

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS – DCF
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS – PIPGCF
LABORATÓRIO DE FISIOLOGIA ENDÓCRINA E EXERCÍCIO FÍSICO – LAFEEEx

RAFAEL HENRIQUE DE OLIVEIRA NASCIMENTO

**RESTRIÇÃO CALÓRICA MODERADA SOBRE A ADIPOSIDADE
CORPORAL E O TECIDO ÓSSEO DE RATAS SOB ESTADO DE
HIPOESTROGENISMO**

São Carlos – SP

2025

RAFAEL HENRIQUE DE OLIVEIRA NASCIMENTO

**RESTRIÇÃO CALÓRICA MODERADA SOBRE A ADIPOSIDADE
CORPORAL E O TECIDO ÓSSEO DE RATAS SOB ESTADO DE
HIPOESTROGENISMO**

Dissertação apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas

Orientador: Prof. Dr. Wladimir Rafael Beck

São Carlos – SP

2025

Nascimento, Rafael Henrique de Oliveira

Restrição calórica moderada sobre a adiposidade corporal e o tecido ósseo de ratas sob estado de hipostrogenismo / Rafael Henrique de Oliveira Nascimento -- 2025.
55f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos, São Carlos
Orientador (a): Wladimir Rafael Beck
Banca Examinadora: Wladimir Rafael Beck, Anabelle Silva Cornachione, Victor Fabricio
Bibliografia

1. Ratas ovariectomizadas. 2. Obesidade. 3. Osteoporose.
I. Nascimento, Rafael Henrique de Oliveira. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática (SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Arildo Martins - CRB/8 7180



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Rafael Henrique de Oliveira Nascimento, realizada em 06/03/2025.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Wladimir Rafael Beck (UFSCar)

Profa. Dra. Anabelle Silva Cornachione (UFSCar)

Prof. Dr. Victor Fabricio (UNOESTE)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

Este trabalho recebeu apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de
Pessoal de Nível Superior (CAPES).
Processo nº: 88887.825271/2023-00

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a minha família por todo apoio e suporte, mas especialmente a minha avó, Edna, por sempre ter se disposto a cuidar de mim e permitir que eu chegasse a esse momento de minha vida. Palavras não são suficientes para descrever minha gratidão e admiração pela senhora.

Agradeço imensamente aos meus amigos de laboratório, Taciane, Alinson, Ana, Jean, Milena, Leandro e Sérgio, pelo apoio durante toda a execução deste estudo. Vocês foram fundamentais para que o mesmo se concluísse, colaborando tanto de forma prática quanto psicológica. Não poderia deixar de agradecer também a minha amiga, Iara, que conheci no início de minha jornada acadêmica, você foi de suma importância para que eu pudesse ingressar e permanecer na mesma. Sozinho não chegamos a lugar algum e ter pessoas que tornem esse processo mais leve e prazeroso é um privilégio. Espero levar a amizade de vocês para a vida toda.

Deixo aqui também meus agradecimentos ao Laboratório de Fisiologia Aplicada ao Esporte (responsáveis: Prof. Dr. Claudio Alexandre Gobatto e Profa. Dra. Fúlvia de Barros Manchado Gobatto), por terem proporcionado o aparato de gravimetria utilizado neste estudo e ao Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparada (responsável: Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes) pelo uso do espectrofotômetro (SpectraMax M5).

Por último, mas não menos importante, deixo meus agradecimentos ao Prof. Dr. Wladimir Rafael Beck, pela oportunidade concedida de realizar uma pesquisa sob sua orientação. Sou extremamente grato por seu acolho e ensinamentos durante essa jornada, sempre sendo uma pessoa receptiva, paciente, compreensível e, além de tudo, uma pessoa amiga. Certamente o senhor é um exemplo de pessoa e profissional.

RESUMO

O estado de hipoposterogenismo tem sido associado ao ganho ponderal e obesidade e a incidência do quadro de osteoporose. Tratando-se de redução ponderal, a restrição calórica (RC) permanece como a principal estratégia. No entanto, a RC de forma severa (40 a 50%) está relacionada à prejuízos ao tecido ósseo, além de favorecer a ocorrência de um quadro de desnutrição em longo prazo. Sendo assim, esse estudo teve como objetivo verificar se 12 semanas de 20% de RC são suficientes para prevenir o ganho de massa e adiposidade corporal sem levar à prejuízos adicionais ao tecido ósseo de ratas ovariectomizadas. Para tal, 40 ratas *Wistar* foram divididas aleatoriamente em 4 grupos (n= 10 por grupo): controle (C), controle + restrição calórica (C-RC), ovariectomizado (OVX) e ovariectomizado + restrição calórica (OVX-RC). Aos 90 dias de idade, os animais dos grupos OVX e OVX-RC sofreram cirurgia de ovariectomia bilateral e aos 97 dias de idade iniciou-se o período experimental, perdurando por 12 semanas de RC e/ou hipoposterogenismo. Os animais dos grupos C-RC e OVX-RC receberam diariamente menos 20% de ração baseado no consumo da última semana dos grupos C e OVX. A massa corporal dos animais foi registrada semanalmente e a atividade física espontânea quinzenalmente, por meio de aparato de gravimetria. Aos 181 dias de idade, os animais foram eutanasiados e os tecidos adiposos subcutâneo, peritoneal, perigonadal e marrom foram coletados para registro de massa absoluta e relativa. Os músculos esqueléticos gastrocnêmios branco e vermelho, glúteo máximo e sóleo e o fígado foram coletados para determinação do conteúdo tecidual de triglicédeos (TG). Além disso, o fêmur direito foi coletado para determinação de parâmetros biométricos, biomecânicos, biofísicos e bioquímicos. Os dados obtidos foram apresentados em média±desvio padrão, submetidos à análise de variância de até três vias (tempo, RC e ovariectomia) e post-hoc de Newman-Keuls com nível de significância de 5% ($p < 0.05$). Ao longo das 12 semanas, a ovariectomia promoveu aumento da massa corporal e do consumo alimentar ($p < 0.001$) e da massa absoluta dos tecidos adiposos subcutâneo, peritoneal e perigonadal ($p < 0.01$), enquanto a RC promoveu diminuição significativa em todos estes parâmetros ($p < 0.01$). No que diz respeito ao conteúdo de TG, a ovariectomia promoveu aumento nos músculos gastrocnêmios branco e vermelho ($p < 0.05$), glúteo máximo e sóleo ($p < 0.01$) e no fígado ($p < 0.01$), enquanto a RC reduziu nos músculos ($p < 0.05$), mas não afetou o fígado ($p = 0.15$). A ovariectomia promoveu diminuição no volume ósseo ($p < 0.05$), na densidade e densidade mineral óssea ($p < 0.01$) e no material mineral ($p < 0.05$), ao passo que a RC não afetou o volume ósseo ($p = 0.90$) e a densidade óssea ($p = 0.24$), porém diminuiu a densidade mineral e o material mineral ($p < 0.05$). Apesar disso, os dados de post-hoc não demonstraram diferença significativa nestes parâmetros entre os grupos OVX e OVX-RC ($p > 0.05$). De maneira geral, 12 semanas de 20% de RC foram suficientes para reduzir a massa e adiposidade corporal de animais sob hipoposterogenismo sem levar à prejuízos adicionais ao tecido ósseo.

Palavras-chave: Obesidade; Ratas ovariectomizadas; Gordura visceral; Síndrome metabólica; Osteoporose; Metabolismo energético.

ABSTRACT

Hypoestrogenism state has been associated with weight gain, obesity and the incidence of osteoporosis. When it comes to weight reduction, calorie restriction (CR) remains the main strategy. However, severe CR (40 to 50%) is associated with damage to bone tissue and favors the incidence of long-term malnutrition. Therefore, the aim of this study was to determine whether 12 weeks of 20% CR is enough to prevent gain in body mass and adiposity without causing additional damage to bone tissue in ovariectomized rats. For this, 40 Wistar rats were randomly divided into 4 groups (n= 10 per group): control (C), control + calorie restriction (C-RC), ovariectomized (OVX) and ovariectomized + calorie restriction (OVX-RC). At 90 days of age, the animals in the OVX and OVX-RC groups underwent bilateral ovariectomy surgery and at 97 days of age the experimental period began, lasting 12 weeks of CR and/or hypoestrogenism. The animals in the C-RC and OVX-RC groups received 20% less feed every day, based on the last week's consumption in the C and OVX groups. The animals' body mass was recorded weekly, and their spontaneous physical activity was recorded every two weeks using a gravimetry apparatus. At 181 days of age, the animals were euthanized and subcutaneous, peritoneal, perigonadal and brown adipose tissue were collected to record absolute and relative mass. The white and red gastrocnemius, gluteus maximus and soleus skeletal muscles and the liver were collected to determine the tissue content of triglycerides (TG). In addition, the right femur was collected to determine biometric, biomechanical, biophysical and biochemical parameters. The data obtained were subjected to analysis of variance up to three ways (time, CR and ovariectomy) and Newman-Keuls post-hoc with a significance level of 5% ($p < 0.05$) and presented as mean \pm standard deviation. Over the 12 weeks, ovariectomy led to an increase in body mass and food consumption ($p < 0.001$) and in the absolute mass of subcutaneous, peritoneal and perigonadal adipose tissue ($p < 0.01$), while CR led to a significant decrease in all these parameters ($p < 0.01$). With regard to TG content, ovariectomy promoted an increase in the white and red gastrocnemius muscles ($p < 0.05$), gluteus maximus and soleus muscles ($p < 0.01$) and in the liver ($p < 0.01$), while CR reduced it in the muscles ($p < 0.05$), but did not affect the liver ($p = 0.15$). Ovariectomy led to a decrease in bone volume ($p < 0.05$), bone density and mineral density ($p < 0.01$) and mineral material ($p < 0.05$), while CR did not affect bone volume ($p = 0.90$) and bone density ($p = 0.24$), but decreased mineral density and mineral material ($p < 0.05$). Despite this, post-hoc data showed no significant difference in these parameters between the OVX and OVX-RC groups ($p > 0.05$). Overall, 12 weeks of 20% CR was sufficient to reduce body mass and adiposity in animals under hypoestrogenism without leading to additional damage to bone tissue.

Keywords: Obesity; Ovariectomized rats; Visceral fat; Metabolic syndrome; Osteoporosis; Energy metabolism.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Resumo das repercussões fisiológicas causadas pelo hipostrogenismo na composição corporal e no tecido ósseo. Fonte: elaborada pelo autor no biorender.com. AF: Atividade física; TAB: Tecido adiposo branco; GET: Gasto energético total.....18

Figura 2 – Representação esquemática do desenho experimental. Fonte: elaborada pelo autor no biorender.com. RC: restrição calórica; C: controle; C-RC: controle mais restrição calórica; OVX: ovariectomizado; OVX-RC: ovariectomizado mais restrição calórica.....24

Figura 3 – Ilustração do procedimento cirúrgico de ovariectomia bilateral. Fonte: Zarrow (1964). (A) local da incisão na pele e na camada muscular; (B) acesso a cavidade peritoneal; (C) identificação do ovário; (D) ligadura na fímbria para posterior remoção do ovário.....25

Figura 4 – Esquematisação do método de restrição calórica. Fonte: elaborada pelo autor. RC: restrição calórica; C: controle; C-RC: controle mais restrição calórica; OVX: ovariectomizado; OVX-RC: ovariectomizado mais restrição calórica; g: gramas.....26

Figura 5 – Ilustração do aparato de gravimetria. Fonte: elaborada pelo autor no biorender.com. (A) Caixas alocadas sob plataformas de ferro contendo as células de carga; (B) Amplificador de sinal e módulo conversor de sinal conectado ao computador para gravação; (C) Computador com sistema de gravação.....27

Figura 6 – Imagem ilustrativa do aparato de gravimetria em funcionamento. Fonte: elaborada pelo autor.....28

Figura 7 – Microplaca após a adição do reagente de triglicerídeos (A) e espectrofotômetro (Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa – UFSCar, responsável: Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes) (B). Fonte: elaborada pelo autor.....29

Figura 8 – Ilustração das regiões onde foram obtidos os parâmetros biométricos do fêmur. Fonte: elaborada pelo autor no biorender.com. mm: milímetros.....30

Figura 9 – Máquina de ensaios Instron® 4444. Fonte: elaborada pelo autor.....32

Figura 10 – Representação do gráfico de carga x deformação gerado após o teste. Fonte: elaborada pelo autor. Carga máxima: maior carga suportada no teste; deslocamento: distância percorrida pela haste cilíndrica na carga máxima;

resiliência: área sob a curva da fase elástica (linear); tenacidade: área sob a curva de todo o gráfico; rigidez: ângulo de inclinação da fase elástica; carga máxima no ponto de fratura: maior carga suportada no momento de fratura do fêmur; deslocamento no ponto de fratura: distância percorrida pela haste cilíndrica no momento de fratura. AUC: área sob a curva; N: newton; J: joules; mm: milímetros.....32

Figura 11 – Representação gráfica da massa corporal (A), do consumo alimentar (B), da atividade física espontânea (C) e da AUC da atividade física espontânea dos grupos controle (C), controle mais restrição calórica (C-RC), ovariectomizado (OVX) e ovariectomizado mais restrição calórica (OVX-RC). Fonte: elaborada pelo autor. Valores expressos em média±desvio padrão. Símbolos estatísticos do post-hoc de Newman-Keuls: ^ap <0.05 OVX vs C na mesma semana; ^bp <0.05 OVX-RC vs OVX na mesma semana; ^cp <0.05 OVX-RC vs C na mesma semana; ^dp <0.05 C-RC vs C na mesma semana. g: gramas; kg: quilogramas.....35

Figura 12 – Dados referentes a massa absoluta (A) e relativa (B) do tecido adiposo subcutâneo, absoluta (C) e relativa (B) do tecido adiposo peritoneal, absoluta (E) e relativa (F) do tecido adiposo perigonadal e absoluta (G) e relativa (F) do tecido adiposo marrom dos grupos controle (C), controle mais restrição calórica (C-RC), ovariectomizado (OVX) e ovariectomizado mais restrição calórica (OVX-RC). Fonte: elaborada pelo autor. Valores expressos em média±desvio padrão. Símbolos estatísticos do post-hoc de Newman-Keuls: ^ap <0.05 vs C; ^bp <0.05 vs OVX; ^cp <0.05 vs OVX-RC. mg: miligramas; g: gramas.....37

Figura 13 – Dados referentes ao conteúdo de triglicerídeos nos músculos sóleo (A), gastrocnêmio branco (B) e vermelho (C), glúteo máximo (D) e fígado (E) dos grupos controle (C), controle mais restrição calórica (C-RC), ovariectomizado (OVX) e ovariectomizado mais restrição calórica (OVX-RC). Fonte: elaborada pelo autor. Valores expressos em média±desvio padrão. Símbolos estatísticos do post-hoc de Newman-Keuls: ^ap <0.05 vs C; ^bp <0.05 vs OVX; ^cp <0.05 vs OVX-RC. mg: miligramas; g: gramas.....38

