

BÁRBARA BRAGA FERNANDES

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES TIPOS DE EXERCÍCIO SOBRE PARÂMETROS
ÓSSEOS EM RATAS OVARIECTOMIZADAS E INTEIRAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Educação Física, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

BÁRBARA BRAGA FERNANDES

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES TIPOS DE EXERCÍCIO SOBRE PARÂMETROS
ÓSSEOS EM RATAS OVARIETOMIZADAS E INTEIRAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Educação Física, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 05 de fevereiro de 2010.

Profª. Maria do Carmo Gouveia Peluzio
(Coorientadora)

Prof. Ricardo Junqueira Del Carlo
(Coorientador)

Prof. Mário Jefferson Quirino Louzada

Prof. Sérgio Luis Pinto da Matta

Prof. Antônio José Natali
(Orientador)

A Deus por iluminar sempre o meu caminho.

Aos meus pais, pelas minhas origens.

Aos meus irmãos, pela amizade.

Ao meu namorado e amigo, pelo nosso amor.

Para os fracos, é o inatingível.

Para os temerosos, o desconhecido.

Para os valentes, a oportunidade.

(Victor Hugo)

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, que esteve sempre ao meu lado, iluminando o meu caminho e me amparando sempre que precisava, dando-me forças para continuar acreditando que este dia chegaria.

Aos meus pais Eduardo e Fátima exemplo de força e perseverança, pelo amor incondicional, que sempre acreditaram em mim e por me lembrarem sempre das minhas origens.

Aos meus irmãos Raniery e Michel, pela nossa amizade e por me apoiarem sempre.

Ao meu amor Hugo, pelo grande homem que está sempre ao meu lado, pelo amor, carinho, paciência, amizade e companheirismo, por nunca me deixar desistir.

A todos os meus familiares pelas constantes orações.

Ao José Renato, Imaculada e Iara que sempre torceram para que este sonho se tornasse realidade.

Ao professor e orientador Antônio José Natali, pela oportunidade, pelo exemplo de ética, serenidade, competência, pelos ensinamentos e palavras ditas nos momentos certos e pela sua admirável humildade.

À professora Maria do Carmo Gouveia Peluzio, por ser minha coorientadora, por ser sempre atenciosa e por ceder seu laboratório para a realização de algumas análises.

Ao professor Ricardo Junqueira Del Carlo por ser meu coorientador, pelo exemplo de competência, ética, pelos grandes ensinamentos e por ser tão atencioso.

À professora Tânia Toledo de Oliveira, pelo apoio nas análises realizadas no Laboratório Biofármaco.

Ao professor Carlos Henrique Osório Silva meu coorientador, pela atenção e pelos ensinamentos prestados.

Ao professor Mário Jefferson Quirino Louzada, por ter aceitado meu convite, por ser simpático e prestativo, disponibilizando seu laboratório, “suas orientadas” e sua boa vontade tornando as coisas muito mais simples.

Ao professor Sérgio Luis Pinto da Matta, por ter aceitado meu convite e por ser essa “figura” simpática.

Aos companheiros de laboratório Ricardo e Cassiano (Nutrição), Adão e Cláudio (Veterinária), Carlos Cardoso (representante da Beckman Coulter do Brasil), Sr. Adão e Juliano (Biotério Central) e Naldo (Bioagro) pela indiscutível colaboração.

As novas amigas Bruna e Priscila (Araçatuba-SP) pela paciência, boa vontade, generosidade, pelos momentos de descontração, pela amizade construída em pouco tempo, vocês são mesmo uma “benza”.

Ao grande amigo Lucas Rios, pelos momentos de trabalho, companheirismo e amizade.

Aos meus amigos Juliana e Miguel que sempre acreditaram que eu era capaz, pelos conselhos, desabafos, sorrisos e por nossa amizade desde 2001.

Aos amigos Márcia e Bruno que iniciaram junto comigo esta caminhada em busca de um mesmo sonho.

Às velhas e grandes amigas Danielle, Mayra, Nara e Sabrina pela nossa eterna amizade.

Aos amigos Cynthia, Karina, Luís Bozi, Judson, Victor, Natália, Aurora, Pedro, Ângela, Regiane, Felipe Rios, Mayra, Felipe Belfort, Lucas e Luciano pela nossa convivência, pelos momentos de trabalho, pelo lazer e pelas novas amizades.

Ao grande amigo e conselheiro professor Frederico Franco pela paciência, pelo conhecimento passado, pelo trabalho e por nossa amizade.

Aos meus queridos alunos de Personal, pelo incentivo e pela paciência.

À melhor equipe de veterinários, Ana Flora, Betânia, Liana, Pablo e Laila pelo excelente trabalho que realizaram na cirurgia dos animais, pela ajuda na leitura das lâminas e pelas novas amizades.

Aos funcionários do departamento de Educação Física: Rita, Priscila, Geraldo, José Francisco, Maysa, Rômulo e Milton pela atenção e auxílio.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para que este sonho se realizasse.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1 TECIDO ÓSSEO.....	5
3.2 REMODELAÇÃO ÓSSEA.....	7
3.3 OSTEOPENIA E OSTEOPOROSE.....	8
3.4 MODELO ANIMAL PARA OSTEOPOROSE.....	8
3.5 OVARECTOMIA.....	9
3.6 COMPOSIÇÃO CORPORAL.....	10
3.7 ESTROGÊNIO.....	11
3.8 MARCADORES BIOQUÍMICOS DO METABOLISMO ÓSSEO.....	11
3.9 BIOMECÂNICA DO OSSO.....	12
3.10 EXERCÍCIO E METABOLISMO ÓSSEO.....	13
3.10.1 EXERCÍCIO DE CAMINHADA E CORRIDA.....	14
3.10.2 EXERCÍCIO DE NATAÇÃO.....	16
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	18
4.2 PROTOCOLO DE EXERCÍCIO.....	19
4.3 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO.....	20
4.4 DETERMINAÇÃO DO MARCADOR BIOQUÍMICO ÓSSEO.....	21

4.5 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CORPORAL.....	21
4.6 AVALIAÇÃO DA DENSIDADE MINERAL ÓSSEA.....	23
4.7 AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA ÓSSEA.....	23
4.8 DETERMINAÇÃO DA MORFOMETRIA ÓSSEA.....	25
4.8.1 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA.....	25
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
5.1 MASSA CORPORAL.....	27
5.2 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DOS ANIMAIS.....	28
5.3 BIOMARCADOR ÓSSEO.....	29
5.4 COMPOSIÇÃO CORPORAL: ÁGUA, PROTEÍNA, GORDURA E CINZAS.....	30
5.5 GORDURA VISCERAL.....	30
5.6 DENSIDADE MINERAL ÓSSEA.....	32
5.7 ÁREA DO FÊMUR RELATIVA À MASSA CORPORAL DE RATAS.....	35
5.8 TESTES BIOMECÂNICOS.....	35
5.9 MORFOMETRIA ÓSSEA NAS REGIÕES DO TROCANTER MAIOR E DA CABEÇA DO FÊMUR.....	37
5.10 ESPESSURA DA DIÁFISE DO FÊMUR.....	40
6. CONCLUSÕES.....	42
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ad libitum - do latim “à vontade”

ANOVA – análise de variância

BMP – proteína morfogenética óssea

°C – temperatura (graus Celsius)

cm – centímetros

cm² – centímetros quadrado

CO₂ – gás carbônico

CMO – conteúdo mineral ósseo

CORR - corrida

DMO – densidade mineral óssea

DXA – densitometria óssea

Fmáx – força máxima

g – gramas

g/cm² – gramas por centímetro quadrado

GH – hormônio do crescimento

GORD - gordura

GB – grupo *baseline*

CO – ratas OVX que foram submetidas ao treinamento de corrida em esteira

CS – ratas SHAM que foram submetidas ao treinamento de corrida em esteira

NO – ratas OVX que foram submetidas ao treinamento de natação com sobrecarga

NS – ratas SHAM que foram submetidas ao treinamento de natação com sobrecarga

CONO – ratas OVX que não foram submetidas ao treinamento

CONS – ratas SHAM que não foram submetidas ao treinamento

h/dia – horas por dia

HE - Hematoxilina e Eosina

HCL – ácido clorídrico

IL1 – interleucina um

IL2 – interleucina dois

IL6 – interleucina seis

IGFBP-4 - proteínas ligantes dos fatores de crescimento semelhante à insulina

J/g – joule por grama

µm - micrômetros

Média ±DP – média mais ou menos desvio padrão

MFP-2 – proteína óssea morfogenética
MFP-6 – proteína óssea morfogenética
m/min – metros por minuto
mg/kg – miligrama por quilo de massa corporal
mL – mililitro
mm - milímetro
N – newton
N/g – newton por grama
NTx – teleopeptídeo do colágeno tipo I amino-terminal
NAT - natação
OMS – Organização Mundial de Saúde
OPG – osteoprotegerina
OVX - ovariectomia
pH – potencial hidrogeniônico
PTH – paratormônio
pg/mL – picograma por mililitro
PTN - proteína
RANK – receptor ativador do fator nuclear kB
RANKL – ligante do receptor
rpm – rotações por minuto
SC – subcutâneos
s - segundos
SHAM – laparotomia
SED - sedentário
TRAT - tratamentos
TNF α – fator de necrose tumoral
UFV – Universidade Federal de Viçosa
vs – versus
25OHD₃ - 25 hidroxicolecalciferol
1,25(OH)₂D₃ - 1,25 diidroxicolecalciferol

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Densitômetro Ósseo de Raios-X.....	23
Figura 2: Aparelho universal de ensaio EMIC®	24
Figura 3: Fotografia do ensaio mecânico de flexão em três pontos, em diáfise de fêmur de rata.....	24
Figura 4: Fotografia do ensaio mecânico de flexão no colo do fêmur de rata.....	25
Figura 5: Modelos de regressão ajustados para descrever a variabilidade dos pesos médios dos animais avaliados em 12 semanas.....	28
Figura 6: Microfotografia de região da cabeça do fêmur, do trocanter maior do fêmur e da diáfise do fêmur de animais ovariectomizados.....	38
Figura 7: Microfotografia de região da cabeça do fêmur, do trocanter maior do fêmur e da diáfise do fêmur de animais inteiros.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Desempenho dos animais nos diferentes grupos experimentais ao final de dez semanas de treinamento.....	28
Tabela 2: Dados referentes ao biomarcador ostase, ao final de dez semanas de treinamento nos animais dos diferentes grupos experimentais.....	29
Tabela 3: Variações da composição corporal ao final de dez semanas de treinamento para os grupos experimentais.....	30
Tabela 4: Valores médios para gordura visceral, ao final de dez semanas de treinamento para os grupos experimentais.....	31
Tabela 5: Densidade mineral óssea, conteúdo mineral ósseo e área, ao final de dez semanas de treinamento, obtidas no fêmur dos animais dos grupos experimentais.....	32
Tabela 6: Área do fêmur relativa ao peso corporal de ratas, ao final de dez semanas de treinamento dos grupos experimentais.....	35
Tabela 7: Tenacidade e força de flexão no colo do fêmur, tenacidade e força de flexão no terço médio da diáfise do fêmur relativo ao peso corporal de ratas ao final de dez semanas de treinamento, nos animais dos grupos experimentais.....	36
Tabela 8: Morfometria do osso trabecular nas regiões do colo e do trocânter do fêmur de ratas, ao final de dez semanas de treinamento dos grupos experimentais.....	37
Tabela 9: Largura do osso cortical no terço médio da diáfise do fêmur de ratas, ao final de dez semanas de treinamento dos grupos experimentais.....	40

RESUMO

FERNANDES, Bárbara Braga, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2010. **Influência de diferentes tipos de exercício sobre parâmetros ósseos em ratas ovariectomizadas e inteiras.** Orientador: Antônio José Natali. Coorientadores: Carlos Henrique Osório Silva, Maria do Carmo Gouveia Peluzio, Ricardo Junqueira Del Carlo.

Este estudo teve como objetivo investigar a influência de diferentes tipos de exercícios físicos (corrida e natação) sobre parâmetros ósseos em ratas ovariectomizadas (OVX) e inteiras (SHAM). Ratas Wistar com 20 semanas de idade, peso inicial de $271,42 \pm 17,6$ g (média \pm desvio padrão) foram usadas. Dez animais foram sacrificados quinze dias após a cirurgia e denominados *baseline* (GB), os demais foram alocados aleatoriamente em um dos seis grupos ($n = 12$): corrida OVX (CO); corrida SHAM (CS); natação OVX (NO); natação SHAM (NS); sedentário OVX (CONO) e sedentário SHAM (CONS). Os animais foram alojados em gaiolas individuais, em sala com temperatura ambiente de 22 ± 2 °C e ciclo de 12 horas claro/escuro, onde receberam diariamente 20g de ração e água *ad libitum*. Os animais dos grupos CO e CS foram submetidos a um programa de treinamento de corrida em esteira durante 10 semanas (16 m/min, 60 min/dia, 5 dias/semana, 8 semanas com 0% de inclinação e 2 semanas com 10° de inclinação). Os animais dos grupos NO e NS foram submetidos a um programa de treinamento em natação durante 10 semanas em um tanque com água a 30 ± 2 °C, com sobrecarga de até 3% do peso corporal (60 min/dia, 5 dias/semana). Os animais dos grupos CONO e CONS permaneceram em gaiolas individuais, sem exercício programado, por 10 semanas. Após a eutanásia, o fêmur direito foi removido para avaliação da densidade mineral óssea (DMO), do conteúdo mineral ósseo (CMO) e da resistência óssea. O fêmur esquerdo foi retirado para determinação da morfometria óssea. Toda a gordura visceral foi removida e pesada, descartaram-se pele, vísceras, cabeça e pés, permanecendo apenas músculo e ossos (carcaça vazia) para a análise quantitativa de água, gordura, proteína e cinzas. Amostras de sangue foram retiradas para análise do biomarcador fosfatase alcalina óssea (ostase). Ao final do experimento os animais OVX apresentaram maior ($p < 0,05$) massa corporal que os animais SHAM. Os programas de exercício aumentaram ($p < 0,05$) a DMO e o CMO dos grupos CO e NO. O programa de exercício em esteira aumentou ($p < 0,05$) a tenacidade de flexão no fêmur dos animais do grupo CO e a força de flexão no fêmur do grupo CS. Não houve aumento ($p > 0,05$) de osso trabecular nas regiões da cabeça e do trocânter do fêmur em CO e NO. O programa de natação aumentou ($p < 0,05$) a espessura do osso cortical no grupo NO e NS. A gordura visceral foi reduzida ($p < 0,05$) no grupo CO. Não houve diferença ($p > 0,05$) entre os grupos experimentais na porcentagem de água,

gordura, proteína e cinzas. Os programas de corrida em esteira e natação com sobrecarga não aumentaram ($p > 0,05$) os valores de ostase em ratas OVX. Concluiu-se que: a) os programas de exercícios aumentaram a DMO e o CMO de ratas OVX; b) O programa de exercício em esteira aumentou a tenacidade do fêmur de ratas OVX; c) O programa de exercício em natação aumentou a espessura do osso cortical em ratas OVX e SHAM; d) O programa de exercício em esteira reduziu a gordura visceral em ratas OVX; e) Os programas de exercício não aumentaram os níveis de ostase em ratas OVX.

ABSTRACT

FERNANDES, Bárbara Braga, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, february, 2010. **Influence of different types of exercise on the bone of ovariectomized and whole female rats.** Adviser: Antônio José Natali. Co-Advisers: Carlos Henrique Osório Silva, Maria do Carmo Gouveia Peluzio, Ricardo Junqueira Del Carlo.

This study aimed at investigating the effects of different types of exercise (running and swimming) on the bone of ovariectomized (OVX) and whole (SHAM) female rats. Wistar female rats with 20 weeks of age and initial weight of $271,42 \pm 17,6$ g (mean \pm standard deviation) were used. Ten animals were sacrificed after two weeks of surgery and were termed baseline (GB). The other animals were randomly divided into six groups (n = 12): race OVX (CO); race SHAM (CS); swimming OVX (NO); swimming SHAM (NS), sedentary OVX (CONO); and sedentary SHAM (CONS). All animals were housed in individual cages in a room with temperature of 22 ± 2 ° C and cycle of 12 hours light/dark, where they received daily 20 g of food and water ad libitum. Animals from CO and CS underwent a treadmill running program for 10 weeks (16 m / min, 60 min / day, 5 days / week for 8 weeks with 0% grade and 2 weeks with 10% grade). Animals from NO and NS were submitted to a swimming training program for 10 weeks in a tank with water at 30 ± 2 ° C bearing up to 3% of body weight (60 min / day, 5 days). Animals from CONO and CONS remained in individual cages for 10 weeks without exercise program. At sacrifice the right femur was removed for bone mineral density (BMD), bone mineral content (BMC) and bone strength assessments. The left femur was removed for bone morphometric analysis. Visceral adipose tissue was removed and weighed. Skin, viscera, head and feet were discharged and the empty carcass (muscle and bone) was used for quantitative analysis of water, fat, protein and ash. Blood samples were collected for analysis of bone alkaline phosphatase (ostas). By the experiment OVX rats exhibited higher (p <0.05) body weight than SHAM. The exercise training programs increased (p <0.05) BMD and BMC in CO and NO. Treadmill training increased (p <0.05) the femur tenacity of bending in CO and the femur flexion strength in CS. Trabecular bone in the head and trochanter of the femur was not affected in CO and NO. Swimming training increased (p <0.05) the width of the femur cortical bone in NO and NS. Visceral fat was reduced (p <0.05) in CO. The percentages of water, fat, protein and ash were not different (p > 0.05) among the experimental groups. The exercise training programs did not increase (p > 0.05) values the alkaline phosphatase in OVX rats. It was concluded that: a) Treadmill and swimming training increased BMD and BMC in OVX rats; b) Treadmill training increased the tenacity of the femur in OVX rats; c) Swimming training increased the

width of cortical bone in OVX rats and SHAM rats; d) Treadmill training reduced visceral fat in OVX rats; and e) Exercise training programs did not increase the alkaline phosphatase levels in OVX rats.

1- INTRODUÇÃO

A osteoporose é uma doença de fragilidade esquelética caracterizada por fraturas que resultam de baixos níveis de traumatismos. É caracterizada por perda gradual de massa óssea, que enfraquece os ossos, por deterioração da microarquitetura tecidual, tornando-os mais frágeis e suscetíveis a fraturas. Estima-se que uma em cada duas mulheres e um em cada quatro homens com mais de 50 anos de idade terá alguma experiência de fratura relacionada à osteoporose (Gammage et al., 2009). A osteoporose é a mais comum de todas as doenças ósseas nos adultos, sobretudo na velhice, e incide mais em mulheres (Guyton e Hall, 2002; Iwamoto et al., 2005).

Segundo critérios da Organização Mundial de Saúde - OMS, aproximadamente um terço das mulheres de raça branca, com idade superior aos 65 anos, são portadoras de osteoporose (WHO, 1994).

