

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CAMPUS SÃO CARLOS
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS PIPGCF UFSCar – UNESP

GRAZIELE FERNANDA DERIGGI PISANI

**EFEITOS DO TREINAMENTO RESISTIDO NA MORFOLOGIA,
PROPRIEDADES E MARCADORES DE REMODELAMENTO DE
MATRIZ EXTRACELULAR ÓSSEA EM MODELO DE RATAS
OVARIECTOMIZADAS**

SÃO CARLOS
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CAMPUS SÃO CARLOS
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS PIPGCF UFSCar - UNESP

GRAZIÉLE FERNANDA DERIGGI PISANI

**EFEITOS DO TREINAMENTO RESISTIDO NA MORFOLOGIA,
PROPRIEDADES E MARCADORES DE REMODELAMENTO DE
MATRIZ EXTRACELULAR ÓSSEA EM MODELO DE RATAS
OVARIECTOMIZADAS**

Tese apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas Associação Ampla UFSCar/ UNESP, para obtenção do título de Doutor em Ciências, Área de Concentração Ciências Fisiológicas.

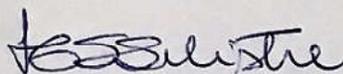
Orientação: Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo

SÃO CARLOS
2016

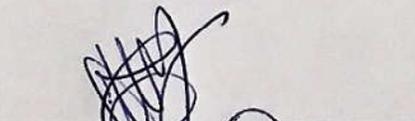
FICHA CATALOGRÁFICA

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Graziéle Fernanda Deriggi Pisani, realizada em 09/12/2016:



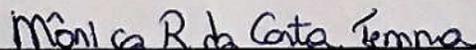
Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araujo
UFSCar



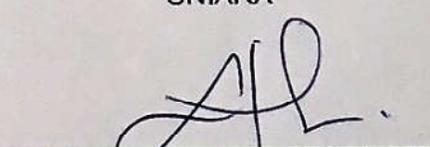
Prof. Dr. Charles Chenwei Wang
IFSC/DSP



Prof. Dr. Gilberto Eiji Shiguemoto
UFSCar



Profa. Dra. Mônica Rosas da Costa lemma
UNIARA



Profa. Dra. Stela Marcia Mattiello
UFSCar

FOLHA DE APROVAÇÃO

*O período de maior ganho em conhecimento e experiência
é o período mais difícil da vida de alguém!*

Dalai Lama

*Ao meu marido, pelo incentivo incondicional, pela paciência e pelo suporte
necessário nos momentos mais difíceis!*

Aos meus pais, por me ensinarem a importância do conhecimento e pelo incentivo!

Ao meu irmão pelo apoio!

A cada amigo e professor que me acolheu, me ouviu, e me incentivou a continuar!

AMO VOCÊS!

AGRADECIMENTOS

Resumir em poucas páginas tudo o que tenho a agradecer e lidar com todas as sensações não foi tarefa fácil! Estes 4 anos foram sem dúvidas de muito amadurecimento! Tenho a nítida sensação que meu doutorado esteve dividido em duas fases, 2 anos iniciais muito nublados, de inverno, mas não menos criativos e produtivos e 2 anos finais de primavera e verão em uma fase nova, que se não tivesse acontecido, eu não estaria aqui hoje escrevendo estas linhas! Vamos aos agradecimentos!

À Deus, inteligência suprema, causa primeira e fonte de inspiração para tudo!

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo. Como resumir tudo o que tenho para agradecer! Obrigada por não me deixar desistir, e mais, por permitir que eu continuasse assumindo minha orientação! Ser orientador e ao mesmo tempo mestre e fonte de inspiração é para poucos e você é uma dessas pessoas! Sem seu apoio, sua sensibilidade, seu incentivo e mais que tudo sua confiança e orientação eu não teria conseguido! Minha eterna gratidão!

Aos meus pais, por me permitirem a vida e me guiarem nos caminhos do conhecimento! Meu pai estava certo quando disse que podem me tirar tudo menos o que eu aprendi! Pai, mãe, vocês foram essenciais nesta jornada! Obrigada Junior, meu irmão, melhor amigo, pessoa que me conhece na essência e tanto me apoia! Obrigada a todos da minha família que sempre torceram pelo meu sucesso!

Obrigada Gustavo, meu marido, companheiro de jornada, por sua força muitas vezes necessária para me carregar, sua compreensão infinita com toda minha complexidade, apoio para as horas mais difíceis e por compartilhar de minha alegria e entusiasmo nos melhores momentos! A você todo o meu amor!

Aos meus três filhos, surpresas boas destes 4 anos, ainda que presentes por tão pouco tempo em meu ventre, mas que me ensinaram tanto sobre ser forte, sobre superar e sobre que é o amor incondicional! Vocês foram minha cultura celular mais perfeita!

Obrigada minha segunda família, em especial: meu sogro, sogra, cunhados, sobrinho, tios, primos e avós vocês são sensacionais! Obrigada pela compreensão e apoio de sempre!

A todos os docentes do Departamento de Ciências Fisiológicas e de outros departamentos pelos quais passei, pelo apoio para realização deste. Em especial:

Ao Prof. Dr. Sérgio Eduardo de Andrade Perez, por ter disponibilizado o Laboratório de Fisiologia do Exercício e por todos os conselhos.

À Prof^a. Dr^a. Keico Okino Nonaka, por ter disponibilizado o laboratório de Neuroendocrinologia e pelo apoio de sempre!

Ao Prof. Dr. Gilberto Eiji Shiguemoto, pelo apoio e esclarecimentos.

À Prof^a. Dr^a Marcia Regina Cominetti por ceder parte de seu tempo para me acolher em um momento tão necessário, pelo seu apoio e torcida de sempre!

Ao Prof. Dr. Ricardo Carneiro Borra por ter disponibilizado o laboratório de Imunologia Aplicada.

Ao Prof. Dr. Mário Jefferson Louzada por ter disponibilizado o laboratório para as análises de densitometria óssea na UNESP em Araçatuba.

Aos funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas, sempre tão solícitos e que colaboraram de todas as maneiras para a realização deste, em especial à Bete, Sr Sérgio, Sr Ângelo e Carmem. Ao secretário do Programa, Alexandre por esclarecer todas as minhas dúvidas e pelo apoio em todos estes anos.

Ao Dr. Clifford Rosen, por ter aceitado me supervisionar no estágio nos Estados Unidos, por ter disponibilizado seu laboratório e as *facilities* do Maine Medical Center Research Institute. Foi um tempo de grande aprendizado!

A todos os amigos que me apoiaram durante esta jornada em todos os sentidos! Minha vida seria vazia sem meus amigos! E que bom poder agradecer tanta gente! Em especial:

Aos amigos que fiz no LBBM: Bruna, Carol, Kelli, Leonardo, Livia, Milene, Patty, Vinicius, Sabrina, Cynthia, Rafael, Tais, Wanessa e ICs (Ana, Anelize, Bianca, Julia, Karol e Tayna). Muito obrigada pelo apoio, amizade e compreensão! Foram tantas histórias compartilhadas em nossos cafés. Encontrei em vocês verdadeiros amigos! Em especial à Uliana, por ter compartilhado parte do material de seu doutorado, este trabalho não estaria aqui se não fosse pela sua disponibilidade em todos os sentidos! Todos vocês moram no meu coração!

Aos amigos de outros laboratórios: Rafa, Maria Fernanda, Tereza, Cinthia, Thiago, Vinicius, Jorge, Gustavo, Cynthia, Julio, Anderson, Cris, Taty, entre tantos outros e em especial à Bruna, Karina e Victor pela ajuda nas análises. Obrigada pessoal pela amizade do dia a dia e disponibilidade de sempre!

Aos meus amigos do MMCRI, Shivangi, Kyle, Caro, Deepthi, David, Ashwani, Sasha, Beth, Nick. Obrigada por terem me acolhido tão bem e por toda a paciência

com meu inglês, além da diversão! Aos demais membros do Rosen Lab, Anyonya, Kathleen, Vic, Beth, e a todos os funcionários, em especial Liz, Sheila, Phuong e Terry e Karen por toda a disponibilidade e ajuda! Thank you!

Ao meu terapeuta, Ivan por me ajudar nos caminhos do autoconhecimento e por toda a paciência, compreensão e parceria de sempre! Muito obrigada!

Aos meus amigos do dia a dia em especial: Dê, Jun, Bianca, Paulo, Rubinho, Humberto, Naira, Daniel, Fran, Mario, Renata, Magal, Mari e Du. Obrigada pela compreensão com minhas ausências.

Aos animais, seres viventes, olhos humildes, que contribuíram para este estudo e o avanço do conhecimento.

Ao CNPq e à Fapesp pelo auxílio financeiro concedido para realização deste trabalho.

RESUMO

A queda nos níveis de estrogênio durante a menopausa pode acarretar em prejuízos, incluindo a osteoporose, caracterizada por um desbalanço no remodelamento da matriz extracelular (MEC) óssea. A resistência óssea à fratura está relacionada não somente com a massa, estrutura e arquitetura ósseas, mas também com alterações na MEC óssea. O treinamento resistido (TR) tem mostrado benefícios na prevenção e tratamento da osteoporose, entretanto poucos trabalhos são dedicados a relacionar o papel do TR no remodelamento ósseo em diversas escalas como composição material óssea, estrutura e o papel das metaloproteínas de matriz (MMPs) em modelo de ovariectomia (OVX). **Objetivos:** Avaliar os efeitos do TR na morfologia e propriedades ósseas e em marcadores de remodelamento da MEC óssea em modelo de ratas OVX. **Métodos:** Trinta e seis ratas da linhagem *Sprague Dawley* foram divididas em quatro grupos: sham sedentário, OVX sedentário, sham TR e OVX TR. As ratas foram submetidas a 10 semanas de TR com subida em escada com cargas progressivamente maiores atadas à cauda. As tíbias foram armazenadas para análises de biometria, biomecânica, biofísica e bioquímica. Os fêmures foram armazenados para análises de morfologia, expressão gênica e zimografia em gelatina. **Resultados:** A OVX promoveu um decréscimo dos seguintes parâmetros: densidade mineral óssea, conteúdo mineral ósseo, rigidez, carga máxima, conteúdo de cálcio, número e conectividade trabecular e expressão de MMP-13 e aumento da porcentagem de água, separação trabecular, expressão gênica de RUNX-2 e OPG e atividade de MMP-2. O TR se mostrou eficaz em prevenir ou reverter praticamente todas as alterações. **Conclusão:** A osteoporose advinda da queda dos hormônios ovarianos afeta não somente a massa óssea, mas também fatores envolvidos no remodelamento da MEC óssea e o TR se mostrou eficaz em prevenir ou reverter tais efeitos.

Palavras chave: menopausa, deficiência de estrogênio, osteoporose, treinamento resistido

ABSTRACT

Absence of estrogen on menopause leads to detrimental consequences, including osteoporosis, which is characterized by unbalanced bone extracellular matrix (ECM) remodeling. Bone resistance to fracture is related to bone mass, structure and architecture including bone ECM changes. Resistance training (RT) has shown beneficial effects on prevention and treatment of osteoporosis, however, there are few studies regarding RT role in bone remodeling in different scales, such as bone composition and structure until matrix metalloproteinases (MMPs) in ovariectomy (OVX) model. **Aims:** To evaluate RT effects on bone properties, morphology and bone ECM remodeling markers in an OVX rat model. **Methods:** Thirty six female *Sprague Dawley* rats were divided into four groups: sham sedentary, OVX sedentary, sham RT and OVX RT. Rats performed RT for 10 weeks in which they climbed a ladder with progressive loads attached to the tails. Tibias were stored for biometrical, biomechanical, biophysical and biochemical analysis. Femurs were stored to morphological, gene expression and gelatin zymography analysis. **Results:** OVX decreased bone mineral density, bone mineral content, stiffness, maximal load, calcium content, trabecular number and connectivity and MMP-13 gene expression. Furthermore, OVX increased RUNX-2 and OPG gene expression and MMP-2 activity. RT was efficient in prevent or reverse almost all of alterations. **Conclusion:** Estrogen absence osteoporosis affects bone mass and other factors involved in bone ECM remodeling and RT showed be efficient in prevent or reverse these harmful effects.

Key words: menopause, estrogen deficiency, osteoporosis, resistance training

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Níveis de organização ósseo.....	22
FIGURA 2. Diferenciação das células tronco da medula óssea.....	25
FIGURA 3. Metaloproteinases de Matriz (MMP). MMP-2 (A) e MMP-13 (B).	27
FIGURA 4. Organograma dos grupos experimentais.....	33
FIGURA 5. Representação esquemática do desenho experimental.	34
FIGURA 6. Etapas do procedimento de ovariectomia.....	35
FIGURA 7. Treinamento de resistência.....	37
FIGURA 8. Imagem anatômica do fêmur de rato e divisões para armazenamento...39	
FIGURA 9. Máquina de Ensaio Universal Instron (modelo 4444) utilizada para o ensaio de flexão de três pontos.	41
FIGURA 10. Gráfico Carga x Deformação utilizado para determinação das propriedades biomecânicas.	42
FIGURA 11. Imagem de corte histológico da cabeça e cólon do fêmur com delimitação da área de interesse.	47
FIGURA 12. Imagens histológicas caracterizando as fases do ciclo estral dos animais dos grupos experimentais SHAM e OVX.....	51
FIGURA 13. Peso relativo do útero (g/100g PC) dos animais dos diferentes grupos experimentais.	52
FIGURA 14. Evolução da carga relativa de carregamento (g/100g PC) dos animais dos grupos experimentais treinados.....	53
FIGURA 15. Evolução do peso corporal (g) dos animais dos diferentes grupos experimentais em três períodos: inicial, pré treino e final.....	54
FIGURA 16. Comprimento (mm) das tíbias direitas, dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	55
FIGURA 17. Valores de densidade mineral óssea (cm ²) (A), conteúdo mineral ósseo (g) (B) e área óssea (cm ²) (C) da tíbia direita, dos animais dos diferentes grupos experimentais.	56
FIGURA 18. Parâmetros biomecânicos rigidez (N/mm) (A), tenacidade (J) (B), resiliência (J) (C), carga máxima (N) (D) e carga de fratura (N) (E) da tíbia direita dos animais de todos os grupos experimentais.	57

FIGURA 19. Parâmetros biofísicos % de água (A), % de material mineral (B), % de material orgânico (C), densidade mineral (g/cm ³) (D), volume (E) e densidade (g/cm ³) (F) da tíbia direita dos animais de todos os grupos experimentais.	58
FIGURA 20. Parâmetros bioquímicos Cálcio (A) e Fósforo (B) da tíbia dos animais de todos os grupos experimentais.	59
FIGURA 21. Densidade mineral (A e C) e conteúdo mineral (B e D) ósseos por regiões, trabecular (A e B) e cortical (C e D) da tíbia esquerda dos animais de todos os grupos experimentais.	60
FIGURA 22. Análise de microtomografia da região trabecular das tíbias esquerdas dos animais de todos os grupos experimentais (E-J). Imagem representativa grupo SHAM-SED (A), Imagem representativa grupo OVX-SED (B), Imagem representativa grupo SHAM-TR (C), Imagem representativa grupo OVX-TR (D).	62
FIGURA 23. Análise de microtomografia da região cortical das tíbias esquerda dos animais de todos os grupos experimentais (E-J). Imagem representativa grupo SHAM-SED (A), Imagem representativa grupo OVX-SED (B), Imagem representativa grupo SHAM-TR (C), Imagem representativa grupo OVX-TR (D).	63
FIGURA 24. Número de adipócitos em uma área de interesse igual para todos os animais de todos os grupos experimentais nos fêmures direitos.	64
FIGURA 25. Análise da expressão gênica de MMP-13 (A), TIMP-1 (B), COL-1 (C), RUNX-2 (D) e OPG (E) nos fêmures esquerdos de todos os animais de todos os grupos experimentais.	66
FIGURA 26. Imagem representativa dos géis de zimografia em gelatina para a atividade proteolítica do fêmur esquerdo (região do grande trocânter) para todos os animais de todos os grupos experimentais. Cada poço representa um animal do grupo.	67
FIGURA 27. Valores de densitometria da zimografia em gelatina para a atividade proteolítica dos fêmures esquerdos (região do grande trocânter) para todos os animais de todos os grupos experimentais. Atividade da Pro-MMP-2 (A), Atividade da MMP-2 ativa (B).	68

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Especificações dos primers utilizados para o qRT-PCR.....	49
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µm Micrômetros
2D Duas dimensões
3D Três dimensões
AOI Área de interesse
Ar Área
BMP-2 do inglês *bone morphogenetic protein 2*
BV do inglês *bone volume*
C₁ Carga no Limite Elástico
C₂ Carga Máxima
C₃ Carga de Fratura
Ca Cálcio
Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂ Hidroxiapatita
Ca²⁺ Cálcio Divalente
CEBP do inglês *CAAT/enhancer binding proteins*
cm Centímetros
cm² Centímetros quadrados
cm³ Centímetro Cúbico
CMO Conteúdo mineral ósseo
COL-1 Colágeno tipo I
Conn.D do inglês *connectivity density*
Ct Cortical
D₁ Deformação no Limite Elástico
D₂ Deformação na Carga Máxima
D₃ Deformação no Ponto de Fratura
DLX5 do inglês *distal-less homeobox 5*
DMO Densidade mineral óssea
DXA Densitômetro de raios X
EDTA do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*
EPM Erro padrão da média
g Gramas
GAPDH Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
h Horas

HE Hematoxilina e eosina
IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IL-6 Interleucina tipo 6
J Joules
kDa Quilo Dawton
kg Quilogramas
Kgf Quilograma força
kVp Quilovoltagem
m Metros
M Molar
Ma Medula óssea
MCSF do inglês *macrophage colony-stimulating factor*
MEC Matriz extracelular (MEC)
MEPE do inglês *matrix extracellular phosphoglycoprotein*
mg Miligramas
microCT Microtomografia computadorizada
min Minutos
mL Mililitros
mm Milímetros
mm² Milímetros quadrados
mm³ Milímetros cúbicos
MMCRI do inglês *Maine Medical Center Research Institute*
MMP Metaloproteinase de matriz
MMP-13 Metaloproteinase de matriz tipo 13
MMP-2 Metaloproteinase de matriz tipo 2
ms Milisegundos
MSX do inglês *MSH homeobox homolog*
N Newton
n Número de animais
ng Nanogramas
nm Nanômetros
nM Nanomolar
°C Graus Celsius
OPG Osteoprotegerina

OVX Ovariectomia
PC Peso corporal
pH Potencial de Hidrogênio
Pi Peso imerso
Pm Peso das cinzas (material mineral)
PPAR do inglês *peroxisome proliferative activated receptor*
Ps Peso seco
Pu Peso úmido
qRT-PCR Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RANK do inglês *receptor activator of nuclear factor KB*
RANKL do inglês *receptor activator of nuclear factor KB ligand*
ROI Região de interesse
RPLP0 do inglês *large ribosomal protein*
RPS-18 do inglês *ribosomal protein S18*
RPS-27A do inglês *ribosomal protein S27A*
RUNX-2 do inglês *run-related transcription factor 2*
SHAM Pseudo ovariectomizadas
SMI do inglês *structural model index*
Sp Separação
T inclinação da reta
Tb Trabecular
Th do inglês *thickness*
TIMP-1 do inglês *metallopeptidase inhibitor 1*
Tm Temperatura de melting
TR Treinamento resistido
TV do inglês *total volume*
vs Versus
W Watts
β-ACT Beta actina
Densidade da água

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. OBJETIVOS	31
2.1 Geral.....	31
2.2 Específicos.....	31
3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 Animais e condições experimentais	32
3.2 Desenho Experimental	32
3.3 Ovariectomia (OVX)	34
3.4 Treinamento Resistido (TR)	36
3.4.1 Adaptação ao treinamento	37
3.4.2 Carga máxima de carregamento	37
3.4.3 Sessões de treinamento	38
3.5 Eutanásia e Coleta de Amostras	38
3.6 Parâmetros biométricos	39
3.6.1 Peso corporal dos animais	39
3.6.2 Comprimento da tíbia direita.....	39
3.7 Densitometria óssea (Tíbia direita)	40
3.8 Parâmetros biomecânicos ósseos (Tíbia direita)	40
3.9 Parâmetros Biofísicos ósseos (Tíbia direita)	42
3.10 Parâmetros bioquímicos ósseos (Tíbia direita)	43
3.11 Densitometria óssea por regiões (Tíbia esquerda)	43
3.12 Microtomografia computadorizada (Micro-CT) (Tíbia esquerda)	44
3.13 Processamento das Amostras e histologia (Fêmur direito)	45
3.13.1 Coloração com Eosina e Hematoxilina e contagem de adipócitos.....	46
3.14 Análises gênicas (Fêmur esquerdo)	47
3.14.1 Extração do RNA total	48
3.14.2 Transcrição reversa.....	48
3.14.3 Reação de cadeia da polimerase em tempo real	48
3.15 Análise de zimografia em gelatina (Fêmur esquerdo)	49
3.16 Análise Estatística	50
4. RESULTADOS	51
4.1 Controle do ciclo estral e massa do útero	51
4.2 Carga de carregamento	52
4.3 Parâmetros biométricos	53

4.3.1	Peso corporal dos animais	53
4.3.2	Comprimento da tíbia direita.....	54
4.4	Densitometria óssea (Tíbia direita)	55
4.5	Parâmetros biomecânicos ósseos (Tíbia direita)	56
4.6	Parâmetros Biofísicos ósseos (Tíbia direita)	57
4.7	Parâmetros bioquímicos ósseos (Tíbia direita)	58
4.8	Densitometria óssea por regiões (Tíbia esquerda).....	59
4.9	Microtomografia computadorizada (Micro-CT) (Tíbia esquerda).....	61
4.10	Contagem adipócitos (Fêmur direito)	64
4.11	Análises gênicas (Fêmur esquerdo)	64
4.12	Análise de zimografia em gelatina (Fêmur esquerdo).....	66
6.	CONCLUSÃO	81
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82

1. INTRODUÇÃO

Menopausa e qualidade de vida

Na maioria dos países do mundo, o número de pessoas idosas tem crescido em ritmo mais acelerado do que a natalidade, gerando um alerta governamental para suas necessidades específicas. No Brasil, de acordo com o último censo de 2010 há cerca de 21 milhões de pessoas com 60 anos ou mais, sendo a maioria mulheres (55,6%) (IBGE, 2016). Com o aumento na expectativa de vida das mulheres, de 51 anos na década de 50 para mais de 80 anos nos dias atuais, aumenta também a proporção que passará pela menopausa e viverá parte de suas vidas em período pós-menopausa, sujeitas às doenças relacionadas à ausência dos hormônios ovarianos, dentre elas a osteoporose (WHO, 2011; LUO et al., 2014).

A capacidade reprodutora das mulheres começa a diminuir por volta dos 50 anos, quando a frequência ovulatória diminui e as menstruações ocorrem de maneira irregular, iniciando o período da menopausa. A menopausa é um evento natural e significativo na vida das mulheres, caracterizada por mudanças biológicas e endócrinas, principalmente na produção de seus hormônios ovarianos, o que afeta sua saúde como um todo. Alguns estágios marcam este período, iniciando com ciclos menstruais irregulares até a completa amenorreia (perimenopausa). Com o desaparecimento de todos os folículos, a secreção ovariana de estrógenos cessa, caracterizando o início da fase pós-menopausa (DALEY; STOKES-LAMPARD; MACARTHUR, 2011; JULL et al., 2014; SURI; SURI, 2015; BERNE et al., 2004).

A queda nos níveis de estrogênio está associada à diversas consequências prejudiciais dentro de um quadro catabólico-inflamatório. Entre as possíveis consequências está a perda de massa óssea que leva ao desenvolvimento de osteoporose pós-menopausa, doença sistêmica comum, marcada por declínio na massa óssea, que acarreta em fragilidade e consequente aumento no risco de fraturas, afetando diretamente a qualidade de vida da mulher (BARONDESS et al., 2002; LI et al., 2004; MANOLAGAS; O'BRIEN; ALMEIDA, 2013; ROSEN; BOUXSEIN, 2006; SHIGUEMOTO et al., 2012; WALSH; HUNTER; LIVINGSTONE, 2006).