Figura 14 – Representação gráfica dos dados de volume ósseo (A), densidade óssea (B), densidade mineral óssea (C), porcentagem de água óssea (D), material orgânico (E) e mineral (F) e conteúdo de cálcio (G), fósforo (H) e cinzas (I) dos grupos controle (C), controle mais restrição calórica (C-RC), ovariectomizado (OVX) e ovariectomizado mais restrição calórica (OVX-RC). Fonte: elaborada pelo autor. Valores expressos em média±desvio padrão. Símbolos estatísticos do post-hoc de Newman-Keuls: ^ap <0.05 vs C; ^bp <0.05 vs OVX; ^cp <0.05 vs OVX-RC. cm³: centímetros cúbicos; g: gramas; mg: miligramas.....41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros biométricos e biomecânicos do fêmur. Valores expressos em média±desvio padrão. Símbolos estatísticos do post-hoc de Newman-Keuls: ^ap <0.05 vs C; ^bp <0.05 vs OVX; ^cp <0.05 vs OVX-RC. mm: milímetros; N: newton; J: joules.....39

LISTA DE ABREVIATURAS E ABREVIACOES

AFE: atividade física espontânea
ALH: rea lateral hipotalâmica
ANOVA: análise de variância
AO: gua sea
ARC: núcleo arqueado hipotalâmico
AUC: rea sob a curva
C: controle
cm: centímetros
DO: densidade sea
DMO: densidade mineral sea
E2: 17 β -estradiol
ER: receptores de estrogênios
ER α : receptor de estrognio alfa
ER β : receptor de estrognio beta
FAT CD36: *fatty acid transporter 36*
GET: gasto energético total
g: gramas
HCl: cido clorídrico
Hz: hertz
J: joules
kcal: calorias
kg: quilograma
ME: músculo esquelético
mg: miligrama
mL: mililitros
mm: milímetros
MM: material mineral
MO: material orgânico
mV: milivolts
N: newtons
nm: nanmetros

OPG: osteoprotegerina

OVX: ovariectomizado

PBS: tampão fosfato-salino

PC: peso das cinzas

PGC-1 α : proliferador de peroxissoma 1 alfa

PI: peso imerso

PS: peso seco

PU: peso úmido

RANKL: ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B

RC: restrição calórica

rpm: rotações por minuto

SIRT: sirtuínas

TAB: tecido adiposo branco

TAM: tecido adiposo marrom

TAS: tecido adiposo subcutâneo

TAV: tecido adiposo visceral

TG: triglicerídeos

UCP: proteínas desacopladoras

VO: volume ósseo

μ L: microlitros

$^{\circ}$ C: graus celsius

%: porcentagem

LISTA DE SIGLAS

AVMA – American Veterinary Medical Association

CCBS – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

DCF – Departamento de Ciências Fisiológicas

LAFEEEx – Laboratório de Fisiologia Endócrina e Exercício Físico

PIPGCF – Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

UFSCar – Universidade Federal de São Carlos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	21
2.1 Geral.....	21
2.2 Específicos.....	21
3 HIPÓTESES	22
4 MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1 Animais e ambiente experimental.....	23
4.2 Desenho experimental.....	23
4.3 Procedimento de ovariectomia.....	24
4.4 Controle do consumo alimentar e restrição calórica.....	25
4.5 Mensuração da atividade física espontânea.....	26
4.6 Eutanásia e coleta de tecidos.....	28
4.7 Quantificação de triglicerídeos no músculo esquelético e no fígado..	29
4.8 Análises do tecido ósseo.....	30
4.8.1 Parâmetros biométricos.....	30
4.8.2 Parâmetros biofísicos.....	30
4.8.3 Parâmetros biomecânicos.....	31
4.8.4 Parâmetros bioquímicos.....	33
4.9 Análise estatística.....	33
5 RESULTADOS	35
5.1 Massa corporal, consumo alimentar e atividade física espontânea.....	35
5.2 Massa dos tecidos adiposos.....	36
5.3 Conteúdo de triglicerídeos no músculo esquelético e no fígado.....	38
5.4 Parâmetros biométricos e biomecânicos do fêmur.....	39
5.5 Parâmetros biofísicos e bioquímicos do fêmur.....	40
6 DISCUSSÃO	42
7 CONCLUSÃO	46
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
9 ANEXOS	53
9.1 Composição nutricional da ração.....	53
9.2 Certificado CEUA.....	54

1 INTRODUÇÃO

Menopausa é um evento que ocorre nas mulheres onde há a cessação da atividade folicular ovariana, indicando o fim de sua idade reprodutiva. Este evento pode ocorrer de duas formas: primária, quando há a cessação fisiológica desta atividade, ocorrendo geralmente entre os 48 e 52 anos de idade; ou secundária, devido a intervenções cirúrgicas ou terapias oncológicas, também conhecida como menopausa iatrogênica. No entanto, essa cessação e/ou remoção ovariana leva à diminuição dos níveis circulantes dos hormônios estrogênicos, propiciando um estado de hipoestrogenismo (DAVIS *et al.*, 2015).

Estrogênios são os principais hormônios esteroides feminilizantes, sendo o 17 β -estradiol ou E2, a principal isoforma circulante (FUENTES; SILVEYRA, 2019). O estado de hipoestrogenismo está associado ao surgimento de sinais e sintomas físicos e psicológicos deletérios à saúde da mulher, envolvendo alterações no sistema nervoso central, no sistema reprodutor e alterações metabólicas e no sistema musculoesquelético. Tais alterações devem-se a ampla distribuição dos receptores de estrogênios (ER), denominados de alfa (ER α) e beta (ER β), nos tecidos extragonadais (MONTELEONE *et al.*, 2018). Embora esses sinais e sintomas sejam individuais para cada mulher, o ganho ponderal devido ao acúmulo de gordura (LIZCANO, 2022) e a osteoporose (GOSSET; POUILLÈS; TRÉMOLLIÈRES, 2021) são comumente associados a deficiência de estrógenos, especialmente em longo prazo.

O ganho ponderal no estado de hipoestrogenismo está relacionado ao desequilíbrio dos componentes inerentes ao balanço energético, tais como o aumento da ingestão alimentar e a diminuição da atividade física (WEIDLINGER *et al.*, 2023). O balanço energético é influenciado pelo hipotálamo, sendo a ingestão alimentar controlada, principalmente, pelo núcleo arqueado hipotalâmico (ARC) (SMITH; WOODSIDE; ABIZAID, 2022). Os ER encontram-se amplamente distribuídos no hipotálamo (LAFLAMME *et al.*, 1998; KRUIJVER *et al.*, 2002, 2003), incluindo no ARC, o que sugere que os estrogênios contribuam para o controle da ingestão alimentar. Em estudos conduzidos com roedores ovariectomizados, ou seja, que tiveram seus ovários extraídos, o aumento da ingestão alimentar pode ser observado (RICHARD *et al.*, 2017; IWASA *et al.*, 2018). Um dos mecanismos

propostos para esse fenômeno é que os estrogênios ajam no ARC inibindo a síntese de neuropeptídeo γ , o principal mediador do apetite, contribuindo assim, para a prevalência da saciedade e redução da ingestão alimentar (MAHBOOBIFARD *et al.*, 2022).

Adicionalmente, o comportamento sedentário e a inatividade física também são fatores contribuintes para o ganho ponderal (BLÜHER, 2019). Ao contrário da atividade física planejada, a atividade física espontânea (AFE) ou involuntária compreende o ato de manter ou mudar a postura, a inquietação e a movimentação em atividades de lazer ou trabalho (GARLAND *et al.*, 2011). Em indivíduos não praticantes de exercícios físicos, a AFE representa uma parcela significativa da atividade física total, podendo chegar a compor 30% do gasto energético total (GET) diário (KOTZ *et al.*, 2017). Assim como a ingestão alimentar, o controle da AFE é mediado pelo hipotálamo, por uma região denominada de área lateral hipotalâmica (ALH). A ALH representa uma das regiões mais interconectadas do hipotálamo, o que permite que a mesma receba uma vasta gama de informações e seja capaz de modular funções cognitivas, motoras e autonômicas (BROWN; WOODWORTH; LEINNINGER, 2015). Embora alguns estudos com roedores ovariectomizados apresentem uma diminuição na AFE (TUAZON *et al.*, 2018; PEJON *et al.*, 2022a), o mecanismo por trás disso não está completamente elucidado. Contudo, a presença dos ER na ALH sugere que os estrogênios possam influenciar nesse mecanismo, resultando em prejuízos na AFE e, conseqüentemente, no GET.

Apesar de seu papel central, o déficit de estrogênios ovarianos afeta o metabolismo energético de tecidos periféricos, influenciando a composição corporal (MAHBOOBIFARD *et al.*, 2022). O tecido adiposo branco (TAB) consiste a principal reserva energética do corpo, subdividindo-se em tecido adiposo visceral (TAV) e subcutâneo (TAS). A expansão do TAV está fortemente associada a distúrbios metabólicos, como resistência à insulina, dislipidemias e obesidade (WRONSKA; KMIEC, 2012). Em condições normais, os estrogênios controlam essa expansão ao se ligar nos ER α , o que ativa os receptores β -adrenérgicos e regula a atividade da lipoproteína lipase, reduzindo a lipogênese e promovendo a lipólise (LIZCANO, 2022). Em contraste, o tecido adiposo marrom (TAM) está distribuído em regiões específicas, sendo crucial para a termorregulação. A termogênese pelo TAM é

mediada pelas proteínas desacopladoras (UCP), nas quais geram calor a partir de substratos energéticos (CARPENTIER *et al.*, 2023). A ligação dos estrogênios no TAM estimula a ativação do proliferador de peroxissoma-1 alfa (PGC-1 α), promovendo a biogênese mitocondrial e a expressão das UCP, o que viabiliza a termogênese e contribui para o GET (GONZÁLEZ-GARCÍA; TENA-SEMPERE; LÓPEZ, 2017).

O músculo esquelético (ME) é o tecido mais abundante presente no corpo humano, ocupando cerca de 40% da massa corporal total (FRONTERA; OCHALA, 2015) e naturalmente apresentando atuação relevante sobre o metabolismo energético. Devido à sua distribuição e função fisiológica, o ME contribui com aproximadamente 30% da taxa metabólica basal, sendo essencial para homeostase energética (FRAMPTON *et al.*, 2020). Sua versatilidade metabólica, na qual transita entre o metabolismo glicolítico e o oxidativo, permite um melhor aproveitamento dos substratos energéticos, influenciando na atividade das vias lipogênicas e evitando a deposição de gordura em regiões ectópicas e o surgimento de dislipidemias (MENGESTE; RUSTAN; LUND, 2021). No ME os estrogênios são importantes para a regulação do metabolismo energético. Assim como no TAM sua ação nessa via consiste em promover a ativação do PGC-1 α , propiciando a integridade da função mitocondrial (YOH *et al.*, 2023). Diante disso, o hipostrogenismo confere um cenário prejudicial à saúde muscular esquelética, podendo comprometer o GET e contribuir para o aumento da adiposidade corporal.

Embora o déficit de estrógenos ovarianos esteja associado ao desenvolvimento da obesidade, a osteoporose compreende outra condição comumente observada, atingindo uma a cada três mulheres na pós-menopausa (GOSSET; POUILLÈS; TRÉMOLLIÈRES, 2021). A osteoporose é uma doença multifatorial caracterizada pela diminuição gradual da massa óssea associada ao aumento da fragilidade do esqueleto (ARCEO-MENDOZA; CAMACHO, 2021). A base de sua fisiopatologia está concentrada no desbalanço do processo de remodelação óssea, ou seja, de renovação óssea. A remodelação óssea é mediada por células especializadas, como os osteoclastos, que são responsáveis pela reabsorção óssea, e os osteoblastos, que promovem a formação óssea. Quando do quadro de osteoporose, a atividade osteoclástica se sobressai frente à osteoblástica, o que leva a degradação excessiva do tecido ósseo. Esse processo

se dá por alterações moleculares, como o aumento da expressão do ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL), que estimula a osteoclastogênese, e a redução na produção de osteoprotegerina (OPG), um inibidor dessa via (FÖGER-SAMWALD *et al.*, 2020).

A osteoporose decorrente do hipoestrogenismo se dá pela perda da função protetora dos estrogênios sobre o tecido ósseo, exercida por meio da regulação da remodelação óssea (EASTELL *et al.*, 2016). Em condições normais, os estrogênios se ligam às células ósseas, modulando negativamente a expressão do RANKL e estimulando a síntese de OPG, o que permite o controle da diferenciação e atividade dos osteoclastos. Ademais, os estrogênios inibem a produção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos e outras células imunes no microambiente ósseo, o que contribui para a supressão da osteoclastogênese (ANAGNOSTIS *et al.*, 2021). A perda dessa regulação durante o hipoestrogenismo resulta em um aumento da reabsorção óssea e, conseqüentemente, em redução da densidade mineral óssea, caracterizando o quadro osteoporótico e aumentando o risco de fraturas (CAULEY, 2015).

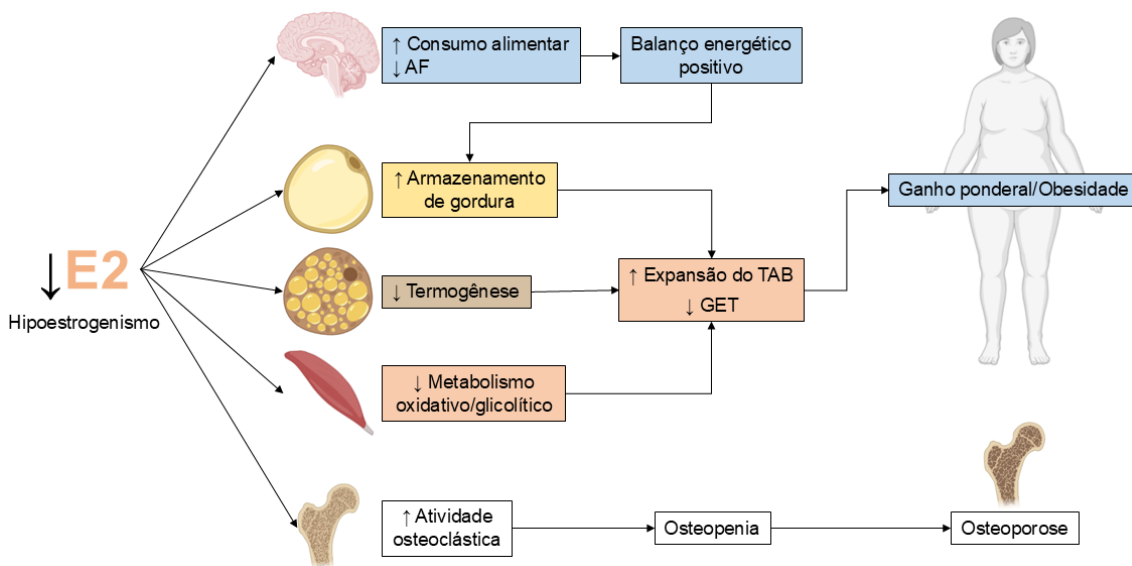


Figura 1 – Resumo das repercussões fisiológicas causadas pelo hipoestrogenismo na composição corporal e no tecido ósseo. Fonte: elaborada pelo autor no biorender.com. AF: Atividade física; TAB: Tecido adiposo branco; GET: Gasto energético total.