O número de pessoas portadoras de osteoporose tem crescido muito nos últimos anos, apresentando altos custos financeiros em seu tratamento. A prevalência de osteoporose em mulheres pós-menopausa nos Estados Unidos é de aproximadamente 38% e estima-se que 1,5 milhões de fraturas estejam associadas à osteoporose. Este número pode vir a triplicar no ano de 2040, tendo em vista o aumento da expectativa de vida da população (Tosteson et al., 2008).

No Brasil não existem dados estatísticos sobre a incidência da doença. De acordo com Camargo et al. (2005), 33% das mulheres e 16% dos homens da cidade de São Paulo ou residentes na cidade de São Paulo com mais de 65 anos apresentavam osteoporose pela densitometria óssea em um dos sítios esqueléticos analisados. Estes dados coincidem com dados norte americanos, em que cerca de 30% das mulheres com mais de 65 anos têm osteoporose (Cooper et al., 1997).

Para a Organização Mundial de Saúde (OMS), indivíduos com densidade mineral óssea (DMO) maior que 2,5 desvios padrão abaixo da média são osteoporóticos (WHO, 1994; Eastell 1998; NIH, 2001; Kanis et al., 2008) e, para cada desvio-padrão que a massa óssea apresenta abaixo da massa óssea normal, o risco relativo de fratura nas mulheres pós-menopausa aumenta em até 2,6 vezes (Lemura e Duvillard, 2006).

A deficiência dos esteróides sexuais na gênese da osteoporose humana, a predisposição genética, a inatividade física, fatores ambientais (consumo de álcool, cafeína, etc.), deficiência de vitamina D e as disfunções tireoidianas constituem os fatores de risco para a osteoporose (Cohen e Roe, 2000; Gammage et al., 2008; Maddalozzo et al., 2009).

Declínios rápidos na densidade mineral óssea (DMO) ocorrem com a deficiência de estrogênio após a menopausa, determinando risco de desenvolvimento de osteoporose (Hart et al., 2001). Nas mulheres, a patologia pode ser prevenida ou retardada maximizando o pico de massa óssea por meio de modificações no estilo de vida, como a dieta e a atividade física durante a infância e a adolescência (Soot et al., 2005).

A baixa DMO está fortemente ligada ao risco de fraturas em mulheres osteoporóticas pós-menopausa, mostrando que existem fatores que modulam o comportamento da massa óssea (Gnudi et al., 2007).

Mulheres pós-menopausa possuem um alto risco de desenvolverem distúrbios metabólicos e doenças cardiovasculares, incluindo a obesidade, o diabetes tipo 2 e a osteoporose (Burguera et al., 2001; Saengsirisuwan et al., 2009). A deficiência de estrogênio provoca importantes alterações no metabolismo lipídico e na distribuição da gordura corporal (Saengsirisuwan et al., 2009).

Medidas de tratamento incluem atividade física regular, quantidades adequadas de cálcio dietético, suplementação de vitamina D e medicamentos que reduzam o risco de novas fraturas (Honig, 2008). Artigos que relatam as consequências da imobilização e a relação entre exercício físico e massa óssea defendem o papel benéfico da atividade na gênese e mineralização dos ossos (Ghadalupe-Grau et al., 2009).

A tensão mecânica gerada pelo exercício constitui estímulo importante para a formação óssea e desempenha papel importante para minimizar a perda óssea em mulheres pós-menopausa (Barengolts et al., 1994) e em ratas ovariectomizadas (Honda et al., 2003).

Estudos com humanos (Chien et al., 2000; Bergström et al., 2008) e com animais (Honda et al., 2003; Huang et al., 2008) tem demonstrado que o exercício aumenta a DMO, a massa e a força óssea (Hart et al., 2001). Acredita-se que o estresse mecânico gerado pelo exercício desempenha papel importante na resposta osteogênica.

Experimentos têm demonstrado o efeito do exercício sobre a massa óssea durante o período de crescimento e aumenta a massa óssea em ratos jovens (Iwamoto et al., 1999; Iwamoto et al., 2004; Huang et al., 2008).

Vários tipos de programas de exercício são utilizados na investigação da resposta do tecido ósseo. Alguns autores utilizaram o exercício aeróbico como a caminhada, a corrida (Borer et al., 2007; Huang et al., 2008), a natação (Huang et al., 2003; Melton et al., 2004), outros exercícios de resistência (Bennell et al., 2000; Notomi et al., 2000), saltos verticais (Honda et al., 2003; Unemura et al., 2008) e escalada (Notomi et al., 2001).

Tem sido demonstrado que a corrida produz efeito osteogênico em ossos de ratos machos jovens (Bourrin et al., 1995; Huang et al., 2008) e fêmeas (Hagihara et al., 2005),

embora o exercício pareça ter efeito menos osteogênico em ratas ovariectomizadas (Barengolts et al., 1993). Entretanto, Notomi et al. (2000), observaram que o exercício de corrida em esteira não provocou mudanças na DMO, no conteúdo mineral ósseo (CMO) e no crescimento ósseo de ratos, percebendo que no exercício aeróbico é necessário uma sobrecarga mais alta para provocar aumentos na massa e na força óssea. Atletas de corrida e natação também não demonstraram diferenças na DMO e no CMO quando comparados ao grupo controle (Jurimae et al., 2005; Soot et al., 2005).

Em contrapartida, a literatura também nos mostra que, embora a natação seja considerada uma atividade em que não há suporte do peso corporal, o aumento da densidade óssea pode estar relacionado com a intensidade da atividade muscular (Bayramoglu et al., 2005; Renno et al., 2007). Snyder et al. (1992), compararam o exercício de natação com o de corrida em ratos Wistar e observaram que o grupo que treinou natação apresentou o úmero mais pesado e de maior CMO quando comparado ao grupo corrida. Isso indicou que a força muscular produzida durante o exercício de natação provoca adaptações nos ossos. Em outro estudo semelhante, pesquisadores observaram que ambos os exercícios (corrida e natação) provocaram aumento no peso e na força da tíbia e do fêmur de ratos, contudo não apresentaram alterações na DMO e no CMO (Huang et al., 2003).

A literatura diverge sobre qual o modelo e intensidade de exercício a ser utilizado na prevenção e tratamento da perda de massa óssea associada à menopausa. Alguns estudos demonstraram que o exercício aeróbico de moderada intensidade e com sobrecarga são os mais efetivos (Tromp et al., 2006; Bonnet et al., 2007), outros afirmaram que o exercício de alto impacto tem um significativo efeito na massa óssea (Honda et al., 2003; Nagasawa et al., 2008).

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo Geral:

Investigar os efeitos de diferentes tipos de exercícios físicos (corrida e natação) sobre parâmetros ósseos em ratas ovariectomizadas e inteiras.

2.2- Objetivos Específicos:

De ratas ovariectomizadas e inteira, avaliar:

- O desempenho nos exercícios de natação com sobrecarga e corrida em esteira;
- O marcador bioquímico de formação óssea (fosfatase alcalina óssea);
- A composição corporal (% hídrico, % de gordura, % de proteína, % de cinzas e gordura visceral);
- A densidade mineral óssea e o conteúdo mineral ósseo do fêmur;
- A resistência da fratura óssea do fêmur;
- A histomorfometria óssea do fêmur;
- O marcador bioquímico de formação óssea (fosfatase alcalina óssea);

3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Tecido ósseo

O osso é um tecido dinâmico constantemente remodelado pelas células ósseas - os osteoblastos, osteócitos e osteoclastos (Weinstein e Manoglas, 2000) - mantendo sua integridade estrutural e a homeostasia mineral, ambas dependentes do equilíbrio entre os processos anabólico (aposição) e catabólico (reabsorção). A perda desse equilíbrio altera a matriz e a mineralização ósseas (Ribeiro et al., 2003).

O osso cortical ou compacto representa 85% do tecido ósseo total, predominando no esqueleto apendicular, com uma distribuição concêntrica em volta de canais centrais que contêm o sistema haversiano, formado por vasos sanguíneos, linfáticos, nervos e tecido conjuntivo. Tem o papel de sustentação e proteção. O osso trabecular ou esponjoso é a parte mais interna dos ossos, caracterizada por uma rede de trabéculas ósseas finas. Ele é encontrado na porção interna dos ossos longos, corpos vertebrais e pelve, sendo mais importante do ponto de vista metabólico que o osso cortical (Coronho et al., 2001).

Internamente, revestindo o canal medular, há uma membrana chamada endóstio, que apresenta uma pronunciada atividade celular, provavelmente devido às forças de flexão e de tração que existem no local e é a membrana responsável pelo processo de remodelação óssea (Coronho et al., 2001).

A superfície externa dos ossos é denominada de perióstio, que é formado de tecido conjuntivo e a sua camada mais superficial contém principalmente fibras colágenas e fibroblastos. Na sua porção profunda é mais celular e apresenta células osteoprogenitoras que se multiplicam por mitose e se diferenciam em osteoblastos, desempenhando papel importante no crescimento dos ossos e na reparação de fraturas (Junqueira e Carneiro, 2008).

O osso consiste em um componente orgânico (20-25%), um componente inorgânico (70%) e água (5%). A matriz orgânica determina a estrutura e as propriedades mecânicas e biomecânicas do osso. Ela é formada por 98% de colágeno tipo I e proteínas não colágenas. Sendo os 2 % restantes são formados pelas células ósseas. O componente inorgânico consiste em cristais de hidroxiapatita (Khan et al., 2001).

Os osteoblastos são originados a partir de células mesenquimais osteoprogenitoras. Estão localizados na superfície de formação óssea, sendo responsáveis pela elaboração dos componentes orgânicos da matriz extracelular. A membrana plasmática destas células é rica em fosfatase alcalina (marcador de formação óssea), além de possuir receptores para paratormônio (PTH), citocinas, prostaglandinas, estrogênios e vitamina D, mas não para calcitonina (Khan et al., 2001; Aires, 2008;). A função osteoblástica é controlada por fatores

endócrinos, parácrinos e autócrinos. Hormônios como PTH, vitamina D₃, glicocorticóides, hormônio do crescimento (GH) e esteróides gonadais atuam diretamente sobre os osteoblastos (Khan et al., 2001).

Quando os osteoblastos são circundados pela matriz óssea que secretam, passam a desenvolver extensões longas e delgadas. Nesse momento, o metabolismo dessas células se altera, param de sintetizar matriz óssea e passam a ser chamados de osteócitos (Motta, 2003).

Os osteócitos são osteoblastos que após mineralização do osteóide ao seu redor tornam-se prisioneiros em lacunas ósseas. Situam-se em cavidades ou lacunas no interior da matriz óssea, mas mantêm comunicação entre si através de longos prolongamentos citoplasmáticos que se intercalam e estabelecem vias de transporte de nutrientes e metabólitos. Acredita-se que os osteócitos participem ativamente na remodelação óssea (Motta, 2003; Aires, 2008).

Os osteoclastos são células gigantes multinucleadas que se formam a partir da fusão de células precursoras mononucleadas localizadas na medula óssea. Os osteoclastos maduros são os únicos com capacidade e eficiência para desempenhar a função de reabsorção óssea (Lorenzo et al., 2008). Eles se caracterizam pela alta mobilidade e, como os osteoblastos, também são encontrados na superfície óssea. Movem-se ao longo da superfície óssea reabsorvendo osso e deixando uma lacuna de reabsorção em seu rastro (Aires, 2008). O processo de reabsorção depende de características especiais entre o osteoclasto e a superfície óssea e um espaço fechado forma-se entre a célula e a matriz. Nesse espaço, os osteoclastos liberam enzimas lisossomais mantendo um pH ácido, de maneira a possibilitar a dissolução da matriz óssea (Khan et al., 2001; Motta, 2003). Os osteoclastos desenvolvem uma borda em escova na superfície em contato com o osso. A cavidade formada pela reabsorção logo abaixo desta borda é chamada de lacuna de Howship (Aires, 2008).

A densidade mineral óssea (DMO) é o resultado de um processo de formação e reabsorção chamado de remodelação. A formação é responsável pela reconstrução e fortalecimento do tecido ósseo, enquanto que a reabsorção é responsável pela deterioração deste tecido (Cadore et al., 2005).

O conteúdo mineral ósseo (CMO) e a DMO são determinados principalmente pelo genótipo. Aproximadamente 70% da variação na densidade óssea são determinadas pela hereditariedade, portanto os 30% restantes dependem do fenótipo, em que a atividade física e/ou a nutrição podem induzir respostas fisiológicas que permitam níveis mais elevados de obtenção de massa óssea. O sal cristalizado depositado na matriz orgânica do osso é composto principalmente de cálcio e fósforo, o que representa aproximadamente 80% - 90% do CMO.

As fibras de colágeno constituem entre 90% - 95% a matriz orgânica (Vicente-Rodriguez et al., 2008).

As propriedades mecânicas do osso são determinadas pela matriz colágena e pelo grau de mineralização, ou seja, pela quantidade de cristais de hidroxiapatita de cálcio depositada entre as fibras colágenas. A resistência óssea é determinada pela massa do tecido ósseo e de sua rigidez. Esta rigidez é determinada principalmente pela fase mineral, enquanto que a matriz de colágeno contribui principalmente para aumentar a capacidade de o osso absorver energia sem se romper. (Guadalupe-Grau et al., 2009).

3.2. Remodelação Óssea

A remodelação óssea é um processo contínuo de reabsorção e formação que ocorre no esqueleto ao longo da vida em resposta a forças mecânicas e a fatores do meio interno. A remodelação ocorre a fim de remover partes do osso danificado ou mais velho, substituindo com osso recém formado. Esse processo ocorre pela atividade dos osteoblastos e dos osteoclastos (Hernandez, 2008; Pivonka et al., 2008).

A homeostase óssea se mantém até a idade aproximada de 40 anos. A partir daí, entretanto, observa-se um discreto predomínio da reabsorção sobre a formação óssea, caracterizando um estado de osteopenia fisiológica. Em mulheres, essa condição pode ser ainda mais intensa devido à redução dos níveis de estrogênio que ocorre na pós-menopausa (Aires, 2008).

A remodelação ocorre tanto no osso cortical como no trabecular, porém é mais intensa no trabecular, devido à disposição e função de trabéculas ósseas. Em situações fisiológicas, a reabsorção e a formação são fenômenos acoplados e dependentes, e o predomínio de um sobre o outro pode resultar em ganho ou perda de massa óssea (Saraiva e Lazaretti-Castro, 2002).

A remodelação óssea ocorre em pequenas unidades de células denominadas *BMU* (unidade básica multicelular), que são encontradas em vários sítios das superfícies ósseas. A sequência de eventos em um sítio de remodelação (*BMU*) é a ativação-reabsorção-formação (Robling et al., 2006; Pivonka et al., 2008).

Estímulos sistêmicos (pelo PTH) ou locais (por tensão mecânica ou microfraturas) podem iniciar o processo de ativação da remodelação óssea. A liberação de hormônios e substâncias (PTH, 1,25-diidroxivitamina D, IL1, IL2, IL6, TNF- α) induzem o aumento na produção de RANKL (ligante do receptor ativador do fator nuclear kB) pelos osteoblastos, que se ligam ao seu receptor RANK nas membranas das células hematopoiéticas precursoras, tornando os osteoclastos ativos. Substâncias inibidoras da reabsorção, tais como o estrogênio e as proteínas morfogenéticas ósseas (BMP), estimulam a produção de osteoprotegerina

(OPG), que é um inibidor de RANK, pois ela captura o RANKL, impedindo sua ligação ao seu receptor, diminuindo, então, o número de osteoclastos ativos e induzindo a apoptose de osteoclastos maduros (Robling et al., 2006).

As superfícies ósseas quiescentes são recobertas por células de superfície ou de revestimento. Em resposta a um estímulo de reabsorção, as células de superfície se retraem e expõem a superfície óssea. Ao mesmo tempo, ocorre a diferenciação, a ativação e a migração dos osteoclastos aos sítios de reabsorção (superfície exposta). Estes reabsorvem o osso velho e criam uma lacuna, denominada lacuna de Howship. Finalmente, os osteoblastos ocupam o sítio de reabsorção e sintetizam a matriz extracelular (osteóide) a qual, após um período de amadurecimento, será mineralizada (Khan et al., 2001; Robling et al., 2006; Pivonka et al., 2008).

3.3. Osteopenia e Osteoporose

A osteoporose é uma doença de fragilidade esquelética caracterizada por fraturas que resultam de baixos níveis de massa óssea. Estima-se que 1 em cada 2 mulheres e 1 em cada 4 homens com mais de 50 anos de idade terá alguma experiência de fratura relacionada a osteoporose (Gammage et al., 2008). A osteoporose é a mais comum de todas as doenças ósseas nos adultos, sobretudo na velhice e em maior incidência em mulheres (Guyton e Hall, 2002; Iwamoto et al., 2005).

Ocorrem anualmente no mundo mais de 8,9 milhões de fraturas relacionadas à osteoporose, das quais mais de 4,5 milhões ocorrem na América e na Europa (WHO, 1994).

A deficiência dos esteróides sexuais na gênese da osteoporose humana, a predisposição genética, a inatividade física, fatores ambientais (consumo em excesso de álcool e cafeína), deficiência de vitamina D e as disfunções tireoidianas constituem os fatores de risco para a osteoporose (Cohen e Roe, 2000; Ribeiro et al., 2003; Gammage et al., 2009; Maddalozzo et al., 2009).

A mais conhecida condição de perda óssea em humanos é a osteoporose pós-menopausa. Declínios rápidos na DMO ocorrem com a deficiência de estrogênio após a menopausa, levando as mulheres a um grande risco de desenvolverem osteoporose em relação aos homens (Hart et al., 2001). A osteoporose em mulheres pode ser prevenida ou retardada maximizando o pico de massa óssea através de modificações no estilo de vida, como a dieta e a atividade física, durante a infância e a adolescência (Soot et al., 2005).

A Organização Mundial de Saúde – OMS classifica o grau de osteoporose de acordo com os critérios densitométricos apresentados no quadro 1 (WHO, 1994; Eastell 1998; NIH, 2001; Kanis et al., 2008).

Quadro 1. Critérios Densitométricos da Organização Mundial da Saúde*

Categoria	Escore T (DP)	Risco de fratura
Normal	> -1	-
Osteopenia	-1 a -2,5	↑ quatro vezes
Osteoporose	≤ -2,5	↑ oito vezes
Osteoporose severa	Com uma ou mais fraturas, independente da massa óssea	↑ vinte vezes

*Critérios estabelecidos para: coluna lombar, colo do fêmur e terço médio do rádio.

Após a menopausa, a redução da concentração de estrogênio aumenta a reabsorção osteoclástica e excede a taxa de formação osteoblástica, resultando em perda de massa óssea (osteopenia ou osteoporose) (Simões et al., 2008).

3.4. Modelo animal para osteoporose

Várias espécies de animais têm sido utilizadas no estudo da perda óssea, incluindo primatas não humanos, cães, ovinos, suínos, coelhos, ratos e camundongos (Priemel et al., 2002). Apesar do fato de que a posição quadrúpede do rato difere da posição bípede do humano, as semelhanças da arquitetura da vértebra e fêmur entre eles sugerem que ratos podem ser utilizados na caracterização das alterações ósseas associadas à idade, fatores hormonais e efeitos terapêuticos (Li et al., 2003).

O modelo animal cada vez mais se torna apropriado para o estudo da biologia do tecido ósseo, devido às restrições práticas e éticas do uso de seres humanos, oferecendo, ainda, maior controle sobre numerosas variáveis externas e permitindo a caracterização da resposta do osso ao exercício (Bennell et al., 2000). Em humanos a mensuração da DMO ocorre através da densitometria óssea e de alguns marcadores bioquímicos, que são mensurados através do soro e da urina (Bennell et al., 2000). Entretanto, no modelo animal avaliações de propriedades biomecânicas e morfométricas também se tornam possíveis, pois nem sempre estará presente alteração na DMO (Bennell et al., 2000).

Ratas adultas têm um ciclo regular de estrogênio e sua deficiência causa perda óssea, por isso vêm sendo o modelo mais utilizado para se estudar o envelhecimento ósseo em

humanos. A rata ovariectomizada (OVX) é considerada um excelente modelo que transmite as principais características clínicas da deficiência do estrogênio no esqueleto humano (Thompson et al., 1995; Gala et al., 2001; Priemel et al., 2002), ocorrendo um aumento do *turnover* ósseo, com a taxa de reabsorção pelos osteoclastos excedendo a formação pelos osteoblastos, levando a perda de massa óssea, similar a osteopenia e osteoporose, como observados em humanos, reduzindo a força e a rigidez do osso determinando aumento do risco de fratura (Gala et al., 2001; Li et al., 2003).

Avaliações como densitometria óssea, análise de marcadores bioquímicos de formação e reabsorção óssea, testes biomecânicos e histomorfometria são realizados no modelo animal da mesma maneira que em humanos (Thompson et al., 1995). Autores têm utilizado o modelo de ratas ovariectomizadas para o estudo da prevenção e tratamento da perda óssea após a depleção do estrogênio (Nakajima et al., 2001; Li et al., 2002; Tromp et al., 2006; Fuchs et al., 2007; Simões et al., 2008; Lespessailles et al., 2009).

3.5. Ovariectomia

A ovariectomia – cirurgia de retirada dos ovários - tem sido utilizada para induzir os efeitos da menopausa em animais, pela deficiência da secreção do hormônio estrogênio (Bonnet et al., 2007; Fuchs et al., 2007; Simões et al., 2008; Saengsirisuwan et al., 2009). É bem estabelecido que o aumento do consumo diário de energia, da massa corporal e da massa gorda é decorrente da ovariectomia (Saengsirisuwan et al., 2009).

A ovariectomia aumenta a reabsorção óssea, resultando em perda do osso trabecular e cortical, e isto é mais significativo em ratas adultas que em jovens (Iwamoto et al., 2005).

3.6. Composição Corporal

A composição corporal tem se demonstrado importante em relação à DMO (Genud et al., 2007). Blain et al. (2002) propõem que a composição corporal, incluindo massa magra e gorda, pode ser mais importante que o peso corporal individualmente, sugerindo que a gordura, por ser um substrato para conversão de andrógenos para estrógenos, pode ser relacionada com a DMO tanto por fatores hormonais (devido a sua importância na regulação dos hormônios sexuais na DMO) quanto por fatores mecânicos.

Outros estudos também mostraram associação entre massa magra e gorda com a massa óssea em mulheres pré e pós-menopausa. Através deles, demonstrou-se que as mais jovens tiveram forte relação da massa magra com a óssea, e as mais velhas da massa gorda com a óssea (Ijuin et al., 2002; Genud et al., 2007; Lekamwasam et al., 2009).

3.7. Estrogênio

Após cessar a produção dos hormônios sexuais, a massa óssea da mulher diminui rapidamente nos primeiros 10 anos e lentamente nos anos subsequentes, havendo, a cada ciclo de remodelação óssea, menor quantidade de osso formado e maior quantidade de osso reabsorvido (Ribeiro et al., 2003). As mulheres perdem cerca de 5% de seu osso trabecular a cada ano e 15% de sua massa óssea total após cinco anos de menopausa (Park et al., 2008).

O estrogênio regula, nos osteoblastos, a expressão dos genes que codificam o colágeno tipo I, a fosfatase alcalina, a osteopontina, a osteocalcina e a osteonectina (Okazaki et al., 2002). Ele aumenta a diferenciação dos osteoblastos e exerce efeito estimulatório sobre a síntese e a mineralização da matriz óssea (Tomkinson et al., 1998; Liel et al., 1999; Bland, 2000). Além disso, o estrogênio estimula a apoptose dos osteoclastos e mantém os osteócitos viáveis, havendo na sua deficiência aumento da taxa de apoptose dessas células (Tomkinson et al., 1997; D'Amelio et al., 2008). A síntese de interleucinas [IL-1 β , IL-6, fator de necrose tumoral alfa (TNF α)], e prostaglandina e do fator estimulador de macrófagos, importantes agentes reabsorptivos, é inibida pelo estrogênio. Já a síntese de antagonistas dos receptores para IL-1, de proteínas ligantes dos fatores de crescimento semelhante à insulina (IGFBP-4) e de proteínas ósseas morfogenéticas (MFP-2 e MFP-6) são estimuladas pelo estrogênio e representam importantes mediadores da ação anabólica desse hormônio sobre o tecido ósseo (Zhou et al., 2003).

Na deficiência de estrogênio, há diminuição dos receptores da vitamina D no intestino e menor conversão renal do 25 hidroxicolecalciferol (25OHD₃) em 1,25 diidroxicolecalciferol (1,25(OH)₂D₃), a forma ativa da vitamina D (Liel et al., 1999; Ribeiro et al., 2003).

3.8. Marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo

Pesquisadores têm utilizado, além de métodos densitométricos, a análise de alguns marcadores do metabolismo ósseo para avaliar os efeitos da atividade física na remodelação óssea, buscando alguma relação entre as mudanças encontradas na DMO e a variação nas concentrações sanguíneas e urinárias desses marcadores (Humphries et al., 2000; Creighton et al., 2001; Iwamoto et al., 2004; Ryan et al., 2004; Bonnet et al., 2007).

Entre os marcadores de formação óssea estão a fosfatase alcalina, que é secretada pelos osteoblastos e hidrolisa ésteres de fosfato (o que provavelmente está envolvido no processo de calcificação), e a osteocalcina, cuja síntese aumenta quando ocorre maior calcificação do tecido (Cadore et al., 2005).

Entre os marcadores de reabsorção óssea estão a deoxipiridinolina livre (expressa em razão da creatinina urinária), a fosfatase ácida tartarato-resistente circulante, a hidroxiprolina

(expressa em razão da creatinina urinária), os telopeptídios das ligações cruzadas do colágeno tipo I, de terminal amino (NTx), entre outras ligações cruzadas de piridinolina circulantes, sendo todas essas substâncias subprodutos da reabsorção do colágeno ósseo (Cadore et al., 2005).

Vicent e Braith (2002) demonstraram relação entre as mudanças nas concentrações dos marcadores do metabolismo ósseo e as mudanças densitométricas.

Entretanto, os resultados da variação dos marcadores bioquímicos nem sempre acompanham as mudanças que ocorrem na DMO com o período de treinamento (Ryan et al., 1994). Honda et al. (2003) observaram o aumento na concentração desses marcadores sem nenhuma resposta da DMO. Contudo, a resposta dos marcadores pode representar uma média da remodelação óssea corporal total e não dos locais que sofrem maior sobrecarga durante a atividade física (Cadore et al., 2005).

3.9. Biomecânica do osso

A principal função dos ossos é a de suportar a contração muscular e a gravidade induzida por forças mecânicas exercidas sobre eles, sem que haja fratura e para permitir a locomoção do corpo (Leppanen et al., 2008). Para realizar estas funções, o tecido ósseo é equipado com um sistema mecanosensorial que facilita a adaptação do esqueleto com a carga (Leppanen et al., 2008; Sehmisch et al., 2009).

Os ossos possuem propriedades elásticas e plásticas. Na elástica o osso absorve a energia imposta a ele e é reversível, ou seja, ele sofre uma deformação, mas volta à sua forma normal. Se a carga imposta excede a capacidade de deformação elástica e se torna permanente é denominada de deformação plástica (Seeman et al, 2008).

O tecido ósseo é um dos mais resistentes e rígidos do corpo humano. O resultado final da deformação mecânica repetida e das contrações musculares resulta em aumento das correntes elétricas pulsáteis no osso devido a fenômenos piezoelétricos e de fluxo (Turek, 1991).

A sobrecarga mecânica desencadeia uma cascata de eventos celulares que envolvem receptores α de estrogênio. Essa pode ser a razão pela qual o efeito osteogênico é maior durante a adolescência e menor em mulheres pós-menopausa, amenorréicas e em casos de ovariectomia, onde estes receptores encontram-se diminuídos (Bland, 2000; Gaumet-Meunier et al., 2000; Guadalupe-Grau, 2009).

3.10. Exercício e Metabolismo Ósseo

A influência da atividade física sobre o tecido ósseo tem sido amplamente discutida na literatura. Diversas linhas de evidência, incluindo trabalhos sobre as consequências da

imobilização e a relação entre exercício físico e massa óssea, defendem o papel benéfico da atividade na gênese e na mineralização dos ossos.

A quantidade máxima de massa óssea acumulada por um indivíduo é denominada pico de massa óssea. Os ganhos de massa óssea são muito rápidos na adolescência, sendo que 90% são adquiridos até os 18 anos de idade. O pico de massa óssea é determinado por fatores genéticos e hormonais, mas pode ser significativamente influenciado pelo peso corporal, hábitos alimentares, tabagismo, álcool, exposição ao sol e pelos níveis de atividade física (Honig, 2008).

A tensão mecânica gerada pelo exercício constitui um dos estímulos mais importantes para a formação óssea e desempenha um papel importante para minimizar a perda óssea em mulheres pós-menopausa (Barengolts et al., 1994) e em ratas ovariectomizadas (Honda et al., 2003). A tensão de cisalhamento que ocorre pelo estresse gerado no osso inicia uma cascata de eventos, incluindo a elevação de cálcio intracelular, a secreção autócrina e parácrina, a expressão de fatores de crescimento e a produção de proteínas na matriz óssea (Turner et al., 2003). A carga imposta pelo exercício produz grandes taxas de deformação na matriz óssea estimulando a osteogênese.

Estudos com humanos (Chien et al., 2000; Bergström et al., 2008) e com animais (Honda et al., 2003; Huang et al., 2008) têm demonstrado que o exercício aumenta a DMO, a massa e a força óssea (Hart et al., 2001). Acredita-se que o estresse mecânico gerado pelo exercício desempenhe um papel importante na resposta osteogênica.

O exercício tem sido considerado positivo para o sistema ósseo, e, por isso, tem sido utilizado como prevenção e tratamento da osteoporose (Melton et al., 2004; Iwamoto et al., 2005). A massa óssea pode ser aumentada por alguns programas de exercício para adultos e idosos e atenuar a sua perda associada ao envelhecimento (Guadalupe-Grau et al., 2009).

Estudos experimentais têm demonstrado os efeitos do exercício sobre a massa óssea durante o período de crescimento sendo evidenciado que o exercício aumenta a massa óssea em ratos jovens (Iwamoto et al., 1999; Iwamoto et al., 2004; Huang et al., 2008).

O treinamento com exercícios resistidos estimula a formação de osso trabecular (Westerlind et al., 1998) e a atividade osteogênica que ocorre provavelmente pelo aumento de proteínas morfogenéticas (*BMP*). Após o exercício ocorre um aumento na formação e uma redução da reabsorção óssea (Iwamoto et al., 1998).

Embora diversos estudos tenham demonstrado um efeito estimulatório dos exercícios sobre o tecido ósseo, o mecanismo pelo qual os exercícios interferem nos ossos não está totalmente compreendido.

Vários tipos de programas de exercício são utilizados para investigar sua resposta no tecido ósseo. Alguns autores utilizaram a caminhada e a corrida (Borer et al., 2007; Huang et al., 2008), outros a natação (Huang et al., 2003; Melton et al., 2004), exercícios resistidos (Bennell et al., 2000; Notomi et al., 2000), saltos verticais (Honda et al., 2003; Unemura et al., 2008) e a escalada (Notomi et al., 2001).

Opiniões divergem sobre qual o modelo e qual a intensidade de exercício é mais eficiente para prevenção e tratamento da perda de massa óssea associada à menopausa. Alguns estudos mostram que os exercícios aeróbicos de intensidade moderada e com sobrecarga são os mais efetivos (Tromp et al., 2006; Bonnet et al., 2007); outros alegam e demonstram que o exercício de alto impacto tem um efeito superior sobre a massa óssea (Honda et al., 2003; Nagasawa et al., 2008).

3.10.1. Exercício de Caminhada e Corrida

O exercício aeróbico, como a corrida em esteira, tem sido utilizado por diversos pesquisadores para investigar a mineralização óssea (Iwamoto et al., 1999; Iwamoto et al., 2005; Huang et al., 2008; Simões et al., 2008). Neste tipo de exercício a formação óssea ocorre de forma compensatória devido à força mecânica sofrida pelo osso (Notomi et al., 2000).

Experimentos têm mostrado que a corrida produz efeito osteogênico em ossos de ratos machos jovens (Bourrin et al., 1995; Huang et al., 2008) e fêmeas (Hagihara et al., 2005), embora o exercício pareça ter efeito menos osteogênico em ratas ovariectomizadas (Barengolts et al., 1993). Já em animais que realizam o exercício com alguma sobrecarga, a força gerada promove uma resposta osteogênica, obtendo-se grandes ganhos na massa óssea quando comparados com aqueles que correm sem sobrecarga (Van der Watiel et al., 1995).

Notomi et al. (2000) observaram que o exercício de corrida em esteira não provocou mudanças na DMO, no CMO e no crescimento ósseo de ratos, talvez pelo baixo impacto provocado no tecido ósseo. Atletas de corrida e natação também não demonstraram diferenças na DMO e no CMO quando comparados ao grupo controle (Jurimae et al., 2005; Soot et al., 2005).

Em contrapartida, outros pesquisadores mostraram que mulheres pós-menopausa (idade 60-72 anos), com um treinamento aeróbico de corrida (60%-70% do VO_2 máx), com três a quatro sessões por semana, durante nove meses, com ou sem reposição hormonal, obtiveram significativos aumentos na massa óssea de vértebras lombares e na cabeça do fêmur (Kohrt et al., 1995). O exercício e a reposição hormonal resultaram em efeitos independentes na DMO. Esses efeitos foram acompanhados pela redução dos níveis séricos de osteocalcina, indicando

um aumento na DMO em resposta à reposição hormonal e ao exercício, provocando uma redução no *turnover* ósseo. Isso sugere que houve uma redução na reabsorção e não um aumento na formação óssea (Kohrt et al., 1995). Borer et al. (2007) realizaram um programa de treinamento de caminhada (74% do VO_2 máx), quatro sessões por semana, durante trinta semanas e observaram que o treinamento foi suficiente para aumentar a massa muscular de membros inferiores e preservar a DMO em mulheres pós-menopausa, mas os níveis de osteocalcina e fosfatase alcalina óssea não interferiram na DMO.

Estudos com ratas ovariectomizadas utilizando exercício em esteira têm prevenido perda de peso do fêmur e da tibia, aumentado os parâmetros de formação óssea, como a taxa de aposição óssea e formação, e diminuído a reabsorção (Barengolts et al., 1993; Barengolts et al., 1994). Peng et al. (1997) observaram que o treinamento em esteira promoveu uma redução da perda óssea trabecular de -51,7% para -32,2% e aumentou a carga máxima de 77.1N para 86.5N em ratas ovariectomizadas quando comparadas as não exercitadas. Em contrapartida, Nordsletten et al. (1994) ao realizarem exercício de corrida em esteira com ratas ovariectomizadas, não observaram alterações na DMO e na mecânica do fêmur destes animais.

O exercício de corrida ou caminhada em esteira provocou alterações no fêmur e na tibia de ratos, devido à sobrecarga nesta região ser maior, não observando as mesmas alterações em vértebras lombares. Isso pode ser explicado pelo fato de o modelo animal utilizado ser quadrúpede (Iwamoto et al., 2004; Iwamoto et al., 2005).

Huang et al. (2008) investigaram os efeitos do treinamento de corrida no crescimento ósseo em ratos adultos com dois modelos de exercício em esteira, onde um grupo de animais se exercitava durante sessenta minutos por dia, de maneira contínua, e o outro grupo de maneira intermitente, ambos com velocidade aumentada progressivamente. Observaram ainda que o exercício beneficiou o tecido ósseo, melhorando a qualidade biomaterial do tecido, sem aumentar significativamente a área da DMO, o CMO e o tamanho do osso em ambos os protocolos de exercício. Em outro estudo semelhante, ratas ovariectomizadas correram em esteira em diferentes intensidades: um grupo exercitava a uma velocidade de 21m/min com uma inclinação da esteira de 7%, durante quarenta minutos consecutivos, enquanto que o outro grupo corria de forma intervalada, com a mesma velocidade, mas com uma inclinação de 11% com uma sobrecarga extra. Concluíram que o modelo de exercício de resistência em esteira possui mais efeitos benéficos, reduzindo a perda óssea em ratas ovariectomizadas (Tae-Woong et al., 2006).

Para Iwamoto e colaboradores (1998), após testarem diferentes intensidades na esteira em ratas maduras ovariectomizadas, o exercício moderado (12m/min, 1h/dia) foi mais eficaz,

pois houve aumento na DMO do fêmur e da tíbia dos animais, os quais apresentaram, ainda, uma maior força de fratura.

A duração do exercício também é importante para prevenir e tratar a osteoporose, devido a sua eficácia em manter e aumentar a DMO. Pesquisadores têm sugerido que o exercício de intensidade moderada e de tempo não muito prolongados para mulheres pós-menopausa são mais benéficos para o tecido ósseo quando comparados a exercícios como a maratona, que podem levar a uma redução da DMO (Hagihara et al., 2005).

3.10.2. Exercício de Natação

Embora a natação seja considerada uma atividade em que não há suporte do peso corporal, o aumento da densidade óssea em resposta à natação pode estar relacionado com a intensidade da atividade muscular.

A influência da força muscular sobre a massa óssea tem sido destacada (Bayramoglu et al., 2005). A contração muscular atua direta ou indiretamente sobre os ossos produzindo um estímulo osteogênico. Mais de 70% da tensão sofrida pelo osso são transmitidas pela força muscular e não pelo peso corporal (Iwamoto et al., 1999).

Embora a influência da contração muscular sobre o metabolismo ósseo tenha sido estudada, os resultados ainda são controversos (Honda et al., 2003). Alguns estudos têm demonstrado uma relação positiva entre a força muscular e a massa óssea (Kritz-Silverstein e Barret-Connor et al., 1994; Vuori et al., 1994; Renno et al., 2007). Em contrapartida, outros autores não encontraram nenhuma relação significativa (Madsen et al., 1998; Daly et al., 2004).

Snyder et al. (1992) compararam o exercício de natação com o de corrida em ratos Wistar, e observaram que o grupo que treinou natação apresentou um úmero mais pesado e maior CMO quando comparado ao grupo corrida, indicando que a força muscular produzida durante o exercício de natação provoca adaptações no osso. Em outro estudo semelhante, pesquisadores observaram que ambos os exercícios (corrida e natação) provocaram aumento no peso e na força da tíbia e do fêmur de ratos (Huang et al., 2003).

Pesquisadores observaram benefícios do exercício de natação na massa óssea em animais ovariectomizados que se assemelham ao estado pós-menopausa, onde encontraram aumento na DMO e no CMO do fêmur, além de mudanças histomorfométricas, sugerindo aumento da atividade óssea e melhor propriedade mecânica em relação ao grupo não exercitado (Hart et al., 2001; Melton et al., 2004). Entretanto, Huang et al. (2003) não encontraram mudanças na DMO e no CMO em ratos jovens, mas observaram aumento nas

propriedades mecânicas do fêmur e da tíbia dos animais que realizaram o treinamento de natação em relação aqueles que não treinaram.

Bourrin et al. (1992), utilizando análise histomorfométrica, mostraram que o exercício de natação em ratos jovens reduziu a reabsorção e a superfície osteóide, sugerindo uma diminuição do *turnover* ósseo. Em contrapartida, Kim et al., (2005) observaram que o exercício de natação levou a uma redução da DMO e da gordura corporal.

Em estudo de natação com atletas jovens (18-24 anos), pesquisadores não encontraram nenhum efeito na DMO (Emslander et al., 1998). Em outro estudo com adolescentes do sexo feminino e masculino (10-16 anos), observaram que o exercício de natação aumentou o CMO apenas nos meninos, não tendo nenhuma interferência no metabolismo ósseo das meninas (Derman et al., 2008).

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais Experimentais

Foram utilizadas 82 ratas Wistar adultas (*Rattus norvegicus*), com 20 semanas de idade (peso médio $271,42 \pm 17,6$ g; média \pm DP), provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, sendo aprovados pela Comissão de Ética do Departamento de Veterinária da UFV sob parecer nº 02/2009.

Os animais foram distribuídos em grupos experimentais, e alojados em gaiolas individuais, por 12 semanas, mantidos em ambiente com temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de cerca de 60% e fotoperíodo de 12 horas. Receberam diariamente de 18 a 20g de ração comercial¹ e água *ad libitum*.

Quarenta e dois animais foram submetidos à ovariectomia (OVX) e os quarenta restantes somente à laparotomia com simulação da retirada dos ovários (SHAM). Antes das cirurgias, cada animal recebeu anestesia com cetamina (20mg/kg) e xilazina (2,71mg/kg) via intramuscular, anti-inflamatório (flunixinina meglumina: 0,68mg/kg) e antibiótico (enrofloxocina: 2,71mg/kg), ambos subcutâneo. Nas primeiras 5 horas após as cirurgias, os animais permaneceram em câmara aquecida, a fim de manter a temperatura corporal. Após este período, as ratas foram alocadas em gaiolas individuais. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Hospital Veterinário do Departamento de Veterinária da UFV.

Um grupo de 10 animais (*baseline*) constituído de ratas ovariectomizadas (n=6) e inteiras (n=4) foi submetido à eutanásia 15 dias após a cirurgia, objetivando determinar a influência da cirurgia sobre a homeostase óssea e também permitir comparações com os demais grupos experimentais ao final de 10 semanas.

Após quinze dias de recuperação das cirurgias de ovariectomia ou simulação da retirada dos ovários, os animais permaneceram por mais 10 semanas em gaiolas individuais no Biotério de Experimentação Animal do Departamento de Educação Física e foram alocados em 7 grupos (n=12), a saber:

GB (*Baseline*): ratas OVX e SHAM submetidas à eutanásia após 15 dias de cirurgia;

CO: ratas OVX que foram submetidas ao treinamento de corrida em esteira, permanecendo com vida livre na gaiola por 10 semanas;

CS: ratas SHAM que foram submetidas ao treinamento de corrida em esteira, permanecendo com vida livre na gaiola por 10 semanas;

¹ Ração Comercial - Socil[®]

NO: ratas OVX que foram submetidas ao treinamento de natação com sobrecarga, permanecendo com vida livre na gaiola por 10 semanas;

NS: ratas SHAM que foram submetidas ao treinamento de natação com sobrecarga, permanecendo com vida livre na gaiola por 10 semanas;

CONO: ratas OVX que não foram submetidas ao treinamento de corrida em esteira ou natação com sobrecarga, permanecendo com vida livre na gaiola por 10 semanas (controle);

CONS: ratas SHAM que não foram submetidas ao treinamento de corrida em esteira ou natação com sobrecarga, permanecendo com vida livre na gaiola por 10 semanas (controle).

4.2. Protocolo de Exercício

Após quinze dias de cirurgia, os animais dos grupos CO e CS foram submetidos a um programa progressivo de exercício aeróbico de corrida em esteira rolante elétrica² (quadro 2).

Quadro 2. Protocolo de exercício em esteira e natação.

Semana	Corrida	Inclinação da esteira	Natação com sobrecarga	Duração
1 ^a	Pós-cirurgia	Pós-cirurgia	Pós-cirurgia	Pós-cirurgia
2 ^a	Pós-cirurgia	Pós-cirurgia	Pós-cirurgia	Pós-cirurgia
3 ^a	10m/min	0°	0%	30min
4 ^a	15m/min	0°	1%	50min
5 ^a	16m/min	0°	2%	60min
6 ^a	16m/min	0°	2%	60min
7 ^a	16m/min	0°	2%	60min
8 ^a	16m/min	0°	2%	60min
9 ^a	16m/min	0°	3%	60min
10 ^a	16m/min	0°	3%	60min
11 ^a	16m/min	10°	3%	60min
12 ^a	16m/min	10°	3%	60min

Na primeira e segunda semanas, foi realizada adaptação dos animais com corridas na velocidade de 10m/min por 10 minutos. Este tempo foi aumentado de 5 em 5 minutos diariamente até o quinto dia de exercício, até atingir 30 minutos contínuos, com a mesma velocidade. No sexto dia de exercício, os animais correram a 11m/min durante 35 minutos. O tempo foi aumentado de 5 em 5 minutos e a velocidade aumentada em 1m/min por dia. A

² Esteira Insight Instrumentos – Ribeirão Preto, SP, Brasil

partir da terceira semana até a oitava, os animais correram a 16m/min, com inclinação de 0%, 60 minutos por dia. Na nona e décima semanas, os animais mantiveram a velocidade de 16m/min, com a esteira inclinada a 10° durante 60 minutos. Os animais realizaram 5 sessões de exercício por semana, por um período de 50 dias, conforme sugerido por Iwamoto et al. (2004).

Após quinze dias de recuperação da cirurgia, os animais dos grupos NO e NS foram submetidos a um programa progressivo de exercício aeróbico de natação com sobrecarga (quadro 2), que foi definida a partir do peso corporal do animal, em um tanque de alvenaria azulejado (45cm de profundidade, 55cm de largura) com água a uma temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$. Na primeira e segunda semanas foi realizada adaptação com os animais, que nadaram 10 minutos com 0% de carga. Este tempo foi aumentado de 5 em 5 minutos, diariamente, até o quinto dia de exercício, chegando a 30 minutos. No oitavo dia de exercício, os animais nadaram com 1% da carga referente ao peso corporal, aumentando progressivamente o tempo de exercício. A partir da terceira até a quarta semana, nadaram com carga de 2% do peso corporal, durante 60 minutos. Da quinta a décima semanas, nadaram com carga de 3% do peso corporal durante 60 minutos, 5 sessões por semana, durante 10 semanas, conforme sugerido por Huang et al. (2003).

Os animais dos grupos CONO e CONS constituíram os grupos controle, durante as dez semanas de experimento.

4.3. Avaliação do Desempenho

O desempenho dos animais dos grupos experimentais foi determinado 48 horas após a última sessão de treinamento físico.

Os animais dos grupos CO e CS e seis animais dos grupos CONO e CONS foram submetidos a um teste máximo de exaustão de corrida em esteira (adaptado de Hussain et al., 2001). O teste foi iniciado a velocidade de 10m/min com inclinação da esteira em 15°. A velocidade foi aumentada em 1m/min, a cada 2 minutos, com o animal correndo até a fadiga, que foi definida quando o animal não mais conseguia correr, apoiando-se na esteira e permanecendo por mais de 10 segundos. Nesta ocasião, considerou-se o fim do teste retornando com o animal à gaiola.

Para a avaliação do desempenho dos animais foi utilizado o tempo (minutos) de permanência dos animais correndo na esteira.

Os animais dos grupos NO e NS e os outros seis restantes dos grupos CONO e CONS foram submetidos ao teste máximo de exaustão de natação em tanque (45cm de profundidade, 55cm de largura) com água a temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$. Os animais foram colocados no tanque

e nadaram com carga de 4% do seu peso corporal até a fadiga, que foi definida quando o animal permanecia por 30 segundos submersos na água. O desempenho foi calculado pelo tempo de permanência no tanque nadando.

4.4. Determinação do Marcador Bioquímico Ósseo

Amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca, de cada animal, com o auxílio de seringas descartáveis, transferidas para tubos de ensaio de 10mL e centrifugadas a 3.000rpm durante 10 minutos³. Deste centrifugado retirou-se o soro que foi armazenado em *ependorf* em freezer a -20°C para análise da fosfatase alcalina óssea.

Os *ependorf* contendo soro foram descongelados em temperatura ambiente, no laboratório de Biofármacos da Universidade Federal de Viçosa, onde o soro foi pipetado em cubetas para a determinação do conteúdo de fosfatase alcalina óssea,⁴ por meio de sistema imunoensaio,⁵ pela técnica de quimioluminescência indireta, a partir da curva padrão de 6 pontos. Os resultados da Ostase foram expressos em picograma / mililitro (pg/mL).

4.5. Determinação da Composição Corporal

Ao final da décima semana, 72 horas após o teste de exaustão, os animais foram submetidos à eutanásia em uma câmara de CO₂. Toda a gordura visceral foi removida e pesada logo em seguida. Descartaram-se pele, vísceras, cabeça e pés, permanecendo apenas ossos e músculos (carcaça vazia) para a análise quantitativa de água, gordura, proteína e cinzas, conforme Pitts et al. (1983).

O percentual de água foi avaliado por método gravimétrico por evaporação em estufa⁶ a 105°C por 24 horas. Pratos de alumínio foram secos em estufa à 105°C por 1 hora. Após este tempo, foram pesados e as carcaças dos animais colocadas dentro dos sobre os pratos para serem novamente pesados. A diferença encontrada entre eles correspondeu ao peso úmido do animal. Foram mantidos em estufa a 105°C por 24 horas para que se evaporasse todo o conteúdo de água presente. Após este período, foram resfriados em dissecadores por 30 minutos e, então, pesados novamente. A água da carcaça foi calculada pela diferença do peso da carcaça pré e pós-secagem.

³ Excelsa-Fanem – modelo 204 - NR– São Paulo, SP, Brasil

⁴ Ostase[®], Beckman Coulter – USA

⁵ Access[®] - USA

⁶ Fanem[®] - Brasil

Após a secagem (rato desidratado), as carcaças vazias foram maceradas e colocadas em cartuchos de papel filtro para a extração da gordura pelo método de Soxhlet durante oito horas, utilizando éter etílico como solvente. O cartucho com o rato desidratado foi colocado no aparelho Soxhlet montado com extratores grandes e balões de 500 mL. Dentro dos extratores foi colocado éter etílico até transbordar o sistema de refluxo. A percentagem da gordura foi determinada pela diferença do peso do cartucho contendo a carcaça pré e pós-desengordurado

O percentual de proteína foi calculado em triplicata pelo método indireto de determinação do nitrogênio, de Kjeldahl (Aoac, 1998), utilizando-se o fator 6,25 ($\text{Proteína (g)} = \text{nitrogênio (g)} \times 6,25$) para conversão em proteína. O conteúdo do cartucho foi triturado⁷ até se transformar em pó. Pesou-se aproximadamente 20mg da carcaça, agora transformada em pó, em papel manteiga para ser digerida. Para o processo de digestão foram utilizados 1g de mistura digestora e 3mL de ácido sulfúrico. Esta foi realizada por um programa progressivo de temperatura chegando a 420°C por 2 horas. A amostra foi levada ao destilador de Kjeldahl com hidróxido de sódio (50%) durante 8 minutos, ao qual se coletou o destilado em ácido bórico (4%). O produto da destilação foi retido no ácido bórico, que posteriormente foi titulado com ácido clorídrico (0,05 N), sendo registrado o volume gasto para viragem de cor. O peso da amostra, o volume de HCL da titulação e o fator do HCL foram usados para determinar a quantidade de nitrogênio presente, para, enfim, se encontrar a percentagem de proteína.

O percentual de cinzas foi determinado por incineração à 600°C por 6 horas (Aoac, 1998). Cadinhos de porcelana foram colocados em uma mufla a uma temperatura de 600°C para que toda umidade fosse retirada. Em seguida, acrescentou-se 2,5g do rato desengordurado (pó) em cada cadinho. Estes foram colocados em um bloco digestor a 300°C por 1 hora e 30 minutos e, posteriormente, levados para incineração em mufla a uma temperatura de 600°C por 6 horas. Após o término do tempo de incineração, reduziu-se a temperatura para 150°C até que os cadinhos atingissem a esta temperatura, para então serem retirados e transferidos para o dissecador. A percentagem de cinzas foi determinada pela diferença do peso do cadinho contendo a amostra pré e pós-incineração. As análises foram realizadas no laboratório de Análise de Alimentos do Departamento de Nutrição e Saúde da UFV.

⁷ Mix Liquidificador Arno- modelo PRC

4.6. Avaliação da Densidade Mineral Óssea

O fêmur direito foi removido, os tecidos moles foram liberados e o osso foi depositado em uma gase embebida com soro fisiológico e armazenado em freezer a -20°C. As amostras foram descongeladas imediatamente antes das análises.

A análise da Densidade Mineral Óssea (DMO) foi realizada em Densitômetro Ósseo de Raios-X⁸ (Figura 1), com software para pequenos animais, e foi realizada na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), em Araçatuba, SP.

A Densidade Mineral Óssea é automaticamente obtida pelo sistema a partir da fórmula:

$$\text{DMO (g/cm}^2\text{)} = \text{CMO (g)} / \text{ÁREA (cm}^2\text{)}.$$



Figura 1: Densitômetro Ósseo de Raios-X.

4.7. Avaliação da Resistência Óssea

A análise da resistência óssea foi realizada também no mesmo fêmur direito, logo após a análise da DMO, conforme Vicentini et al. (2007). O osso foi submetido a ensaio mecânico em máquina universal de ensaio⁹ (figura 2), do Departamento de Materiais Dentários da Faculdade de Odontologia da UNESP, Araçatuba - SP, com carga aplicada a uma velocidade de 5mm/min. Um sistema computadorizado acoplado ao aparelho registrou a força (carga) e o deslocamento, e foi possível controlar todos os parâmetros do ensaio mecânico e obter o valor da força referente a cada deslocamento. A aquisição destes pontos foi realizada em intervalos padronizados de tempos definidos pelo programa. A análise foi realizada tanto no colo do fêmur (com predomínio de osso esponjoso) como também no terço médio da diáfise (com predomínio de osso cortical).

⁸ LUNAR DPX-ALPHA[®]

⁹ EMIC[®], modelo DL 3000*



Figura 2: Aparelho universal de ensaio EMIC[®], acoplado a um computador.

Na diáfise femoral, foi utilizado ensaio de flexão simples em três pontos no ensaio das amostras. O ensaio consistiu em apoiar o fêmur sob dois suportes distanciados entre si de 20mm, sendo a carga aplicada no centro da amostra (Figura 3). A célula de carga utilizada foi de 2000N. A cada incremento de carga aplicada ao material o computador automaticamente registrava a deformação correspondente, para, depois, ser construído o gráfico carga vs deformação, a partir do qual pode-se obter: força máxima (maior força aplicada à amostra) e rigidez (dada pela inclinação da curva na fase elástica). Quanto maior a rigidez menor a deformação resultante da aplicação da carga. Também foi avaliada a tenacidade das amostras, que corresponde à energia absorvida pelo corpo, obtida pelo cálculo da área sob a curva carga vs deformação até o ponto de ruptura da amostra.



Figura 3: Fotografia do ensaio mecânico de flexão em três pontos, em diáfise de fêmur de rata.

Também foi realizado ensaio de flexão na cabeça do fêmur, com a amostra fixada em um aparato mecânico ficando em posição vertical (Figura 4). Os mesmos parâmetros foram calculados neste ensaio (força máxima, rigidez e tenacidade).

O programa emitiu um arquivo com todos os pontos adquiridos durante os ensaios [Tempo (s) \times Deslocamento (mm) \times Força (N)]. Estes valores foram transferidos para planilhas¹⁰, para a construção dos gráficos e cálculo das propriedades mecânicas.

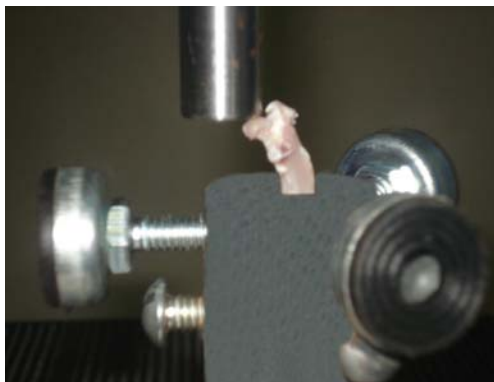


Figura 4: Fotografia do ensaio mecânico de flexão no colo do fêmur de rata.

4.8. Determinação da Morfometria Óssea

O fêmur esquerdo foi dissecado e o osso, livre dos tecidos moles, foi fixado em formol tamponado a temperatura ambiente. Posteriormente, os fêmures foram colocados em cuba descalcificadora, contendo solução com citrato de sódio, água destilada e ácido fórmico, permanecendo nesta solução por 8 dias consecutivos. Após a descalcificação, foram feitos cortes transversais no fêmur, removendo-se o trocânter maior, a cabeça e a porção média da diáfise do fêmur, que retornaram à cuba descalcificadora, agora armazenados em cassetes, onde permaneceram por mais 7 dias. Posteriormente, as amostras foram colocadas em álcool 70%, 80% e 90% por 1 hora em cada, em álcool absoluto e xilol em partes iguais e xilol absoluto para que fossem incluídas em parafina. Em seqüência, foram obtidos cortes de 5 micrômetros (μm) de espessura e as lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) e montadas.

4.8.1. Análise histomorfométrica

Para avaliação histomorfométrica, os cortes histológicos foram analisados através do sistema para análises de imagens Image-Pro Plus versão 4.5.0.29. As imagens foram digitalizadas utilizando um fotomicroscópio¹¹ com ocular de 10x e objetiva de 20x para análise do osso trabecular e objetiva de 4x para osso cortical¹². No osso trabecular foram feitas cinco imagens por animal, em campos distintos, garantindo maior fidelidade dos

¹⁰ Microsoft Office Excel 2007 e Origin.

¹¹ Olympus Biological CX31

¹² programa analySIS[®] getIT

resultados encontrados. Foram contados cem pontos por imagem capturada, assim distribuída sobre o tecido ósseo e outros componentes (tecido mielóide). Foi mensurada toda a região que continha tecido ósseo, utilizando a média simples como resultado.

No osso cortical foram feitas duas imagens por animal em campos distintos, com dez medidas por campo, para mensuração da espessura cortical.

4.9. Análise Estatística

Os dados (Y = AGUA, GOR, PTN e CINZAS) foram submetidos a análises de variância (ANOVA's) para se avaliar os efeitos dos tratamentos (TRAT = CORR, NAT e SED) e da presença/ausência do ovário (OVARIO = SHAM e OVX), conforme o seguinte modelo de efeitos fixos: $Y = \text{TRAT} + \text{OVX} + (\text{TRAT} \times \text{OVX})$; em que TRAT x OVX é o efeito da interação entre os efeitos do tratamento e da presença/ausência do ovário. A pressuposição de homogeneidade de variâncias entre os grupos foi checada e quando não atendida optou-se pelo procedimento não paramétrico de Kruskal-Wallis. A estratégia adotada após as ANOVA's foi de comparar médias pelo procedimento de Tukey (a 5%) ou com ajustamento do valor p por Tukey-Kramér quando os dados eram desbalanceados, procedendo-se a comparações marginais quando a interação era não significativa (valor $p < 5\%$). Os valores p das análises são informados nos resultados. Para as comparações entre os tratamentos com o grupo baseline adotou-se o teste de Dunnett.

Para o peso corporal (Y), as análises basearam-se no ajuste de modelos de regressão: linear simples, $Y = a + bX$, ou linear do segundo grau, $Y = a + bX + cX^2$, para comparar os perfis de ganho de peso semanais (X=tempo em semanas) entre os tratamentos corrida e natação comparados ao sedentário e também SHAM versus OVX.

Todas as análises foram implementadas do software SAS (Statistical Analysis System, SAS Institute Inc., Cary, NC - www.sas.com/offices/latinamerica/brazil/) versão 9.1, licenciado para a UFV, 2009.

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Massa Corporal

Os resultados referentes à massa corporal dos animais do experimento, durante 12 semanas de período de estudo, estão apresentados na figura 5.

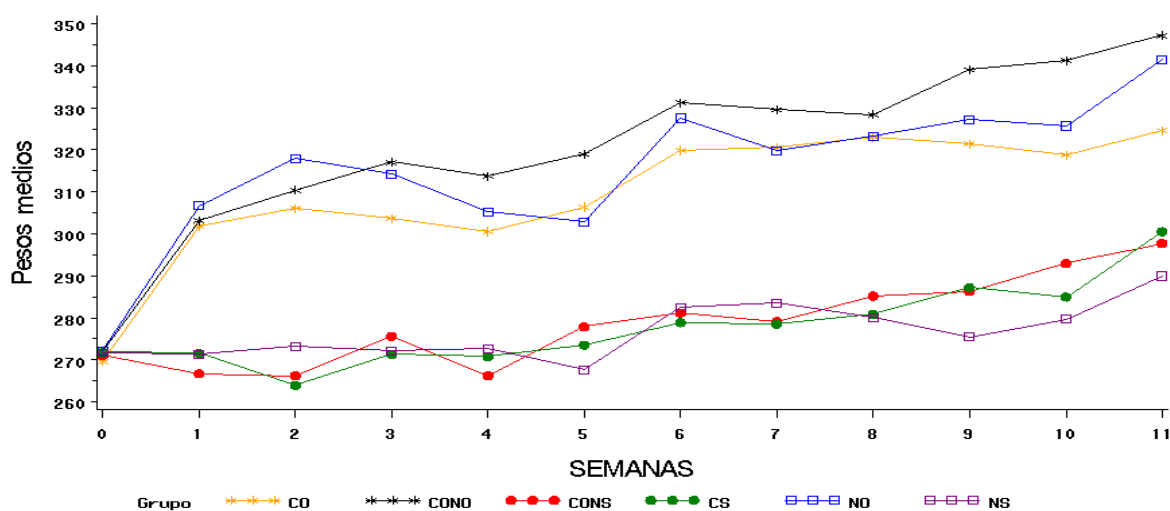


Figura 5: Modelos de regressão ajustados para descrever a variabilidade dos pesos médios dos animais dos diferentes grupos experimentais avaliados em 12 semanas. OVX = ratas ovariectomizadas; SHAM = ratas inteiras. CO = corrida OVX; CS = corrida SHAM; NO = natação OVX; NS = natação SHAM; CONO = controle OVX; CONS = controle SHAM.

Não foi observada diferença ($P > 0,05$) entre a massa dos animais dos diferentes grupos no início dos tratamentos (CO: $269,7 \pm 19,3$; NO: $272,3 \pm 17,9$; CONO: $272 \pm 17,8$; CS: $271,8 \pm 16,9$; NS: $271,7 \pm 19,4$; CONS: $271,1 \pm 18,1$), comprovando homogeneidade entre os grupos nesta fase. Todos os animais aumentaram a massa corporal até o final do experimento. Porém, observou-se que os animais submetidos à ovariectomia e a falta de atividade física ganharam mais massa em relação aos inteiros durante o período de treinamento e ao final dos tratamentos.

Após 15 dias de recuperação pós-cirurgia, observou-se aumento significativo da massa corporal dos animais OVX comparados aos SHAM ($p < 0,05$). Esses resultados permitem concordar com outros autores que utilizaram ratas ovariectomizadas e inteiras (Latour et al., 2001; Renno et al., 2007; Tromp et al., 2006; Lespessailles et al., 2009). Para Shinoda et al. (2002) esse aumento da massa corporal se deve principalmente a ovariectomia e é resultante de baixos níveis hormonais e ao maior acúmulo de gordura ocasionado pela elevação da ingestão alimentar. Contudo, neste estudo, a ingestão alimentar foi controlada, todos os animais receberam diariamente a mesma quantidade de ração, sugerindo que o ganho de

massa corporal dos animais OVX independe da ingestão alimentar, mostrando que esse aumento se deve principalmente a ovariectomia.

Um dos benefícios do exercício aeróbico é a redução da massa corporal, provavelmente da massa gorda (Irving et al., 2008). Essa afirmação é confirmada pela redução da massa corporal dos animais OVX exercitados quando comparados aos não treinados. Contudo, Ferreira et al. (2005) ao treinarem ratos Wistar em esteira a uma velocidade de 12m/min durante 1 hora/dia por 10 semanas não observaram diferença significativa na massa corporal destes animais. Infere-se que a velocidade utilizada, 16 m/min no treinamento de corrida em esteira, e a sobrecarga de até 3% na natação, além da duração, neste estudo, foram suficientes para promover o aumento do metabolismo aeróbico, promovendo redução na massa corporal.

5.2. Avaliação do desempenho dos animais

Os resultados referentes ao desempenho dos animais submetidos a diferentes tipos de tratamento estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1: Desempenho dos animais dos diferentes grupos experimentais ao final de dez semanas de treinamento.

Grupos	Ovário	Tempo (minutos)
CO	OVX	18,0 ±7,34*
NO	OVX	145,9 ±63,52**
CONO-CO	OVX	5,0 ±1,41
CONO-NO	OVX	42,7 ±24,93
CS	SHAM	18,8 ±6,33
NS	SHAM	89,1 ±52,21 [#]
CONS-CS	SHAM	13,8 ±6,58
CONS-NS	SHAM	28,5 ±19,98

Dados expressos em média ±desvio padrão. OVX=ovariectomizadas, SHAM=inteiras. CO (n = 12) e CS (n = 12)= grupos corrida; NO (n = 12) e NS (n = 12)= grupos natação; CONO-CO (n = 6) e CONS-CS (n = 6)= grupo controle teste corrida (n = 6); CONO-NO (n = 6) e CONS-NS (n = 6)= grupo sedentário teste natação. *, p < 0,05 vs CONO-CO; **, p < 0,05 vs CONO-NO; [#], p < 0,05 vs CONS-NS.

Os valores referentes à avaliação do desempenho dos animais no exercício de corrida em esteira mostram que houve diferença (p < 0,05) entre os grupos treinados e não treinados. Quando comparados os grupos OVX e SHAM submetidos ao treinamento de corrida com os não treinados, apenas CS não apresentou diferenças (p > 0,05) no desempenho dos animais.

Quando comparados os grupos OVX e SHAM submetidos ao treinamento de natação com os não treinados, NO e NS apresentaram melhor desempenho ($p < 0,05$) que CONO-NO e CONS-NS.

5.3. Biomarcador ósseo

Os resultados referentes ao marcador bioquímico, fosfatase alcalina óssea (ostase) ao final dos tratamentos estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Dados referentes ao biomarcador ostase, ao final de dez semanas de treinamento nos animais dos diferentes grupos experimentais.

Animais	Ovário	Ostase (pg/mL)
CO	OVX	10,9 ±10,97*
NO	OVX	11,3 ±7,69**
CONO	OVX	27,9 ±28,70
CS	SHAM	48,3 ±28,84
NS	SHAM	35,8 ±20,80
CONS	SHAM	30,1 ±25,13

Dados expressos em média ±desvio padrão. OVX = ovariectomizadas; SHAM = inteiras. CO (n = 12) e CS (n = 12) = grupos corrida; NO (n = 12) e NS (n = 12) = grupos natação; CONO (n = 12) e CONS = grupos controle. *, $p < 0,05$ vs CS; **, $p < 0,05$ vs NS.

Em relação ao biomarcador ostase observou-se diferenças ($p < 0,05$) nos grupos OVX treinados (CO e NO) quando comparados aos SHAM treinados (CS e NS), demonstrando que os animais SHAM apresentaram uma taxa de formação óssea mais expressiva que os OVX e que pode ser justificada pela deficiência de estrogênio que determina aumento do *turnover* ósseo, acelerando o processo de remodelação, reduzindo a taxa de formação e elevando a de reabsorção (Bonnet et al., 2007; Fuchs et al., 2007; D'Amelio et al., 2008). Também Franco (2009), encontrou em animais OVX valores de ostase menores que os SHAM.

Apesar de não atingirem significância ($p > 0,05$) os valores de ostase no grupo não treinado foram maiores que nos treinados. Para Ryan et al. (1994) os resultados da variação dos marcadores bioquímicos nem sempre acompanham as mudanças que ocorrem na DMO no decorrer do período de treinamento. Honda et al. (2003) observaram aumento na concentração desses marcadores sem nenhuma resposta da DMO. Contudo, a resposta dos marcadores pode representar uma média da remodelação óssea corporal total e não dos locais que sofrem maior sobrecarga durante a atividade física (Cadore et al., 2005).

5.4. Composição corporal: água, gordura, proteína e cinzas

As variações da composição corporal, para os respectivos grupos de tratamentos corrida, natação e sedentário estão apresentadas na tabela 3.

Tabela 3: Variações da composição corporal ao final de dez semanas de treinamento para os grupos experimentais.

Variável	Ovário			Exercício	
	SHAM	OVX	Corrida	Natação	Controle
Água na carcaça (%)	67,5 ±3,04	68,4 ±1,68	69,2 ±1,64	67,6 ±1,64	67,1 ±3,39
Gordura na carcaça (%)	6,5 ±3,46	5,6 ±1,53	4,9 ±1,84	6,5 ±2,05	6,8 ±3,60
Proteína na carcaça (%)	24,2 ±2,58	23,6±1,57	23,9 ±2,37	23,9 ±1,55	23,9 ±2,51
Cinzas na carcaça (%)	5,3 ±0,65	5,1 ±0,51	4,9 ±0,46	5,4 ±0,53	5,2 ±0,69

Dados expressos em média ±desvio padrão de 6 animais por grupo.

Quando comparados os dados médios referentes à composição corporal dos animais dos diversos grupos ao final do treinamento, não foram observadas diferenças ($p > 0,05$). Também, quando foram estabelecidas comparações entre os diversos grupos os valores encontrados estabeleceram que nem a ovariectomia ou o tipo de exercício foram capazes de influenciar a composição corporal.

Sugere-se que o tempo em que foi realizado o treinamento não foi suficiente para provocar alterações significativas na composição corporal na carcaça destes animais. E que neste tipo de análise a gordura subcutânea não foi analisada, pois a pele foi descartada, então os valores encontrados para gordura na carcaça, não refletem a gordura corporal total, apenas a intramuscular.

5.5. Gordura visceral

Os efeitos dos tratamentos sobre a gordura visceral dos animais estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4: Valores médios para gordura visceral, no início e ao final de dez semanas de treinamento para os grupos experimentais.

Grupos	Ovário	Gordura visceral (g)
GBa	OVX	10,9 ±3,71
CO	OVX	7,8 ±3,81*
NO	OVX	13,1 ±7,20
CONO	OVX	19,2 ±9,58
GBb	SHAM	5,3 ±2,08
CS	SHAM	11,4 ±3,56
NS	SHAM	12,3 ±5,62
CONS	SHAM	12,9 ±4,19

Dados expressos em média ±desvio padrão. OVX = ovariectomizadas; SHAM = inteiras. GBa (n = 6) e GBb (n = 4) = grupos *baseline*; CO (n = 12) e CS (n = 12) = grupos corrida; NO (n = 12) e NS (n = 12) = grupos natação; CONO (n = 12) e CONS = grupos CONTROLE. *, p < 0,05 vs CONO.

Quando foram comparados os valores médios de gordura visceral obtidos de ratas ovariectomizadas ao final do experimento, observou-se que o protocolo de exercício corrida influenciou (p < 0,05) a redução destes valores, em relação ao grupo não treinado. A deficiência de estrogênio provocou alterações hormonais (Shinoda et al., 2002) e a prática de exercício aeróbico determinou ao aumento do gasto energético (Ormsbee et al., 2007). Notomi et al. (2003) observaram que ratas Sprague – Dawley OVX com 12 semanas de idade apresentaram 30% mais gordura abdominal do que as SHAM.

Estudos com humanos (Irving et al., 2008) e animais (Iwamoto et al., 2004) mostraram que o exercício de moderada intensidade determinou benefícios à composição corporal, caracterizando-se como estratégia para reduzir a deposição de gordura e o peso corporal (Irving et al., 2008). Esses benefícios se devem ao aumento do gasto energético causado pelo exercício, sendo tratados como importante estratégia para o tratamento da obesidade.

Quando foram comparados os valores médios de gordura visceral obtidos de ratas inteiras, no início e no final do experimento, observou-se que os protocolos de exercício corrida e natação não influenciaram (p > 0,05) a redução destes valores em relação aos grupos sedentários.

5.6. Densidade mineral óssea

Os valores referentes à densidade mineral óssea, conteúdo mineral ósseo e área do fêmur estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5: Densidade mineral óssea, conteúdo mineral ósseo e área, ao final de dez semanas de treinamento, obtidas no fêmur dos animais dos grupos experimentais.

Grupos	Ovário	DMO (g/cm²)	CMO (g)	Área (cm²)
GBa	OVX	0,226 ±0,022 ^{**}	0,280 ±0,035	1,232 ±0,084
CO	OVX	0,227 ±0,008	0,308 ±0,026 ^{#§}	1,169 ±0,003
NO	OVX	0,241 ±0,029 [*]	0,301 ±0,054 ^{#§}	1,193 ±0,003
CONO	OVX	0,225 ±0,012	0,272 ±0,036	1,217 ±0,003
GBb	SHAM	0,255 ±0,003	0,345 ±0,038 [§]	1,443 ±0,105 [§]
CS	SHAM	0,237 ±0,015 [*]	0,275 ±0,032	1,139 ±0,043 ^{**}
NS	SHAM	0,219 ±0,018 ^{**}	0,294 ±0,028	1,181 ±0,003 ^{**}
CONS	SHAM	0,229 ±0,018 ^{**}	0,297 ±0,032 [#]	1,205 ±0,003 ^{**}

Dados expressos em média ±desvio padrão. OVX = ovariectomizadas; SHAM = inteiras. GBa (n = 6) e GBb (n = 4) = grupos *baseline*; CO (n = 12) e CS (n = 12) = grupos corrida; NO (n = 12) e NS (n = 12) = grupos natação; CONO (n = 12) e CONS = grupos controle. ^{*}, p < 0,05 vs NS ; ^{**}, p < 0,05 vs GBb; [#], p < 0,05 vs CONO; [§], p < 0,05 vs GBa .

O grupo CS apresentou maior DMO (p > 0,05) em relação à NS, evidenciando que o treinamento de corrida em esteira provocou maior aumento na massa óssea que o treinamento de natação em ratas inteiras. O exercício em esteira consiste de corrida e a formação óssea ocorre em resposta à força mecânica transmitida pelos músculos locomotores e pelo peso do animal ao osso (Notomi et al., 2000). Outros estudos mostraram que a corrida produz efeito osteogênico em ratos jovens (Bourrin et al., 1995; Huang et al., 2008) e em fêmeas (Hagihara et al., 2005).

Huang et al. (2003) observaram que os níveis mais altos de DMO foram encontrados na posição distal da tíbia e proximal do fêmur dos ratos que treinaram corrida. Entretanto, em outro estudo, observaram que o exercício de corrida em esteira beneficiou o tecido ósseo sendo verificado por análises biomecânicas, não provocando mudanças significativas na DMO e no CMO (Huang et al., 2008). Neste estudo, o exercício de corrida em esteira pode ter provocado um aumento da DMO devido à sobrecarga e ao impacto que o osso foi submetido, o que não ocorreu com o treinamento de natação que não gera este mesmo tipo de sobrecarga.

Foi verificado que os animais treinados com natação OVX (NO) apresentaram maior DMO que os SHAM (NS) provavelmente em razão dos efeitos benéficos do exercício que ao provocar aumento da massa muscular induz maior ação sobre o osso, como já havia sido relatado por Bayramoglu et al. (2005) e Renno et al. (2007). É sabido que a contração muscular atua direta ou indiretamente sobre os ossos produzindo estímulo osteogênico,

explicando o fato dos animais do grupo NO, mesmo sem a ação do estrogênio, terem apresentado alterações na DMO.

Como o exercício de natação foi realizado com sobrecarga e os animais OVX possuíam uma massa corporal maior em relação aos SHAM, a ação muscular pode ter se tornado mais efetiva. Outra hipótese é que os animais passavam a maior parte do dia, durante o período experimental, dentro de suas gaiolas e movimentavam livremente dentro delas. A ação biomecânica produzida pela massa corporal destes animais sobre o osso poderia estar aumentando a DMO dos animais OVX e, isto ficou comprovado pela menor área do fêmur relativa a massa corporal dos animais OVX (tabela 5) que nos SHAM. Hughes et al. (1995) sugerem que a massa corporal pode ser um importante fator a influenciar a DMO devido às forças de compressão aplicadas nos ossos que sustentam a sobrecarga corporal.

Em outro estudo, foi observado aumento na DMO e no CMO do fêmur dos animais OVX treinados, sugerindo aumento da atividade óssea (Hart et al., 2001; Melton et al., 2004). Em contrapartida, Kim et al. (2005) observaram que o exercício de natação provocou redução na DMO e, Huang et al. (2003), não observaram mudanças na DMO em ratos que realizaram treinamento com natação. Neste estudo, o treinamento de natação com sobrecarga foi capaz de aumentar os níveis de DMO em ratas ovariectomizadas.

Ambos os grupos GBa, NS e CONS apresentaram valores da DMO menores que o GBb ($p < 0,05$). Os valores médios de GBa confirmam achados anteriores em animais OVX que apresentaram o processo de reabsorção muito mais acentuado que os SHAM (Bagi et al., 1997, Tromp et al., 2006). Quando comparados NS com GBb verificou-se que o exercício de natação não recuperou os valores iniciais da DMO, mesmo com níveis regulares do estrogênio. Enquanto que o grupo CONS pode ter apresentado valores menores que o GBb devido à idade dos animais, visto que os animais do CONS tinham 30 semanas, enquanto que os do GBb apenas 22 semanas de idade.

O grupo CO apresentou valores no CMO maiores ($p < 0,05$) que o seu controle (CONO), mostrando que o exercício de corrida em esteira também foi benéfico ao CMO em animais OVX, além de reverter e aumentar os níveis iniciais de CMO observados no grupo GBa. O exercício de corrida em esteira reduziu a massa corporal destes animais, aumentando assim a área relativa do fêmur neste grupo (tabela 5). Esses resultados permitem concordar com Fuchs et al. (2007), que constataram aumento no CMO em ratas correndo em esteira a 24m/min por 60 min/dia sob uma inclinação de 5%. Em contrapartida, Lespessailles et al. (2009) não encontraram mudanças significativas no CMO em animais ovariectomizados que realizaram treinamento de corrida em período de 12 semanas. Em outro estudo, pesquisadores sugeriram que o exercício de corrida com sobrecarga, por períodos curtos de tempo, aumenta

de 7-12% o CMO e de 5-9% a DMO, sendo acompanhados por aumento da força óssea (Tromp et al., 2006). Os resultados deste estudo sugerem que o treinamento de corrida em esteira pode ter provocado aumento no CMO devido ao impacto que este tipo de exercício provoca no osso.

O grupo NO apresentou maiores valores no CMO quando comparado ao seu controle (CONO), demonstrando que o exercício de natação foi eficaz para a melhora do CMO em ratas ovariectomizadas. Também, apresentou valores superiores a GBa, aumentando os valores iniciais de CMO. Pesquisadores afirmam que mais de 70% da tensão sofrida pelo osso são transmitidas pela força muscular e não pelo peso corporal, beneficiando diretamente a DMO e o CMO (Iwamoto et al., 1999; Lekamwasam et al., 2009). Hughes et al. (1995) sugerem que havendo relação entre força muscular, DMO e CMO, possivelmente a magnitude da contração muscular tem impacto em locais ósseos relacionados anatomicamente com os músculos que realizam essa contração. Os resultados para ratas OVX são semelhantes aos de Snyder et al. (1992) cujo grupo que treinou natação apresentou o úmero mais pesado e maior CMO, indicando que a força muscular produzida durante o exercício de natação provocou adaptações no osso.

Como mostrado anteriormente neste estudo, a área relativa a massa corporal de CO ($4,2 \pm 0,366 \text{ cm}^2/\text{g}$) apresentou valores superiores, e quando CO foi comparado com os grupos NO e CONO, percebeu-se que a massa corporal dos animais teve ação direta nesta área, visto que NO e CONO apresentaram menores valores na área relativa ($3,6 \pm 0,266$; $3,5 \pm 0,354$, respectivamente). Assim, a maior massa corporal de NO pode ter contribuído para uma maior ação da massa muscular sobre o tecido ósseo.

Os resultados encontrados para o CMO no grupo CONS foram maiores que os do CONO, implicando que os animais com deficiência de estrogênio apresentam menor CMO, que acelera a reabsorção óssea e resulta em rápida perda óssea com aumento do *turnover* ósseo (Tromp et al., 2006). Confirmando a hipótese de que a ovariectomia aumenta a reabsorção óssea.

O grupo GBa apresentou valores menores ($p < 0,05$) que GBb, confirmando que os animais ovariectomizados demonstram rápida perda óssea, afetando dessa maneira a área do fêmur. Como Bagi et al. (1997) que verificaram que a área do fêmur de animais SHAM foram maiores que os OVX. Esses resultados são confirmados também através da área relativa a massa corporal, onde a área dos animais OVX foi menor que os SHAM, 15 dias após ovariectomia e que já apresentavam massa corporal superior aos inteiros, mesmo não havendo diferenças ($p > 0,05$) entre os grupos GBa e GBb ($308 \pm 31,4$ vs $294,5 \pm 24,4$, respectivamente).

Os grupos CS, NS e CONS apresentaram valores menores da área quando comparados ao GBb ($4,9 \pm 0,642 \text{ cm}^2/\text{g}$). Isto pode ser confirmado pela área relativa à massa corporal, em que os animais de CS, NS e CONS apresentaram valores menores que GBb ($3,9 \pm 0,356$; $4,7 \pm 0,474$; $4,4 \pm 0,415$, respectivamente).

5.7. Área do fêmur relativa à massa corporal de ratas

Os dados da área do fêmur foram normalizados pela massa corporal, sendo apresentados de forma relativa. Os resultados estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6: Área do fêmur relativa ao peso corporal de ratas, ao final de dez semanas de treinamento dos grupos experimentais.

Grupos	Ovário	Área (cm^2/g)
GBa	OVX	$4,0 \pm 0,41^*$
CO	OVX	$4,2 \pm 0,37$
NO	OVX	$3,6 \pm 0,27^{**\S}$
CONO	OVX	$3,5 \pm 0,35^{\#\S}$
GBb	SHAM	$4,9 \pm 0,64$
CS	SHAM	$3,9 \pm 0,36^{* **\#}$
NS	SHAM	$4,7 \pm 0,47$
CONS	SHAM	$4,4 \pm 0,42$

Dados expressos em média \pm desvio padrão. OVX = ovariectomizadas; SHAM = inteiras. GBa (n = 6) e GBb (n = 4) = grupos *baseline*; CO (n = 12) e CS (n = 12) = grupos corrida; NO (n = 12) e NS (n = 12) = grupos natação; CONO (n = 12) e CONS = grupos controle. *, p < 0,05 vs GBb; **, p < 0,05 vs NS; #, p < 0,05 vs CONS; §, p < 0,05 vs CO.

5.8. Testes biomecânicos

Os dados da resistência óssea foram normalizados pelo peso corporal, sendo apresentados de forma relativa. Os valores de tenacidade e força de flexão no colo do fêmur, tenacidade e força de flexão no terço médio da diáfise do fêmur foram divididos pelo peso corporal dos animais. Os resultados estão apresentados na tabela 7.

Tabela 7: Tenacidade e força de flexão no colo do fêmur, tenacidade e força de flexão no terço médio da diáfise do fêmur relativo ao peso corporal de ratas ao final de dez semanas de treinamento, nos animais dos grupos experimentais.

Grupos	Ovário	Tenacidade no colo do fêmur (10⁻³ J/g)	Tenacidade terço médio do fêmur (10⁻³ J/g)	Força no colo do fêmur (N/g)	Força terço médio do fêmur (N/g)
CO	OVX	0,2 ±0,05	0,3 ±0,11*	0,4 ±0,16	0,8 ±0,13
NO	OVX	0,3 ±0,25	0,2 ±0,11	0,5 ±0,09	0,8 ±0,16
CONO	OVX	0,2 ±0,06	0,2 ±0,08	0,5 ±0,19	0,8 ±0,11
CS	SHAM	0,2 ±0,06	0,2 ±0,06	0,6 ±0,20	1,0 ±0,11**
NS	SHAM	0,3 ±0,11	0,2 ±0,09	0,6 ±0,12	0,9 ±0,16
CONS	SHAM	0,2 ±0,06	0,2 ±0,07	0,6 ±0,20	1,0 ±0,15*

Dados expressos em média ±desvio padrão. OVX = ovariectomizadas; SHAM = inteiras. CO (n = 12) e CS (n = 12) = grupos corrida; NO (n = 12) e NS (n = 12) = grupos natação; CONO (n = 12) e CONS = grupos controle. *, p < 0,05 vs CONO; **, p < 0,05 vs CO.

Quanto aos resultados relacionados à tenacidade relativa no terço médio do fêmur, observou-se que apenas CO apresentou diferenças (p < 0,05), quando comparado ao seu controle CONO. Mostrando que o exercício de corrida aumentou a tenacidade no terço médio do fêmur em ratas OVX. Esses resultados podem ser confirmados (tabela 8) quando os animais do grupo CO apresentaram valores menores na espessura do osso cortical quando comparados a CONO. Confirmando a hipótese de que quanto maior a tenacidade menor é a resistência do osso.

Observou-se diferenças (p < 0,05) na força relativa do terço médio do fêmur entre CS vs CO e CONS vs CONO. Mostrando que os animais SHAM devido à presença dos ovários, e manutenção dos níveis de estrogênio, possuíam uma maior força relativa no terço médio do fêmur, antes de ocorrer à fratura do osso. Provavelmente, os animais OVX, devido à limitação da ação do estrogênio, possuíam uma menor força relativa de flexão, antes de ocorrer à fratura do osso. Esses resultados confirmam achados anteriores de que a deficiência de estrogênio acelera a perda de massa e aumenta a fragilidade óssea, induzindo osteoporose e aumentando o risco de fraturas (Huang et al., 2008; Park et al., 2008). Autores observando ratas Sprague-Dawley (Dai et al., 2008) e Wistar (Huang et al., 2008), relataram que a OVX reduziu a resistência óssea quando comparada aos animais SHAM, após seis meses de cirurgia. Portanto, estes resultados confirmam a osteoporose em ratas ovariectomizadas em consequência do desequilíbrio na remodelação óssea.

Os resultados do presente estudo permitem concordar com Huang et al. (2003), que observaram aumento na resistência óssea em ratos jovens exercitados com corrida em esteira.

Entretanto, Bonnet et al. (2007) não verificaram diferenças significativas na resistência óssea em animais OVX exercitados.

Não foram observadas diferenças ($p > 0,05$) na força relativa no colo do fêmur entre os grupos. A tensão mecânica gerada pelo exercício constitui um dos estímulos mais importantes para a formação óssea e desempenha um papel importante para minimizar a perda óssea em ratas ovariectomizadas (Honda et al., 2003). Mesmo não havendo significância estatística entre os grupos, infere-se que os animais OVX exercitados apresentaram valores de força relativa no colo do fêmur igual aos SHAM, mostrando que os exercícios de corrida e natação com sobrecarga foram eficazes para a resistência do osso destes animais.

5.9. Morfometria óssea nas regiões da cabeça e do trocânter maior do fêmur.

Devido à grande incidência de fraturas na região do colo do fêmur (Bagi et al., 1997; Gammage et al., 2009), este estudo analisou a quantidade de osso trabecular nas regiões da cabeça e do trocânter maior do fêmur de ratas ovariectomizadas e inteiras ao final de dez semanas de treinamento.

Os resultados referentes à morfometria óssea na cabeça do fêmur e no trocânter maior, ao final dos tratamentos, estão apresentados na tabela 8.

Tabela 8: Morfometria do osso trabecular nas regiões do trocânter maior e da cabeça do fêmur de ratas, ao final de dez semanas de treinamento dos grupos experimentais.

Grupos	Ovário	Trocânter (pontos)	Cabeça do fêmur (pontos)
CO	OVX	200,3 ±34,72 ^{*#}	237,2 ±33,20 [*]
NO	OVX	282,0 ±23,89	277,3 ±35,55 [§]
CONO	OVX	226,8 ±68,64	233,7 ±28,53
CS	SHAM	292,2 ±22,94	315,2 ±34,07 [€]
NS	SHAM	281,0 ±45,09	306,7 ±26,36
CONS	SHAM	245,5 ±42,35	270,8 ±44,61

Dados expressos em média ±desvio padrão. OVX = ovariectomizadas; SHAM = inteiras. CO (n = 12) e CS (n = 12) = grupos corrida; NO (n = 12) e NS (n = 12) = grupos natação; CONO (n = 12) e CONS = grupos controle. ^{*}, $p < 0,05$ vs CS; [#], $p < 0,05$ vs NO; [€], $p < 0,05$ vs CONS; [§], $p < 0,05$ vs CONO.

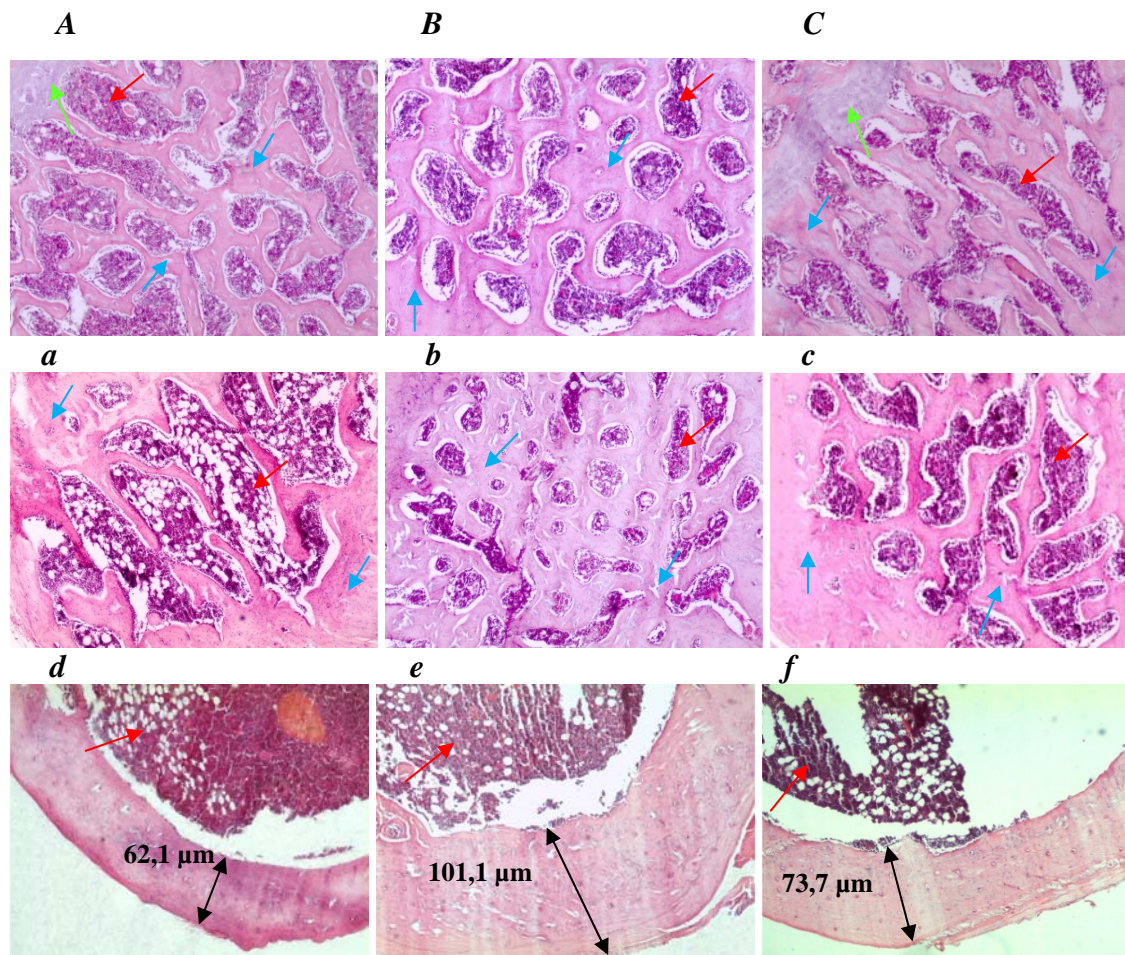


Figura 6: Microfotografias de região da cabeça do fêmur de animais ovariectomizados (OVX) dos grupos Corrida (A), Natação (B) e Controle (C). Microfotografias de região do trocanter maior do fêmur de animais castrados (OVX) dos grupos Corrida (a), Natação (b) e Controle (c). Espaços medulares mais evidentes em B e b, entremeados por osso trabecular mais maduro em relação aos grupos corrida (A e a) e controle (C e c). Medula óssea (setas vermelhas), osso trabecular (setas azuis) e placa de crescimento da cabeça do fêmur (seta verde). Microfotografias de região da diáfise do fêmur de animais ovariectomizados (OVX) dos grupos Corrida (d), Natação (e) e Controle (f), caracterizando maior espessura do osso cortical de natação (e) e controle (f) quando comparados aos submetidos à corrida (d). Aumento de 40X.

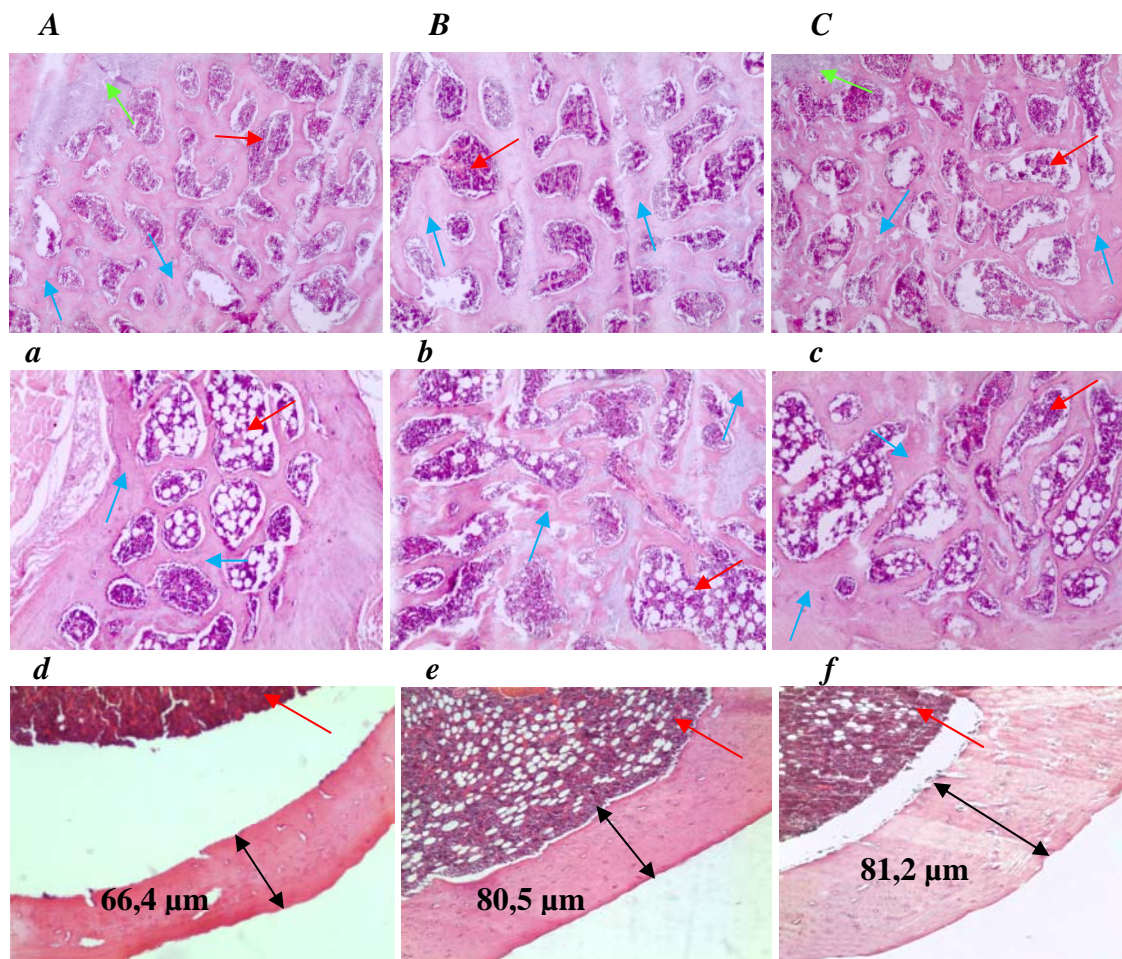


Figura 7: Microfotografias de região da cabeça do fêmur de animais inteiros (SHAM) dos grupos Corrida (A), Natação (B) e Controle (C). Microfotografias de região do trocânter maior do fêmur de animais inteiros (SHAM) dos grupos Corrida (a), Natação (b) e Controle (c). Medula óssea (setas vermelhas), osso trabecular (setas azuis) e placa de crescimento da cabeça do fêmur (seta verde). Microfotografias de região da diáfise do fêmur de animais inteiros (SHAM) dos grupos Corrida (d), Natação (e) e Controle (f), caracterizando maior espessura do osso cortical de natação (e) e controle (f) quando comparados aos submetidos à corrida (d). Aumento de 40X.

O grupo CO apresentou valores menores ($p < 0,05$) no trocânter e na cabeça do fêmur quando comparados a CS, demonstrando que os animais inteiros possuíam maior quantidade de osso trabecular e que o exercício de corrida não fez com que os animais OVX alcançassem os mesmos valores dos animais SHAM. D'Amelio et al. (2008) relataram que a deficiência de estrogênio em mulheres osteoporóticas determinou relevante papel sobre a reabsorção e ação de osteoclastos. O incremento na mobilização óssea, desequilibrando o processo de remodelação foi constatado neste estudo quando a média da quantidade de osso trabecular nos animais OVX foi menor que os SHAM.

Os resultados deste estudo corroboram os achados de Bonnet et al. (2007), que verificaram que os animais exercitados OVX apresentaram menores valores no volume do osso trabecular comparados aos animais SHAM. Aumentos na superfície mineralizada, taxa de formação óssea e presença de osteoclastos, demonstram um aumento no *turnover* ósseo após ovariectomia (Tromp et al., 2006). Estes dados confirmam e indicam que as regiões da

cabeça e do trocânter maior no fêmur possuem grande relevância em osteoporose à semelhança dos seres humanos.

O exercício de corrida atuou aumentando o osso trabecular da cabeça do fêmur no grupo CS, e de forma superior a CONS. O exercício estimulou a formação de osso trabecular, pois de acordo com Turner e Robling (2005), solicitações mecânicas causadas pelo impacto e pela força de contração muscular afetam tanto a formação como a reabsorção óssea, e segundo Westerlind et al. (1998), a atividade osteogênica ocorreu provavelmente pelo aumento e ação de proteínas morfogenéticas (*BMP*).

O exercício de natação aumentou o osso trabecular no grupo NO, mesmo com a deficiência de estrogênio, conforme comprovado pelos valores obtidos na cabeça do fêmur destes animais e foram superiores aos observados em CONO. Neste estudo, não foram analisadas células ósseas, mas Barengolts et al. (1994) observaram que o número de osteoclastos na superfície do osso trabecular foi aumentado pela ovariectomia e que o exercício foi capaz de diminuir essa resposta.

5.10. Espessura da diáfise do fêmur

A diáfise do fêmur é constituída de osso cortical que lhe confere a propriedade de resistência (Li et al., 2003), justificando a importância da mensuração da área do osso cortical em ratas ovariectomizadas e inteiras ao final de dez semanas de treinamento.

Os resultados referentes à espessura da diáfise do fêmur ao final dos tratamentos estão apresentados na tabela 9.

Tabela 9: Espessura do osso cortical no terço médio da diáfise do fêmur de ratas, ao final de dez semanas de treinamento dos grupos experimentais.

Grupos	Ovário	Diáfise do fêmur (μm)
CO	OVX	81,7 \pm 16,29
NO	OVX	84,3 \pm 13,75*
CONO	OVX	82,5 \pm 11,64*
CS	SHAM	80,8 \pm 12,72
NS	SHAM	82,6 \pm 11,30**
CONS	SHAM	81,2 \pm 16,34**

Dados expressos em média \pm desvio padrão. OVX = ovariectomizadas; SHAM = inteiras. CO (n = 12) e CS (n = 12) = grupos corrida; NO (n = 12) e NS (n = 12) = grupos natação; CONO (n = 12) e CONS = grupos controle. *, p < 0,05 vs CO; **, p < 0,05 vs CS.

Observou-se diferença (p < 0,05) entre NO e CONO quando comparados a CO. O exercício de natação em ratas OVX aumentou a espessura do osso cortical quando comparado

ao exercício de corrida. Na presente pesquisa, os grupos OVX treinados com natação com sobrecarga apresentaram aumento nos valores da espessura do osso cortical, nestes animais. Também infere-se que o exercício de natação atuou reduzindo o processo de reabsorção.

O grupo CONO apresentou valores superiores ($p < 0,05$) que CO, a hipótese seria que os animais OVX não treinados, apresentavam peso corporal superior aos treinados e tinham movimentação livre na gaiola, indicando que o efeito biomecânico provocou alterações na deposição de osso cortical nestes animais.

O exercício de natação também provocou aumento na espessura do osso cortical em animais SHAM ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo CS. Estes resultados estão de acordo com Hart et al. (2001) que observaram aumento no osso cortical em ratas Sprague - Dawley que treinaram natação.

O grupo CONS apresentou valores superiores ($p < 0,05$) na espessura do osso cortical que CS. A hipótese seria que os animais SHAM não treinados possuíam uma área do fêmur maior, indicando que o efeito biomecânico causado pela movimentação livre na gaiola e ao peso corporal interferiu na deposição de osso cortical.

6 – CONCLUSÕES

a) Desempenho dos animais

O exercício de corrida em esteira melhorou o desempenho dos animais OVX e a natação com sobrecarga melhorou o desempenho dos animais OVX e SHAM;

b) Gordura visceral

O exercício de corrida em esteira reduziu a gordura visceral em ratas OVX;

c) DMO e CMO

- O exercício de natação com sobrecarga aumentou a DMO e o CMO em ratas OVX;
- O exercício de corrida em esteira aumentou o CMO em ratas OVX;
- O exercício de corrida em esteira aumentou a DMO em ratas SHAM;

d) Testes biomecânicos

- Os exercícios não alteraram a tenacidade no colo do fêmur de ratas OVX;
- O exercício de corrida em esteira aumentou a tenacidade no terço médio do fêmur de ratas OVX;
- Os exercícios mantiveram os valores de força no colo do fêmur em ratas OVX semelhantes aos SHAM;
- O exercício de corrida em esteira aumentou a força de flexão no terço médio do fêmur de ratas SHAM;

e) Taxa de formação óssea por área trabecular

- O exercício de corrida em esteira não aumentou a taxa de formação óssea por área trabecular na região do trocânter maior do fêmur em ratas OVX;
- O exercício de natação aumentou a taxa de formação óssea por área trabecular na cabeça do fêmur em ratas OVX;
- O exercício de corrida em esteira aumentou a taxa de formação óssea por área trabecular na cabeça do fêmur em ratas SHAM, mas não aumentou em ratas OVX;

f) Espessura da diáfise do fêmur

- O exercício de corrida em esteira não promoveu aumento na espessura da diáfise do fêmur em ratas OVX e SHAM;

- O exercício de natação com sobrecarga aumentou a espessura da diáfise do fêmur em ratas OVX e SHAM em relação as que treinaram com corrida em esteira.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aires, M. M. **Fisiologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2008. 1137-1162p.

Aoac. Official methods of analysis. Washington, D.C. 1998

Bagi, C. M., Ammann, P., Rizzoli, R. e Miller, S. C. Effect of estrogen deficiency on cancellous and cortical bone structure and strength of the femoral neck in rats. Calcif Tissue Int, v.61, n.4, Oct, p.336-44. 1997.

Barengolts, E. I., Curry, D. J., Bapna, M. S. e Kukreja, S. C. Effects of endurance exercise on bone mass and mechanical properties in intact and ovariectomized rats. J Bone Miner Res, v.8, n.8, Aug, p.937-42. 1993.

Barengolts, E. I., Lathon, P. V., Curry, D. J. e Kukreja, S. C. Effects of endurance exercise on bone histomorphometric parameters in intact and ovariectomized rats. Bone Miner, v.26, n.2, Aug, p.133-40. 1994.

Bayramoglu, M., Sozay, S., Karatas, M. e Kilinc, S. Relationships between muscle strength and bone mineral density of three body regions in sedentary postmenopausal women. Rheumatol Int, v.25, n.7, Sep, p.513-7. 2005.

Bergstrom, I., Landgren, B., Brinck, J. e Freyschuss, B. Physical training preserves bone mineral density in postmenopausal women with forearm fractures and low bone mineral density. Osteoporos Int, v.19, n.2, Feb, p.177-83. 2008.

Blain, H., Vuillemin, A., Guillemin, F., Durant, R., Hanesse, B., De Talance, N., Doucet, B. e Jeandel, C. Serum leptin level is a predictor of bone mineral density in postmenopausal women. J Clin Endocrinol Metab, v.87, n.3, Mar, p.1030-5. 2002.

Bland, R. Steroid hormone receptor expression and action in bone. Clin Sci (Lond), v.98, n.2, Feb, p.217-40. 2000.

Bonnet, N., Beaupied, H., Vico, L., Dolleans, E., Laroche, N., Courteix, D. e Benhamou, C. L. Combined effects of exercise and propranolol on bone tissue in ovariectomized rats. J Bone Miner Res, v.22, n.4, Apr, p.578-88. 2007.

Bonnet, N., Laroche, N., Beaupied, H., Vico, L., Dolleans, E., Benhamou, C. L. e Courteix, D. Doping dose of salbutamol and exercise training: impact on the skeleton of ovariectomized rats. J Appl Physiol, v.103, n.2, Aug, p.524-33. 2007.

Borer, K. T., Fogleman, K., Gross, M., La New, J. M. e Dengel, D. Walking intensity for postmenopausal bone mineral preservation and accrual. Bone, v.41, n.4, Oct, p.713-21. 2007.

Bourrin, S., Ghaemmaghami, F., Vico, L., Chappard, D., Gharib, C. e Alexandre, C. Effect of a five-week swimming program on rat bone: a histomorphometric study. Calcif Tissue Int, v.51, n.2, Aug, p.137-42. 1992.

Bourrin, S., Palle, S., Pupier, R., Vico, L. e Alexandre, C. Effect of physical training on bone adaptation in three zones of the rat tibia. J Bone Miner Res, v.10, n.11, Nov, p.1745-52. 1995.

Burguera, B., Hofbauer, L. C., Thomas, T., Gori, F., Evans, G. L., Khosla, S., Riggs, B. L. e Turner, R. T. Leptin reduces ovariectomy-induced bone loss in rats. Endocrinology, v.142, n.8, Aug, p.3546-53. 2001.

Cadore, E. L., Bretano, M. A. e Kruehl, L. F. M. Efeitos da atividade física na densidade mineral óssea e na remodelação do tecido ósseo. Revista Brasileira de Medicina do Esporte, v.11, n. 6, p. 373-379, 2005.

Camargo, M. B., Cendoroglo, M. S., Ramos, L. R., De Oliveira Latorre Mdo, R., Saraiva, G. L., Lage, A., Carvalhaes Neto, N., Araujo, L. M., Vieira, J. G. e Lazaretti-Castro, M. Bone mineral density and osteoporosis among a predominantly Caucasian elderly population in the city of Sao Paulo, Brazil. Osteoporos Int, v.16, n.11, Nov, p.1451-60. 2005.

Chien, M. Y., Wu, Y. T., Hsu, A. T., Yang, R. S. e Lai, J. S. Efficacy of a 24-week aerobic exercise program for osteopenic postmenopausal women. Calcif Tissue Int, v.67, n.6, Dec, p.443-8. 2000.

Cohen, A. J. e Roe, F. J. Review of risk factors for osteoporosis with particular reference to a possible aetiological role of dietary salt. Food Chem Toxicol, v.38, n.2-3, Feb-Mar, p.237-53. 2000.

Cooper, C. The crippling consequences of fractures and their impact on quality of life. Am J Med, v.103, n.2A, Aug 18, p.12S-17S; discussion 17S-19S. 1997.

Coronho, V., Petroianu, A., Santana, E. M. e Pimenta, L. G. **Tratado de Endocrinologia e cirurgia endócrina**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 1535p.

Creighton, D. L., Morgan, A. L., Boardley, D. e Brolinson, P. G. Weight-bearing exercise and markers of bone turnover in female athletes. J Appl Physiol, v.90, n.2, Feb, p.565-70. 2001.

D'amelio, P., Grimaldi, A., Di Bella, S., Brianza, S. Z., Cristofaro, M. A., Tamone, C., Giribaldi, G., Ulliers, D., Pescarmona, G. P. e Isaia, G. Estrogen deficiency increases osteoclastogenesis up-regulating T cells activity: a key mechanism in osteoporosis. Bone, v.43, n.1, Jul, p.92-100. 2008.

Dai, R., Ma, Y., Sheng, Z., Jin, Y., Zhang, Y., Fang, L., Fan, H. e Liao, E. Effects of genistein on vertebral trabecular bone microstructure, bone mineral density, microcracks, osteocyte density, and bone strength in ovariectomized rats. J Bone Miner Metab, v.26, n.4, p.342-9. 2008.

Daly, R. M., Saxon, L., Turner, C. H., Robling, A. G. e Bass, S. L. The relationship between muscle size and bone geometry during growth and in response to exercise. Bone, v.34, n.2, Feb, p.281-7. 2004.

Derman, O., Cinemre, A., Kanbur, N., Dogan, M., Kilic, M. e Karaduman, E. Effect of swimming on bone metabolism in adolescents. Turk J Pediatr, v.50, n.2, Mar-Apr, p.149-54. 2008.

Eastell, R. Treatment of postmenopausal osteoporosis. N Engl J Med, v.338, n.11, Mar 12, p.736-46. 1998.

Emslander, H. C., Sinaki, M., Muhs, J. M., Chao, E. Y., Wahner, H. W., Bryant, S. C., Riggs, B. L. e Eastell, R. Bone mass and muscle strength in female college athletes (runners and swimmers). Mayo Clin Proc, v.73, n.12, Dec, p.1151-60. 1998.

Ferreira, L. G., De Toledo Bergamaschi, C., Lazaretti-Castro, M. e Heilberg, I. P. Effects of creatine supplementation on body composition and renal function in rats. Med Sci Sports Exerc, v.37, n.9, Sep, p.1525-9. 2005.

Franco, F. S. C. Efeitos da ovariectomia, ingestão de cafeína e exercício aeróbico associados à adequação ou não de cálcio alimentar na composição corporal, no tecido ósseo e no balanço de cálcio em ratas. Tese apresentada ao Departamento de Ciências e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2009. 70-77p.

Fuchs, R. K., Shea, M., Durski, S. L., Winters-Stone, K. M., Widrick, J. e Snow, C. M. Individual and combined effects of exercise and alendronate on bone mass and strength in ovariectomized rats. Bone, v.41, n.2, Aug, p.290-6. 2007.

Gala, J., Diaz-Curiel, M., De La Piedra, C. e Calero, J. Short- and long-term effects of calcium and exercise on bone mineral density in ovariectomized rats. Br J Nutr, v.86, n.4, Oct, p.521-7. 2001.

Gammage, K. L., Francoeur, C., Mack, D. E. e Klentrou, P. Osteoporosis health beliefs and knowledge in college students: the role of dietary restraint. Eat Behav, v.10, n.1, Jan, p.65-7. 2009.

Gaumet-Meunier, N., Coxam, V., Robins, S., Pastoureau, P., Pointillart, A., Davicco, M. J., Lebecque, P. e Barlet, J. P. Gonadal steroids and bone metabolism in young castrated male rats. Calcif Tissue Int, v.66, n.6, Jun, p.470-5. 2000.

Gnudi, S., Sitta, E. e Fiumi, N. Relationship between body composition and bone mineral density in women with and without osteoporosis: relative contribution of lean and fat mass. J Bone Miner Metab, v.25, n.5, p.326-32. 2007.

Guadalupe-Grau, A., Fuentes, T., Guerra, B. e Calbet, J. A. Exercise and bone mass in adults. Sports Med, v.39, n.6, p.439-68. 2009.

Guyton, A.C. e Hall, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2002. p. 853.

Hagihara, Y., Fukuda, S., Goto, S., Iida, H., Yamazaki, M. e Moriya, H. How many days per week should rats undergo running exercise to increase BMD? J Bone Miner Metab, v.23, n.4, p.289-94. 2005.

Hart, K. J., Shaw, J. M., Vajda, E., Hegsted, M. e Miller, S. C. Swim-trained rats have greater bone mass, density, strength, and dynamics. J Appl Physiol, v.91, n.4, Oct, p.1663-8. 2001.

Hernandez, C. J. How can bone turnover modify bone strength independent of bone mass? Bone, v.42, n.6, Jun, p.1014-20. 2008.

Honda, A., Sogo, N., Nagasawa, S., Shimizu, T. e Umemura, Y. High-impact exercise strengthens bone in osteopenic ovariectomized rats with the same outcome as sham rats. J Appl Physiol, v.95, n.3, Sep, p.1032-7. 2003.

Honig, S. Treatment strategies for patients with low bone mass: the younger postmenopausal female. Bull NYU Hosp Jt Dis, v.66, n.3, p.240-3. 2008.

Huang, T. H., Chang, F. L., Lin, S. C., Liu, S. H., Hsieh, S. S. e Yang, R. S. Endurance treadmill running training benefits the biomaterial quality of bone in growing male Wistar rats. J Bone Miner Metab, v.26, n.4, p.350-7. 2008.

Huang, T. H., Lin, S. C., Chang, F. L., Hsieh, S. S., Liu, S. H. e Yang, R. S. Effects of different exercise modes on mineralization, structure, and biomechanical properties of growing bone. J Appl Physiol, v.95, n.1, Jul, p.300-7. 2003.

Hughes, V. A., Frontera, W. R., Dallal, G. E., Lutz, K. J., Fisher, E. C. e Evans, W. J. Muscle strength and body composition: associations with bone density in older subjects. Med Sci Sports Exerc, v.27, n.7, Jul, p.967-74. 1995.

Humphries, B., Newton, R. U., Bronks, R., Marshall, S., McBride, J., Triplett-Mcbride, T., Hakkinen, K., Kraemer, W. J. e Humphries, N. Effect of exercise intensity on bone density, strength, and calcium turnover in older women. Med Sci Sports Exerc, v.32, n.6, Jun, p.1043-50. 2000.

Hussain, S. O., Barbato, J. C., Koch, L. G., Metting, P. J. e Britton, S. L. Cardiac function in rats selectively bred for low- and high-capacity running. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, v.281, n.6, Dec, p.R1787-91. 2001.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/tabuadevida/2005/defaulttab.shtm>.

Ijuin, M., Douchi, T., Matsuo, T., Yamamoto, S., Uto, H. e Nagata, Y. Difference in the effects of body composition on bone mineral density between pre- and postmenopausal women. Maturitas, v.43, n.4, Dec 10, p.239-44. 2002.

Irving, B. A., Davis, C. K., Brock, D. W., Weltman, J. Y., Swift, D., Barrett, E. J., Gaesser, G. A. e Weltman, A. Effect of exercise training intensity on abdominal visceral fat and body composition. Med Sci Sports Exerc, v.40, n.11, Nov, p.1863-72. 2008.

Iwamoto, J., Shimamura, C., Takeda, T., Abe, H., Ichimura, S., Sato, Y. e Toyama, Y. Effects of treadmill exercise on bone mass, bone metabolism, and calciotropic hormones in young growing rats. J Bone Miner Metab, v.22, n.1, p.26-31. 2004.

Iwamoto, J., Takeda, T. e Ichimura, S. Effects of exercise on bone mineral density in mature osteopenic rats. J Bone Miner Res, v.13, n.8, Aug, p.1308-17. 1998.

Iwamoto, J., Takeda, T. e Sato, Y. Effect of treadmill exercise on bone mass in female rats. Exp Anim, v.54, n.1, Jan, p.1-6. 2005.

Iwamoto, J., Yeh, J. K. e Aloia, J. F. Differential effect of treadmill exercise on three cancellous bone sites in the young growing rat. Bone, v.24, n.3, Mar, p.163-9. 1999.

Junqueira, L. C., Carneiro, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2008. p. 135-152.

Jurimae, T., Soot, T. e Jurimae, J. Relationships of anthropometrical parameters and body composition with bone mineral content or density in young women with different levels of physical activity. J Physiol Anthropol Appl Human Sci, v.24, n.6, Nov, p.579-87. 2005.

Kanis, J. A., McCloskey, E. V., Johansson, H., Oden, A., Melton, L. J., 3rd e Khaltsev, N. A. A reference standard for the description of osteoporosis. Bone, v.42, n.3, Mar, p.467-75. 2008.

Kemmler, W., Engelke, K., Lauber, D., Weineck, J., Hensen, J. e Kalender, W. A. Exercise effects on fitness and bone mineral density in early postmenopausal women: 1-year EFOPS results. Med Sci Sports Exerc, v.34, n.12, Dec, p.2115-23. 2002.

Khan, K., McKay, H., Kannus, P., Bailey, D., Wark, J. e Bennell, K. **Physical Activity and Bone Health**. Human Kinetics. 2001.

Kim, C. S. e Park, D. H. Effects of chronic NH₄Cl dosage and swimming exercise on bone metabolic turnover in rats. J Physiol Anthropol Appl Human Sci, v.24, n.6, Nov, p.595-600. 2005.

Kohrt, W. M., Snead, D. B., Slatopolsky, E. e Birge, S. J., Jr. Additive effects of weight-bearing exercise and estrogen on bone mineral density in older women. J Bone Miner Res, v.10, n.9, Sep, p.1303-11. 1995.

Kritz-Silverstein, D. e Barrett-Connor, E. Grip strength and bone mineral density in older women. J Bone Miner Res, v.9, n.1, Jan, p.45-51. 1994.

Latour, M. G., Shinoda, M. e Lavoie, J. M. Metabolic effects of physical training in ovariectomized and hyperestrogenic rats. J Appl Physiol, v.90, n.1, Jan, p.235-41. 2001.

Lekamwasam, S., Weerathna, T., Rodrigo, M., Arachchi, W. K. e Munidasa, D. Association between bone mineral density, lean mass, and fat mass among healthy middle-aged premenopausal women: a cross-sectional study in southern Sri Lanka. J Bone Miner Metab, v.27, n.1, p.83-8. 2009.

Lemura, L. M., Duvillard, S. P. V. **Fisiologia do Exercício Clínico: Aplicação e Princípios Fisiológicos**. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2006. p. 409-419.

Leppanen, O. V., Sievanen, H., Jokihaara, J., Pajamaki, I., Kannus, P. e Jarvinen, T. L. Pathogenesis of age-related osteoporosis: impaired mechano-responsiveness of bone is not the culprit. PLoS ONE, v.3, n.7, p.e2540. 2008.

Lespessailles, E., Jaffre, C., Beupied, H., Nanyan, P., Dolleans, E., Benhamou, C. L. e Courteix, D. Does Exercise Modify the Effects of Zoledronic Acid on Bone Mass, Microarchitecture, Biomechanics, and Turnover in Ovariectomized Rats? Calcif Tissue Int, Jul 17. 2009.

Li, C. Y., Jee, W. S., Chen, J. L., Mo, A., Setterberg, R. B., Su, M., Tian, X. Y., Ling, Y. F. e Yao, W. Estrogen and "exercise" have a synergistic effect in preventing bone loss in the lumbar vertebra and femoral neck of the ovariectomized rat. Calcif Tissue Int, v.72, n.1, Jan, p.42-9. 2003.

Liel, Y., Shany, S., Smirnoff, P. e Schwartz, B. Estrogen increases 1,25-dihydroxyvitamin D receptors expression and bioresponse in the rat duodenal mucosa. Endocrinology, v.140, n.1, Jan, p.280-5. 1999.

Lorenzo, J., Horowitz, M. e Choi, Y. Osteoimmunology: interactions of the bone and immune system. Endocr Rev, v.29, n.4, Jun, p.403-40. 2008.

Maddalozzo, G. F., Turner, R. T., Edwards, C. H., Howe, K. S., Widrick, J. J., Rosen, C. J. e Iwaniec, U. T. Alcohol alters whole body composition, inhibits bone formation, and increases bone marrow adiposity in rats. Osteoporos Int, v.20, n.9, Sep, p.1529-38. 2009.

Madsen, K. L., Adams, W. C. e Van Loan, M. D. Effects of physical activity, body weight and composition, and muscular strength on bone density in young women. Med Sci Sports Exerc, v.30, n.1, Jan, p.114-20. 1998.

Melton, S. A., Hegsted, M., Keenan, M. J., Morris, G. S., O'neil, C. E. e Zablah-Pimentel, E. M. Water exercise prevents femur density loss associated with ovariectomy in the retired breeder rat. J Strength Cond Res, v.18, n.3, Aug, p.508-12. 2004.

Motta, V. T. **Bioquímica clínica para laboratório: princípios e interpretações**. 4.ed. Porto Alegre: Editora Médica Missau, 2003. 419p.

Mundy, G. D., Oyajob, B.O. Bone remodeling. In: FAVUS, M. J. (Org.). **Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism**. 5.ed. Washignton: American Society for Bone for bone and Mineral Research, 2003. p. 46-58.

Nagasawa, S., Honda, A., Sogo, N. e Umemura, Y. Effects of low-repetition jump exercise on osteogenic response in rats. J Bone Miner Metab, v.26, n.3, p.226-30. 2008.

Nakajima, D., Kim, C. S., Oh, T. W., Yang, C. Y., Naka, T., Igawa, S. e Ohta, F. Suppressive effects of genistein dosage and resistance exercise on bone loss in ovariectomized rats. J Physiol Anthropol Appl Human Sci, v.20, n.5, Sep, p.285-91. 2001.

Nelson-Dooley, C., Della-Fera, M. A., Hamrick, M. e Baile, C. A. Novel treatments for obesity and osteoporosis: targeting apoptotic pathways in adipocytes. Curr Med Chem, v.12, n.19, p.2215-25. 2005.

NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. JAMA 285: 785-795, 2001.

Nordsletten, L., Kaastad, T. S., Madsen, J. E., Reikeras, O., Ovstebo, R., Stromme, J. H. e Falch, J. The development of femoral osteopenia in ovariectomized rats is not reduced by high intensity treadmill training: a mechanical and densitometric study. Calcif Tissue Int, v.55, n.6, Dec, p.436-42. 1994.

Notomi, T., Okazaki, Y., Okimoto, N., Saitoh, S., Nakamura, T. e Suzuki, M. A comparison of resistance and aerobic training for mass, strength and turnover of bone in growing rats. Eur J Appl Physiol, v.83, n.6, Dec, p.469-74. 2000.

Notomi, T., Okimoto, N., Okazaki, Y., Nakamura, T. e Suzuki, M. Tower climbing exercise started 3 months after ovariectomy recovers bone strength of the femur and lumbar vertebrae in aged osteopenic rats. J Bone Miner Res, v.18, n.1, Jan, p.140-9. 2003.

Notomi, T., Okimoto, N., Okazaki, Y., Tanaka, Y., Nakamura, T. e Suzuki, M. Effects of tower climbing exercise on bone mass, strength, and turnover in growing rats. J Bone Miner Res, v.16, n.1, Jan, p.166-74. 2001.

Okazaki, R., Inoue, D., Shibata, M., Saika, M., Kido, S., Ooka, H., Tomiyama, H., Sakamoto, Y. e Matsumoto, T. Estrogen promotes early osteoblast differentiation and inhibits adipocyte differentiation in mouse bone marrow stromal cell lines that express estrogen receptor (ER) alpha or beta. Endocrinology, v.143, n.6, Jun, p.2349-56. 2002.

Ormsbee, M. J., Thyfault, J. P., Johnson, E. A., Kraus, R. M., Choi, M. D. e Hickner, R. C. Fat metabolism and acute resistance exercise in trained men. J Appl Physiol, v.102, n.5, May, p.1767-72. 2007.

Park, J. H., Omi, N., Nosaka, T., Kitajima, A. e Ezawa, I. Estrogen deficiency and low-calcium diet increased bone loss and urinary calcium excretion but did not alter arterial stiffness in young female rats. J Bone Miner Metab, v.26, n.3, p.218-25. 2008.

Peng, Z. Q., Vaananen, H. K. e Tuukkanen, J. Ovariectomy-induced bone loss can be affected by different intensities of treadmill running exercise in rats. Calcif Tissue Int, v.60, n.5, May, p.441-8. 1997.

Pitts, G. C., Ushakov, A. S., Pace, N., Smith, A. H., Rahlmann, D. F. e Smirnova, T. A. Effects of weightlessness on body composition in the rat. Am J Physiol, v.244, n.3, Mar, p.R332-7. 1983.

Pivonka, P., Zimak, J., Smith, D. W., Gardiner, B. S., Dunstan, C. R., Sims, N. A., John Martin, T. e Mundy, G. R. Model structure and control of bone remodeling: a theoretical study. Bone, v.43, n.2, Aug, p.249-63. 2008.

Priemel, M., Schilling, A. F., Haberland, M., Pogoda, P., Rueger, J. M. e Amling, M. Osteopenic mice: animal models of the aging skeleton. J Musculoskelet Neuronal Interact, v.2, n.3, Mar, p.212-8. 2002.

Renno, A. C., Silveira Gomes, A. R., Nascimento, R. B., Salvini, T. e Parizoto, N. Effects of a progressive loading exercise program on the bone and skeletal muscle properties of female osteopenic rats. Exp Gerontol, v.42, n.6, Jun, p.517-22. 2007.

Ribeiro, A. F.C., Serakides, R., Nunes, A. V., Silva, C. M., Ocarino, N. M. A osteoporose e os distúrbios endócrinos da tireóide e das gônadas. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia, v.47, n.3, p. 22-236. 2003.

Robling, A. G., Castillo, A. B. e Turner, C. H. Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. Annu Rev Biomed Eng, v.8, p.455-98. 2006.

Ryan, A. S., Ivey, F. M., Hurlbut, D. E., Martel, G. F., Lemmer, J. T., Sorkin, J. D., Metter, E. J., Fleg, J. L. e Hurley, B. F. Regional bone mineral density after resistive training in young and older men and women. Scand J Med Sci Sports, v.14, n.1, Feb, p.16-23. 2004.

Ryan, A. S., Treuth, M. S., Rubin, M. A., Miller, J. P., Nicklas, B. J., Landis, D. M., Pratley, R. E., Libanati, C. R., Gundberg, C. M. e Hurley, B. F. Effects of strength training on bone mineral density: hormonal and bone turnover relationships. J Appl Physiol, v.77, n.4, Oct, p.1678-84. 1994.

Saengsirisuwan, V., Pongseeda, S., Prasannarong, M., Vichaiwong, K. e Toskulkao, C. Modulation of insulin resistance in ovariectomized rats by endurance exercise training and estrogen replacement. Metabolism, v.58, n.1, Jan, p.38-47. 2009.

Saraiva, G. L., Lazaretti-Castro, M. marcadores bioquímicos da remodelação óssea na prática clínica. Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia. v. 46, n. 1, p. 72-78, 2002.

Seeman, E. Bone quality: the material and structural basis of bone strength. J Bone Miner Metab, v.26, n.1, p.1-8. 2008.

Sehmisch, S., Galal, R., Kolios, L., Tezval, M., Dullin, C., Zimmer, S., Stuermer, K. M. e Stuermer, E. K. Effects of low-magnitude, high-frequency mechanical stimulation in the rat osteopenia model. Osteoporos Int, Mar 13. 2009.

Shinoda, M., Latour, M. G. e Lavoie, J. M. Effects of physical training on body composition and organ weights in ovariectomized and hyperestrogenic rats. Int J Obes Relat Metab Disord, v.26, n.3, Mar, p.335-43. 2002.

Simoes, P. A., Zamarioli, A., Bloes, P., Mazzocato, F. C., Pereira, L. H., Volpon, J. B. e Shimano, A. C. Effect of treadmill exercise on lumbar vertebrae in ovariectomized rats: anthropometrical and mechanical analyses. Acta Bioeng Biomech, v.10, n.2, p.39-41. 2008.

Snyder, A., Zierath, J. R., Hawley, J. A., Sleeper, M. D. e Craig, B. W. The effects of exercise mode, swimming vs. running, upon bone growth in the rapidly growing female rat. Mech Ageing Dev, v.66, n.1, p.59-69. 1992.

Soot, T., Jurimae, T., Jurimae, J., Gapeyeva, H. e Paasuke, M. Relationship between leg bone mineral values and muscle strength in women with different physical activity. J Bone Miner Metab, v.23, n.5, p.401-6. 2005.

Tae-Woong, O. H., Soon-Gill, L. e Mitsuro, H. Resistance running exercise effectively prevents bone loss in ovariectomized rats. Sports Sci, n.3, 8-17. 2006.

Thompson, D. D., Simmons, H. A., Pirie, C. M. e Ke, H. Z. FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. Bone, v.17, n.4 Suppl, Oct, p.125S-133S. 1995.

Tomkinson, A., Gevers, E. F., Wit, J. M., Reeve, J. e Noble, B. S. The role of estrogen in the control of rat osteocyte apoptosis. J Bone Miner Res, v.13, n.8, Aug, p.1243-50. 1998.

Tomkinson, A., Reeve, J., Shaw, R. W. e Noble, B. S. The death of osteocytes via apoptosis accompanies estrogen withdrawal in human bone. J Clin Endocrinol Metab, v.82, n.9, Sep, p.3128-35. 1997.

Tosteson, A. N., Melton, L. J., 3rd, Dawson-Hughes, B., Baim, S., Favus, M. J., Khosla, S. e Lindsay, R. L. Cost-effective osteoporosis treatment thresholds: the United States perspective. Osteoporos Int, v.19, n.4, Apr, p.437-47. 2008.

Tromp, A. M., Bravenboer, N., Tanck, E., Oostlander, A., Holzmann, P. J., Kostense, P. J., Roos, J. C., Burger, E. H., Huiskes, R. e Lips, P. Additional weight bearing during exercise and estrogen in the rat: the effect on bone mass, turnover, and structure. Calcif Tissue Int, v.79, n.6, Dec, p.404-15. 2006.

Turek, S. L. **Ortopedia: princípios e sua aplicação**. 4. ed., São Paulo: Manole, 1991. p.250-257.

Turner, C. H. e Robling, A. G. Designing exercise regimens to increase bone strength. Exerc Sport Sci Rev, v.31, n.1, Jan, p.45-50. 2003.

Turner, C. H. e Robling, A. G. Mechanisms by which exercise improves bone strength. J Bone Miner Metab, v.23 Suppl, p.16-22. 2005.

Umemura, Y., Nagasawa, S., Honda, A. e Singh, R. High-impact exercise frequency per week or day for osteogenic response in rats. J Bone Miner Metab, v.26, n.5, p.456-60. 2008.

Van Der Wiel, H. E., Lips, P., Graafmans, W. C., Danielsen, C. C., Nauta, J., Van Lingen, A. e Mosekilde, L. Additional weight-bearing during exercise is more important than duration of exercise for anabolic stimulus of bone: a study of running exercise in female rats. Bone, v.16, n.1, Jan, p.73-80. 1995.

Vicente-Rodriguez, G., Ezquerro, J., Mesana, M. I., Fernandez-Alvira, J. M., Rey-Lopez, J. P., Casajus, J. A. e Moreno, L. A. Independent and combined effect of nutrition and exercise on bone mass development. J Bone Miner Metab, v.26, n.5, p.416-24. 2008.

Vincent, K. R. e Braith, R. W. Resistance exercise and bone turnover in elderly men and women. Med Sci Sports Exerc, v.34, n.1, Jan, p.17-23. 2002.

Vicentini, C. R., Rosa, R. A. C., Ciarlini, L. D. R. P., Santos, P. H., Louzada, M.J.Q. Análise Biomecânica em fêmures de ratos submetidos à ausência de carga e atividade física em esteira. Vet e Zootec, v.14, n.1, Jun, p.62-71. 2007.

Vuori, I., Heinonen, A., Sievanen, H., Kannus, P., Pasanen, M. e Oja, P. Effects of unilateral strength training and detraining on bone mineral density and content in young women: a study of mechanical loading and deloading on human bones. Calcif Tissue Int, v.55, n.1, Jul, p.59-67. 1994.

Weinstein, R. S. e Manolagas, S. C. Apoptosis and osteoporosis. Am J Med, v.108, n.2, Feb, p.153-64. 2000.

Westerlind, K. C., Fluckey, J. D., Gordon, S. E., Kraemer, W. J., Farrell, P. A. e Turner, R. T. Effect of resistance exercise training on cortical and cancellous bone in mature male rats. J Appl Physiol, v.84, n.2, Feb, p.459-64. 1998.

World Health Organization. Assessment of fracture risk and application to screening for postmenopausal osteoporosis. Washington, DC: Technical Report Series 843; 1994. p.1-129.

Zhou, S., Turgeman, G., Harris, S. E., Leitman, D. C., Komm, B. S., Bodine, P. V. e Gazit, D. Estrogens activate bone morphogenetic protein-2 gene transcription in mouse mesenchymal stem cells. Mol Endocrinol, v.17, n.1, Jan, p.56-66. 2003.

