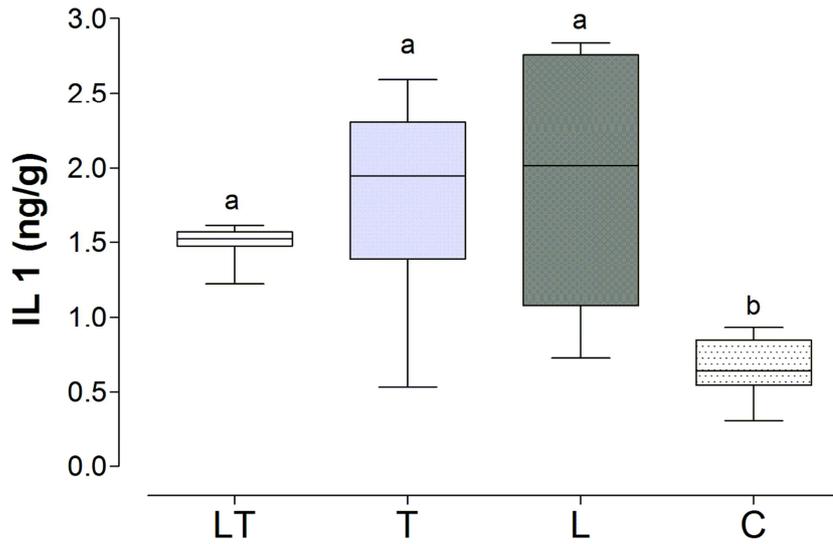


Figure 4. Muscle IL-1 concentrations in rats after 12 weeks of resistance training. C: control-sedentary, L: LEDT-sedentary, LT: Resistance training and LEDT, T: Resistance training. Columns with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).

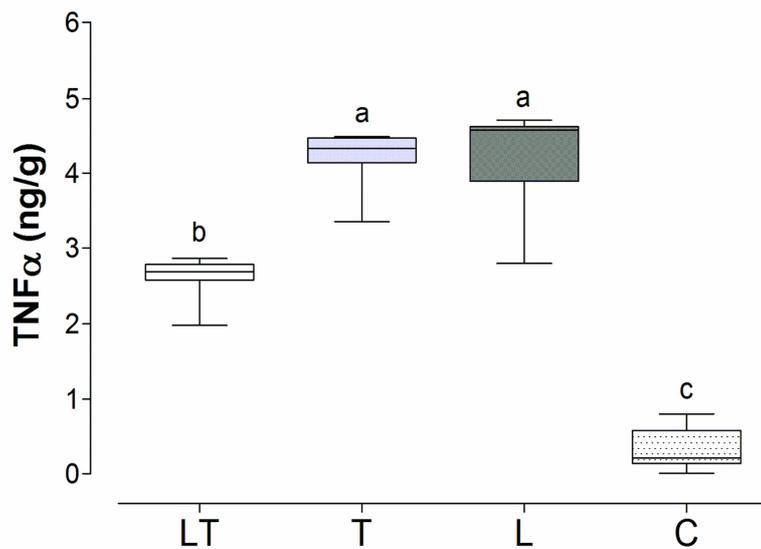


Figure 5. Muscle TNF- $\alpha$  concentrations in rats after 12 weeks of resistance training. C: control-sedentary, L: LEDT-sedentary, LT: Resistance training and LEDT, T: Resistance training. Columns with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).

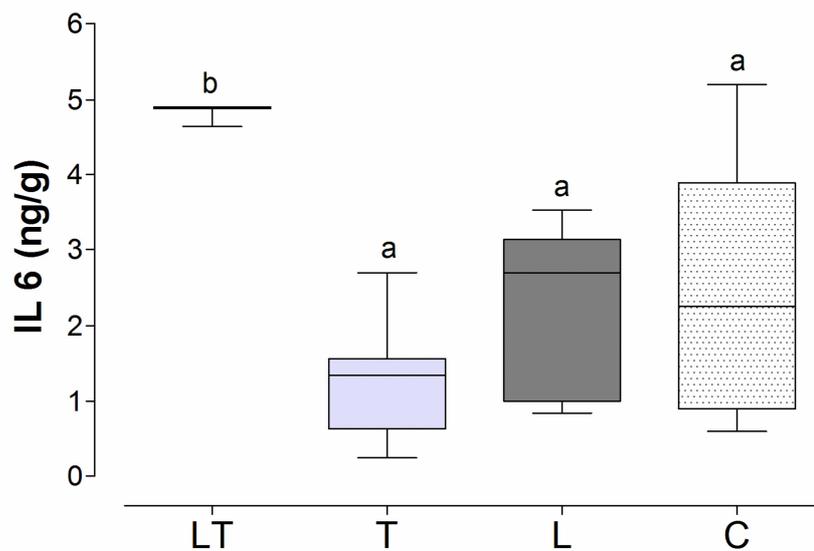


Figure 6. Muscle IL-6 concentrations in rats after 12 weeks of resistance training. C: control-sedentary, L: LEDT-sedentary, LT: Resistance training and LEDT, T: Resistance training. Columns with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).

### 3.4. Lactate concentration

#### 3.4.1. Pre-training

In the pre-ovariectomy period, the lactate concentrations of the LT ( $1.88 \pm 0.25$  mmol.L<sup>-1</sup>) and L ( $1.62 \pm 0.19$  mmol.L<sup>-1</sup>) groups were significantly different from those of the T ( $1.28 \pm 0.35$  mmol.L<sup>-1</sup>) and C ( $1.36 \pm 0.31$  mmol.L<sup>-1</sup>) groups (Fig. 7). In the L group there was a significant decrease in the 4<sup>th</sup> week ( $0.94 \pm 0.21$  mmol.L<sup>-1</sup>) compared to groups LT ( $1.37 \pm 0.29$  mmol.L<sup>-1</sup>), T ( $1.2 \pm 0.27$  mmol.L<sup>-1</sup>) and C ( $1.22 \pm 0.32$  mmol.L<sup>-1</sup>). Between weeks 6 and 12, there were no significant differences between the lactate concentrations of groups L and C, while group C showed no significant variation in lactate levels over time. At the end of the experiment, there were significant increases in the lactate concentrations of the T ( $1.95 \pm 0.37$  mmol.L<sup>-1</sup>) and LT ( $1.75 \pm 0.28$  mmol.L<sup>-1</sup>) groups compared to groups C ( $1.28 \pm 0.21$  mmol.L<sup>-1</sup>) and L ( $1.13 \pm 0.27$  mmol.L<sup>-1</sup>) (Fig. 7).

#### 3.4.2. Post-training

In the adaptation period, the lactate concentrations (at rest) of the T (between  $1.5 \pm 0.27$  and  $9.58 \pm 0.87$  mmol.L<sup>-1</sup>) and LT (between  $1.56 \pm 0.33$  and  $10.13 \pm 1.22$  mmol.L<sup>-1</sup>) groups increased significantly (Wilcoxon test,  $p < 0.05$ ) after jumping

exercises with a load. Between weeks 1 and 6 of training there were no significant differences in the lactate levels measured after exercise. Comparison of the LT and T groups revealed significant differences (Mann-Whitney test,  $p < 0.05$ ) in the post-training lactate concentrations in week 10 for groups LT ( $5.48 \pm 0.88 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) and T ( $7.96 \pm 2.2 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) and week 12 for groups LT ( $10.14 \pm 0.95 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) and T ( $17.04 \pm 2.23 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) (Fig. 7).

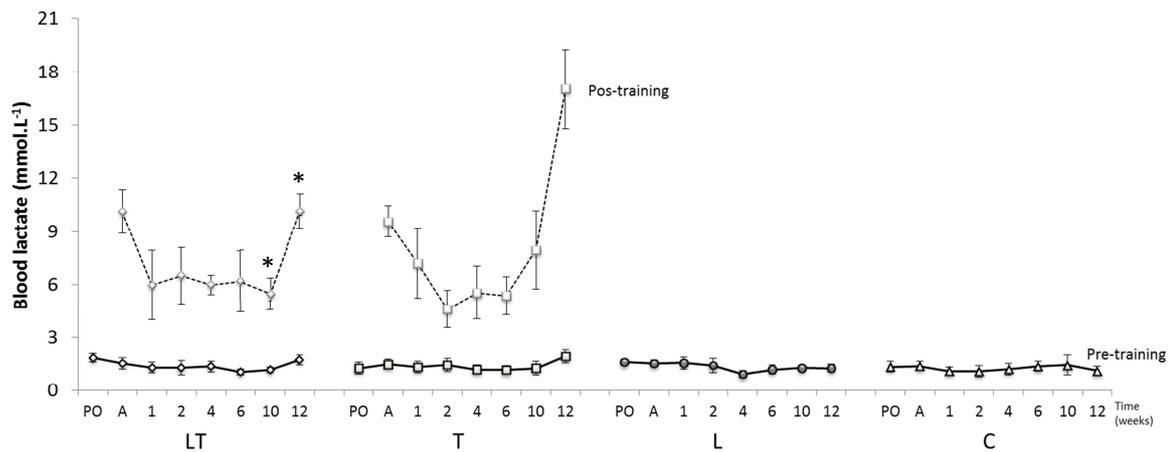


Figure 7. Blood lactate concentrations in rats at various intervals during the experiment. The intervals studied were the pre-ovariectomy period (12 days before resistance training), the adaptation period and the last day of the 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, 4<sup>th</sup>, 6<sup>th</sup>, 10<sup>th</sup> and 12<sup>th</sup> weeks of resistance training. C: control-sedentary, L: LEDT-sedentary, LT: Resistance training and LEDT, T: Resistance training. Solid line: pre-training period, dashed line: post-training period. (\*) Significant difference between the LT and T groups ( $p < 0.05$ ).

#### 4. Discussion

Histomorphometric analysis showed that light therapy mitigated muscle hypotrophy in ovariectomized rats. Aging accelerates the loss of myocytes via apoptosis (Marzetti and Leewenburgh, 2006) and low-intensity light therapy enhances the survival and number of satellite cells (Shefer et al., 2002). Phototherapy can help to prevent sarcopenia by enhancing mitochondrial activity and ATP synthesis (Karu, 2005) and by increasing the intracellular concentrations of cytoprotective heat shock proteins (HSP-70i) (reviewed in Oron, 2006). Phototherapy also has antioxidant (Kim et al., 2000), anti-inflammatory (Mesquita-Ferrari et al., 2011; Pires et al., 2011) and angiogenic (Corazza et al., 2009) activities, in addition to enhancing blood flow (Schindl et al., 1998).

The greater IGF-1 concentration of the L group compared to control sedentary rats (group C) indicated the prevention of sarcopenia, possibly through the stimulation of pathways in the hormonal IGF-1/GH axis, as reported by Florini et al., (1996), but without the influence of estrogen in the production of IGF-1 (Stupka and Tiidus, 2001). IGF-1 production stimulated by LLLT has also been observed in cultured fibroblasts (Saygun et al.,2008) and osteoblasts (Shimizu et al.,2007). However, in a study *in vivo*, LLLT (at 830 nm) did not stimulate IGF-1 production in the gastrocnemius muscle of rats irradiated with a fluence of 0.6 J/cm<sup>2</sup> (per point) at a total of 60 points (Nakano et al.,2008). This finding suggests that LEDT with an energy density of 120 J/cm<sup>2</sup> applied at a single point, as used here, was highly effective in stimulating IGF-1 production.

The photobiomodulation of anti-atrophic effects and the enhanced IGF-1 production seen in skeletal muscle may have been related to the physical conditions used, especially the wavelength of light. Conflicting results have been obtained for motor activity in response to light therapy with the red and infrared spectral ranges (Lopes-Martins et al., 2006; Lakyová et al., 2010). However, infrared light produces a greater reduction in fatigue, as assessed by changes in lactate dehydrogenase (LDH), blood lactate and CK levels, as well as biomechanical parameters (Baroni et al., 2010; Leal Júnior et al., 2009, 2010; Ferraresi et al., 2011; Paolillo et al., 2011). In agreement with this evidence, the results of the present study support the theory that infrared phototherapy can reach deeper tissues and promote better therapeutic responses in relation of red wavelength (Tunér and Hode, 2002). This greater penetration is particularly important in aging since there is an increase in the barrier of adipose tissue adjacent to the muscles (Leite et al., 2010).

As shown here, the TNF- $\alpha$  and IL-1 concentrations were higher in the L group than in sedentary group C. Ahtiainen et al., (2011) suggested that menopausal inflammatory responses restrict IGF-1 concentration in skeletal muscles although we observed that phototherapy stimulated the production of IGF-1, despite an increase in the levels of some markers of inflammation.

The changes seen here in inflammatory mediators (TNF- $\alpha$  and IL-1) suggested that the level of irradiation used (120 J/cm<sup>2</sup>) had reached a saturating level. According to Kim et al., (2000), at high fluence the production of antioxidants such as catalase and superoxide dismutase is attenuated while that of reactive oxygen species (ROS) and cytokines is enhanced. On the other hand, LLLT at a fluence of 7.7 J/cm<sup>2</sup> (Pires et al.,2011) and 5 J/cm<sup>2</sup> (Mesquita-Ferrari et al.,2011) attenuates the gene expression of

TNF- $\alpha$  and IL-6 in rat tendon inflammation. The observation that muscle from group L rats had an IL-6 concentration similar to that of the control group indicated an inflammatory response in the former group. According to Petersen and Pedersen (2005) cytokines may be pro-inflammatory (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6), anti-inflammatory (IL-6, IL-10, IL-4, IL-5, IL-13 and IL-1 $\alpha$ ) or contribute to the biomodulation of inflammation. In the present study, there was no evidence that enhancement of the inflammatory signaling pathway interfered with the synthesis of IGF-1 or with the increase in the muscle volume of ovariectomized rats treated with LEDT.

Blood lactate concentrations showed no direct relationship with the formation of inflammatory cytokines since at most time intervals there were no differences between the lactate concentrations of groups L and C. The lactate concentration of group L was lower than the other groups (T, LT and C) in the 4<sup>th</sup> week, perhaps because of lower muscle tissue acidity (Myers and Ashley, 1997) and lower IL-6 production (without affecting the release of IL-1 and TNF- $\alpha$ ). These findings may be related to enhanced microcirculatory blood flow (Schindl et al.,1998) and the activation of cellular respiration (Hayworth et al.,2010).

Comparison of the histomorphometric results for the treated and control groups demonstrated the anti-atrophic action of high-intensity resistance training. The frequency of training (48 h intervals) may have contributed to the benefits observed in the muscle mass. An interval of 48 h has a positive effect on protein synthesis during recovery from inflammation following overload resistance training (Karagounis et al.,2010). In contrast, another study found that resistance training for five times per week led to atrophy in rat plantaris muscles (De Souza et al.,2011). A functional overload of physical exercise could decrease protein synthesis (Seene et al.,2004), with increased rates of catabolism/anabolism and a reduction in muscle volume.

The increase in the IGF-1 concentration in the resistance trained group compared to the sedentary group was proportional to the increase in IL-1 and TNF- $\alpha$ . Enhanced IGF-1 production in response to resistance exercise (Adamo and Farrar, 2006) inhibits protein degradation in myotubes by stimulating the phosphatidylinositol-3 kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) pathway (Stitt et al.,2004) and preventing muscle atrophy (Adams et al.,2007). In the present study, inflammatory cytokines (IL-1, IL-6 and TNF- $\alpha$ ) did not interfere with the synthesis of IGF-1, in agreement with previous work in which the optimization of IGF-1 production during high-intensity resistance training was associated with the enhanced signaling of inflammatory cytokines (Smith

et al.,2008). It is therefore possible that resistance training for 12 weeks provided sufficient anabolic signaling to avoid overload. This conclusion suggests that the protocol used here may be a useful alternative for treating reduced estrogen production in aging women.

Only rats in the resistance training group had a lactate concentration higher than the pre-training sedentary group after 12 weeks of heavy overload training. This training favored muscle acidity and greater inflammatory signaling by IL-1, IL-6 and TNF- $\alpha$ . Mechanical stress and resistance training at an intensity exceeding 20% of one repetition maximum (1RM) during exercise can restrict blood flow by increasing muscle tension (Petrofsky and Hendershot, 1984), with consequent muscle microlesions and an increase in IL-1, IL-6 and TNF- $\alpha$  (de Salles et al.,2010). Microinjuries are important for muscle repair and regeneration because the fusion of satellite cells stimulates protein synthesis and the recovery of damaged tissue (Hawke and Garry, 2001). The results obtained in group T showed that enhanced inflammatory signaling did not contribute to muscle atrophy, in contrast to the results reported by Dalla Libera et al., (2001).

Compared to the group sedentary, resistance training in association with LEDT increased muscle volume and IGF-1 synthesis. However, this association did not increase muscle hypertrophy when compared to treatments L and T applied independently. Matheny et al., (2009) showed that progressive resistance exercise at high loads was sufficient to stimulate IGF-1 production and that this mediator prevented muscle atrophy in rats subjected to endurance training.

The LT group showed a reduction in TNF- $\alpha$  formation compared to the T and L groups. TNF- $\alpha$  signaling leads to the activation of caspase-3 and caspase-8 (cysteine-aspartic acid proteases) that induce muscle apoptosis and sarcopenia (Phillips and Leeuwenburgh, 2005). Mitochondria can trigger apoptosis and regulate muscle fibers in the elderly through mitochondrial endonuclease G (EndoG) and apoptosis-inducing factor (AIF); the activation of EndoG can lead to large-scale DNA-fragmentation, either independently or in association with caspases (Marzetti and Leeuwenburgh, 2006). Our findings suggest possible photobiomodulation of mitochondrial activity, as reported by Lubart et al., (2005), and enhanced TNF- $\alpha$  synthesis, with a preventive effect on muscle atrophy during overload resistance training.

The decrease in TNF- $\alpha$  concentration in the LT group compared to groups L and T was possibly influenced by the increase in IL-6. Exercise stimulates IL-6 secretion by

muscle and this mediator attenuates the production of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  (Smith et al.,2008) while increasing the levels of anti-inflammatory cytokines such as IL-10 (Pedersen et al.,2008). Thus, IL-6 plays a more restorative than inflammatory role under conditions of muscle overload during high-intensity resistance training (de Salles et al.,2010). Despite the conflicting behavior of IL-6 as an anti-inflammatory or pro-inflammatory marker, we suggest that the phototherapy-stimulated increase in muscle IL-6 formation facilitated and enhanced the physical recovery after exercise (Calle and Fernandez, 2010).

The intensity of resistance training is a major source of stress for the anaerobic metabolic system (Sánchez-Medina and González-Badillo, 2011). In resistance training with overloads of 50-60% of the body mass, the association with LEDT did not change the lactate concentration after exercise ( $\pm 5.5 \text{ mmol.L}^{-1}$ ). This result showed that the rats were at an anaerobic threshold, with severe metabolic overload, as reported by Voltarelli et al., (2002).

Curiously, the LT group had a lower blood lactate concentration than group T at overloads of 70-80% of the body mass. The photostimulation of muscle mitochondria increases the expression and activity of enzymes involved in ATP synthesis (Hayworth et al.,2010; Shefer et al.,2002). Furthermore, exercise reduces the impact of aging by activating mitochondrial functions (Irrcher et al.,2003). Thus, a combination of phototherapy and resistance training may be useful in attenuating the decline in muscle function with advancing age.

## **5. Conclusions**

Our results indicate that resistance training and LEDT can enhance anabolic activity by stimulating IGF-1 production, thereby increasing the muscle volume of midlife ovariectomized rats. Phototherapy may also regulate the lactate, TNF- $\alpha$  and IL-6 concentrations in rats subjected to high-intensity resistance training. Clinical studies are needed to establish the mechanisms by which LEDT may prevent sarcopenia in elderly women subjected to resistance training.

## **Acknowledgements**

The authors thank Felipe Furlan, Júlio César Domingues, Luis Vaz de Lima Júnior and Mariana Sabino Bortolozzo for valuable technical assistance. This work was supported by CNPq and CePOF-FAPESP.

## References

1. Adams, G.R., Haddad, F., Bodell, P.W., Tran, P.D., Baldwin, K.M., 2007. Combined isometric, concentric, and eccentric resistance exercise prevents unloading-induced muscle atrophy in rats. *J Appl Physiol.* 103(5), 1644-1654.
2. Adamo, M.L., Farrar, R.P., 2006. Resistance training and IGF involvement in the maintenance of muscle mass during the aging process. *Ageing Res Rev.* 5(3), 310-331.
3. Ahtiainen, M., Pöllänen, E., Ronkainen, P.H., Alen, M., Puolakka, J., Kaprio, J., Sipilä, S., Kovanen, V., 2011. Age and estrogen-based hormone therapy affect systemic and local IL-6 and IGF-1 pathways in women. *Age.* doi: 10.1007/s11357-011-9298-1.
4. Baroni, B.M., Leal Junior, E.C., de Marchi, T., Lopes, A.L., Salvador, M., Vaz, M.A., 2010. Low level laser therapy before eccentric exercise reduces muscle damage markers in humans. *Eur J Appl Physiol.* 110(4), 789-796.
5. Bloomer, R.J., Goldfarb, A.H., 2004. Anaerobic exercise and oxidative stress: a review. *Can J Appl Physiol.* 29(3), 245-263.
6. Calle, M.C., Fernandez, M.L., 2010. Effects of resistance training on the inflammatory response. *Nutr Res Pract.* 4(4), 259-269.
7. Corazza, A.V., Jacks, J., Kurachi, C., Bagnato, V.S., 2007. Photobiomodulation on the angiogenesis of skin wounds in rats using different light sources. *Photomed Laser Surg.* 25(2), 102-106.
8. Cressoni, M.D., Giusti, H.H., Pião, A.C., de Paiva Carvalho, R.L., Anaruma, C.A., Casarotto, R.A., 2010. Effect of GaAlAs laser irradiation on the epiphyseal cartilage of rats. *Photomed Laser Surg.* 28(4), 527-532.
9. Cunha, T.S., Tanno, A.P., Moura, M.J.C.S., Marcondes, F.K., 2005. Influence of high-intensity exercise training and anabolic steroid treatment on rat tissue glycogen content. *Life Sci.* 77(9), 1030-1043.
10. Dalla Libera, L., Sabbadini, R., Renken, C., Ravara, B., Sandri, M., Betto, R., Angelini, A., Vescovo, G., 2001. Apoptosis in the skeletal muscle of rats with heart failure is associated with increased serum levels of TNF-alpha and sphingosine. *J Mol Cell Cardiol.* 33(10), 1871-1878.
11. de Salles, B.F., Simão, R., Fleck, S.J., Dias, I., Kraemer-Aguiar, L.G., Bouskela, E., 2010. Effects of resistance training on cytokines. *Int J Sports Med.* 31(7), 441-450.

12. de Souza, R.W.A., Aguiar, A.F., Carani, F.R., Campos, G.E.R., Padovani, C.R., Silva, M.D.P., 2011. High-intensity resistance training with insufficient recovery time between bouts induce atrophy and alterations in myosin heavy chain content in rat skeletal muscle. *Anat Rec (Hoboken)*. 294(8),1393-1400.
13. Douris, P., Southard, V., Ferrigi, R., Grauer, J., Katz, D., Nascimento, C., Podbielski, P., 2006. Effect of phototherapy on delayed onset muscle soreness. *Photomed Laser Surg*. 24(3), 377-382.
14. Enns, D.L., Tiidus, P.M., 2008. Estrogen influences satellite cell activation and proliferation following downhill running in rats. *J Appl Physiol*. 104(2), 347-353.
15. Ferraresi, C., de Brito Oliveira, T., de Oliveira Zafalon, L., de Menezes Reiff, R.B., Baldissera, V., de Andrade Perez, S.E., Matheucci Júnior, E., Parizotto, N.A., 2011. Effects of low level laser therapy (808 nm) on physical strength training in humans. *Lasers Med Sci*. 26(3), 349-358.
16. Florini, J.R., Ewton, D.Z., Coolican, S.A., 1996. Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. *Endocr Rev*. 17(5), 481-517.
17. Goldspink, G., 2007. Loss of muscle strength during aging studied at the gene level. *Rejuvenation Res*. 10, 397-405.
18. Hawke, T.J., Garry, D.J., 2001. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol*. 91(2), 534-551.
19. Hayworth, C.R., Rojas, J.C., Padilla, E., Holmes, G.M., Sheridan, E.C., Gonzalez-Lima, F., 2010. In vivo low-level light therapy increases cytochrome oxidase in skeletal muscle. *Photochem Photobiol*. 86(3), 673-680.
20. Hornberger, T.A., Farrar, R.P., 2004. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. *Can J Appl Physiol*. 29(1), 16-31.
21. Irrcher, I., Adhietty, P.J., Joseph, A.M., Ljubicic, V., Hood, D.A., 2003. Regulation of mitochondrial biogenesis in muscle by endurance exercise. *Sports Med*. 33(11), 783-793.
22. Karagounis, L.G., Yaspelkis III, B.B., Reeder, D.W., Lancaster, G.I., Hawley, J.A., Coffey, V.G., 2010. Contraction-induced changes in TNF- $\alpha$  and Akt-mediated signalling are associated with increased myofibrillar protein in rat skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol*. 109(5), 839-848.
23. Karu, T.I., Pyatibrat, L.V., Kolyakov, S.F., Afanasyeva, N.I., 2005. Absorption measurements of a cell monolayer relevant to phototherapy: reduction of

- cytochrome c oxidase under near IR radiation. *J Photochem Photobiol B.* 81(2), 98-106.
24. Kim, Y.G., Pak, S.C., Lee, S.R., 2000. Hairless mouse epidermal antioxidants and lipid peroxidation assessed by He-Ne laser. *J Photochem Photobiol B Biol.* 27(5), 420-426.
  25. Kraemer, W.J., Häkkinen, K., Newton, R.U., Nindl, B.C., Volek, J.S., McCormick, M., Gotshalk, L.A., Gordon, S.E., Fleck, S.J., Campbell, W.W., Putukian, M., Evans, W.J., 1999. Effects of heavy-resistance training on hormonal response patterns in younger vs. older men. *J Appl Physiol.* 87(3), 982-992.
  26. Lakyová, L., Toporcer, T., Tomečková, V., Sabo, J., Radoňak, J., 2010. Low-level laser therapy for protection against skeletal muscle damage after ischemia-reperfusion injury in rat hindlimbs. *Lasers Surg Med.* 42(9), 665-672.
  27. Lamberts, S.W., van den Beld, A.W., van der Lely, A.J., 1997. The endocrinology of aging. *Science.* 278(5337), 419-424.
  28. Leal Junior, E.C., Lopes-Martins, R.A., Baroni, B.M., De Marchi, T., Taufer, D., Manfro, D.S., Rech, M., Danna, V., Grosselli, D., Generosi, R.A., Marcos, R.L., Ramos, L., Bjordal, J.M., 2009. Effect of 830 nm low-level laser therapy applied before high-intensity exercises on skeletal muscle recovery in athletes. *Lasers Med Sci.* 24(6), 857-863.
  29. Leite, R.D., Prestes, J., Pereira, G.B., Shiguemoto, G.E., Perez, S.E., 2010. Menopause: highlighting the effects of resistance training. *Int J Sports Med.* 31(11), 761-767.
  30. Lopes-Martins, R.A., Marcos, R.L., Leonardo, P.S., Prianti, A.C. Jr., Muscará, M.N., Aimbire, F., Frigo, L., Iversen, V.V., Bjordal, J.M., 2006. Effect of low-level laser (Ga-Al-As 655 nm) on skeletal muscle fatigue induced by electrical stimulation in rats. *J Appl Physiol.* 101(1), 283-288.
  31. Lubart, R., Eichler, M., Lavi, R., Friedman, H, Shainberg, A., 2005. Low-energy laser irradiation promotes cellular redox activity. *Photomed Laser Surg.* 23(1), 3-9.
  32. Marzetti, E., Leeuwenburgh, C., 2006. Skeletal muscle apoptosis, sarcopenia and frailty at old age. *Exp Gerontol.* 41(12), 1234-1238.

33. Matheny, R.W., Merritt, E., Zannikos, S.V., Farrar, R.P., Adamo, M.L., 2009. Serum IGF-I-deficiency does not prevent compensatory skeletal muscle hypertrophy in resistance exercise. *Exp Biol Med.* 234(2), 164-170.
34. Mesquita-Ferrari, R.A., Martins, M.D., Silva, J.A. Jr., da Silva, T.D., Piovesan, R.F., Pavesi, V.C., Bussadori, S.K., Fernandes, K.P., 2011. Effects of low-level laser therapy on expression of TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  in skeletal muscle during the repair process. *Lasers Med Sci.* 26(3), 335-340.
35. Muniz-Renno, A.C., de Moura, F.M., dos Santos, N.S., Tirico, R.P., Bossini, P.S., Parizotto, N.A., 2006. The effects of infrared-830 nm laser on exercised osteopenic rats. *Lasers Med Sci.* 21(4), 202-207.
36. Myers, J., Ashley, E., 1997. Dangerous curves. A perspective on exercise, lactate, and the anaerobic threshold. *Chest.* 111(3), 787-795.
37. Nakano, J., Kataoka, H., Sakamoto, J., Origuchi, T., Okita, M., Yoshimura, T., 2009. Low-level laser irradiation promotes the recovery of atrophied gastrocnemius skeletal muscle in rats. *Exp Physiol.* 94(9), 1005-1015.
38. Oron, U., 2006. Photoengineering of tissue repair in skeletal and cardiac muscles. *Photomed Laser Surg.* 24(2), 111-120.
39. Paolillo, F.R., Milan, J.C., Aniceto, I.V., Barreto, S.G., Rebelatto, J.R., Borghi-Silva, A., Parizotto, N.A., Kurachi, C., Bagnato, V.S., 2011. Effects of infrared-LED illumination applied during high-intensity treadmill training in postmenopausal women. *Photomed Laser Surg.* 29(9), 639-645.
40. Pedersen, B.K., Akerström, T.C.A., Nielsen, A.R., Fischer, C.P., 2007. Role of myokines in exercise and metabolism. *J Appl Physiol.* 103(3), 1093-1098.
41. Petersen, A.M.W., Pedersen, B.K., 2005. The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol.* 98(4), 1154-1162.
42. Petrofsky, J.S., Hendershot, D.M., 1984. The interrelationship between blood pressure, intramuscular pressure, and twitch skeletal muscle in the cat. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 53(2), 106-111.
43. Phillips, T., Leeuwenburgh, C., 2005. Muscle fiber specific apoptosis and TNF- $\alpha$  signaling in sarcopenia are attenuated by life-long calorie restriction. *FASEB J.* 19(6), 668-670.
44. Pires, D., Xavier, M., Araújo, T., Silva, J.A. Jr, Aimbire, F., Albertini, R., 2011. Low-level laser therapy (LLLT; 780 nm) acts differently on mRNA expression of

- anti- and pro-inflammatory mediators in an experimental model of collagenase-induced tendinitis in rat. *Lasers Med Sci.* 26(1), 85-94.
45. Rizzi, E.C., Issa, J.P., Dias, F.J., Leão, J.C., Regalo, S.C., Siéssere, S., Watanabe, I.S., Iyomasa, M.M., 2010. Low-level laser intensity application in masseter muscle for treatment purposes. *Photomed Laser Surg.* 28(2), S31-S35.
46. Sánchez-Medina, L., González-Badillo, J.J., 2011. Velocity loss as an indicator of neuromuscular fatigue during resistance training. *Med Sci Sports Exerc.* 43(9), 1725-1734.
47. Saygun, I., Karacay, S., Serdar, M., Ural, A.U., Sencimen, M., Kurtis, B., 2008. Effects of laser irradiation on the release of basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin like growth factor-1 (IGF-1), and receptor of IGF-1 (IGFBP3) from gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci.* 23(2), 211-215.
48. Schindl, A., Schindl, M., Schön, H., Knobler, R., Havelec, L., Schindl, L., 1998. Low-intensity laser irradiation improves skin circulation in patients with diabetic microangiopathy. *Diabetes Care.* 21(4), 580-584.
49. Seene, T., Kaasik, P., Alev, K., Pehme, A., Riso, E.M., 2004. Composition and turnover of contractile proteins in volume-overtrained skeletal muscle. *Int J Sports Med.* 25(6), 438-445.
50. Shefer, G., Partridge, T.A., Heslop, L., Gross, J.G., Oron, U., Halevy, O., 2002. Low-energy laser irradiation promotes the survival and cell cycle entry of skeletal muscle satellite cells. *J Cell Sci.* 115(7), 1461-1469.
51. Shimizu, N., Mayahara, K., Kiyosaki, T., Yamaguchi, A., Ozawa, Y., Abiko, Y., 2007. Low-intensity laser irradiation stimulates bone nodule formation via insulin-like growth factor-I expression in rat calvarial cells. *Lasers Surg Med.* 39(6), 551-559.
52. Smith, C., Kruger, M.J., Smith, R.M., Myburgh, K.H., 2008. The inflammatory response to skeletal muscle injury: illuminating complexities. *Sports Med.* 38(11), 947-969.
53. Stitt, T.N., Drujan, D., Clarke, B.A., Panaro, F., Timofeyeva, Y., Kline, W.O., Gonzalez, M., Yancopoulos, G.D., Glass, D.J., 2004. The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol Cell.* 14(3), 395-403.
54. Stupka, N., Tiidus, P.M., 2001. Effects of ovariectomy and estrogen on ischemia reperfusion injury in hindlimbs of female rats. *J Appl Physiol.* 91(4), 1828-1835.

55. Tunér, J., Hode, L., 2002. Laser Therapy: Clinical Practise and Scientific Background. Prima Books AB. 570.
56. Voltarelli, F.A., Gobatto, C.A., de Mello, M.A., 2002. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. *Braz J Med Biol Res.* 35(11), 1389-1394.
57. Waters, D.L., Baumgartner, R.N., Garry, P.J., Vellas, B., 2010. Advantages of dietary, exercise-related, and therapeutic interventions to prevent and treat sarcopenia in adult patients: an update. *Clin Interv Aging.* 7(5), 259-270.
58. Weibel, E.R., Kistler, G.S., Scherle, W.F., 1966. Practical stereological methods for morphometric cytology. *J Cell Biol.* 30(1), 23-38.
59. Whelan, H.T., Smits, R.L., Buchman, E.V., Whelan, N.T., Turner, S.G., Margolis, D.A., Cevenini, V., Stinson, H., Ignatius, R., Martin, T., Cwiklinsk, J., Philippi, A.F., Graf, W.R., Hodgson, B., Gould, L., Kane, M., Chen, G., Caviness, J., 2001. Effect of NASA light-emitting diode irradiation on wound healing. *J Clin Laser Med Surg.* 19(6), 305-314.
60. Wong-Riley, M.T.T., Bai, X., Buchmann, E., Whelan, H.T., 2001. Light-emitting diode treatment reverses the effect of TTX on cytochrome oxidase in neurons. *Neuroreport.* 12(14), 3033-3037.
61. Yang, J., Anzo, M., Cohen, P., 2005. Control of aging and longevity by IGF-1 signaling. *Exp Gerontol.* 40(11), 867-872.

## CAPÍTULO 2

### **FOTOTERAPIA E TREINAMENTO RESISTIDO NA PREVENÇÃO DA OSTEOPENIA EM RATAS**

Artigo será encaminhado para a revista *Osteoporosis International*.

**Síntese do Resumo:** Foi avaliada a associação entre a fototerapia e o treinamento resistido na prevenção à osteopenia em ratas de meia-idade. Os animais foram divididos em seis grupos: sedentária-ovariectomizada; sedentária não-ovariectomizada; exercitada-ovariectomizada; exercitada não-ovariectomizada; LEDT e exercitada ovariectomizada e LEDT e exercitada não-ovariectomizada. Os resultados sugerem que o treinamento resistido preveniu a osteopenia em ratas ovariectomizadas e a associação da terapia em ratas com atividade estrogênica aumentou o volume ósseo trabecular.

**Introdução:** A prevenção da osteoporose evita fraturas, restrição funcional e comorbidades. O treinamento de força é uma terapia convencionalmente utilizada na prevenção dos efeitos da osteoporose, mas não há estudos avaliando a sua associação com terapia por diodos emissores de luz - *Light Emitting Diodes Therapy* - (LEDT) no aumento da atividade osteogênica. **Métodos:** Sessenta ratas Wistar foram divididas em seis grupos (n=10/grupo): sedentária-ovariectomizada (CO); sedentária não-ovariectomizada (CS); exercitada-ovariectomizada (EOV); exercitada não-ovariectomizada (ES); LEDT e exercitada ovariectomizada (LEO) e LEDT e exercitada não-ovariectomizada (LES). As ratas saltaram dentro de um cilindro com água aquecida (4 séries de 10 repetições, 30 s de repouso entre as séries) com uma carga de 50-80% da massa corpórea, por 12 semanas. A LEDT (850 ± 10 nm, 100 mW, 120 J/cm<sup>2</sup> e área do feixe de luz com 0,5 cm<sup>2</sup>) foi irradiada pontualmente com contato em um único ponto no centro do trocanter maior do fêmur direito. A fração de volume, espessura e separação do osso trabecular, e o número de osteoclastos foram analisados por meio da histomorfometria estereológica. **Resultados:** A densidade volumétrica e espessura do osso trabecular foram maiores no grupo EOV em relação ao CO (p < 0,05). A associação da LEDT ao exercício resistido colaborou para o aumento do volume ósseo em ratas de meia idade com ovário intacto (p < 0,05). **Conclusão:** A LEDT infravermelho (120 J/cm<sup>2</sup>) associada ao treinamento com exercício resistido age como método preventivo na osteopenia de ratas com meia idade.

Palavras Chaves: Fototerapia, LED, osteoporose, osteopenia e treinamento resistido

## **Introdução**

A osteoporose é uma doença ósteo-metabólica multifatorial caracterizada pela redução da densidade mineral e deteriorização da microarquitetura óssea, predispondo os indivíduos ao risco de fraturas, restrição funcional e comorbidades, com alto custo econômico [1].

A rápida redução da massa óssea após a menopausa também aumenta os fatores impactantes da osteoporose em mulheres de meia idade e idosas.

É reconhecido que a restrição hormonal dos estrogênios promove um desequilíbrio entre a proporção dos osteoblastos e osteoclastos por aumentar citocinas osteoclastogênicas como fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) [2], interleucina 1 e 6 (IL-1 e 6) [3], além de limitar a produção de fatores anti-reabsortivos como o fator de crescimento semelhante a insulina do tipo 1 (IGF-1) e fator de crescimento de transformação  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) [4, 5].

Como método alternativo a deficiência dos estrogênios, um grande número de tratamentos farmacológicos e não-farmacológicos são desenvolvidos [6, 7]. O treinamento resistido ou exercício com levantamento de peso para o ganho de força tem demonstrado excelentes resultados preventivos e curativos no aumento da densidade mineral óssea [8, 9, 10].

Outra intervenção não-farmacológica é a fototerapia, utilizada no reparo óssea em situações de deficiência dos estrogênios [11, 12]. A osteogenia com Laserterapia de baixa intensidade (LLLT) e Terapia com diodos emissores de luz (LEDT) em lesões ósseas foram favoráveis, pois aumentaram a atividade e número de osteoblastos e diminuíram proporcionalmente os osteoclastos [13, 14]. Entretanto a associação da LLLT ao treinamento resistido em ratas osteopênicas não demonstrou eficiência osteogênica [15], mas ao utilizar a LLLT isolado, com dose de energia de 120 J/cm<sup>2</sup>, foram obtidos resultados positivos nas propriedades mecânicas dos fêmures de ratas ovariectomizadas [16].

Devido à ausência de experimentos sobre a ação da LEDT associada ao treinamento resistido no envelhecimento ósseo, o presente estudo teve como objetivo analisar os efeitos da associação da fototerapia ao treinamento resistido em ratas ovariectomizadas e intactas.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Amostra**

Sessenta ratas (Wistar) com 12 meses de idade e massa corpórea entre 295 a 330g, foram mantidas em gaiolas coletivas (5 ratas por gaiola), em sala climatizada ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e fotoperíodo controlado de 12 horas. Os animais receberam ração comercial e água filtrada *ad libitum*. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA - IB - UNICAMP / protocolo no. 2115-1) e foi conduzido conforme as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

### **2.2. Ovariectomia**

Para simular a menopausa e avaliar seus efeitos hormonais no tecido ósseo, as ratas foram anestesiadas com quetamina/xilazina (47,5/12 mg/Kg, IM) e por incisão translombar, foram bilateralmente ovariectomizadas. As tubas uterinas foram ligadas (catgut 4,0) e depois realizada a remoção dos ovários. A eficiência do procedimento cirúrgico foi verificada por dissecação “pós morte” por meio da atrofia das tubas uterinas. As ratas foram divididas aleatoriamente em 6 grupos (n=10): controle-sedentária ovariectomizada (CO), controle-sedentária não-ovariectomizada (CS), exercitada ovariectomizada (EOV), exercitada não-ovariectomizada (ES), LEDT e exercitadas ovariectomizada (LEO) e LEDT e exercitadas não-ovariectomizada (LES)

### **2.3. LED Terapia**

O protótipo LED foi desenvolvido especialmente para este estudo no Instituto de Física de São Carlos – USP. O LED foi ajustado em 100 mW, com intensidade de  $200 \text{ mW/cm}^2$ , em modo contínuo e faixa espectral de  $850 \pm 10 \text{ nm}$ , com uma área do feixe de luz de  $0,5 \text{ cm}^2$ . A fototerapia teve início 12 dias após a ovariectomia. A dose de energia de  $120 \text{ J/cm}^2$  [16] foi aplicada em único ponto com contato direto por 10 minutos no centro do trocanter maior do fêmur direito, a cada 48 horas durante 12 semanas. Este ponto foi localizado por palpação e remarcado a cada semana. Nos grupos LEO e LES a fototerapia foi aplicada imediatamente após o treinamento.

## 2.4. Protocolo de Treinamento

Os animais foram submetidos ao treinamento resistido com sessões de levantamento de peso no interior de um cilindro (75 cm de altura e 30 cm de diâmetro) com água a  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , três vezes por semana durante 12 semanas. Uma mochila com bolas de chumbo no seu interior foi acoplada ao corpo do animal de acordo com sua massa corporal. Após 12 dias da ovariectomia os animais foram adaptados ao protocolo de treinamento de exercícios na água três vezes por semana, com 30 segundos de repouso entre cada série, com aumento gradativo do número de séries (2 para 4) e repetições (5 para 10) [17]. A massa corpórea dos animais foi mensurada nos seguintes períodos: pré-operatório (12 dias antes do treinamento resistido), adaptação (uma semana) e nos últimos dias da 1ª até a 12ª semana de treinamento resistido. Foi utilizado o protocolo modificado de Hornberger e Farrar [18] com a sobrecarga de treinamento (chumbo na mochila) adequada para o ciclo de treinamento. A sobrecarga de treinamento foi proporcional a sua massa corporal (Fig 1), sendo 50% (1ª e 2ª semanas), 60% (3ª e 6ª semanas), 70% (3ª e 10ª semanas) e 80% (11ª e 12ª semanas). Houve aumento da altura da coluna de água em 30 cm (1ª semana), 35 cm (2ª semana) e 40 cm (a partir da 3ª semana). Vinte quatro horas após a aplicação do protocolo, os animais foram decapitados e o fêmur foi removido para análise histológica. A atrofia das tubas uterinas também foi verificada nessa etapa.

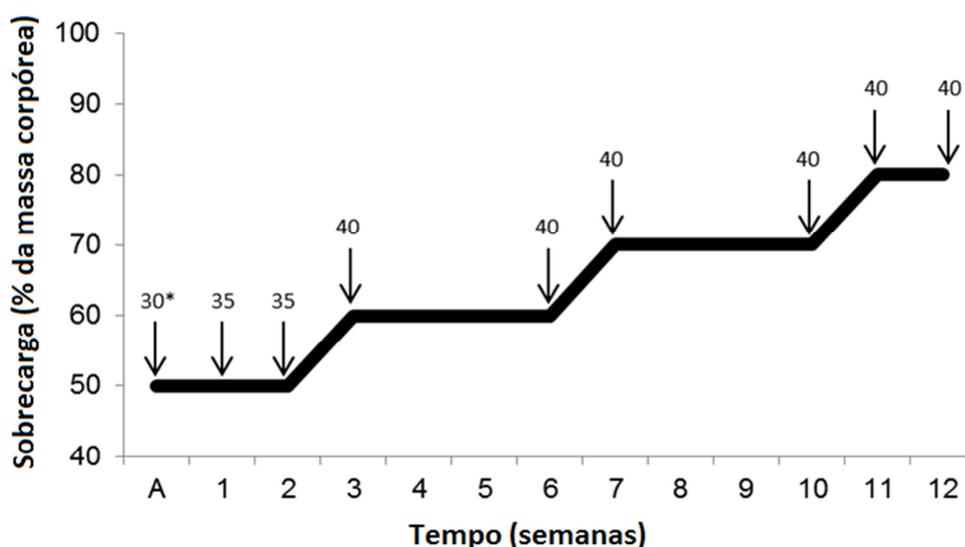


Figura 1. Evolução do percentual de sobrecarga em relação à massa corporal nas semanas de treinamento. Existiu um período de adaptação (A) e o protocolo de treinamento resistido em 12 semanas. (\*) Altura da coluna de água que os ratos saltavam no cilindro.

## **2.5. Parâmetros avaliados**

### **2.5.1. Histomorfometria**

O fêmur dos ratos foram removidos e fixados em solução modificada de Karnovsky (4% de paraformaldeído e 2,5% de glutaraldeído) por 6 horas. Em seguida, os fêmures foram descalcificados em uma solução contendo ácido etileno diamina tetra acético (EDTA) por 45 dias. Após completar a desmineralização, o fêmur foi cortado longitudinalmente do trocanter maior, seguindo o colo até a fôvea da cabeça do fêmur e emblocado em paraplast, os quais foram feitos cortes seriados com 5 µm de espessura. Os corte foram corados com hematoxilina e eosina e analisados em microscopia de luz (Axioskop 2 plus, Zeiss, Jena, Germany), com uma câmera digital DFC280 (Leica<sup>®</sup>, Germany) acoplada ao sistema. As imagens foram obtidas pelo software IM50 (Leica<sup>®</sup>, Germany) em um aumento de 2,5X para mensurar a separação e espessura trabecular. No aumento de 20X foi medida a fração de volume do osso trabecular em porcentagem (VO/VT%) e o número de osteoclastos TRAP (fosfatase ácida tartarato-resistente) positivos segundo metodologia de Cole *et al* [19].

A fração de volume trabecular do fêmur e o número de osteoclastos foram realizadas por sistema de análise de imagem (Image-Pro<sup>®</sup>, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) em oito campos a partir de 1 mm abaixo da placa epifisária e utilizado um retículo digital de 667 pontos de acordo com os princípios de Weibel et al., [20]. A espessura e separação trabecular foram medidas em linha reta, de um extremo ao outro da placa epifisária.

### **2.6. Análise Estatística**

Os testes de Levene e Shapiro-Wilk foram utilizados para observar a homogeneidade de variância e distribuição dos dados, respectivamente. A fração de volume trabecular, espessura e separação trabecular do fêmur das ratas dos grupos do estudo foram analisadas pela análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey. Foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis para comparar o número de osteoclastos entre os grupos. Foi utilizado o software BioEstat 5.0 (Fundação Mamirauá, Bélem, PA, Brazil) para realizar as análises, com nível de significância de 5%.

### 3. Resultados

#### 3.1. Fração de Volume Óssea

Nos grupos LEO ( $51,05 \pm 12,20\%$ ) e EOV ( $53,01 \pm 12,90\%$ ) existiram aumento significativo da fração volumétrica do osso trabecular na cabeça do fêmur (Fig. 2) em relação ao grupo CO ( $38,96 \pm 12,68$ ) (Fig. 3). Houve elevação significativa do percentual de fração de volume do osso dos grupos LEO ( $51,05 \pm 12,20\%$ ) e EOV ( $53,01 \pm 12,90\%$ ) em relação ao grupo CS ( $50 \pm 15\%$ ). No grupo ES ( $53,4 \pm 14,65\%$ ) não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao CS ( $50 \pm 15\%$ ). No grupo LES ( $57,30 \pm 14,45\%$ ) houve aumento significativo (ANOVA e Tukey,  $p < 0,05$ ) do número de trabéculas em relação aos demais grupos.

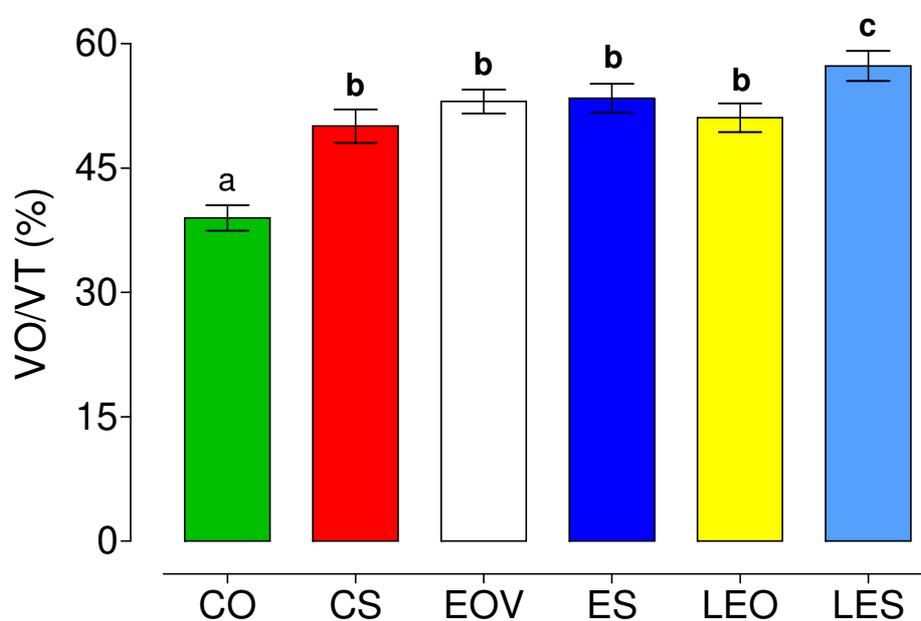


Figura 2. Fração de volume ósseo trabecular (VO/VT%) na cabeça do fêmur (média  $\pm$  erro padrão) de acordo com os grupos. Diferenças significantes do Controle-sedentária ovariectomizada (CO), Controle-sedentária sem-ovariectomia (CS), Exercitada ovariectomizada (EOV), Exercitada sem-ovariectomia (ES), Exercitada e LEDT ovariectomizada (LEO) além do Exercitada e LEDT sem-ovariectomia (LES) estão retratados como “a”, “b” ou “c”.

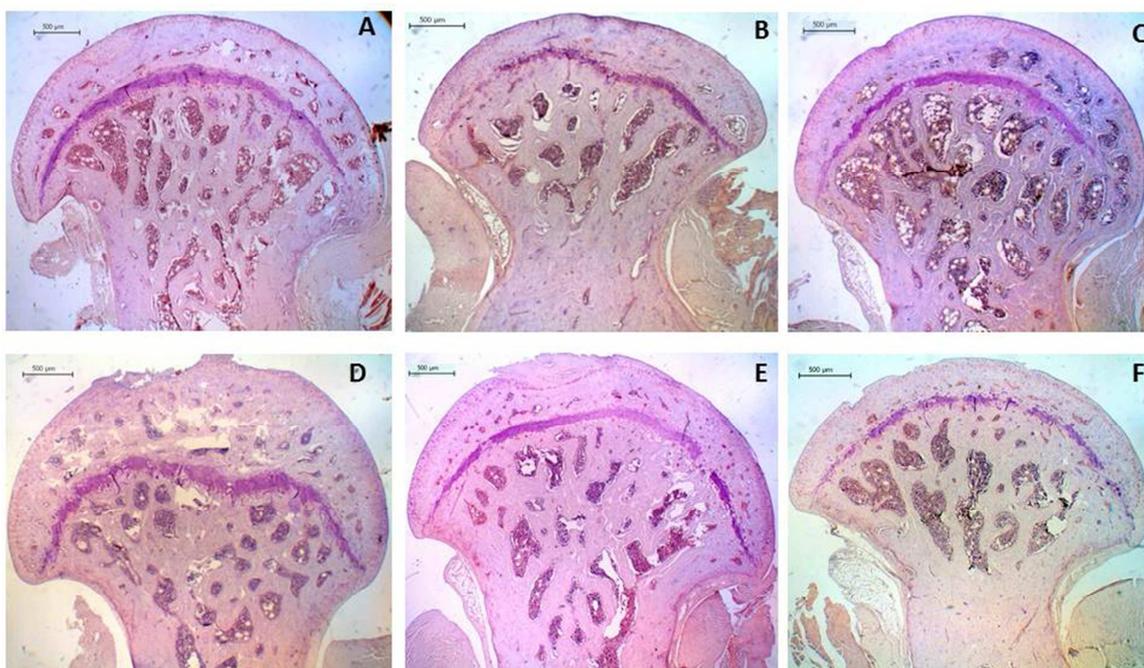


Figura 3: Fotografia histológica (HE) da cabeça do fêmur em corte longitudinal (aumento de 2,5X) dos grupos experimentais. **A)** LEDT e exercitada ovariectomizada (LEO); **B)** Exercitada ovariectomizada (EOV); **C)** Controle-sedentária ovariectomizada (CO); **D)** Exercitada e LEDT sem-ovariectomia (LES); **E)** Exercitado sem-ovariectomia (ES) e **F)** Controle-sedentária sem-ovariectomia (CS).

### 3.2. Espessura trabecular

A espessura trabecular (Fig. 2) nos grupos LEO ( $1,93 \pm 0,45\text{mm}$ ), EOV ( $2,21 \pm 0,29\text{mm}$ ), LES ( $2,07 \pm 0,36\text{mm}$ ) e ES ( $1,84 \pm 0,53\text{mm}$ ) foi significativamente maior em relação ao CO ( $1,36 \pm 0,48\text{mm}$ ) (Fig 4). Houve uma elevação significante (ANOVA e Tukey,  $p < 0,05$ ) do grupo EOV ( $2,21 \pm 0,29\text{mm}$ ) em relação ao CS ( $1,762 \pm 0,1396\text{mm}$ ).

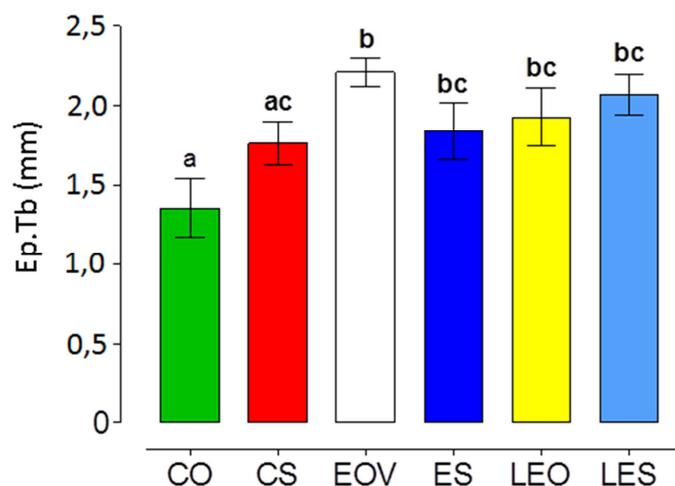


Figura 4. Espessura trabecular total (Ep.Tb mm) na cabeça do fêmur (média±erro padrão) de acordo com os grupos. Diferenças significantes do Controle-sedentária ovariectomizada (CO), Controle-sedentária sem-ovariectomia (CS), Exercitada ovariectomizada (EOV), Exercitada sem-ovariectomia (ES), Exercitada e LEDT ovariectomizada (LEO) além do Exercitada e LEDT sem-ovariectomia (LES) estão retratados como “a”, “b” ou “c”.

### 3.3. Separação trabecular

A análise dos dados (ANOVA e Tukey) mostrou aumento significativo ( $p < 0,05$ ) entre a separação trabecular total do grupo CO ( $1,7 \pm 0,30\text{mm}$ ) comparado aos demais grupos (Fig 2), sendo que não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos EO (0,78  $\pm$  0,28mm), LEO (1,0  $\pm$  0,17mm), CS (1,0  $\pm$  0,34mm), ES (0,88  $\pm$  0,52mm) e LES (0,82  $\pm$  0,51mm) (Fig. 5).

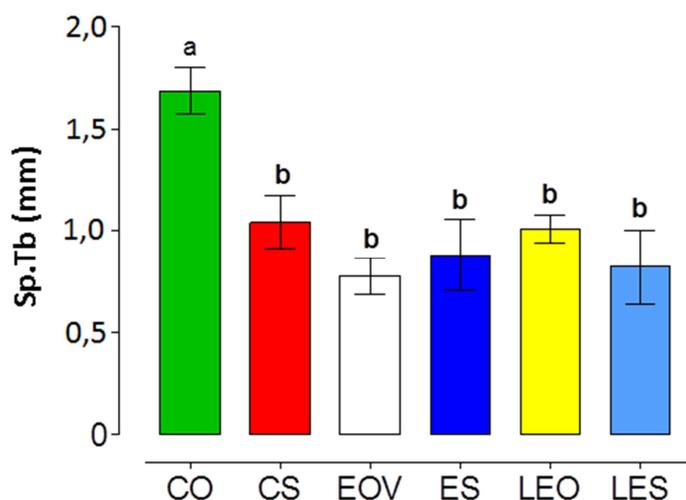


Figura 5. Separação trabecular (Sp.Tb mm) na cabeça do fêmur (média±erro padrão) de acordo com os grupos. Diferenças significantes do Controle-sedentária ovariectomizada (CO), Controle-sedentária sem-ovariectomia (CS), Exercitada ovariectomizada (EOV), Exercitada sem-ovariectomia (ES), Exercitada e LEDT ovariectomizada (LEO) além do Exercitada e LEDT sem-ovariectomia (LES) estão retratados como “a”, “b” ou “c”.

### 3.4. Número de Osteoclastos

O número de osteoclastos (Fig.6) foi significativamente maior (Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ ) no grupo CO (8,5; 5-13  $\text{mm}^{-1}$ ) do que nos demais. Além disso, o grupo ES (4; 1-7,5  $\text{mm}^{-1}$ ) também mostrou aumento significativo do número de osteoclastos em relação ao LES (0; 0-2  $\text{mm}^{-1}$ ), LEO (0; 0-3  $\text{mm}^{-1}$ ), EOV (2; 0-4  $\text{mm}^{-1}$ ) e CS (2; 0-4  $\text{mm}^{-1}$ ). O menor número de osteoclastos dos grupos LEO e LES foi estatisticamente significativo em relação aos demais grupos.

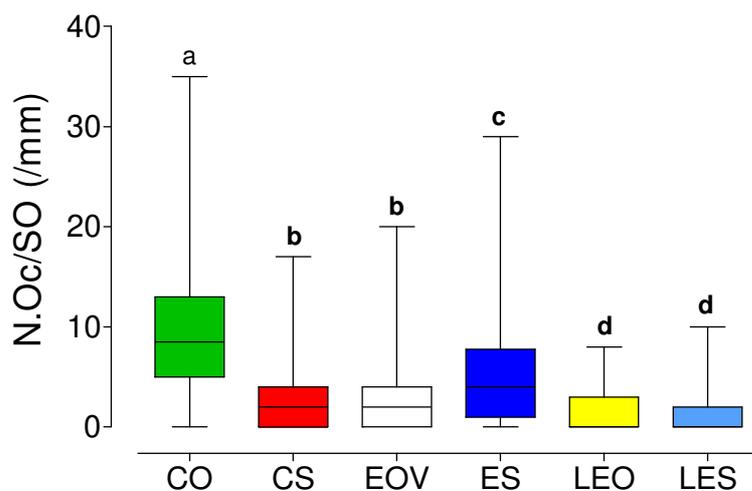


Figura 6. Número de osteoclastos na superfície da cabeça do fêmur (N.Oc/SO - /mm) de acordo com os grupos. Diferenças significativas do Controle-sedentária ovariectomizada (CO), Controle-sedentária sem-ovariectomia (CS), Exercitada ovariectomizada (EOV), Exercitada sem-ovariectomia (ES), Exercitada e LEDT ovariectomizada (LEO) além do Exercitada e LEDT sem-ovariectomia (LES) estão retratados como “a”, “b” ou “c”.

## Discussão

Devido ao impacto da osteoporose na sociedade moderna há preocupação terapêutica para minimizar os efeitos sobre o sistema esquelético [6, 7]. Modelos experimentais de osteopenia são adotados para demonstrar de modo padronizado a eficiência preventiva e curativa de determinados métodos de tratamento. No presente estudo, a ovariectomia bilateral induziu a osteopenia ao longo de três meses de pós-operatório por meio da histomorfometria óssea em relação às sedentárias não-ovarietomizadas. Resultados semelhantes foram observados em outros estudos para analisar a influência metabólica com o tratamento preventivo e curativo da osteopenia [11, 16, 21].

A ação preventiva do treinamento com saltos resistidos aos efeitos da osteopenia em ratas ovariectomizadas e a sobrecarga progressiva (peso de 50 a 80% da massa corpórea) durante 12 semanas, associado ao menor número de repetições (16 repetições), promoveu aumento do volume ósseo e espessura trabecular em relação às sedentárias ovariectomizadas. Por outro lado, Swift et al., [22] sugerem que treinamento de saltos com baixa carga pode ser adequado para aumento do volume ósseo e espessura trabecular em ratas osteopênicas devido ao menor impacto e riscos de fraturas. Entretanto, o treinamento com impacto não induz alterações na remodelação óssea [23] e a evolução no volume e intensidade de treinamento é importante para a exposição dos osteócitos à tensão mecânica, suprimindo a produção de esclerostina, com aumento no efeito osteogênico pela via de sinalização Wnt (24). Além disso, há o efeito piezoelétrico que transforma sinal mecânico em elétrico para estimular a produção de osteoblastos [10].

O treinamento resistido aplicado nas ratas com deficiência dos estrogênios deste estudo preveniu a diminuição do volume ósseo trabecular em relação às ratas ovariectomizadas e sedentárias. O treinamento resistido aumenta as concentrações de IGF-1 sérico, conforme relatado em outros estudos [25, 26], sendo reconhecido que este fator de crescimento pode estar envolvido na regulação da formação óssea [27]. Deste modo, sugerimos que na ausência dos estrogênios, o treinamento resistido aumenta a produção de IGF-1, promovendo a osteogênica e evita a redução da massa óssea em ratas ovariectomizadas.

A atividade osteoclástica e a separação trabecular do grupo EOV foi proporcionalmente menor em relação ao grupo CO. O aumento espontâneo na expressão

e secreção de citocinas pró-inflamatórias do tipo IL1 , IL-6 e TNF- $\alpha$  pela deficiência dos estrogênios, aumentam a reabsorção óssea por estímulo aos osteoclastos [3]. Deste modo, o volume, a intensidade e a frequência deste programa de treinamento resistido foram essenciais para modular as concentrações sanguíneas de citocinas pró-inflamatórias, conforme relatado em outros estudos [28, 29, 30], sugerindo um menor número de osteoclastos e manutenção do volume ósseo.

A associação da LEDT ao treinamento resistido nas ratas ovariectomizadas não suplementou a osteogenia em relação ao treinamento resistido realizado isoladamente. Do mesmo modo, Muniz Renno et al [15] ao associarem o treinamento resistido de salto ao laser infra-vermelho (830 nm) com dose de energia semelhante (120 J/cm<sup>2</sup>), não otimizou a resposta terapêutica sobre o osso osteopênico, relatando que os efeitos fotobiomodulares dependem do ajuste das variáveis físicas do equipamento.

Os fundamentos de associar a fototerapia ao exercício para evitar a osteopenia se justificou por estudos anteriores devido ao sucesso da laserterapia no reparo de lesões ósseas. Ré Poppi et al., [12] utilizaram laser infra-vermelho (880nm) em defeito ósseo do fêmur de ratas ovariectomizadas promovendo aumento do metabolismo celular e formação de calo ósseo com dose de energia de 133 J/cm<sup>2</sup>, distribuídos em quatro pontos no fêmur, por 10 segundo cada um. Por outro lado, o laser infra-vermelho (904 nm) pulsado com baixa dose de energia (50 mJ/cm<sup>2</sup>) otimizou o reparo quando aplicado em quatro pontos na tíbia de ratas com deficiência estrogênica [11]. A alta dose de energia (120J/cm<sup>2</sup>) em um único ponto pode produzir saturação energética nas ratas hormônio-deprimidas associada à sobrecarga metabólica no presente programa de treinamento resistido, visto que as moléculas ósseas destas ratas possivelmente não tiveram a capacidade de absorver a energia fornecida para prevenir de modo suplementar a osteopenia em relação às treinadas isoladamente.

O treinamento resistido em ratas de meia-idade com produção normal de estrogênios não promoveu aumento do volume ósseo em relação às ratas sedentárias na mesma condição hormonal. Westerlind et al., [31] analisaram aumento da área, do número e da espessura do osso trabecular em ratas maduras submetidas ao exercício resistido, com aumento de 104% da carga em relação a massa corpórea em seis semanas de treinamento. Por outro lado, ao submeter ratas maduras ao treinamento resistido de saltos durante 5 semanas com alta e baixa carga (100% e 8% da massa corpórea, respectivamente) foi observado que baixas intensidade de exercício otimiza a atividade osteogênica [22]. Neste sentido, analisamos que a variação da carga de treinamento não

é determinante sobre o nível de saturação mecanosensorial dos osteoblastos, que existem fatores do metabolismo celular mitocondrial que podem interferir na atividade osteogênica.

A associação da LEDT ao treinamento resistido suplementou a atividade osteogênica em relação às ratas treinadas com ovários intactos com redução do número de osteoclastos. É reconhecido que o envelhecimento favorece a mutação no DNA mitocondrial [32], colaborando no aumento de radicais livres pelas mitocôndrias, que aumentam a osteoclastogênese e consequente reabsorção óssea [33]. Neste sentido, a fototerapia tem demonstrado efeitos biomoduladores na atividade mitocondrial (34), com aumento dos antioxidantes superóxido dismutase e catalase [35] para reduzir o estresse oxidativo. Portanto, sugerimos que associar o treinamento de força e fototerapia nas ratas de meia-idade promove homeostasia entre espécies de oxigênio reativos e antioxidantes, conforme relatado por outros estudos [36, 37], com diminuição dos osteoclastos [14] e aumento de osteoblastos [13] no envelhecimento.

A fototerapia tem efeitos diretos sobre metabolismo osteogênico com estímulo na produção de osteoblastos por meio do IGF-1 [38], fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ) [39], fator de crescimento fibroblástico (FGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) [21]. Assim, a LEDT pode colaborar na elevação do metabolismo celular de ratas com concentração normal de estrogênios submetida a sobrecarga do treinamento resistido de força para aumento do volume ósseo, prevenindo a osteopenia pós-menopausa.

## **Conclusão**

O programa de treinamento resistido utilizado neste estudo nas ratas ovariectomizadas sugere efeitos preventivos na osteopenia. Associar a fototerapia ao exercício físico não houve suplementação no volume ósseo trabecular diante da ausência dos estrogênios, mas reduziu o número de osteoclastos. Combinar LEDT ao treinamento resistido em ratas de meia-idade, sem restrição dos estrogênios, demonstrou aumentou na atividade osteogênica, sugerindo uma ação preventiva nas ratas ovariectomizadas. Futuros estudos poderão contribuir para um maior entendimento da fototerapia, com parâmetros físicos adequados, para suplementar a qualidade do tecido ósseo de idosas osteoporóticas submetidas ao treinamento resistido, além de analisar o fator preventivo da fototerapia associada ao exercício em mulheres de meia-idade.

## Referências Bibliográficas

1. NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis and Therapy (2001) Osteoporosis prevention, diagnosis and therapy. *J Am Med Assoc* 285:785-95
2. Li JY, Tawfeek H, Bedi B, Yang X, Adams J, Gao KY, Zayzafoon M, Weitzmann MN, Pacifici R (2011). Ovariectomy disregulates osteoblast and osteoclast formation through the T-cell receptor CD40 ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(2):768-73
3. Weitzmann MN, Pacifici R (2006) Estrogen deficiency and bone loss: An inflammatory tale. *J Clin Invest* 116(5):1186–1194
4. Al-Mulla F, Leibovich SJ, Francis IM, Bitar MS (2011) Impaired TGF- $\beta$  signaling and a defect in resolution of inflammation contribute to LEDayed wound healing in a female rat model of type 2 diabetes. *Mol Biosyst* 7(11):3006-3020
5. Jiang SD, Yan J, Jiang LS, Dai LY (2011) Down-regulation of the Wnt, estrogen receptor, insulin-like growth factor-I, and bone morphogenetic protein pathways in osteoblasts from rats with chronic spinal cord injury. *Joint Bone Spine* 78(5):488-492
6. Body JJ, Bergmann P, Boonen S, Boutsen Y, Bruyere O, Devogelaer JP, Goemaere S, Hollevoet N, Kaufman JM, Milisen K, Rozenberg S, Reginster JY (2011) Non-pharmacological management of osteoporosis: a consensus of the Belgian Bone Club. *Osteoporos Int* 22(11):2769-2788
7. Luhmann T, Germershaus O, Groll J, Meinel L (2011) Bone targeting for the treatment of osteoporosis. *J Control Release* 8. doi: 10.1016
8. Bocalini DS, Serra AJ, dos Santos L, Murad N, Levy RF (2009) Strength training preserves the bone mineral density of postmenopausal women without hormone replacement therapy. *J Aging Health* 21(3):519-27
9. Zehnacker CH, Bemis-Dougherty A (2007) Effect of weighted exercises on bone mineral density in post menopausal women a systematic review. *J Geriatr Phys Ther* 30(2):79-88
10. Lirani-Galvão AP, Lazaretti-Castro M (2010) Physical approach for prevention and treatment of osteoporosis. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 54(2):171-178

11. Pires-Oliveira DA, Oliveira RF, Amadei SU, Pacheco-Soares C, Rocha RF (2010) Laser 904 nm action on bone repair in rats with osteoporosis. *Osteoporos Int* 21(12):2109-14.
12. Ré Poppi R, Da Silva AL, Nacer RS, Vieira RP, de Oliveira LV, Santos de Faria Júnior N, de Tarso Camilo Carvalho P (2011) Evaluation of the osteogenic effect of low-level laser therapy (808 nm and 660 nm) on bone defects induced in the femurs of female rats submitted to ovariectomy. *Lasers Med Sci* 26(4):515-22
13. Pinheiro AL, Soares LG, Barbosa AF, Ramalho LM, Dos Santos JN (2011) Does LED phototherapy influence the repair of bone defects grafted with MTA, bone morphogenetic proteins, and guided bone regeneration? A description of the repair process on rodents. *Lasers Med Sci* 15. doi: 10.1007/s10103-011-1033
14. Saad A, El Yamany M, Abbas O, Yehia M (2010) Possible role of low level laser therapy on bone turnover in ovariectomized rats. *Endocr Regul* 44(4):155-163
15. Muniz Renno AC, de Moura FM, dos Santos NS, Tirico RP, Bossini PS, Parizotto NA (2006) The effects of infrared-830 nm laser on exercised osteopenic rats. *Lasers Med Sci* 21(4):202-7
16. Renno AC, de Moura FM, dos Santos NS, Tirico RP, Bossini PS, Parizotto NA (2006) Effects of 830-nm laser, used in two doses, on biomechanical properties of osteopenic rat femora. *Photomed Laser Surg* 24(2):202-6
17. Cunha, TS, Tanno AP, Moura MJCS, Marcondes FK (2005) Influence of high-intensity exercise training and anabolic steroid treatment on rat tissue glycogen content. *Life Sci* 77(9):1030-1043
18. Hornberger TA, Farrar RP (2004) Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. *Can J Appl Physiol* 29(1):16–31
19. Cole AA, Walters LM (1987) Tartrate-resistant acid phosphatase in bone and cartilage following decalcification and cold-embedding in plastic. *J Histochem Cytochem* 35(2):203-6
20. Weibel ER, Kistler GS, Scherle WF (1966) Practical stereological methods for morphometric cytology. *J Cell Biol* 30(1): 23–38
21. Bossini PS, Rennó AC, Ribeiro DA, Fangel R, Ribeiro AC, Lahoz M de A, Parizotto NA (2012) Low level laser therapy (830nm) improves bone repair in osteoporotic rats: Similar outcomes at two different dosages. *Exp Gerontol* 47(2):136-42

22. Swift JM, Gasier HG, Swift SN, Wiggs MP, Hogan HA, Fluckey JD, Bloomfield SA (2010) Increased training loads do not magnify cancellous bone gains with rodent jump resistance exercise. *J Appl Physiol* 109(6):1600–1607
23. Vainionpää A, Korpelainen R, Väänänen HK, Haapalahti J, Jämsä T, Leppäluoto J (2009) Effect of impact exercise on bone metabolism. *Osteoporos Int* 20(10):1725-1733.
24. Tu X, Rhee Y, Condon KW, Bivi N, Allen MR, Dwyer D, Stolina M, Turner CH, Robling AG, Plotkin LI, Bellido T (2012) Sost downregulation and local Wnt signaling are required for the osteogenic response to mechanical loading. *Bone* 50(1):209–217
25. Maddalozzo GF, Snow CM (2000) High intensity resistance training: effects on bone in older men and women. *Calcif Tissue Int* 66(6):399-404
26. Parkhouse WS, Coupland DC, Li C, Vanderhoek KJ (2000) IGF-1 bioavailability is increased by resistance training in older women with low bone mineral density. *Mech Ageing Dev* 113(2):75-83
27. Zhang Q, Wastney ME, Rosen CJ, Beamer WG, Weaver CM (2011) Insulin-like growth factor-1 increases bone calcium accumulation only during rapid growth in female rats. *J Nutr* 141(11):2010-2016.
28. Karagounis LG, Yaspelkis III BB, Reeder DW, Lancaster GI, Hawley JA, Coffey VG (2010) Contraction-induced changes in TNF $\alpha$  and Akt-mediated signalling are associated with increased myofibrillar protein in rat skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol* 109(5):839–848
29. Ogawa K, Sanada K, Machida S, Okutsu M, Suzuki K (2010) Resistance exercise training-induced muscle hypertrophy was associated with reduction of inflammatory markers in elderly women. *Mediators Inflamm.* doi:10.1155/2010/171023
30. Smith LL, Anwar A, Fragen M, Rananto C, Johnson R, Holbert D (2000) Cytokines and cell adhesion molecules associated with high-intensity eccentric exercise. *Eur J Appl Physiol* 82(1-2):61–67
31. Westerlind KC, Fluckey JD, Gordon SE, Kraemer WJ, Farrell PA, Turner RT. 1998. Effect of resistance exercise training on cortical and cancellous bone in mature male rats. *J Appl Physiol* 84(2):459-64

32. Caro P, Gómez J, Arduini A, González-Sánchez M, González-García M, Borrás C, Viña J, Puertas MJ, Sastre J, Barja G (2010) Mitochondrial DNA sequences are present inside nuclear DNA in rat tissues and increase with age. *Mitochondrion* 10(5):479-86
33. Baek KH, Oh KW, Lee WY, Lee SS, Kim MK, Kwon HS, Rhee EJ, Han JH, Song KH, Cha BY, Lee KW, Kang MI (2010) Association of oxidative stress with postmenopausal osteoporosis and the effects of hydrogen peroxide on osteoclast formation in human bone marrow cell cultures. *Calcif Tissue Int* 87(3):226-35
34. Karu TI, (2003) Low-power laser therapy in Vo-Dinh, T (ed) *Biomedical Photonics Handbook*. Tennessee
35. Kim YG, Pak SC, Lee SR (2000) Hairless mouse epidermal antioxidants and lipid peroxidation assessed by He-ne laser. *J Photochem Photobiol B: Biol* 27(5):420-426
36. Avni D, Levkovitz S, Maltz L, Oron U (2005) Protection of skeletal muscles from ischemic injury: low-level laser therapy increases antioxidant activity. *Photomed Laser Surg* 23(3):273-277
37. Lubart R, Eichler M, Lavi R, Friedman H, Shainberg A (2005) Low-energy laser irradiation promotes cellular redox activity. *Photomed Laser Surg* 23(1):3-9
38. Shimizu N, Mayahara K, Kiyosaki T, Yamaguchi A, Ozawa Y, Abiko Y (2007) Low-Intensity Laser Irradiation Stimulates Bone Nodule Formation Via Insulin-Like Growth Factor-I Expression in Rat Calvarial Cells. *Lasers Surg Med* 39(6): 551-559
39. Khadra M, Lyngstadaas SP, Haanaes HR, Mustafa K (2005) Effect of laser therapy on attachment, proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells cultured on titanium implant material. *Biomaterials* 26(17):3503-3509

### III. CONCLUSÕES

A LEDT aplicada isoladamente ou associada ao treinamento resistido preveniu a sarcopenia porque aumentou a concentração de IGF-1. A fotobiomodulação nas concentrações de lactato, TNF- $\alpha$  e IL-6 atenuou o declínio na função muscular durante o treinamento resistido de alta intensidade.

A associação da fototerapia ao treinamento resistido em ratas com nível normal de estrogênios demonstrou aumento do volume ósseo em relação ao treinamento isolado. Nas ratas ovariectomizadas o exercício resistido isolado ou combinado à fototerapia preveniu a osteopenia.

A fototerapia associada ao treinamento resistido preveniu o envelhecimento nos tecidos ósseo e muscular.

Futuros estudos poderão avaliar o rendimento físico, massa muscular e densidade óssea em mulheres de meia-idade pós-menopausa ou em idosas submetidas à LEDT associada ao treinamento resistido, empregando duas doses de energia (120 J/cm<sup>2</sup> e 60J/cm<sup>2</sup>) para analisar as respostas fisiológicas da luz no tecido ósseo e muscular.

#### IV. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ahmed MS, Matsumura B, Cristian A. Age-related changes in muscle and joints. *Phys Med Rehabil Clin N Am*. 2005; 16(1): 19-39.
2. Aoi W, Naito Y, Takanami Y, Kawai Y, Sakuma K, Ichikawa H, Yoshida N, Yoshikawa T. Oxidative stress and LEDayed-onset muscle damage after exercise. *Free Radic Biol Med*. 2004; 37(4): 480-87.
3. Bagnato VS. *Uso de LED (Light Emitting Diodes) para terapia bioestimuladora*. BR n. PI0200200-0, 23 jan 2002; 14 out. 2003.
4. Banu J, Varela E, Fernandes G. Alternative therapies for the prevention and treatment of osteoporosis. *Nutrition Reviews*. 2012; 70: 22–40. doi: 10.1111/j.1753-4887.2011.00451.x
5. Bauer JM, Sieber CC. Sarcopenia and frailty: a clinician's controversial point of view. *Exp Gerontol*. 2008; 43(7): 674–8.
6. Bunout D, Barrera G, de la Maza MP, Leiva L, Backhouse C, Hirsch S. Effects of enalapril ou nifedipine on muscle strength or functional capacity in elderly subjects. A double blind trial. *J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2009; 10(2): 77-84.
7. Castano AP, Dai T, Yaroslavsky I, Cohen R, Apruzzese WA, Smotrich MH, Hamblin MR. Low-level laser therapy for zymosan-induced arthritis in rats: Importance of illumination time. *Laser Surg Med*. 2007; 39(6): 543-550.
8. Christiansen, C. Osteoporosis: diagnosis and management today and tomorrow. *Bone*. 1995; 17(5): 513-16.
9. Corazza AV, Jacks J, Kurachi C, Bagnato VS. Photobiomodulation on the Angiogenesis of SkinWounds in Rats Using Different Light Sources. *Photomed Laser Surg*. 2007; 25(2): 102–6.
10. Cressoni MD, Giusti HH, Pião AC, de Paiva Carvalho RL, Anaruma CA, Casarotto RA. Effect of GaAlAs laser irradiation on the epiphyseal cartilage of rats. *Photomed Laser Surg*. 2010; 28(4): 527-32.
11. de Salles BF, Simão R, Fleck SJ, Dias I, Kraemer-Aguiar LG, Bouskela E. Effects of Resistance Training on Cytokines. *Int J Sports Med*. 2010; 31: 441-50.

12. Douris P, Southard V, Ferrigi R, Grauer J, Katz D, Nascimento C, Podblielski P. Effect of phototherapy on delayed onset muscle soreness. *Photomed. Laser Surg.* 2006; 24(3): 377-82.
13. Enns DL, Tiidus PM. Estrogen influences satellite cell activation and proliferation following downhill running in rats. *J Appl Physiol.* 2008; 104(2): 347-53.
14. Garrido R, Menezes PR. Perspectivas epidemiológica de envelhecimento. *Rev Bras Psiquiatr.* 2002; 24(Supl I): 3-6.
15. Goldspink, G. Loss of muscle strength during aging studied at the gene level. *Rejuvenation Res.* 2007; 10: 397-405.
16. Hakkinen K, Pakarinen A, Kraemer WJ, Häkkinen A, Valkeinen H, Alen M. Selective muscle hypertrophy, changes in EMG and force, and serum hormones during strength training in older women. *Journal Applied Physiology.* 2001; 91: 569-80.
17. Hallberg L, Rossander-Hultén L, Brune M, Glerup A. Calcium and iron absorption: mechanism of action and nutritional importance. *Eur J Clin Nutr.* 1992; 46(5): 317-27.
18. Hawke TJ, Garry DJ. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol.* 2001; 91(2): 534-51.
19. Iannetta O. Osteoporose: Uma ex-enfermidade silenciosa. Ribeirão Preto: Tecmedd; 2006.
20. Inouye K, Pedrazzani ES, Pavarini, SCI. Octogenários e cuidadores: perfil sócio-demográfico e correlação da variável qualidade de vida. *Texto contexto – enferm.* 2008; 17(2): 350-7.
21. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Sinopse do Censo Demográfico de 2010. Rio de Janeiro (RJ): IBGE; 2010 [acesso em 2012 Mar 09]. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010>.
22. Janssen I, Shepard DS, Katzmarzyk PT, Roubenoff R. The healthcare costs of sarcopenia in the United States. *J Am Geriatr Soc.* 2004; 52(1): 80-5.
23. Jugdutt, BI. Prevention of heart failure in the elderly: when, where and how to begin? *Heart Fail Ver.* 2012; 21. doi: 10.1007/s10741-012-9299-x.
24. Karagounis LG, Yaspelkis III BB, Reeder DW, Lancaster GI, Hawley JA, Coffey VG. Contraction-induced changes in TNF $\alpha$  and Akt-mediated signalling

- are associated with increased myofibrillar protein in rat skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol.* 2010; 109(5): 839–48.
25. Karu TI. Low-power laser therapy in VO-DINH, T (Ed). *Biomedical Photonics Handbook*. Ed. CRC PRESS: Tennessee; 2003.
  26. Kim YG, Pak SC, Lee SR. Hairless mouse epidermal antioxidants and lipid peroxidation assessed by He-ne laser. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 2000; 27: 420-6.
  27. Kortebein P, Ferrando A, Lombeida J, Wolfe R, Evans WJ. Effect of 10 days of bed rest on skeletal muscle in healthy older adults. *JAMA.* 2007; 297(16): 1772–4.
  28. Lamberts SW, van den Beld AW, van der Lely AJ. The endocrinology of aging. *Science.* 1997. 278(5337): 419-24.
  29. Lambertucci RH, Levada-Pires AC, Rossoni LV, Curi R, Pithon-Curi TC. Effects of aerobic exercise training on antioxidant enzyme activities and mRNA levels in soleus muscle from young and aged rats. *Mech Ageing.* 2007. 128(3): 267-75.
  30. Lanzillotti HS, Lanzillotti RS, Trotte APR, Dias AS, Bornand B, Costa EAMM. Osteoporosis in postmenopausal women, dietary calcium and other risk factors. *Rev Nutr Campinas.* 2003; 16(2): 181-93.
  31. Leal Jr EC, de Godoi V, Mancalossi JL, Rossi RP, de Marchi T, Parente M, Grosselli D, *et al.* Comparison between cold water immersion therapy (CWIT) and light emitting diode therapy (LEDT) in short-term skeletal muscle recovery after high-intensity exercise in athletes-preliminary results. *Lasers Med Sci.* 2010; 26(4): 493-501.
  32. Leal Jr EC, Lopes-Martins RA, Broni BM, de Marchi T, Rossi RP, Grossilli D, Generosi RA, de Godoi V, Basso M, Mancalossi JL, Bjordal JM. Comparison Between Single-Diode Low-Level Laser Therapy (LLLT) and LED Multi-Diode (Cluster) Therapy (LEDT) Applications Before High-Intensity Exercise. *Photomed Laser Surg.* 2009; 27(4): 617-3.
  33. Lirani-Galvão AP, Lazaretti-Castro M. Physical approach for prevention and treatment of osteoporosis. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2010; 54(2):171-8.
  34. Lopes-Martins RA, Marcos RL, Leonardo PS, Prianti AC Jr, Muscará MN, Aimbire F, Frigo L, Iversen VV, Bjordal JM. Effect of low-level laser (Ga-Al-

- As 655 nm) on skeletal muscle fatigue induced by electrical stimulation in rats. *J Appl Physiol.* 2006; 101: 283–8.
35. Malafarina V, Uriz-Otano F, Iniesta R, Gil-Guerrero L. Sarcopenia in the elderly: Diagnosis, physiopathology and treatment. *Maturitas.* 2012; 71(2):109-14.
  36. Martinelli Jr. CE, Oliveira CRP, Brito AVO, Costa FO, Silva PRC, Serpa MG, Aguiar-Oliveira MH. Diagnostico da Deficiência de Hormônio de Crescimento, a Rigor de IGF-I. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2002; 46(1): doi:10.1590/S0004-27302002000100005.
  37. Mesquita-Ferrari RA, Martins MD, Silva JA Jr, da Silva TD, Piovesan RF, Pavesi VC, Bussadori SK, Fernandes KP. Effects of low-level laser therapy on expression of TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  in skeletal muscle during the repair process. *Lasers Med Sci.* 2011; 26(3): 335–40.
  38. Muniz-Renno AC, de Moura FM, dos Santos NS, Tirico RP, Bossini PS, Parizotto NA. The effects of infrared-830 nm laser on exercised osteopenic rats. *Lasers Med Sci.* 2006; 21(4): 202-7.
  39. Nakano J, Kataoka H, Sakamoto J, Origuchi T, Okita M, Yoshimura T. Low-level laser irradiation promotes the recovery of atrophied gastrocnemius skeletal muscle in rats. *Exp Physiol.* 2009; 94(9): 1005–15.
  40. Oliveira MT, Garesse R, Kaguni LS. Animals models of mitochondrial DNA transactions in disease and ageing. *Exp Gerontol.* 2010; 45(7-8): 489-502.
  41. Paolillo FR, Milan JC, Aniceto IV, Barreto SG, Rebelatto JR, Borghi-Silva A, Parizotto NA, Kurachi C, Bagnato VS. Effects of infrared-LED illumination applied during high-intensity treadmill training in postmenopausal women. *Photomed Laser Surg.* 2011; 29(9): 639-645.
  42. Perrini S, Laviola L, Carreira MC, Cignarelli A, Natalicchio A, Giorgino F. The GH/IGF1 axis and signaling pathways in the muscle and bone: mechanisms underlying age-related skeletal muscle wasting and osteoporosis. *J Endocrinol.* 2010; 205(3): 201-10.
  43. Petrofsky JS, Hendershot DM. The interrelationship between blood pressure, intramuscular pressure, and twitch skeletal muscle in the cat. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1984; 53(2):106-11.
  44. Pinheiro AL, Soares LG, Barbosa AF, Ramalho LM, Dos Santos JN. Does LED phototherapy influence the repair of bone defects grafted with MTA, bone

- morphogenetic proteins, and guided bone regeneration? A description of the repair process on rodents. *Lasers Med Sci.* 2011; 15: doi: 10.1007/s10103-011-1033-8.
45. Pires D, Xavier M, Araújo T, Silva JAJr, Aimbire F, Albertini R. Low-level laser therapy (LLLT; 780 nm) acts differently on mRNA expression of anti- and pro-inflammatory mediators in an experimental model of collagenase-induced tendinitis in rat. *Lasers Med Sci.* 2011; 26(1): 85–94.
  46. Pöntinen PJ; Aaltokallio T, Kolari PJ. Comparative effects of exposure to different light sources (He-Ne laser, InGaAl Diode laser, a specific type of noncoherent LED) on skin blood flow for the head. *Acupuncture and Electro-Therapeutics Research.* 1996; 21(2): 105-18.
  47. Prince R, Devine A, Dick I, Criddle A, Kerr D, Kent N, Price R, Randell A. The effects of calcium supplementation (milk powder or tablets) and exercise on bone density in postmenopausal women. *J Bone Miner Res.* 1995; 10(7): 1068-75.
  48. Riggs BL, Khosia S, Melton LJ. A unitary model for involutional osteoporosis: estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. *J Bone Miner Res.* 1998; 13(5): 763-73.
  49. Rizzi EC, Issa JP, Dias FJ, Leão JC, Regalo SC, Siéssere S, Watanabe IS, Iyomasa MM. Low-Level Laser Intensity Application in Masseter Muscle for Treatment Purposes. *Photomed Laser Surg.* 2010; 28(2): 31-5.
  50. Roubenoff R. Sarcopenia and its implications for the elderly. *Eur J Clin Nutr.* 2000; 54(Suppl. 3): 40–7.
  51. Rosenberg IH. Sarcopenia: Origins and Clinical Relevance. *Clinics in Geriatric Medicine.* 2011; 27(3): 337-9.
  52. Russo LAT. Osteoporose Pós-Menopausa: Opções Terapêuticas. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia.* 2001; 45(4): 401-6.
  53. Saad A, El Yamany M, Abbas O, Yehia M. Possible role of low level laser therapy on bone turnover in ovariectomized rats. *Endocr Regul.* 2010; 44(4): 155-63.
  54. Saygun I, Karacay S, Serdar M, Ural AU, Sencimen M, Kurtis B. Effects of laser irradiation on the release of basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin

- like growth factor-1 (IGF-1), and receptor of IGF-1 (IGFBP3) from ingival fibroblasts. *Lasers Med Sci.* 2008; 23(2): 211–5.
55. Schindl A, Schindl M, Schön H, Knobler R, Havelec L, Schindl L. Low-intensity laser irradiation improves skin circulation in patients with diabetic microangiopathy. *Diabetes Care.* 1998; 21(4): 580-4.
56. Seene T, Kaasik P, Alev K, Pehme A, Riso EM. Composition and turnover of contractile proteins in volume-overtrained skeletal muscle. *Int J Sports Med.* 2004; 25(6): 438-45.
57. Sussai DA, Carvalho PTC, Dourado DM, Belchior AC, dos Reis FA, Pereira DM. Low-level laser therapy attenuates creatine kinase levels and apoptosis during forced swimming in rats. *Lasers Med Science.* 2010; 25(1): 115-20
58. Shimizu N, Mayahara K, Kiyosaki T, Yamaguchi A, Ozawa Y, Abiko Y. Low-Intensity Laser Irradiation Stimulates Bone Nodule Formation Via Insulin-Like Growth Factor-I Expression in Rat Calvarial Cells. *Lasers Surg Med.* 2007; 39(6): 551-59.
59. Silva TAA, Frisoli Júnior A, Pinheiro MM, Szejnfeld VL. Sarcopenia associada ao envelhecimento: aspectos etiológicos e opções terapêuticas. *Rev Bras Reumatol.* 2006; 46(6): 391-6.
60. Solerte SB, Gazzaruso C, Bonacasa R, Rondanelli M, Zamboni M, Basso C, Locatelli E, Schifino N, Giustina A, Fioravanti M. Nutritional supplements with oral amino acid mixtures increases whole-body lean mass and insulin sensitivity in elderly subjects with sarcopenia. *Am J Cardiol.* 2008; 101(11A): 69–77.
61. St. Pierre Schneider B, Correia LA, Cannon JG. Sex differences in leukocyte invasion in injured murine skeletal muscle. *Res Nurs Health.* 1999; 22(3): 243-50.
62. Thomas DR. Sarcopenia. *Clin Geriatr Med.* 2010; 26(2): 331–46.
63. Tu X, Rhee Y, Condon KW, Bivi N, Allen MR, Dwyer D, Stolina M, Tuner CH, Robling AG, Plotkin LI, Bellido T. Sost downregulation and local Wnt signaling are required for the osteogenic response to mechanical loading. *Bone.* 2012. 50: 209–17.

64. Vink EM, Cagnie BJ, Cornelissen MJ, Declereq HA, Cambier DC. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. *Lasers Med Sci.* 2003; 18(2): 95-99.
65. Visser M, Schaap LA. Consequences of sarcopenia. *Clin Geriatr Med.* 2011; 27(3): 401-21.
66. Whelan HT, Smits RL, Buchman EV, Whelan NT, Turner SG, Margolis DA, Cevenini V, Stinson H, Ignatius R, Martin T, Cwiklinsk J, Philippi AF, Graf WR, Hodgson B, Gould L, Kane M, Chen G, Caviness J. Effect of NASA light-emitting diode irradiation on wound healing. *J.Clin. Laser Med Surg.* 2001; 19(6): 305-14.

## V. ANEXOS

### Anexo 1



CEUA/Unicamp

#### Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

#### CERTIFICADO

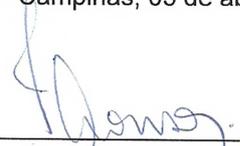
Certificamos que o Protocolo nº 2115-1, sobre "Estudo associativo do LED (Light Emitted Diode) de baixa intensidade e do exercício em ratas ovariectomizadas", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Paulo Henrique Ferreira Caria / Adalberto Vieira Corazza, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em 05 de abril de 2010.

#### CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 2115-1, entitled "Associative study of the LED (Light Emitted Diode) of low intensity to resistive exercise in ovariectomized rats", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on April 5, 2010.

Campinas, 05 de abril de 2010.

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP  
Caixa Postal 6109  
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359  
E-mail: [comisib@unicamp.br](mailto:comisib@unicamp.br)  
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

## Anexo 2

### Comprovante de submissão do artigo

Experimental Gerontology

Contact us Help ?

home | main menu | submit paper | guide for authors | register | change details | log out

Username: corazza  
Role: Author

Version: EES

Submissions Being Processed for Author Adalberto Vieira Corazza

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
<a href="#">Action Links</a>	EXG-12-32	Phototherapy and Resistance Training Prevent Sarcopenia in Ovariectomized Rats	Feb 15, 2012	Feb 16, 2012	With Editor

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Dear Dr. Corazza,

Your submission entitled "Phototherapy and Resistance Training Prevent Sarcopenia in Ovariectomized Rats" has been received by Experimental Gerontology. Your manuscript will soon be given a reference number.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/exg/>.

Your username is: corazza

If you need to retrieve password details, please go to: [http://ees.elsevier.com/exg/automail\\_query.asp](http://ees.elsevier.com/exg/automail_query.asp)

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System

Experimental Gerontology

## VI. APÊNDICE

### Descrição do Procedimento Experimental

#### 1. Amostra

Setenta ratas (Wistar) com 12 meses de idade e massa corpórea entre 295 a 330g, foram mantidas em gaiolas coletivas (5 ratas por gaiola), em sala climatizada ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e fotoperíodo controlado de 12 horas. A idade de 12 meses foi adotada neste estudo para justificar uma semelhança temporal com a mulher de meia-idade (40 anos) e proporcionar deficiências metabólicas comuns a esta idade. Os animais receberam ração comercial e água filtrada *ad libitum*. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA - IB - UNICAMP / protocolo no. 2115-1) e foi conduzido conforme as normas do Colégio Brasileiro em Experimentação Animal (COBEA).

#### 2. Ovariectomia

Para simular a menopausa e avaliar seus efeitos hormonais no tecido muscular e ósseo, as ratas foram anestesiadas com quetamina/xilazina (47,5/12 mg/Kg, IM). A parede muscular foi divulsionada até ter acesso à cavidade abdominal, localizando-se o ovário em meio a uma massa gordurosa. A remoção bilateral dos ovários foi efetuada após ligadura da extremidade da tuba uterina (catgut 4,0), seccionando-se entre a ligadura e o ovário. A fenda foi fechada por planos. A eficiência do procedimento cirúrgico foi verificada por dissecação “pós morte” por meio da atrofia das tubas uterinas (Fig. 1). As ratas foram divididas aleatoriamente em 7 grupos (n=10): controle-sedentária ovariectomizada (CO), controle-sedentária sem-ovariectomia (CS), LEDT em sedentária ovariectomizada (LOV), exercitada ovariectomizada (EOV), exercitada sem-ovariectomia (ES), LEDT e exercitadas ovariectomizada (LEO) e LEDT e exercitadas sem-ovariectomia (LES).

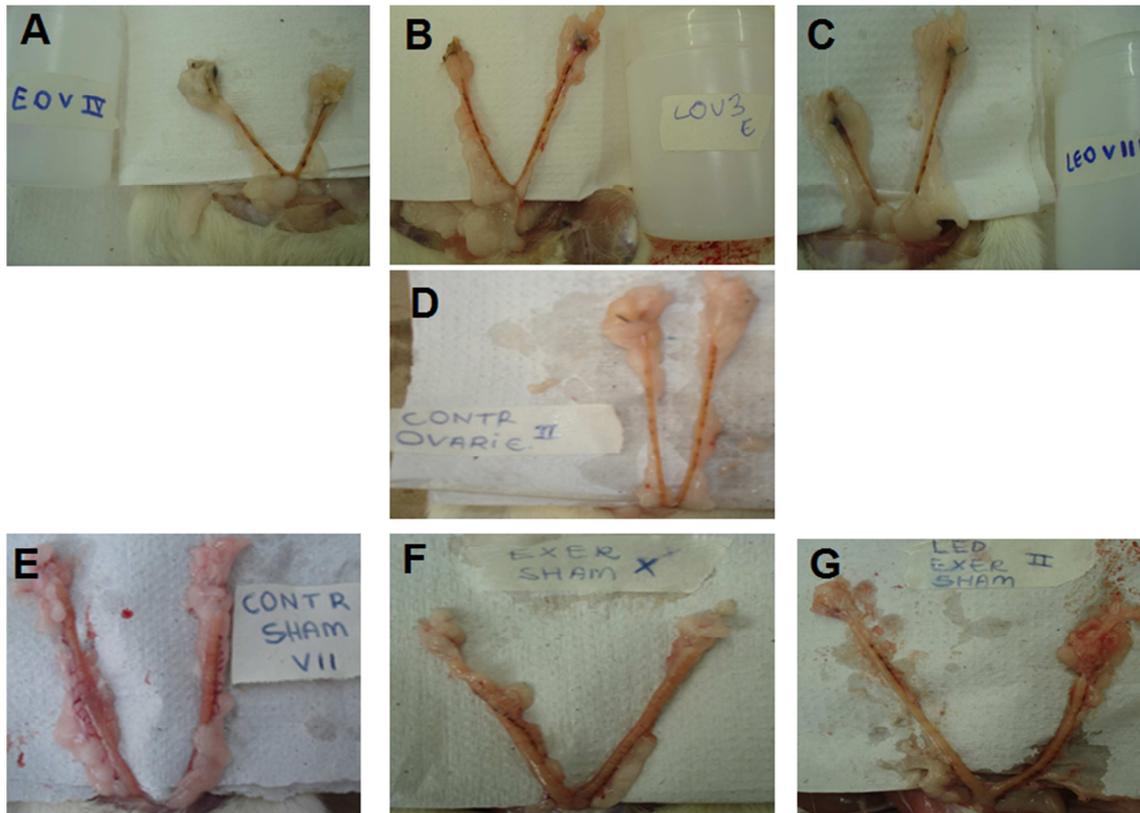


Figura 1: Tubas uterinas das ratas referentes aos grupos do estudo: **A)** Exercitada ovariectomizada (EOV); **B)** LEDT em ratas sedentárias ovariectomizadas (LOV); **C)** LEDT em ratas Exercitadas ovariectomizada (LEO); **D)** controle-sedentária ovariectomizada (CO); **E)** controle-sedentária sem-ovariectomia (CS); **F)** Exercitada sem-ovariectomia (ES); **G)** LEDT e Exercitadas sem-ovariectomia (LES).

### 3. LED Terapia

O protótipo LED foi desenvolvido especialmente para este estudo no Instituto de Física de São Carlos – USP. O LED foi ajustado em 100 mW, com intensidade de 200 mW/cm<sup>2</sup>, em modo contínuo e faixa espectral de 850 ± 10 nm, com uma área do feixe de luz de 0,5 cm<sup>2</sup> (Fig. 2A). A fototerapia teve início 12 dias após a ovariectomia. A dose de energia de 120 J/cm<sup>2</sup> [16] ou energia total de 60 J foi aplicada em único ponto com contato direto por 10 minutos no centro do trocanter maior do fêmur direito, a cada 48 horas durante 12 semanas (Fig. 2B). Este ponto foi localizado por palpação e remarcado a cada semana. Nos grupos LEO e LES a fototerapia foi aplicada imediatamente após o treinamento. Respeitando as normas de biossegurança internacional, o terapeuta utilizou óculos de proteção para irradiação fototerapêutica e filme de PVC na ponteira do equipamento.



**Figura 2:** LED Terapia A) Equipamento LED. B) Local e ponto de tratamento.

#### ***4. Protocolo de Treinamento***

Os animais foram submetidos ao treinamento resistido com sessões de levantamento de peso no interior de um cilindro (75 cm de altura e 30 cm de diâmetro) com água a  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , três vezes por semana durante 12 semanas. Uma mochila com bolas de chumbo no seu interior foi acoplada ao corpo do animal de acordo com sua massa corporal (Fig. 3). Após 12 dias da ovariectomia os animais foram adaptados (uma semana em período de adaptação) ao protocolo de treinamento de exercícios na água três vezes por semana, com 30 segundos de repouso entre cada série, com aumento gradativo do número de séries (2 para 4) e repetições (5 para 10) (Tab. 1). A massa corpórea dos animais foi mensurada nos seguintes períodos: pré-operatório (12 dias antes do treinamento resistido), adaptação (uma semana) e nos últimos dias da 1<sup>a</sup> até a 12<sup>a</sup> semana de treinamento resistido. Foi utilizado o protocolo modificado de Hornberger e Farrar com a sobrecarga de treinamento (chumbo na mochila) adequada para o ciclo de treinamento. A sobrecarga de treinamento foi proporcional a sua massa corporal (Tab. 1), sendo 50% (1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> semanas), 60% (3<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> semanas), 70% (3<sup>a</sup> e 10<sup>a</sup> semanas) e 80% (11<sup>a</sup> e 12<sup>a</sup> semanas). Houve aumento da altura da coluna de água em 30 cm (1<sup>a</sup> semana), 35 cm (2<sup>a</sup> semana) e 40 cm (a partir da 3<sup>a</sup> semana). Vinte quatro horas após a aplicação do protocolo, os animais foram decapitados, sendo os músculos retos femorais e os fêmures removidos para análises laboratoriais. A atrofia das tubas uterinas também foi verificada nessa etapa.

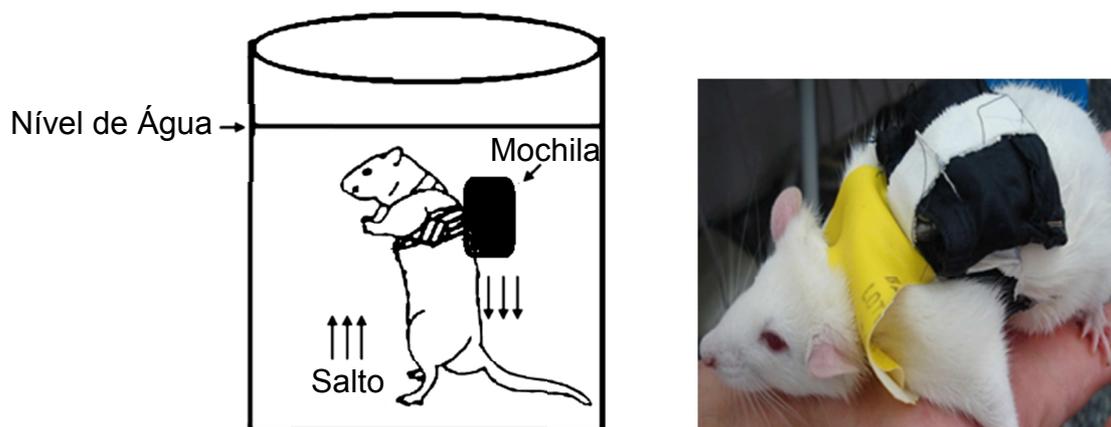


Figura 3: Modelo demonstrando o protocolo de salto. Figura adaptada de Muniz-Renno (2006).

Semana de Treinamento	Treinamento	Sobrecarga (% massa corporal)	Altura da coluna de água (cm)
Adaptação	1º dia: 2 séries de 5 saltos. 2º dia: 3 séries de 7 saltos. 3º dia: 4 séries de 9 saltos.	50	30
1ª e 2ª	4 séries de 10 saltos	50	35
3ª a 6ª	4 séries de 10 saltos	60	40
7ª a 10ª	4 séries de 10 saltos	70	40
11ª a 12ª	4 séries de 10 saltos	80	40

**Tabela 1:** Evolução do percentual de sobrecarga em relação à massa corporal nas semanas de treinamento.

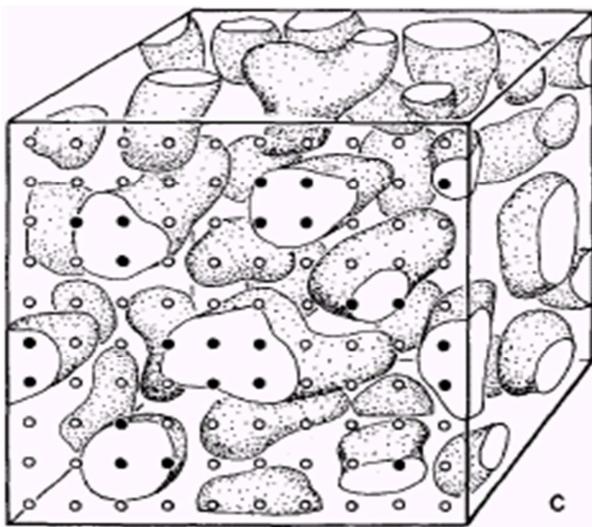
## 5. Parâmetros avaliados

### 5.1. Histomorfometria

#### 5.1.2. Músculo Reto Femoral

O terço médio do músculo reto femoral direito foi removido e colocado em solução de formaldeído tamponada a 10% durante 24 h. As amostras dos tecidos foram incluídos em blocos de parafina e cortados em 5 micrometros, corados com

hematoxilina e eosina e examinadas por microscopia de luz (Axioskop 2 Plus, Zeiss, Jena, Alemanha) acoplado a uma câmara digital (DFC280, Leica, Alemanha). As imagens (ampliação de 20X) foram processadas usando software IM50 (Leica, Germany). As frações de volume do músculo em porcentagem (Fig. 3) foram determinados de acordo com os princípios estereológicas de Weibel et al. (1966) usando um sistema de análise de imagem (Image-Pro, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA) e um retículo digital com 667 intersecções (Fig. 4). Para a análise foi determinado um campo central e dois marginais em relação ao eixo transverso do terço médio do músculo.



$$V_{Vn} = P_n / P_t$$

$P_n$  = número de pontos de intersecção

$P_t$  = número total de pontos do retículo

$$V_{Vn} (\%) = (P_n / P_t) \times 100$$

Figura 5: Método estereológico de histomorfometria para determinar a fração de volume muscular ( $V_{Vn}$ ). Para a transformação em porcentagem ( $V_{Vn} \%$ ) multiplica-se por 100 o valor da fração de volume muscular ( $V_{Vn}$ ).

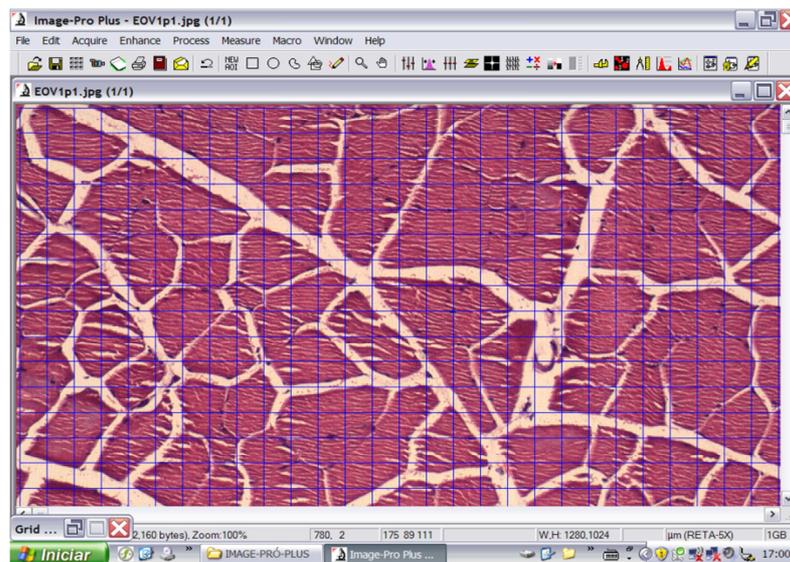
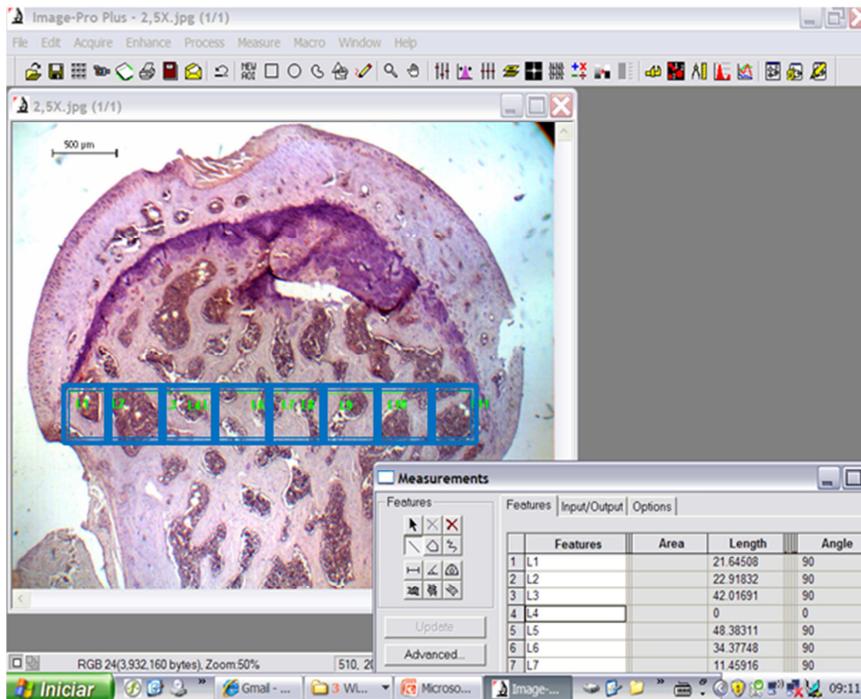


Figura 4: Software Image-Pro Plus com retículo digital de 667 intersecções

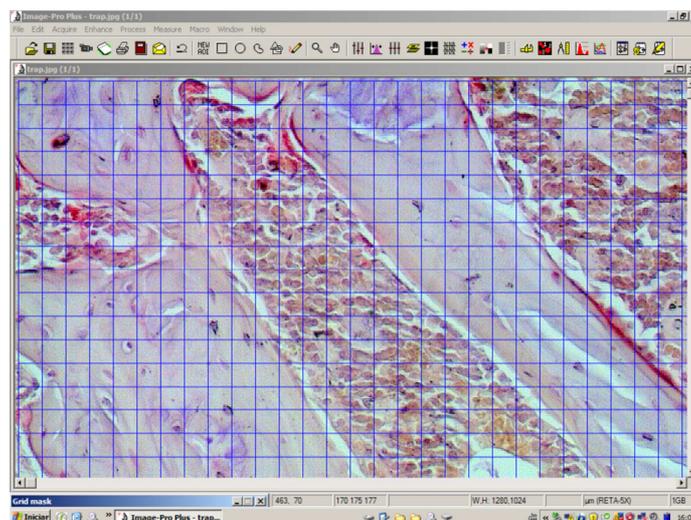
### **5.1.2. Cabeça do Fêmur**

Os fêmures dos ratos foram removidos e fixados em solução modificada de Karnovsky (4% de paraformaldeído e 2,5% de glutaraldeído) por 6 horas. Em seguida, os fêmures foram descalcificados em uma solução contendo 5% de ácido etileno diamina tetra acético (EDTA) por 45 dias. Após completar a desmineralização, o fêmur foi cortado longitudinalmente do trocanter maior, seguindo o colo até a fóvea da cabeça do fêmur e emblocado em paraplást, os quais foram feitos cortes seriados com 5 µm de espessura. Os cortes seriados foram corados com hematoxilina e eosina (HE) e analisados em microscopia de luz (Axioskop 2 plus, Zeiss, Jena, Germany), com uma câmera digital DFC280 (Leica<sup>®</sup>, Germany) acoplada ao sistema. As imagens foram obtidas pelo software IM50 (Leica<sup>®</sup>, Germany) em um aumento de 2,5X para mensurar a separação e espessura trabecular. No aumento de 20X foi medida a fração de volume do osso trabecular em porcentagem (VO/VT%) e o número de osteoclastos TRAP (fosfatase ácida tartarato-resistente) positivos segundo metodologia de Cole et al. (1987).

A fração de volume trabecular do fêmur (Fig. 6) e o número de osteoclastos (Fig. 7) foram realizadas por sistema de análise de imagem (Image-Pro<sup>®</sup>, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) em oito campos a partir de 1 mm abaixo da placa epifisária e utilizado um retículo digital de 667 pontos de acordo com os princípios de Weibel et al., (1966). A espessura e separação trabecular foram medidas em linha reta, de um extremo ao outro da placa epifisária (Fig. 6).



**Figura 6:** Software Image-Pro Plus para mensurar espessura e separação trabecular (linhas verdes) e a fração de volume muscular (8 quadrados azuis)



**Figura 7:** Software Image-Pro Plus com retículo digital de 667 intersecções para mensurar osteoclastos identificados em vermelho pelo método TRAP.

### 2.5.2. IGF-1 e citocinas

As amostras dos músculos foram coletadas na coxa direita (terço médio do músculo reto femoral) 24 h após o término do protocolo (12 semanas). Os músculos foram congelados e armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Antes da análise, as amostras foram descongeladas e cortada em cubos ( $\pm 1,52$  g), sendo o cubo de cada animal macerado

em nitrogênio líquido e depois ressuspensão em 5 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS). As amostras foram realizadas em triplicata em todos os ensaios descritos a seguir.

### **2.5.2.1. IGF-1**

A concentração de IGF-1 no músculo reto femoral foi mensurada usando um *kit* ELISA (Peptotech Inc., Rock Hill, NJ, USA), quantitativo de alta sensibilidade (variação: 62-6000 pg/mL), de acordo com as instruções do fabricante.

### **2.5.2.2. IL-1, IL-6, e TNF- $\alpha$**

A concentração de citocina muscular foi analisada utilizando *kit* ELISA (Peptotech Inc., Rock Hill, NJ, USA) com absorbância medida em 450 nm em um leitor de microplaca (ELX 800, Bio-Tek Instruments, Winooski, Vermont, USA). As variações da sensibilidade do leitor nas concentrações de IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  foram respectivamente de 16-1000 pg/mL, 62-8000 pg/mL e 63-3000 pg/mL.



**Figura 8:** Leitor de Microplaca Bio-Tek Instruments, ELX 800

### **2.5.3. Concentração de Lactato**

As amostras sanguíneas (25  $\mu$ L) foram imediatamente coletadas antes (pré-treinamento) e após (pós-treinamento) o treinamento resistido por punção na extremidade do rabo do rato, nos seguintes tempos de análises: pré-cirurgia (12 dias antes de iniciar o protocolo), após a semana de adaptação e nos últimos dias da 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup>, 10<sup>a</sup> e 12<sup>a</sup> semanas de treinamento resistido. A análise da concentração de lactato ( $\text{mmol.L}^{-1}$ ) foi realizada por lactímetro (Model 1500 Sport Lactate Analyzer, Yellow Springs Instrument Co., Yellow Springs, OH, USA) (Fig. 9).



Figura 9: Lactímetro Yellow Springs Instrument Co – Modelo 1500

## 6. Análise Estatística

Os testes de Levene e Shapiro-Wilk foram utilizados para observar a homogeneidade de variância e distribuição dos dados, respectivamente. A fração de volume trabecular, espessura e separação trabecular do fêmur das ratas dos grupos do estudo foram analisadas pela análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey. Foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis para comparar o número de osteoclastos entre os grupos. Foi utilizado o software BioEstat 5.0 (Fundação Mamirauá, Bélem, PA, Brazil) para realizar as análises, com nível de significância de 5%.

## Referências dos Materiais e Métodos

- Cole AA, Walters LM (1987) Tartrate-resistant acid phosphatase in bone and cartilage following decalcification and cold-embedding in plastic. *J Histochem Cytochem* 35(2):203-6.
- Cunha, TS, Tanno AP, Moura MJCS, Marcondes FK (2005) Influence of high-intensity exercise training and anabolic steroid treatment on rat tissue glycogen content. *Life Sci* 77(9):1030-1043.
- Muniz Renno AC, de Moura FM, dos Santos NS, Tirico RP, Bossini PS, Parizotto NA (2006) The effects of infrared-830 nm laser on exercised osteopenic rats. *Lasers Med Sci* 21(4):202-7.
- Hornberger TA, Farrar RP (2004) Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. *Can J Appl Physiol* 29(1):16–31.
- Weibel ER, Kistler GS, Scherle WF (1966) Practical stereological methods for morphometric cytology. *J Cell Biol* 30(1): 23–38.