Como forma de prevenir ou tratar os sinais e sintomas do hipoestrogenismo, a terapia de reposição hormonal permanece como a principal intervenção,

frequentemente envolvendo a administração de estrogênios isolados ou em combinação com progestinas (análogos da progesterona). Contudo, a resposta individual ao tratamento constitui um dos maiores desafios dessa intervenção, com riscos de desenvolvimento de câncer de mama, trombose venosa e doenças cardiovasculares sendo frequentemente relatados (FLORES; PAL; MANSON, 2021). Sendo assim, intervenções não farmacológicas como as dietéticas tem ganhado notoriedade por estarem relacionadas com uma menor incidência de efeitos colaterais, tornando-as mais sustentáveis.

Nesse sentido, a restrição da ingestão calórica diária, ou simplesmente restrição calórica (RC), compreende a principal estratégia para controle e redução ponderal. No contexto clínico, a RC envolve a redução de 10 a 25% do consumo calórico basal diário, sendo que em estudos com roedores essa redução pode chegar a ultrapassar 50% (HOFER *et al.*, 2022). A RC é alcançada pela limitação do conteúdo alimentar ingerido, o que promove um déficit calórico, assim favorecendo o uso das reservas energéticas, especialmente dos ácidos graxos, o que leva à diminuição do tecido adiposo e, conseqüentemente, à perda de peso. Além disso, a RC é conhecida cientificamente como uma ferramenta potente no retardo da senescência celular (FLANAGAN *et al.*, 2020). Em nível molecular quando da restrição energética ocorre a ativação das sirtuínas (SIRT), sendo essas proteínas reguladoras dos processos celulares. Dentre esses processos, as SIRT são capazes de melhorar o metabolismo energético, otimizando a utilização dos substratos energéticos, e agir sobre o controle do estresse oxidativo e do processo inflamatório (JI; LIU; QU, 2022)

Apesar de seus benefícios, estudos conduzidos com roedores tem demonstrado que a adesão crônica à RC está relacionada à incidência de prejuízos às propriedades biofísicas do tecido ósseo, como redução do volume ósseo e da densidade mineral óssea (TATSUMI *et al.*, 2008; AHN *et al.*, 2014), bem como do conteúdo mineral ósseo (HAMRICK *et al.*, 2008). Além disso, prejuízos às propriedades biomecânicas e biométricas também podem ser observados, como redução na rigidez e capacidade de carga suportada (TALBOTT *et al.*, 2001; WESTERBEEK; HEPPLER; ZERNICKE, 2008) e redução do comprimento ósseo (BEHRENDT *et al.*, 2016). Contudo, a maioria dos estudos que demonstraram esses efeitos utilizaram restrições severas, variando de 40 a 50%, o que em longo

prazo pode levar a um quadro de desnutrição (CERQUEIRA; KOWALTOWSKI, 2010), explicando tais prejuízos. Ademais esta porcentagem de restrição costuma ser impraticável para maioria da população, o que impede sua adesão e leva a desistência do tratamento (HEMMINGSSON *et al.*, 2012).

Mediante o descrito até agora, a literatura carece de estudos que abordem os efeitos da adesão crônica da RC moderada (10 a 25%) no estado de hipoestrogenismo, especialmente visando o tecido ósseo. Tal cenário motivou a condução do presente estudo, que teve como pergunta norteadora a seguinte: doze semanas de 20% de RC são suficientes para prevenir o ganho de massa e adiposidade corporal de ratas submetidas ao estado de hipoestrogenismo sem levar à prejuízos adicionais ao tecido ósseo?

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Investigar os efeitos da ovariectomia e da RC sobre a adiposidade corporal e as propriedades biométricas, biomecânicas, biofísicas e bioquímicas do tecido ósseo.

2.2 Específicos

Avaliar os efeitos da ovariectomia e da RC, associados ou não, sobre:

- A massa corporal;
- O consumo de ração;
- A atividade física espontânea;
- A massa do tecido adiposo subcutâneo, peritoneal, perigonadal e marrom;
- O conteúdo de triglicerídeos no músculo esquelético e no fígado;
- O comprimento e o diâmetro menor e maior do fêmur;
- A carga máxima, o deslocamento, a resiliência, a tenacidade, a rigidez e a carga máxima e o deslocamento no ponto de fratura do fêmur;
- O volume ósseo, a densidade óssea, a densidade mineral óssea, a porcentagem de água, material orgânico e material mineral e o peso das cinzas do fêmur;
- O conteúdo de cálcio e fósforo no fêmur.

3 HIPÓTESES

A ovariectomia será capaz de promover aumento do consumo alimentar, da massa corporal e da massa do tecido adiposo subcutâneo e visceral. Além disso, a ovariectomia promoverá redução do volume ósseo, da densidade e da densidade mineral óssea.

Por outro lado, a RC promoverá redução da massa corporal e da massa do tecido adiposo subcutâneo e visceral. Ademais, a RC não exercerá efeito sobre o volume ósseo, a densidade e a densidade mineral óssea.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais e ambiente experimental

Para os objetivos do presente estudo, foram utilizadas 40 ratas *Wistar* (*Rattus norvegicus albinus*) com 45 dias de idade e pesando cerca de 154 ± 15 g, adquiridas do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Durante o período experimental, os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Fisiologia Endócrina e Exercício Físico (LAFEEEx) do Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF) da UFSCar. Os animais permaneceram alocados em caixas coletivas de polipropileno (40cm x 40cm x 20cm), sob leito de maravalha, com 5 ratas em cada caixa. As condições ambientais foram controladas, com temperatura de 22 ± 2 °C mediada por ar condicionado, umidade relativa do ar entre 45 e 55% e fotoperíodo de ciclo claro/escuro de 12/12 horas, com as luzes sendo apagadas automaticamente em *Zeitgeber* 12. Durante a aclimação até o início do período experimental, todos os animais tiveram acesso à água e ração (Presence®, Brasil; 3,12 kcal/g) (Anexo 1) *ad libitum*. Os procedimentos experimentais realizados neste estudo foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSCar, sob o protocolo de número 4420100423 (Anexo 2).

4.2 Desenho experimental

Após o período de aclimação, as ratas foram divididas aleatoriamente em quatro grupos (n= 10 por grupo), e permaneceram em seus respectivos grupos por um período experimental de 12 semanas consecutivas, onde foram submetidas ou não à ovariectomia e/ou à RC (Figura 2). O procedimento de ovariectomia ocorreu quando os animais atingiram 90 dias de idade. A massa corporal dos animais, bem como o consumo de ração foram mensurados semanalmente, por meio de uma balança digital. Além disso, durante o período experimental, a AFE de todos os animais foi mensurada a cada duas semanas por meio de um aparato de gravimetria. Os quatro grupos consistiram em:

1) Grupo controle: animais que não foram submetidos à ovariectomia ou à RC, sendo alimentados *ad libitum* com ração padrão (C, n= 10);

2) Grupo controle mais restrição calórica: animais que não foram submetidos à ovariectomia, mas foram submetidos à RC, sendo alimentados com ração padrão (C-RC, n= 10);

3) Grupo ovariectomizado: animais que foram submetidos à ovariectomia, mas não foram submetidos à RC, sendo alimentados *ad libitum* com ração padrão (OVX, n= 10);

4) Grupo ovariectomizado mais restrição calórica: animais que foram submetidos à ovariectomia e à RC, sendo alimentados com ração padrão (OVX-RC, n= 10).

Posteriormente ao período experimental, os animais foram eutanasiados para coleta de materiais biológicos.

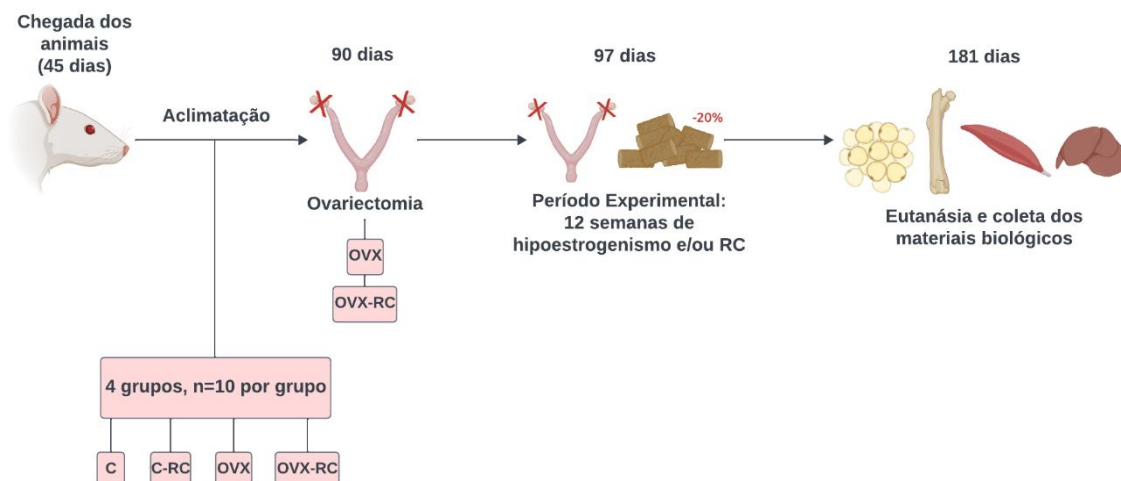


Figura 2 – Representação esquemática do desenho experimental. Fonte: elaborada pelo autor no biorender.com. RC: restrição calórica; C: controle; C-RC: controle mais restrição calórica; OVX: ovariectomizado; OVX-RC: ovariectomizado mais restrição calórica.

4.3 Procedimento de ovariectomia

O procedimento de retirada dos ovários das ratas foi realizado no LAFEEEx – UFSCar e seguiu o modelo proposto anteriormente por Zarrow (1964). Anteriormente ao início da cirurgia, as ratas dos grupos OVX e OVX-RC tiveram sua massa corporal registrada. Posteriormente, receberam uma dose anestésica intraperitoneal que consistiu na associação de 6 mg/kg de xilazina (Anasedan®, Ceva, Paulínia, São Paulo, Brasil) e 120 mg/kg de ketamina (Dopalen®, Ceva,

Paulínia, São Paulo, Brasil). Após a sedação o animal sofreu tricotomia e assepsia da região a ser operada.

O procedimento cirúrgico consistiu na realização de pequenas incisões bilaterais na pele e na camada muscular na região entre a última costela e coxa, em paralelo com a linha corporal do animal. Estas incisões permitiram acesso a cavidade peritoneal, permitindo a exposição e retirada dos ovários pela realização de uma ligadura abaixo da fímbria (Figura 3). Após a remoção dos ovários, foi realizada a sutura entre os tecidos com a utilização de agulha e fio de nylon. Posteriormente, foi realizada assepsia diária nos locais da incisão cirúrgica com soro fisiológico e os animais foram medicados com antibiótico (penicilina-estreptomicina: 5 mg/kg, intraperitoneal) e analgésico (dipirona: 14,2mg/kg) durante 3 dias. Foi respeitado um período pós-cirúrgico de pelo menos 7 dias antes do início do período experimental.

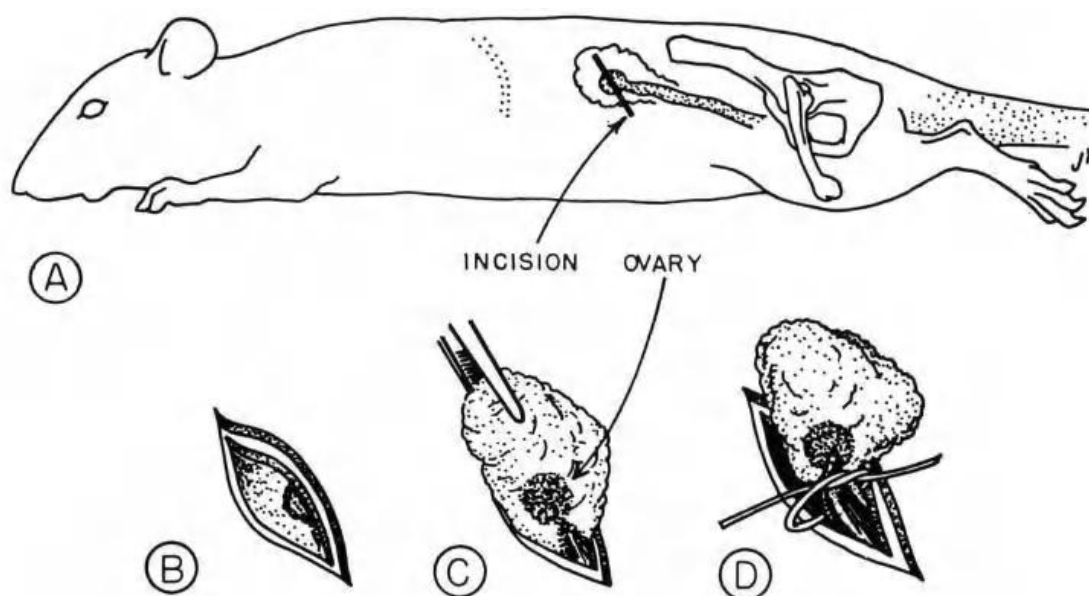


Figura 3 – Ilustração do procedimento cirúrgico de ovariectomia bilateral. Fonte: Zarrow (1964). (A) local da incisão na pele e na camada muscular; (B) acesso a cavidade peritoneal; (C) identificação do ovário; (D) ligadura na fímbria para posterior remoção do ovário.

4.4 Controle do consumo alimentar e restrição calórica

No presente estudo, foi adotada uma restrição de ração diária de 20%, permitindo assim 20% de RC. Portanto, diariamente, com o início do período experimental, foi ofertado aos grupos C-RC e OVX-RC uma quantidade de ração

equivalente a 80% do total consumido pelas ratas dos grupos C e OVX respectivamente.

O total em gramas a ser ofertado foi ajustado semanalmente às segundas-feiras, sempre a partir do *Zeitgeber* 12. Para tal, 24 horas antes, uma quantidade de ração pré-estabelecida foi ofertada às ratas dos grupos C e OVX. Vinte e quatro horas após, o montante foi retirado e teve sua massa registrada. O total consumido nesse período foi dividido pela massa total em gramas (g) das ratas contidas nas caixas, afim de obter a quantidade de g de ração ingerida por g de animal. Este valor foi multiplicado pela massa das ratas contidas nas caixas dos grupos C-RC e OVX-RC, subtraído 20%, e o resultado definiu o montante de ração ofertado para os animais destes grupos (Figura 4).

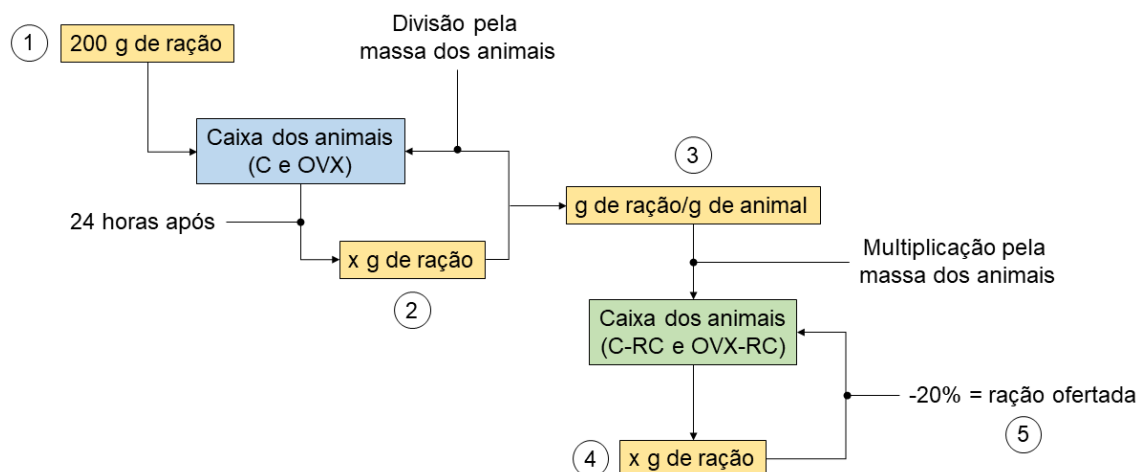


Figura 4 – Esquematisação do método de restrição calórica. Fonte: elaborada pelo autor. RC: restrição calórica; C: controle; C-RC: controle mais restrição calórica; OVX: ovariectomizado; OVX-RC: ovariectomizado mais restrição calórica; g: gramas.

4.5 Mensuração da atividade física espontânea

Com o início do período experimental, todos os animais foram submetidos a cada duas semanas à análise gravimétrica, afim da mensuração da AFE por meio da identificação e registro das alterações gravitacionais geradas pelas contrações musculares. Para tal, as caixas foram colocadas sobre plataformas de ferro contendo células de carga extremamente sensíveis entre elas (PLA30Kg®, Líder Balanças, Araçatuba, São Paulo, Brasil), que permitiram o reconhecimento de movimentos mínimos exercidos sobre as mesmas. Tais movimentos promoveram

deformações imperceptíveis na célula de carga, o que gerou uma carga elétrica em milivolts (mV). Posteriormente, esses sinais foram amplificados por um amplificador de sinal (MKTC5-10, MK controle e instrumentação, São Paulo, Brasil) conectado às células de carga e processados por um módulo USB analógico-digital (USB-6001®, *National Instruments*, Austin, Texas, USA), o que permitiu a conversão do sinal analógico em digital. Por último, os sinais expressos foram registrados em um computador pelo software *Signal Express*® 2009 (*National Instruments*, Austin, Texas, USA) a 30 Hertz (Hz) por um período de 24 horas. Semanalmente, antecedendo o início das gravações, o sistema foi calibrado com a utilização de 9 cargas progressivas de 0,198 a 7,938 kg. Ao final do período experimental, os sinais foram tratados usando o *MatLab*® 7.0 (*MathWorks*™), permitindo a identificação e a posterior conversão dos sinais registrados em mV para g e a AFE foi determinada pela soma das variações de peso em valores absolutos (*BIESIADECKI et al.*, 1999) (Figura 5 e 6).

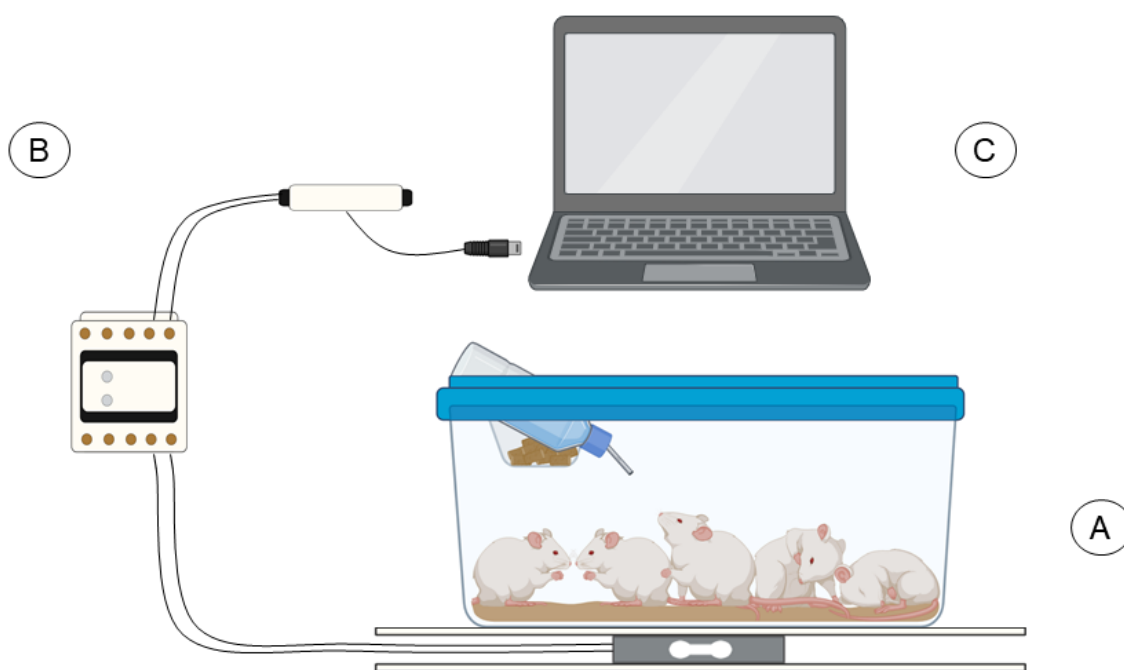


Figura 5 – Ilustração do aparato de gravimetria. Fonte: elaborada pelo autor no biorender.com. (A) Caixas aloçadas sob plataformas de ferro contendo as células de carga; (B) Amplificador de sinal e módulo conversor de sinal conectado ao computador para gravação; (C) Computador com sistema de gravação.

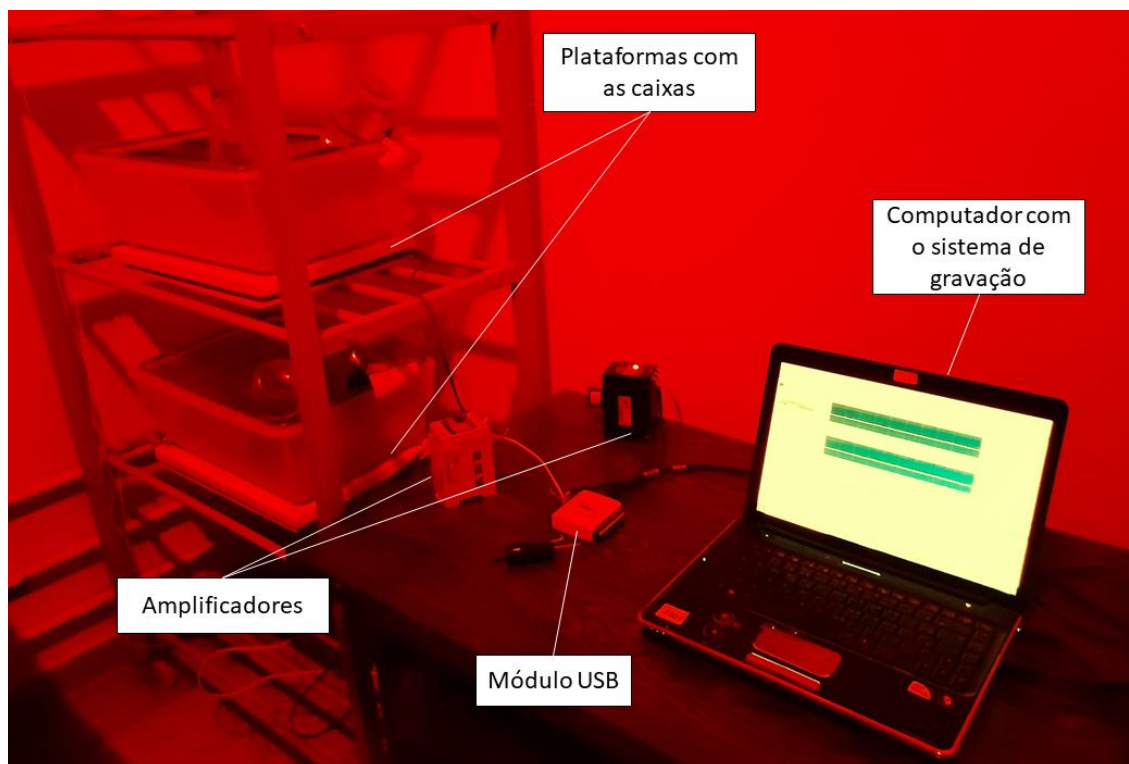


Figura 6 – Imagem ilustrativa do aparato de gravimetria em funcionamento. Fonte: elaborada pelo autor.

4.6 Eutanásia e coleta de tecidos

A eutanásia dos animais se deu por meio de decapitação, método esse recomendado pela *American Veterinary Medical Association – AVMA* (2020) e aprovado pela CEUA da UFSCar, por prover perda da consciência de dor em um período de tempo muito curto. Imediatamente após a eutanásia, os tecidos adiposos subcutâneo, peritoneal, perigonadal e o marrom interescapular das ratas foram extraídos e tiveram suas massas registradas, para posterior apresentação do valor absoluto e relativo (divisão pela massa corporal) dos mesmos. Os músculos sóleo, gastrocnêmios, glúteo máximo e o fígado foram coletados e armazenados em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior análise de quantificação do conteúdo de triglicerídeos. O fêmur direito das ratas foi retirado e armazenado em solução salina a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior execução das análises biométricas, biomecânicas, biofísicas e bioquímicas.

4.7 Quantificação de triglicerídeos no músculo esquelético e no fígado

Os músculos esqueléticos e o fígado foram retirados do freezer e tiveram sua massa registrada, afim de se obter 100 a 200 mg de cada tecido. Posteriormente, para cada 200 mg de tecido foi adicionado 1 mL de Triton X-100 diluído à 0,1% e os mesmos foram homogeneizados *overnight* a 4 °C em um agitador magnético com a utilização de barras magnéticas (5x3 mm). A homogeneização com Triton permitiu a solubilização das membranas celulares, facilitando a dispersão dos lipídeos contidos nas mesmas. Após isso, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos para obtenção do sobrenadante. Em seguida, 10 µL do sobrenadante de cada amostra foi pipetado em microplacas de 96 poços e, posteriormente, 200 µL de reagente de triglicerídeos de método enzimático-colorimétrico (#1770290, Laborlab, São Paulo, Brasil) foi adicionado em cada poço e as microplacas foram incubadas por 20 minutos a 25 °C. Ao adicionar o reagente aos poços, após diversas reações químicas, os triglicerídeos foram degradados em quinoniminas vermelhas, nas quais conferiram uma coloração alaranjada aos mesmos. Após a incubação, as placas foram lidas em um espectrofotômetro (SpectraMax M5, Molecular Devices®, LLC., San Jose, CA, United States) sob um comprimento de onda de 505 nm e os valores da absorbância foram utilizados para posterior apresentação dos resultados em mg/g de tecido (Figura 7).



Figura 7 – Microplaca após a adição do reagente de triglicerídeos (A) e espectrofotômetro (Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa – UFSCar, responsável: Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes) (B). Fonte: elaborada pelo autor.

4.8 Análises do tecido ósseo

4.8.1 Parâmetros biométricos

Os fêmures foram retirados do freezer para remoção dos tecidos moles remanescentes. Após isso, foram realizadas as medidas de comprimento e diâmetro menor e maior com a utilização de um paquímetro analógico (precisão de 0,05 mm). O comprimento consistiu na medida entre a região distal dos côndilos femorais e a saliência do trocânter maior. Os diâmetros maior e menor consistiram nas espessuras da região do terceiro trocânter da diáfise femoral realizadas na posição látero-lateral (maior) e ântero-posterior (menor) (Figura 8).

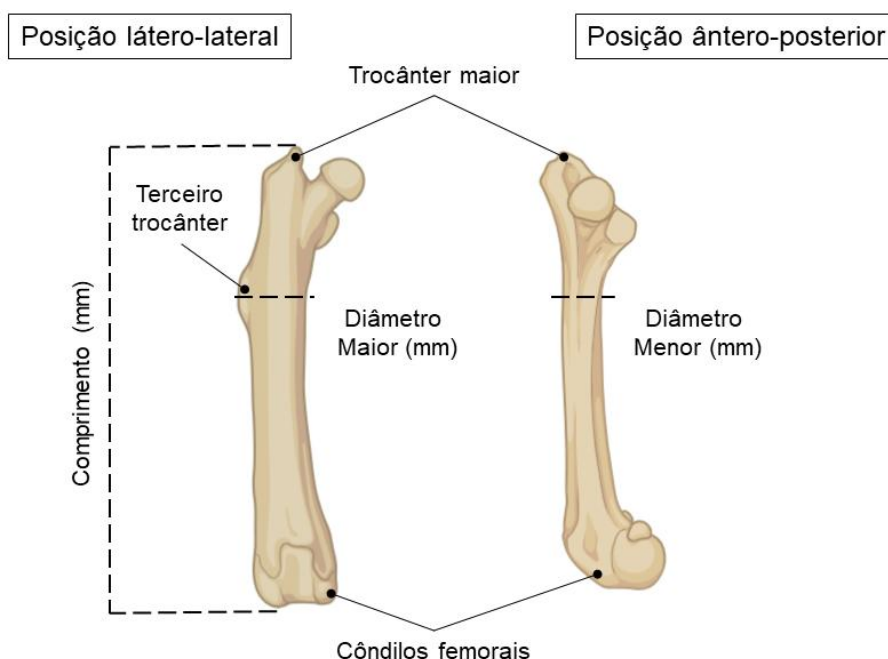


Figura 8 – Ilustração das regiões onde foram obtidos os parâmetros biométricos do fêmur. Fonte: elaborada pelo autor no biorender.com. mm: milímetros.

4.8.2 Parâmetros biofísicos

Após a realização dos parâmetros biométricos, os fêmures foram imersos em água destilada e mantidos em um dessecador por 24 horas, afim de remover o ar presente na porção trabecular. Em seguida, foram registrados os pesos imersos (PI) e úmido (PU) dos fêmures e os mesmos foram mantidos em uma estufa com a temperatura de 100 °C por 24 horas para posterior registro do peso seco (PS). Após

registro do PS, houve a obtenção dos parâmetros biomecânicos (ver item 4.8.3). Posteriormente, os fêmures foram colocados em barcas de cerâmica e levados em uma mufla com a temperatura de 800 °C e mantidos por 24 horas para o subsequente registro do peso das cinzas (PC). Os parâmetros biofísicos consistiram no PC, no volume ósseo (VO), na densidade óssea (DO), na densidade mineral óssea (DMO) e na porcentagem de água óssea (AO) de material mineral (MM) e material orgânico (MO). Para a obtenção dos valores de VO, DO, DMO, AO, MM e MO o princípio de Arquimedes foi adotado (MARTIN, 1990), utilizando-se as seguintes formulas:

$$VO (cm^3) = PU - PI / \text{densidade da água};$$

$$DO (g/cm^3) = PU / VO;$$

$$DMO (g/cm^3) = PC / VO;$$

$$AO (\%) = 100 * (PU - PS) / PU;$$

$$MM (\%) = 100 * (PS - PC) / PU;$$

$$MO (\%) = 100 * PC / PU.$$

4.8.3 Parâmetros biomecânicos

Para a obtenção dos parâmetros biomecânicos, os fêmures foram submetidos ao teste de flexão a três pontos (AKHTER *et al.*, 2004), realizado na máquina de ensaios Instron® 4444 (Figura 9). Os fêmures foram apoiados em uma base de metal onde a região da diáfise femoral ficou suspensa para aplicação da força do teste por meio de uma haste cilíndrica. Previamente ao início do teste foi aplicada uma pré-carga de 5 Newtons (N), afim da estabilização do fêmur na base. Após a estabilização, uma carga com velocidade constante de 5 mm/min foi aplicada até que houvesse a fratura do fêmur. Os testes foram registrados pelo software Instron Series IX na forma de um gráfico de carga (eixo y) x deformação (eixo x), cujo a interpretação permitiu a obtenção dos seguintes parâmetros: carga máxima (N), deslocamento (mm), resiliência (J), tenacidade (J), rigidez (N/mm), deslocamento no ponto de fratura (mm) e carga máxima no ponto de fratura (N) (Figura 10).

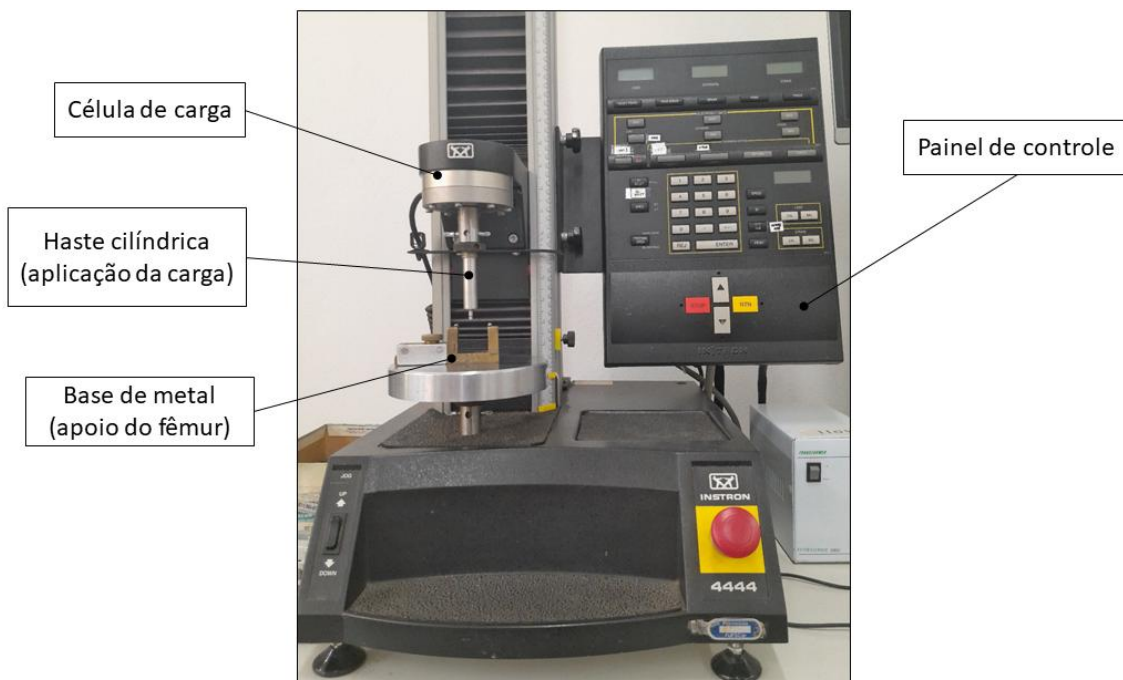


Figura 9 – Máquina de ensaios Instron® 4444. Fonte: elaborada pelo autor.

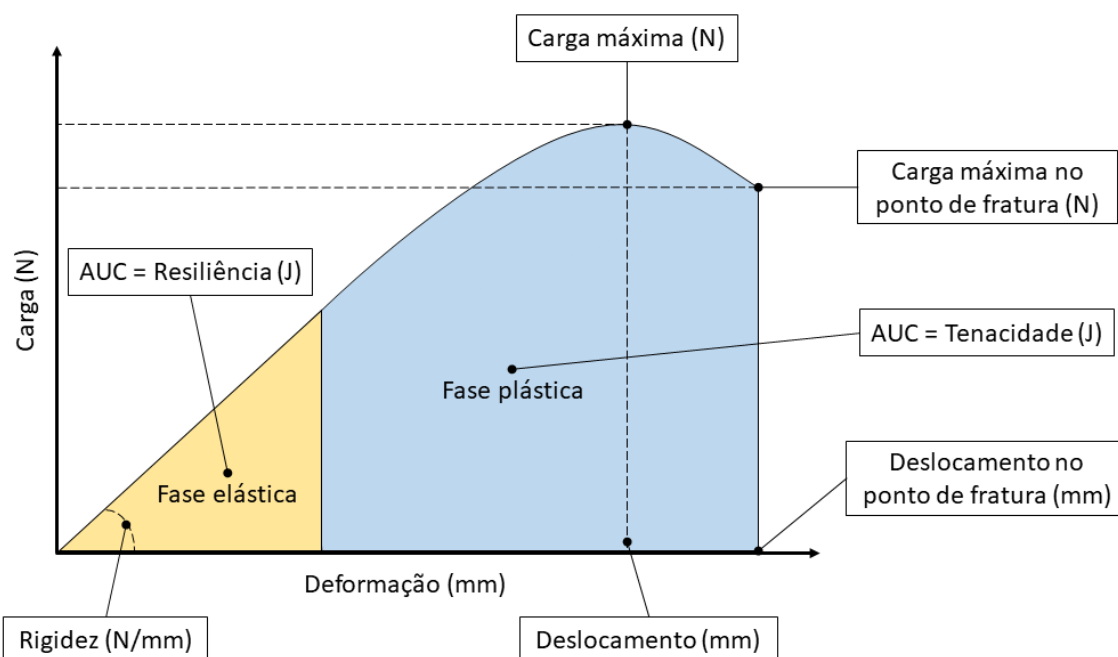


Figura 10 – Representação do gráfico de carga x deformação gerado após o teste. Fonte: elaborada pelo autor. Carga máxima: maior carga suportada no teste; deslocamento: distância percorrida pela haste cilíndrica na carga máxima; resiliência: área sob a curva da fase elástica (linear); tenacidade: área sob a curva de todo o gráfico; rigidez: ângulo de inclinação da fase elástica; carga máxima no ponto de fratura: maior carga suportada no momento de fratura do fêmur; deslocamento no ponto de fratura: distância percorrida pela haste cilíndrica no momento de fratura. AUC: área sob a curva; N: newton; J: joules; mm: milímetros.

4.8.4 Parâmetros bioquímicos

Após a obtenção dos parâmetros anteriores, os fêmures foram colocados em tubos de ensaio e dissolvidos em ácido clorídrico (HCl) numa quantidade de 1 mL para cada 12 mm de comprimento. Posteriormente, a dissolução foi diluída em água mili-Q nas concentrações de 1:500 e 1:1000 para obtenção do conteúdo de cálcio e fósforo (POLISEL *et al.*, 2021; BECK *et al.*, 2025).

O conteúdo de cálcio foi obtido a partir da pipetagem de 3 µL da diluição de 1:500 em microplacas com a posterior adição de 300 µL de reagente de cálcio (#1770050, Laborlab, São Paulo, Brasil) e as mesmas permaneceram incubadas por 2 minutos a 25 °C. A incubação permitiu a reação das moléculas de cálcio com as moléculas de arsenazo III contidas no reagente, o que gerou um complexo de coloração azulada. Em seguida, os valores de absorvância das microplacas foram obtidos em um espectrofotômetro sob o comprimento de onda de 650 nm e, posteriormente, apresentados em mg/g de tecido.

Para obtenção do conteúdo de fósforo, 3 µL da diluição de 1:1000 foi pipetado em microplacas com subsequente adição de 300 µL de reagente de fósforo (#1770250, Laborlab, São Paulo, Brasil). As placas foram incubadas por 10 minutos a 25 °C, facilitando a formação do complexo fosfomolibdico (fósforo inorgânico mais molibdênio). Posteriormente, os valores de absorvância foram obtidos sob o comprimento de onda de 340 nm para serem apresentados em mg/g de tecido.

4.9 Análise estatística

Os dados foram processados utilizando o software Statistica 7.0 (StatSoft, Inc.; Tulsa, Oklahoma, United States) e apresentados em média±desvio padrão. Previamente, os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk, o que permitiu a adoção da estatística paramétrica por meio da análise de variância (ANOVA) de até três vias, sendo elas: tempo, RC (comparação entre os dados dos animais que foram submetidos à RC com os não foram) e ovariectomia (comparação entre os dados dos animais que foram submetidos à ovariectomia com os que não foram). Para os dados referentes à massa corporal, AFE e

consumo de ração foi verificada a influência dos três efeitos (tempo, RC e ovariectomia). Sob os resultados da AFE foi obtida a área sob a curva (AUC) utilizando o software Prism® 5.0 (GraphPad Software; Massachusetts, Boston, United States) e o valor do grupo controle (C) foi considerado 100% para comparação com os outros grupos. Os demais dados, como a massa dos tecidos adiposos, o conteúdo de triglicerídeos no músculo esquelético e no fígado e os parâmetros biométricos, biomecânicos, biofísicos e bioquímicos foram submetidos à ANOVA de duas vias (RC e ovariectomia). O post-hoc de Newman-Keuls foi utilizado para todos os dados submetidos à ANOVA, afim da comparação entre os grupos e, para todas as análises, um critério de significância de 5% foi estabelecido ($p < 0.05$).

5 RESULTADOS

5.1 Massa corporal, consumo alimentar e atividade física espontânea

Ao longo das 12 semanas de experimento, a análise de variância demonstrou que a ovariectomia e o tempo aumentaram significativamente a massa corporal ($F= 365.93$, $p < 0.001$ e $F= 4.55$, $p < 0.001$, respectivamente), enquanto a RC a diminui significativamente ($F= 83.46$, $p < 0.001$) (Figura 11A). Em relação ao consumo alimentar, a ovariectomia também causou aumento significativo do mesmo ao longo das 12 semanas ($F= 454.63$, $p < 0.001$), ao passo que o tempo e a RC o diminuíram significativamente ($F= 15.77$, $p < 0.001$ e $F= 1474.6$, $p < 0.001$, respectivamente) (Figura 11B).

No que diz respeito a AFE, o efeito principal do tempo causou redução significativa ao longo de 6 quinzenas ($F= 2.5$, $p < 0.05$). No entanto, a ovariectomia não promoveu efeito significativo ($F= 1.99$, $p= 0.16$), assim como a RC ($F= 1.35$, $p= 0.25$) (Figura 11C). Por outro lado, a AUC da AFE foi 12.98% menor no grupo C-RC, 14.45% no grupo OVX e 11.98% menor no grupo OVX-RC em relação ao grupo controle (Figura 11D).

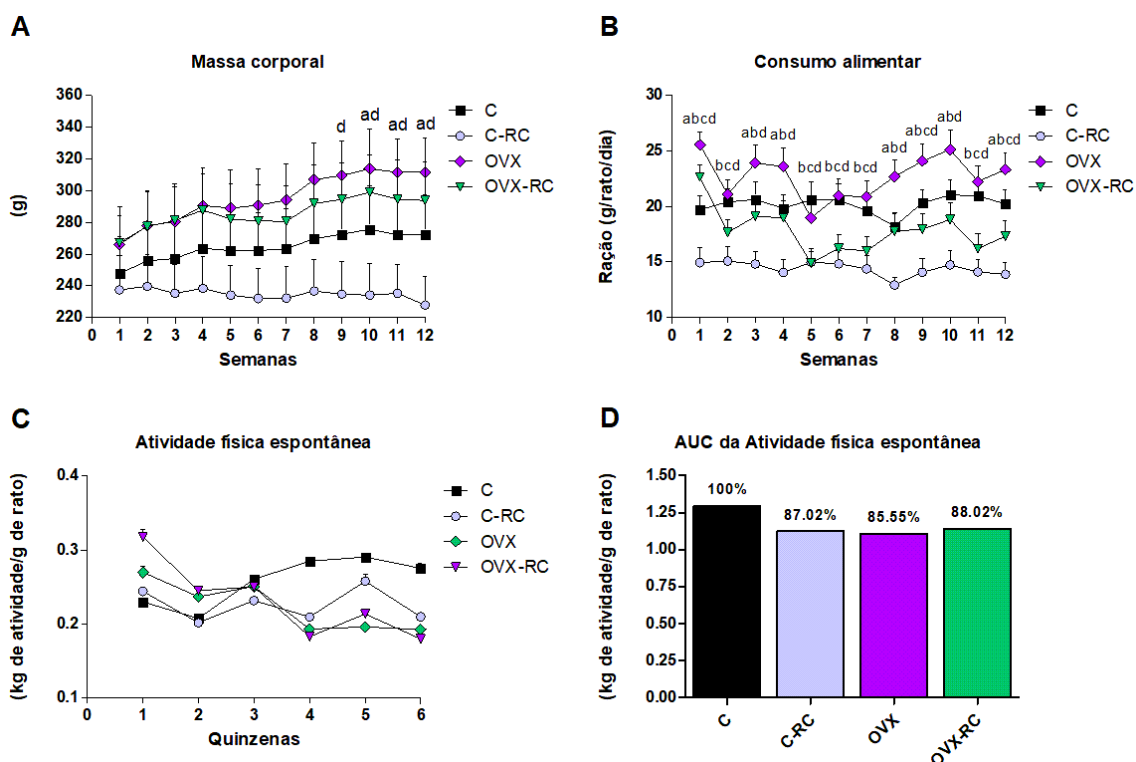


Figura 11 – Representação gráfica da massa corporal (A), do consumo alimentar (B), da atividade física espontânea (C) e da AUC da atividade física espontânea dos grupos controle (C), controle mais restrição calórica (C-RC), ovariectomizado (OVX) e ovariectomizado mais restrição calórica (OVX-RC). Fonte: elaborada pelo autor. Valores expressos em média±desvio padrão. Símbolos estatísticos do post-hoc de Newman-Keuls: ^ap <0.05 OVX vs C na mesma semana; ^bp <0.05 OVX-RC vs OVX na mesma semana; ^cp <0.05 OVX-RC vs C na mesma semana; ^dp <0.05 C-RC vs C na mesma semana. g: gramas; kg: quilogramas.

5.2 Massa dos tecidos adiposos

A ovariectomia levou ao aumento da massa absoluta e relativa do tecido adiposo subcutâneo (F= 12.19, p <0.01 e F= 25.31, p <0.001, respectivamente), enquanto a RC levou à redução de ambas (F= 77.02, p <0.001 e F= 85.88, p <0.001, respectivamente) (Figura 12A, B).

Em relação a gordura visceral, tanto a massa absoluta quanto a relativa do tecido adiposo peritoneal aumentaram significativamente devido a ovariectomia (F= 39.98, p <0.001 e F= 27.94, p <0.001, respectivamente) ao mesmo tempo que ambas diminuíram significativamente devido a RC (F= 187.60, p <0.001 e F= 245.01, p <0.001, respectivamente). A massa absoluta do tecido adiposo perigonadal aumentou devido a ovariectomia (F= 14.56, p <0.01), assim como a massa relativa (F= 5.32, p <0.05) e a RC diminuiu ambas (F= 75.14, p <0.001 e F= 113.73, p <0.001, respectivamente) (Figura 12C, D, E, F).

No que diz respeito ao tecido adiposo marrom, a ovariectomia não causou efeito significativo na massa absoluta (F= 0.33, p= 0.57), porém a massa relativa foi significativamente reduzida (F= 19.65, p <0.001). Além disso, a RC resultou em redução significativa da massa absoluta (F= 49.66, p <0.001), porém a massa relativa não foi afetada (F= 0.75, p= 0.039) (Figura 12G, H).

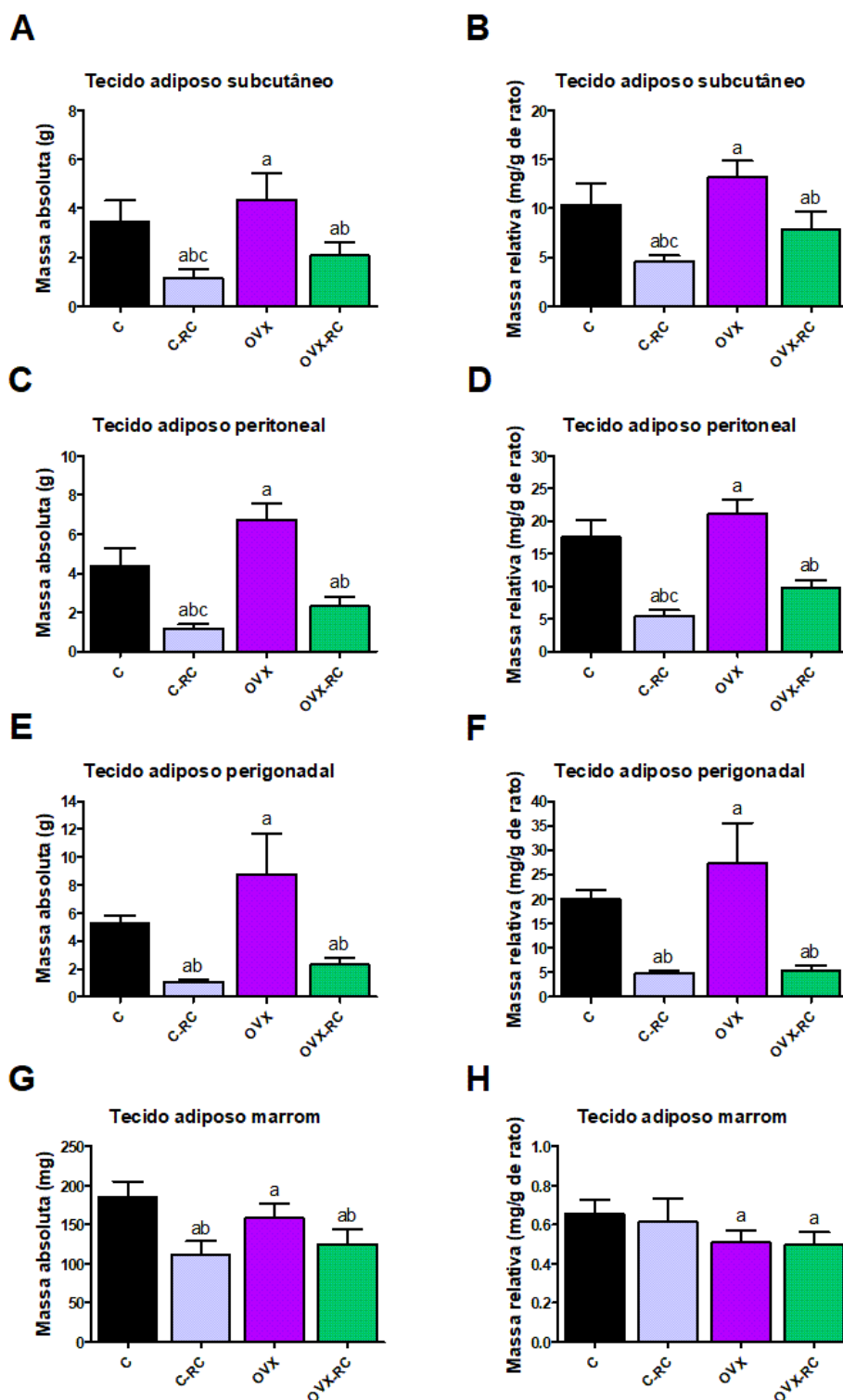


Figura 12 – Dados referentes a massa absoluta (A) e relativa (B) do tecido adiposo subcutâneo, absoluta (C) e relativa (D) do tecido adiposo peritoneal, absoluta (E) e relativa (F) do tecido adiposo perigonadal e absoluta (G) e relativa (H) do tecido adiposo marrom dos grupos controle (C), controle mais restrição calórica (C-RC), ovariectomizado (OVX) e ovariectomizado mais restrição calórica (OVX-RC). Fonte: elaborada pelo autor. Valores expressos em média±desvio padrão.

Símbolos estatísticos do post-hoc de Newman-Keuls: ^ap <0.05 vs C; ^bp <0.05 vs OVX; ^cp <0.05 vs OVX-RC. mg: miligramas; g: gramas.

5.3 Conteúdo de triglicerídeos no músculo esquelético e no fígado

A ovariectomia resultou em aumento significativo do conteúdo de triglicerídeos nos músculos sóleo, gastrocnêmio branco e vermelho e no glúteo máximo (F= 24.26, p <0.001; F= 5.16, p <0.05; F= 11.96, p <0.01; e F= 13.34, p <0.01, respectivamente), enquanto a RC promoveu redução significativa em todos os esses músculos (F= 6.41, p <0.05; F= 10.89, p <0.01; F= 6.83, p <0.05; e F= 10.15, p <0.01, respectivamente) (Figura 13A, B, C, D). O conteúdo de triglicerídeos no fígado aumentou significativamente devido a ovariectomia (F= 9.32, p <0.01), porém a RC não promoveu efeito significativo (F= 2.22, p= 0.15) (Figura 13E).

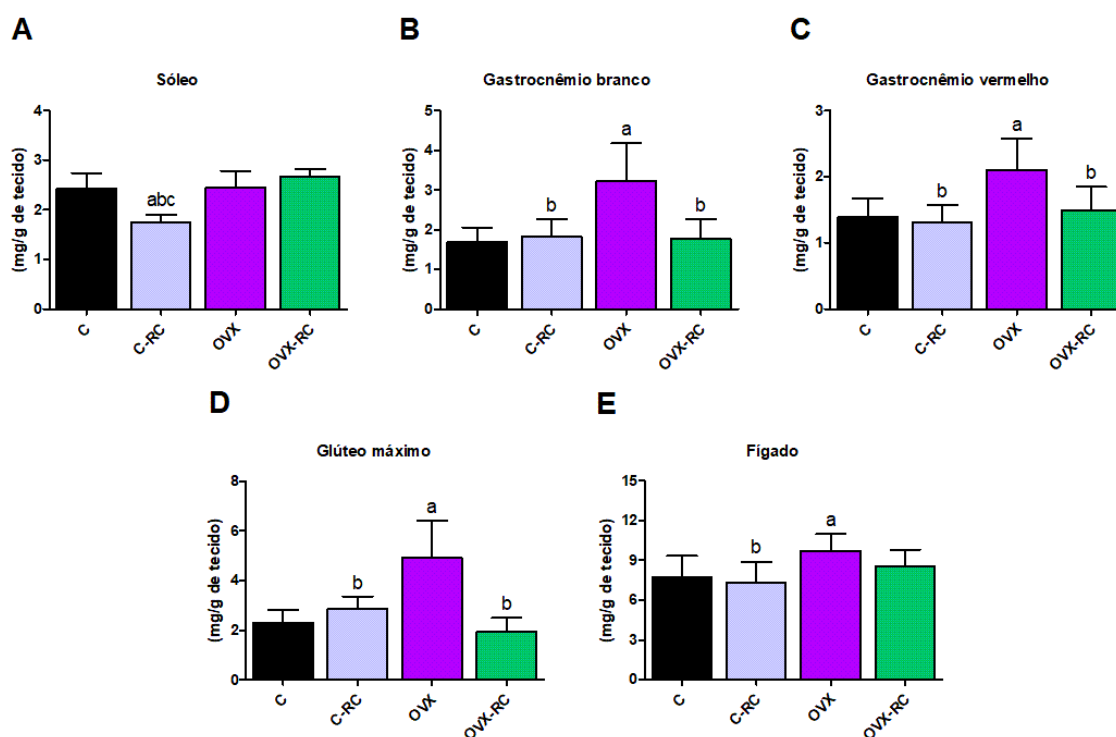


Figura 13 – Dados referentes ao conteúdo de triglicerídeos nos músculos sóleo (A), gastrocnêmio branco (B) e vermelho (C), glúteo máximo (D) e fígado (E) dos grupos controle (C), controle mais restrição calórica (C-RC), ovariectomizado (OVX) e ovariectomizado mais restrição calórica (OVX-RC). Fonte: elaborada pelo autor. Valores expressos em média±desvio padrão. Símbolos estatísticos do post-hoc de Newman-Keuls: ^ap <0.05 vs C; ^bp <0.05 vs OVX; ^cp <0.05 vs OVX-RC. mg: miligramas; g: gramas.

5.4 Parâmetros biométricos e biomecânicos do fêmur

O comprimento e o diâmetro maior do fêmur aumentaram significativamente devido a ovariectomia ($F= 24.71$, $p <0.001$ e $F= 10.22$, $p <0.01$, respectivamente), contudo o diâmetro menor não foi afetado ($F= 0.24$, $p= 0.60$). A RC não afetou o comprimento do fêmur ($F= 0.13$, $p= 0.72$), porém diminuiu tanto o diâmetro maior quanto o menor ($F= 11.41$, $p <0.01$ e $F= 5.66$, $p <0.05$, respectivamente) (Tabela 1).

A carga máxima, o deslocamento, a resiliência, a rigidez e a carga máxima no ponto de fratura não foram afetados pela ovariectomia ($F= 0.06$, $p= 0.80$; $F= 0.71$, $p= 0.41$; $F= 2.67$, $p= 0.12$; $F= 0.001$, $p= 0.98$ e $F= 1.65$, $p= 0.21$, respectivamente), ao passo que a tenacidade e o deslocamento no ponto de fratura aumentaram significativamente ($F= 6.20$, $p <0.05$ e $F= 12.42$, $p <0.01$, respectivamente). A RC aumentou significativamente a carga máxima ($F= 6.5$, $p <0.05$), porém não afetou o deslocamento, a resiliência, a tenacidade, a rigidez e o deslocamento e carga máxima no ponto de fratura ($F= 2.83$, $p= 0.11$; $F= 3.32$, $p= 0.09$; $F= 0.06$, $p= 0.80$; $F= 0.97$, $p= 0.34$; $F= 2.83$, $p= 0.11$ e $F= 1.51$, $p= 0.23$, respectivamente) (Tabela 1).

Tabela 1 – Parâmetros biométricos e biomecânicos do fêmur.

Variável	C	C-RC	OVX	OVX-RC
Comprimento (mm)	37.14±0.62	36.87±0.65 ^{bc}	37.93±0.54 ^a	38.36±0.74 ^a
Diâmetro maior (mm)	5.19±0.33	4.83±0.24 ^{abc}	5.48±0.25	5.18±0.25
Diâmetro menor (mm)	3.15±0.14	2.98±0.10 ^a	3.06±0.13 ^a	3.02±0.11 ^a
Carga máxima (N)	190.06±8.40	205.53±11.48	191.54±17.22	201.43±11.42
Deslocamento (mm)	0.77±0.07	0.79±0.06	0.81±0.05	0.78±0.05
Resiliência (J)	0.09±0.01	0.10±0.01	0.10±0.01	0.11±0.01
Tenacidade (J)	0.11±0.01	0.11±0.01	0.13±0.01 ^a	0.12±0.01
Rigidez (N/mm)	575.22±28.5	564.26±41.48	581.60±70.36	556.73±41.10
Deslocamento no ponto de fratura (mm)	185.79±12.12	192.97±13.58 ^c	203.96±21.77	216.84±12.13 ^a
Carga máxima no ponto de fratura (N)	0.82±0.06	0.80±0.07	0.80±0.06	0.88±0.07

Valores expressos em média±desvio padrão. Símbolos estatísticos do post-hoc de Newman-Keuls: ^a $p <0.05$ vs C; ^b $p <0.05$ vs OVX; ^c $p <0.05$ vs OVX-RC. mm: milímetros; N: newton; J: joules.

5.5 Parâmetros biofísicos e bioquímicos do fêmur

O volume ósseo, a densidade óssea e a densidade mineral óssea diminuíram significativamente devido a ovariectomia ($F= 5.12$, $p <0.05$; $F= 10.73$, $p <0.01$ e $F= 7.68$, $p <0.01$, respectivamente), enquanto a RC também diminuiu a densidade mineral óssea ($F= 4.34$, $p <0.05$), mas não afetou o volume ósseo ($F= 0.01$, $p= 0.90$) ou a densidade óssea ($F= 1.4$, $p= 0.24$). A porcentagem de água óssea não foi afetada pela ovariectomia ($F= 2.13$, $p= 0.16$) ou pela RC ($F= 2.81$, $p= 0.11$), contudo, a porcentagem de material orgânico aumentou significativamente devido a ambos os efeitos ($F= 43.17$, $p <0.001$ e $F= 5.23$, $p <0.05$, respectivamente), assim como a porcentagem de material mineral diminuiu significativamente devido a ambos ($F= 4.33$, $p <0.05$ e $F= 10.25$, $p <0.01$, respectivamente) (Figura 14A, B, C, D, E, F).

Em função da ovariectomia ou da RC, a quantidade de cinzas ósseas não foi afetada ($F= 3.83$, $p= 0.06$ e $F= 1.85$, $p= 0.19$, respectivamente), porém o conteúdo de cálcio diminuiu significativamente devido a ovariectomia ($F= 5.48$, $p <0.05$) e aumentou devido a RC ($F= 16.46$, $p <0.001$), enquanto o conteúdo de fósforo diminuiu devido a ambos os efeitos ($F= 39.31$, $p <0.001$ e $F= 24.36$, $p <0.001$, respectivamente) (Figura 14G, H, I).

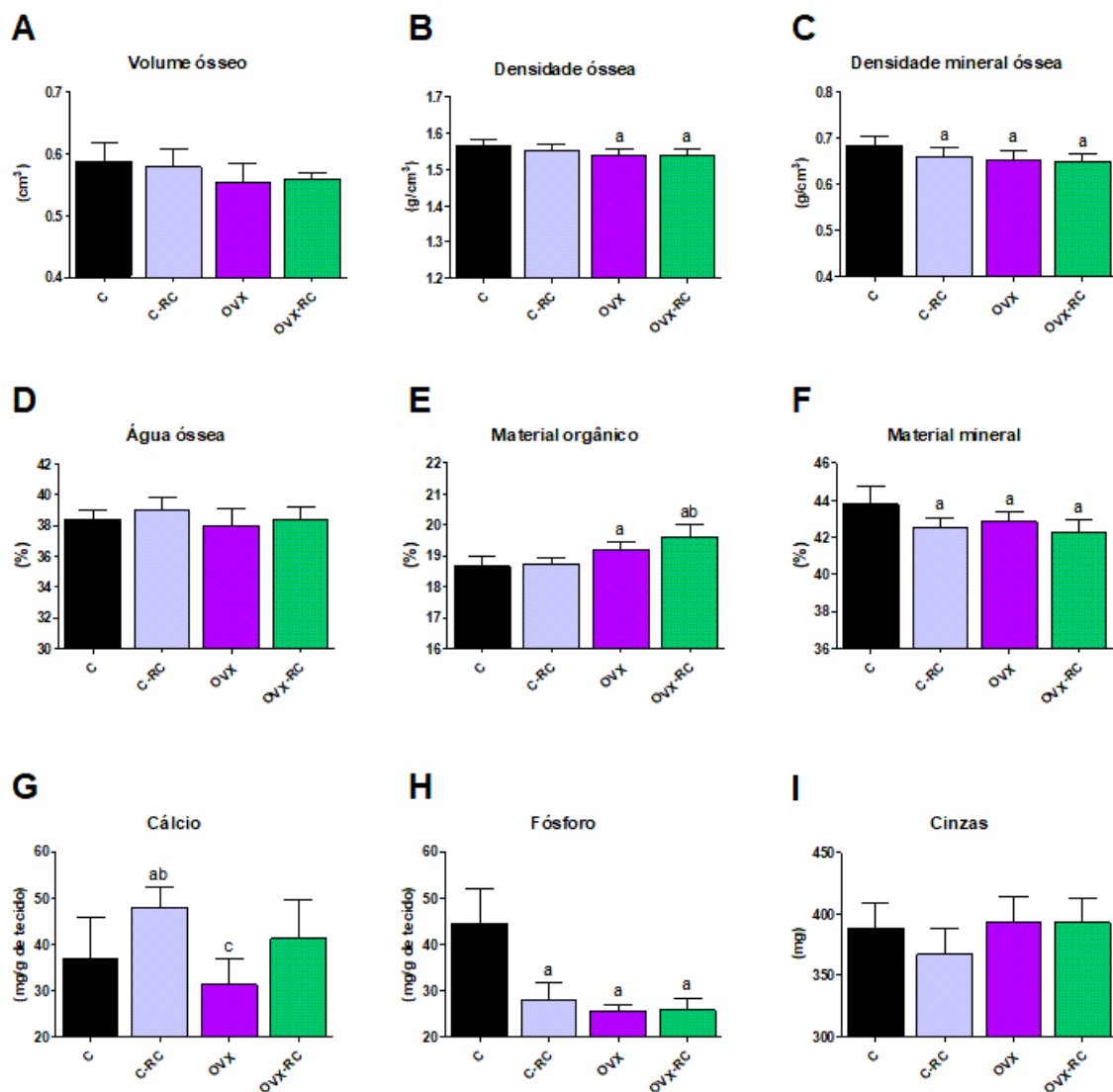


Figura 14 – Representação gráfica dos dados de volume ósseo (A), densidade óssea (B), densidade mineral óssea (C), porcentagem de água óssea (D), material orgânico (E) e mineral (F) e conteúdo de cálcio (G), fósforo (H) e cinzas (I) dos grupos controle (C), controle mais restrição calórica (C-RC), ovariectomizado (OVX) e ovariectomizado mais restrição calórica (OVX-RC). Fonte: elaborada pelo autor. Valores expressos em média±desvio padrão. Símbolos estatísticos do post-hoc de Newman-Keuls: ^ap <0.05 vs C; ^bp <0.05 vs OVX; ^cp <0.05 vs OVX-RC. cm³: centímetros cúbicos; g: gramas; mg: miligramas.

6 DISCUSSÃO

De maneira geral, este trabalho demonstrou que o estado de hipoestrogenismo leva à prejuízos à massa corporal e adiposa e à densidade mineral óssea, e que 12 semanas de 20% de RC foram capazes de melhorar a composição corporal sem causar prejuízos adicionais à saúde óssea dos animais ovariectomizados.

Ao final das 12 semanas de experimento, foi encontrado aumento na massa corporal devido ao déficit de estrogênios, o que é comumente observado (KIM *et al.*, 2020; XIA *et al.*, 2024). Esse resultado foi provavelmente causado pelo aumento do consumo alimentar e pela menor quantidade de atividade física espontânea nos grupos dos animais ovariectomizados, demonstrado pela análise da área sob a curva da análise gravimétrica, na qual representa outro componente importante relacionado ao controle ponderal (KOTZ *et al.*, 2017). Ainda, outro fator que pode ter contribuído para o aumento da massa corporal é a diminuição da massa relativa do tecido adiposo marrom, o que pode ser consequência da menor atividade termogênica provocada pelo hipoestrogenismo (YOSHIOKA *et al.*, 1988). É sabido que os receptores de estrogênios são expressos em diversas áreas hipotalâmicas responsáveis pelo balanço energético (LAFLAMME *et al.*, 1998). Baseado nisso, a ausência dos estrogênios provavelmente levou ao desbalanço desse mecanismo, promovendo o ganho ponderal pelo aumento do consumo alimentar e diminuição do gasto energético.

Em adição ao ganho ponderal, um aumento na massa do tecido adiposo visceral devido ao hipoestrogenismo também foi observado, similar ao encontrado por Sutjarit *et al.* (2018) e Fonseca *et al.* (2021). A gordura visceral está fortemente relacionada a emergência de diversos problemas de saúde, como resistência à insulina, hipertensão, dislipidemias e, eventualmente, síndrome metabólica (NEELAND *et al.*, 2024). Esse aumento no estado de hipoestrogenismo pode ser explicado pela ampla distribuição do receptor de estrogênio alfa (ER α) nos adipócitos viscerais, no qual é responsável por estimular a lipólise e controlar o acúmulo de gordura (LIZCANO, 2022).

Além da expansão do tecido adiposo, um aumento no conteúdo de triglicerídeos em alguns músculos esqueléticos e no fígado devido ao déficit de

estrogênios foi encontrado nesse estudo. O aumento da deposição de gordura em tecidos ectópicos devido à ovariectomia já foi anteriormente reportado (LEITE *et al.*, 2009) e pode ser consequência do comprometimento do metabolismo energético nesses tecidos. De fato, já foi demonstrado que o hipoestrogenismo é capaz de reduzir o conteúdo de proteínas chaves do metabolismo no músculo, como o FAT CD36 (do inglês, *fatty acid transporter 36*) (PEJON *et al.*, 2022a) e do proliferador de peroxissoma-1 alfa (PGC-1 α) (PEJON *et al.*, 2022b), o que compromete o transporte e a oxidação dos ácidos graxos e leva ao acúmulo de gordura nesses tecidos.

Apesar das alterações deletérias na composição corporal observadas, 12 semanas de 20% de RC reduziram a massa corporal e do tecido adiposo visceral e o acúmulo de gordura ectópica. Resultados similares sobre a massa corporal utilizando o mesmo tempo de intervenção foram previamente encontrados, contudo, estes estudos utilizaram restrições mais severas, como 35 (PRASANNARONG; VICHAIWONG; SAENGSIKISUWAN, 2012) e 50% (PÓSA *et al.*, 2015). Embora a redução do acúmulo de gordura tenha sido causada pelo balanço energético negativo devido ao menor suprimento de alimento, um aumento na expressão de PGC-1 α dado da RC de forma crônica foi encontrado no fígado e nos músculos esqueléticos (RANHOTRA, 2010), bem como nos tecidos adiposos brancos (PARDO *et al.*, 2019), indicando uma modulação positiva na capacidade oxidativa destes tecidos. Além disso, no presente estudo, os dados de post-hoc demonstraram que o grupo OVX-RC apresentou menor quantidade de tecido adiposo branco quando comparado com o grupo controle (Figura 12), ressaltando o benefício da restrição calórica apesar do hipoestrogenismo. A atividade física espontânea é outro resultado no qual a análise de área sob a curva demonstrou diminuição nos grupos RC e OVX-RC. Devido ao tempo de intervenção, esse resultado pode representar um mecanismo adaptativo para poupar energia (SANTOS-PINTO; LUZ; GRIGGIO, 2001). No entanto, mesmo que isso reflita no gasto energético total, essa redução não foi suficiente para impedir a melhora na composição corporal.

Ratas ovariectomizadas são consideradas modelo para estudar osteoporose (YOUSEFZADEH *et al.*, 2020). Em condições normais os estrogênios agem no tecido ósseo, bloqueando a ação do RANKL por meio do aumento da expressão de

osteoprotegerina, o que diminui a diferenciação osteoclástica e preserva a massa óssea (GOSSET; POUILLÈS; TRÉMOLLIERES, 2021). Nesse estudo, após 12 semanas de exposição ao hipoestrogenismo, foi encontrado diminuição na densidade mineral óssea, o que corrobora com a diminuição da densidade óssea e do conteúdo mineral ósseo. Apesar disso, de forma geral, as propriedades biomecânicas do fêmur não foram afetadas pela ovariectomia. Esse resultado foi provavelmente causado devido a idade dos animais, uma vez que algumas alterações ósseas só podem ser notadas após 6 meses de idade dos mesmos (YOUSEFZADEH *et al.*, 2020). Contudo, embora no estado de hipoestrogenismo a ausência dos hormônios estrogênicos seja a principal causa de prejuízos ao tecido ósseo, o aumento da gordura corporal também pode ser prejudicial (KIM *et al.*, 2010). O aumento da adiposidade visceral está relacionado com altas concentrações de citocinas pró-inflamatórias (WANG; HE, 2018), além do aumento da adiposidade na medula óssea (BREDELLA *et al.*, 2011), o que implica na reabsorção óssea de forma exacerbada e, eventualmente, a perda óssea. Esse mecanismo pode suportar o fato de que, apesar da idade, houve prejuízos às propriedades biofísicas do fêmur devido à ovariectomia neste estudo.

Por outro lado, a análise de variância demonstrou que 20% de RC também levou à diminuição da densidade mineral óssea ($F= 4.34$, $p < 0.05$). Contudo, essa redução não foi suficiente para afetar as propriedades biomecânicas do fêmur, diferentemente do encontrado por Talbott *et al.* (2001), no qual utilizou uma restrição de 40% por 9 semanas em seu estudo. A dieta exerce um papel crucial na formação óssea (PROIA *et al.*, 2021) e, de fato, a diminuição no suprimento de alimento pode levar à diminuição das concentrações séricas de cálcio, o que estimula a liberação do paratormônio e, conseqüentemente, a reabsorção óssea (RICCI *et al.*, 2001). No entanto, ao olhar para os dados de post-hoc, o grupo OVX-RC não demonstrou diferença na densidade óssea, densidade mineral óssea e no material mineral ósseo quando comparado com o grupo OVX (Figura 14). Uma vez que esses grupos apresentam condições similares, a RC não foi capaz de trazer prejuízos adicionais. Resultados semelhantes foram encontrados por Fisher, Kohrt e Brown (2000), que utilizaram 20% de restrição por 4 semanas. Uma possível explicação do porque a RC não levou à piora da saúde óssea nesse cenário, é que a redução ponderal pode ter ocasionado diminuição das concentrações das

citocinas pró-inflamatórias (IMAYAMA *et al.*, 2012), o que diminui a reabsorção óssea. No entanto, em seu estudo, Ahn *et al.* (2014) encontraram uma redução na densidade mineral óssea das ratas ovariectomizadas submetidas a 8 semanas de 50% de RC quando comparadas com as ovariectomizadas *ad libitum*, indicando que o tempo de intervenção e a porcentagem de restrição provavelmente refletem no resultado final.

Embora um cuidado extremo tenha sido levado em consideração para a condução deste estudo, o mesmo não está livre de limitações. A alocação dos animais em gaiolas individuais poderia ter permitido uma extração mais precisa dos dados referentes ao consumo alimentar dos mesmos. No entanto, levando em consideração que ratos são animais sociais, sua subsequente separação com o início do período experimental poderia gerar um estresse desnecessário (KRIMBERG *et al.*, 2022), intervindo diretamente nas intervenções estudadas. Além disso, no presente estudo, não houve suplementação de cálcio para os animais submetidos à RC, afim da compensação da possível baixa disponibilidade desse nutriente devido a diminuição da oferta de alimento. Uma vez que o mesmo representa um nutriente chave para o metabolismo ósseo, sua suplementação poderia ter influenciado positivamente os resultados referentes à RC. Ademais, após a identificação de resultados referentes ao tempo de intervenção e porcentagem de restrição, análises moleculares podem ser necessárias para ajudar no entendimento dos mesmos, permitindo futuros ajustes.

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, este estudo demonstrou que 12 semanas de 20% de RC foram suficientes para prevenir o ganho de massa e adiposidade corporal no estado de hipoestrogenismo sem levar à prejuízos adicionais às propriedades ósseas. Considerando que a ovariectomia é um modelo amplamente utilizado para simular a menopausa em animais, os resultados deste estudo podem ter implicações para mulheres na pós-menopausa que se encontram em sobrepeso ou obesidade. No entanto, deve-se ter cautela ao usar a RC como intervenção, uma vez que seus efeitos no tecido ósseo não são totalmente compreendidos. Futuros estudos utilizando diferentes tempos de intervenção e porcentagem de restrição são necessários para ajudar a elucidar em nível molecular a relação entre RC e saúde óssea no estado de hipoestrogenismo.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AVMA - American Veterinary Medical Association. **Guidelines for the euthanasia of animals: 2020 edition**. AVMA, Schaumber, Illinois, 2020.

AHN, H. *et al.* Calorie restriction aggravated cortical and trabecular bone architecture in ovariectomy-induced estrogen-deficient rats. **Nutrition Research**, v. 34, n. 8, p. 707–713, 2014.

AKHTER, M. P. *et al.* Bone biomechanical properties in LRP5 mutant mice. **Bone**, v. 35, n. 1, p. 162–169, 2004.

ANAGNOSTIS, P. *et al.* Estrogen and bones after menopause: a reappraisal of data and future perspectives. **Hormones**, v. 20, n. 1, p. 13–21, 2021.

ARCEO-MENDOZA, R. M.; CAMACHO, P. M. Postmenopausal Osteoporosis. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 50, n. 2, p. 167–178, 2021.

BECK, W. R. *et al.* Living High-Training Low on Mice Bone Parameters Analyzed through Complex Network Approach. **International Journal of Sports Medicine**, v. 46, n. 01, p. 32–40, 2025.

BEHRENDT, A.-K. *et al.* Dietary Restriction-Induced Alterations in Bone Phenotype: Effects of Lifelong Versus Short-Term Caloric Restriction on Femoral and Vertebral Bone in C57BL/6 Mice. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 31, n. 4, p. 852–863, 2016.

BIESIADECKI, B. J. *et al.* A Gravimetric Method for the Measurement of Total Spontaneous Activity in Rats. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 222, n. 1, p. 65–69, 1999.

BLÜHER, M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 15, n. 5, p. 288–298, 2019.

BREDELLA, M. A. *et al.* Vertebral Bone Marrow Fat Is Positively Associated With Visceral Fat and Inversely Associated With IGF-1 in Obese Women. **Obesity**, v. 19, n. 1, p. 49–53, 2011.

BROWN, J. A.; WOODWORTH, H. L.; LEINNINGER, G. M. To ingest or rest? Specialized roles of lateral hypothalamic area neurons in coordinating energy balance. **Frontiers in Systems Neuroscience**, v. 9, n. FEB, p. 1–25, 2015.

CARPENTIER, A. C. *et al.* Brown Adipose Tissue—A Translational Perspective. **Endocrine Reviews**, v. 44, n. 2, p. 143–192, 2023.

CAULEY, J. A. Estrogen and bone health in men and women. **Steroids**, v. 99, n. Part A, p. 11–15, 2015.

CERQUEIRA, F. M.; KOWALTOWSKI, A. J. Commonly adopted caloric restriction protocols often involve malnutrition. **Ageing Research Reviews**, v. 9, n. 4, p. 424–430, 2010.

DAVIS, S. R. *et al.* Menopause. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, n. 1, p. 15004, 2015.

EASTELL, R. *et al.* Postmenopausal osteoporosis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, n. 1, p. 16069, 2016.

FISHER, J. S.; KOHRT, W. M.; BROWN, M. Food restriction suppresses muscle growth and augments osteopenia in ovariectomized rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 88, n. 1, p. 265–271, 2000.

FLANAGAN, E. W. *et al.* Calorie Restriction and Aging in Humans. **Annual Review of Nutrition**, v. 40, n. 1, p. 105–133, 2020.

FLORES, V. A.; PAL, L.; MANSON, J. E. Hormone Therapy in Menopause: Concepts, Controversies, and Approach to Treatment. **Endocrine Reviews**, v. 42, n. 6, p. 720–752, 2021.

FÖGER-SAMWALD, U. *et al.* Osteoporosis: Pathophysiology and therapeutic options. **EXCLI Journal**, v. 19, p. 1017–1037, 2020.

FONSECA, H. *et al.* Association between Visceral and Bone Marrow Adipose Tissue and Bone Quality in Sedentary and Physically Active Ovariectomized Wistar Rats. **Life**, v. 11, n. 6, p. 478, 2021.

FRAMPTON, J. *et al.* Short-chain fatty acids as potential regulators of skeletal muscle metabolism and function. **Nature Metabolism**, v. 2, n. 9, p. 840–848, 2020.

FRONTERA, W. R.; OCHALA, J. Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. **Calcified Tissue International**, v. 96, n. 3, p. 183–195, 2015.

FUENTES, N.; SILVEYRA, P. Estrogen receptor signaling mechanisms. *In*: **ADVANCES IN PROTEIN CHEMISTRY AND STRUCTURAL BIOLOGY**. 1. ed. Elsevier Inc., 2019. v. 116, p. 135–170.

GARLAND, T. *et al.* The biological control of voluntary exercise, spontaneous physical activity and daily energy expenditure in relation to obesity: human and rodent perspectives. **Journal of Experimental Biology**, v. 214, n. 2, p. 206–229, 2011.

GONZÁLEZ-GARCÍA, I.; TENA-SEMPERE, M.; LÓPEZ, M. Estradiol Regulation of Brown Adipose Tissue Thermogenesis. *In*: **ADVANCES IN EXPERIMENTAL MEDICINE AND BIOLOGY**, v. 1043, p. 315–335, 2017.

GOSSET, A.; POUILLÈS, J.-M.; TRÉMOLLIÈRES, F. Menopausal hormone therapy for the management of osteoporosis. **Best Practice & Research Clinical**

Endocrinology & Metabolism, v. 35, n. 6, p. 101551, 2021.

HAMRICK, M. W. *et al.* Caloric Restriction Decreases Cortical Bone Mass but Spares Trabecular Bone in the Mouse Skeleton: Implications for the Regulation of Bone Mass by Body Weight. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 23, n. 6, p. 870–878, 2008.

HEMMINGSSON, E. *et al.* Weight loss and dropout during a commercial weight-loss program including a very-low-calorie diet, a low-calorie diet, or restricted normal food: observational cohort study. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 96, n. 5, p. 953–961, 2012.

HOFER, S. J. *et al.* The ups and downs of caloric restriction and fasting: from molecular effects to clinical application. **EMBO Molecular Medicine**, v. 14, n. 1, p. 1–20, 2022.

IMAYAMA, I. *et al.* Effects of a Caloric Restriction Weight Loss Diet and Exercise on Inflammatory Biomarkers in Overweight/Obese Postmenopausal Women: A Randomized Controlled Trial. **Cancer Research**, v. 72, n. 9, p. 2314–2326, 2012.

IWASA, T. *et al.* The effects of ovariectomy and lifelong high-fat diet consumption on body weight, appetite, and lifespan in female rats. **Hormones and Behavior**, v. 97, n. September 2017, p. 25–30, 2018.

JI, Z.; LIU, G.-H.; QU, J. Mitochondrial sirtuins, metabolism, and aging. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 49, n. 4, p. 287–298, 2022.

KIM, K.-C. *et al.* Relation between Obesity and Bone Mineral Density and Vertebral Fractures in Korean Postmenopausal Women. **Yonsei Medical Journal**, v. 51, n. 6, p. 857, 2010.

KIM, M. R. *et al.* Combination of Red Clover and Hops Extract Improved Menopause Symptoms in an Ovariectomized Rat Model. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2020, n. 1, 2020.

KOTZ, C. M. *et al.* Spontaneous Physical Activity Defends Against Obesity. **Current Obesity Reports**, v. 6, n. 4, p. 362–370, 2017.

KRIMBERG, J. S. *et al.* Impact of social isolation on the oxytocinergic system: A systematic review and meta-analysis of rodent data. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 134, n. December 2021, p. 104549, 2022.

KRUIJVER, F. P. M. *et al.* Estrogen-receptor- β distribution in the human hypothalamus: Similarities and differences with ER α distribution. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 466, n. 2, p. 251–277, 2003.

KRUIJVER, F. P. M. *et al.* Estrogen receptor- α distribution in the human hypothalamus in relation to sex and endocrine status. **Journal of Comparative Neurology**, v. 454, n. 2, p. 115–139, 2002.

LAFHAMME, N. *et al.* Expression and neuropeptidergic characterization of estrogen receptors (ER α and ER β) throughout the rat brain: Anatomical evidence of distinct roles of each subtype. **Journal of Neurobiology**, v. 36, n. 3, p. 357–378, 1998.

LEITE, R. D. *et al.* Effects of ovariectomy and resistance training on lipid content in skeletal muscle, liver, and heart; fat depots; and lipid profile. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 34, n. 6, p. 1079–1086, 2009.

LIZCANO, F. Roles of estrogens, estrogen-like compounds, and endocrine disruptors in adipocytes. **Frontiers in Endocrinology**, v. 13, n. September, p. 1–16, 2022.

MAHBOOBIFARD, F. *et al.* Estrogen as a key regulator of energy homeostasis and metabolic health. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 156, n. October, p. 113808, 2022.

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

MENGESTE, A. M.; RUSTAN, A. C.; LUND, J. Skeletal muscle energy metabolism in obesity. **Obesity**, v. 29, n. 10, p. 1582–1595, 2021.

MONTELEONE, P. *et al.* Symptoms of menopause — global prevalence, physiology and implications. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 14, n. 4, p. 199–215, 2018.

NEELAND, I. J. *et al.* Metabolic syndrome. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 10, n. 1, p. 77, 2024.

PARDO, R. *et al.* Calorie restriction prevents diet-induced insulin resistance independently of PGC-1-driven mitochondrial biogenesis in white adipose tissue. **The FASEB Journal**, v. 33, n. 2, p. 2343–2358, 2019.

PEJON, T. M. M. *et al.* Effect of 12-wk Training in Ovariectomised Rats on PGC-1 α , NRF-1 and Energy Substrates. **International Journal of Sports Medicine**, v. 43, n. 07, p. 632–641, 2022.

PEJON, T. M. M. *et al.* Effects of Moderate–Intensity Physical Training on Skeletal Muscle Substrate Transporters and Metabolic Parameters of Ovariectomized Rats. **Metabolites**, v. 12, n. 5, p. 402, 2022.

POLISEL, E. E. C. *et al.* Effects of high-intensity interval training in more or less active mice on biomechanical, biophysical and biochemical bone parameters. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 6414, 2021.

PÓSA, A. *et al.* Exercise Training and Calorie Restriction Influence the Metabolic Parameters in Ovariectomized Female Rats. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, p. 1–8, 2015.

PRASANNARONG, M.; VICHAIWONG, K.; SAENGSIRISUWAN, V. Calorie restriction prevents the development of insulin resistance and impaired insulin signaling in skeletal muscle of ovariectomized rats. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1822, n. 6, p. 1051–1061, 2012.

PROIA, P. *et al.* The Impact of Diet and Physical Activity on Bone Health in Children and Adolescents. **Frontiers in Endocrinology**, v. 12, n. September, p. 704647, 2021.

RANHOTRA, H. S. Long-term caloric restriction up-regulates PPAR gamma co-activator 1 alpha (PGC-1alpha) expression in mice. **Indian journal of biochemistry & biophysics**, v. 47, n. 5, p. 272–277, 2010.

RICCI, T. A. *et al.* Moderate energy restriction increases bone resorption in obese postmenopausal women. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 2, p. 347–352, 2001.

RICHARD, J. E. *et al.* Estradiol is a critical regulator of food-reward behavior. **Psychoneuroendocrinology**, v. 78, p. 193–202, 2017.

SANTOS-PINTO, F. N.; LUZ, J.; GRIGGIO, M. A. Energy expenditure of rats subjected to long-term food restriction. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 52, n. 2, p. 193–200, 2001.

SMITH, A.; WOODSIDE, B.; ABIZAID, A. Ghrelin and the Control of Energy Balance in Females. **Frontiers in Endocrinology**, v. 13, n. July, p. 1–13, 2022.

SUTJARIT, N. *et al.* Curcuma comosa reduces visceral adipose tissue and improves dyslipidemia in ovariectomized rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 215, n. August 2017, p. 167–175, 2018.

TALBOTT, S. M. *et al.* Energy Restriction Reduces Bone Density and Biomechanical Properties in Aged Female Rats. **The Journal of Nutrition**, v. 131, n. 9, p. 2382–2387, 2001.

TATSUMI, S. *et al.* Life-Long Caloric Restriction Reveals Biphasic and Dimorphic Effects on Bone Metabolism in Rodents. **Endocrinology**, v. 149, n. 2, p. 634–641, 2008.

TUAZON, M. A. *et al.* Effects of ovariectomy and exercise training intensity on energy substrate and hepatic lipid metabolism, and spontaneous physical activity in mice. **Metabolism**, v. 83, p. 234–244, 2018.

WANG, T.; HE, C. Pro-inflammatory cytokines: The link between obesity and osteoarthritis. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 44, n. 37, p. 38–50, 2018.

WEIDLINGER, S. *et al.* Impact of estrogens on resting energy expenditure: A systematic review. **Obesity Reviews**, v. 24, n. 10, p. 1–23, 2023.

WESTERBEEK, Z. W.; HEPPLER, R. T.; ZERNICKE, R. F. Effects of Aging and Caloric Restriction on Bone Structure and Mechanical Properties. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 63, n. 11, p. 1131–1136, 2008.

WRONSKA, A.; KMIEC, Z. Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots. **Acta Physiologica**, v. 205, n. 2, p. 194–208, 2012.

XIA, B. *et al.* Lycopene Promotes Osteogenesis and Reduces Adipogenesis through Regulating FoxO1/PPAR γ Signaling in Ovariectomized Rats and Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. **Nutrients**, v. 16, n. 10, p. 1443, 2024.

YOH, K. *et al.* Roles of Estrogen, Estrogen Receptors, and Estrogen-Related Receptors in Skeletal Muscle: Regulation of Mitochondrial Function. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 3, p. 1853, 2023.

YOSHIOKA, K. *et al.* Reduced Brown Adipose Tissue Thermogenesis of Obese Rats After Ovariectomy. **Endocrinologia Japonica**, v. 35, n. 4, p. 537–543, 1988.

YOUSEFZADEH, N. *et al.* Ovariectomized rat model of osteoporosis. **EXCLI Journal**, v. 19, p. 89–107, 2020.

ZARROW M. X. *et al.* **Experimental endocrinology: a sourcebook of basic techniques.** Academic press. New York and London, 1964.

9 ANEXOS

9.1 Composição nutricional da ração

Componente	Quantidade
Umidade (máx)	130,00 g/kg
Proteína bruta (mín)	230,00 g/kg
Extrato etéreo (mín)	40,00 g/kg
Fibra bruta (máx)	120,00 g/kg
Matéria mineral (máx)	100,00 g/kg
Cálcio (mín)	12,00 g/kg
Cálcio (máx)	13,00 g/kg
Fósforo (mín)	8.500,00 mg/kg
Sódio (mín)	2.700,00 mg/kg
Magnésio (mín)	1.500,00 mg/kg
Ferro (mín)	180,00 mg/kg
Cobre (mín)	30,00 mg/kg
Manganês (mín)	110,00 mg/kg
Zinco (mín)	110,00 mg/kg
Iodo (mín)	1,80 mg/kg
Cobalto (mín)	2,00 mg/kg
Selênio (mín)	0,20 mg/kg
Vitamina A (mín)	25.500,00 UI/kg
Vitamina D3 (mín)	4.000,00 UI/kg
Vitamina E (mín)	82,00 UI/kg
Vitamina K3 (mín)	64,00 mg/kg
Vitamina B1 (mín)	11,00 mg/kg
Vitamina B2 (mín)	6,40 mg/kg
Niacina (mín)	219,00 mg/kg
Ácido pantotênico (mín)	61,00 mg/kg
Vitamina B6 (mín)	11,00 mg/kg
Ácido fólico (mín)	13,00 mg/kg
Biotina (mín)	0,30 mg/kg
Vitamina B12 (mín)	40,00 mg/kg
Colina (mín)	1.800,00 mg/kg
Lisina (mín)	12,50 g/kg
Metionina (mín)	3.500,00 mg/kg

9.2 Certificado CEUA



Universidade Federal de São Carlos

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos da Restrição Calórica e do Treinamento Resistido Sobre o Metabolismo Energético de Ratas Ovariectomizadas", protocolada sob o CEUA nº 4420100423 (ID 001781), sob a responsabilidade de **Wladimir Rafael Beck** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) na reunião de 03/05/2023.

We certify that the proposal "Effects of Calorie Restriction and Resistance Training on Energy Metabolism in Ovariectomized Rats", utilizing 150 Heterogenics rats (150 females), protocol number CEUA 4420100423 (ID 001781), under the responsibility of **Wladimir Rafael Beck** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Carlos (CEUA/UFSCAR) in the meeting of 05/03/2023.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de 05/2023 a 05/2026 Área: Centro de Ciências Biológicas E da Saúde

Origem: Biotério Central da UFSCar

Espécie: Ratos heterogênicos

sexo: Fêmeas

idade: 40 a 45 dias

Quantidade: 150

Linhagem: Wistar

Peso: 120 a 150 g

São Carlos, 03 de maio de 2023

Prof. Dr. Luiz Fernando Takase
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos



Profa. Dra. Luciana Thie Seki Dias
Vice-presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos