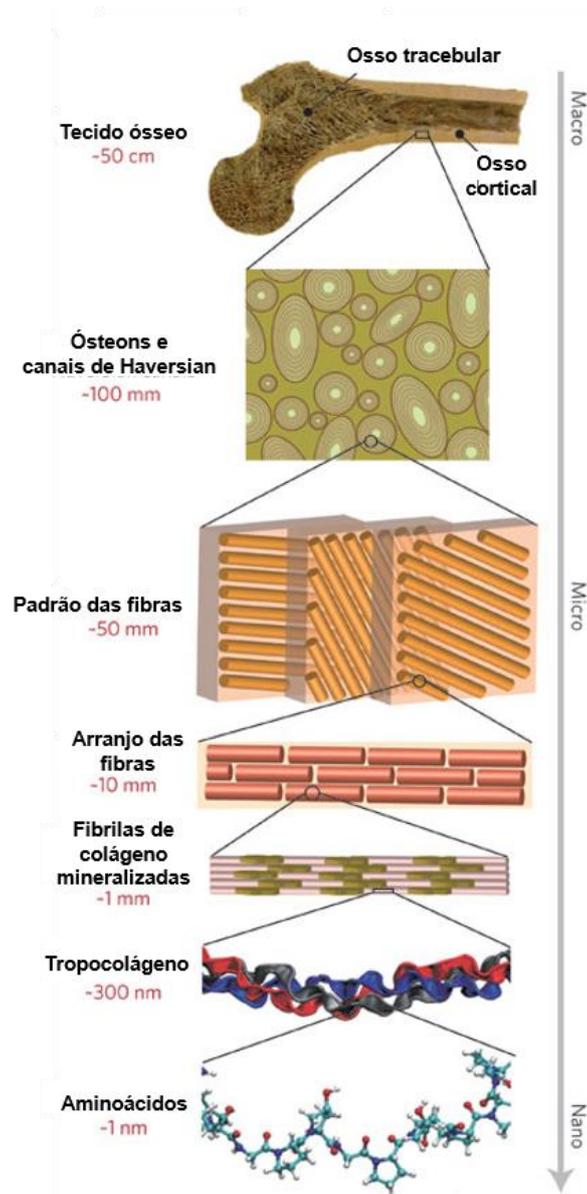
Tecido ósseo

Os ossos são os principais elementos estruturais do organismo, compõem o esqueleto, e desempenham diversas funções importantes como proteção de órgãos vitais, além de fornecerem uma estrutura rígida em forma de alavanca para locomoção. Também contribuem com a homeostase metabólica mineral e possuem a medula óssea, local de hematopoiese. Ao mesmo tempo que deve ser rígido, o osso também precisa ser leve para permitir a mobilidade e ter flexibilidade a fim de absorver energia e sofrer alteração em sua forma sem que haja fissura. Como estão em constante remodelamento, os ossos são capazes de auto-reparação e adaptam suas estruturas às diferentes mudanças nas demandas mecânicas, biológicas e bioquímicas (BILEZIKIAN, RAISZ, MARTIN, 2008; KWAN TAT et al., 2004).

O tecido ósseo é um dos mais complexos e heterogêneos nos mamíferos. É composto por diferentes tipos celulares e tecido conectivo, mineralizado e não mineralizado (ALMEIDA et al., 2017). Sua estrutura óssea é dividida em osso cortical (75%-80%), camada mais externa, e osso trabecular (20%-25%), presente nas partes internas das epífises e metáfises dos ossos longos e, embora de menor massa, possui cinco vezes mais área de superfície que o osso cortical, sendo de crucial importância na renovação do cálcio (BERNE et al., 2004) (Figura 1).

Dentre as propriedades mecânicas dos ossos estão a rigidez, resiliência e tenacidade (GUEDE et al., 2013). Os ossos são rígidos porque são formados por uma matriz de colágeno e outros componentes ligados a cristais de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$. Estas propriedades estão relacionadas não apenas à sua composição, mas também à sua estrutura e microarquitetura (CHEUNG et al., 2016), portanto uma análise completa deve envolver todas as escalas, desde o conteúdo e arquitetura ósseas até a microarquitetura e composição da matriz extracelular (MEC) (Figura 1).

FIGURA 1. Níveis de organização ósseo.



Esquema ilustrativo dos diversos níveis hierárquicos de organização do tecido ósseo (Adaptado de RITCHIE, 2011).

A composição óssea é definida por seu conteúdo mineral ósseo (CMO), expresso pela densidade mineral óssea (DMO), porém a resistência óssea não depende somente da massa mas também sua geometria, além de propriedades estruturais e materiais, ou seja, calcificação, composição e arranjo dos cristais e das fibras colágenas as quais definem a microarquitetura e qualidade ósseas (GUEDE et al., 2013; VICENTE-RODRÍGUEZ et al., 2008). A estrutura óssea está relacionada

não somente à composição, mas como este conteúdo está distribuído no osso, ou seja, a arquitetura óssea, que engloba a forma, macroestrutura do córtex e da rede trabecular (FERRETTI et al., 2001). Diante disso, diagnósticos baseados somente na quantidade mineral óssea, como a densitometria óssea, podem não oferecer um panorama completo a respeito da saúde óssea (VON MACH et al., 2004).

A MEC óssea consiste em material mineral, colágeno, proteínas não colágenas, água e lipídios distribuídos em duas fases: orgânica e inorgânica. A fase inorgânica ou mineral, fornece rigidez ao osso. Já a fase orgânica é responsável por resistência à tração, maleabilidade e tenacidade (SAITO; MARUMO, 2010). A fase mineral ou inorgânica é composta principalmente por cálcio, fosfato e carbonato organizados em cristais de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO)_6(OH)_2]$ (BOSKEY; ROBEY, 2013). O colágeno tipo I (COL-1) é a principal proteína da MEC óssea, compondo 90% da fase orgânica (VASHISHTH, 2007), sendo o restante composto por fatores de crescimento, citocinas e outras proteínas da MEC como osteocalcina, osteopontina, osteonectina, sialoproteínas, proteoglicanos e proteolipídios, que apresentam papel na calcificação da matriz, mas também na osteoclastogênese (HALL; SANSOM, 2006).

O remodelamento ósseo é um processo contínuo que está relacionado à reabsorção e nova formação óssea. Este processo possui quatro principais etapas: ativação, reabsorção, reversão e formação, as quais contribuem para a renovação do esqueleto, sendo essencial para manutenção da homeostase de cálcio, reparação de microdanos diários e resistência óssea. O processo de remodelamento é estimulado em resposta tanto a cargas mecânicas, potente estímulo que contribui com o aumento de força e inibição de perda óssea que ocorrem naturalmente com o envelhecimento, como microdanos diários e estímulos de hormônios como o da paratireóide e estrogênio (CHEUNG; GIANGREGORIO, 2012; ROBLING; CASTILLO; TURNER, 2006; ROSEN, 2008).

Os principais tipos celulares que compõem o tecido ósseo são: osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. Os osteoblastos derivam de células tronco mesenquimais da medula óssea e são responsáveis pela secreção da MEC óssea, sendo progressivamente transformados em osteócitos quando ficam circundados pela matriz mineralizada. Os osteoclastos são células gigantes, multinucleadas, que derivam de células tronco hematopoiéticas, progenitoras das linhagens monócito-

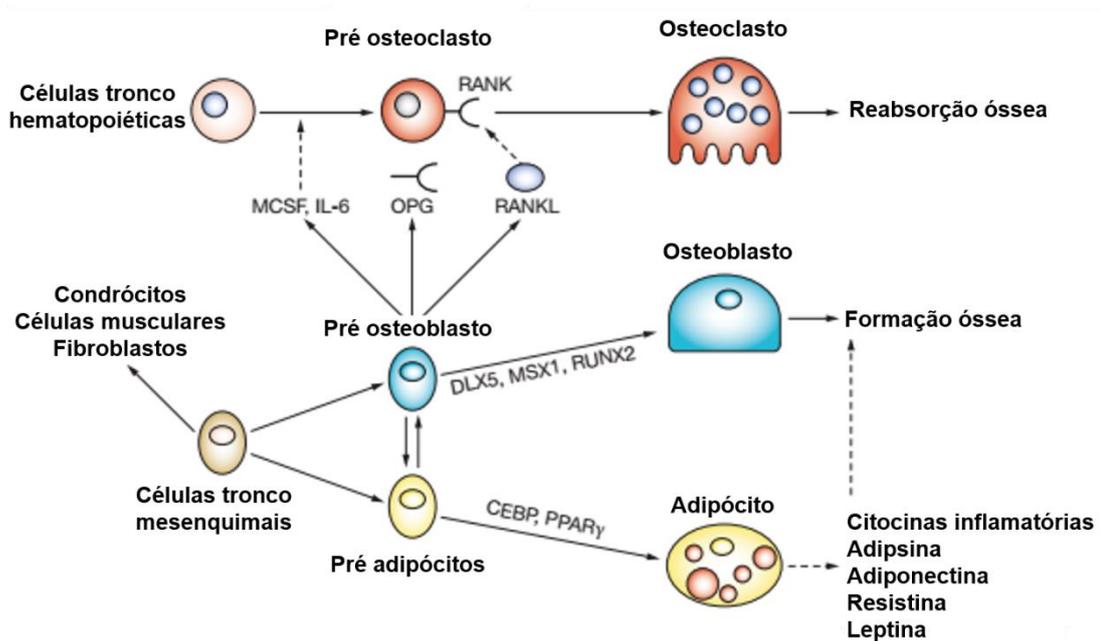
macrófago, e são responsáveis pela reabsorção óssea (KWAN TAT et al., 2004; THEOLEYRE et al., 2004).

A diferenciação das células tronco nas diferentes linhagens celulares ósseas é coordenada por uma série de fatores-chave durante o remodelamento ósseo (Figura 2). A diferenciação das células tronco hematopoiéticas em osteoclastos é influenciada por citocinas e fatores estimuladores de colônias de macrófagos (MCSF – *macrophage colony-stimulating factor*), derivados das células mesenquimais, além do ligante ativador do receptor do fator nuclear KB (RANKL – *receptor activator of nuclear factor KB ligand*), que se liga ao ativador do receptor do fator nuclear KB (RANK) (HOROWITZ; LORENZO, 2004; ROSEN; BOUXSEIN, 2006). A osteoprotegerina (OPG), da superfamília de ligantes fatores de necrose tumoral, atua como um receptor solúvel antagonista para RANKL evitando a ligação e ativação de RANK, inibindo, desta maneira, a diferenciação dos osteoclastos (ROSEN; BOUXSEIN, 2006; THEOLEYRE et al., 2004; WADA et al., 2006) (Figura 2).

Para a diferenciação das células tronco mesenquimais em osteoblastos é necessária a ativação de fatores como fator de transcrição relacionado a run 2 (*run-related transcription factor 2* – RUNX-2), proteína morfogenética 2 (*bone morphogenetic protein 2* – BMP-2) e homeobox menos distal (*distal-less homeobox 5* – DLX5), envolvido em diversas vias que levam à osteoblastogênese (SCHILTZ et al., 2010). Porém, dependendo do estímulo, as células tronco mesenquimais podem ainda se diferenciar em adipócitos.

O receptor peroxissomo proliferativo ativado gama (*peroxisome proliferate activated receptor gama* – PPAR γ) promove o deslocamento da osteoblastogênese para a via adipogênica, levando à redução da formação do osso via osteoblastos, podendo contribuir para fragilidade óssea (ROSEN; BOUXSEIN, 2006). Moerman et al. (2004) relataram diminuição na expressão de RUNX2 em camundongos com expressão aumentada de PPAR γ 2 e infiltração de adipócitos na medula óssea. Além disso, o aumento na taxa de gordura na medula óssea tem sido demonstrado em pacientes osteoporóticos (PINO et al., 2016).

FIGURA 2. Diferenciação das células tronco da medula óssea.



Esquema ilustrativo dos diferentes destinos que as células tronco da medula óssea podem adquirir de acordo com o estímulo recebido. Intensificador de ligação de proteínas CAAT (CEBP), Homeobox menos distal (DLX), Fator estimulante de colônia de macrófagos (MCSF), Interleucina (IL), Osteoprotegerina (OPG), Receptor ativador do fator de transcrição nuclear κ B (superfamília de receptores fatores de necrose tumoral, membro 11a) (RANK), Ligante do receptor ativador do fator de transcrição nuclear ligante κ B (superfamília de receptores fatores de necrose tumoral, membro 11) (RANKL), Homeobox homólogo de MSH (MSX), Fator de transcrição run-relacionado (RUNX-2), Receptor de peroxissomo proliferativo ativado (PPAR) (Adaptado de ROSEN; BOUXSEIN, 2006).

Desta forma o equilíbrio orquestrado entre a tríade OPG/RANK/RANKL e os outros sistemas de receptores/fatores de transcrição (RUNX-2, PPAR γ) mantém a homeostase óssea em sua fisiologia típica, sendo que o desequilíbrio promove o remodelamento não adequado, o que pode acarretar em doenças como a osteoporose (WADA et al., 2006).

Metaloproteinases de Matriz e Tecido ósseo

Uma vez que a qualidade óssea é definida como a soma de fatores que podem influenciar na resistência do osso à fraturas (FYHRIE, 2005), e mudanças na composição e arranjo da MEC podem influenciar na qualidade óssea, acarretando em

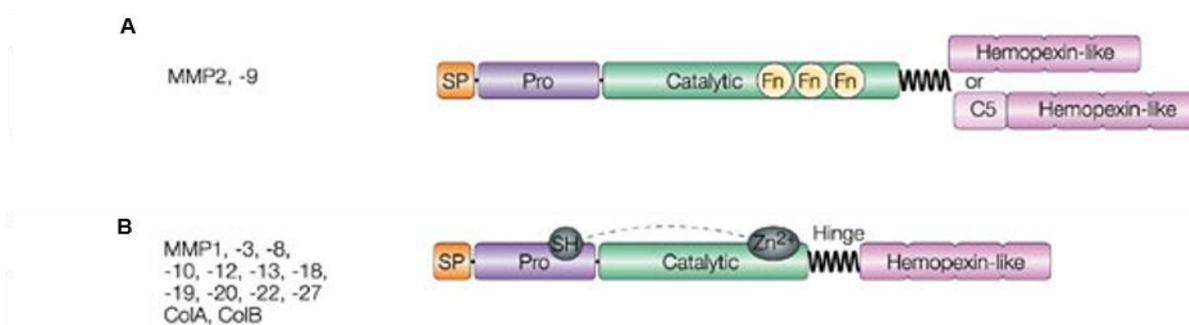
fragilidade, moléculas que participam do remodelamento da matriz são de extrema importância para manutenção da homeostase óssea (TANG et al., 2013).

As metaloproteinases de matriz (MMPs) compõem uma família de proteases zinco-dependentes altamente conservada que é responsável principalmente pela degradação da MEC. A fina regulação da expressão e atividade das MMPs é essencial para o desenvolvimento, manutenção e reparo de muitos tecidos, tornando-as fortes candidatas a participarem ativamente da regulação da qualidade da MEC óssea (LI et al., 2004; SHIGUEMOTO et al., 2012; TANG et al., 2013). A regulação do catabolismo das MMPs é mediada por uma família de proteínas homólogas chamadas inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) (GARDNER et al., 2008).

A MMP-2 é uma gelatinase, com 62 kDa em sua forma ativa, cujo substrato é o colágeno, que desempenha um papel importante na regulação da osteogênese e remodelamento ósseo durante a embriogênese, adolescência e cicatrização óssea (MOSIG et al., 2007). A ausência desta metaloproteinase está relacionada à diminuição da densidade mineral óssea e aumento da porosidade, o que sugere que esta MMP exerce influência nas propriedades ósseas. Desta maneira, a presença de MMP-2 em sua forma ativa está relacionada à preservação da massa óssea (INOUE et al., 2006; NYMAN et al., 2011) (Figura 3A).

A MMP-13 (colagenase 3) desempenha papel central na modulação da degradação da MEC uma vez que está envolvida na ativação de outras MMPs. Possui todos os domínios característicos de uma MMP e mais de 50% da sequência idêntica a outras colagenases, bem como muitos resíduos específicos da subfamília de colagenases (Tyr 241, Asp 235, Gly 237). Seus substratos são os colágenos (I, II e III), que são clivados nos fragmentos típicos C-terminal e N-terminal (LEEMAN; CURRAN; MURRAY, 2002) (Figura 3B).

FIGURA 3. Metaloproteinases de Matriz (MMP). MMP-2 (A) e MMP-13 (B).



Esquema ilustrativo da estrutura básica das MMPs -2 e -13 (Adaptado de PARKS; WILSON; LÓPEZ-BOADO, 2004).

A MMP-13 possui papel fundamental no remodelamento da MEC óssea durante o desenvolvimento fetal (JOHANSSON et al., 1997; TANG et al., 2013), constituindo-se em enzima-chave responsável pela degradação de colágeno, podendo ter importante papel na regulação da diferenciação dos osteoblastos, visto que em modelos *knockout* para esta MMP são observados fenótipos com cartilagem e osteoblastos defeituosos (HAYAMI; KAPILA; KAPILA, 2008). Hayami et al. (2008) relataram em estudo *in vitro* que a diminuição na atividade da MMP-13 resultou em aumento nos níveis de marcadores osteoblásticos. Já Schiltz et al. (2010) relataram que alta expressão de RUNX2 *in vivo* está relacionada à alta expressão de MMP-13, fato que pode ter um efeito inibitório na diferenciação dos osteoblastos, induzindo um fenótipo de osteoporose, o que foi revertido em animais com alta expressão de TIMP-1.

Fica evidente, portanto, a participação ativa das MMPs no processo de remodelamento da MEC óssea, colocando-as como destaque entre as moléculas a serem investigadas em processos patológicos como a osteoporose, que envolve o remodelamento desequilibrado da MEC óssea (OZEKI et al., 2014).

Como já descrito, a capacidade de resistência à fratura depende da qualidade da MEC óssea, sendo as MMPs essenciais tanto no processo de remodelamento fisiológico como patológico. Significante aumento na expressão da MMP-13 tem sido relatado em ratas submetidas à ovariectomia (OVX), estando relacionado à perda de massa óssea alveolar e degeneração do disco intervertebral

(LI et al., 2004; LUO et al., 2014). Já em relação à MMP-2 Shiguemoto et al. (2012) relataram uma diminuição na atividade deste metaloproteinase após a ovariectomia.

Estes resultados sugerem a participação dessas MMPs na perda de qualidade óssea na osteoporose e aumento do risco de fratura, sendo, portanto, um importante alvo de estudo em possíveis tratamentos para esta doença. Porém mais estudos são necessários para descrever o papel dessas metaloproteinases na perda óssea induzida pela OVX.

Osteoporose pós menopausa

A osteoporose é considerada um problema grave de saúde pública, com aproximadamente 200 milhões de pessoas afetadas mundialmente. Em torno de 30% das mulheres em estágio pós-menopausa desenvolvem osteoporose nos Estados Unidos e Europa, sendo a fratura uma das principais consequências associadas à diminuição na qualidade de vida, incapacidade e morte, além dos altos custos à saúde pública (IOF, 2015; VASHISHTH, 2007). Um dos principais objetivos clínicos no tratamento da osteoporose, segundo a Sociedade Americana de Menopausa, é a prevenção de fraturas (NAMS, 2010).

O estrogênio, hormônio ovariano, atua bloqueando a formação de novos osteoclastos e estimulando também sua apoptose, enquanto inibe a apoptose de osteoblastos e osteócitos (PACIFICI, 2012). A menopausa induz o aumento na taxa de remodelamento da MEC óssea, porém de maneira desequilibrada, sendo o aumento da osteoclastogênese uma das consequências da deficiência de estrogênio (ELEFTERIOU et al., 2005; WADA et al., 2006). Este desbalanço entre formação e reabsorção óssea, resulta em acelerada perda de massa óssea, tanto no compartimento trabecular quanto cortical, deterioração da ultraestrutura e fragilidade óssea, aumentando os índices de fraturas características da osteoporose pós-menopausa (LI et al., 2004; MANOLAGAS; O'BRIEN; ALMEIDA, 2013; SCHILTZ et al., 2008; YAMAZAKI et al., 2004).

Os efeitos da deficiência dos hormônios ovarianos podem ser simulados por meio de modelos de OVX, procedimento de remoção dos ovários, o que acarreta em reabsorção óssea levando à osteoporose, sendo este considerado um modelo

clássico experimental para estudar os efeitos da retirada do estrogênio (KALU, 1991; PACIFICI, 2012; SCHILTZ et al., 2008).

As terapias atuais para tratamento da osteoporose visam a prevenção da perda de massa óssea ou promoção do ganho da mesma com tratamentos utilizando bifosfonatos e hormônio paratireoideiano, além da reposição hormonal com estrógeno, visando minimizar os efeitos da menopausa como um todo. Entretanto, apesar da diminuição nos índices de fraturas, as terapias antiabsortivas e anabólicas vêm sendo questionadas, pois alguns indivíduos ainda apresentam fraturas atípicas durante o tratamento. Já a suplementação de longo-prazo com estrógeno está relacionada a diversos riscos para saúde, dentre eles câncer de útero e de mama, além de doenças cardiovasculares, não sendo, portanto, recomendada por muito tempo (LI et al., 2014; NYMAN; MAKOWSKI, 2012; SHIGUEMOTO et al., 2012). Daí a importância de estudos que busquem estratégias alternativas para tratamento e prevenção da osteoporose.

Neste sentido, o exercício físico é proposto atualmente como uma alternativa não farmacológica, acessível e eficiente na prevenção e no tratamento dos efeitos deletérios da osteoporose, atuando na redução da reabsorção, reduzindo o risco de fraturas, mas também reduzindo a dor, melhorando o equilíbrio e mobilidade, prevenindo quedas e melhorando a qualidade de vida como um todo (CAPUTO; COSTA, 2014; CHEUNG; GIANGREGORIO, 2012; SHIGUEMOTO et al., 2012; YAMAZAKI et al., 2004).

Treinamento resistido, tecido ósseo e osteoporose

Treinamento resistido (TR) é definido como um exercício físico que envolve contrações dos músculos esqueléticos frente a uma carga de resistência externa (DOS SANTOS et al., 2014). Uma vez que o osso é um tecido que possui habilidade de responder à atividade física e exercício (CHEUNG; GIANGREGORIO, 2012), programas de exercício físico, principalmente TR, tem sido indicados para tratamento de osteoporose, visto que estimula a osteogênese (GIANGREGORIO et al., 2014; SHIGUEMOTO et al., 2012; WILHELM et al., 2012).

De acordo com o efeito piezoelétrico, a pressão imposta pelo exercício atinge os cristais de hidroxiapatita, que sofrem deformação e geram diferenças de potencial elétrico, que atua como um estímulo no processo de formação óssea, ou seja, o aumento na massa óssea em resposta ao exercício se dá principalmente devido ao aumento na mecanotransdução (WEBER-RAJEK et al., 2015).

O TR atua como um indutor de diferenciação de células tronco mesenquimais em osteoblastos e, além disso há fortes evidências de que a ausência de mecanotransdução leva à perda rápida de massa óssea no membro afetado, estando este fato associado com o aumento na adipogênese na medula óssea (YUAN et al., 2015).

O TR também aparentemente atua via modulação das MMPs. Shiguemoto et al. (2012) em um estudo com ratas ovariectomizadas relataram diminuição da expressão da MMP-2 acompanhada por diminuição na densidade mineral óssea e queda na resistência à fratura. Estes efeitos foram revertidos com TR crônico. Um estudo *in vitro* em tecido sinovial advindo de pacientes com artrite reumatoide apresentou diminuição dos níveis de MMP-13 frente ao alongamento mecânico (WANG et al., 2009a). Já Barthelemi et al. (2012) relataram superexpressão de MMP-13 induzida por força mecânica em estudo *in vitro*, sugerindo participação desta MMP na diferenciação de osteoblastos. Entretanto não há estudos que relacionem os efeitos do TR na expressão da MMP-13 em modelos animais de OVX, caracterizando a originalidade e importância deste projeto.

Poucos trabalhos, entretanto, são dedicados ao estudo completo acerca da saúde óssea, relacionando o papel do treinamento resistido no remodelamento ósseo em diversas escalas como composição material óssea, estrutura e o papel das MMPs em modelo de ratas OVX.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o efeito da ovariectomia sobre marcadores de remodelamento da matriz extracelular óssea, bem como as consequências sobre a morfologia e as propriedades biofísicas e biomecânicas do tecido ósseo em ratas ovariectomizadas.

2.2 Específicos

Verificar os efeitos do treinamento resistido sobre:

- peso corporal dos animais;
- parâmetros biométricos ósseos (tíbias) (comprimento, volume e área)
- parâmetros biofísicos ósseos (tíbias) (densitometria, porcentagem de água, porcentagem de material mineral, porcentagem de material orgânico, micro tomografia);
- parâmetros biomecânicos ósseos (tíbias) (rigidez, tenacidade, resiliência, carga máxima e carga de fratura);
- parâmetros bioquímicos ósseos (tíbias) (cálcio e fósforo);
- morfologia óssea (fêmures) (micro tomografia e contagem de adipócitos);
- expressão gênica de marcadores de remodelamento da matriz extracelular óssea (fêmures) (MMP-13, TIMP-1, COL-1, RUNX-2 e OPG) ;
- atividade de metaloproteinase óssea (fêmures): MMP-2.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e condições experimentais

Trinta e seis ratas da espécie *Rattus norvegicus*, da linhagem *Sprague Dawley*, com sete semanas de idade, obtidas do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP) foram utilizadas para o desenvolvimento desta pesquisa. Com peso corporal inicial de 231 ± 3 g, as ratas foram alocadas em caixas coletivas com quatro animais em cada caixa e foram mantidas no Biotério do Laboratório de Fisiologia do Exercício do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar, São Carlos, Brasil), com oferta de água e alimento *ad libitum*. A ração utilizada foi do tipo padrão para roedores (Biobase®, Águas Frias, Brasil). A temperatura foi mantida controlada entre 22 ± 2 °C e o ciclo claro-escuro foi de 12 horas, com período de claro das 6 h às 18 h durante a semana de aclimatação. No início do período experimental, o ciclo claro-escuro foi invertido passando a ser o período de claro das 18 h às 6 h. Esse procedimento foi adotado para permitir que as sessões de treino fossem realizadas durante o período de maior atividade desses animais, ou seja, o período escuro.

Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as normas internacionais para procedimentos experimentais em esportes e exercício “*Ethical standards in sport and exercise science research: 2014 update*” (HARRISS; ATKINSON, 2013), e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar, São Carlos, Brasil), protocolo nº 008/2010.

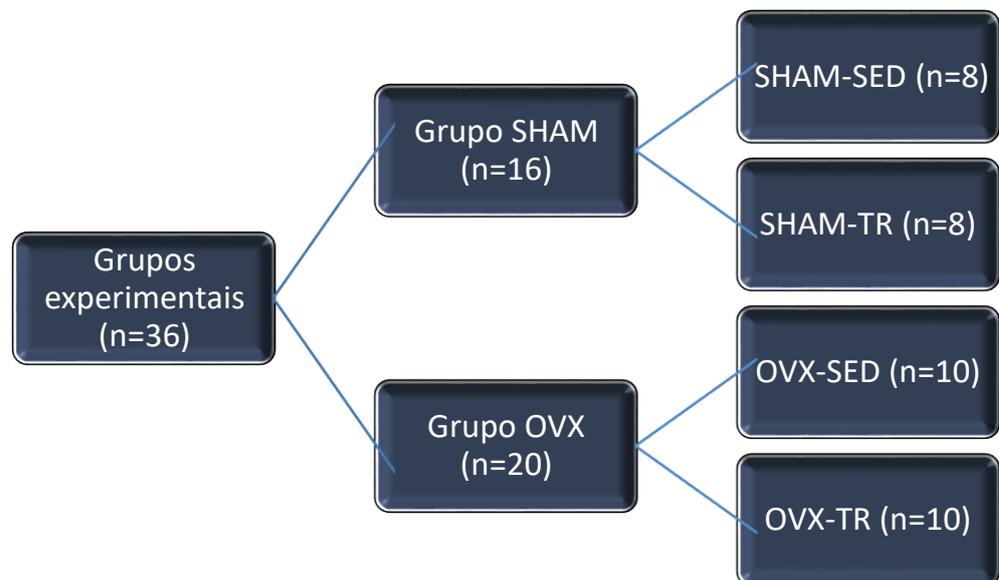
3.2 Desenho Experimental

Após a chegada ao laboratório, as ratas foram alocadas em caixas coletivas e ficaram em período de aclimatação por uma semana. Após o período de aclimatação houve inversão do ciclo claro-escuro e esperou-se mais duas semanas

para adaptação dos animais. Ao completar 10 semanas de vida (aproximadamente 260 g), período no qual estes animais são considerados adultos jovens (HORCAJADA et al., 2008; SOUZA et al., 2007), as ratas foram randomicamente distribuídas em dois grupos experimentais: ovariectomizadas (grupo OVX) ou pseudo ovariectomizadas (grupo SHAM). Neste momento foram realizados os procedimentos de ovariectomia, ou pseudo OVX, procedimento que mimetiza o procedimento cirúrgico realizado na OVX (THOMPSON et al., 1995).

Após um período de 21 dias de recuperação da cirurgia, os grupos foram novamente sub-divididos em dois grupos: sedentários ou treinamento resistido, totalizando quatro grupos experimentais: grupo sham sedentárias (SHAM-SED) (n=8), ovariectomizadas sedentárias (OVX-SED) (n=10), sham treinamento resistido (SHAM-TR) (n=8) e ovariectomizadas treinamento resistido (OVX-TR) (n=10) (Figura 4).

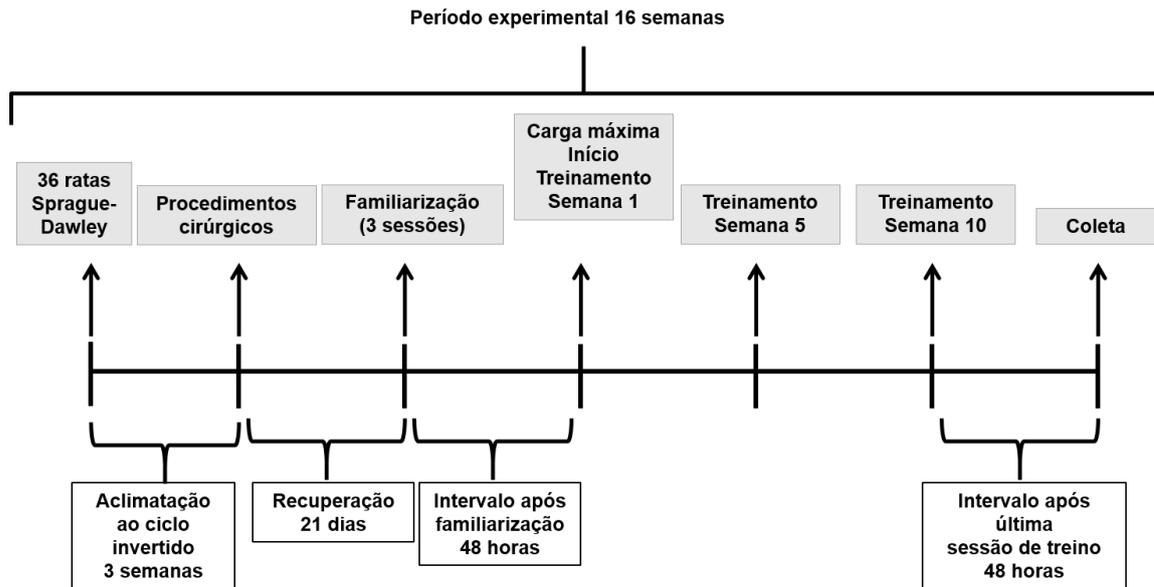
FIGURA 4. Organograma dos grupos experimentais.



Os animais sedentários não realizaram qualquer tipo de treinamento e permaneceram em suas caixas durante o período experimental. Os animais treinados, SHAM-TR e OVX-TR realizaram 3 sessões de treinamento resistido por semana, durante 10 semanas. A eutanásia foi realizada em todos os animais 92 dias após a

OVX quando as ratas se encontravam com 23 semanas de vida. O desenho experimental utilizado pode ser observado na figura 5.

FIGURA 5. Representação esquemática do desenho experimental.

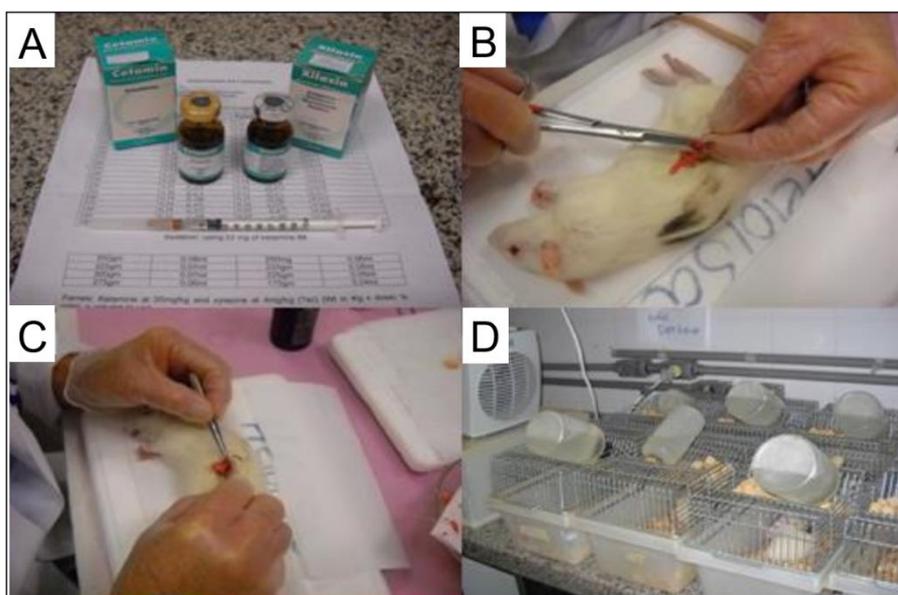


3.3 Ovariectomia (OVX)

A ovariectomia foi realizada segundo modelo proposto por KALU (1991). As ratas foram anestesiadas com uma mistura de ketamina e xylazina (61,5-7,6mg/Kg i.p.) e o procedimento foi iniciado após a ausência dos reflexos (Figura 6A). Inicialmente, foi feita uma incisão bilateral de 1-1,5 cm na região medial entre a última costela e o início da coxa, paralelamente a linha corporal, através da pele e camada muscular. Após a abertura da cavidade peritoneal os ovários foram expostos e removidos após ligadura abaixo da fimbria (Figura 6B). O útero foi recolocado em seu local natural e os músculos e pele foram suturados (Figura 6C). O procedimento foi realizado bilateralmente e após o procedimento cirúrgico as ratas foram alocadas em gaiolas individuais, onde permaneceram por cinco dias e receberam analgésico e aquecimento (Figura 6D) para recuperação inicial. Após este período, os animais foram recolocados em suas caixas coletivas de origem onde permaneceram para total

recuperação até o completar 21 dias dos procedimentos cirúrgicos. Este período de recuperação foi adotado pois, segundo a literatura, é tempo suficiente para que o estradiol não seja mais detectado no plasma dos animais (DIAZ BRINTON, 2012), indicando que alguns dos efeitos deletérios da ausência deste hormônio, como a perda da massa óssea podem começar a ser estabelecidos.

FIGURA 6. Etapas do procedimento de ovariectomia.



Anestésicos utilizados: ketamina e xylazina (A). Remoção dos ovários (B). Realocação do útero em posição natural (C). Recuperação dos animais em caixas individuais com temperatura adequada e analgesia (D). (Adaptado de STOTZER, 2013).

O controle do ciclo estral foi feito em ambos os grupos (SHAM e OVX) a partir da segunda semana após a cirurgia para confirmar o sucesso da OVX e a continuidade do ciclo do grupo SHAM. Para isso, um cotonete (swab) embebido em solução salina foi cuidadosamente introduzido na cavidade vaginal das ratas e foi feita uma rotação para coleta de material. A secreção foi colocada em uma lâmina histológica, na forma de esfregaço, para análise em microscopia óptica em aumento de 40X. A coleta foi realizada diariamente e foi mantida até um mês antes da eutanásia. (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002; STOTZER et al., 2015). A avaliação da fase do ciclo é feita a partir da proporção de células, sendo que no

proestro, fase inicial do ciclo, há a predominância de células nucleadas epiteliais, no estro, segunda fase, predominam células anucleadas cornificadas, no metaestro, terceira fase, há a mesma proporção entre células nucleadas epiteliais, cornificadas e leucócitos e no diestro, fase final, predominam leucócitos (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002).

3.4 Treinamento Resistido (TR)

O protocolo de TR foi adaptado de HORNBERGER; FARRAR (2004). Foram feitas as seguintes adaptações:

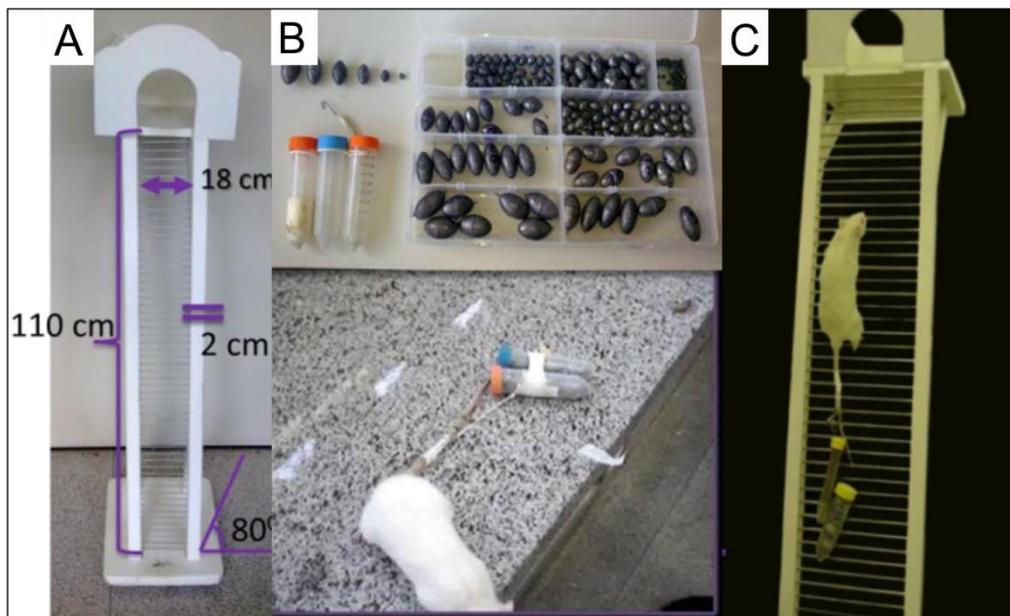
- O treinamento foi realizado em período de escuro, uma vez que este é o de maior atividade dos animais. Para possibilitar a visão do treinador foi utilizada luz infravermelha de 150W;

- O treinamento foi realizado 3 vezes por semana (segundas, quartas e sextas), tornando o modelo mais semelhante ao realizado em academias;

- O aumento da sobrecarga nas quatro primeiras séries das sessões de treinamento foi mudada de 50%, 75%, 90% e 100% para 65%, 85%, 95% e 100% da carga máxima, evitando um elevado número de séries e exaustão dos animais.

Para o treinamento, foi utilizada um recurso ergogênico (escada) de 1,10 m de altura por 0,18 m de largura com 2 cm de distância entre os degraus e 80° de inclinação (Figura 7A). As cargas foram colocadas em tubos do tipo falcon (50 mL) e fixadas na cauda dos animais com fita adesiva (Figuras 7B e 7C).

FIGURA 7. Treinamento de resistência.



Aparatos utilizados para o treinamento: Escada (a). Rata realizando o treinamento (b). Aparatos de sobrecarga (c). (Adaptado de STOTZER, 2013).

3.4.1 Adaptação ao treinamento

A adaptação ao treinamento foi realizada na primeira semana. As ratas foram colocadas na parte inferior da escada e estimuladas a escalar aplicando-se inicialmente um pinçamento manual na cauda. No topo da escada os animais encontravam uma gaiola com dimensões de 20 x 20 x 20 cm, onde descansavam por 120 segundos. O procedimento foi repetido até que os animais escalassem voluntariamente por três vezes consecutivas sem a aplicação do pinçamento na cauda.

3.4.2 Carga máxima de carregamento

A carga máxima de carregamento inicial foi determinada na primeira sessão de treino da segunda semana. Foi utilizada como base uma carga inicial de 75% do peso corporal. Após a primeira escalada, e nas subsequentes, foram adicionadas 30 g a cada escalada até que a rata não conseguisse mais escalar até o topo da escada ou completasse um total de nove escaladas (número máximo de

escaladas por sessão). A maior carga carregada com sucesso foi considerada a carga máxima.

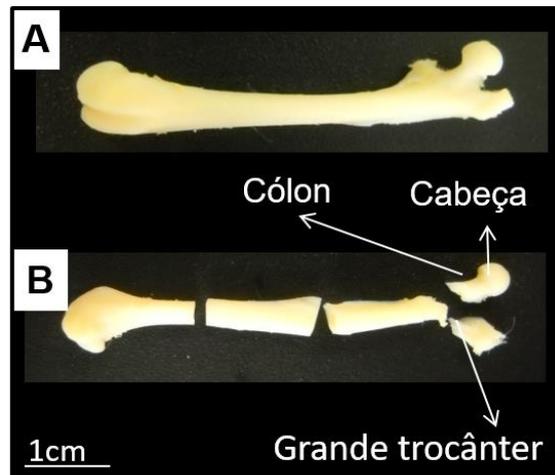
3.4.3 Sessões de treinamento

Nas próximas sessões de treinamento as ratas carregaram nas primeiras quatro escaladas 65%, 85%, 95% e 100%, respectivamente, da carga máxima determinada na sessão anterior e, nas escaladas seguintes, foram adicionados 30 g a cada escalada até que a rata não conseguisse mais escalar ou completasse nove escaladas, sendo que a sobrecarga utilizada na última escalada completa passava a ser a nova carga máxima para a próxima sessão de treinamento.

3.5 Eutanásia e Coleta de Amostras

Após as dez semanas de treinamento e passadas 48 horas da última sessão de treino, os animais ficaram em jejum *overnight* e foram eutanasiados por decapitação em guilhotina. Os animais foram então alocados em mesa cirúrgica para remoção dos fêmures, das tíbias e do útero. O útero foi pesado para mais uma confirmação do sucesso da ovariectomia. Em seguida, foi efetuada a dessecação e limpeza dos ossos. Os fêmures esquerdos foram divididos de acordo com o necessário para as análises subsequentes, congelados imediatamente em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80 °C para as análises gênicas e de zimografia (Figura 8). Os fêmures direitos foram armazenado em formalina tamponada a 10% para posteriores análises histológicas. As tíbias (direitas e esquerdas) foram armazenadas em solução salina 0,9% em freezer -20 °C para as análises biométricas, biomecânicas, biofísicas e de microtomografia computadorizada (microCT).

FIGURA 8. Imagem anatômica do fêmur de rato e divisões para armazenamento.



Fêmur inteiro (A). Divisão do fêmur (B): para extração de RNA foram utilizados cabeça e cólon e para análises de zimografia foi utilizado o grande trocânter (Arquivo pessoal).

3.6 Parâmetros biométricos

3.6.1 Peso corporal dos animais

O peso corporal dos animais foi mensurado no início do período experimental (inicial), antes do início do treinamento de resistência (pré treino) e após 10 semanas de treinamento (final).

3.6.2 Comprimento da tíbia direita

Para mensurar o comprimento da tíbia direita foi utilizado um paquímetro digital (Carbom Fiber Composities Western® PRO) com precisão de 0,01 mm. A padronização de referência utilizada foi o platô condilar e maléolo tibiais.

3.7 Densitometria óssea (Tíbia direita)

As análises de densidade mineral óssea (DMO) e conteúdo mineral ósseo (CMO) foram realizadas utilizando um Densitômetro Ósseo de Raios-X (DXA), Lunar dual energy X-Ray (DPX Alpha, General Electric Company, Madison, USA), acoplado a um computador com o software adequado para análises em pequenos animais (SmartScan, DPX versão 4.7). O equipamento está alocado na Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Federal Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP, Araçatuba, São Paulo, Brasil).

Os ossos foram analisados em temperatura ambiente. Para isto foram alinhados na posição ântero-posterior em um container com água destilada e foram escaneados. No software foi selecionada a região de interesse através do contorno das imagens dos ossos e os resultados para DMO (g/cm^3) e CMO (g) foram obtidos automaticamente pelo software.

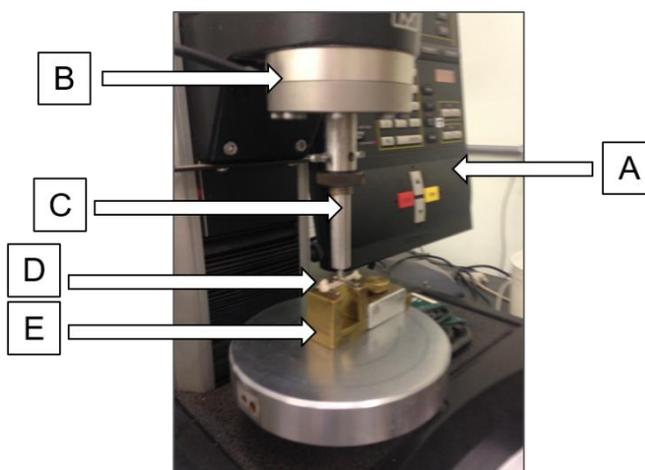
3.8 Parâmetros biomecânicos ósseos (Tíbia direita)

Para as análises biomecânicas, as tíbias direitas foram descongeladas 10 horas antes do início do ensaio e mantidas em solução salina. Inicialmente as tíbias foram alocadas em um dessecador, imersas em água destilada por 24 h para retirada do ar presente nos poros ósseos. Em seguida foram mensurados em balança de precisão o peso imerso (P_i) e o peso úmido (P_u), passando-se então para o ensaio biomecânico.

As propriedades biomecânicas foram mensuradas através do teste de flexão de três pontos, utilizando-se uma máquina de ensaio universal INSTRON modelo 4444 (Instron, Canton, MA, USA), cuja célula de carga possui capacidade de 100 Kgf. As extremidades das tíbias foram apoiadas em dois roletes com diâmetro de 3 mm, distanciados em 21,70 mm e a carga foi aplicada na região central de cada osso (TREBACZ; ZDUNEK, 2006) (Figura 9). No início do teste foi aplicada uma pré-carga de 10 N por meio de uma haste cilíndrica com um rolete de 3 mm na extremidade, no sentido pósterio-anterior e perpendicular ao eixo longitudinal para

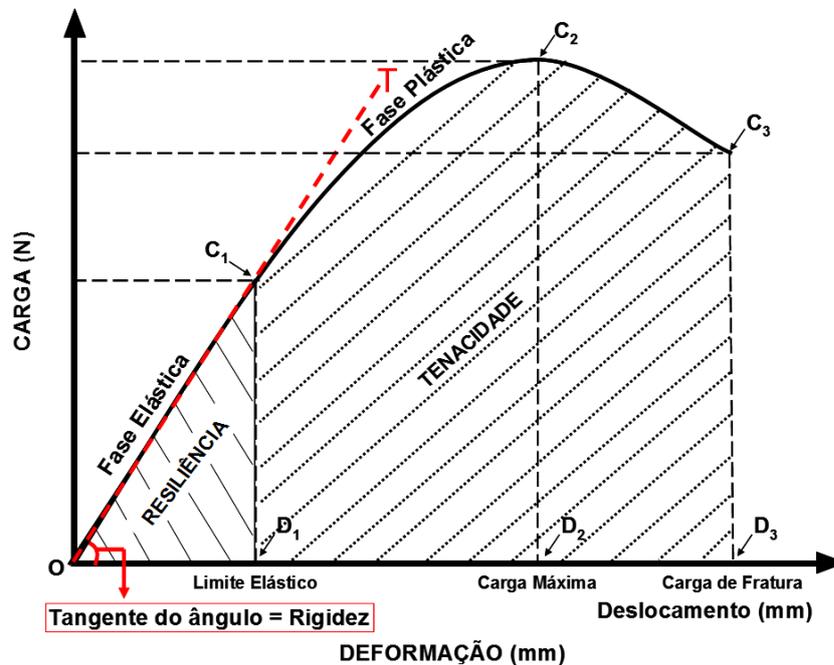
acomodação e estabilização da amostra. O tempo de acomodação foi de 1 min e então foi aplicada uma força no mesmo sentido, com velocidade constante de 0,5 cm/min até que ocorresse a fratura. Os resultados obtidos foram registrados pelo software Instron Series IX e foi gerada uma curva carga x deformação (Figura 10). A partir da análise desta curva foram obtidas as seguintes propriedades biomecânicas: carga máxima (N), maior carga suportada pela amostra durante o ensaio; carga de fratura (N), carga aplicada no momento da fratura da amostra; rigidez (N/mm), capacidade de resistir a deformações; tenacidade (J), energia necessária para provocar a ruptura da amostra e resiliência (J), energia absorvida pelo tecido ósseo sem que haja deformações permanentes.

FIGURA 9. Máquina de Ensaio Universal Instron (modelo 4444) utilizada para o ensaio de flexão de três pontos.



Painel de controle (A); célula de carga ligada (B); haste para a aplicação de carga (C); amostra (tíbia de rato) (D); suporte (E) (arquivo pessoal).

FIGURA 10. Gráfico Carga x Deformação utilizado para determinação das propriedades biomecânicas.



C₁: Carga no Limite Elástico; D₁: Deformação (deslocamento) no Limite Elástico; C₂: Carga Máxima; D₂: Deformação (deslocamento) na Carga Máxima; C₃: Carga de Fratura; D₃: Deformação (deslocamento) na Carga de Fratura (máxima); O/C₁/D₁: a área desta região corresponde a Resiliência (energia absorvida na fase elástica); O/C₃/D₃: a área desta região corresponde à tenacidade (energia absorvida até o ponto de ruptura); T: tangente da região O/C₁ da curva, corresponde a Rigidez (capacidade de resistir a deformações).

3.9 Parâmetros Biofísicos ósseos (Tíbia direita)

Para as análises biofísicas, as tíbias direitas, após o teste biomecânico, foram colocadas em uma estufa a 100 °C por 24 h para desidratação e, após esse procedimento, foi mensurado o peso seco (P_s). Para obtenção do peso das cinzas (P_m, material mineral), as tíbias foram colocadas em uma mufla na temperatura de 800 °C por 24 h (NORDSLETTEN et al., 1994).

Após a obtenção dos pesos, os cálculos foram realizados com base no Princípio de Arquimedes. Foi calculado o volume ósseo, densidade óssea e mineral, percentuais de material orgânico, mineral e de água de acordo com as fórmulas abaixo (MARTIN, 1990).

$$\text{Volume ósseo} = \text{Pu} - \text{Pi} / \rho \text{ (cm}^3\text{)}$$

$$\text{Densidade óssea} = \text{Pu} / \text{volume ósseo (g/cm}^3\text{)}$$

$$\text{Densidade mineral} = \text{Pm} / \text{volume ósseo (g/cm}^3\text{)}$$

$$\text{Percentual ósseo de água} = 100 \times (\text{Pu} - \text{Ps}) / \text{Pu}$$

$$\text{Percentual de material orgânico} = 100 \times (\text{Ps} - \text{Pm}) / \text{Pu}$$

$$\text{Percentual de material mineral} = 100 \times \text{Pm} / \text{Pu}$$

Onde: Pu = peso úmido ósseo, Ps = peso da amostra óssea desidratada, Pi = peso imerso ósseo, Pm = peso do material mineral (cinzas) e ρ = densidade da água destilada.

3.10 Parâmetros bioquímicos ósseos (Tíbia direita)

Para a análise bioquímica, as cinzas obtidas a partir das tíbias passaram por um processo de solubilização em ácido clorídrico 2 N. Posteriormente, por meio de ensaio colorimétrico, o conteúdo de cálcio e fósforo dos ossos foi determinado, com a utilização do kit comercial específico Labtest® (Labtest, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil), cat. 90, e 12 respectivamente.

3.11 Densitometria óssea por regiões (Tíbia esquerda)

Para as análises, as tíbias esquerdas (n=6 /grupo) foram enviadas ao *Rosen Laboratory* (MMCRI, Maine Medical Center Research Institute, Scarborough, USA) alocadas em tubos do tipo falcon de 15 mL contendo etanol 70 %. Antes de iniciar as análises de micro-CT é necessário confirmar se os ossos apresentam diferenças com relação à densidade mineral óssea. As tíbias foram então submetidas à análise de densitometria óssea para avaliação da DMO em um Densitômetro Ósseo de Raios-X (DXA) *PIXImus dual-energy X-ray densitometer* (GELunar, Madison, WI, USA), acoplado a um computador com o software para análises em pequenos animais (Lunar PIXImus 2, versão 2.1). O equipamento está alocado em uma *facility* para

imagens de pequenos animais do MMCRI. Os ossos foram analisados de maneira semelhante ao anteriormente feito com as tíbias direitas, porém houve a separação entre regiões trabecular e cortical para análise, sendo selecionada a região de interesse (ROI) separadamente para as duas análises (trabecular e cortical). Foram obtidos seguintes dados: DMO (g/cm^2) e CMO (g).

3.12 Microtomografia computadorizada (Micro-CT) (Tíbia esquerda)

Para esta análise foi utilizado um sistema de Micro-CT de alta resolução, vivaCT 40 (Scanco Medical AG, Brüttisellen, Switzerland) alocado em uma *facility* do MMCRI. O equipamento foi calibrado utilizando-se um phantom fornecido pela Scanco. As amostras foram colocadas duas a duas em um suporte plástico para amostra de 20 mm de diâmetro, semelhante a um canudo, envoltas por água destilada. O suporte foi colocado no equipamento, que é conectado a um computador com um software específico para análise das imagens (Scanco, versão 4.05). As imagens em 3D foram adquiridas utilizando um voxel de 10,5 μm para a região trabecular e um voxel de 21 μm para região cortical em todas as direções. A energia utilizada foi de 55 kVp com integração de 300 ms. As imagens obtidas foram segmentadas usando um filtro de remoção de ruído e estabeleceu-se um threshold padrão para aquisição da fase óssea mineralizada.

Foram adquiridas um total de 375 fotos em “fatias” tomando-se por base a região proximal da tíbia até a região de inserção da fíbula. As secções trabeculares e corticais das tíbias foram separadas e contornadas no software. Para a análise da região trabecular, foi escolhida a região proximal da tíbia abaixo da placa de crescimento e utilizou-se aproximadamente 200 fotos em “fatias”. Esta região foi semelhante à utilizada para contagem do número de adipócitos nas lâminas histológicas feitas com o fêmur direita. Para a região cortical foi utilizado como referência o eixo médio tibial, região média entre a parte superior e local de inserção da fíbula, sendo utilizadas 100 fotos em “fatias” para análise. Esta região foi escolhida por ser também a região onde foi aplicada a força no teste de três pontos realizado nas tíbias direitas.

Para região trabecular foram obtidos os seguintes dados a partir das imagens binárias: fração de volume ósseo (BV/TV) (%), volume de osso mineralizado em relação ao volume total analisado; densidade de conectividade (Conn.D) ($1/\text{mm}^3$), medida do grau de conectividade trabecular normalizado pelo volume total analisado; índice de modelo estrutural (SMI), indicador da estrutura trabecular, que pode variar de 0, para placas paralelas até 3 para hastes cilíndricas; espessura trabecular (Tb.Th) (μm), número de trabéculas (Tb.N) ($1/\text{mm}^3$), corresponde ao número de trabéculas por unidade de comprimento e separação trabecular (Tb.Sp) (μm), distância média entre uma trabécula e outra dentro da região de interesse analisada.

Para a região cortical foram obtidos os seguintes dados a partir das imagens binárias: fração de volume ósseo (BV/TV) (%), volume de osso mineralizado em relação ao volume total analisado; fração de área cortical (Ct.Ar/Tt.Ar) (%), espessura cortical (Ct.Th) (μm), porosidade cortical (%) e área de medula óssea (Ma.Ar) (mm^2).

3.13 Processamento das Amostras e histologia (Fêmur direito)

Os fêmures direitos, destinados para as análises histológicas, ficaram armazenados em formalina tamponada a 10% por 24 h e foram lavados em água corrente, passando em seguida por processo de descalcificação em solução de ácido etilenodiaminotetracético 4% (EDTA) (Merck®, Darmstadt, Alemanha) por aproximadamente vinte dias.

Para confecção das lâminas foi utilizada a epífise proximal dos fêmures (região da cabeça e cólo). As alíquotas passaram por processo de desidratação em concentrações crescentes de etanol (70%, 80%, 90%, 95% e 100%), foram diafanizadas em xilol, impregnadas em paraplast (Histosec®, Merck, Darmstadt, Alemanha) e incluídas em blocos de paraplast para posterior composição das lâminas.

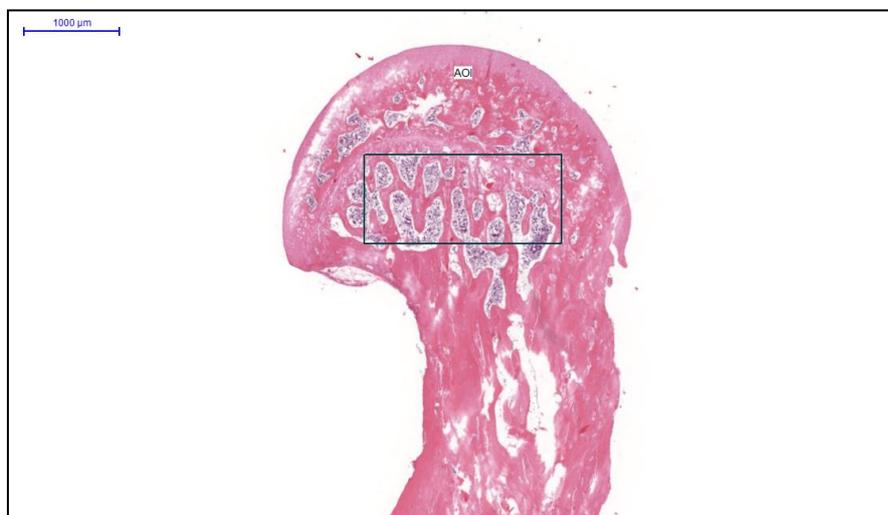
A partir dos blocos de paraplast foram feitos cortes histológicos semi-seriados com 5 μm de espessura. Os cortes foram então estendidos e montados em lâminas tratadas com polilisina para melhor fixação do corte. Após a montagem, as lâminas foram mantidas em forno estufa a 60 °C overnight para adesão do corte na lâmina.

3.13.1 Coloração com Eosina e Hematoxilina e contagem de adipócitos

Para a coloração com eosina e hematoxilina (HE), as lâminas foram alocadas *overnight* em estufa a 60 °C para desparafinização. No dia seguinte os cortes passaram por processo de hidratação em bateria de xilol, etanol em concentrações decrescentes e água destilada, sendo posteriormente submetidos ao processo de coloração em HE. Subsequentemente, os cortes já corados foram desidratados em álcool, diafanizados em xilol e a montagem das lâminas foi feita utilizando-se Bálsamo do Canadá para fixação da lamínula.

As lâminas foram escaneadas utilizando-se o scanner de lâminas Panoramic DESK 1.18.1 (3D HISTECH, Budapest, Hungary), localizado no Laboratório de Imunologia Aplicada do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar, São Carlos, Brasil). Após o escaneamento foi utilizado o software Panoramic Viewer 1.15.4 (3D HISTECH, Budapest, Hungary) para visualização das imagens escaneadas e aquisição de fotos da área de interesse (AOI), região fotografada a partir do aumento de 7x obtido no software Panoramic Viewer (Figura 11). As células adiposas foram contadas em toda a área de interesse. A área foi mensurada, sendo a mesma para todas as imagens, 2009726 μm^2 .

FIGURA 11. Imagem de corte histológico da cabeça e cólon do fêmur com delimitação da área de interesse.



AOI: área de interesse, área interna ao retângulo de bordas azuis (Arquivo pessoal).

3.14 Análises gênicas (Fêmur esquerdo)

As análises de expressão gênica foram realizadas pela técnica da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR). A expressão dos seguintes genes foi analisada: MMP-13, TIMP-1, COL-1, RUNX-2 e OPG. Para escolha do melhor gene constitutivo a ser utilizado para as análises, foram testados os genes para as seguintes proteínas: proteína ribossomal S27A (RPS-27A), proteína ribossomal S18 (RPS-18), proteína ribossomal grande P0 (RPLP0), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e beta actina (β -ACT). Os resultados foram analisados e ranqueados utilizando-se um programa online (RefFinder, 2015) o qual analisa os resultados de acordo com quatro critérios diferentes para classificar qual o gene de referência mais indicado para ser utilizado nas análises. O gene da proteína ribossomal S27A (RPS-27A) foi o melhor classificado e foi utilizado como constitutivo para análise de expressão gênica relativa.

3.14.1 Extração do RNA total

A cabeça e cólo dos fêmures esquerdos, utilizados para extração do RNA total (Figura 8), foram macerados em cuba de metal com nitrogênio líquido com o auxílio de um pistilo de porcelana. O pó proveniente dos fêmures foi alocado em um microtubo de 1,5 ml com 1 mL de TRIZOL Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Em seguida o material foi homogeneizado utilizando-se o homogeneizador PowerGen 125 (Fisher Scientific, Pittsburgh, USA). As etapas subsequentes da extração do RNA foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante. O RNA extraído foi ressuspensionado em água livre de nucleases, quantificado e avaliado para verificação do grau de pureza (260nm/280nm) em equipamento Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, USA) e foi armazenado em freezer -80 °C para posterior transcrição reversa.

3.14.2 Transcrição reversa

Um micrograma do RNA total de cada amostra foi submetido ao tratamento com desoxirribonuclease I (DNase I; Invitrogen Corporation, California, USA) segundo instruções do fabricante, para remoção de possíveis contaminações com DNA genômico. Após o tratamento, iniciou-se o processo de transcrição reversa, utilizando para isto oligo (dT) e enzima *M-MLV Reverse Transcriptase* (Promega Corporation, Madison, USA) de acordo com o manual do fabricante.

3.14.3 Reação de cadeia da polimerase em tempo real

O sistema de detecção em tempo real CFX 96 (BioRad, São Francisco, USA) foi utilizado para a qRT-PCR. Para cada reação foram utilizados 20 ng de cDNA, 200 nM de cada primer e 5 µl de *Evagreen Supermix* (BioRad, São Francisco, USA) totalizando 10 µl por reação. Os primers utilizados para avaliação da expressão dos genes para MMP-13, TIMP-1, COL-1, RUNX-2, OPG e RPS-27A foram comprados da Sigma Aldrich (Missouri, USA) ou da Bioneer (Republic of Korea) e as sequências estão descritas na tabela 1.

TABELA 1. Especificações dos primers utilizados para o qRT-PCR.

Genes	Primer Senso (5'-3')	Primer Antiseno (3'-5')	Acesso nº	Empresa
MMP-13	CGTGTGGAGTTATGATGATG	ATCTACTTTGTGCGCCAATTC	NM_133530.1	Sigma Aldrich
TIMP-1	ATAGTGCTGGCTGTGGGGTG	TGATGCCTCTGGTAGCCCTT	NM_053819.1	Bioneer
COL-1	ATCAGCCCAAACCCCAAGGAGA	CGCAGGAAGGTCAGCTGGATAG	NM_053304.1	Bioneer
RUNX-2	AGAGTCAGATTACAGATCCC	TGTCATCATCTGAAATACGC	NM_001278483.1	Sigma Aldrich
OPG	AAGGAAATGCAACACATGAC	TCTCTACACTCTCTGCATTC	NM_012870.2	Sigma Aldrich
RPS27A	GACCCTTACGGGGAAAACCAT	AGACAAAGTCCGGCCATCTTC	NM_031113.2	Sigma Aldrich

MMP-13: Metaloproteinase de matriz -13; TIMP-1: Inibidor de metaloproteinase de matriz -1; COL-1: colágeno do tipo 1; RUNX-2: *Run-related transcription fator -2*; OPG: osteoprotegerina; RPS-27A: proteína ribossomal S27A

A sequência de ciclos dos primers, padronizada de acordo com a temperatura de *melting* (T_m) de cada primer, foi: 10 min a 95 °C, seguido por 40 ciclos de 15 s a 95 °C, 30 s a 60 °C e 30 s a 72 °C. Os produtos específicos da PCR foram determinados como picos únicos através das curvas de MELT e foi determinado o início da fase de amplificação exponencial (C_t , *Threshold cycle*). Os valores de C_t foram utilizados para análise da expressão gênica dos genes de interesse acima descritos. A análise dos dados foi feita através do método de quantificação relativa e a normalização através da expressão do gene constitutivo RPS-27A. Para análise dos dados foi utilizada a equação de Livak e Schmittgen, onde a variação na expressão de cada gene é igual a $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

3.15 Análise de zimografia em gelatina (Fêmur esquerdo)

A fim de avaliar a atividade da MMP-2 foi realizada a análise de zimografia em gelatina, a qual foi adaptada do protocolo estabelecido por MARQUETI et al. (2008). A região do grande trocânter dos fêmures esquerdos das ratas foi utilizada para esta análise (Figura 8). Inicialmente as amostras foram maceradas utilizando-se um pistilo de porcelana em cuba de metal com nitrogênio líquido,

homogeneizadas e incubadas em 2 mL de tampão de extração [10 mM de ácido cacodílico (pH 5,0), 0,15 M NaNO₃ e 0,01 % de Triton X-100] a 4 °C por 24 h. O homogeneizado foi centrifugado a 4 °C, 13.000 g por 10 min e o sobrenadante foi coletado e o pH ajustado para 7.4. A concentração total de proteínas foi mensurada através do método BCA utilizando-se o kit para detecção *Pierce™ BCA Protein Assay* (Thermo Scientific™, Waltham, USA). Um total de 20 µg de proteína foi aplicado em cada poço de um gel de poliacrilamida com 10 % de dodecil sulfato de sódio (SDS) preparado com 1 mg/mL de gelatina. Após a eletroforese os géis foram lavados duas vezes em Triton X-100 2,5 % para remoção do SDS. Na sequência, os géis foram incubados em tampão de substrato (Tris-HCl 50mM pH 8,0, CaCl₂ 5 mM e NaN₃ 0,02%) a 37 °C por 20 h. Após a incubação, o corante Coomassie Blue Brilliant R-250 (Bio-Rad®, California, USA) foi utilizado para corar os géis por 1h30min e o descorante ácido acético:metanol:água (1:4:5 v:v:v) foi utilizado para descorar os géis, permitindo a visualização das áreas onde houve atividade das MMPs (faixas claras no gel corado). As imagens dos géis foram capturadas com uma câmera Canon G6 Power Shot 7.1 mega pixels (Newport News, Virginia, USA). As médias de intensidade das bandas foram mensuradas utilizando o software Gene Tools 3.06® (Syngene, Cambridge, UK).

3.16 Análise Estatística

Para análise estatística dos dados foi utilizado o programa STATISTICA® 7.0 (Stat Soft). Inicialmente foram testadas a distribuição normal dos dados através do teste de Shapiro-Wilk e homogeneidade (critério de Bartlett). Todas as variáveis que apresentaram distribuição normal e foram homogêneas foram submetidas à análise de variância ANOVA utilizando-se o teste Two Way (considerando as variáveis OVX e TR) com post-hoc de Tukey para comparações múltiplas. O nível de significância estatística adotado foi de $P < 0,05$. Os resultados estão apresentados como média ± erro padrão da média (EPM).

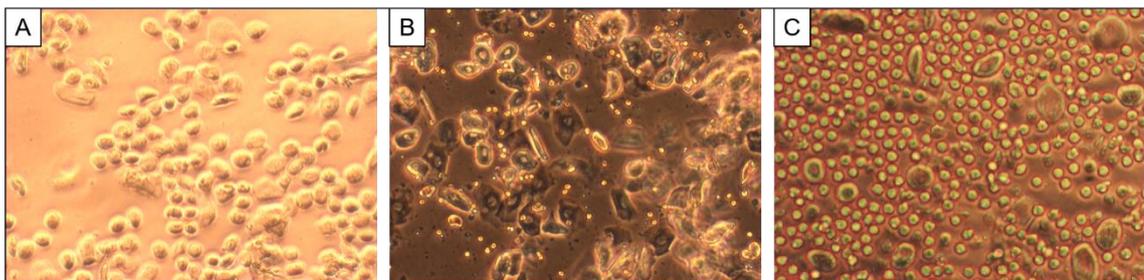
4. RESULTADOS

4.1 Controle do ciclo estral e massa do útero

O sucesso da ovariectomia foi confirmado através do esfregaço vaginal para avaliação do ciclo estral. A figura 12 apresenta as imagens histológicas obtidas do esfregaço vaginal com as fases do ciclo estral. O critério de inclusão utilizado para as ratas do grupo OVX foi a permanência na fase de diestro (ou anestro). Todas as ratas que passaram pela OVX deixaram de ciclar, ou seja, permaneceram na fase diestro (ou anestro), sendo, portanto, utilizadas no estudo. As ratas do grupo SHAM continuaram ciclando normalmente.

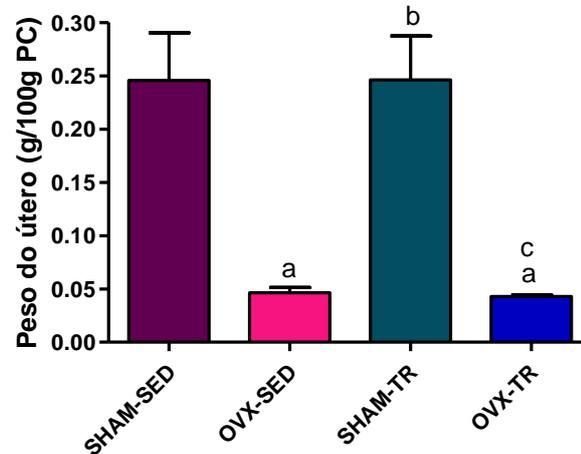
O peso do útero também foi utilizado como critério para confirmar o sucesso da ovariectomia (Figura 13). Pode-se observar uma grande queda no peso uterino nos grupos OVX, indicando que a cirurgia foi efetiva.

FIGURA 12. Imagens histológicas caracterizando as fases do ciclo estral dos animais dos grupos experimentais SHAM e OVX.



Proestro (A) apresentando a predominância de células nucleadas epiteliais; Metaestro (B) apresentando a mesma proporção entre células nucleadas epiteliais, cornificadas e leucócitos e Diestro (C) apresentando a predominância de leucócitos. Aumento de 40X.

FIGURA 13. Peso relativo do útero (g/100g PC) dos animais dos diferentes grupos experimentais.

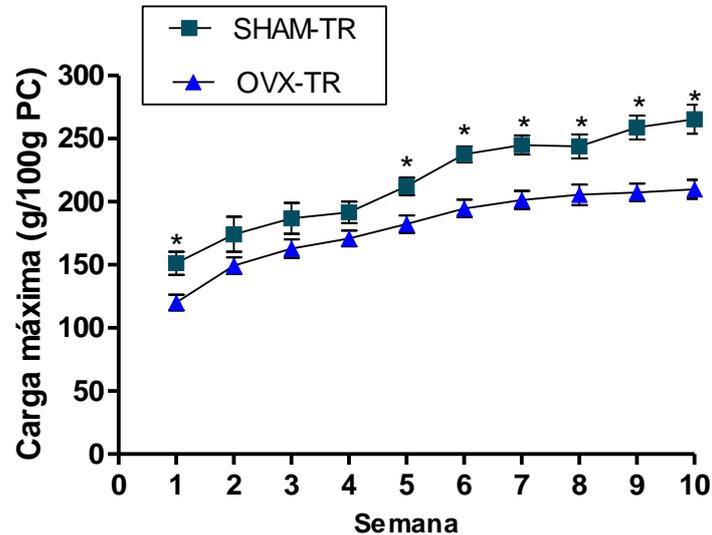


Sham sedentários (SHAM-SED), Ovariectomizados sedentários (OVX-SED), Sham treinamento resistido (SHAM-TR), Ovariectomizados treinamento resistido (OVX-TR), Peso corporal (PC). Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média. a vs. SHAM-SED; b vs. OVX-SED; c vs. SHAM-TR, $p < 0,05$.

4.2 Carga de carregamento

A carga de carregamento foi normalizada pelo peso corporal. Observou-se um aumento gradual durante o período experimental, em torno de 75% em ambos os grupos e, na primeira e a partir da quinta semana de treinamento houve diferença significativa na carga de carregamento entre os grupos experimentais, sendo que os animais do grupo SHAM-TR carregaram mais peso relativo do que os animais do grupo OVX-TR (Figura 14).

FIGURA 14. Evolução da carga relativa de carregamento (g/100g PC) dos animais dos grupos experimentais treinados.



Sham treinamento resistido (SHAM-TR), Ovariectomizados treinamento resistido (OVX-TR), Peso corporal (PC). Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média. * vs. SHAM-TR, $p < 0,05$.

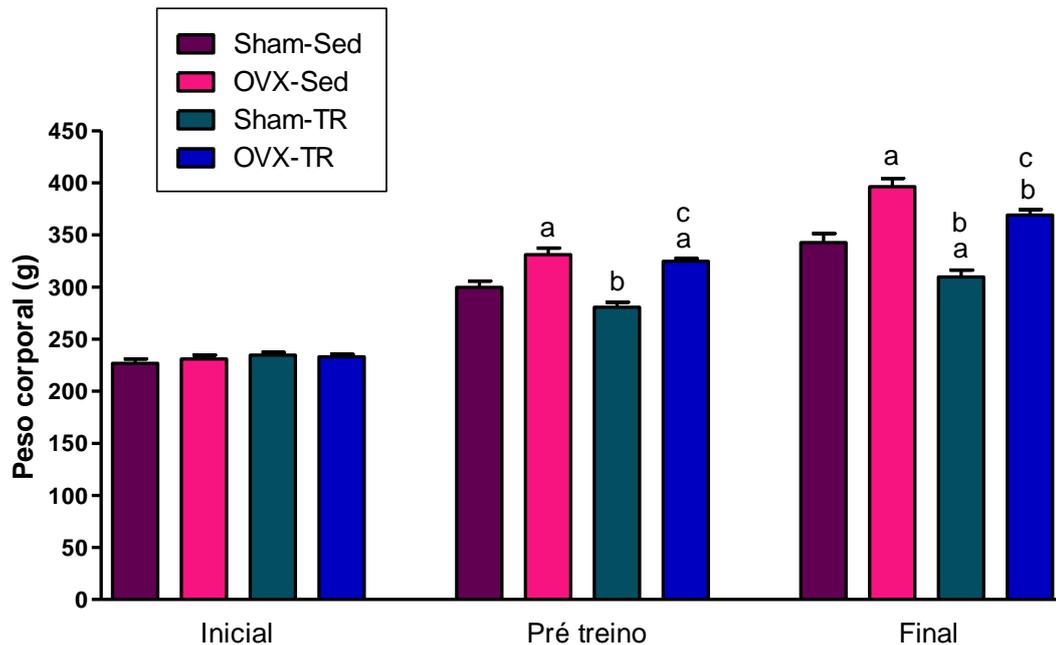
4.3 Parâmetros biométricos

4.3.1 Peso corporal dos animais

O peso corporal das ratas ao início do período experimental não apresentou diferenças significativas entre os grupos, indicando que todos os animais iniciaram o experimento nas mesmas condições. Todos os grupos ganharam peso até o período que marcou o início do treinamento resistido (pré treino), porém os grupos OVX apresentaram maior peso quando comparados ao SHAM-SED e SHAM-TR. Os grupos OVX-SED e OVX-TR apresentaram um aumento de 43% e 39%, respectivamente no peso corporal enquanto os grupos SHAM-SED e SHAM-TR aumentaram o peso corporal em 32% e 19%, respectivamente, indicando que a OVX promoveu um maior incremento no peso corporal destes animais. Ao final do período experimental o peso corporal do grupo OVX-SED foi o maior em relação ao dos demais grupos e os animais do grupo SHAM-TR apresentaram o menor peso corporal. As ratas do grupo OVX-TR apresentaram menor peso corporal que as do grupo OVX-

SED e maior peso corporal que as ratas do grupo SHAM-TR, não havendo diferenças significativas para o grupo SHAM-SED. Este resultado indica que o treinamento resistido previne o aumento do peso corporal na ausência dos hormônios ovarianos (Figura 15).

FIGURA 15. Evolução do peso corporal (g) dos animais dos diferentes grupos experimentais em três períodos: inicial, pré treino e final.

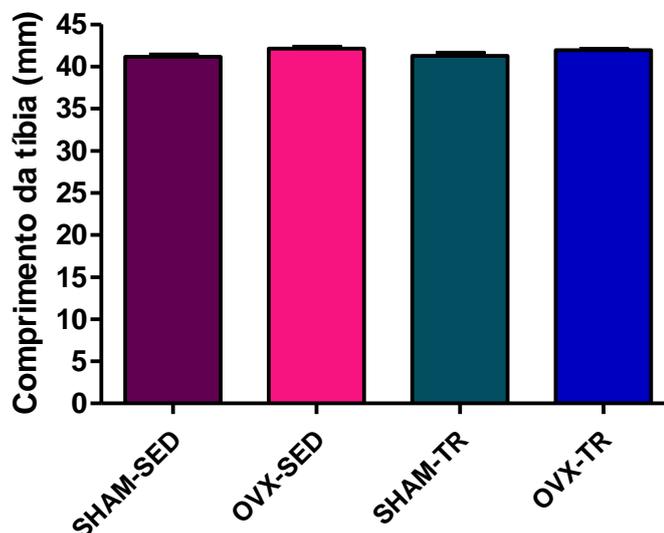


Sham sedentários (SHAM-SED), Ovariectomizados sedentários (OVX-SED), Sham treinamento resistido (SHAM-TR), Ovariectomizados treinamento resistido (OVX-TR), Peso corporal (PC). Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média. a vs. SHAM-SED; b vs. OVX-SED; c vs. SHAM-TR, $p < 0,05$.

4.3.2 Comprimento da tíbia direita

Na figura 16 pode-se observar a medida do comprimento da tíbia nos grupos experimentais. Não houve diferença significativa entre os grupos estudados, indicando que os animais se encontravam no mesmo estágio de desenvolvimento ósseo.

FIGURA 16. Comprimento (mm) das tíbias direitas, dos animais dos diferentes grupos experimentais.

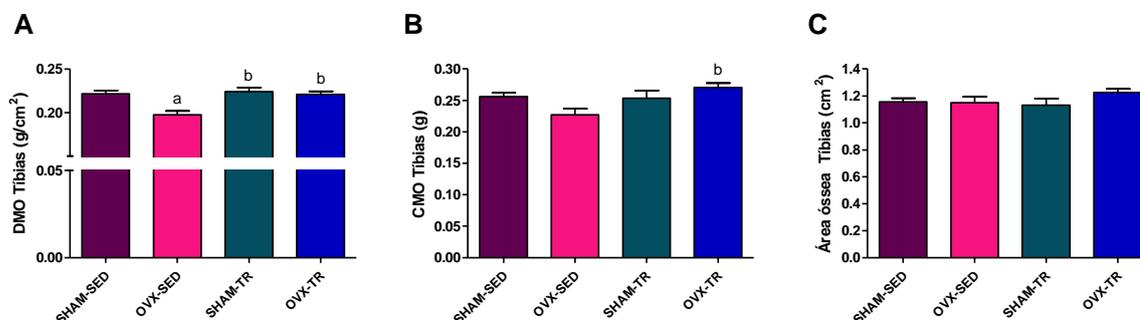


Sham sedentários (SHAM-SED), Ovariectomizados sedentários (OVX-SED), Sham treinamento resistido (SHAM-TR), Ovariectomizados treinamento resistido (OVX-TR), Peso corporal (PC). Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média. a vs. SHAM-SED; b vs. OVX-SED; c vs. SHAM-TR, $p < 0,05$.

4.4 Densitometria óssea (Tíbia direita)

A ovariectomia promoveu queda na densidade mineral óssea (10,4%, $P < 0.05$) nos animais do grupo OVX-SED quando comparados os animais dos grupos SHAM-SED e OVX-TR. O treinamento resistido se mostrou eficaz na reversão deste efeito, não havendo diferenças entre os grupos SHAM-SED, SHAM-TR e OVX-TR (Figura 17A). O conteúdo mineral ósseo foi maior no grupo OVX-TR comparado aos demais grupos (Figura 17B) e não houve diferenças significativas na área óssea entre os grupos estudados (Figura 17C).

FIGURA 17. Valores de densidade mineral óssea (cm^2) (A), conteúdo mineral ósseo (g) (B) e área óssea (cm^2) (C) da tíbia direita, dos animais dos diferentes grupos experimentais.

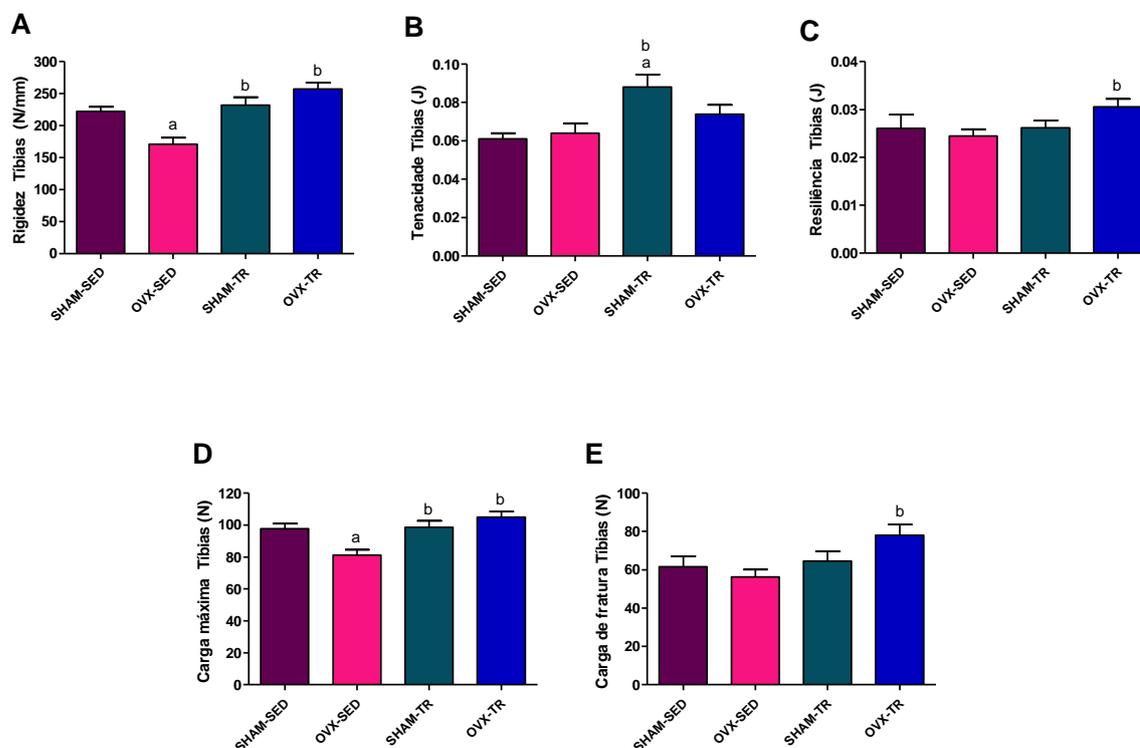


Sham sedentários (SHAM-SED), Ovariectomizados sedentários (OVX-SED), Sham treinamento resistido (SHAM-TR), Ovariectomizados treinamento resistido (OVX-TR), Densidade mineral óssea (DMO), conteúdo mineral ósseo (CMO). Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média. a vs. SHAM-SED; b vs. OVX-SED; c vs. SHAM-TR, $p < 0,05$.

4.5 Parâmetros biomecânicos ósseos (Tíbia direita)

Na figura 18 podem ser observados os parâmetros biomecânicos referentes à tíbia direita dos animais de todos os grupos experimentais: rigidez (N/mm), tenacidade (J), resiliência (J), carga máxima (N) e carga de fratura (N). Pode-se observar que tanto a rigidez como a carga máxima diminuíram no grupo OVX-SED quando comparado ao SHAM-SED e o treinamento resistido foi eficaz em aumentar estes parâmetros no grupo OVX-TR quando comparado ao OVX-SED, tornando-os parâmetros semelhantes aos dos grupos SHAM-TR. A carga máxima de fratura e resiliência aumentaram no grupo OVX-TR em relação ao OVX-SED. Já a tenacidade foi maior no grupo SHAM-TR quando comparado aos grupos SHAM-SED e OVX-SED.

FIGURA 18. Parâmetros biomecânicos rigidez (N/mm) (A), tenacidade (J) (B), resiliência (J) (C), carga máxima (N) (D) e carga de fratura (N) (E) da tíbia direita dos animais de todos os grupos experimentais.



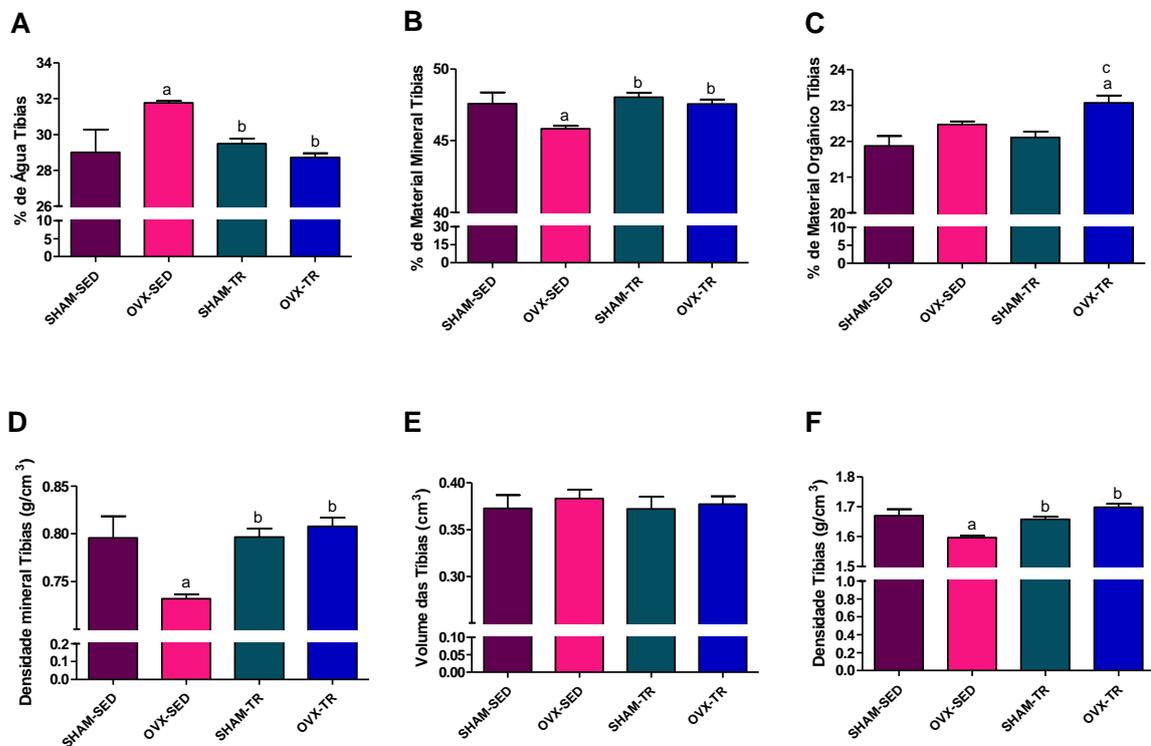
Sham sedentários (SHAM-SED), Ovariectomizados sedentários (OVX-SED), Sham treinamento resistido (SHAM-TR), Ovariectomizados treinamento resistido (OVX-TR). Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média. a vs. SHAM-SED; b vs. OVX-SED; c vs. SHAM-TR, $p < 0,05$.

4.6 Parâmetros Biofísicos ósseos (Tíbia direita)

Os parâmetros biofísicos das tíbias direitas estão representados na figura 19. A porcentagem de água foi maior no grupo OVX-SED em relação ao grupo SHAM-SED e o treinamento resistido promoveu diminuição na porcentagem de água nos animais do grupo OVX-TR em relação aos animais do grupo OVX-SED não havendo diferenças entre os grupos SHAM-TR e OVX-TR (Figura 16A). A porcentagem de material mineral, a densidade mineral e a densidade das tíbias diminuíram no grupo OVX-SED em relação ao grupo SHAM-SED. O treinamento resistido foi eficaz em reverter estes efeitos, havendo aumento nos parâmetros

analisados para os animais do grupo OVX-TR em relação aos animais do grupo OVX-SED, não havendo diferenças entre os grupos SHAM-TR e OVX-TR (Figura 16B, D e F). A porcentagem de material orgânico aumentou no grupo OVX-TR em relação aos grupos SHAM-SED e SHAM-TR (Figura 16C).

FIGURA 19. Parâmetros biofísicos % de água (A), % de material mineral (B), % de material orgânico (C), densidade mineral (g/cm^3) (D), volume (E) e densidade (g/cm^3) (F) da tíbia direita dos animais de todos os grupos experimentais.



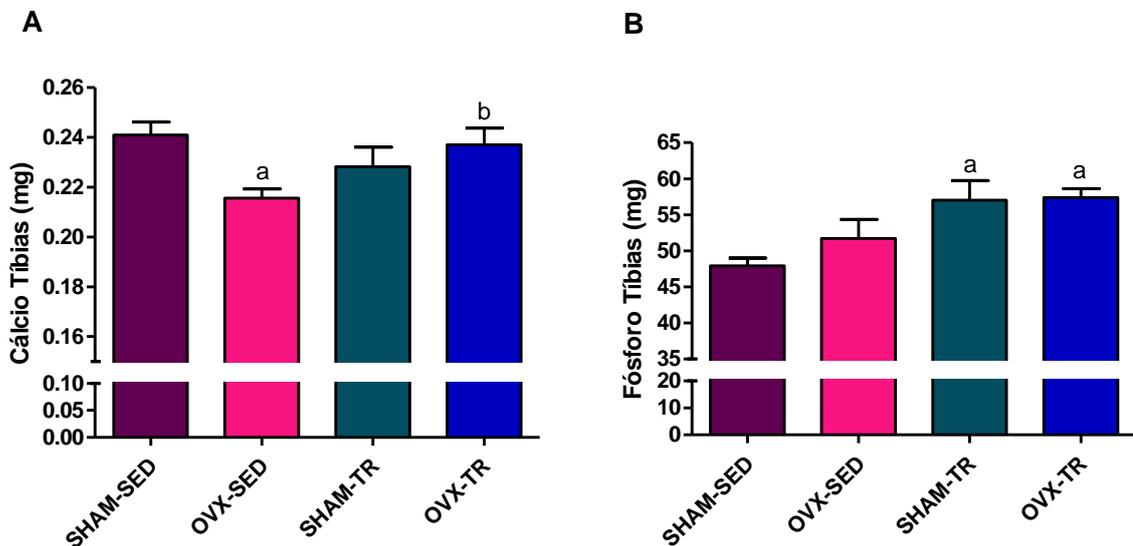
Sham sedentários (SHAM-SED), Ovariectomizados sedentários (OVX-SED), Sham treinamento resistido (SHAM-TR), Ovariectomizados treinamento resistido (OVX-TR). Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média. a vs. SHAM-SED; b vs. OVX-SED; c vs. SHAM-TR, $p < 0,05$.

4.7 Parâmetros bioquímicos ósseos (Tíbia direita)

Na figura 20 estão apresentados os dados referentes às análises bioquímicas ósseas de cálcio (mg) e de fósforo (mg) realizadas nas tíbias direitas dos

animais de todos os grupos experimentais. O grupo OVX-SED apresentou uma diminuição na quantidade de cálcio em relação ao grupo SHAM-SED. O treinamento resistido foi capaz de prevenir esta diminuição uma vez que o grupo OVX-TR apresentou maior quantidade de cálcio em relação ao grupo OVX-SED (Figura 20A). Já para o fósforo houve um aumento na concentração nos grupos, SHAM-TR e OVX-TR comparados ao SHAM-SED (Figura 20B).

FIGURA 20. Parâmetros bioquímicos Cálcio (A) e Fósforo (B) da tíbia dos animais de todos os grupos experimentais.



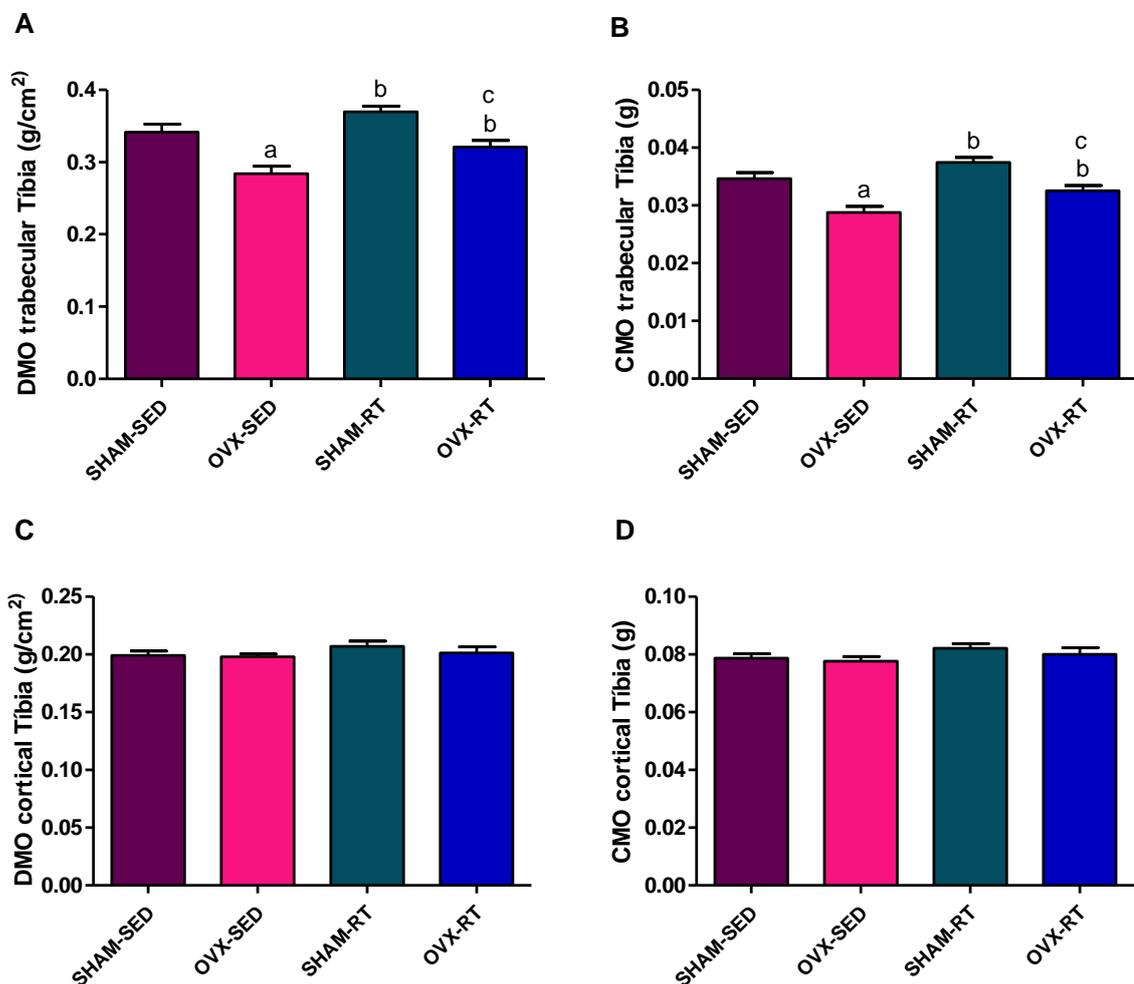
Sham sedentários (SHAM-SED), Ovariectomizados sedentários (OVX-SED), Sham treinamento resistido (SHAM-TR), Ovariectomizados treinamento resistido (OVX-TR). Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média. a vs. SHAM-SED; b vs. OVX-SED; c vs. SHAM-TR, $p < 0,05$.

4.8 Densitometria óssea por regiões (Tíbia esquerda)

A ovariectomia promoveu queda na densidade mineral óssea e no conteúdo mineral ósseo da região trabecular nas tíbias esquerdas do grupo OVX-SED quando comparado aos grupos SHAM-SED e OVX-SED. O treinamento resistido se mostrou eficaz na reversão deste efeito uma vez que houve um aumento significativo

no grupo OVX-TR quando comparado ao grupo OVX-SED ainda que não tenha se igualado ao grupo SHAM-TR (Figuras 21A e 21B). Com relação à região cortical não houve diferença significativa entre os grupos para densidade mineral e conteúdo mineral (Figuras 21C e 21D).

FIGURA 21. Densidade mineral (A e C) e conteúdo mineral (B e D) ósseos por regiões, trabecular (A e B) e cortical (C e D) da tíbia esquerda dos animais de todos os grupos experimentais.

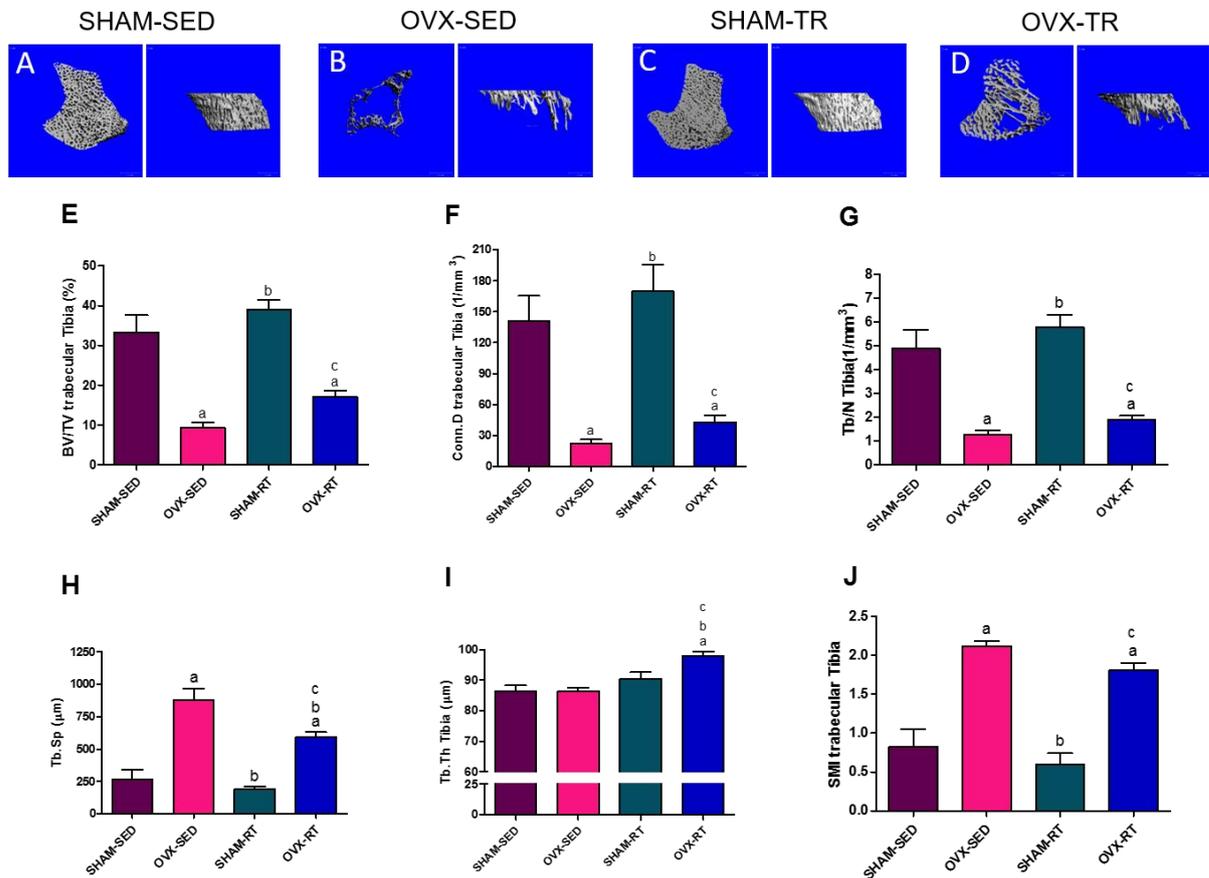


Sham sedentários (SHAM-SED), Ovariectomizados sedentários (OVX-SED), Sham treinamento resistido (SHAM-TR), Ovariectomizados treinamento resistido (OVX-TR) Densidade mineral óssea (DMO), Conteúdo mineral ósseo (CMO). Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média. a vs. SHAM-SED; b vs. OVX-SED; c vs. SHAM-TR, $p < 0,05$.

4.9 Microtomografia computadorizada (Micro-CT) (Tíbia esquerda)

A figura 22 traz os resultados para Micro-CT da região trabecular. As Figuras 19A, B, C e D trazem imagens representativas dos resultados obtidos a partir da análise em duas posições, transversal e longitudinal, nos grupos experimentais SHAM-SED, OVX-SED, SHAM-TR e OVX-TR, respectivamente. São notáveis as diferenças com relação à composição trabecular entre os grupos SHAM-SED e OVX-SED demonstrando os efeitos negativos da ausência do estrogênio sobre os ossos (Figuras 22A e 22B). Observa-se a relevância do treinamento na prevenção destes impactos negativos quando comparados os grupos OVX-SED e OVX-TR (Figuras 22B e 22D). Pode ser observado que os animais do grupo OVX-SED apresentaram uma diminuição no volume ósseo em relação aos animais do grupo SHAM-SED e o treinamento resistido não foi capaz de prevenir esta perda pois, apesar de haver uma melhora esta não foi significativa quando comparados os grupos OVX-SED e OVX-TR (Figura 22E). Resultados semelhantes foram observados para conectividade, número de trabéculas e índice de modelo estrutural (SMI) que indica a composição estrutural das trabéculas (Figuras 22F, 22G e 22J). Por outro lado, houve um aumento na separação trabecular no grupo OVX-SED comparado ao grupo SHAM-SED e o treinamento foi efetivo em prevenir este aumento uma vez que houve diferença significativa entre os grupos OVX-TR e OVX-SED (Figura 22H). O treinamento resistido também propiciou aumento na espessura trabecular no grupo OVX-TR quando comparado aos demais grupos experimentais (Figura 22I).

FIGURA 22. Análise de microtomografia da região trabecular das tíbias esquerdas dos animais de todos os grupos experimentais (E-J). Imagem representativa grupo SHAM-SED (A), Imagem representativa grupo OVX-SED (B), Imagem representativa grupo SHAM-TR (C), Imagem representativa grupo OVX-TR (D).

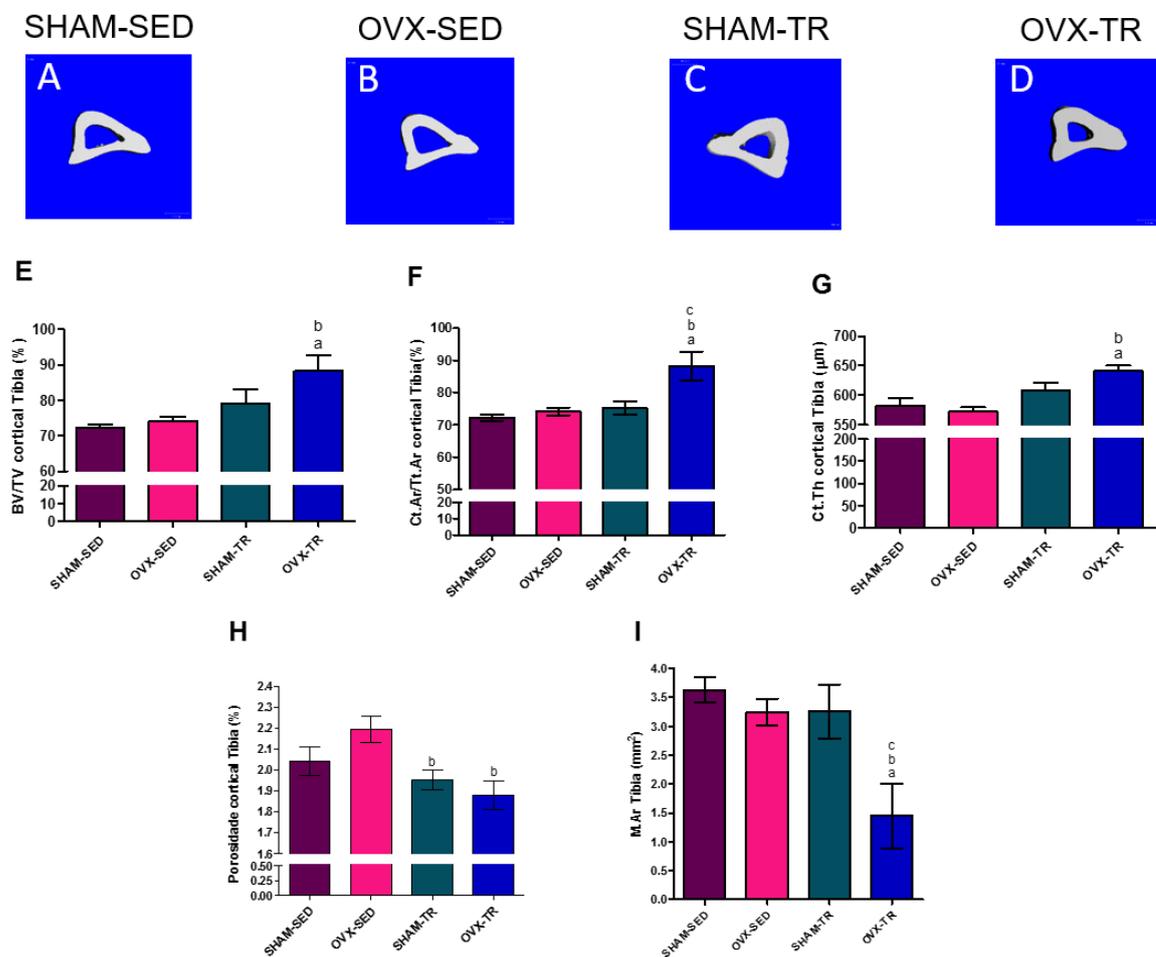


Sham sedentários (SHAM-SED), Ovariectomizados sedentários (OVX-SED), Sham treinamento resistido (SHAM-TR), Ovariectomizados treinamento resistido (OVX-TR), Fração de volume ósseo (BV/TV), Densidade de conectividade (Conn.D), Número de trabéculas (Tb.N), Separação trabecular (Tb.Sp), Espessura trabecular (Tb.Th), Índice de modelo estrutural (SMI). Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média. a vs. SHAM-SED; b vs. OVX-SED; c vs. SHAM-TR, $p < 0,05$.

A figura 23 mostra os resultados para Micro-CT da região cortical. As figuras 23A, 23B, 23C e 23D trazem imagens representativas dos resultados obtidos a partir da análise em posição transversal, nos grupos experimentais SHAM-SED, OVX-SED, SHAM-TR e OVX-TR, respectivamente. Nas figuras 23E, 23F e 23G observa-se que o treinamento resistido promoveu o aumento no volume ósseo cortical, na fração de área cortical e na espessura cortical quando comparados os grupos OVX-SED e OVX-TR. O treinamento também foi eficiente em diminuir a

porosidade e a área de medula óssea, o que pode ser observado quando comparados os grupos OVX-SED e OVX-TR, indicando que os ossos ganharam massa e espessura (Figuras 23H e 23I).

FIGURA 23. Análise de microtomografia da região cortical das tíbias esquerda dos animais de todos os grupos experimentais (E-J). Imagem representativa grupo SHAM-SED (A), Imagem representativa grupo OVX-SED (B), Imagem representativa grupo SHAM-TR (C), Imagem representativa grupo OVX-TR (D).

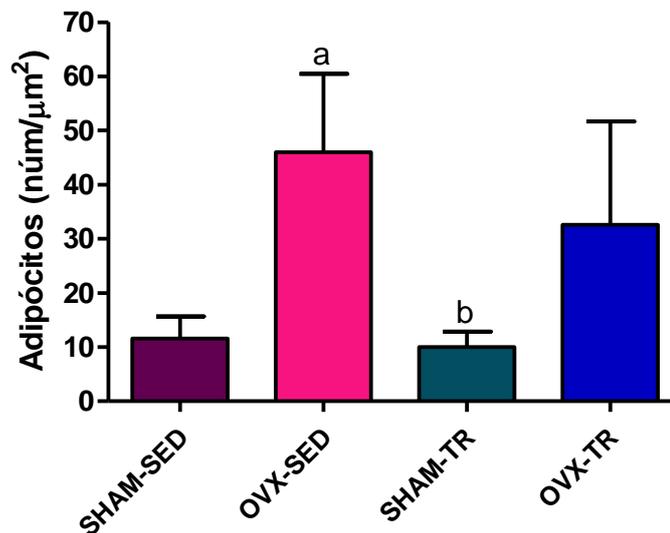


Sham sedentários (SHAM-SED), Ovariectomizados sedentários (OVX-SED), Sham treinamento resistido (SHAM-TR), Ovariectomizados treinamento resistido (OVX-TR), Fração de volume ósseo (BV/TV), Fração de área cortical (Ct.Ar/Tt.Ar), Espessura cortical (Ct.Th), Área de medula óssea (Ma.Ar). Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média. a vs. SHAM-SED; b vs. OVX-SED; c vs. SHAM-TR, $p < 0,05$.

4.10 Contagem adipócitos (Fêmur direito)

O número de adipócitos contados foi maior no grupo OVX-SED em relação ao grupo SHAM-SED. O treinamento resistido apresentou uma tendência à redução no número de adipócitos, porém as diferenças não foram significativas quando comparados os grupos OVX-SED e OVX-TR (Figura 24).

FIGURA 24. Número de adipócitos em uma área de interesse igual para todos os animais de todos os grupos experimentais nos fêmures direitos.



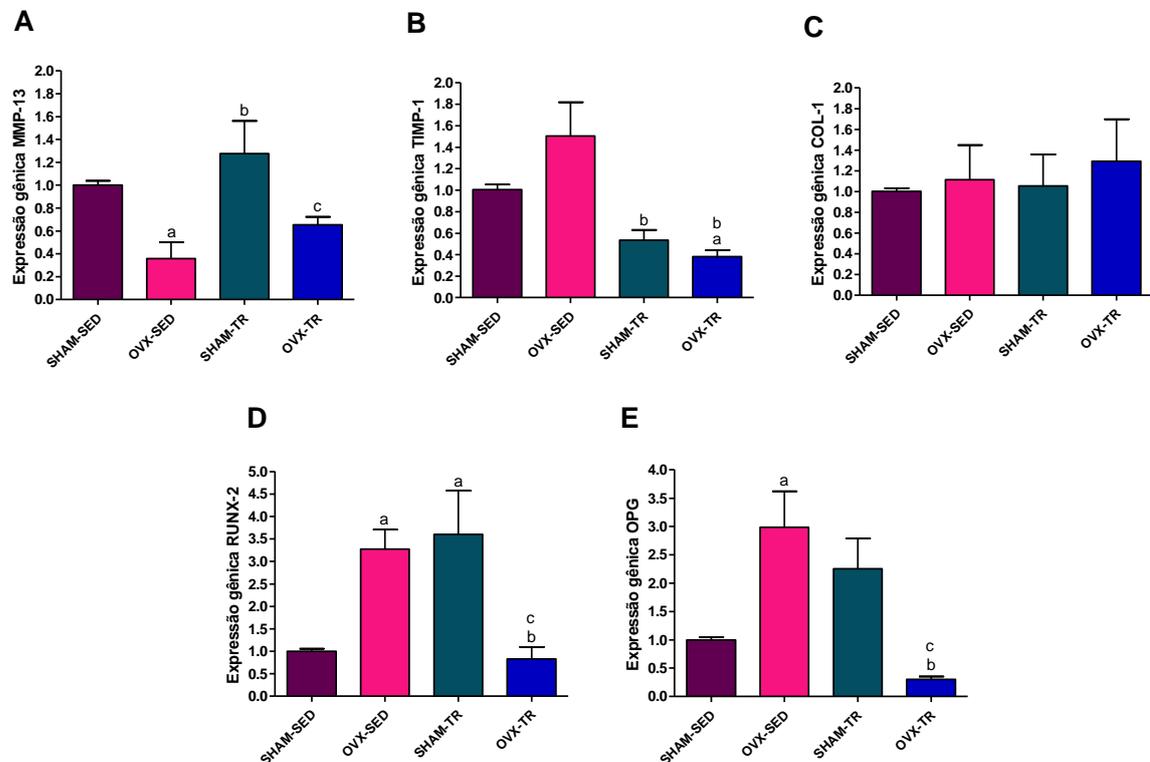
Sham sedentários (SHAM-SED), Ovariectomizados sedentários (OVX-SED), Sham treinamento resistido (SHAM-TR), Ovariectomizados treinamento resistido (OVX-TR). Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média. a vs. SHAM-SED; b vs. OVX-SED; c vs. SHAM-TR, $p < 0,05$.

4.11 Análises gênicas (Fêmur esquerdo)

Na figura 25 estão apresentados os resultados para expressão gênica. A expressão da MMP-13 diminuiu significativamente no grupo OVX-SED comparado ao grupo SHAM-SED e o treinamento resistido não foi capaz de mudar de forma significativa a expressão deste gene (Figura 25A). Já para TIMP-1, inibidor da proteína

MMP-13, o treinamento induziu a redução na expressão deste gene para ambos o grupo OVX-TR quando comparado a OVX-SED, tornando sua expressão semelhante ao do grupo SHAM-TR (Figura 25B). O gene para a proteína colágeno não apresentou mudanças significativas em sua expressão (Figura 25C). O grupo OVX-SED apresentou aumento na expressão do gene para RUNX-2 quando comparado ao grupo SHAM-SED. Interessantemente houve aumento na expressão de RUNX-2 para o grupo SHAM-TR comparado ao seu controle SHAM-SED, oposto do que ocorreu com o outro grupo treinado OVX-TR que diminuiu a expressão para este gene comparado ao seu controle sedentário, OVX-SED, ficando a expressão semelhante à do grupo SHAM-SED (Figura 25D). De forma semelhante o grupo OVX-SED apresentou aumento na expressão do gene para OPG quando comparado ao grupo SHAM-SED e o grupo OVX-TR diminuiu a expressão para este gene comparado ao seu controle OVX-SED, ficando a expressão semelhante à do grupo SHAM-SED (Figura 25E).

FIGURA 25. Análise da expressão gênica de MMP-13 (A), TIMP-1 (B), COL-1 (C), RUNX-2 (D) e OPG (E) nos fêmures esquerdos de todos os animais de todos os grupos experimentais.

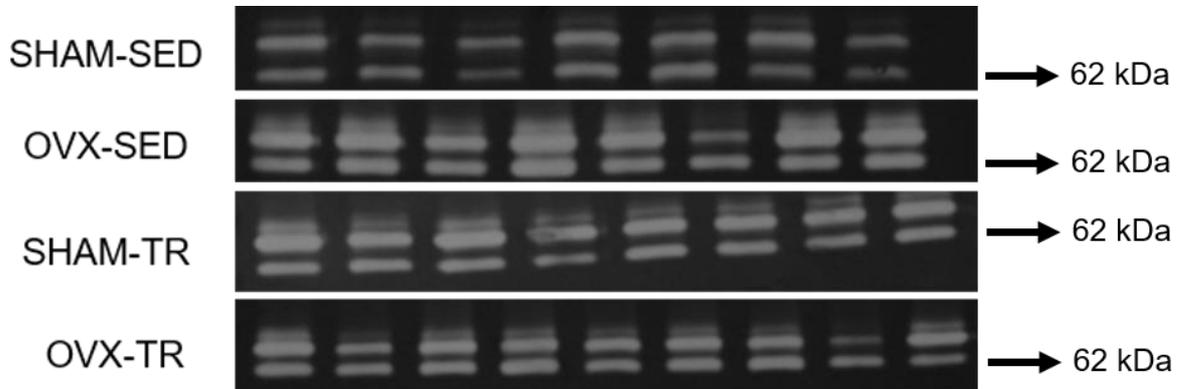


Sham sedentários (SHAM-SED), Ovariectomizados sedentários (OVX-SED), Sham treinamento resistido (SHAM-TR), Ovariectomizados treinamento resistido (OVX-TR). Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média. a vs. SHAM-SED; b vs. OVX-SED; c vs. SHAM-TR, $p < 0,05$.

4.12 Análise de zimografia em gelatina (Fêmur esquerdo)

A figura 26 traz as imagens representativas dos géis de zimografia para atividade proteolítica da MMP-2 no fêmur esquerdo, região do grande trocânter, dos animais dos diferentes grupos experimentais.

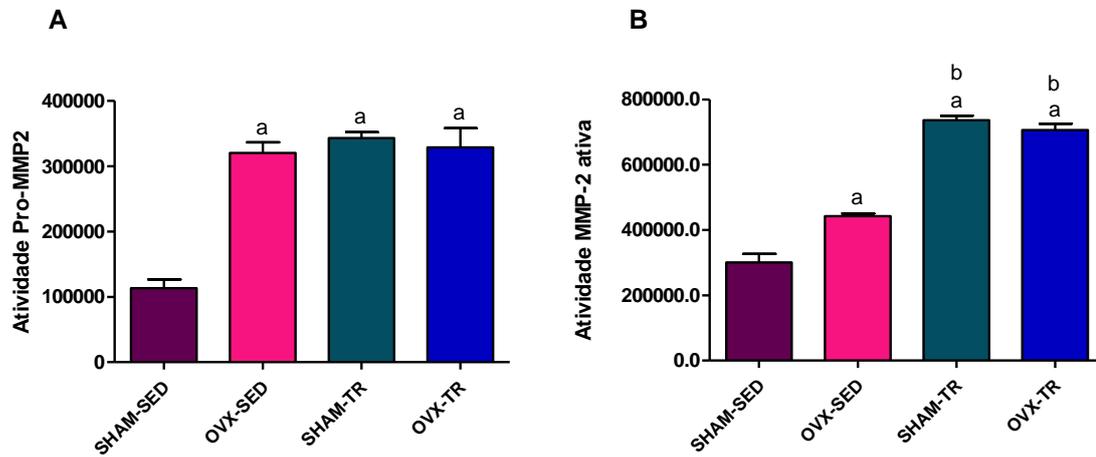
FIGURA 26. Imagem representativa dos géis de zimografia em gelatina para a atividade proteolítica do fêmur esquerdo (região do grande trocânter) para todos os animais de todos os grupos experimentais. Cada poço representa um animal do grupo.



Sham sedentários (SHAM-SED), Ovariectomizados sedentários (OVX-SED), Sham treinamento resistido (SHAM-TR), Ovariectomizados treinamento resistido (OVX-TR).

A ovariectomia promoveu aumento tanto da forma pró quanto da forma ativa da MMP-2 no grupo OVX-SED quando comparado ao grupo SHAM-SED. O treinamento também promoveu um aumento tanto da forma pró quanto ativa da MMP-2 nos grupos SHAM-TR e OVX-TR quando comparados ao controle SHAM-TR. Entretanto a atividade da pró MMP-2 se manteve inalterada entre os grupos OVX-SED, SHAM-TR e OVX-TR enquanto que a atividade da MMP-2 ativa foi maior nos grupos treinados SHAM-TR e OVX-TR quando comparada ao grupo OVX-SED (Figura 27).

FIGURA 27. Valores de densitometria da zimografia em gelatina para a atividade proteolítica dos fêmures esquerdos (região do grande trocânter) para todos os animais de todos os grupos experimentais. Atividade da Pro-MMP-2 (A), Atividade da MMP-2 ativa (B).



Sham sedentários (SHAM-SED), Ovariectomizados sedentários (OVX-SED), Sham treinamento resistido (SHAM-TR), Ovariectomizados treinamento resistido (OVX-TR). Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média. a vs. SHAM-SED; b vs. OVX-SED; c vs. SHAM-TR, $p < 0,05$.

5. DISCUSSÃO

A deficiência de estrogênio, dentre outros fatores, está associada com acúmulo de gordura e aumento do peso corporal (JUNG et al., 2014; KIDO et al., 2014). Neste estudo, os animais iniciaram o período experimental com pesos corporais semelhantes e, de fato, foi observado aumento do peso corporal nos animais do grupo OVX-SED comparados aos animais do grupo SHAM-SED até o período pré treino, o que foi mantido até o término do período experimental.

O acúmulo de gordura tem sido associado com efeitos benéficos para os ossos como aumento de massa óssea e redução no risco de osteoporose (CAO, 2011; COLAIANNI et al., 2014), dado que o aumento no peso corporal aumenta a carga mecânica, além de estar associado ao aumento de hormônios anabólicos (ROSEN; BOUXSEIN, 2006).

Inicialmente, para comprovar se houve prejuízo ósseo devido à queda dos hormônios ovarianos e verificar as ações do treinamento resistido, foram realizadas as análises biométricas e de densitometria. Os animais do grupo OVX-SED, apesar do maior peso corporal, apresentaram menor DMO e CMO que os demais grupos, indicando que o aumento do peso corporal dos animais do grupo OVX-SED por si não foi um fator benéfico para os ossos das ratas deste grupo. De fato já está bem documentada a queda na DMO em modelos de OVX (JU et al., 2015; LUO et al., 2014).

As análises biométricas não apresentaram diferenças entre os grupos, indicando que os animais tiveram o mesmo padrão de desenvolvimento e, portanto, as diferenças encontradas nas análises de densitometria estão realmente relacionadas ao conteúdo ósseo e não foram devido a diferenças de comprimento ou volume ósseo.

Apesar do aumento no peso estar relacionado com aumento na DMO, o local de acúmulo, tipo e quantidade de gordura pode influenciar neste possível benefício uma vez que afeta o remodelamento ósseo (DE PAULA; ROSEN, 2013). Dentro dessa perspectiva, o aumento de gordura abdominal está negativamente relacionado com a massa óssea (ZHAO et al., 2008). Além disso, o aumento de deposição de gordura estimula a liberação de citocinas pró-inflamatórias que, em altas

concentrações atuam como mediadores primários de osteopenia e osteoporose (ABUNA et al., 2016; CAO, 2011).

Estudos prévios do nosso grupo com as mesmas ratas que foram utilizadas para este trabalho reportaram um aumento no tamanho dos adipócitos principalmente do tecido adiposo intra-abdominal e aumento na expressão de genes lipogênicos (STOTZER et al., 2015). O quadro de acúmulo de gordura instalado nestas ratas podem estar relacionado à diminuição da DMO e CMO encontrados no grupo OVX-SED quando comparado ao grupo SHAM-SED. Shigemoto et al. (2012) em um estudo com modelo de ovariectomia e treinamento resistido também observaram que o aumento no peso corporal não foi protetivo para os ossos no grupo ovariectomizado.

Neste estudo o treinamento resistido evitou o aumento acentuado no peso corporal nos animais do grupo OVX-TR, uma vez que, imediatamente antes do treinamento os grupos OVX-SED e OVX-TR apresentavam pesos corporais semelhantes e, ao final do período de treinamento, os animais do grupo OVX-TR exibiam peso corporal menor quando comparados aos animais do grupo OVX-SED, corroborando os resultados encontrados por Shigemoto et al. (2012). Stotzer et al. (2015) observaram também que o treinamento resistido propiciou a redução do tamanho dos adipócitos intra-abdominais e a diminuição na expressão de genes lipogênicos, o que pode ter contribuído para o menor peso corporal dos animais OVX-TR.

Ao final do período experimental, o peso corporal dos animais OVX-TR era menor que o dos animais OVX-SED, porém se manteve maior que o dos animais do grupo SHAM-TR. Embora o aumento do peso corporal não ter sido protetivo para os ossos no grupo OVX-SED, quando associado ao treinamento resistido, pode ter contribuído para o aumento na DMO e CMO apresentados pelo grupo OVX-TR comparado ao grupo OVX-SED, uma vez que estes animais, ao treinar, estão impondo aos ossos não somente o impacto da carga carregada, mas também do próprio peso. Ainda que a carga de carregamento tenha sido menor para o grupo OVX-TR em relação ao grupo SHAM-TR, sabe-se que a sobrecarga imposta pelo próprio peso promove estresse mecânico, ao qual o sistema ósseo responde positivamente com aumento na massa óssea (KLEIN-NULEND; BACABAC; BAKKER, 2012a).

A qualidade óssea, por sua vez, não está relacionada somente à massa óssea, ou seja, a quantidade, mas se estende à análise de múltiplas escalas em uma

organização hierárquica do osso que compreende desde a geometria óssea até a microarquitetura incluindo a composição e estrutura da MEC óssea (CARVALHO et al., 2012; NYMAN; MAKOWSKI, 2012). A resistência óssea está relacionada tanto à quantidade, quanto à qualidade óssea. Consequentemente, as análises densitométricas não são suficientes para quantificar a resistência óssea (GUEDE et al., 2013).

Com o intuito de verificar possíveis alterações na resistência óssea devido os resultados encontrados, a próxima etapa foi composta pelas análises biomecânicas que comprovaram o comprometimento ósseo no grupo OVX-SED, uma vez que houve diminuição na rigidez e carga máxima suportada por estes animais comparados aos do grupo SHAM-SED corroborando os resultados de Luo et al. (2014) e Shiguemoto et al. (2012). Entretanto, a carga de fratura não sofreu mudanças estatisticamente significantes no grupo OVX-SED comparado ao SHAM-SED. Segundo Nyman et al. (2012), a composição da MEC pode contribuir para a resistência à fratura dissipando a energia adquirida através da geração de microdanos. Ou seja, apesar de não haver diferenças entre os grupos OVX-SED e SHAM-SED com relação à carga de fratura, isso não significa que não há alterações em outra magnitude, como microfraturas, uma vez que a carga máxima estava diminuída no grupo ovariectomizado.

A literatura reporta que o exercício pode prevenir a perda óssea induzida pela ovariectomia promovendo o aumento na taxa de turnover ósseo (BAGI et al., 1997; LI et al., 2014; WINTERS-STONE et al., 2013). Os resultados demonstraram que o treinamento resistido promoveu o restabelecimento da DMO e CMO, o que foi refletido nos resultados do teste biomecânico onde houve aumento da rigidez do osso, da carga máxima e da carga de fratura no grupo OVX-TR. Uma vez que o tempo de recuperação do procedimento de ovariectomia foi suficiente para que algumas alterações relacionadas à queda nos níveis de estrogênio fossem estabelecidas (WEI et al., 2015), o treinamento resistido não apenas preveniu, mas possivelmente reverteu a perda de massa óssea, indicando efeitos profiláticos e de tratamento.

Um dado interessante das análises biomecânicas foi o aumento da resiliência óssea no grupo OVX-TR comparado ao OVX-SED e o discreto aumento em relação ao SHAM-TR embora não diferente estatisticamente. A resiliência corresponde à capacidade do osso em absorver energia sem que tenha danos permanentes (ZHANG et al., 2013). Este resultado possivelmente tem relação com o

maior impacto ósseo que este grupo sofreu durante o exercício como discutido anteriormente. Resultado semelhante ocorreu para a carga de fratura, o que demonstra os efeitos no treinamento resistido no remodelamento ósseo, contribuindo no aumento da resistência à fratura.

Por outro lado, a tenacidade foi maior no grupo SHAM-TR, o que demonstra que apesar da maior carga de fratura dos animais OVX-TR, a qualidade óssea dos SHAM-TR provavelmente estava melhor, uma vez que tenacidade é a quantidade de energia capaz de ser absorvida antes da fratura. Isso se deve porque a tenacidade está relacionada às fibrilas de colágeno mineralizadas, que são capazes de tolerar microdanos sem causar danos macroscópicos aos ossos (RITCHIE; BUEHLER; HANSMA, 2009).

Sabe-se que a variação do tamanho e forma da deposição mineral na região de sobreposição às fibras de colágeno controla os mecanismos de deformação (NAIR et al., 2013), em outras palavras somente o aumento na quantidade mineral pode não ser suficiente para melhorar totalmente a qualidade óssea. De qualquer forma, os resultados encontrados apresentaram grandes benefícios no quesito resistência óssea aos animais ovariectomizados que treinaram, indicando que esta pode ser uma boa opção terapêutica para tratamento da osteoporose pós menopausa, uma vez que apesar da ausência do hormônio ovariano causar uma série de desarranjos metabólicos, os ossos responderam de maneira positiva ao treinamento resistido.

Estes primeiros resultados avaliaram a composição e resistência óssea na ausência de estrogênio e após o treinamento de resistência em uma escala macroscópica. Todavia, a composição estrutural óssea é afetada por diversos fatores como idade, sexo e funções fisiológicas, sendo que o arranjo e a composição das fibras, ou seja, as características ósseas de menor escala, influenciam nas propriedades biomecânicas (RITCHIE; BUEHLER; HANSMA, 2009). Diante disso, na sequência foram investigadas as alterações na composição óssea, por meio das análises biofísicas e bioquímicas.

O grupo OVX-SED apresentou menor densidade óssea, o que provavelmente ocorreu devido às mudanças na composição óssea já que os ossos tinham comprimento e volume semelhantes entre os grupos. Esta proposição foi comprovada com os resultados da densidade mineral, porcentagem de material mineral e quantidade de cálcio, que estavam diminuídos no grupo OVX-SED

comparado ao grupo SHAM-SED. Observou-se ainda aumento na porcentagem de água no grupo ovariectomizado sedentário.

Enquanto o colágeno assim como a mineralização contribuem com a microestrutura e estão relacionados à resistência aos microdanos, a interação com a água afeta as propriedades mecânicas ósseas. O aumento na porcentagem de água está relacionado à diminuição na mineralização óssea (NYMAN et al., 2006), o que de fato ocorreu no grupo OVX-SED.

O treinamento resistido se mostrou eficaz em contrabalancear os efeitos negativos causados pela queda dos hormônios ovarianos na composição óssea. Realmente estão bem estabelecidos os efeitos positivos promovidos pelo exercício sobre o metabolismo do tecido ósseo, inclusive em grupos com alterações metabólicas como queda nos hormônios ovarianos (AHN; KIM, 2016; SHIGUEMOTO et al., 2012).

A resistência óssea advem da interação da composição mineral, que confere força e rigidez e da fase orgânica, composta primariamente por colágeno do tipo I, principal proteína componente da MEC óssea que confere tenacidade e torna o osso mais resiliente (BENJAMIN, 2010; VASHISHTH, 2007). A ausência ou queda do estrogênio pode promover modificações no metabolismo ósseo em outras escalas, como alteração na composição da MEC óssea (SHIGUEMOTO et al., 2012) ou possivelmente na qualidade da mineralização óssea como já descrito. Além disso, a quantidade de colágeno e o tipo de cross-link pode afetar as propriedades mecânicas ósseas (SAITO; MARUMO, 2010).

Com relação à porcentagem de material orgânico não houve diferença entre os grupos OVX-SED e SHAM-SED, porém o grupo OVX-TR apresentou aumento no conteúdo de material orgânico, o que pode ter contribuído para o aumento na resiliência observado neste grupo. Apesar dos resultados não apresentarem diferenças na porcentagem de material orgânico para o grupo OVX-SED, alterações na estrutura do colágeno somadas à diminuição da quantidade de material mineral provavelmente influenciaram na resistência óssea neste grupo.

Uma vez que a resistência óssea não está relacionada somente à sua composição mineral, as análises de densitometria, apesar de amplamente utilizadas, podem não ser suficientes para determinar as propriedades biomecânicas ósseas (GUEDE et al., 2013) e, conseqüentemente, não equivaleria a um bom diagnóstico de fragilidade óssea. Além disso, dados estruturais não podem ser adquiridos com as

análises de densitometria pois estas são imagens 2D, o que pode prejudicar o diagnóstico precoce (JIANG et al., 2000). Ademais, devido a deposição de gordura e dificuldade no posicionamento, erros de diagnóstico são comuns em indivíduos obesos, nos quais a DMO é elevada segundo a densitometria, porém o diagnóstico é falsamente camuflado pela grande quantidade de gordura na medula óssea (ROSEN; BOUXSEIN, 2006). Nestes casos, a micro-CT oferece um diagnóstico mais apurado das reais alterações ósseas.

A fim de investigar como as alterações ósseas observadas tanto no grupo OVX-SED e, principalmente no grupo OVX-TR influenciaram na morfologia óssea e a fim de verificar se o treinamento resistido surtiu real efeito em termos de estrutura foram feitas as análises de micro-CT e de investigação da morfologia óssea através da histologia.

Como as análises de micro-CT seriam conduzidas em duas vertentes de análise, trabecular e cortical, a densitometria foi realizada novamente, desta vez separando-se as regiões para avaliação. Como esperado, os resultados para parte trabecular óssea foram semelhantes à primeira análise realizada, havendo queda na DMO e CMO para o grupo OVX-SED e restabelecimento, ainda que não total, destes componentes no grupo OVX-T. Porém, para a região de diáfise cortical, não foram encontradas alterações.

Foi encontrada uma forte ligação entre os resultados obtidos com os testes biofísicos e as alterações morfológicas encontradas na análise de micro-CT, para a região trabecular que ficou extremamente prejudicada no grupo OVX-SED comparado ao SHAM-SED, resultados que corroboram os encontrados por Jiang et al. (2000). As análises, porém, demonstraram que os maiores prejuízos foram com relação à conectividade, número de trabéculas e formato das trabéculas e não com relação à espessura trabecular. Foi observado ainda que o volume ósseo diminuiu corroborando os resultados encontrados nas análises de densitometria.

Poucos são os trabalhos que fazem este tipo de análise em grupos submetidos ao treinamento, seja ele resistido ou não, mas não em animais submetidos à ovariectomia e ao treinamento resistido ao mesmo tempo. Tang et al. (2011) encontraram melhora na microarquitetura femural após treinamento com suporte de peso. Resultados semelhantes foram obtidos para os grupos SHAM-TR, que apresentaram melhorias em praticamente todos os parâmetros trabeculares

analisados comparados ao grupo SHAM-SED, indicando que o treinamento resistido promove benefícios para o tecido ósseo.

No grupo OVX-TR as principais melhorias observadas foram em relação à separação trabecular que foi menor neste grupo comparado ao OVX-SED. Para os outros parâmetros analisados, volume ósseo, conectividade e número de trabéculas foram observados benefícios, porém discretos e não diferentes estatisticamente do grupo OVX-SED. Outro resultado interessante foi com relação ao aumento na espessura trabecular no grupo OVX-TR comparado aos demais grupos. Meakin et al. (2015), em um estudo com camundongos fêmeas idosas e submetidas ao treinamento de esteira e com aplicação de força mecânica em uma das patas, observaram mudanças semelhantes que corroboram os resultados deste estudo, comprovando a eficiência do treinamento. Já Tang et al. (2016) encontraram resultados benéficos do treinamento resistido em escada para a microarquitetura óssea em ratos obesos.

Os resultados para micro-CT da região cortical não apresentaram diferenças significativas entre os grupos OVX-SED e SHAM-SED, porém pode-se observar discreta diminuição na espessura cortical no grupo OVX-SED e aumento da porosidade, ainda que não estatisticamente significante. Por outro lado, grandes mudanças ocorreram para o grupo OVX-TR como aumento no volume ósseo, diminuição da porosidade, aumento na espessura e diminuição da área de medula, mudanças que não estavam presentes nas análises de densitometria, o que leva ao questionamento da qualidade desta análise para diagnóstico clínico. Realmente a imposição de carga aumenta a área cortical óssea como resultado do aumento de formação óssea periosteal (MANOLAGAS; O'BRIEN; ALMEIDA, 2013).

A medula óssea é um microambiente complexo composto por diversos tipos celulares que juntos, secretam MEC especializada (DE PAULA; ROSEN, 2013). O acúmulo de tecido adiposo medular tem sido associado com doenças como diabetes tipo 1 e osteoporose, entretanto seu papel está começando a ser definido na comunidade científica (SUCHACKI; CAWTHORN; ROSEN, 2016).

Sabe-se que os adipócitos da medula óssea atuam de maneira parácrina com a produção de citocinas, adipocinas, esteroides e ácidos graxos livres que poderiam influenciar em processos osteogênicos. Além disso, o balanço entre número e qualidade dos adipócitos presentes está relacionado com a função óssea (PINO et al., 2016). As análises histológicas de contagem de adipócitos corroboraram o que já está relatado na literatura, havendo aumento no número de adipócitos nos animais do

grupo OVX-SED. O número de adipócitos foi semelhante nos grupos SHAM-SED e SHAM-TR, porém houve uma discreta diminuição, ainda que não significativa, no número de adipócitos do grupo OVX-TR, indicando que o treinamento pode estar provocando alguma influência de maneira a alterar o quadro encontrado para os animais OVX-SED.

Diante dos resultados apresentados houve o questionamento acerca de possíveis alterações na MEC óssea, aprofundando mais as investigações sobre a qualidade óssea. Para isso foram realizadas análises de expressão de genes para proteínas envolvidas no remodelamento da matriz óssea, além da zimografia em gelatina para investigar a atividade de outra proteína de remodelamento de MEC óssea, a MMP-2. Os resultados demonstraram um forte link entre os parâmetros biofísicos e biomecânicos e os genes analisados.

As MMPs compreendem uma família de endopeptidases zinco dependentes que participam ativamente do remodelamento da MEC óssea, mas somente poucas delas, como MMP-13 e MMP-2 são enzimas responsáveis pela degradação de colágeno (MARQUETI et al., 2008; TANG et al., 2013). As MMPs estão presentes em níveis baixos em condições fisiológicas, usualmente em sua forma inativa (MARQUETI et al., 2008), entretanto quando excessivamente ativadas podem ser danosas para o osso.

Os resultados para expressão gênica apresentaram uma queda na expressão da MMP-13 no grupo OVX-SED e uma tendência de aumento na expressão no grupo OVX-TR em relação ao grupo OVX-SED deixando a expressão neste grupo semelhante à do grupo controle SHAM-SED embora ainda mais baixa que do grupo SHAM-TR.

A MMP-13 é uma colagenase produzida pelos osteoblastos e é essencial para a qualidade óssea. A ausência de MMP-13 compromete a resistência óssea à fratura (RIFAS; ARACKAL, 2003; TANG et al., 2013), entretanto a superexpressão de MMP-13 tem sido relatada em ratas ovariectomizadas, tanto nos condrócitos (LUO et al., 2014) como em osteoblastos (LI et al., 2004), sendo positivamente correlacionadas aos prejuízos morfológicos ósseos encontrados neste último estudo.

Por outro lado, Jemtland et al. (2011) em um trabalho de identificação de possíveis genes candidatos para osteoporose demonstraram que a expressão de genes relacionados à proteínas de matriz, tais como MMP-13 e fosfoglicoproteína de matriz extracelular (MEPE) estava reduzida nas amostras advindas de pessoas com

osteoporose comparados ao grupo controle. Apesar de os resultados ainda serem contraditórios, o trabalho de Li et al. (2004) não descreve o tempo de recuperação pós cirúrgico ao qual os animais foram submetidos, o que pode ter influenciado na avaliação da MMP-13.

Com relação ao treinamento, Wang e Yang (2009) encontraram um decréscimo na expressão de MMP-13 devido frente a forças mecânicas em modelos de artrite reumatóide. Outro estudo mostrou que a privação de força em tendões de ratos levou ao aumento na expressão de MMP-13 e sugere que o exercício pode ser benéfico no tratamento da tendinopatia (GARDNER et al., 2008).

Poucos estudos têm relatado o papel do exercício ou força mecânica no remodelamento da MEC óssea pelas MMPs em ratas ovariectomizadas e até o momento não foi encontrado nenhum estudo que relatasse alterações na expressão da MMP-13 proteína em grupos ovariectomizados que realizaram treinamento de resistência, sendo este possivelmente o primeiro trabalho a descrever estas alterações.

A proteína TIMP-1 é um inibidor de metaloproteinases e o aumento em sua alta taxa de expressão tem sido relacionado à um papel protetor contra a reabsorção óssea devido à deficiência de estrogênio (SCHILTZ et al., 2008). Os resultados obtidos neste trabalho foram coerentes com o papel desempenhado pela TIMP-1, ou seja, nos grupos SHAM-TR e OVX-TR em que houve aumento na expressão de MMP-13 houve também a queda na expressão de TIMP-1 e já no grupo OVX-SED em que houve diminuição na expressão da MMP-13, foi observado aumento na expressão da TIMP-1 ainda que as diferenças não sejam significativas com relação ao grupo SHAM-SED.

Gardner et al. (2008) apresentaram em seus resultados um aumento na taxa TIMP-1/MMP-13 em tendões de ratos expostos a cargas cíclicas, sugerindo que o exercício seria benéfico no tratamento de tendinopatia. Da mesma forma, Kim e Li (2016) observaram após o exercício, que o aumento na expressão de TIMP-1 ocorre de maneira a equilibrar a expressão de metaloproteinases que degradam os músculos. Entretanto, não foram encontrados estudos em modelo de ovariectomia e treinamento resistido. Porém, diante do relatado na literatura, os resultados deste estudo permitem inferir que o treinamento resistido atuou na expressão de TIMP-1 de maneira a buscar um equilíbrio, ou seja, reverter o desbalanço na taxa TIMP-1/MMP-13 observado no grupo OVX-SED.

A expressão de COL-1 não apresentou diferenças significativas entre os grupos apesar da porcentagem de material orgânico ter sido maior no grupo OVX-TR. Esta incoerência pode ter sido ocasionada pelo fato de que a transcrição gênica e a tradução em proteínas possuem uma separação temporal.

O RUNX-2 é um fator de transcrição relacionado à diferenciação osteoblastogênica e osteogênese (KIDO et al., 2014; ROSEN; BOUXSEIN, 2006). Além disso, durante a diferenciação das células ósseas, RUNX-2 regula a expressão de muitos genes relacionados a proteínas de MEC (KIDO et al., 2014). Diante disso, a diminuição na expressão de MMP-13 pode estar relacionada ao aumento na expressão de RUNX-2, uma vez que o oposto ocorre, ou seja, a superexpressão de MMP-13 está relacionada à quedas na expressão de RUNX-2 (HAYAMI; KAPILA; KAPILA, 2011). Estes resultados podem mostrar uma tentativa do organismo de retomar o equilíbrio perdido na ausência dos hormônios ovarianos, ainda que sem sucesso como comprovado nos demais resultados.

Com relação ao grupo SHAM-TR observou-se um aumento na expressão de RUNX-2, resultado já esperado, uma vez que o treinamento está relacionado ao aumento de turnover ósseo (YUAN et al., 2015). De fato Gharibi et al. (2013) observaram aumento na expressão de RUNX-2 após a aplicação de forças de compressão em células tronco mesenquimais humanas, sugerindo que as forças mecânicas ativam genes relacionados à proliferação e diferenciação de osteoblastos.

No grupo OVX-TR de maneira contraditória, não se observou mudanças na expressão de RUNX-2. Isso pode ter ocorrido pois o treinamento neste grupo possivelmente apenas regularizou a expressão de RUNX-2, tornando-a semelhante ao do grupo controle SHAM-SED e as melhoras ósseas observadas neste grupo podem ter advindo não do maior número de células osteoblastogênicas, mas sim da ativação da produção óssea pelos osteócitos já existentes através do estímulo dos mecanorreceptores presentes nestas células (KLEIN-NULEND; BACABAC; BAKKER, 2012b).

A ligação de RANKL, indutor de diferenciação para osteoclastos, a seu receptor RANK, é bloqueada pelo OPG, sendo este, portanto, considerado um inibidor da reabsorção óssea (THEOLEYRE et al., 2004). Os resultados obtidos para expressão de OPG seguiram o mesmo padrão que para RUNX-2. O OPG regula a expressão de TIMP-1, aumentando-a quando este é expresso (THEOLEYRE et al., 2004). Este resultado realmente foi observado para o grupo OVX-SED, fazendo parte

da possível tentativa de adaptação à queda na massa óssea observada nestes animais.

Já para o grupo OVX-TR a resposta pode ter sido somente adaptativa, como ocorreu com RUNX-2, tornando as taxas de expressão de OPG semelhantes às do SHAM-SED, uma vez que possivelmente a ativação óssea ocorreu por outra via como já discutido. O único trabalho foi encontrado avaliando a expressão de RUNX-2 e OPG em modelo de ovariectomia e exercício mostrou aumento na expressão de OPG e diminuição na expressão de RUNX-2 nos ossos de ratas ovariectomizadas após o treinamento em esteira (WANG; YANG; WANG, 2013), porém o fato do tipo de treinamento ter sido diferente pode influenciar na comparação dos resultados. Desta forma, mais trabalhos nesta linha são necessários para confirmar as ações do treinamento na expressão destes genes.

A MMP-2 desempenha papel importante na preservação da massa óssea e a queda em sua atividade está relacionada à perturbação da estrutura do colágeno (SHIGUEMOTO et al., 2012). Foi observado que o treinamento promoveu o aumento na atividade da MMP-2 em tendões de ratos no estudo de Marqueti et al. (2008). Entretanto, Shiguetomoto et al. (2012) foram os primeiros a descrever a relação entre o treinamento resistido, os parâmetros biomecânicos e biofísicos e a atividade da MMP-2 nos ossos de ratas ovariectomizadas. Eles relataram um aumento na atividade da MMP-2 nos ossos dos animais dos grupos treinados e melhoras nos parâmetros biomecânicos, indicando que o treinamento resistido tem um papel modulador na atividade da MMP-2, que estava drasticamente reduzida no grupo ovariectomizado sedentário.

Os resultados deste trabalho mostraram aumento na atividade da MMP-2 no grupo OVX-SED comparado ao grupo SHAM-SED. Este resultado contraditório pode estar relacionado ao tempo de recuperação da cirurgia ao qual os animais foram expostos, indicando que na ausência dos hormônios ovarianos houve uma tentativa de adaptação, mesmo que sem sucesso, como demonstrada nos resultados biofísicos, biomecânicos e morfológicos.

Não obstante, o treinamento resistido induziu a atividade da forma ativa da MMP-2 no grupo OVX-TR, corroborando os resultados obtidos por Shiguetomoto et al. (2012) e demonstrando que, mesmo com os efeitos deletérios instalados, o treinamento resistido foi eficiente na reversão deste quadro.

Diferente de outros trabalhos, este estudo teve como objetivo investigar as alterações promovidas pela queda nos níveis de estrogênio e as ações de remodelamento do treinamento resistido não somente relacionado à massa óssea, mas nos diversos níveis hierárquicos de organização óssea, indo do macro à microestrutura. Uma vez que não apenas o conteúdo mineral ósseo, mas também a integridade da MEC óssea contribui para a resistência do osso à fratura pois previne a propagação de microdanos (NYMAN; MAKOWSKI, 2012), investigar as ações do treinamento resistido também neste nível é de vital importância na compreensão da modulação que o treinamento exerce sobre os ossos tanto de grupos saudáveis como quando instaurada a patologia da osteoporose evidenciando a importância deste trabalho e reforçando a indicação do treinamento resistido como tratamento não farmacológico eficaz para a osteoporose pós menopa.

6. CONCLUSÃO

A osteoporose advinda da queda dos hormônios ovarianos afeta não somente a massa óssea, mas também fatores envolvidos no remodelamento da MEC óssea e o treinamento resistido se mostrou eficaz em prevenir ou reverter tais efeitos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUNA, R. P. F. et al. Participation of TNF- α in Inhibitory Effects of Adipocytes on Osteoblast Differentiation. **Journal of cellular physiology**, v. 231, n. 1, p. 204–14, jan. 2016.

AHN, N.; KIM, K. Effects of 12-week exercise training on osteocalcin, high-sensitivity C-reactive protein concentrations, and insulin resistance in elderly females with osteoporosis. **Journal of physical therapy science**, v. 28, n. 8, p. 2227–31, ago. 2016.

ALMEIDA, M. et al. Estrogens and Androgens in Skeletal Physiology and Pathophysiology. **Physiological Reviews**, v. 97, n. 1, p. 135–187, 2017.

BAGI, C. M. et al. 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, p. 336–344, 1997.

BARONDESS, D. A. et al. Radiographic measurements, bone mineral density, and the Singh Index in the proximal femur of white and black postmenopausal women. **Disease-a-month : DM**, v. 48, n. 10, p. 637–46, out. 2002.

BARTHELEMI, S. et al. Mechanical forces-induced human osteoblasts differentiation involves MMP-2/MMP-13/MT1-MMP proteolytic cascade. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 113, n. 3, p. 760–772, 2012.

BENJAMIN, R. M. Bone health: preventing osteoporosis. **Public health reports (Washington, D.C. : 1974)**, v. 125, n. 3, p. 368–70, jan. 2010.

BERNE, R. M., LEVY, M. N., KOEPPEN, B. M. & STANTON, B. A. (2004). *Fisiologia*, 5ª ed., Ed Elsevier, Rio de Janeiro, RJ. ISBN-10:8535213678.

BILEZIKIAN, J. P. , RAISZ, L. G. AND MARTIN, T. J. Principles of Bone Biology. v. 1,2, n. 978-0-12-373884–4, 2008.

BOSKEY, A.; ROBEY, P. G. The composition of bone. **Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism**, p. 49–58, 2013.

CAO, J. J. Effects of obesity on bone metabolism. **Journal of orthopaedic surgery and research**, v. 6, n. 1, p. 30, 2011.

CAPUTO, E. L.; COSTA, M. Z. Influência do exercício físico na qualidade de vida de mulheres pós-menopáusicas com osteoporose. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 54, n. 6, p. 467–473, 2014.

CARVALHO, A. A. F. et al. High-sucrose effect on bone structure, hardness and biomechanics in an obesity model using Wistar male rats. **Journal of Morphological Sciences**, v. 29, n. 1, p. 32–37, 2012.

CHEUNG, A. M. et al. Bone strength and management of postmenopausal fracture risk with antiresorptive therapies: considerations for women's health practice. **International Journal of Women's Health**, v. Volume 8, p. 537–547, 2016.

CHEUNG, A. M.; GIANGREGORIO, L. Mechanical stimuli and bone health: what is the evidence? **Current opinion in rheumatology**, v. 24, n. 5, p. 561–6, 2012.

COLAIANNI, G. et al. Osteoporosis and obesity: Role of Wnt pathway in human and murine models. **World journal of orthopedics**, v. 5, n. 3, p. 242–6, 2014.

DALEY, A.; STOKES-LAMPARD, H.; MACARTHUR, C. Exercise for vasomotor menopausal symptoms. **The Cochrane database of systematic reviews**, n. 5, p. CD006108, 2011.

DE PAULA, F. J. A.; ROSEN, C. J. Bone Remodeling and Energy Metabolism: New Perspectives. **Bone research**, v. 1, n. 1, p. 72–84, 2013.

DIAZ BRINTON, R. Minireview: Translational Animal Models of Human Menopause: Challenges and Emerging Opportunities. **Endocrinology**, v. 153, n. 8, p. 3571–3578, 2012.

DOS SANTOS, J. L. et al. Protective effect of a hydroethanolic extract from *Bowdichia virgilioides* on muscular damage and oxidative stress caused by strenuous resistance training in rats. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 11, p. 1–10, 2014.

ELEFTERIOU, F. et al. Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. **Nature**, v. 434, n. 7032, p. 514–520, 2005.

FERRETTI, J. L. et al. Analysis of biomechanical effects on bone and on the muscle-bone interactions in small animal models. **Journal of musculoskeletal & neuronal interactions**, v. 1, n. 2, p. 263–274, 2001.

FYHRIE, S. D. P. Summary - Measuring “ Bone Quality ”. v. 5, n. 4, p. 318–320, 2005.

GARDNER, K. et al. The effect of stress-deprivation and cyclic loading on the TIMP/MMP ratio in tendon cells: an in vitro experimental study. **Disability and rehabilitation**, v. 30, n. 20–22, p. 1523–9, 2008.

GHARIBI, B. et al. Gene expression responses to mechanical stimulation of mesenchymal stem cells seeded on calcium phosphate cement. **Tissue engineering. Part A**, v. 19, n. 21–22, p. 2426–38, nov. 2013.

GIANGREGORIO, L. M. et al. Too Fit to Fracture: Exercise recommendations for individuals with osteoporosis or osteoporotic vertebral fracture. **Osteoporosis International**, v. 25, n. 3, p. 821–835, 2014.

GUEDE, D. et al. Biomechanics and bone (1): Basic concepts. p. 43–50, 2013.

HALL, B. K.; SANSOM, I. J. BOOK REVIEW Bones and cartilage : developmental and evolutionary skeletal biology ,. v. 390, p. 389–390, 2006.

HARRISS, D. J.; ATKINSON, G. Ethical standards in sport and exercise science research: 2014 update-. **International journal of sports medicine**, v. 34, n. 12, p. 1025–8, dez. 2013.

HAYAMI, T.; KAPILA, Y. L.; KAPILA, S. MMP-1 (collagenase-1) and MMP-13 (collagenase-3) differentially regulate markers of osteoblastic differentiation in osteogenic cells. **Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 27, n. 8, p. 682–92, 2008.

HAYAMI, T.; KAPILA, Y. L.; KAPILA, S. Divergent upstream osteogenic events contribute to the differential modulation of MG63 cell osteoblast differentiation by MMP-1 (collagenase-1) and MMP-13 (collagenase-3). **Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 30, n. 4, p. 281–9, maio 2011.

HORCAJADA, M. N. et al. Hesperidin inhibits ovariectomized-induced osteopenia and shows differential effects on bone mass and strength in young and adult intact rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 104, n. 3, p. 648–654, 3 jan. 2008.

HORNBERGER, T. A.; FARRAR, R. P. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. **Canadian journal of applied physiology = Revue canadienne de physiologie appliquée**, v. 29, n. 1, p. 16–31, fev. 2004.

HOROWITZ, M. C.; LORENZO, J. A. The origins of osteoclasts. **Current opinion in rheumatology**, v. 16, n. 4, p. 464–8, jul. 2004.

IBGE :: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/>>. Acesso em 10/11/2016.

INOUE, K. et al. A crucial role for matrix metalloproteinase 2 in osteocytic canalicular formation and bone metabolism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 44, p. 33814–33824, 2006.

JEMTLAND, R. et al. Molecular disease map of bone characterizing the postmenopausal osteoporosis phenotype. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 26, n. 8, p. 1793–1801, 2011.

JIANG, Y. et al. Micro CT and Micro MR imaging of 3D architecture of animal skeleton.

Journal of musculoskeletal & neuronal interactions, v. 1, n. 1, p. 45–51, 2000.

JOHANSSON, N. et al. Collagenase-3 (MMP-13) is expressed by hypertrophic chondrocytes, periosteal cells, and osteoblasts during human fetal bone development.

Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists, v. 208, n. 3, p. 387–97, 1997.

JU, Y.-I. et al. Effect of swimming exercise on three-dimensional trabecular bone microarchitecture in ovariectomized rats. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 119, n. 9, p. 990–7, 1 nov. 2015.

JULL, J. et al. Lifestyle interventions targeting body weight changes during the menopause transition: a systematic review. **Journal of obesity**, v. 2014, p. 1–16, 2014.

JUNG, S. R. et al. Changes of bone metabolism based on the different interventions with exercise type or additional intake material in ovariectomized rats. v. 18, n. 1, p. 111–117, 2014.

KALU, D. N. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. **Bone and mineral**, v. 15, n. 3, p. 175–91, dez. 1991.

KIDO, H. W. et al. Evaluation of the bone healing process in an experimental tibial bone defect model in ovariectomized rats. **Aging clinical and experimental research**, v. 26, n. 5, p. 473–81, out. 2014.

KIM, J.; LEE, J. Matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase responses to muscle damage after eccentric exercise. **Journal of Exercise Rehabilitation**, v. 12, n. 4, p. 260–265, 26 ago. 2016.

KLEIN-NULEND, J.; BACABAC, R. G.; BAKKER, A. D. Mechanical loading and how it affects bone cells: The role of the osteocyte cytoskeleton in maintaining our skeleton. **European Cells and Materials**, v. 24, p. 278–291, 2012a.

KWAN TAT, S. et al. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 15, n. 1, p. 49–60, fev. 2004.

LEEMAN, M. F.; CURRAN, S.; MURRAY, G. I. The Structure , Regulation , and Function of Human Matrix Metalloproteinase-13. v. 37, n. 3, p. 149–166, 2002.

LI, J. et al. Effects of 17 beta-estradiol on the expression of interstitial collagenases-8 and -13 (MMP-8 and MMP-13) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in ovariectomized rat osteoblastic cells. **J Mol Histol**, v. 35, n. 8–9, p. 723–731, 2004.

LI, L. et al. Influence of Exercise on Bone Remodeling-Related Hormones and Cytokines in Ovariectomized Rats: A Model of Postmenopausal Osteoporosis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. 1–10, 2014.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–8, dez. 2001.

LUO, Y. et al. The inhibitory effect of salmon calcitonin on intervertebral disc degeneration in an ovariectomized rat model. **European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society**, 2014.

MANOLAGAS, S. C.; O'BRIEN, C. A; ALMEIDA, M. The role of estrogen and androgen receptors in bone health and disease. **Nature reviews Endocrinology**, v. 9, n. 12, p. 699–712, 2013.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. DETERMINATION OF THE ESTROUS CYCLE PHASES OF RATS : SOME HELPFUL CONSIDERATIONS. v. 62, p. 609–614, 2002.

MARQUETI, R. C. et al. Matrix metalloproteinase 2 activity in tendon regions: Effects of mechanical loading exercise associated to anabolic-androgenic steroids. **European Journal of Applied Physiology**, v. 104, p. 1087–1093, 2008.

MARTIN, R. B. Effects of simulated weightlessness on bone properties in rats. **Journal of Biomechanics**, v. 23, n. 10, p. 1021–1029, 1990.

MEAKIN, L. B. et al. Exercise does not enhance aged bone's impaired response to artificial loading in C57Bl/6 mice. **Bone**, v. 81, p. 47–52, 2015.

MOERMAN, E. J. et al. Aging activates adipogenic and suppresses osteogenic programs in mesenchymal marrow stroma / stem cells : γ 2 transcription factor and TGF- β β / BMP the role of PPAR- γ signaling pathways. **Aging Cell**, n. August, p. 379–389, 2004.

MOSIG, R. A. et al. Loss of MMP-2 disrupts skeletal and craniofacial development and results in decreased bone mineralization, joint erosion and defects in osteoblast and osteoclast growth. **Human molecular genetics**, v. 16, n. 9, p. 1113–23, 1 maio 2007.

NAIR, A. K. et al. Molecular mechanics of mineralized collagen fibrils in bone. **Nature communications**, v. 4, p. 1724, 2013.

NAMS. Management of osteoporosis in postmenopausal women. **Menopause**, v. 17, n. 1, p. 25–54, 2010.

NORDSLETTEN, L. et al. The development of femoral osteopenia in ovariectomized rats is not reduced by high intensity treadmill training: A mechanical and densitometric study. **Calcified Tissue International**, v. 55, n. 6, p. 436–442, 1994.

NYMAN, J. S. et al. The influence of water removal on the strength and toughness of cortical bone. **J. Biomech**, v. 39, n. 5, p. 931–938, 2006.

NYMAN, J. S. et al. Differential effects between the loss of MMP-2 and MMP-9 on structural and tissue-level properties of bone. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 26, n. 6, p. 1252–1260, 2011.

NYMAN, J. S.; MAKOWSKI, A. J. The contribution of the extracellular matrix to the fracture resistance of bone. **Current Osteoporosis Reports**, v. 10, n. 2, p. 169–177,

2012.

OZEKI, N. et al. IL-1 β -induced matrix metalloproteinase-13 is activated by a disintegrin and metalloprotease-28-regulated proliferation of human osteoblast-like cells. **Experimental Cell Research**, v. 323, n. 1, p. 165–177, 2014.

PACIFICI, R. Role of T cells in ovariectomy induced bone loss-revisited. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 27, n. 2, p. 231–239, 2012.

PARKS, W. C.; WILSON, C. L.; LÓPEZ-BOADO, Y. S. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 8, p. 617–629, ago. 2004.

PINO, A. M. et al. Qualitative Aspects of Bone Marrow Adiposity in Osteoporosis. **Frontiers in Endocrinology**, v. 7, n. October, p. 1–6, 2016.

RefFinder. Disponível em: <<http://fulxie.0fees.us/?type=reference&i=2>>. Acesso em: 04/06/2015.

RIFAS, L.; ARACKAL, S. T cells regulate the expression of matrix metalloproteinase in human osteoblasts via a dual mitogen-activated protein kinase mechanism. **Arthritis Rheum**, v. 48, n. 4, p. 993–1001, 2003.

RITCHIE, R. O. The conflicts between strength and toughness. **Nature Materials**, v. 10, n. 11, p. 817–822, 24 out. 2011.

RITCHIE, R. O.; BUEHLER, M. J.; HANSMA, P. Plasticity and toughness in bone. n. June, 2009.

ROBLING, A. G.; CASTILLO, A. B.; TURNER, C. H. BIOMECHANICAL AND MOLECULAR REGULATION OF BONE REMODELING_annurev.bioeng.8.061505.pdf. 2006.

ROSEN, C. J. Bone Remodeling, Energy Metabolism, and the Molecular Clock. **Cell**

Metabolism, v. 7, n. 1, p. 7–10, 2008.

ROSEN, C. J.; BOUXSEIN, M. L. Mechanisms of Disease: is osteoporosis the obesity of bone? **Nature Clinical Practice Rheumatology**, v. 2, n. 1, p. 35–43, 2006.

SAITO, M.; MARUMO, K. Collagen cross-links as a determinant of bone quality: a possible explanation for bone fragility in aging, osteoporosis, and diabetes mellitus. **Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA**, v. 21, n. 2, p. 195–214, fev. 2010.

SCHILTZ, C. et al. Inhibition of osteoblastic metalloproteinases in mice prevents bone loss induced by oestrogen deficiency. **Journal of cellular biochemistry**, v. 104, n. 5, p. 1803–17, 2008.

SCHILTZ, C. et al. Bone loss induced by Runx2 over-expression in mice is blunted by osteoblastic over-expression of TIMP-1. **Journal of cellular physiology**, v. 222, n. 1, p. 219–29, 2010.

SHIGUEMOTO, G. E. et al. Effects of resistance training on matrix metalloproteinase-2 activity and biomechanical and physical properties of bone in ovariectomized and intact rats. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**, v. 22, n. 5, p. 607–617, 2012.

SOUZA, S. B. C. et al. Role of Exercise Training in Cardiovascular Autonomic Dysfunction and Mortality in Diabetic Ovariectomized Rats. **Hypertension**, v. 50, n. 4, p. 786–791, 1 out. 2007.

STOTZER, U. S. et al. Resistance Training Suppresses Intra-abdominal Fatty Acid Synthesis in Ovariectomized Rats. **International journal of sports medicine**, v. 36, n. 3, p. 226–33, 2015.

SUCHACKI, K. J.; CAWTHORN, W. P.; ROSEN, C. J. Bone marrow adipose tissue: formation, function and regulation. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 28, p. 50–

56, jun. 2016.

SURI, V.; SURI, V. ORAL DISCOMFORT-BURNING MOUTH SYNDROME. **Menopause and oral health**, p. 1–8, 2015.

TANG, L. et al. Combination of Weight-Bearing Training and Anti-MSTN Polyclonal Antibody Improve Bone Quality in Rats. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, v. 32, p. 1–44, 2011.

TANG, L. et al. Ladder-Climbing Training Prevents Bone Loss and Microarchitecture Deterioration in Diet-Induced Obese Rats. **Calcified Tissue International**, v. 98, n. 1, p. 85–93, 2016.

TANG, S. et al. Matrix Metalloproteinase-13 is Required for Osteocytic Perilacunar Remodeling and Maintains Bone Fracture Resistance. v. 27, n. 9, p. 1936–1950, 2013.

THEOLEYRE, S. et al. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: Involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 15, n. 6, p. 457–475, 2004.

THOMPSON, D. D. et al. FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. **Bone**, v. 17, n. 4 Suppl, p. 125S–133S, out. 1995.

TREBACZ, H.; ZDUNEK, A. Three-point bending and acoustic emission study of adult rat femora after immobilization and free remobilization. **Journal of biomechanics**, v. 39, n. 2, p. 237–45, jan. 2006.

VASHISHTH, D. The role of the collagen matrix in skeletal fragility. **Current osteoporosis reports**, v. 5, n. 2, p. 62–6, jun. 2007.

VICENTE-RODRÍGUEZ, G. et al. Independent and combined effect of nutrition and exercise on bone mass development. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 26, n. 5, p. 416–424, 2008.

VON MACH, M.-A. et al. Changes in bone mineral content after surgical treatment of morbid obesity. **Metabolism: clinical and experimental**, v. 53, n. 7, p. 918–21, jul. 2004.

WADA, T. et al. RANKL–RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 12, n. 1, p. 17–25, jan. 2006.

WALSH, M. C.; HUNTER, G. R.; LIVINGSTONE, M. B. Sarcopenia in premenopausal and postmenopausal women with osteopenia, osteoporosis and normal bone mineral density. **Osteoporosis International**, v. 17, n. 1, p. 61–67, 2 jan. 2006.

WANG, P. et al. Mechanical Stretch Regulates the Expression of Matrix Metalloproteinase in Rheumatoid Arthritis Fibroblast-Like Synoviocytes. **Connective Tissue Research**, v. 50, n. 2, p. 98–109, 2009a.

WANG, Q.; YANG, M.; WANG, J. Effects of treadmill exercise on mRNA expression levels of osteoprotegerin, RANKL and RUNX2 in bone tissues of ovariectomized. **China journal of orthopaedics and traumatology**, v. 26, n. 11, p. 940–3, nov. 2013.

WEBER-RAJEK, M. et al. Whole-body vibration exercise in postmenopausal osteoporosis. **Przegląd Menopauzalny**, v. 14, n. 1, p. 41–47, 2015.

WEI, J. et al. Effectiveness of combined salmon calcitonin and aspirin therapy for osteoporosis in ovariectomized rats. **Molecular Medicine Reports**, 16 abr. 2015.

WILHELM, M. et al. Effect of resistance exercises on function in older adults with osteoporosis or osteopenia: A systematic review. **Physiotherapy Canada**, v. 64, n. 4, p. 386–394, 2012.

WINTERS-STONE, K. M. et al. Impact + resistance training improves bone health and body composition in prematurely menopausal breast cancer survivors: a randomized controlled trial. **Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA**, v. 24, n. 5, p. 1637–46, maio 2013.

YAMAZAKI, S. et al. Effect of walking exercise on bone metabolism in postmenopausal women with osteopenia/osteoporosis. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 22, n. 5, p. 500–508, 2004.

YUAN, Y. et al. The roles of exercise in bone remodeling and in prevention and treatment of osteoporosis. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, 2015.

ZHANG, N. et al. Assessment of Trabecular Bone Yield and Post-yield Behavior from High-Resolution MRI-Based Nonlinear Finite Element Analysis at the Distal Radius of Premenopausal and Postmenopausal Women Susceptible to Osteoporosis. **Academic Radiology**, v. 20, n. 12, p. 1584–1591, 2013.

ZHAO, L.-J. et al. Correlation of obesity and osteoporosis: effect of fat mass on the determination of osteoporosis. **Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 23, n. 1, p. 17–29, 2008.

ANEXO I - PROTOCOLO COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
Comissão de Ética em Experimentação Animal
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676
Fones: (016) 3351.8109 / 3351.8110
Fax: (016) 3361.3176
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil
propg@power.ufscar.br - www.propg.ufscar.br

Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal nº 008/2010

Protocolo CEEA nº 001/2010

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos – CEEA/UFSCar – na sua 40ª. Reunião ocorrida em 16/03/2010, **APROVOU** o trabalho intitulado “Efeitos do treinamento de força sobre a expressão gênica e protéica de larga escala em músculos de ratas ovariectomizadas”, elaborado por Uliana Sbeguen Stotzer, Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo e Sérgio eduardo de Andrade Perez..

São Carlos, 22 de março de 2010.

Prof. Dra. Keico Okino Nonaka

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal