

GILBERTO EIJI SHIGUEMOTO

“Efeitos do Treinamento de Força sobre a Densidade Mineral Óssea (DMO): (1) estudo da biomecânica óssea e da atividade da Metaloproteinase -2 (MMP-2) em ratas ovariectomizadas; (2) estudo de biomarcadores inflamatórios e do remodelamento ósseo em mulheres pós-menopáusicas”

ORIENTADOR

PROF. DR. SÉRGIO EDUARDO DE ANDRADE PEREZ

SÃO CARLOS, JULHO DE 2010



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - CCBS

**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS UFSCar/UNESP**
Nível de Doutorado

“Efeitos do Treinamento de Força sobre a Densidade Mineral Óssea (DMO): (1) estudo da biomecânica óssea e da atividade da Metaloproteinase -2 (MMP-2) em ratas ovariectomizadas; (2) estudo de biomarcadores inflamatórios e do remodelamento ósseo em mulheres pós-menopáusicas”¹

ORIENTADOR:
PROF. DR. SÉRGIO EDUARDO DE ANDRADE PEREZ²

DOUTORANDO:
GILBERTO EIJI SHIGUEMOTO³

¹ Tese de Doutorado apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, associação ampla entre o Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos e a Universidade Estadual Paulista – UNESP Araraquara, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor.

² Professor Associado pertencente ao quadro docente do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar.

³ Doutorando do Programa de Pós-Graduação Interinstitucional em Ciências Fisiológicas UFSCar/UNESP.

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

S555et

Shiguemoto, Gilberto Eiji.

Efeitos do treinamento de força sobre a densidade mineral óssea (DMO) : (1) estudo da biomecânica óssea e da atividade da metaloproteinase -2 (MMP-2) em ratas ovariectomizadas; (2) estudo de biomarcadores inflamatórios e do remodelamento ósseo em mulheres pós-menopáusicas / Gilberto Eiji Shiguemoto. -- São Carlos : UFSCar, 2010.

107 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

1. Fisiologia. 2. Osteoporose. 3. Exercício resistido. 4. Citocinas. 5. Menopausa. 6. Metaloprotease. I. Título.

CDD: 612 (20^a)

Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas
Associação Ampla UFSCar/UNESP

Defesa de Tese de Gilberto Eiji Shiguemoto

Prof. Dr. Sergio Eduardo de Andrade Perez.....

Prof. Dr. Fábio Viadanna Serrão.....

Prof. Dr. Ricardo Luís Fernandes Guerra.....

Prof. Dr. Claudio Alexandre Gobatto.....

Profª. Drª. Débora Bevilaqua Grossi.....

Salmo 22

Pelos prados e campinas verdejantes eu vou

É o Senhor que me leva a descansar

Junto às fontes de águas puras repousantes eu vou

Minhas forças o Senhor vai animar

Tu és, Senhor, o meu pastor

Por isso nada em minha vida faltará

Nos caminhos mais seguros junto d'Ele eu vou

E pra sempre o Seu nome eu honrarei

Se eu encontro mil abismos nos caminhos eu vou

Segurança sempre tenho em suas mãos

Tu és, Senhor, o meu pastor

Por isso nada em minha vida faltará

Dedicatória

Dedico a finalização desse trabalho a DEUS, que em sua infinita sabedoria e bondade, colocou-me diante de pessoas do bem, que me proporcionaram escrever uma página muito linda de minha vida.

Obrigado SENHOR!

À minha família,

Lembro-me muito bem, quando minha mãe, em sua sabedoria

oriental disse-me:

- “Eu te gerei para o mundo. Vai e segue seu caminho, pois sempre

estarei contigo!” –

Foi o que fiz. Segui meu caminho, muitas vezes me esqueci de vocês,

só lembrei de mim...

Hoje, quando olho para trás, tenho a certeza de que só cheguei até

esse momento, porque vocês, meus pais (*in memoriam*), meus

irmãos, minha esposa, meus sogros, estiveram sempre comigo!

Obrigado, Senhor, pela família que me deste!

Dedicatória Especial II

Aos meus orientadores,

Prof. Dr. Sérgio Eduardo de Andrade Perez e Prof. Dr. Vilmar
Baldissera, pessoas do bem e de DEUS, pessoas de incomensurável
bondade e competência, que me proporcionaram a oportunidade de
enxergar minha profissão sob a ótica da ciência.

Obrigado por vocês existirem em minha vida!

Agradecimento Especial

À você,

Que feito anjo de Deus, entrou em minha vida sem pedir licença, sem pedir nada em troca. Que se doou por inteiro, que acreditou em pessoas nunca vistas antes.

Que me ensinou que vida pode ser vivida com alegria, independente da idade, sexo ou religião. Que me ensinou que a vida está presente em nossas pequenas atitudes.

Que me ensinou que amar não é apenas dizer, mas sentir, fazer acontecer!

À você,

Que fez esse projeto acontecer.

Meu muito obrigado!

Agradecimentos

Ao Programa de Pós-Graduação Interinstitucional em Ciências Fisiológicas UFSCar/UNESP, pela possibilidade de um fisioterapeuta crescer pessoal e profissionalmente em outra área do conhecimento.

À Secretaria de Pós-Graduação do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar, especialmente ao secretário Alexandre, pelo carinho, atenção e profissionalismo dispensados durante minha passagem pelo programa.

Aos membros da banca examinadora, pelo aceite do convite em participar de minha defesa, mas principalmente, pela relevante contribuição acadêmica e científica prestada a essa tese, por meio das correções e sugestões.

Aos companheiros de doutorado, Jonato Prestes e João Paulo Botero, amigos-irmãos, com quem dividi dúvidas e apreensões, com quem muito aprendi. Tenho plena certeza, que só chegamos até esse momento, porque estávamos juntos. Como dizia o poeta: quando se sonha sozinho, é apenas um sonho; quando sonhamos juntos, tudo se transforma, e torna-se realidade.

Ao amigo e companheiro de doutorado, Fabiano Cândido Ferreira, e sua esposa Telma, por permitir participar de seu projeto de mestrado enquanto aguardávamos a entrada no doutorado. Mas principalmente, pela amizade e pelo fortalecimento de nossa fé em Deus.

Agradecimentos

Aos companheiros de mestrado, Richard Diego Leite e Guilherme Borges Pereira, amigos-irmãos, parceiros inseparáveis de bancada, pelo apoio e auxílio inestimável em todas as etapas de nossos projetos.

Ao amigo-irmão, parceiro de todas as horas, meu cirurgião predileto, José Carlos Lopes, por sua participação efetiva e pelos ensinamentos que me proporcionaram finalizar esse trabalho com satisfação e alegria.

À Prof^a. Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo, pela pronta disponibilização e suporte técnico do Laboratório de Biologia Molecular - UFSCar, mas, principalmente, pelo interesse científico nesse trabalho.

À Carmen Lúcia Salla Pontes, orientanda de doutorado da Prof^a. Heloísa, pelo grande auxílio em todas as análises bioquímicas de nossos projetos, e principalmente, pelo carinho e atenção disponibilizados durante minha estada no Laboratório de Biologia Molecular.

À Prof^a. Dra. Keiko Okino Nonaka, pela pronta disponibilização e suporte técnico do Laboratório de Neuroendocrinologia - UFSCar, mas, principalmente, pelo interesse científico nesse trabalho.

Ao amigo Fernando Vidal D'Ávila, parceiro de muitas peladas de futebol, orientando de doutorado da Prof^a. Dra. Keiko Okino Nonaka, pelo grande auxílio em todas as análises biomecânicas e biofísicas de nossos projetos.

Agradecimentos

Aos mantenedores, diretores, especialmente ao Prof. Dr. Dorival Marcos Milani e a Prof^a. Neise Talarico Saia, e coordenadores, especialmente a Prof^a. Ms. Luciene Maria Barbieri Ázar, do Centro Universitário Central Paulista, pelo apoio, incentivo e disponibilização da estrutura física da ADPM para a realização do projeto.

Aos alunos dos cursos de Fisioterapia e Educação Física da UNICEP, pela ativa participação nos treinamentos realizados pelas mulheres, e, principalmente, pelo compromisso e responsabilidade demonstrados em todo o percurso do projeto. À vocês a minha admiração eterna e meu muito obrigado!

Sumário

1	Considerações Iniciais	1
2	Manuscrito I	10
2.1	Resumo	11
2.2	Introdução	12
2.3	<i>Materiais e Métodos</i>	16
2.4	<i>Resultados</i>	23
2.5	<i>Discussão</i>	30
2.6	<i>Conclusões</i>	35
2.7	<i>Referências Bibliográficas</i>	36
3	Manuscrito II	43
3.1	<i>Resumo</i>	44
3.2	<i>Introdução</i>	45
3.3	<i>Metodologia</i>	49
3.4	<i>Resultados</i>	54
3.5	<i>Discussão</i>	59
3.6	<i>Conclusões</i>	67
3.7	<i>Referências Bibliográficas</i>	68
4	Apêndice I: Artigo submetido ao periódico <i>Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports</i>	79
4.1	Abstract	80
4.2	Introduction	81

4.3	Material and Methods	84
4.4	Results	90
4.5	Discussion	97
4.6	<i>Conclusions</i>	101
4.7	<i>References</i>	102

Lista de Tabelas e Figuras

Manuscrito I

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Evolução Temporal da Massa Corporal dos Animais Experimentais (gramas)	23
---	----

Lista de Figuras

Figura 1 – Carga Máxima de Carregamento	25
Figura 2 - Atividade da MMP-2 Pró e Ativa da Tíbia Direita obtida por zimografia e expressa em unidades arbitrárias (UA)	26
Figura 3 - Análises Biofísicas da Tíbia Esquerda das ratas: Densidade Mineral (DM) e Densidade Óssea (DO) expressos em mg/cm^2	27
Figura 4 - Análise Biométrica e Biomecânica da Tíbia Esquerda das ratas: Comprimento da Tíbia (mm) e Rigidez (N/mm)	28
Figura 5 - Análises Biomecânicas da Tíbia Esquerda das ratas: Carga Máxima e Carga de Fratura expressos em Newton (N)	29

Manuscrito II

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Caracterização Antropométrica e Composição Corporal dos Sujeitos participantes	54
Tabela 2 - Densidade Mineral Óssea (DMO) Inicial e Final da Coluna Lombar, Colo do Fêmur e Corpo Todo (mg/cm^2) (média \pm DPM)	55

Tabela 3 - Força Muscular (Carga Máxima, Kg) Inicial e Final (pós 13 meses de treinamento)	56
--	----

Lista de Figuras

Figura 1 - Concentrações sorológicas da Interleucina -1 (IL-1) e da Leptina (pg/ml)	57
---	----

Figura 2 - Concentrações Sorológicas do TGF- β (pg/mL) e do IGF-I (ng/mL)	58
---	----

Apêndice 1

Lista de Tabelas

Table 1 - Temporal Evaluation of Rat Body Mass (grams)	90
--	----

Lista de Figuras

Figure 1 - Maximal Workload (g) of the groups OVX Chronic Exercise (OVX-Ex-Cr) and Intact Chronic Exercise (Int-Ex-Cr) at weeks 1, 6, and 12	91
--	----

Figure 2 - Activity of Active (a) and Pro MMP-2 (b) of the right tibia obtained by zymography (c) and expressed in arbitrary units (AU)	93
---	----

Figure 3 - Biophysical Analysis of the left tibia: (a) Mineral Density (MD) and (b) Bone Density (BD) expressed in mg/cm ²	94
---	----

Figure 4 - Biometrics and Biomechanics Analysis of the left tibia: (a) Length of Tibia (mm) and (b) Stiffness (N/mm)	95
--	----

Figure 5 - Biomechanical Analysis of the left tibia: (a) Maximum Load (N) and (b) Fracture Load (N)	96
---	----

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Olhe para aquela estrada, a que caminhos nos levará?

Nessa caminhada de vida, muitas vezes encontrei-me em grandes dúvidas sobre as escolhas a fazer. Muitas vezes, em minha fraqueza humana, pensei em desistir. Mas, em todas as ocasiões, senti as mãos de Deus guiando-me, empurrando-me para o caminho certo, muitas vezes esburacado e cheio de curvas, mas era o caminho a seguir.

Foi assim que encontrei-me com o Prof. Sérgio no primeiro dia de aula da 1ª. Turma do Curso de Especialização em Fisiologia do Exercício da UFSCar, próximo as escadas de acesso aos anfiteatros da Biblioteca da UFSCar. Foi muito mais que um casual reencontro, um sorriso, o aperto de mãos e o reconhecimento mútuo. Foi a abertura de uma nova perspectiva, apenas o começo de um grande desafio, do qual não sabia sequer a menor parte do enredo todo. Caminho que se tornava, ao mesmo tempo, fascinante e assustador.

Com o decorrer das aulas do curso, tive a certeza de que deveria alterar meu projeto de mestrado, na época recém iniciado na Faculdade de Farmácia da UNESP de Araraquara. Não sabia como, pois já havia iniciado a revisão da literatura e a campanha de recrutamento dos sujeitos. Talvez estivesse apenas sonhando demais, pensava eu. Mas, nesse período de certezas e incertezas, minha orientadora inicial, a Prof^a. Dra. Helena Bolini transferiu-se para a UNICAMP, deixando-me bem à vontade para decidir, se desejava continuar no mestrado com sua orientação, mesmo à distância, ou trocar de orientação.

Procurei então o Prof. Elizeu, que desde há muito tempo trabalhava com o desenvolvimento de um tipo de iogurte derivado da soja, suplementado com isoflavonas. Ele já vinha pesquisando o efeito do iogurte em modelos experimentais de câncer, e gostaria de

investigar em outros modelos! Por que não osteoporose? Onde? No Laboratório de Fisiologia do Exercício da UFSCar!

Um grande problema estava resolvido, pois novamente tinha orientação. Tinha também um produto interessante nas mãos, o iogurte de soja. Apareceram então, outros, talvez maiores que o primeiro. Como elaborar o projeto? E o modelo experimental, quem sabia fazer? Que tipo de exercício (treinamento)? Que análises realizar?

Dessa forma, criei coragem e conversei com os professores Sérgio e Vilmar (em um de nossos incontáveis churrascos que sempre realizávamos todas as sextas-feiras de curso), sobre minha intenção de pesquisar o efeito do exercício na osteoporose. Para minha grata surpresa, o Prof. Vilmar não somente abriu as portas do antigo laboratório para que pudesse desenvolver toda a parte experimental, como também tornou-se co-orientador oficial.

O Prof. Sérgio, com sabedoria e muita paciência, auxiliou-me em toda a elaboração do projeto. E mais, apresentou-me a quem considero como “maior cirurgião de ratas do universo”, e a quem sou eternamente grato, o técnico do laboratório José Carlos Lopes (“Cacau”). Foi ele quem fez todas as ovariectomias (mestrado e doutorado) e me ensinou a trabalhar e lidar carinhosamente com esses preciosos animais.

De toda essa história inicial, além de conseguir o título de especialista em Fisiologia do Exercício e mestre em Ciências Nutricionais e de Alimentos, também obtive (obtivemos) minha primeira publicação internacional:

SHIGUEMOTO, GE; ROSSI, EA; BALDISSERA, V; GOUVEIA, CH; VARGAS, GMFV; PEREZ, SEA. Isoflavone-supplemented soy yoghurt associated with resistive physical exercise increase bone mineral density of ovariectomized rats. Maturitas (Amsterdam) JCR, v. 57, n. 5, p. 261-270, 2007.

Após a defesa do mestrado, externei ao Prof. Sérgio minha vontade de seguir na área, e se possível realizar o doutorado sob a orientação dele na Fisiologia. Pacientemente, esperei pela abertura das vagas do doutorado, já que o Prof. Sérgio, recém reingressado no programa de pós-graduação em Ciências Fisiológicas, precisava da defesa dos mestrados para poder abrir vagas de doutorado.

Enquanto esperava, fui auxiliando os projetos de mestrado, um dos quais gerou a seguinte publicação:

Fabiano Candido Ferreira; Alexandra Ivo de Medeiros; Cristiane Nicoli; João Elias Nunes Dias; Gilberto Eiji Shiguemoto; Jonato Prestes; Roberto Mário Machado Verzola; Vilmar Baldissera; Sérgio Eduardo de Andrade Perez. Circuit resistance training in sedentary women: body composition and serum cytokine levels. Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism JCR, v. 35, p. 163-171, 2010.

Após minha entrada no Programa de Pós-Graduação Interinstitucional em Ciências Fisiológicas UFSCar / UNESP, nível de doutorado, em Maio/2007, o Prof. Sérgio definiu, em reunião com todos os mestrados e doutorandos, as linhas de pesquisa de interesse do Laboratório de Fisiologia do Exercício:

1. Treinamento de Força;
2. Composição Corporal;
3. Biomarcadores Inflamatórios;
4. Remodelamento Ósseo: biomarcadores ósseos e biomecânica óssea;
5. Remodelamento Muscular.

Nessas linhas de pesquisa acima citadas, resolvemos estudar o efeito do treinamento de força sobre a osteoporose (continuidade do mestrado) em dois modelos: (1) modelo experimental de menopausa (ovariectomia em ratas), atividade da MMP-2 óssea, biomecânica e biofísica da Tíbia; (2) modelo experimental em humanos (mulheres pós-menopáusicas), densidade mineral óssea (DMO), composição corporal, e biomarcadores inflamatórios e do remodelamento ósseo.

Dessa forma, o trabalho de doutorado ficou dividido em duas grandes pesquisas: uma com ratas ovariectomizadas submetidas ao treinamento de força (manuscrito I) e outra com mulheres idosas pós-menopáusicas que também realizaram treinamento de força (manuscrito II).

O motivo principal para a escolha das ratas ovariectomizadas é que esta técnica tem sido recomendada pelo FDA como modelo experimental de menopausa e, como o objetivo foi analisar a perda da massa óssea provocada pela falta do estrogênio (osteopenia) por meio da atividade da MMP-2 e das propriedades biomecânicas e biofísicas, o modelo animal tornou-se mais viável e aplicável. Este projeto conjunto também originou a tese de doutorado de Jonato Prestes, que trabalhou com remodelamento muscular e atividade da MMP-2. A tese do Jonato Prestes já foi defendida, e produziu a seguinte publicação:

Jonato Prestes; Rita Marqueti; Gilberto Eiji Shiguemoto; Richard Leite; Guilherme Borges Pereira; Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo; Vilmar Baldissera, Sérgio Eduardo de Andrade Perez. Effects of ovariectomy and resistance training on MMP-2 activity in skeletal muscle. Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism JCR, v. 34, p. 700-706, 2009.

Do projeto das ratas ovariectomizadas, originou o primeiro artigo dessa tese e que foi submetido para publicação no *Scandinavian Journal of Medicine & Sciences in Sports*:

Effects of Resistance Training on MMP-2 Activity and Biomechanical and Biophysics Properties of bone in ovariectomized and intact rats

Gilberto Eiji Shiguemoto, Jonato Prestes, Richard Diego Leite, Guilherme Borges Pereira, Carmen Lúcia Salla Pontes, Fernando Vidal D'Ávila, João Paulo Botero, Vilmar Baldissera, Keiko Okino Nonaka, Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo, Sérgio Eduardo de Andrade Perez

Convém ressaltar que esse modelo animal contou com duas parceiras importantes:

- a. Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Ciências Fisiológicas, sob responsabilidade e coordenação da Prof^a. Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo, e com a participação efetiva da doutoranda Carmen Lúcia Salla Pontes;
- b. Laboratório de Neuroendocrinologia do Departamento de Ciências Fisiológicas, sob responsabilidade da Prof^a. Dra. Keiko Okino Nonaka, e com participação efetiva do doutorando Fernando Vidal D'Ávila.

O projeto das ratas ovariectomizadas originou também dados do metabolismo intermediário, remodelamento de tendões e liberação de neurotransmissores em diferentes áreas do encéfalo, que são objetos de estudo do Laboratório de Fisiologia do Exercício com a inserção de três alunos de mestrado: Richard Diego Leite, Guilherme Borges Pereira e Josiane de Oliveira Duarte. Dois trabalhos de mestrado, originados desse projeto também já foram publicados:

Richard Diego Leite; Jonato, Prestes; Celene Fernandes Bernardes; Gilberto Eiji Shiguemoto; Guilherme Borges Pereira; Josiane Oliveira Duarte; Mateus Moraes Domingos; Vilmar Baldissera; Sérgio Eduardo de Andrade Perez. 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 JCR, 2009.

Guilherme Borges Pereira; Jonato Prestes; Richard Diego Leite; Rodrigo Magosso; Peixoto, F. S.; Rita Marqueti Gilberto Eiji Shiguemoto; Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo; Vilmar Baldissera; Sérgio Eduardo de Andrade Perez. Effects of ovariectomy and resistance training on MMP-2 activity in rat calcaneal tendon. Connective Tissue Research (Print) JCR, 2010.

Como também era objetivo do Laboratório avançar em pesquisas com seres humanos, desenvolvemos paralelamente outro projeto, para observarmos o efeito do treinamento de força de alta intensidade sobre a densidade mineral óssea, composição corporal, biomarcadores inflamatórios e do remodelamento ósseo, em mulheres pós-menopáusicas. As mulheres realizaram o treinamento de força durante período de 13 meses, e foram avaliadas nos períodos inicial, intermédio (6 meses) e final.

Lembro-me bem, que por várias vezes, o Prof. Sérgio questionou-me sobre o período longo proposto para o treinamento. Dizia-me: “as mulheres não completarão todo o projeto, faça por período mais curto!” Nós insistimos em 12 meses, tivemos fé e confiança, e conseguimos, graças a fé e coragem recíproca de nossas mulheres.

Esse projeto contou com duas parcerias importantes:

- a. Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Ciências Fisiológicas, sob responsabilidade e coordenação da Prof^a. Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo, e com a participação efetiva da doutoranda Carmen Lúcia Salla Pontes;
- b. Centro Universitário Central Paulista – UNICEP, representados por seus diretores Prof. Dr. Dorival Marcos Milani e Prof^a. Neise Talarico Saia, e alunos dos cursos de Fisioterapia e Educação Física.

De algumas avaliações intermediárias do projeto das mulheres, obteve-se a outra parte da defesa de doutorado de Jonato Prestes, que também gerou a seguinte publicação:

Jonato Prestes; Gilberto Eiji Shiguemoto; João Paulo Botero; Anelena Frolini; Rodrigo Dias; Richard Diego Leite; Guilherme Borges Pereira; Rodrigo Magosso; Vilmar Baldissera; Cláudia Cavaglieri; Sérgio Eduardo de Andrade Perez. Effects of resistance training on resistin, leptin, cytokines, and muscle force in elderly post-menopausal women. Journal of Sports Sciences (Print) JCR, v. 27, p. 917445696, 2009.

Mas também, ao longo desses 13 meses, outras duas boas surpresas ocorreram, listadas abaixo:

1. Matéria no Globo Repórter do dia 17.07.2008;
2. Prêmio TOP Educacional “Mário Palmério” 2008 - Associação Brasileira de Mantenedoras do Ensino Superior – ABMES – Melhor Projeto Brasileiro de Extensão das Universidades e Centros Universitários privados.

Esse prêmio gerou também a seguinte publicação:

Gilberto Eiji Shiguemoto; João Paulo Botero; Jonato Prestes; Luciene Maria Barbieri Ázar; Cecília Tardivo Marin; Filipe Henrique Monaretti; Everson Ricardo Bertacini; Sérgio Eduardo de Andrade Perez. De Bem com a Vida: Programa de Intervenção Preventiva e Promoção da Saúde e Qualidade de Vida em Mulheres Pós-Menopáusicas por meio de Treinamento de Força Periodizado. ABMES Cadernos JCR, v. 19, p. 5-39, 2009.

De outra parte do projeto com as mulheres, gerou-se a tese do João Paulo Botero, recém defendida, e um artigo que será submetido ao Journal of Sports Sciences:

“Efeitos de um programa de Treinamento de Força sobre variáveis da composição corporal, concentrações plasmáticas de leptina e resistina, e qualidade de vida em mulheres pós-menopáusicas”.

João Paulo Botero, Gilberto Eiji Shiguemoto, Jonato Prestes, Cecília Tardivo Marin, Carmen Lúcia Salla Pontes, Vilmar Baldissera, Sérgio Eduardo de Andrade Perez

Finalmente, coube-me investigar, no projeto das mulheres, o efeito do treinamento de força sobre a densidade mineral óssea e biomarcadores inflamatórios e do remodelamento ósseo (Manuscrito II).

Não sei a que outros caminhos me levará a estrada “Fisiologia do Exercício”. Não tenho mais medo, pois se “Deus é por nós, quem será contra nós?”

Aprendi muito mais que precisava, lidar com animais, treinamentos, técnicas de laboratório... Aprendi a ser professor, a ser uma pessoa melhor!

Encontrei mais que professores, e companheiros de doutorado e mestrado, encontrei amigos, verdadeiros parceiros, amigos-irmãos. Encontrei uma nova família!

Encontrei mais que uma nova vida, encontrei o amor de minha vida, minha esposa, eterna namorada, fonte de inspiração, a quem permito-me dedicar toda essa tese e prestar uma singela homenagem:

Folhas vazias

Contam qualquer história,

Corações vazios

Geram insensatez ...

Vidas cheias

Levam ao AMOR!

Gilberto Eiji Shiguemoto

Manuscrito I

Efeito do Treinamento de Força na atividade da MMP-2 e nas propriedades biomecânicas e biofísicas do tecido ósseo de ratas ovariectomizadas e intactas

Gilberto Eiji Shiguemoto*¹, Jonato Prestes¹, Richard Diego Leite¹, Guilherme Borges Pereira¹, Carmen Lúcia Salla Pontes², Fernando Vidal D'Ávila³, João Paulo Botero¹, Vilmar Baldissera¹, Keiko Okino Nonaka³, Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo², Sérgio Eduardo de Andrade Perez¹

1 – Laboratório de Fisiologia do Exercício – Departamento de Ciências Fisiológicas – Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

2 – Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular - Departamento de Ciências Fisiológicas – Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

3 – Laboratório de Neuroendocrinologia - Departamento de Ciências Fisiológicas – Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

* *Autor para correspondência*

Gilberto Eiji Shiguemoto – Laboratório de Fisiologia do Exercício

Universidade Federal de São Carlos

E-mail: gileiji@terra.com.br

Endereço: Rua Bernardino Fernandes Nunes, 1707 – Casa 21 – Condomínio Dona Eugênia

Parque Delta – São Carlos – SP – BR – CEP: 13.566-490

Phones: +55(16)3361-6439/3411-3343/9607-4406

RESUMO

INTRODUÇÃO: osteoporose é reconhecida mundialmente como sério problema de saúde pública, apresentando como característica principal a fragilidade óssea. A qualidade do osso é fator determinante nesse aspecto, e depende do colágeno. Um dos fatores intrínsecos que regula o colágeno é a atividade da metaloproteinase -2 (MMP-2). O treinamento de força é o melhor recomendado para preservar e/ou melhorar a qualidade da massa óssea.

OBJETIVO: foi investigar a influência do treinamento de força na atividade da MMP-2 e nas propriedades mecânicas do osso de ratas ovariectomizadas (OVX) e intactas.

MATERIAIS E MÉTODOS: 48 ratas maduras jovens foram distribuídas em 2 grupos distintos, ovariectomia (OVX) e Intactas (Int); a seguir, 3 subgrupos foram formados similarmente em cada grupo: sedentário (OVX-Sed e Int-Sed), exercício agudo (OVX-Ex-Ag e Int-Ex-Ag) e exercício crônico (OVX-Ex-Cr e Int-Ex-Cr) (n = 8 por grupo). Foi utilizado um treinamento de força de 12 semanas no qual os animais escalaram uma escada vertical de 1,1-m com pesos presos as suas caudas. As sessões foram realizadas com intervalo de três dias, 4-9 escaladas e 8-12 movimentos dinâmicos por escalada. Após o término do período experimental, foram realizadas análises da atividade da MMP-2 por zimografia e análises biomecânicas e biofísicas utilizando-se uma máquina de ensaio universal (Instron modelo 4444).

RESULTADOS: a atividade da MMP-2 apresentou-se reduzida em 2 grupos OVX (OVX-Sed e OVX-Ex-Ag) comparada com todos os outros grupos ($p \leq 0,05$). Em contrapartida, os grupos treinados cronicamente (OVX-Ex-Cr e Int-Ex-Cr) apresentaram aumento significativo da MMP-2. Esses resultados também foram observados nas análises biomecânicas e biofísicas, nas quais os grupos OVX-Sed e OVX-Ex-Ag apresentaram Densidade Mineral, Densidade Óssea, Carga Máxima e Carga de Fratura menores em relação à todos os outros grupos; na outra mão, os grupos treinados cronicamente, apresentaram índices maiores nas análises biomecânicas e biofísicas acima citadas.

CONCLUSÕES: a ovariectomia reduziu a atividade da MMP-2, produzindo efeitos deletérios sobre a massa óssea. O treinamento de força proposto foi eficiente em combater esses efeitos, apresentando inclusive efeito modelador.

Palavras-Chave: ovariectomia, ratas, treinamento de força, atividade da MMP-2, propriedades biomecânicas e biofísicas do osso

INTRODUÇÃO

Osteoporose é uma patologia metabólica do tecido ósseo caracterizada por anormalidades no arranjo micro-arquitetônico, que leva ao aumento da fragilidade do osso e o consequente aumento no risco de desenvolvimento de fraturas [NIH *Consensus*, 2001]. A osteoporose é reconhecida mundialmente como sério problema de saúde pública, observando-se que a estimativa anual de fraturas relacionadas à osteoporose em mulheres pós-menopáusicas nos Estados Unidos é de aproximadamente 1,5 milhões [NAMS POSITION STATEMENT, 2006]. A etiologia das fraturas osteoporóticas é multifatorial, sendo que baixa densidade mineral óssea (DMO), alta taxa de turnover ósseo e fragilidade física, entre outros, são reconhecidos como fatores preponderantes no desenvolvimento desses quadros clínicos [WIDRICK et al., 2007]. A perda da função ovariana pode estar relacionada com severos declínios na função muscular, nas propriedades mecânicas do tecido ósseo e no desenvolvimento de processos inflamatórios catabólicos [WALSH et al., 2006].

O *turnover* ósseo é um dos principais fatores determinantes da integridade estrutural do tecido ósseo. Qualquer alteração na taxa ótima do *turnover*, como o aumento dramático que ocorre após a ovariectomia e a menopausa, apresenta o potencial de alterar a microestrutura e a mecânica dos materiais do tecido ósseo [KENNEDY et al., 2008].

A quantidade do tecido ósseo, avaliada principalmente pela DMO e utilizando-se o método DXA ou DEXA (Dual Energy X-ray Absorptiometry), não é a forma mais acurada de se prever a força do osso, mas certamente é um dos fatores que devem ser considerados na avaliação da força óssea. Outros parâmetros, como a organização tridimensional das trabéculas (microarquitetura), o tamanho e a geometria dos ossos, as microfraturas potencialmente existentes, e as propriedades intrínsecas da matriz extracelular (mineral e

colágeno) também contribuem para determinar a força do osso [VIGUET-CARRIN et al., 2006].

A qualidade do tecido ósseo pode ser alterada por uma gama enorme de fatores, incluindo principalmente alterações em sua matriz extracelular, que são causadas por variações na composição, arranjo e interações entre os constituintes orgânicos (colágeno e proteínas não-colagenosas da matriz extracelular) e inorgânicos (cristais de hidroxiapatita) [VASHISHTH, 2005]. O arranjo microestrutural do osso envelhecido é, portanto, caracterizado por apresentar grande porosidade e grande quantidade de canais lineares cimentados. Adicionalmente, o tecido ósseo acumula microfraturas com o envelhecimento em razão da redução na capacidade de identificar e reparar microfendas (“microcracks”) [WALDORFF; GOLDSTEIN; McCREADIE, 2007]. É importante observar que todas as alterações acima citadas refletem não somente alterações na quantidade de tecido ósseo, mas principalmente na qualidade da matriz extracelular óssea. O papel e a magnitude das alterações na matriz extracelular proporcionadas pelo envelhecimento e menopausa, e suas relações com o aumento do risco de fraturas permanece pouco compreendidos. A escassez de pesquisas no nível orgânico dessas alterações parece ser a principal razão da crença amplamente difundida de que a fragilidade óssea está somente relacionada com sua mineralização [VASHISHTH, 2007]. Entretanto, a falta de correlação entre medidas de mineralização óssea e índices de fraturas ósseas, bem como evidências de que alterações no colágeno e na matriz extracelular podem determinar comportamento mecânico frágil do osso, têm motivado pesquisadores a explorar o papel das alterações no colágeno e na matriz extracelular em promover fragilidade óssea [VASHISHTH, 2007; VIGUET-CARRIN et al., 2006].

O tecido ósseo é largamente constituído por Matriz Extracelular (MEC), cuja proteína fibrilar predominante é o colágeno do tipo I, que promove integridade estrutural e suporte para forças mecânicas. A MEC também contém Proteínas da Matriz Celular (MPs), que prioritariamente apresentam papel modulador biológico, mesmo em relação aos seus papéis no desenvolvimento estrutural [BORNSTEIN; SAGE, 2002]. As MPs interagem com receptores da superfície celular (como as integrinas), matriz estrutural, e fatores solúveis extracelulares (como fatores de crescimento e proteases). Por meio de mecanismos múltiplos, as MPs podem influenciar a atividade celular, bem como regular a disponibilidade ou atividade das proteínas sequestradas na matriz. Proteínas estruturais da MEC, como a fibronectina e o colágeno, também se ligam às integrinas, portanto, as MPs apresentam potencial de modular suas funções pela competição nesses sítios de ligação [ALFORD; HANKENSON, 2006]. Dois tipos específicos de MPs, a Osteopontina (OPN) e a Sialoproteína Óssea (BSP), apresentam concentrações elevadas em processos inflamatórios e remodelamento tecidual [GIACHELLI; STEITZ, 2000], e especificamente ligam-se aos receptores para promover a ativação de metaloproteases de matriz (MMPs), principalmente a do tipo 2 (MMP-2, gelatinase), mesmo em presença de seus inibidores (TIMPs 1 e 2) [FEDARKO et al., 2004].

As MMPs compreendem uma família de enzimas de mais de 20 proteases zinco-dependentes que primariamente são responsáveis pela degradação da MEC, constituindo-se, portanto, nos principais agentes do remodelamento da MEC. A simples visão anterior de que esta família de proteases, incluindo a MMP-2, apresentava apenas funções destrutivas, deve ser modificada por uma série de estudos que demonstram que as MMPs podem alterar o microambiente celular, modular a atividade de moléculas bioativas e regular a atividade de outras proteases, desenvolvendo, portanto, papel na adesão, proliferação, diferenciação e

apoptose celular [STAMENKOVIC, 2003]. Especificamente, as gelatinases MMP-2 e MMP-9 apresentam importante papel no remodelamento do tendão, pois iniciam a degradação do colágeno não-fibrilar do tipo IV, e também do colágeno do tipo I [KJAER, 2004]. Dentre outras tarefas, essas gelatinases, principalmente a MMP-2, participam ativamente na regulação da osteogênese e remodelamento do tecido ósseo durante a embriogênese, adolescência e cicatrização óssea [MOSIG et al., 2007; HENLE et al., 2005].

O tratamento padrão ouro para osteoporose, recomendado tradicionalmente pela literatura, tem sido a terapia de reposição hormonal (TRH), especificamente a reposição de estrogênio [COMPSTON, 2004]. A TRH previne a perda da massa óssea e aumenta a DMO, resultando em diminuição de fraturas osteoporóticas [HOSHINO; OUCHI, 2004]. Entretanto, a TRH não é aceita universalmente, devido principalmente às contra-indicações para alguns pacientes, a baixa adesão, a relutância e a aversão por parte de muitas mulheres em virtude dos efeitos colaterais, e riscos de aparecimento, a longo prazo, de alguns tipos de câncer [STEFANICK et al., 2006; ZHANG et al., 2007], e de infarto do miocárdio [AZOULAY, 2004].

Exercícios físicos constituem-se em forma alternativa barata e eficaz para combater os efeitos deletérios da osteoporose, desde que os programas de atividade física sejam apropriadamente estruturados para isso [BENTON, 2006]. Programas de exercícios físicos em humanos, bem como experimentos em animais, têm mostrado que exercícios de alta intensidade que apresentam grande impacto sobre as estruturas ósseas, são os melhores recomendados para promover carga mecânica suficiente para deformar e estimular a neoformação óssea [SHIGUEMOTO et al., 2007; TURNER; ROBLING, 2003].

Em vista dos argumentos expostos, o objetivo desse trabalho foi verificar o efeito de um protocolo de treinamento de força de alta intensidade na atividade da MMP-2 e nas propriedades biomecânicas e biofísicas do tecido ósseo de ratas ovariectomizadas e intactas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizadas 48 ratas *Wistar* (*Rattus norvegicus* var. *albinus*, *Rodentia*, *Mammalia*) com 13 semanas de idade e massa corporal inicial de aproximadamente $247,74 \pm 12,73$ g, obtidas do biotério da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), SP, Brasil. Os animais tiveram acesso livre a água e ração, foram mantidos em gaiolas coletivas (4 ratas por gaiola) em temperatura constante de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, ciclo de 12 horas claro/12 horas escuro, com luzes acesas das 06:00 h às 18:00 h. Todos os animais foram alimentados com Labina® (uma dieta com ração padrão para ratos fornecida pela Purina, Brasil).

Planejamento Experimental

Os animais foram randomicamente distribuídos em dois grupos experimentais, Grupo Ovariectomia e Grupo Intacto, que foram subdivididos em três (3) grupos distintos com oito (8) animais em cada grupo. Os dois grandes grupos foram assim designados e distribuídos:

a) Grupo Ovariectomia (OVX):

(1) *Grupo Ovariectomia Sedentário (OVX-Sed)*: sofreram a ovariectomia e permaneceram durante todo o período do experimento em suas respectivas gaiolas;

(2) *Grupo Ovariectomia Exercício Agudo (OVX-Ex-Ag)*: sofreram a ovariectomia e após três meses de alojamento foram adaptados ao exercício de força em uma sessão, e no dia

seguinte, suas cargas máximas foram determinadas (nova sessão). Três dias após esses procedimentos, os animais realizaram apenas uma sessão aguda de exercício de força.

(3) *Grupo Ovariectomia Exercício Crônico (OVX-Ex-Cr)*: sofreram a ovariectomia e realizaram 12 semanas de treinamento.

b) Grupo Intacto (Int):

(4) *Grupo Intacto Sedentário (Int-Sed)*: não sofreram a ovariectomia e permaneceram durante todo o período do experimento em suas respectivas gaiolas;

(5) *Grupo Intacto Exercício Agudo (Int-Ex-Ag)*: não sofreram a ovariectomia e após três meses de alojamento foram adaptados ao exercício de força em uma sessão, e no dia seguinte, suas cargas máximas foram determinadas (nova sessão). Três dias após esses procedimentos, os animais realizaram apenas uma sessão aguda de exercício de força.

(6) *Grupo Intacto Exercício Crônico (Int-Ex-Cr)*: não sofreram a ovariectomia e realizaram 12 semanas de treinamento.

Ovariectomia

As ratas dos grupos OVX sofreram a retirada dos ovários na 13^a semana de vida segundo o modelo proposto por Kalu [1991] – “Modelo de Ovariectomia da Rata Jovem Madura”. O modelo da rata ovariectomizada é o modelo recomendado pelo FDA para testar terapias clínicas contra a osteoporose [THOMPSON et al., 1995].

Protocolo de Treinamento Força de Alta Intensidade

Aparatos de Treinamento: (1) escada vertical (1,1 x 0,18 m, degrau de 2-cm, inclinação de 80°) e (2) pesos colocados em tubos Falcon de 50mL presos à porção proximal das caudas das ratas com fita adesiva.

Tempo de Treinamento e Periodização: os grupos crônicos (OVX e Intacto) realizaram o treinamento de força durante 12 semanas, uma vez a cada três dias; os grupos agudos realizaram apenas uma única sessão de treinamento, coincidindo com a última semana de treinamento do grupo crônico.

Adaptação (Familiarização): as ratas realizaram uma sessão de familiarização com a escada e a escalada antes de iniciar o treinamento. O tamanho da escada fazia com que os animais realizassem 8-12 movimentos por escalada. Nesse processo, as ratas subiram com pesos equivalentes a 50% de sua massa corporal. Com o aparato fixado a cauda as ratas foram colocadas na parte inferior da escada e familiarizadas com a escalada. Caso necessário um estímulo com pinça era aplicado na cauda do animal para iniciar o movimento. No topo da escada as ratas alcançavam uma gaiola (20 x 20 x 20 cm) onde descansavam durante 120 segundos. Este procedimento foi repetido até que os animais conseguissem voluntariamente escalar a escada, três vezes consecutivas, sem estímulo.

Determinação da Carga Máxima de Carregamento: a escalada inicial consistia em carregar uma carga de 75% da massa corporal do animal. Em seguida, foi adicionado um peso de 30g por escalada até atingir uma carga com a qual a rata não conseguisse mais escalar toda a escada. A falha em escalar foi determinada quando o animal não conseguia progredir na subida da escada após três estímulos sucessivos na cauda. A maior carga carregada por toda a escada foi considerada como a “*capacidade máxima de carregamento*” da rata para aquela sessão de treinamento. Esses procedimentos tiveram início 3 dias após a familiarização.

Protocolo de Treinamento: adaptado de Hornerberg Jr. e Farrar [2004], as sessões de treinamento consistiam de quatro escalas na escada, com 50%, 75%, 90% e 100% da “*capacidade máxima de carregamento*” do animal, determinada na sessão anterior. Durante

as escaladas subsequentes eram adicionados 30g até que uma nova capacidade máxima de carregamento fosse determinada.

Eutanásia

Os animais foram eutanasiados por decapitação imediatamente após a última sessão de exercício de força (grupos crônicos e agudos). Os animais dos grupos sedentários também foram eutanasiados no mesmo período. Em seguida, as tíbias direita e esquerda foram retiradas. Os ossos foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -84°C para a análise bioquímica. A tíbia direita foi utilizada para determinação da atividade da Metaloproteinase 2 (MMP-2) e a tíbia esquerda foi utilizada para determinação das propriedades biofísicas e biomecânicas do osso.

Atividade da MMP-2 na Tíbia

Os procedimentos para determinação da atividade MMP-2 do osso foram realizados segundo protocolo estabelecido por Marqueti et al. [2008] e adaptados para esse estudo. Cada grupo de ratas ($n = 8$) foi analisado separadamente. O terço proximal da tíbia direita foi retirado e macerado em nitrogênio líquido. O osso macerado foi incubado em 2mL de tampão de extração (10mM ácido cacodílico, pH 5,0; 0,15M NaCl; 1M ZnCl_2 ; 20mM CaCl_2 ; 1,5mM NaN_3 ; 0,01% Triton X- 100 [v/v]), a 4°C , em agitação contínua, por um período de 24 horas. Após este período, a solução foi centrifugada por 10 minutos ($9000 \times g$ a 4°C). As amostras foram concentradas para 20 μg de proteína total em cada poço dos géis poliacrilamida (SDS-PAGE) a 10% com 1mg/mL de gelatina. Após a eletroforese, os géis foram lavados duas vezes em 2,5% de Triton X-100 para remover o SDS. Os géis foram incubados no tampão de substrato (50mM Tris-HCl, pH 8,0; 5mM CaCl_2 ; 0,02% NaN_3) a 37°C durante 20 horas. Os géis foram então corados com Coomassie brilliant blue por 1 hora e 30 minutos e descorados com ácido acético:metanol:água (1:4:5) para visualização da atividade das bandas. Os géis

foram fotografados com uma câmera Canon G6 Power Shot 7.1 mega pixels (Virginia, USA). As médias de intensidade de banda foram mensuradas por meio do *software* Gene Tools® (Philomath, OR, USA). As bandas encontradas em todos os grupos foram de 72–62 kDa, sugerindo a ativação da MMP-2 conforme proposto por Fredericks e Mook [2004].

Análises Biométricas, Biomecânicas e Biofísicas

Análises Biométricas: (1) *Medida do comprimento da Tibia Esquerda:* as medidas foram realizadas com utilizando-se um paquímetro (precisão de 0,05 mm) tomando como referência o platô tibial e o maléolo tibial; (2) *Massa Corporal:* as ratas foram pesadas antes de todas as sessões de treinamento em balança digital de precisão KERN® modelo 573 (Balingen, Alemanha) para acompanhamento longitudinal da massa corporal.

Análises Biomecânicas: após as análises biométricas das tíbias esquerdas dos animais, os ossos foram mantidos em um dessecador por 24 horas com objetivo da retirada do ar presente nos poros. Em seguida foram obtidas as massas imersa (M_i) e úmida (M_u); a partir desse ponto, iniciou-se as análises biomecânicas. As propriedades mecânicas das tíbias esquerdas foram mensuradas por intermédio do teste de flexão em três pontos realizado em uma máquina de ensaio universal Instron modelo 4444 (Instron, Canton, MA, USA), com célula de carga com capacidade de 100 kgf. As extremidades (regiões metafisárias) dos ossos foram apoiadas em dois roletes com diâmetro de 3 mm, distanciados em 21,70 mm e a carga aplicada na região central de cada osso [TREBACZ; ZDUNECK, 2006]. No início do teste foi aplicada uma pré-carga de 10 N por uma haste cilíndrica com um rolete de 3 mm na extremidade, no sentido pósterio-anterior e perpendicular ao eixo longitudinal para estabilizar a tibia. O tempo de acomodação foi de um minuto para todos os grupos e após a estabilização e a acomodação, foi aplicada uma força no mesmo sentido, com velocidade constante de 0,5 cm/min até o momento da fratura. Como resultado da força aplicada à tibia, obteve-se um

gráfico força-deformação fornecido pelo software Instron Series IX. Por meio desta curva, obtiveram-se as principais propriedades biomecânicas: (1) *Carga máxima* (N): a maior força suportada pelo osso durante o teste; (2) *Força de ruptura* (N): força obtida no momento da fratura; e (3) *Rigidez* (N/mm): capacidade do material de sofrer força sem se deformar permanente.

Análises Biofísicas: após as análises biomecânicas, iniciou-se as análises biofísicas; os ossos foram colocados em uma estufa a 100° C durante 24 horas para serem desidratados e, a partir desse ponto, obteve-se a massa seca (Ms). Para obtenção da massa da cinza, os ossos foram colocados em uma mufla a 800° C durante 24 horas. Todas as medidas citadas foram obtidas através de uma balança eletrônica (marca Chyo, modelo JEX 200, Instruchem Inc, Manila, Filipinas). Utilizando-se o Princípio de Arquimedes, calculou-se a o volume ósseo; a partir do volume ósseo, determinou-se a densidade óssea e mineral, de acordo com as fórmulas abaixo:

$$\text{Volume Ósseo} = \frac{Mu - Mi}{\rho} (\text{cm}^3)$$

$$\text{Densidade Óssea} = \frac{Mu}{\text{Volume Ósseo}} \left(\frac{\text{mg}}{\text{cm}^3} \right)$$

$$\text{Densidade Mineral} = \frac{Mm}{\text{Volume Ósseo}} \left(\frac{\text{mg}}{\text{cm}^3} \right)$$

Onde: **Mu** = massa úmida óssea, **Ms** = massa óssea da amostra desidratada, **Mi** = massa imersa óssea, **Mm** = massa do material mineral (cinzas), e ρ = densidade da água.

Análise Estatística dos Dados

Todos os dados foram apresentados pela média \pm erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi inicialmente realizada pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk e pelo teste de homocedasticidade (critério de Bartlett). Todas as variáveis apresentaram distribuição

normal e homocedasticidade. A partir dessa análise inicial, foi utilizado o teste ANOVA *two-way* (levando-se em consideração as variáveis treinamento de força x ovariectomia). Na análise da capacidade máxima de carregamento foi utilizado o teste Anova *two-way* (levando-se em consideração as variáveis ovariectomia x tempo). Para os dados de massa corporal (g) dos animais na semana 1 e semana 12, foi utilizado o ANOVA *three-way* (exercício x ovariectomia x semana). Quando a diferença apresentada foi significativa, aplicou-se o *post-hoc* Teste de Bonferroni para comparações múltiplas. O *software* utilizado foi o Statistica® 6.1 (Stat. Soft Inc., Tulsa, OK, USA) com um nível de alfa de 0,05.

Aspectos Éticos & Legais

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (n^o. protocolo 048/2007). Todos os procedimentos com os animais foram conduzidos de acordo com o guia de cuidados e manuseio de animais laboratoriais dos Estados Unidos da América (*National Research Council's*, 1996).

RESULTADOS

Na **Tabela 1** são apresentados os valores da evolução temporal da massa corporal das ratas do experimento.

Tabela 1 – Evolução Temporal da Massa Corporal dos Animais Experimentais (gramas).

<i>Avaliação da Massa Corporal</i>	<i>Grupos Experimentais</i>					
	<i>Grupo Ovariectomia (OVX)</i>			<i>Grupo Intacto</i>		
	<i>OVX-Sed</i>	<i>OVX-Ex-Ag</i>	<i>OVX-Ex-Cr</i>	<i>Int-Sed</i>	<i>Int-Ex-Ag</i>	<i>Int-Ex-Cr</i>
<i>Inicial</i>	254,86 ^a	237,89 ^a	254,57 ^a	242,71 ^a	249,43 ^a	247,00 ^a
<i>(13 semanas de idade)</i>	± 2,62	± 2,50	± 5,16	± 3,86	± 3,40	± 7,39
<i>Intermediária</i>	290,57 ^a	291,86 ^a	283,14 ^{a,b}	258,71 ^c	278,28 ^c	263,14 ^{b,c}
<i>(6 Semanas de Treinamento)</i>	± 3,96	± 5,69	± 6,53	± 8,22	± 5,85	± 7,20
<i>Final</i>	331,86 ^a	334,43 ^a	298,57 ^b	305,57 ^b	303,14 ^b	290,57 ^b
<i>(12 Semanas de Treinamento)</i>	± 4,67	± 5,79	± 6,23	± 7,69	± 6,91	± 7,98

Valores estão expressos como Média ± Erro Padrão da Média (SEM). Número de ratas em cada grupo é igual a oito (n = 8). Valores na mesma linha com letras diferentes diferem entre si para $p \leq 0,05$ (ANOVA three-way e *post-hoc* Teste de Bonferroni). **Grupo Ovariectomia (OVX):** Ovariectomia Sedentário (OVX-Sed), Ovariectomia Exercício Agudo (OVX-Ex-Ag) e Ovariectomia Exercício Crônico (OVX-Ex-Cr). **Grupo Intacto (Int):** Intacto Sedentário (Int-Sed), Intacto Exercício Agudo (Int-Ex-Ag) e Intacto Exercício Crônico (Int-Ex-Cr).

Observa-se pelos valores da massa corporal média inicial de todas as ratas que não houve nenhuma diferença significativa entre todos os grupos participantes do experimento, demonstrando homogeneidade da amostra inicial em relação a esse dado biométrico. Quando a análise é direcionada para a massa corporal final das ratas, observa-se que os grupos OVX-Sed e OVX-Ex-Ag aumentaram significativamente sua massa corporal em relação aos outros grupos ($p \leq 0,05$); entretanto, o grupo OVX-Ex-Cr apresentou massa corporal final estatisticamente menor que os outros dois grupos OVX, e semelhante aos grupos Int-Sed, Int-Ex-Ag e Int-Ex-Cr. O Grupo Int-Ex-Cr, embora tenha apresentado massa corporal final menor que todos os outros grupos, não apresentou diferença estatística significativa em relação aos grupos Int-Sed, Int-Ex-Ag e OVX-Ex-Cr.

A **Figura 1** apresenta os dados da Carga Máxima de Carregamento desse estudo. Durante as 12 semanas de treinamento, não se observa nenhuma interação entre grupo e tempo, indicando que os grupos Int-Ex-Cr e OVX-Ex-Cr aumentaram a capacidade máxima de carregamento de maneira similar durante o treinamento. As cargas aumentaram após a semana 6 e semana 12 quando comparado com a semana 1, e após a semana 12 comparado com a semana 6. Deste modo, não houve nenhuma diferença nas cargas máximas entre ambos os grupos treinados cronicamente no período de 12 semanas.

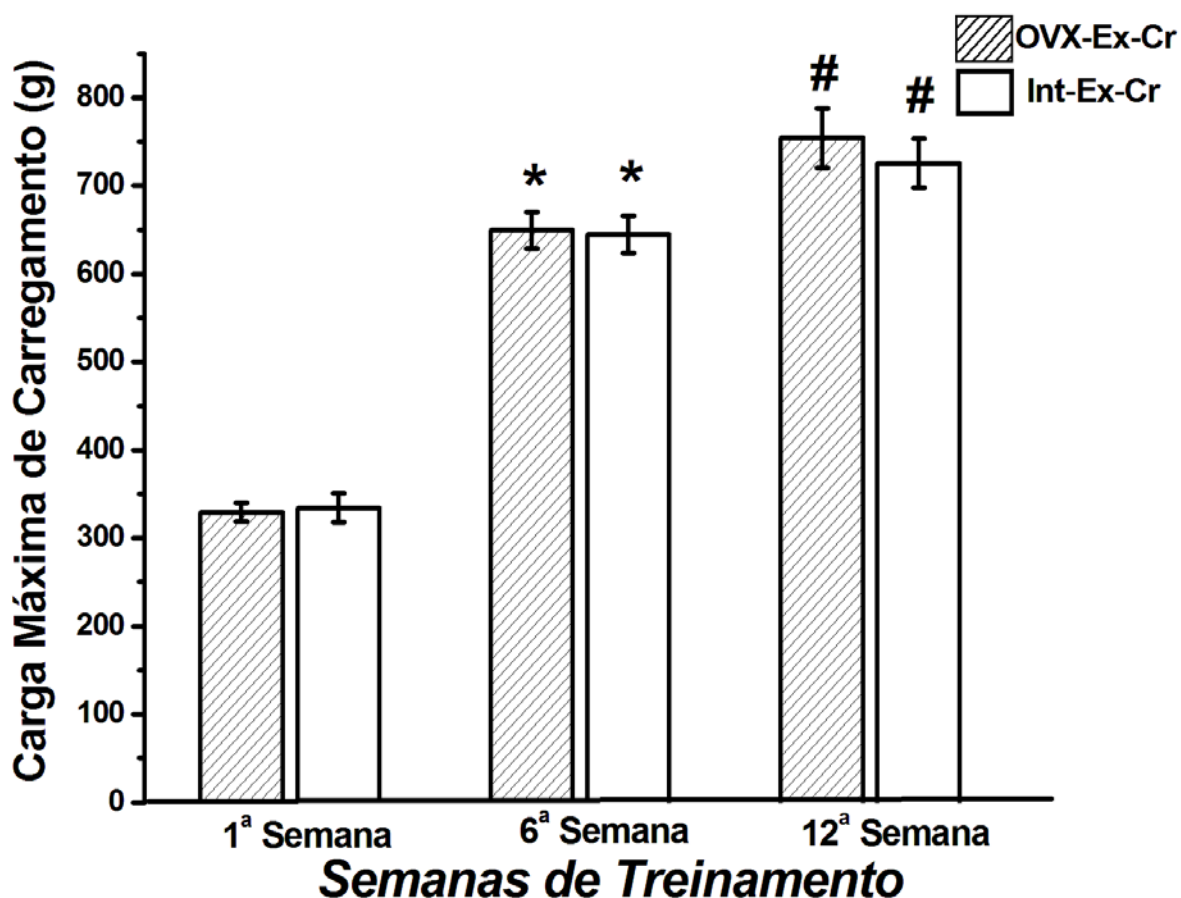


Figura 1. Carga máxima (g) dos grupos OVX-Exercício-Crônico (OVX-Ex-Cr) e Intacto-Exercício-Crônico (Int-Ex-Cr) nas semanas 1, 6 e 12. Os valores estão apresentados pela média \pm erro padrão da média, $p \leq 0,05$ ($n = 8$ por grupo). (*) Diferença estatisticamente significativa comparada com a 1ª semana; (#) Diferença estatisticamente significativa entre a 6ª semana e a 12ª semana (ANOVA two-way e *post-hoc* Teste de Bonferroni).

A Figura 2 apresenta os resultados da atividade da MMP-2 em suas isoformas pró e ativa. Observa-se que o treinamento de força de alta intensidade crônico aumentou a atividade da MMP-2 ativa tanto para o grupo intacto quanto para o grupo OVX comparado com todos os outros quatro grupos. Em contrapartida, a ovariectomia diminuiu drasticamente a atividade da MMP-2 ativa, mesmo no grupo que realizou uma sessão aguda de treinamento ($p \leq 0,05$). Salienta-se que a sessão aguda de treinamento não altera a atividade da MMP-2 ativa, tanto para o grupo OVX quanto para o grupo intacto, quando comparados com seus respectivos

grupos sedentários. A Pró MMP-2 apresentou aumento da atividade significativamente maior para os grupos OVX-Ex-Cr, Int-Ex-Cr e Int-Ex-Ag, comparados com os outros três grupos ($p \leq 0,05$). No grupo intacto, o treinamento agudo aumentou a atividade desta isoforma da MMP-2; porém, o grupo Int-Sed não apresentou diferença significativa de atividade para os grupos OVX-Sed e OVX-Ex-Ag.

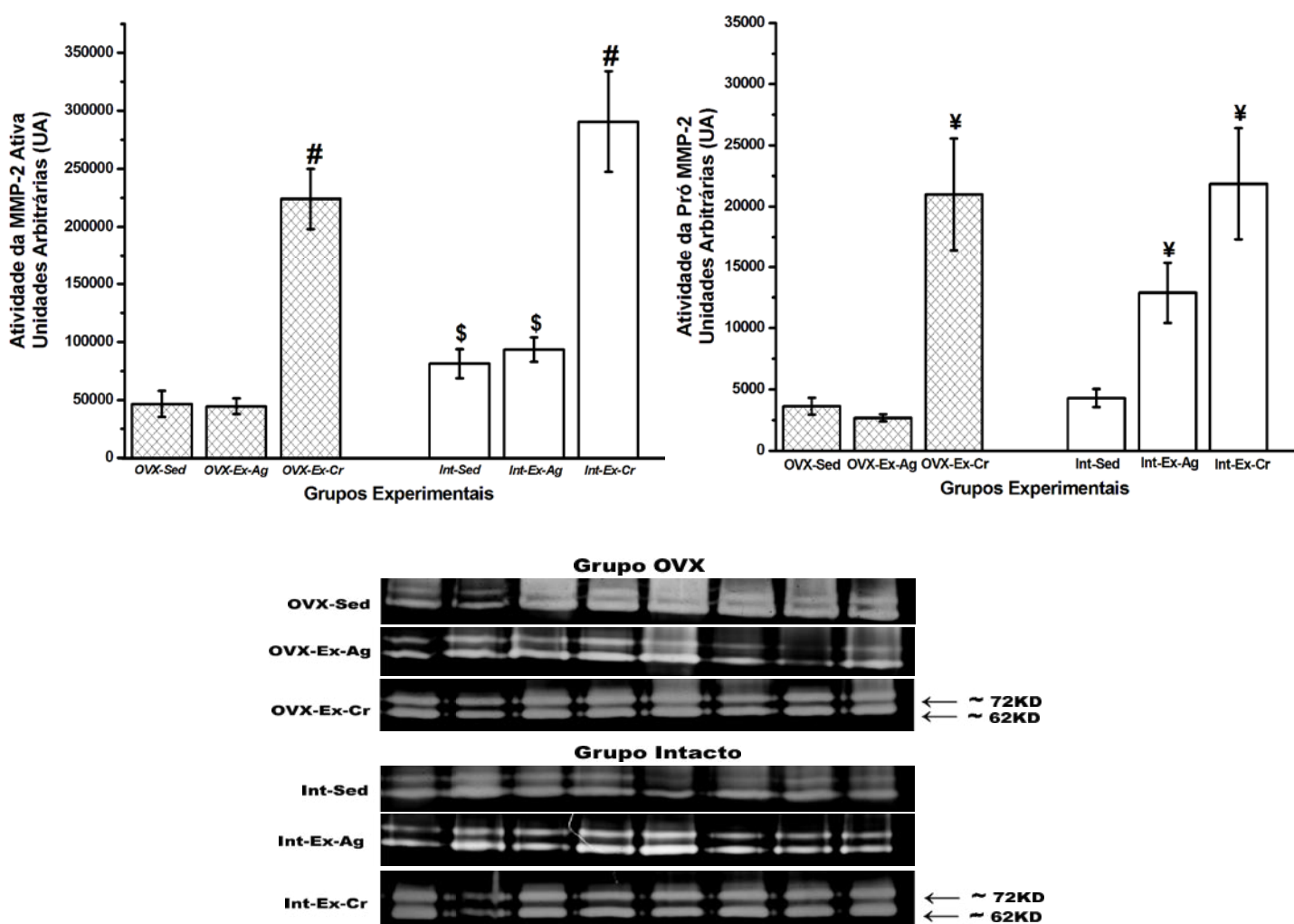


Figura 2 – Atividade da MMP-2 Pró e Ativa da Tibia Direita obtida por zimografia e expressa em unidades arbitrárias (UA). Os valores estão apresentados pela média \pm erro padrão da média (SEM), $p \leq 0,05$. **Grupo Ovariectomia (OVX)**: Ovariectomia Sedentário (OVX-Sed), Ovariectomia Exercício Agudo (OVX-Ex-Ag) e Ovariectomia Exercício Crônico (OVX-Ex-Cr). **Grupo Intacto (Int)**: Intacto Sedentário (Int-Sed), Intacto Exercício Agudo (Int-Ex-Ag) e Intacto Exercício Crônico (Int-Ex-Cr). (#) Diferença estatística significativa comparada com os grupos Int-Sed, Int-Ex-Ag, OVX-Sed e OVX-Ex-Ag; (\$) diferença estatística significativa comparada com os grupos OVX-Sed e OVX-Ex-Ag; (¥) diferença estatística significativa comparada com os grupos Int-Sed, OVX-Sed e OVX-Ex-Ag (ANOVA two-way e *post-hoc* Teste de Bonferroni).

A Figura 3 apresenta os resultados das análises biofísicas, densidade mineral (DM) e densidade óssea (DO). As ratas dos grupos treinados cronicamente (12 semanas), tanto para o grupo intacto (Int-Ex-Cr) quanto para o grupo OVX (OVX-Ex-Cr), obtiveram maior densidade mineral e densidade óssea quando comparadas com os grupos sedentários e de treinamento agudo. Ressalta-se que não houve diferença estatística entre os grupos treinados cronicamente (intacto e OVX), fato que corrobora com os resultados na carga máxima de carregamento. Outro dado importante a se destacar, refere-se aos valores obtidos pelos grupos OVX-Sed e OVX-Ex-Ag, que apresentaram DM e DO menor que todos os outros grupos.

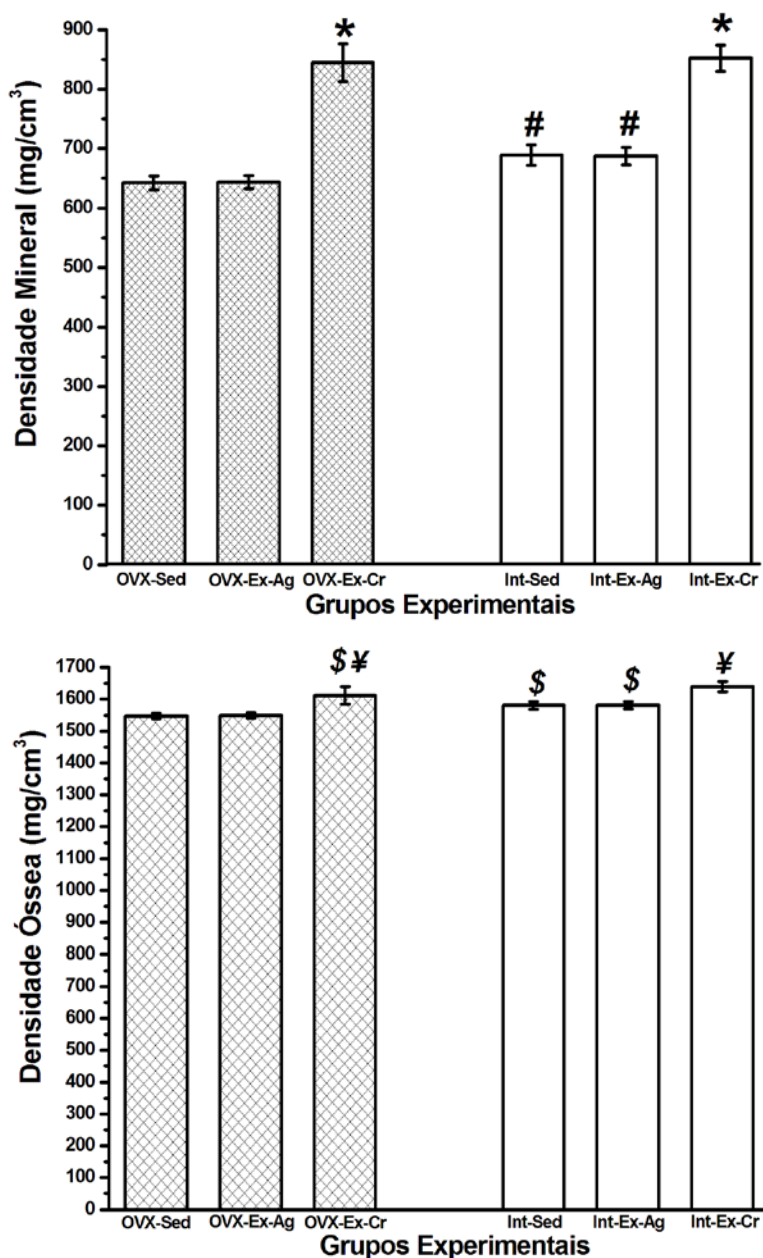


Figura 3 – Análises Biofísicas da Tíbia Esquerda das ratas: Densidade Mineral (DM) e Densidade Óssea (DO) expressos em mg/cm². Os valores estão apresentados pela média ± erro padrão da média (SEM), $p \leq 0,05$. **Grupo Ovariectomia (OVX):** Ovariectomia Sedentário (OVX-Sed), Ovariectomia Exercício Agudo (OVX-Ex-Ag) e Ovariectomia Exercício Crônico (OVX-Ex-Cr). **Grupo Intacto (Int):** Intacto Sedentário (Int-Sed), Intacto Exercício Agudo (Int-Ex-Ag) e Intacto Exercício Crônico (Int-Ex-Cr). (*) Diferença estatística significativa comparada com os grupos Int-Sed, Int-Ex-Ag, OVX-Sed e OVX-Ex-Ag; (#) diferença estatística significativa comparada com os grupos OVX-Sed e OVX-Ex-Ag; (¥) diferença estatística significativa comparada com os grupos Int-Sed, Int-Ex-Ag, OVX-Sed e OVX-Ex-Ag; (\$) diferença estatística significativa comparada com os grupos OVX-Sed e OVX-Ex-Ag (ANOVA two-way e *post-hoc* Teste de Bonferroni).

Os dados biofísicos apresentados na Figura 3 também são confirmados pelos resultados das análises biomecânicas e biométricas (Figura 4 e 5), com algumas diferenças entre si. O comprimento da tíbia (análise biométrica) foi maior nas ratas do grupo Int-Ex-Cr, quando comparado com as ratas de todos os outros grupos ($p \leq 0,05$). Também o grupo OVX-Ex-Cr foi beneficiado pelo treinamento de força de alta intensidade, pois apresentou desenvolvimento ósseo maior que os outros dois grupos OVX, e desenvolvimento equivalente comparado com os grupos intacto sedentário e intacto exercício agudo.

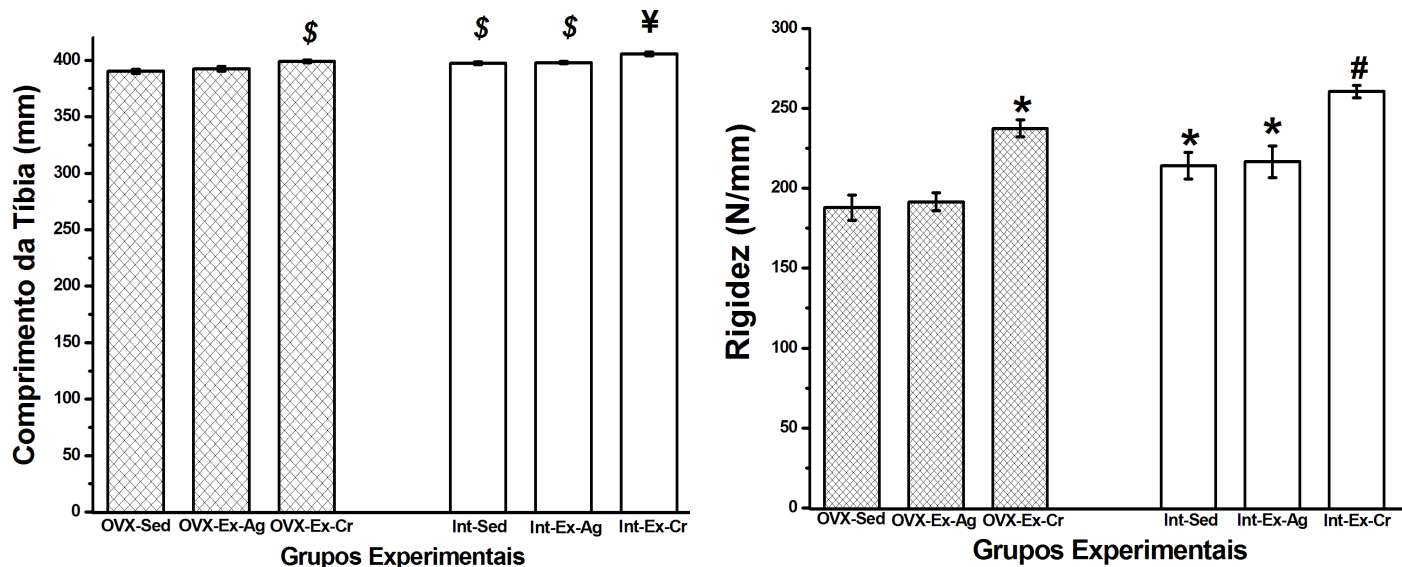


Figura 4 – Análise Biométrica e Biomecânica da Tíbia Esquerda das ratas: Comprimento da Tíbia (mm) e Rigidez (N/mm). Os valores estão apresentados pela média \pm erro padrão da média (SEM), $p \leq 0,05$. **Grupo Ovariectomia (OVX):** Ovariectomia Sedentário (OVX-Sed), Ovariectomia Exercício Agudo (OVX-Ex-Ag) e Ovariectomia Exercício Crônico (OVX-Ex-Cr). **Grupo Intacto (Int):** Intacto Sedentário (Int-Sed), Intacto Exercício Agudo (Int-Ex-Ag) e Intacto Exercício Crônico (Int-Ex-Cr). (¥) Diferença estatística significativa para todos os outros grupos experimentais; (\$) diferença estatística significativa comparada com os grupos OVX-Sed e OVX-Ex-Ag; (#) diferença estatística significativa comparada com todos os outros grupos; (*) diferença estatística significativa comparada com os grupos OVX-Sed e OVX-Ex-Ag (ANOVA two-way e *post-hoc* Teste de Bonferroni).

Em relação às análises biomecânicas, observa-se que a carga de fratura é maior para os grupos treinados cronicamente, e muito menor para os grupos OVX sedentário e de treinamento agudo. Porém, em relação a carga máxima e rigidez, o grupo Int-Ex-Cr apresentou valores significativamente maiores que todos os outros grupos indicando maior força biomecânica; também o grupo OVX-Ex-Cr foi beneficiado pelo treinamento de força proposto, pois apresentou valores de carga máxima e rigidez maiores que os outros grupos OVX e os grupos intactos sedentário e treinado agudamente, porém com significância estatística somente para os grupos OVX.

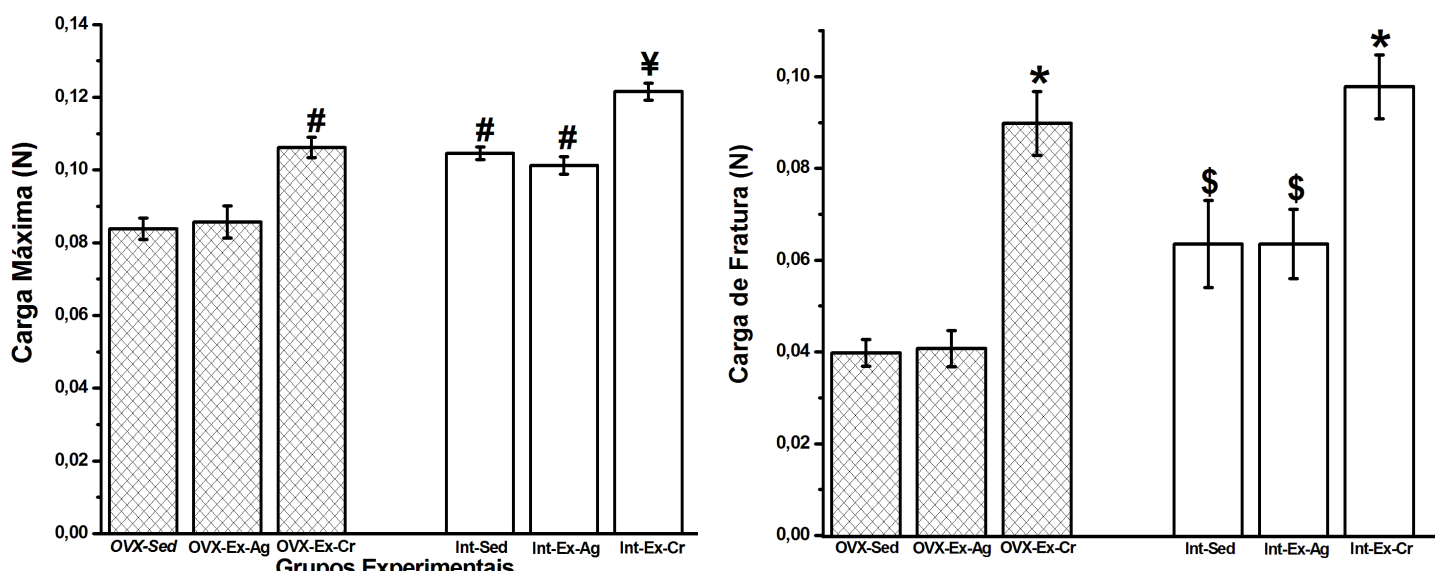


Figura 5 – Análises Biomecânicas da Tíbia Esquerda das ratas: Carga Máxima e Carga de Fratura expressos em Newton (N). Os valores estão apresentados pela média \pm erro padrão da média (SEM), $p \leq 0,05$. **Grupo Ovariectomia (OVX):** Ovariectomia Sedentário (OVX-Sed), Ovariectomia Exercício Agudo (OVX-Ex-Ag) e Ovariectomia Exercício Crônico (OVX-Ex-Cr). **Grupo Intacto (Int):** Intacto Sedentário (Int-Sed), Intacto Exercício Agudo (Int-Ex-Ag) e Intacto Exercício Crônico (Int-Ex-Cr). (¥) Diferença estatística significativa para todos os outros grupos experimentais; (#) diferença estatística significativa comparada com os grupos; OVX-Sed e OVX-Ex-Ag; (\$) diferença estatística significativa comparada com os grupos OVX-Sed e OVX-Ex-Ag; (*) diferença estatística significativa comparada com os grupos Int-Sed, Int-Ex-Ag, OVX-Sed e OVX-Ex-Ag (ANOVA two-way e *post-hoc* Teste de Bonferroni).

DISCUSSÃO

O aumento da massa corporal encontrado em nosso trabalho nas ratas ovariectomizadas é relatado na literatura como mecanismo protetor para prevenir a osteopenia promovida pela ovariectomia, estando relacionado com a sobrecarga mecânica imposta pela massa corporal [ZHAO et al., 2008]; porém, em nosso trabalho, apesar do aumento da massa corporal das ratas OVX nos grupos sedentário e treinado agudo, a densidade mineral (DM) e a densidade óssea (DO) desses dois grupos ficaram em valores abaixo de todos os outros grupos, principalmente em relação aos grupos treinados cronicamente (OVX e Intacto), indicando que o aumento da massa corporal não exerce efeito protetor sobre a massa óssea. Nossos resultados corroboram com os resultados de Jiang et al. [2008], que demonstram que esse efeito protetor sobre a massa óssea também não ocorre, e relacionam diretamente o aumento da massa corporal com a hiperfagia e o acúmulo de gordura provocada pela ovariectomia. Um dado interessante da massa corporal está relacionado com o grupo OVX-Ex-Cr, que apresentou massa corporal final menor que os outros dois grupos OVX ($p \leq 0,05$) e semelhante a todos os grupos intactos, demonstrando que o treinamento de força de alta intensidade proposto foi eficiente em prevenir o aumento do massa corporal proporcionado pela ovariectomia. Trabalho recente realizado com o mesmo protocolo de treinamento em ratas OVX, demonstrou que esse tipo de treinamento foi capaz de reduzir parcialmente a gordura hepática, os depósitos de gordura (mesentérica e retroperitoneal), e a gordura dos músculos sóleo e tibial anterior [LEITE et al., 2009]. Em estudos anteriores realizados em ratas OVX com treinamento de saltos em tubos de água e saltos com estímulo elétrico, o aumento da massa corporal não foi evitado pelo treinamento [SHIGUEMOTO et al., 2007; NOTOMI et al., 2003].

O nosso trabalho é o primeiro a estudar a relação entre treinamento de força de alta intensidade, atividade da MMP-2 e propriedades biomecânicas e biofísicas do tecido ósseo em ratas ovariectomizadas.

As Metaloproteases de Matriz (MMPs) formam uma família de proteases zinco-dependentes essenciais para diversos eventos fisiológicos e patológicos, como o desenvolvimento embrionário, angiogênese, reparo de feridas, artrite reumatóide e metástases [CHAVEY et al., 2003]. As MMPs são usualmente encontradas nos tecidos como pró-MMPs [KJAER, 2004] e sua expressão é altamente regulada por fatores de crescimento e citocinas produzidas durante o remodelamento tecidual [CARMELI et al., 2005], tornando-se portanto, cruciais para a manutenção e desenvolvimento do tecido saudável. O aumento na atividade das MMPs é usualmente indicativo de degradação da matriz que é necessária para permitir o crescimento tecidual [MARQUETI et al., 2008]. A MMP-2, em sua forma ativa (62kD), é a MMP mais importante para a preservação da massa óssea. Evidências recentes demonstram que a deficiência da MMP-2 induz a um distúrbio ósseo caracterizado por destruição do tecido ósseo na forma de nodulose, artrite e osteólise (Síndrome NAO), e que inclui também osteoporose generalizada [INOUE et al., 2006; AL-OTAIBI et al., 2002], fato que sugere papel mais complexo dessa gelatinase no desenvolvimento e manutenção do osso [MOSIG et al., 2007]. A ovariectomia reduz a atividade e a expressão da MMP-2, e, também, a expressão do colágeno do tipo I e III [ZECCHIN et al., 2005]. O colágeno do tipo I é o tipo de colágeno mais abundante no tecido ósseo, compreendendo cerca de 95% do colágeno ósseo e 80% do total de proteínas [NIYBIZI & EYRE, 1989]. Em todos os tecidos conjuntivos, o colágeno apresenta funções mecânicas, provendo elasticidade e estrutura para seus componentes teciduais. No osso, o colágeno do tipo I é um dos principais elementos determinantes das propriedades mecânicas. Alterações nas propriedades do colágeno, como as que ocorrem na

osteogênese imperfeita e na osteoporose, podem, portanto, afetar as propriedades mecânicas do osso, e, conseqüentemente, aumentar a susceptibilidade às fraturas [VIGUET-CARRIN et al., 2006]. A alta taxa de remodelamento óssea está associada com a desmineralização óssea e com a diminuição do conteúdo dos elos cruzados do colágeno (balanço ósseo negativo), promovendo, conseqüentemente, diminuição nas propriedades biomecânicas e biofísicas dos ossos. Trabalhos recentes demonstram que a MMP-2 está diretamente envolvida com a degradação e renovação do colágeno [MOSIG et al, 2007; INOUE et al., 2006]

Em nosso estudo, a ovariectomia reduziu drástica e significativamente a atividade das isoformas pro e ativa da MMP-2 nos grupos OVX sedentário e exercício agudo, quando comparado com os outros grupos, corroborando com os resultados obtidos por Zecchin et al. [2005], que demonstraram diminuição da atividade da MMP-2 em feridas na mucosa oral provocadas por extração do molar de ratas OVX. A diminuição da atividade da MMP-2 foi acompanhada também de diminuição na densidade mineral (DM) e na densidade óssea (DO), além de diminuição nas propriedades biomecânicas (carga de fratura, carga máxima e rigidez) e na biometria (comprimento da tíbia), confirmando as hipóteses sugeridas acima de que a diminuição da atividade da MMP-2 promove destruição do tecido ósseo e desarranjo estrutural do colágeno, determinando quadro clínico patológico semelhante à osteopenia e osteoporose proporcionadas pela menopausa. Como se pode observar, a ovariectomia mimetiza muito intrinsecamente o estado pós-menopáusico no qual os níveis de estrógeno estão bem reduzidos e o tecido ósseo sofre um aumento dramático no *turnover* ósseo, seguido de acelerada perda da massa óssea em diversas regiões do corpo [EGERMANN et al., 2005]. Estudo recente de Jiang et al. [2008] observou diminuição da densidade mineral óssea (DMO) femoral e da coluna lombar de ratas OVX comparadas com os grupos intactos, confirmando também que a ovariectomia é o modelo para mimetizar a menopausa.

Por outro lado, observa-se que o treinamento de força de alta intensidade proposto em nosso trabalho aumentou significativamente a atividade das isoformas pro e ativa da MMP-2 nos dois grupos treinados cronicamente (OVX-Ex-Cr e Int-Ex-Cr) comparados com os todos os outros grupos, embora não diferiram entre si. Ressalta-se que a atividade da MMP-2 ativa do grupo Int-Ex-Cr apresentou-se relativamente maior que o grupo OVX-Ex-Cr, porém sem apresentar significância estatística, fato acompanhado pela maior densidade óssea, comprimento da tíbia, carga máxima e rigidez, todos com significância estatística. Esses resultados já foram observados em outros estudos com ratas intactas [UMEMURA et al., 2008; SHIGUEMOTO et al., 2007], demonstrando que o treinamento de força de alta intensidade exerce efeito “modelador” sobre a massa óssea de ratas intactas [KIUCHI et al., 2006]. Em relação ao grupo OVX-Ex-Cr, podemos observar que o aumento da atividade da MMP-2 foi acompanhado de alterações positivas e significativas nas propriedades biofísicas, biomecânicas e biométricas, quando comparadas com os outros dois grupos OVX; quando se compara com o grupo Int-Sed e Int-Ex-Ag, os resultados somente são significativos em relação à densidade mineral e carga de fratura. À luz desses resultados, podemos afirmar que o treinamento de força de alta intensidade é eficiente em combater os efeitos deletérios provocados pela ovariectomia sobre o tecido ósseo.

Outro resultado interessante a ser abordado foi o aumento significativo da atividade da isoforma latente da MMP-2 (pro MMP-2) no grupo intacto treinado agudamente, fato que não ocorreu no grupo OVX treinado agudamente. Tem sido postulado na literatura que o exercício agudo promove aumento imediato na atividade da pro MMP-2 em tecidos peritendíneos humanos [KOSKINEN et al., 2004], dado que suporta a visão de que as MMPs desempenham um papel importante na imediata adaptação do tecido tendíneo ao exercício [KJAER, 2004], e como demonstrado em nosso estudo, do tecido ósseo. Em contrapartida, a ovariectomia

demonstra não permitir essa adaptação imediata do tecido ósseo ao exercício, fato que pode estar diretamente relacionado com a falta do estrogênio.

Nesse aspecto, é importante ressaltar que uma das funções do estrógeno no osso é aumentar a sensibilidade para cargas mecânicas [LEE et al., 2004], portanto, a ovariectomia e a menopausa podem diminuir a sensibilidade dos receptores ósseos às cargas mecânicas. Em consequência desse fato, o osso deficiente de estrógeno não consegue detectar cargas mecânicas de intensidade muito baixas [KIUCHI et al., 2006]; esse estudo demonstrou que o efeito do treinamento de força sobre a recuperação da massa óssea perdida por ratas OVX (5 meses após a ovariectomia) é “dose-dependente” (sensibilidade), pois seus resultados mostraram claramente que cargas baixas não produzem efeitos benéficos na recuperação da massa óssea, enquanto cargas médias e altas recuperaram a massa óssea perdida das ratas OVX comparadas com o grupo controle intacto. É proposto também que o treinamento de força com cargas altas apresentam cargas mecânicas acima do modo de conservação da deformação mecânica, aumentando o “modelamento” ósseo, enquanto que exercícios em esteira apresentam cargas no nível do modo de conservação, proporcionando, portanto, apenas remodelamento ósseo. Corroborando com os resultados apresentados acima, Tae-Woong et al. [2006] compararam exercício de corrida resistida e de endurance na esteira, e observaram que corrida resistida aumentou a massa óssea das ratas OVX significativamente em relação ao OVX-Sed e a corrida de endurance; o grupo endurance apresentou menor aumento, mas também significativo em relação ao OVX-Sed. As altas cargas de trabalho propostas em nosso trabalho para o treinamento das ratas corroboram com a hipótese acima proposta, demonstrando que o nosso treinamento de força de alta intensidade apresenta efeito modelador sobre o tecido ósseo de ratas intactas e OVX.

Outro resultado que contribuiu diretamente sobre esse efeito modelador foi a força máxima de carregamento, que aumentou significativamente em ambos grupos treinados cronicamente (OVX e intacto); é importante ressaltar que não houve diferença significativa entre os grupos. Para o grupo OVX-Ex-Cr, esse resultado parece ter sido determinante no aumento da massa óssea, pois a sarcopenia, definida como declínio fisiológico da massa e da função muscular no envelhecimento, pode provocar a osteoporose senil e pós-menopáusia [WALSH et al., 2006], já que a massa muscular e a mecânica da contração estimulam a neoformação óssea [COIN et al., 2008]. Sarcopenia, e a consequente diminuição da força muscular, é um dos fatores adicionais para o aumento do risco de fratura [WALSH et al., 2006]. Muitos estudos têm demonstrado relação positiva entre massa magra e densidade mineral óssea [BAKKER et al., 2003], e mulheres osteoporóticas apresentam massa muscular significativamente menores no esqueleto apendicular comparadas com seus controles não osteoporóticos [GILLETTE-GUYONNET et al., 2000]. Em nosso estudo, não foram realizadas análises histomorfométricas musculares, fato que limita um pouco nossas conclusões nesse sentido, porém os dados da força máxima de carregamento, fornecem indicativos de que outros estudos para se obter respostas mais precisas sobre essa relação intrínseca entre sarcopenia e osteopenia devem ser realizados, agregando-se também análises *in situ* da atividade da MMP-2 com o conceito acima exposto.

CONCLUSÕES

Sumariamente, nossos achados nos permitem concluir que existe forte relação entre a atividade da MMP-2 e propriedades biomecânicas e biofísicas do tecido ósseo. Adicionalmente, podemos concluir também que a ovariectomia impõe alterações drásticas e negativas na atividade da MMP-2, e, conseqüentemente, diminuição das propriedades

biomecânicas e biofísicas do osso, mimetizando intrinsicamente os efeitos deletérios da menopausa sobre o tecido ósseo.

Finalmente, o treinamento de força de alta intensidade realizado em nosso estudo, mostrou-se eficiente em prevenir as alterações deletérias sobre o tecido ósseo de ratas OVX, apresentando inclusive efeito modelador sobre a massa óssea dessas ratas, confirmando hipóteses anteriores, de que o treinamento resistido direcionado para ratas OVX e mulheres pós-menopáusicas, deve ser realizado com cargas acima do modo de conservação da deformação mecânica (dose-dependência) e iniciado o mais precoce possível durante a menopausa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFORD, A. I.; HANKENSON, K. D. Matricellular proteins: Extracellular modulators of bone development, remodeling, and regeneration. *Bone*, v.38, n.6, p.749–757, 2006.

AL-OTAIBI, L.; AL-MAYOUF, S. M.; MAJEED, M.; AL-EID, W.; BAHABRI, S.; HUGOSSON, C. O. Radiological findings in NAO syndrome. *Pediat Radiol*, v.32, n.7, p.465-539, 2002.

AZOULAY, C. “Hormone replacement therapy” is not what it used to be anymore. *Rev Med Interne*, v.25, n.11, p.806–815, 2004.

BAKKER, I.; TWISK, J. W.; VAN MECHELEN, W.; KEMPER, H. C. Fat-free body mass is the most important body composition determinant of 10-year longitudinal development of lumbar bone in adult men and women. *J Clin Endocrinol Metab*, v.88, n.6, p.2607–2613, 2003.

BENTON, M. J. Osteoporosis: Recommendations for Resistance Exercise and Supplementation With Calcium and Vitamin D to Promote Bone Health. *J Community Health Nurs*, v.23, n.4, p.201–211, 2006.

BORNSTEIN, P.; SAGE, E. H. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Curr Opin Cell Biol*, v.14, n.5, p.608–16, 2002.

CARMELI, E.; MOAS, M.; LENNON, S.; POWERS, S. K. High intensity exercise increases expression of matrix metalloproteinases in fast skeletal muscle fibres. *Exp Physiol*, v.90, n.4, p.613–619, 2005.

CHAVEY, C.; MARI, B.; MONTHOUEL, M. N.; BONNAFOUS, S.; ANGLARD, P.; VAN OBBERGHEN, E.; TARTARE-DECKERT, S. Matrix metalloproteinases are differentially expressed in adipose tissue during obesity and modulate adipocyte differentiation. *J Biol Chem*, v.278, n.14, p.11888–11896, 2003.

COIN, A.; PERISSINOTTO, E.; ENZI, G.; ZAMBONI, M.; INELMEN, E. M.; FRIGO, A. C.; MANZATO, E.; Busetto, L.; BUJA, A.; SERGI, G. Predictors of low bone mineral density in the elderly: the role of dietary intake, nutritional status and sarcopenia. *Eur J Clin Nutrition*, v.62, n.6, p.802–809, 2008.

COMPSTON, J. E. The risks and benefits of HRT. *JMNI*, v.4, n.2, p.187–190, 2004.

EGERMANN, M.; GOLDHAHN, J.; SCHNEIDER, E. Animal models for fracture treatment in osteoporosis. *Osteoporos Int*, v.16, n.S2, p.S129–138, 2005.

FEDARKO, N. S.; JAIN, A.; KARADAG, A.; FISHER, L. W. Three small integrin binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs) bind and activate specific matrix metalloproteinases. *FASEB J*, v.18, n.6, p.734–746, 2004.

FREDERIKS, W. M.; MOOK, O. R. F. Metabolic Mapping of Proteinase Activity with Emphasis on In Situ Zymography of Gelatinases: Review and Protocols. *J Histochem Cytochem*, v.52, n.6, p.711–722, 2004.

GIACHELLI, C. M.; STEITZ, S. Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization. *Matrix Biol*, v.19, n.7, p.615–622, 2000.

GILLETTE-GUYONNET, S.; NOURHASHEMI, F.; LAQUE, S.; GRANDJEAN, H.; VELLAS, B. Body composition and osteoporosis in elderly women. *Gerontology*, v.46, n.4, p.189–193, 2000.

HENLE, P.; ZIMMERMANN, G.; WEISS, S. Matrix Metalloproteinases and failed fracture healing. *Bone*, v.37, n.6, p.791-798, 2005.

HORNBERGER Jr., T. A.; FARRAR, R. P. Physiological Hypertrophy of the FHL Muscle Following 8 Weeks of Progressive Resistance Exercise in the Rat. *Can J Appl Physiol*, v.29, n.1, p.16-31, 2004.

HOSHINO, S.; OUCHI, Y. Right or wrong of the hormone replacement therapy involving osteoporosis. *Clin Calcium*, v.14, n.11, p.87–98, 2004.

INOUE, K.; MIKUNI-TAKAGAKI, Y.; OIKAWA, K.; IYOH, T.; INADA, M.; NOGUCHI, T.; JIN-SUNG, P.; ONODERA, T.; KRANE, S. M.; NODA, M.; ITOHARA, S. A Crucial Role for Matrix Metalloproteinase 2 in Osteocytic Canalicular Formation and Bone Metabolism. *J Biol Chem*, v.281, n.44, p.33814–33824, 2006.

JIANG, J. M. Y.; SACCO, S. M.; WARD, W. E. Ovariectomy-Induced Hyperphagia Does Not Modulate Bone Mineral Density or Bone Strength in Rats. *J Nutr*, v.138, n.11, p.2106–2110, 2008.

KALU, D. N. *The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss*. *Bone Miner*, v.15, n.3, p.175-92, 1991.

KENNEDY, O. D.; BRENNAN, O.; RACKARD, S. M.; STAINES, A.; O'BRIEN, J. O.; TAYLOR, D.; LEE, T. C. Effects of Ovariectomy on Bone Turnover, Porosity, and Biomechanical Properties in Ovine Compact Bone 12 Months Postsurgery. *J Orthop Res*, v.27, n.3, p.303-309, 2009.

KIUCHI, A.; SHIMEGI, S.; TANAKA, I.; IZUMO, N.; FUKUYAMA, R.; NAKAMUTA, H.; KOIDA, M. Dose-response effects of exercise intensity on bone in ovariectomized rats. *Int. J Spo Heal Sci*, v.4, n.1, p.10-18, 2006.

KJAER M. Role of Extracellular Matrix in Adaptation of Tendon and Skeletal Muscle to Mechanical Loading. *Physiol Rev*, v.84, n.2, p.649-698, 2004.

KOSKINEN, S. O. A.; HEINEMEIER, K. M.; OLESEN, J. L.; LANGBERG, H.; KJAER, M. Physical exercise can influence local levels of matrix metalloproteinases and their inhibitors in tendon-related connective tissue. *J Appl Phys*, v.96, n.3, p.861-864, 2004.

LEE, K. C. L.; LANYON, L. E. Mechanical loading influences bone mass through estrogen receptor α . *Exerc. Sport Sci. Rev.*, v.32, n.2, p.64-68, 2004.

LEITE, R. D.; PRESTES, J.; BERNARDES, C. F.; SHIGUEMOTO, G. E.; PEREIRA, G. B.; DUARTE, J. O.; DOMINGOS, M. M.; BALDISSERA, V.; PEREZ, S. E. A. Effects of ovariectomy and resistance training on lipid content in skeletal muscle, liver, heart, fat depots and lipid profile. *App Phys Nut Met*, v.34, n.6, p.1079-86, 2009.

MARQUETI, R. C.; PRESTES, J.; STOTZER, U. S.; PASCHOAL, M.; LEITE, R. D.; PEREZ, S. E. A.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. **MMP-2, jumping exercise and nandrolone in skeletal muscle.** *Int J Sports Med*, v.29, n.7, p.559-563, 2008.

MOSIG, R. A.; DOWLING, O.; DIFEO, A.; RAMIREZ, M. C. M.; PARKER, I. C.; ABE, E.; DIOURI, J.; AL AQEEL, A.; WYLIE, J. D.; OBLANDER, S. A.; MADRI, J.; BIANCO, P.; APTE, S. S.; ZAIDI, M.; DOTY, S. B.; MAJESKA, R. J.; SCHAFFLER, M. B.;

MARTIGNETTI, J. A. Loss of MMP-2 disrupts skeletal and craniofacial development and results in decreased bone mineralization, joint erosion and defects in osteoblast and osteoclast growth. *Hum Mol Genet*, v.16, n.9, p.1113–1123, 2007.

NAMS POSITION STATEMENT. Management of osteoporosis in postmenopausal women: 2006 Statement Position of The North American Menopause Society. *Menopause*, v.13, n.3, p.340-367, 2006.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. National science education standards. Washington, DC: *National Academy Press*, 1996.

NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis and Therapy. Osteoporosis prevention, diagnosis and therapy. *JAMA*, v.285, n.6, p.785-795, 2001.

NIYBIZI, C.; EYRE, D. R. Bone type V collagen: chain composition and location of a trypsin cleavage site. *Connect Tissue Res*, v.20, n.1-4, p.247–250, 1989.

NOTOMI, T.; OKIMOTO, N.; OKAZAKI, Y.; NAKAMURA, T.; SUZUKI, M. Tower climbing exercise started 3 months after ovariectomy recovers bone strength of the femur and lumbar vertebrae in aged osteopenic rats. *J. Bone Miner. Research*, v.18, n.1, p.140-149, 2003.

SHIGUEMOTO, G. E.; ROSSI, E. A.; BALDISSERA, V.; GOUVEIA, S. H.; VARGAS, G. M. F. V.; PEREZ, S. E. A. Isoflavone-supplemented soy yoghurt associated with resistive physical exercise increase bone mineral density of ovariectomized rats. *Maturitas*, v.57, n.5, p.261-270, 2007

STAMENKOVIC, I. Extracellular matrix remodeling: The role of matrix metalloproteinases. *J. Pathol.*, v.200, n.4, p.448–464, 2003.

STEFANICK, M. L.; ANDERSON, G. L.; MARGOLIS, K. L.; HENDRIX, S. L.; RODABOUGH, R. J.; PASKETT, E. D.; LANE, D. S.; HUBBEL, F. A.; ASSAF, A. R.;

SARTO G. E.; SCHENKEN, R. S.; YASMEEN, S.; LESSIN, L.; CHLEBOWSKI, R. T. Effects of conjugated equine estrogens on breast cancer and mammography screening in postmenopausal women with hysterectomy. *JAMA*, v.295, n.14, p.1647-1657, 2006.

TAE-WONG, O.; SOON-GILL, L.; MITSURU, H. Resistance Running Exercise Effectively Prevents Bone Loss in Ovariectomized Rats. *Waseda Spo*, v.3, p.8-17, 2006.

THOMPSON, D. D.; SIMMONS, H. A.; PIRIE, C. M.; KE, H. Z. FDA Guidelines and Animal Models for Osteoporosis. *Bone*, v.17, n.4S, p.125S-133S, 1995.

TREBACZ, H.; ZDUNECK, A. Three-point bending and acoustic emission study of adult rat femora after immobilization and free remobilization. *J Biomechanics*, v.39, n.2, p.237-245, 2006.

TURNER, C. H.; ROBLING, A. G. Designing exercise regimens to increase bone strength. *Exerc Sport Sci Rev*, v.31, n.1, p.45-50, 2003.

UMEMURA, Y.; NAGASAWA, S.; SOGO, N.; HONDA, A. Effects of jump training on bone are preserved after detraining, regardless of estrogen secretion state in rats. *J App Phys*, v.104, n.4, p.1116-1120, 2008.

VASHISHTH, D. Age-dependent biomechanical modifications in bone. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, v.15, n.4, p.343-358, 2005.

VASHISHTH, D. The Role of the Collagen Matrix in Skeletal Fragility. *Curr Osteop Rev*, v.5, n.2, p.62-66, 2007.

VIGUET-CARRIN, S.; GARNERO, P.; DELMAS, P. D. The role of collagen in bone strength. *Osteoporos Int*, v.17, n.3, p.319-336, 2006.

WALDORFF, E.; GOLDSTEIN, S. A.; McCREADIE, B. R. Age-dependent microdamage removal following mechanically induced microdamage in trabecular bone in vivo. *Bone*, v.40, n.2, p.425-432, 2007.

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

WIDRICK, J. J.; FUCHS, R.; MADDALOZZO, G. F.; MARLEY, K.; SNOW, C. Relative effects of exercise training and alendronate treatment on skeletal muscle function of ovariectomized rats. *Menopause*, v.14, n.3, p.528-534, 2007.

ZECCHIN, K. G.; PEREIRA, M. C.; COLETTA, R. D.; GRANER, E.; JORGE, J. Ovariectomy Reduces the Gelatinolytic Activity and Expression of Matrix Metalloproteinases and Collagen in Rat Molar Extraction Wounds. *Calcif Tissue Int*, v.76, n.2, p.136–145, 2005.

ZHANG, S. M.; MANSON, J. E.; REXRODE, K. M.; COOK, N. R.; BURING, J. E.; LEE, I. Use of Oral Conjugated Estrogen Alone and Risk of Breast Cancer. *Am J Epidemiol.*, v.165, n.5, p.524-529, 2007.

ZHAO, L. J.; JIANG, H.; PAPASIAN, C. J.; MAULIK, D.; DREES, B.; HAMILTON, J.; DENG, H. W. Correlation of obesity and osteoporosis: effects of fat mass on the determination of osteoporosis. *J Bone Miner Res*, v.23, n.1, p.17–29, 2008.

Manuscrito II

Efeito de um protocolo de treinamento de força de 13 meses sobre a densidade mineral óssea (DMO) e biomarcadores inflamatórios e do remodelamento ósseo (IL-1, leptina, TGF- β e IGF-I) de mulheres pós-menopáusicas

Gilberto Eiji Shiguemoto*¹, João Paulo Botero¹, Jonato Prestes¹, Carmen Lúcia Salla Pontes², Richard Diego Leite¹, Guilherme Borges Pereira¹, Fabiano Candido Ferreira¹, Cecília Tardivo Marin³, Vilmar Baldissera¹, Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo², Sérgio Eduardo de Andrade Perez¹

1 – Laboratório de Fisiologia do Exercício – Departamento de Ciências Fisiológicas – Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

2 – Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular - Departamento de Ciências Fisiológicas – Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

3 – Curso de Fisioterapia – Centro Universitário Central Paulista - UNICEP

* *Autor correspondente*

Gilberto Eiji Shiguemoto – Laboratório de Fisiologia do Exercício

Universidade Federal de São Carlos

E-mail: gileiji@terra.com.br

Endereço: Rua Bernardino Fernandes Nunes, 1707 – Casa 21 – Condomínio Dona Eugênia

Parque Delta – São Carlos – SP – BR – CEP: 13.566-490

Phones: +55(16)3361-6439/3411-3343/9607-4406

RESUMO

INTRODUÇÃO: osteoporose e doenças cardiovasculares são os distúrbios relacionados ao envelhecimento mais comumente encontrados em mulheres pós-menopáusicas. A osteoporose pós-menopáusicas é considerada doença inflamatória causada pela falta de estrogênio. Evidências recentes demonstram existir um link entre inflamação senil e osteoporose. A densidade mineral óssea (DMO) e os biomarcadores inflamatórios e do remodelamento ósseo constituem-se em critérios de avaliação clínica importantes na avaliação e acompanhamento da osteoporose. O exercício físico tem sido prescrito como forma alternativa para se prevenir os efeitos deletérios da osteoporose e combater a inflamação senil, porém ainda com resultados contraditórios.

OBJETIVO: foi investigar a influência do treinamento de força de alta intensidade na DMO e nos marcadores inflamatórios e do remodelamento ósseo de mulheres pós-menopáusicas.

MATERIAIS E MÉTODOS: 23 mulheres pós-menopáusicas, idade média 56,52 (\pm 4,43) anos foram selecionadas para participar do projeto. Realizaram treinamento de força de alta intensidade (75 a 80% de 1RM) durante 13 meses, duas sessões por semana. O treinamento foi constituído por 12 exercícios, sendo que as mulheres realizaram 3 séries de 8-10 repetições. A força muscular foi avaliada em 3 exercícios (leg-press, supino e rosca bíceps) por meio do teste de 1RM. Foram realizadas avaliações da DMO inicial e final por meio do método DXA (equipamento DPX # 6243 da marca LUNAR). Também foram realizadas análises bioquímicas da IL-1, leptina, TGF- β e IGF-I, todas por intermédio do método ELISA (kit RayBio®). **RESULTADOS:** observou-se aumento significativo na força muscular dos membros inferiores (leg-press) e dos membros superiores (supino e rosca bíceps), porém com maior magnitude para o leg-press (98,5%). A DMO apresentou pequeno aumento nas regiões observadas (colo femoral, coluna lombar e corpo todo), com significância estatística apenas para a coluna lombar. Porém, a diminuição do t-score reflete alteração clínica importante no risco de fratura. As avaliações bioquímicas apresentaram diminuição nas concentrações sorológicas da IL-1 e da leptina, e aumento do TGF- β e do IGF-I.

CONCLUSÕES: o treinamento de força mostrou-se, a longo prazo, eficaz e aplicável para aumentar a DMO de mulheres pós-menopáusicas e combater o processo de inflamação senil.

Palavras-Chave: treinamento de força, mulheres pós-menopáusicas, DMO, inflamação senil, IL-1, leptina, TGF- β , IGF-I.

INTRODUÇÃO

O aumento da proporção de mulheres idosas e o conseqüente aumento em sua expectativa de vida, tem aumentado a prevalência de doenças nas mulheres que antes estavam somente relacionadas aos homens, como as doenças cardiovasculares e cerebrovasculares [ROSANO; VITALI; FINI, 2009]. Osteoporose, câncer de mama e doenças cardiovasculares são os distúrbios relacionados ao envelhecimento mais comuns em mulheres pós-menopáusicas, estando associados a altos índices de morbidade e mortalidade nesta população [TREMOLLIÈRES; RIBOT, 2010].

A osteoporose configura-se como sério problema de saúde pública, pois aumenta consideravelmente o risco de incidência de fraturas em mulheres pós-menopáusicas, principalmente nas mais idosas [NAMS STATEMENT POSITION, 2010]. Trata-se de patologia progressiva, cuja manifestação clínica inicial relaciona-se a fraturas na coluna, colo femoral ou punho, e muito frequentemente, só é diagnosticada apenas após o aparecimento da fratura; por essa razão, é considerada como doença silenciosa e muito perigosa [POST et al., 2010]. Aproximadamente dois milhões de fraturas relacionadas à osteoporose foram reportadas nos Estados Unidos no ano de 2005, com custo estimado em cerca de 17 bilhões de dólares [BURGE et al., 2009], enquanto que na Europa foram reportadas no mesmo período cerca de 2,7 milhões de fraturas, com custo estimado em 36 bilhões de euros [KANIS et al., 2008].

A Densidade Mineral Óssea (DMO) tem-se constituído como critério básico para a determinação do diagnóstico da osteoporose e do risco de fraturas em mulheres pós-menopáusicas e homens idosos [MILLER, 2006]. A Absortometria Radiológica de Dupla Energia (DXA) é reconhecida como método referência para mensurar a DMO, apresentando aceitáveis erros de acurácia, boa precisão e reprodutibilidade [BLAKE; FOGELMAN,

2007A]. Entretanto, a DMO é um biomarcador que apresenta evolução e resposta lenta, tornando lento o processo de diagnóstico e acompanhamento da osteoporose.

Essa questão começa a ser discutida mais abertamente, no sentido de se encontrar outros biomarcadores que possam auxiliar no diagnóstico, prevenção e tratamento da osteoporose, em especial na prevenção das fraturas osteoporóticas. Nesse contexto, os biomarcadores envolvidos com a inflamação senil podem constituir-se em biomarcadores secundários importantes para auxiliar a melhor compreensão do diagnóstico e tratamento da osteoporose.

O estrogênio é um hormônio esteróide que apresenta importância indispensável não somente no desenvolvimento e maturação da mulher, mas também desempenha um papel bastante ativo na manutenção do sistema imunológico e no metabolismo ósseo [CARLSTEN, 2005]. A osteoporose pós-menopáusicas deve ser considerada como um produto de uma doença inflamatória disparada pela deficiência do estrogênio [DE MARTINS; MENGOLI; GINALDI, 2007]. A diminuição gradativa da produção de estrogênio no período pós-menopáusicas leva ao aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-6 (IL-6), a interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral (TNF- α), que promovem diferenciação e ativação osteoclástica [GOLDRING, 2003; PFEILSCHIFTER, 2003]. A deficiência do estrogênio também está relacionada com a diminuição na produção da osteoprotegerina (OPG) e do fator de transformação do crescimento - β (TGF- β), que se contrapõem à reabsorção óssea; o TGF- β é um potente repressor da ativação das células T senescentes, que apresentam propriedades pró-inflamatórias [DE MARTINS; MENGOLI; GINALDI, 2007].

Outros hormônios importantes para a manutenção do *turnover* ósseo como o fator de crescimento semelhante a insulina -I (IGF-I) e a Leptina também estão com a produção

comprometida em falta do estrogênio. O IGF-I apresenta importante papel na aquisição e manutenção da massa óssea, apesar de seus precisos alvos celulares e os mecanismos moleculares responsáveis por suas ações ainda permanecerem pouco compreendidos [CLEMENS; CHERNAUSEK, 2004]. A Leptina é um hormônio produzido pelos adipócitos, que originalmente estava relacionado somente com a regulação do balanço energético via sistema nervoso central [WEISS et al., 2006]; muitas linhas de pesquisa têm relacionado a Leptina com a saúde óssea, mas com resultados contraditórios. Alguns trabalhos têm associado a Leptina com DMO aumentada [BLAIN et al., 2002], diminuição do risco de fratura e diminuição da reabsorção óssea [SCHETT et al., 2004]; outros porém, reportam associação negativa entre a Leptina com a DMO [KONTOGIANNI et al., 2004] e o turnover ósseo [DENNISON et al., 2004].

A Terapia de Reposição Hormonal (TRH) tem sido prescrita para as mulheres pós-menopáusicas para contrapor a perda da massa óssea e minimizar os efeitos indesejados da menopausa, enquanto que os agentes anti-reabsortivos têm sido aceitos como esteio do tratamento da osteoporose [MADDALOZZO et al., 2007]. Somando-se a esse efeito sobre a massa óssea, a administração da TRH em mulheres pós-menopáusicas saudáveis diminui os níveis de IL-6, IL-1 e TNF- α , prevenindo também o aumento dos níveis de IL-6 em ratas ovariectomizadas [PFEILSCHIFTER *et al.*, 2002]. Entretanto, o tratamento farmacológico apresenta limitações, como efeitos colaterais, eficácia limitada [CAULEY et al., 2003], falta de adesão por grande parte dos pacientes [NAMS STATEMENT POSITION, 2010], e riscos de aparecimento, a longo prazo, de alguns tipos de câncer [OLSON; BANDERA; ORLOW, 2007].

A prática regular de exercícios físicos tem sido altamente recomendada pela literatura como ferramenta de combate aos efeitos deletérios da osteoporose pós-menopáusicas sobre o

sistema ósseo e, mais recentemente, sobre o sistema imunológico. Exercícios de descarga do peso corporal (como a dança, caminhada ou corrida leve), e exercícios de força são benéficos para o desenvolvimento e manutenção da massa óssea [WILSGAARD et al., 2009]. A atividade física deve promover carga axial suficiente para poder estimular a formação da massa óssea e muscular, e dessa forma reduzir ou atenuar os efeitos da osteoporose e sarcopenia senis [MADDALOZZO et al., 2007]. Porém, ainda persistem divergências sobre a influência desse tipo de treinamento sobre a produção de marcadores inflamatórios em indivíduos saudáveis e idosos, demonstrando a necessidade de mais estudos para se certificar a influência do exercício de força na redução ou não da inflamação em pessoas idosas [STEWART et al., 2007], e, conseqüentemente, estabelecer relações entre treinamento de força, sistema ósseo e sistema imune.

Em vista dos argumentos expostos, o objetivo desse trabalho foi verificar a influência de um protocolo de treinamento de força de alta intensidade (75 a 80% de 1RM) sobre a densidade mineral óssea (DMO) e marcadores bioquímicos pró e antiinflamatórios de mulheres pós-menopáusicas durante período de 13 (treze) meses.

METODOLOGIA

Sujeitos

As mulheres foram convidadas a participar desse estudo por meio de campanha de divulgação em panfletos explicativos e reportagens em jornal local. Todas procuraram voluntariamente os pesquisadores do estudo, e para serem selecionadas, passaram por avaliação médica individual oferecida pelo projeto. A avaliação médica constou de anamnese minuciosa, aferição dos sinais vitais, exame físico geral, hemograma completo, eletrocardiograma de repouso e esforço, e exame do sistema musculoesquelético. Foram selecionadas 23 (vinte e três) mulheres, idade inicial média 56,52 (\pm 4,43) anos, que obedeceram aos seguintes critérios de inclusão: pós-menopáusicas por período mínimo de 3 anos, sedentárias (sem atividade física consistente nos últimos 6 meses prévios ao estudo), não estarem realizando tratamento de reposição hormonal, não apresentarem doenças metabólicas ou endócrinas que afetassem a massa óssea ou muscular, e cognitivamente capazes de compreender as instruções do treinamento. Os critérios de exclusão foram: impedimentos musculoesqueléticos (ortopédicos ou artríticos) que impossibilitariam a execução dos exercícios propostos, diagnóstico de insuficiência cardíaca congestiva, arritmia severa, e hipertensão não controlada.

Treinamento de Força de Alta Intensidade

a) Equipamentos utilizados no treinamento: os equipamentos utilizados em todas as estações de treinamento foram da marca Reforce® (Jaú, SP, BR). Nos exercícios Leg-Press, Supino Reto, Panturrilha na barra guiada e Rosca Bíceps, foram utilizadas anilhas com pesos variados para determinação da carga. Nos demais exercícios abaixo discriminados, o próprio aparelho apresentava barras de ferro anexadas para determinação da carga.

- b) Protocolo de Exercícios:** as mulheres realizaram um protocolo de 12 exercícios resistidos, de acordo com a sequência: (01) Leg-Press 45°; (02) Supino Reto no Banco Supino; (03) Panturrilha na Barra Guiada; (04) Bíceps Braquial (Rosca Bíceps) em Pé; (05) Banco Adutor de Quadril; (06) Remada Baixa no Pulley Inferior; (07) Banco Extensor (Extensão de Joelho); (08) Chest Press; (09) Banco Abdutor de Quadril; (10) Tríceps Pressdown (Cross-Over); (11) Mesa Flexora (Flexão de Joelho – Ísquio-Tibiais); e (12) Pulley Alto. No final da sessão de exercícios resistidos, as mulheres realizavam 2 séries de 20 a 30 repetições de exercícios abdominais, seguidas de 10 minutos de exercícios de alongamento. Todos os procedimentos do protocolo de exercícios foram acompanhados pelos pesquisadores responsáveis pela pesquisa.
- c) Intensidade e volume do treinamento:** as mulheres realizaram três séries de 8 a 10 repetições cada, com carga estimada entre 75 a 80% da carga máxima (1 RM) de cada aparelho, sendo que cada repetição teve duração de 3 a 4 segundos. A carga de trabalho para cada exercício, excetuando-se o Leg-Press, o Supino Reto e a Rosca Bíceps, foi determinada pelo Método de 4 a 8 repetições para evitar excessiva sobrecarga [CASEROTTI et al., 2008]. Dessa forma, os sujeitos eram solicitados a realizar cada exercício com carga estimada pelos pesquisadores para permitir no máximo 4-8 repetições; então, a carga de treinamento de 75-80% de 1RM foi obtida de acordo com a tabela de carga estimada proposta por Baechle e Earle [2000]. A carga de trabalho foi ajustada a cada 4 semanas, de acordo com o método de 4-8 repetições. O intervalo (repouso) entre as sessões e os aparelhos foi de 1 minuto. As sessões de treinamento de força duravam 50 minutos em média. Foram realizadas 2 (duas) sessões de treinamento semanais (segundas e quintas-feiras), permitindo-se um mínimo de 72h de repouso entre elas para recuperação do treino.

d) **Adaptação e Período Total de Treinamento:** antes de iniciar todos os procedimentos do treinamento de força, as mulheres realizaram período de adaptação de quatro semanas, que consistia de 2 séries de 15 repetições com cargas baixas; nesse período foram enfatizadas a execução correta dos exercícios e a familiarização com os equipamentos e com o treinamento de força. As mulheres realizaram o treinamento de força de alta intensidade durante período de 12 meses, computando-se, portanto, 13 meses de período total de treinamento.

Avaliação da Força Máxima – Teste de Carga Máxima

Após quatro semanas de adaptação aos exercícios de força e avaliações clínicas, foram realizados os testes de carga máxima (1RM). Os testes de 1RM foram realizados no mesmo dia com no mínimo 10 minutos de intervalo entre os exercícios testados na seguinte ordem: supino com barra livre, leg press 45⁰ e rosca bíceps em pé. Em seguida do aquecimento geral (10 minutos de esteira em intensidade leve), os indivíduos foram submetidos a oito repetições com 50% de 1RM estimada (de acordo com a capacidade de cada participante verificada no período de adaptação de duas semanas), após um minuto de intervalo, foram realizadas três repetições com 70% de 1RM estimada [BAECHLE e EARLE, 2000]. Depois de três minutos as tentativas subsequentes foram realizadas para uma repetição com cargas progressivamente mais pesadas até que a 1RM fosse determinada em três tentativas, utilizando 3-5 minutos de descanso entre as tentativas. As padronizações das angulações e movimentos dos exercícios foram conduzidas de acordo com as descrições de Brown e Weir [2001]. Para certificar que as 1RM pré-treinamento fossem ajustadas antes do início do treinamento, as 1RM foram determinadas em três dias separados com dois dias entre estes testes. A correlação intraclasse foi determinada entre a segunda e a terceira tentativa do teste de 1RM. Uma alta correlação intraclasse foi observada entre as segundas e terceiras

tentativas nos testes (supino com barra livre $r= 0,99$, leg press 45^0 $r= 0,99$ e rosca direta em pé $r= 0,99$). A maior 1RM determinada a partir das últimas duas tentativas foi utilizada como medida inicial. Os testes de 1RM foram realizados mensalmente, permitindo também ajuste mensal da carga de treinamento para esses exercícios.

Avaliação da Densidade Mineral Óssea

A Densidade Mineral Óssea (DMO) foi mensurada nos períodos inicial e final (após 13 meses de treinamento) por meio do método DXA ou DEXA (Dual Energy X-ray Absorptiometry), com o equipamento DPX # 6243 da marca LUNAR (Lunar DPX-IQ, Madison, WI, USA). Esse equipamento fornece um laudo com os seguintes dados sobre a Densitometria Óssea (mg ou g/cm^2): Densidade Mineral Óssea da Coluna Lombar, do Colo Femoral Direito e do Corpo Todo. Os dados da DMO foram padronizados de acordo com o trabalho de Lu et al. [2001]. A composição Corporal também pode ser avaliada por esse equipamento, que fornece os seguintes dados: estatura (cm), massa corporal (kg), percentual de gordura, percentual de massa magra, massa gorda (g), massa magra (g), conteúdo mineral ósseo (g).

Análises Bioquímicas: determinação da citocina IL-1, leptina, Fator de Transformação do Crescimento (TGF- β) e Fator de crescimento semelhante à insulina -1 (IGF-I) do soro sanguíneo

Amostras sanguíneas de 4,5mL foram coletadas da veia antecubital dos sujeitos em tubos a vácuo antes (repouso) da primeira e da última (13 meses após) sessão de treinamento. Essas amostras foram centrifugadas a 2500rpm em $4^{\circ}C$ durante 20 minutos. Em seguida, o soro sanguíneo foi separado em alíquotas de 500 μ L, e armazenado em eppendorfs em freezer $-80^{\circ}C$ até a realização das análises. As dosagens de IL-1, leptina, TGF- β e IGF-I foram determinadas pelo método ELISA (Ensaio Imuno Enzimático em Fase Sólida), de acordo com

as especificações do Kit de Alta Sensibilidade R&D Systems Quantikine (R&D Systems Minneapolis, MN). Os resultados foram apresentados em pg/mL e ng/mL. Para garantir à precisão dos resultados todas as dosagens foram determinadas em duplicata.

Análise Estatística dos Dados

Todos os dados encontrados foram expressos como média \pm Desvio Padrão da Média (DPM). Inicialmente, foram realizados os testes de normalidade Shapiro Wilk e de homocedasticidade (critério de Bartlett). Para as variáveis que apresentaram distribuição normal e homocedasticidade normal, utilizou-se o teste t de Student. Para as variáveis que não apresentaram distribuição normal, utilizou-se o teste não-paramétrico de Wilcoxon. Em todos os cálculos foi fixado um nível crítico de 5% ($P < 0,05$). O software utilizado em todos os testes estatísticos foi o Statistica[®] 6.1 (Stat. Soft Inc., Tulsa, OK, USA).

Procedimentos Éticos & Legais

O experimento foi conduzido segundo as normas internacionais de ética na experimentação com humanos, e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Humana e Animal do Centro Universitário Central Paulista – CEP/UNICEP segundo protocolo 042/2008.

RESULTADOS

A Tabela 1 apresenta as principais características antropométricas e a composição corporal (inicial e final) das mulheres participantes do estudo.

TABELA 1 – Caracterização Antropométrica e Composição Corporal dos Sujeitos participantes (n = 23). Dados apresentados em Média ± DPM.

Dados Antropométricos	Inicial	Final
Idade (anos)	56,52 ± 4,43	57,52 ± 4,43
Altura (cm)	148,50 ± 32,71	148,50 ± 32,71
Massa Corporal (Kg)	67,56 ± 10,85	66,52 ± 10,98
Composição Corporal Geral	Inicial	Final
% Massa Gorda - DXA	37,78 ± 6,12	36,78 ± 6,34
Massa Gorda (Kg) - DXA	24,27 ± 6,37	23,54 ± 6,61*
Massa Magra (Kg) - DXA	38,88 ± 4,50	39,49 ± 5,40 [#]
Composição Corporal Regional	Inicial	Final
Membros Superiores		
Massa Magra (Kg)	4,570 ± 0,653	4,542 ± 0,730
Massa Gorda (Kg)	2,444 ± 0,836	2,168 ± 0,748
Membros Inferiores		
Massa Magra (Kg)	13,435 ± 1,496	14,031 ± 1,568*
Massa Gorda (Kg)	8,742 ± 2,066	8,884 ± 2,476
Tronco		
Massa Magra (Kg)	18,506 ± 2,841	18,525 ± 2,835
Massa Gorda (Kg)	11,331 ± 3,505	11,125 ± 3,606

* *Diferença estatística significativa para $p < 0,05$ – Teste t de Student.* [#]*Diferença estatística significativa para $p < 0,05$ – Teste não-paramétrico pareado de Wilcoxon.*

Os dados da Tabela 1 demonstram redução significativa da massa gorda total, com concomitante aumento também significativo da massa magra total ($p < 0,05$). As alterações relatadas, apesar de significativas, foram pequenas em magnitude e não alteraram a classificação das mulheres em relação à composição corporal. Essas pequenas alterações corroboram com os dados da Densidade Mineral Óssea (DMO) que estão na Tabela 2. Ressalta-se também o aumento significativo da massa magra do membro inferior, fato que foi acompanhado de grande aumento na força muscular no exercício Leg-Press e discreto aumento na DMO femoral.

A Tabela 2 apresenta os principais dados referentes à Densidade Mineral Óssea (mg/cm^2): Coluna Lombar, Colo do Fêmur e Corpo Todo, nos períodos inicial e final (13 meses após o treinamento de força).

Tabela 2 – Densidade Mineral Óssea (DMO) Inicial e Final da Coluna Lombar, Colo do Fêmur e Corpo Todo (mg/cm^2) (média \pm DPM).

Período	Densidade Mineral Óssea – DMO (mg/cm^2)			
	<i>Quadril Total</i>		<i>Coluna Lombar</i>	<i>Corpo Todo</i>
	<i>DMO</i>	<i>T-score</i>		
<i>Inicial</i>	873,17 \pm 93,08	- 0,552	1048,43 \pm 174,30	1107,43 \pm 92,79
<i>Final</i>	887 \pm 93,80	- 0,446	1061,78 \pm 173,87*	1125,17 \pm 113,15
<i>% de Ganho</i>	1,58		1,27	1,60

* Diferença estatística significativa para $p < 0,05$ – Teste t de Student

Como é possível observar, em todas as regiões avaliadas, houve discreto aumento na DMO, acompanhando as alterações ocorridas na composição corporal. Ressalta-se que a DMO da Coluna Lombar apresentou aumento significativo ($p < 0,05$). Esses resultados confirmam que o treinamento realizado, na intensidade (75-80% 1RM) e volume propostos, e de forma prolongada (13 meses), foi efetivo para promover alterações benéficas na DMO.

A Tabela 3 apresenta os resultados da Avaliação da Força Muscular Máxima obtidos por meio do Teste de Carga Máxima (1RM) em 3 exercícios dos 13 executados pelas voluntárias durante o período de treinamento: Leg-Press (Membros Inferiores), Supino e Rosca Bíceps (Membros Superiores).

Tabela 3 – Força Muscular (Carga Máxima, Kg) Inicial e Final (pós 13 meses de treinamento) (Média \pm DPM)

Força Muscular Máxima – Carga Máxima (Kg)			
Exercício Avaliado	Período		% de Ganho
	Inicial	Final	
Leg-Press	171,04 \pm 27,33	339,53 \pm 42,94*	98,50%
Supino	31,66 \pm 4,40	41,02 \pm 5,33*	29,67%
Bíceps	20,94 \pm 2,31	26,50 \pm 2,87*	26,5%

* *Diferença estatística significativa para $p < 0,05$ - Teste t de Student.*

Observa-se aumento significativo ($p < 0,05$) nesse importante quesito físico-funcional do sistema musculoesquelético, tanto para membros inferiores (Leg-Press) quanto para membros superiores (Supino e Rosca Bíceps). Quando se aponta para a magnitude do crescimento, observa-se que a força muscular dos membros inferiores elevou-se em maior

proporção (98,50% no Leg-Press) quando comparada com a dos membros superiores (29,67% no Supino e 26,55% no Biceps).

A Figura 1 apresenta os resultados referentes às análises das concentrações sorológicas da citocina IL-1 e da leptina durante os períodos inicial e final (13 meses após) do estudo. Observa-se que houve redução significativa nas concentrações sorológicas para as duas variáveis. Em contrapartida, os marcadores bioquímicos antiinflamatórios analisados nesse estudo, TGF- β e o IGF-I (Figura 2), apresentaram aumento significativo em suas concentrações sorológicas de repouso no período final comparado com o período inicial.

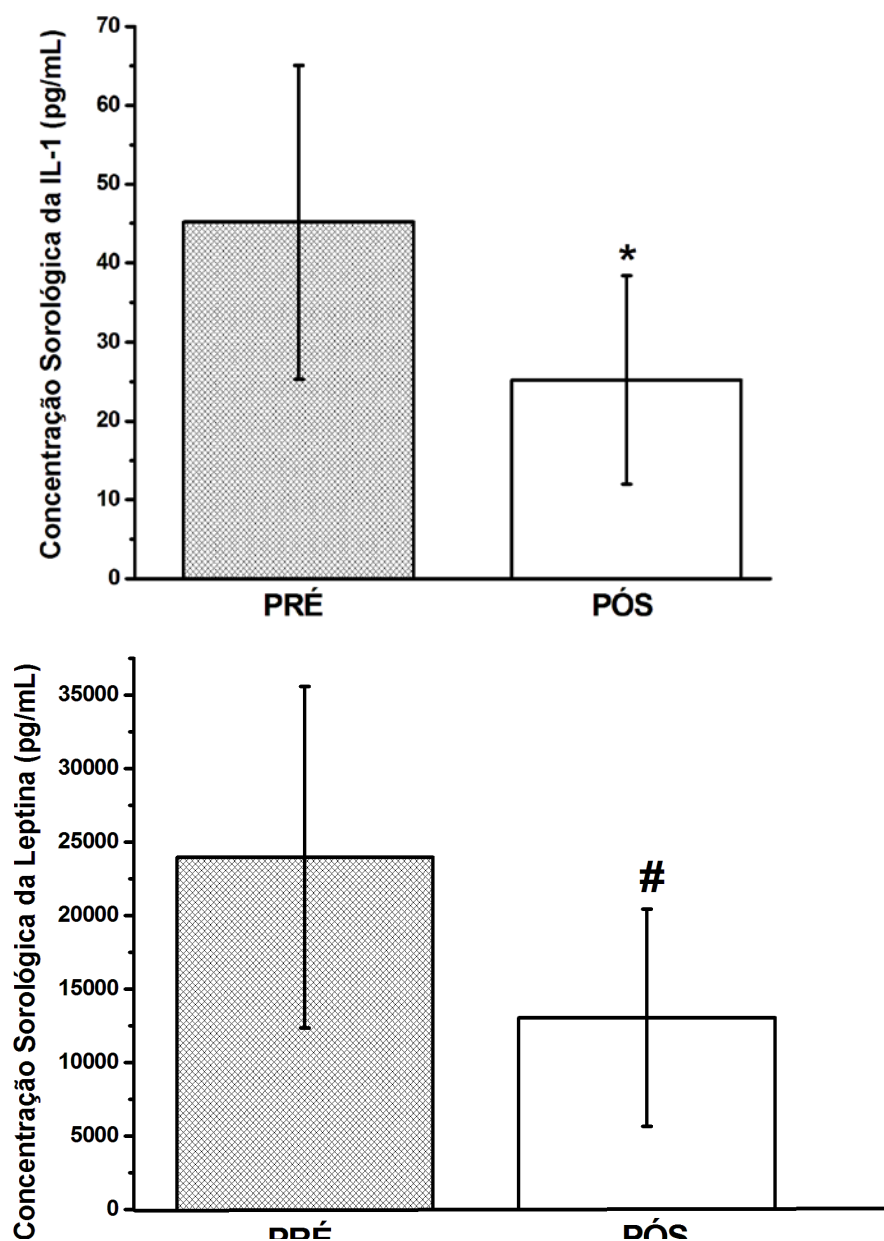


Figura 1 - Concentrações sorológicas da Interleucina -1 (IL-1) e da Leptina (pg/ml). Os valores estão apresentados em média \pm desvio padrão da média (DPM) (n= 23). A IL-1 e a Leptina foram avaliadas em repouso no período inicial (PRÉ) e no período final do treinamento de força (PÓS). (* e #) Diferença estatística significativa entre as médias inicial e final, teste t de Student ($p < 0,05$).

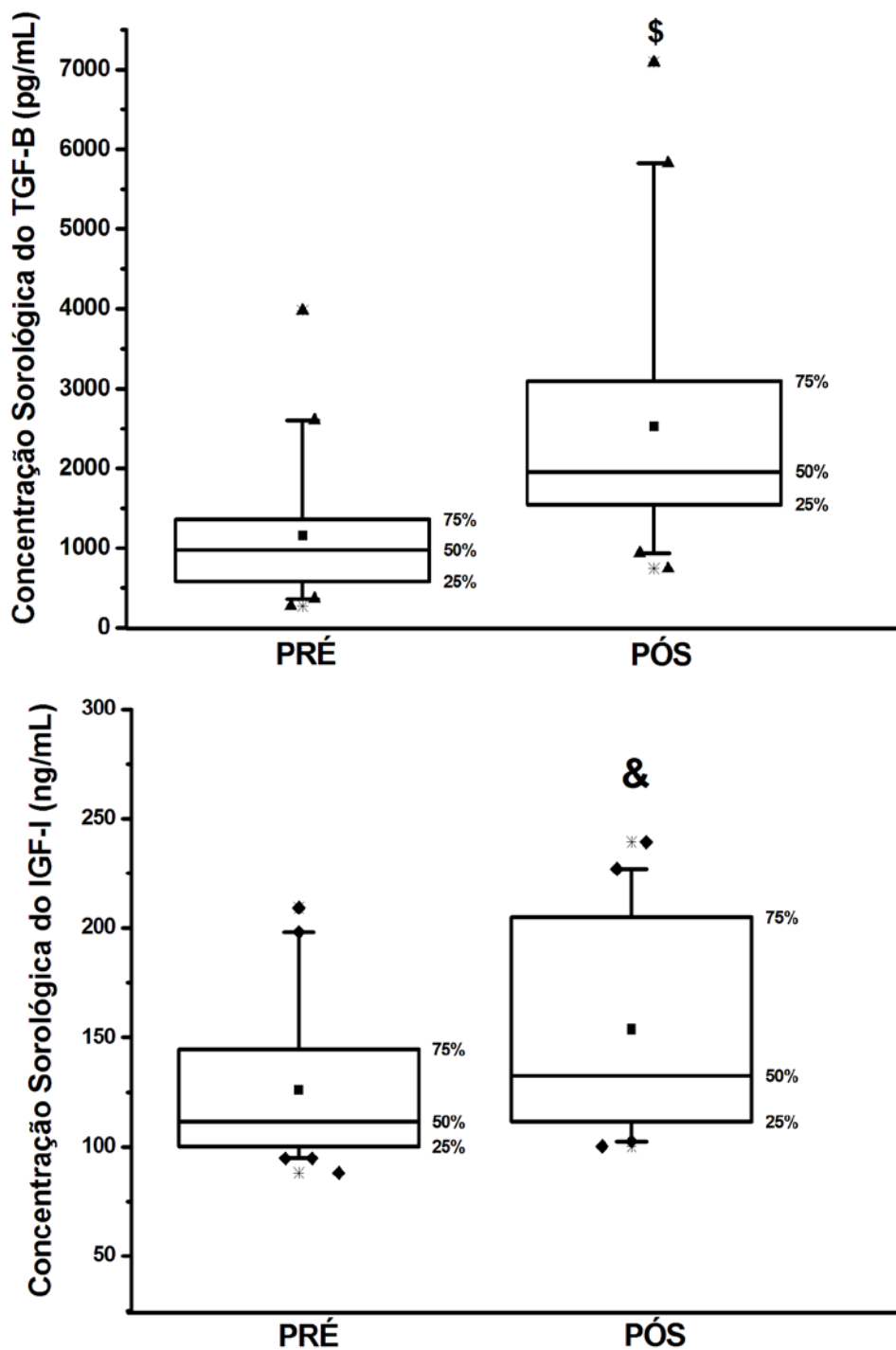


Figura 2 – Concentrações Sorológicas do TGF- β (pg/mL) e do IGF-I (ng/mL). Os valores estão expressos em média \pm desvio padrão da média (DPM) (n= 23). O TGF- β e o IGF-I foram avaliados nos períodos inicial (Pré) e final do treinamento de força (Pós). (\$ e &) Diferença estatística significativa entre as médias inicial e final, teste pareado de Wilcoxon ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

O aumento significativo da DMO da coluna lombar avaliado na DXA das mulheres participantes desse estudo após 13 meses de treinamento foi acompanhado de discreto aumento na DMO femoral e na DMO de corpo todo, demonstrando a efetividade do treinamento de força de alta intensidade proposto em estimular o pequeno, mas importante crescimento da massa óssea, contrapondo-se inclusive à perda que ocorre normalmente em mulheres pós-menopáusicas. A DXA é considerada como único método recomendado para determinar a classificação diagnóstica [BAIM et al., 2008], constituindo-se também, como ferramenta clínica muito útil para o monitoramento dos resultados de intervenções terapêuticas, pois permite acompanhar as alterações na DMO e no cálculo do risco de fraturas [LEWIECKI, 2009]. Apresenta grande versatilidade, pois é capaz de medir a DMO do corpo todo bem como de sítios específicos, especialmente aqueles com maior vulnerabilidade a fraturas, como o colo femoral, a coluna lombar e o punho [BLAKE; FOGELMAN, 2007B]. Por essas razões acima expostas, a DXA é considerada como medida padrão ouro para avaliar a densidade mineral óssea [LEWIECKI; BORGES, 2006].

Outro dado importante fornecido pela DXA é o t-score, índice preconizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para determinar a classificação diagnóstica da osteoporose e o risco de fratura [EL MAGHRAOUI; ROUX, 2008]. O t-score das mulheres de nosso estudo também apresentou ligeira diminuição, determinando, portanto, melhora na classificação diagnóstica e conseqüente diminuição no risco de fratura. Entretanto, desde a criação do t-score como critério para determinação do diagnóstico de osteoporose por meio da DMO, tem ocorrido muitos desentendimentos e empregos incorretos desse critério estabelecido pela OMS, principalmente o equívoco de que se o paciente não apresenta o t-

score abaixo de $-2,5DP$, não apresenta osteoporose, mesmo em presença de uma fratura claramente ocasionada por fragilidade óssea [NAMS STATEMENT POSITION, 2010]. A esse respeito, como a maioria das mulheres pós-menopáusicas e homens idosos sofrem fraturas por fragilidade óssea sem apresentarem diagnóstico de osteoporose, muitos pacientes de risco podem não receber tratamento para sua fragilidade óssea por não apresentarem t-score abaixo de $-2,5DP$ [MILLER, 2006].

O conceito dose-resposta emerge na atualidade com bastante força para se estabelecer relações mais efetivas entre exercícios e massa óssea. Vincent e Braith [2002] demonstraram que treinamento de força de alta intensidade (80% de 1RM, 1 série de 8 repetições, 3 vezes por semana) por período de 24 semanas foi estímulo suficiente para aumentar significativamente a DMO do colo femoral de homens e mulheres idosas (1,96%), enquanto que o treinamento de baixa intensidade (50% 1RM, 1 série de 13 repetições, 3 vezes por semana) não apresentou nenhum efeito sobre a DMO. Cussler et al. [2003] também conduziram um programa de treinamento de força de alta intensidade (80% 1 RM) em mulheres pós-menopáusicas, e observaram que a carga total de peso levantada durante os 12 meses de treinamento foi determinante para predizer as alterações na DMO dessa mulheres. Portanto, carga total de trabalho (peso levantado X número de repetições X número de séries) parece ser outra importante variável para se predizer alterações na DMO. Esses resultados também encontram consistência em estudos animais, que têm demonstrado que a magnitude do pico de deformação é um importante determinante da resposta óssea às cargas mecânicas [KIUCHI et al., 2006]. Em nosso estudo, o aumento observado na DMO femoral e coluna lombar, demonstra que a carga total de trabalho executado pelas mulheres (75-80% 1RM, 3 séries, 8-10 repetições) foi determinante para estimular esse aumento, corroborando com as hipóteses acima apresentadas. Portanto, o treinamento realizado em nosso estudo, na

intensidade (75-80% 1RM) e volume propostos, e de forma prolongada (13 meses), foi efetivo para promover alterações benéficas na DMO, reduzindo também o risco de fraturas (t-score).

Entretanto, estudo recente [BEMBEN; BEMBEN, 2010] contrasta com o conceito dose-resposta, e não suporta a hipótese de que apenas o treinamento de alta intensidade promove alterações benéficas na massa óssea. Nesse estudo, todos os 4 grupos treinados durante 24 semanas (alta intensidade 2 vezes por semana, baixa intensidade 2 vezes por semana, alta intensidade 3 vezes por semana, baixa intensidade 3 vezes por semana) tiveram aumento da DMO da coluna lombar e manutenção da DMO femoral

Outro dado importante observado na DXA de nosso estudo foi a alteração ocorrida na composição corporal. A massa magra total das mulheres apresentou discreto, porém, significativo aumento, contrapondo-se com a também discreta diminuição da massa gorda total. Entretanto, o dado mais relevante a ser discutido foi o significativo aumento da massa magra dos membros inferiores, aumento que não ocorreu nos membros superiores e no tronco. Esses dados foram acompanhados pelo maior aumento da força muscular nos membros inferiores (98,5% no Leg-Press) quando comparado com o aumento proporcionado pelo nosso protocolo de treinamento nos membros superiores (29,67% no Supino e 26,5% na Rosca Bíceps). A sarcopenia é um fator patogênico que influencia diretamente a osteoporose, pois, o processo inflamatório-catabólico que a acompanha, está diretamente associado com a perda de massa óssea que acontece na osteoporose [COIN et al., 2008]. Os altos índices de perda da massa muscular esquelética (massa magra) relacionadas ao envelhecimento e a menopausa ocorrem nas pernas e na região inferior do tronco, enquanto que perdas moderadas ocorrem na região superior do tronco e membros superiores. Essas regiões correspondem aos segmentos onde as fraturas ocorrem frequentemente [KANEHISA et al., 2004]. Muitos estudos vêm demonstrando que força muscular [SINAKI et al., 2002; BLAIN et al., 2001] e

massa muscular [WALSH; HUNTER; LIVINGSTONE, 2006; SZULC et al., 2005] estão diretamente relacionadas com índices de mineralização óssea sítio-específicos, tanto para o conteúdo quanto para a densidade mineral óssea. Entretanto, não está suficientemente claro se a diminuição regional da massa muscular afeta o declínio da massa óssea relacionado à idade em mulheres pós-menopáusicas [SANADA et al., 2008].

A relação entre osteoporose e inflamação senil tem emergido com bastante força nos últimos anos dentro do contexto existente entre sistema ósseo e sistema imune. Um fator biológico que pode estreitar essa compreensão, é o conceito da “osteimunologia”, que apresenta crescentes evidências da ligação íntima entre o tecido ósseo e o sistema imunológico [BREUIL et al., 2010]. De fato, as células da linhagem osteoblástica são reguladoras críticas do nicho de células-tronco hematopoéticas, das quais todas as células sanguíneas e imunológicas são derivadas; mediadores solúveis múltiplos da função celular imune, incluindo citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, também regulam a atividade osteoblástica e osteoclástica [LORENZO; HOROWITZ; CHOI, 2008]. Além do mais, as células imunes e ósseas são derivadas de um mesmo local, a medula óssea; devido a estreita proximidade dessas populações celulares, torna-se evidente que o tecido ósseo e o sistema imune interagem frequentemente [TAKAYANAGI et al., 2005].

Uma forte ligação temporal entre inflamação e osteoporose emerge em condições como envelhecimento, menopausa, gravidez, transplantes e administração de esteróides. A concordância de que osteoporose e inflamação estão associadas, está amparada pela emergente evidência de que fatores imunológicos são os mediadores dos processos acima relatados [YUN; LEE, 2004]. Em particular, características da inflamação crônica e do remodelamento do sistema imune de várias doenças imunológicas comumente associadas com a osteoporose, podem ser fatores patogénéticos determinantes [DE MARTINS; MENGOLI;

GINALDI, 2007]. A inflamação senil pós-menopáusica, medida por marcadores como a IL-6, IL-1, TNF- α e a proteína C-reativa (PC-R) está significativamente relacionada com performance física pobre e diminuição da força muscular [CESARI et al., 2004], e com níveis baixos de atividade física em pessoas idosas [COLBERT et al., 2004]. A artrite reumatóide (AR) é o exemplo típico do link existente entre inflamação e osteoporose. A perda óssea na AR ocorre tanto na articulação quanto no esqueleto como resultado da liberação de proteases (metaloproteases) e citocinas próinflamatórias (TNF- α e IL-1) [GINALDI et al., 2005]. A IL-1 e o TNF- α são as citocinas localmente produzidas mais potentes para estimular a reabsorção e inibir a formação óssea [PACIFICI, 1996]. Ding et al. [2008], em estudo de acompanhamento longitudinal de 3 anos, observaram que altas concentrações sorológicas das citocinas próinflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF- α) estão associadas com grandes perdas da massa óssea do quadril, da coluna e do corpo todo. A concentração elevada dessas citocinas aumenta o risco de ocorrência de fraturas femorais [McLEAN; ROUBENOFF; HANNAN, 2008]. Evidências recentes demonstram que a força muscular em mulheres pós-menopáusicas também está fortemente ligada à expressão genética de adipocinas inflamatórias [WANG et al., 2010].

A leptina, um hormônio parecido com as citocinas secretado pelos adipócitos (adipocina) e envolvido na regulação do balanço energético e massa corporal [AIZAWA-ABE et al., 2000], também apresenta importante e contraditória função na regulação da massa óssea [HAMRICK et al., 2005] e sistema imune [MATARESE; MOSCHOS; MANTZOROS, 2005]. Concentrações elevadas de leptina circulante têm sido relacionadas com altos índices de DMO em mulheres pós-menopáusicas [WEISS et al., 2006], enquanto que concentrações baixas têm sido relacionadas com baixos índices de DMO [PASCO et al., 2001] e aumento da susceptibilidade à infecções e inflamações, estando associadas também com desequilíbrio na

produção das citocinas pró e antiinflamatórias [FAGGIONI et al., 2001]. Por outro lado, aumento nas concentrações plasmáticas da leptina estão relacionadas com doenças autoimunes, como a artrite reumatóide, e estados inflamatórios crônicos relacionados à obesidade, nos quais citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , a IL-1 β e a IL-6) também estão com concentrações elevadas [MATARESE; MOSCHOS; MANTZOROS, 2005]. Em relação à DMO, outros estudos demonstram relação inversa entre concentração de leptina e DMO [KONTOGIANNI et al, 2004; BLUM et al., 2003].

O efeito do exercício regular ou crônico nos níveis basais dos marcadores inflamatórios tem sido utilizado para se recomendar o exercício como terapia antiinflamatória [BRUUNSGAARD, 2005], pois exercícios regulares e de longo prazo exercem proteção contra doenças associadas com alto grau de inflamação crônica sistêmica [PETERSEN; PEDERSEN, 2005]. Entretanto, comparado com séries agudas de exercícios, o efeito do exercício crônico nos marcadores inflamatórios tem sido pouco investigado [PLOEGER et al., 2009]. Outra questão importante e controversa está relacionada à intensidade do treinamento. Enquanto exercícios de intensidade moderada parecem apresentar efeitos antiinflamatórios, exercícios extenuantes aumentam a produção de repouso dos marcadores pró-inflamatórios durante e após o período de treinamento intenso em pessoas idosas [GLEESON, 2007].

Nosso trabalho é o primeiro a estudar o efeito crônico (13 meses) do treinamento de força de alta intensidade nos marcadores pró e antiinflamatórios de mulheres pós-menopáusicas, e as relações desses marcadores bioquímicos com a DMO. Nossos resultados contrastam em parte com o exposto acima, pois, nas mulheres de nosso trabalho, o treinamento reduziu a produção de repouso da citocina pró-inflamatória IL-1 e da leptina, e aumentou a produção dos marcadores antiinflamatórios, TGF- β e IGF-I, demonstrando claramente efeito antiinflamatório crônico do treinamento proposto. Em nosso estudo,

observa-se relação direta entre a leptina e a citocina pró-inflamatória IL-1, pois ambas reduziram suas concentrações após 13 meses de treinamento. Observa-se também relação inversa entre esses marcadores bioquímicos e a DMO da coluna lombar e femoral.

O TGF- β é uma importante citocina regulatória com papel essencial na regulação da resposta imune [LI et al., 2006] e na formação óssea [JANSSENS et al., 2005]. O TGF- β regula uma ampla variedade de processos biológicos, que incluem a proliferação, sobrevivência, diferenciação e migração celular, e também a produção da matriz extracelular (MEC). Em relação ao sistema imune, o papel dominante do TGF- β é o de induzir a tolerância (papel regulador) bem como conter e resolver a inflamação. O TGF- β também regula positivamente a resposta imune recrutando os leucócitos na fase inicial da inflamação e promovendo a sobrevivência das células T [LI et al., 2006].

Já em relação ao sistema ósseo, o TGF- β apresenta importante função no equilíbrio entre reabsorção e formação óssea, fundamental para o processo de remodelamento e manutenção da massa óssea, pois estimula a proliferação e diferenciação dos pré-osteoblastos em osteoblastos, bem como inibe a ação de osteoclastos maduros [LAU et al., 2004]. Outro importante e crucial papel do TGF- β no osso refere-se às propriedades mecânicas. O TGF- β regula as propriedades mecânicas e o conteúdo mineral da matriz óssea, que contribuem decisivamente para aumentar a resistência óssea às fraturas [BALOOCH et al., 2005]. Estudo de Hering et al. [2002] observou aumento na concentração plasmática do TGF- β 1 em homens e mulheres jovens após realizarem treinamento de força durante 4 semanas, assumindo que as alterações ocorreram em grande parte devido ao aumento da produção do TGF- β 1 ou liberação pelo osso, promovidas pela carga mecânica imposta pelo treinamento. Tem sido postulado na literatura de forma contraditória a relação entre o TGF- β e a DMO em mulheres com osteoporose. Alguns estudos apresentam correlação positiva entre a concentração

plasmática do TGF- β e DMO [GRAINGER et al., 1999], enquanto outros não [YOUSEFZADEH et al., 2006]. Em nosso estudo, o aumento significativo da concentração sérica do TGF- β foi acompanhado de importante aumento na DMO da coluna lombar e de discreto aumento femoral.

O fator de crescimento semelhante a insulina -1 (IGF-I), principalmente sintetizado no fígado, músculos, osteoblastos e adipócitos, está entre os mais importantes reguladores da função celular óssea devido ao seu efeito anabólico no esqueleto, apresentando potencial para regular o remodelamento ósseo, bem como permitir a aquisição e modelamento ósseo [GIUSTINA; MAZZIOTI; CANALIS, 2008]. O IGF-I também está diretamente envolvido com a manutenção da massa e função muscular durante o período de crescimento, bem como durante a vida toda, incluindo o período do envelhecimento [MUSARO et al., 2001]. No aspecto clínico, a diminuição na concentração sorológica do IGF-I está fortemente relacionada à diminuição da DMO radial e ao aumento do risco de fraturas na coluna lombar de mulheres pós-menopáusicas [YAMAGUCHI et al., 2006]. Corroborando com esse estudo, trabalho de Hedström [1999] demonstra que baixos níveis sorológicos de IGF-I estão diretamente relacionados com diminuição da DMO e da massa magra de membros inferiores, bem como aumento na ocorrência de fraturas femorais. O IGF-I relaciona-se também com o processo de inflamação senil, pois o aumento da IL-6 circulante que ocorre no envelhecimento, promove diminuição da concentração do IGF-I, e conseqüentemente, diminuição da força muscular [BARBIERI et al., 2003]. Baixas concentrações de IGF-I em mulheres idosas estão associadas com força pobre dos músculos extensores do joelho, velocidade de caminhada lenta, baixa mobilidade e incapacidade funcional [CAPPOLA et al., 2001].

Estudo de Borst et al. [2001], que realizou treinamento de força em homens e mulheres adultas durante 25 semanas, observou aumento na concentração do IGF-I circulante, relacionando-o em parte ao aumento de força produzido pelo treinamento. Contrastando com os resultados acima apresentados, estudo de Maddalozzo e Snow [2000], que realizou treinamento de força de alta intensidade em homens e mulheres idosas durante 24 semanas, observou aumento da força muscular de todo o corpo e aumento da DMO trocantérica, mas não observou alteração na concentração sorológica do IGF-I. Em nosso estudo, o aumento observado nas concentrações sorológicas do IGF-I correlaciona-se positivamente com o aumento observado na força muscular, na massa magra de membros inferiores e na DMO femoral e da coluna lombar, demonstrando efeito anabólico do treinamento realizado sobre o tecido ósseo e muscular das mulheres pós-menopáusicas do estudo. A diminuição da citocina pró-inflamatória IL-1 e da leptina podem também ter influenciado o aumento do IGF-I.

Os sujeitos participantes de nosso estudo foram controle deles mesmos, principal limitação para abordagens comparativas com outros grupos de pessoas. Entretanto, por todo o exposto nesta discussão, parece-nos oportuno concordar que o desenvolvimento de modelos baseados no mecanismo da doença, que integrem a fisiologia com a patologia óssea, podem ser mais adequados para promover uma nova abordagem que permita melhor entendimento da osteoporose, sua prevenção e tratamento [POST et al., 2010].

CONCLUSÕES

Sumariamente, o presente estudo permite-nos afirmar que o treinamento de força de alta intensidade, realizado de forma prolongada, é aplicável e funciona como ferramenta não-

farmacológica aliada na prevenção da perda de densidade mineral óssea em mulheres pós-menopáusicas, principalmente na coluna lombar e membros inferiores, que são as regiões corporais mais afetadas por fraturas osteoporóticas.

Permite-nos também confirmar que o treinamento de força de alta intensidade é capaz de combater, a longo prazo, o processo de inflamação senil, revertendo processos catabólicos provocados pela inflamação, tanto no músculo quanto no tecido ósseo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIZAWA-ABE, M.; OGAWA, Y.; MASUZAKI, H.; EBIHARA, K.; SATOH, N.; IWAI, H.; MATSUOKA, N.; HAYASHI, T.; HOSODA, K.; INOUE, G.; YOSHIMASA, Y.; NAKAO, K. Pathophysiological role of leptin in obesity-related hypertension. *J Clin Invest*, v.105, n.9, p.1243–1252, 2000.

BAECHLE, T. R.; EARLE, R. W. *Essentials of Strength Training and Conditioning*. 2nd Edition, Illinois, USA: Human Kinetics Publishers, NSCA, 2000.

BAIM, S.; BINKLEY, N.; BILEZIKIAN, J. P.; KENDLER, D. L.; HANS, D. B.; LEWIECKI, E. M.; SILVERMAN, S. Official Positions of the International Society for Clinical Densitometry and executive summary of the 2007 ISCD Position Development Conference. *J Clin Densitom*, v.11, n.1, p.75–91, 2008.

BALOOCH, G.; BALOOCH, M.; NALLA, R. K.; SCHILLING, S.; FILVAROFF, E. H.; MARSHALL, G. W.; MARSHALL, S. J.; RITCHIE, R. O.; DERYNCK, R.; ALLISTON, T. TGF- β regulates the mechanical properties and composition of bone matrix. *PNAS*, v.102, n.52, p.18813-18, 2005.

- BARBIERI, M.; FERRUCCI, L.; RAGNO, E.; CORSI, A.; BANDINELLI, S.; BONAFÈ, M.; OLIVIERI, F.; GIOVAGNETTI, S.; FRANCESCHI, C.; GURALNIK, J. M.; PAOLISSO, G. Chronic inflammation and the effect of IGF-I on muscle strength and power in older persons. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v.284, n.3, p.E481–E487, 2003.
- BEMBEN, D. A.; BEMBEN, M. G. Dose–response effect of 40 weeks of resistance training on bone mineral density in older adults. *Osteop Int*, 2010, online published.
- BLAIN, H.; VUILLMEIN, A.; TEISSIER, A.; HANESSE, B.; GUILLEMIN, F.; JEANDEL, C. Influence of muscle strength and body weight and composition on regional bone mineral density in healthy women aged 60 years and over. *Gerontology*, v.47, n.4, p.207-212, 2001.
- BLAIN, H.; VUILLEMIN, A.; GUILLEMIN, F.; DURANT, R.; HANESSE, B.; DE TALANCE, N.; DOUCET, B.; JEANDEL, C. Serum leptin level is a predictor of bone mineral density in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*, v.87, n.3, p.1030–1035, 2002.
- BLAKE, G. M.; FOGELMAN, I. The role of DXA bone density scans in the diagnosis and treatment of osteoporosis. *Postgrad Med J*, v.83, n.982, p.509–517, 2007A.
- BLAKE, G. M.; FOGELMAN, I. Role of dual-energy X-ray absorptiometry in the diagnosis and treatment of osteoporosis. *J Clin Densitom*, v.10, n.1, p.102–110, 2007B.
- BLUM, M.; HARRIS, S. S.; MUST, A.; NAUMOVA, E. N.; PHILLIPS, S. M.; RAND, W. M.; DAWSON-HUGHES, B. Leptin, body composition and bone mineral density in premenopausal women. *Calcif Tissue Int*, v.73, n.1, p.27–32, 2003.
- BORST, S. E.; DE HOYOS, D. V.; GARZARELLA, L.; VINCENT, K.; POLLOCK, B. H.; LOWENTHAL, D. T.; POLLOCK, M. L. Effects of resistance training on insulin-like growth factor-I and IGF binding proteins. *Med Sci Spor Exerc*, v.33, n.4, 2001, p.648-653, 2001.

- BREUIL, V.; TICCHIONI, M.; TESTA, J.; ROUX, C. H.; FERRARI, P.; BREITTMAYER, J. P.; ALBERT-SABONNADIÈRE, C.; DURANT, J.; DE PERRETI, F.; BERNARD, A.; EULLER-ZIEGLER, L.; CARLE, G. F. Immune changes in post-menopausal osteoporosis: the Immunos study. *Osteoporos Int*, v.21, n.5, p.805–814, 2010.
- BROWN, L. E.; WEIR, J. P. Procedures Recommendation I: Accurate Assessment of Muscular Strength and Power. *J Exerc Physiol*, v.4, n.3, p.1-21, 2001.
- BRUUNSGAARD, H. Physical activity and modulation of systemic low-level inflammation. *J Leukoc Biol*, v.78, n.4, p.819-835, 2005.
- BURGE, R.; DAWSON-HUGHES, B.; SOLOMON, D. H.; WONG, J. B.; KING, A.; TOSTESON, A. Incidence and economic burden of osteoporosis-related fractures in the United States, 2005–2025. *J Bone Miner Res*, v.22, n.3, p.465–475, 2007.
- CAPPOLA, A. R.; BANDEEN, R. K.; WAND, G. S.; VOLPATO, S.; FRIED, L. P. Association of IGF-1 levels with muscle strength and mobility in older women. *J Clin Endocrinol Metab*, v.86, n.9, p.4139–4146, 2001.
- CARLSTEN, H. Immune responses and bone loss: the estrogen connection. *Immunological Reviews*, v.208, n.1, p.194-206, 2005.
- CASEROTTI, P.; AAGAARD, P.; LARSEN, J. B.; PUGGAARD, L. Explosive heavy-resistance training in old and very old adults: changes in rapid muscle force, strength and power. *Scand J Med Sci Sports*, v.18, n.6, p.773–782, 2008.
- CAULEY, J. A.; ROBBINS, J.; CHEN, Z.; CUMMINGS, S. R.; JACKSON, R. D.; LA CROIX, A. Z.; LE BOFF, M.; LEWIS, C. E.; Mc GOWAN, J.; NEUNER, J.; PETTINGER, M.; STEFANICK, M. L.; WACTAWSKI-WENDE, J.; WATTS, N. B. Effects of estrogen plus progestin on risk of fracture and bone mineral density: the Women's Health Initiative randomized trial. *JAMA*, v. 290, n.13, p.1729–38, 2003.

CESARI, M.; PENNINX, B. W. J. H.; PAHOR, M.; LAURETANI, F.; CORSI, A. M.; WILLIAMS, G. R.; GURALNIK, J. M.; FERRUCCI, L. Inflammatory Markers and Physical Performance in Older Persons: The InCHIANTI Study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, v.59, n.3, p.M242-M248, 2004.

CLEMENS, T. L.; CHERNAUSEK, S. D. Genetic strategies for elucidating insulin-like growth factor action in bone. *Growth Horm IGF Res*, v.14, n.3, p.195–199, 2004.

COIN, A.; PERISSINOTTO, E.; ENZI, G.; ZAMBONI, M.; INELMEN, E. M.; FRIGO, A. C.; MANZATO, E.; Busetto, L.; BUJA, A.; SERGI, G. Predictors of low bone mineral density in the elderly: the role of dietary intake, nutritional status and sarcopenia. *Eur J Clin Nutrition*, v.62, n.6, p.802–809, 2008.

COLBERT, L. H.; VISSER, M.; SIMONSICK, E. M.; TRACY, R. P.; NEWMAN, A. B.; KRITCHEVSKY, S. B.; PAHOR, M.; TAAFFE, D. R.; BRACH, J.; RUBIN, S.; HARRIS, T. B. Physical Activity, Exercise, and Inflammatory Markers in Older Adults: Findings from The Health, Aging and Body Composition Study. *JAGS*, v.52, n.7, p.1098-1104, 2004.

CUSLLER, E.; LOHMAN, T.; GOING, S.; HOUTKOOOPER, L. B.; METCALFE, L. L.; FLINT-WAGNER, H. G.; HARRIS, R. B.; TEIXEIRA, P. J. Weight lifted in strength training predicts bone change in postmenopausal women. *Med Sci Sports Exerc*, v.35, n.1, p.10-17, 2003.

DE MARTINS, M.; MENGOLI, L. P.; GINALDI, L. Osteoporosis – an immune mediated disease? *Drug Disc Tod Ther Strat*, v.4, n.1, p.3-9, 2007.

DENNISON, E. M.; SYDDALL, H. E.; FALL, C. H.; JAVAID, M. K.; ARDEN, N. K.; PHILLIPS, D. I.; COOPER, C. Plasma leptin concentration and change in bone density among elderly men and women: The Hertfordshire Cohort Study. *Calcif Tissue Int*, v.74, n.5, p.401–406, 2004.

- DING, C.; PARAMESWARAN, V.; UDAYAN, R.; **BURGESS, J.; GRAEME, J.** Circulating levels of inflammatory markers predict change in bone mineral density and resorption in older adults: a longitudinal study. *J Clin Endocrinol Metab*, v.93, n.5, p.1952–1958, 2008.
- EL MAGHRAOUI, A.; ROUX, C. DXA scanning in clinical practice. *Q J Med*, v.101, n.8, p.605–617, 2008.
- FAGGIONI, R.; FEINGLOD, K. R.; C. GRUNFELD, C. Leptin regulation of the immune response and the immunodeficiency of malnutrition. *FASEB J*, v.15, n.14, p.2565–2571, 2001.
- GLEESON, M. Immune function in sport and exercise. *J Appl Physiol*, v.103, n.2, p.693-699, 2007.
- GINALDI, L.; DI BENEDETTO, M. C.; DE MARTINIS, M. Osteoporosis, inflammation and ageing. *Immunity & Ageing*, v.2, n.14, p.1-5, 2005.
- GIUSTINA, A.; MAZZIOTI, G.; CANALIS, E. Growth Hormone, Insulin-Like Growth Factors, and the Skeleton. *Endocrine Reviews*, v.29, n.5, p.535–559, 2008.
- GOLDRING, S. R. Inflammatory Mediators as Essential Elements in Bone. *Calcif Tissue Int*, v.73, n.2, p.97-100, 2003.
- GRAINGER, D. J.; PERCIVAL, J.; M. CHIANO, M.; SPECTOR, T. D. The Role of Serum TGF- β Isoforms as Potential Markers of Osteoporosis. *Osteoporos Int*, v.9, n.5, p.398–404, 1999.
- HAMRICK, M. W.; DELLA-FERA, M. A.; CHOI, Y.; PENNINGTON, C.; HARTZELL, D.; BAILE, C. A. Leptin Treatment Induces Loss of Bone Marrow Adipocytes and Increases Bone Formation in Leptin-Deficient *ob/ob* Mice. *J Bone Miner Res*, v.20, n.6, p.994–1001, 2005.

- HEDSTRÖM, M. Hip fracture patients, a group of frail elderly people with low bone mineral density, muscle mass and IGF-I levels. *Acta Phys*, v.167, n.4, p.347-350, 1999.
- HERING, S.; JOST, C.; SCHULZ, H.; HELLMICH, B.; SCHATZ, H.; PFIFFER, A. Circulating transforming growth factor b1 (TGFb1) is elevated by extensive exercise. *Eur J Appl Physiol*, v.86, n.5, p.406–410, 2002.
- JANSSENS, K.; DIJKE, P.; JANSSENS, S.; HUL, W. V. Transforming Growth Factor-1 to the Bone. *End Rev*, v.26, n.6, p.743–774, 2005.
- KANEHISA, H.; MIYATANI, M.; AZUMA, K.; KUNO, S.; FUKUNAGA, T. Influences of age and sex on abdominal muscle and subcutaneous fat thickness. *Eur J Appl Physiol*, v.91, n.5-6, p.534-537, 2004.
- KANIS, J. A.; BURLET, N.; COOPER, C.; DELMAS, P. D.; REGINSTER, J. Y.; BORGSTROM, F.; RIZZOLI, R. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos Int*, v.19, n.4, p.399–428, 2008.
- KIUCHI, A.; SHIMEGI, S.; TANAKA, I.; IZUMO, N.; FUKUYAMA, R.; NAKAMUTA, H.; KOIDA, M. Dose-response effects of exercise intensity on bone in ovariectomized rats. *Int. J Spo Heal Sci*, v.4, n.1, p.10-18, 2006.
- KONTOGIANNI, M. D.; DAFINI, U. G.; ROUSIAS, J. G.; SKOPOULI, F. N. Blood leptin and adiponectin as possible mediators of the relation between fat mass and BMD in perimenopausal women. *J Bone Miner Res*, v.19, n.4, p.546–551, 2004.
- LAU, H. H. L.; HO, A. Y. Y.; LUK, K. D. K.; KUNG, A. W. C. Transforming Growth Factor- β 1 Gene Polymorphisms and Bone Turnover, Bone Mineral Density and Fracture Risk in Southern Chinese Women. *Calcif Tissue Int*, v.74, n.6, p.516–521, 2004.
- LEWIECKI, E. M.; BORGES, J. L. Bone density testing in clinical practice. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, v.50, n.4, p.586–595, 2006.

- LEWIECKI, E. M. Managing osteoporosis: Challenges and strategies. *Clev Clin J Med*, v.76, n.8, p.457-466, 2009.
- LI, M. O.; WAN, Y. Y.; SANJABI, S.; ROBERTSON, A. K. L.; FLAVELL, R. A. Transforming Growth Factor- β Regulation of Immune Responses. *An Rev Immunol*, v.24, p.99–146, 2006.
- LORENZO, J.; HOROWITZ, M.; CHOI, Y. Osteoimmunology: interactions of the bone and immune system. *Endocr Rev*, v.29, n.4, p.403–40, 2008.
- LU, Y.; FUERST, T.; HUI, S.; GENANT, H. K. Standardization of Bone Mineral Density at Femoral Neck, Trochanter and Ward's Triangle. *Osteoporos Int*, v.12, n.6, p.438-444, 2001.
- MADDALOZZO, G. F.; SNOW, C. M. High Intensity Resistance Training: Effects on Bone in Older Men and Women. *Calcif Tissue Int*, v.66, n.6, p.399-404, 2000.
- MADDALOZZO, G. F.; WIDRICK, J. J.; CARDINAL, B. J.; WINTERS-STONE, K. M.; HOFFMAN, M. A.; SNOW, C. M. The effects of hormone replacement therapy and resistance training on spine bone mineral density in early postmenopausal women. *Bone*, v.40, n.5, p.1244–1251, 2007.
- MATARESE, G.; MOSCHOS, S.; MANTZOROS, C. S. Leptin in Immunology. *J Immunol*, v.174, n.6, p.3137–3142, 2005.
- McLEAN, R. R.; ROUBENOFF, R.; HANNAN, M. T. Elevated production of interleukin 1beta (IL-1beta) and tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) is associated with increased hip fracture risk in elders: the Framingham Osteoporosis Study. *J Bone Miner Res*, v.23, p.S79, 2008.
- MILLER, P. D. Guidelines for the diagnosis of osteoporosis: T-scores vs fractures. *Rev Endocr Metab Disord*, v.7, n.1-2, p.75–89, 2006.

MUSARO, A.; McCULLAGH K.; PAUL, A.; HOUGHTON, L.; DOBROWOLNY, G.; MOLINARO, M.; BART, E. R.; SWEENEY, H. L.; ROSENTHAL, N. Localized IGF-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *Nat Genet*, v.27, n.2, p.195–200, 2001.

NAMS POSITION STATEMENT. Management of osteoporosis in postmenopausal women: 2010 statement position of The North American Menopause Society. *Menopause*, v.17, n.1, p.25-54, 2010.

OLSON, S. H.; BANDERA, E. V.; ORLOW, I. Variants in Estrogen Biosynthesis Genes, Sex Steroid Hormone Levels, and Endometrial Cancer: A HuGE Review. *Am J Epidemiol*, v.165, n.3, p.235-245, 2007.

PACIFICI, R. Estrogen, Cytokines, and Pathogenesis of Postmenopausal Osteoporosis. *J Bone Miner Res*, v.11, n.8, p.1043-1051, 1996.

PASCO, J. A.; HENRY, M. J.; KOTOWICZ, M. A.; COLLIER, G. R.; BALL, M. J.; UGONI, A. M.; NICHOLSON, G. C. Serum Leptin Levels Are Associated with Bone Mass in Nonobese Women. *J Clin Endocrinol Metab*, v.86, n.5, p.1884–1887, 2001.

PETERSEN, A. M. W.; PEDERSEN, B. K. The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol*, v.98, n.4, p.1154-1162, 2005.

PFEILSCHIFTER, J.; KÖDTIZ, R.; PFHOL, M.; SCHATZ, H. Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause. *Endocr Rev*, v.23, n.1, p.90-119, 2002.

PFEILSCHIFTER, J. Role of cytokines in Postmenopausal bone loss. *Curr Osteop Rep*, v.1, n.2, p.53-58, 2003.

PLOEGER, H. E.; TAKKEN, T.; GREEF, M. H. G.; TIMMONS, B. W. The effects of acute and chronic exercise on inflammatory markers in children and adults with a chronic inflammatory disease: a systematic review. *Exerc Immunol Rev*, v.15, p.6-41, 2009.

POST, T. M.; CREMERS, S. C. L. M.; KERBUSCH, T.; DANHOF, M. Bone Physiology, Disease and Treatment. *Clin Pharmacokinet*, v.49, n.2, p.89-118, 2010.

ROSANO, G. M. C.; VITALE C.; FINI, M. Cardiovascular aspects of menopausal hormone replacement therapy. *Climacteric*, v.12(Suppl 1), p.41–46, 2009.

SANADA, K.; MIYACHI, M.; TABATA, I.; MIYATANI, M.; TANIMOTO, M.; YAMAMOTO, K.; USUI, C.; HIGUSHI, M. Muscle mass and bone mineral indices: does the normalized bone mineral content differ with age? *Eur. J Clin Nutrition*, v.62, n.1, p.1-8, 2008.

SCHETT, G.; KIECHL, S.; BONORA, E.; REDLICH, K.; WOLOSZCZUK, W.; OBERHOLLENZER, F.; JOCHER, J.; DORIZZI, R.; MUGGEO, M.; SMOLEN, J.; WILLEIT, J. Serum leptin level and the risk of nontraumatic fracture. *Am J Med*, v.117, n.12, p.952–956, 2004.

SINAKI, M.; ITOI, E.; WAHNER, H. W.; WOLLAN, P.; GELZCER, R.; MULLAN, B. P. Stronger back muscles reduce the incidence of vertebral fractures: a prospective 10 year follow-up of postmenopausal women. *Bone*, v.30, n.6, p.836-841, 2002.

STEWART, L. K.; FLYNN, M. G.; CAMPBELL, W. W.; CRAIG, B. A.; ROBINSON, J. P.; TIMMERMAN, K. L.; MCFARLIN, B. K.; COEN, P. M.; TALBERT, E. The Influence of Exercise Training on Inflammatory Cytokines and C-Reactive Protein. *Med Sci Sports Exerc*, v.39, n.10, p.1714-1719, 2007.

SZULC, P.; BECK, T. J.; MARCHAND, F.; DELMAS, P. D. Low skeletal muscle mass is associated with poor structural parameters of bone and impaired balance in elderly men—the MINOS study. *J Bone Miner Res*, v.20, n.5, p.721-729, 2005.

TAKAYANAGI, H.; SATO, K.; TAKAOKA, A.; TADATSUGU, T. Interplay between interferon and other cytokine systems in bone metabolism. *Immunol Rev*, v.208, n.1, p.181–193, 2005.

TREMOLLIÈRES, F.; RIBOT, C. Bone Mineral Density and prediction of non-osteoporotic disease. *Maturitas*, v.65, n.4, p.348-351, 2010.

VINCENT, K. R.; BRAITH, R. W. Resistance exercise and bone turnover in elderly men and women. *Med Sci Sports Exerc*, v.34, n.1, p.17–23, 2002.

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

WANG, X.; YOU, T.; YANG, R.; LYLES, M. F.; DEMONS, J.; GONG, D.; NICKLAS, B. J. Muscle strength is associated with adipose tissue gene expression of inflammatory adipokines in postmenopausal women. *Age and Ageing*, v.1, p.1-4, 2010.

WEISS, L. A.; BARRET-CONNOR, E.; VON MÜHLEN, D.; CLARK, P. Leptin Predicts BMD and Bone Resorption in Older Women but Not Older Men: The Rancho Bernardo Study. *J Bone Miner Res*, v.21, n.5, p.758–764, 2006.

WILSGAARD, T.; EMAUS, N.; AHMED, L. A.; GRIMNES, G.; JOAKIMSEN, R. M.; OMSLAND, T. K.; BERNTSEN, G. R. Lifestyle impact on lifetime bone loss in women and men: the Tromso Study. *Am J Epidemiol*, v.169, n.7, p.877-886, 2009.

YAMAGUCHI, T.; KANATANI, M.; YAMAUCHI, M.; KAJI, H.; SUGISHITA, T.; BAYLINK, D. J.; MOHAN, S.; CHIHARA, K.; SUGIMOTO, T. Serum Levels of Insulin-Like Growth Factor (IGF); IGF-Binding Proteins-3,-4, and -5; and Their Relationships to Bone Mineral Density and the Risk of Vertebral Fractures in Postmenopausal Women. *Calcif Tissue Int*, v.78, n.1, p.18-24, 2006.

YOUSEFZADEH, G.; LARIJANI, B.; MOHAMMADIRAD, A.; HESHMAT, R.; DEHGHAN, G.; RAHIMI, R.; ABDOLLAHI, M. Determination of Oxidative Stress Status and Concentration of TGF- β 1 in the Blood and Saliva of Osteoporotic Subjects. *Ann NY Acad Sci*, v.1091, n.1, p.142–150, 2006.

YUN A. J.; LEE, P. Y. Maldaptation of the link between inflammation and bone turnover may be a key determinant of osteoporosis. *Med Hypotheses*, v.63, n.3, p.532-537, 2004.

Apêndice 1 – *Artigo submetido ao periódico Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*

Effects of Resistance Training on MMP-2 Activity and Biomechanical and Biophysics Properties of bone in ovariectomized and intact rats

Gilberto Eiji Shiguemoto*¹, Jonato Prestes¹, Richard Diego Leite¹, Guilherme Borges Pereira¹, Carmen Lúcia Salla Pontes², Fernando Vidal D'Ávila³, João Paulo Botero¹, Vilmar Baldissera¹, Keiko Okino Nonaka³, Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo², Sérgio Eduardo de Andrade Perez¹

1 – Laboratory of Exercise Physiology – Department of Physiological Sciences - Federal University of São Carlos – UFSCar, BR

2 – Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology – Department of Physiological Sciences - Federal University of São Carlos – UFSCar, BR

3 - Laboratory of Neuroendocrinology – Department of Physiological Sciences - Federal University of São Carlos - UFSCar, BR

*** Corresponding Author:**

Gilberto Eiji Shiguemoto – Laboratory of Exercise Physiology
Federal University of São Carlos - UFSCar

E-mail: gileiji@terra.com.br

Address: Rua Bernardino Fernandes Nunes, 1707 – Casa 21 – Condomínio Dona Eugênia
Parque Delta – São Carlos – SP – BR – CEP: 13.566-490

Phones: +55(16)3361-6439/3411-3343/9607-4406

ABSTRACT

BACKGROUND: Osteoporosis is worldwide recognized as a serious public health problem. The loss of ovarian function may be related to severe decline in biomechanical properties of bone. The bone matrix alterations caused by aging and menopause remain poorly understood. MMP-2 activity and biomechanical properties of bone may be related to bone fractures. Physical activity compose an efficient form to prevent the deleterious effects of osteoporosis. **OBJECTIVE:** the aim of this study was investigate the influence of resistance training on the activity of MMP-2 and the mechanical properties of bone in OVX and intact rats. **METHODS:** forty eight young female mature rats were divided into two distinct groups, ovariectomized (OVX) and intact (INT), which were subdivided into three similarly subgroups (eight rats per group): sedentary (OVX-Sed and Int-Sed), acute exercise (OVX-Ex-Ac and Int-Ex-Ac) and chronic exercise (OVX-Ex-Cr and Int-Ex-Cr). Rats performed resistance training for twelve weeks in which the animals climbed a vertical ladder of 1.1-m with weights attached to their tails. The sessions were performed with an interval of three days, 4-9 and 8-12 scaled dynamic movements of climbing. After the experimental period, were performed MMP-2 activity analysis by zymography, and biophysical and biomechanical analyses using a universal testing machine. **RESULTS:** the activity of MMP-2 was reduced in two OVX groups (OVX-Sed and OVX-Ex-Ac) when compared to all other groups; in contrast, chronically trained groups (OVX-Ex-Cr and Int-Ex-Cr) showed significantly increased in MMP-2 activity. These results were also observed in the biophysical and biomechanical analysis, in which OVX-Sed and OVX-Ex-Ac groups showed decrease mineral density, bone density, maximum load, and fracture load in relation to all other groups; on the other hand, chronically trained groups showed higher rates in the biomechanical and biophysical analysis mentioned above. **CONCLUSION:** our results suggest that ovariectomy reduced the activity of MMP-2, producing deleterious effects on bone mass. On the other hand, the resistance training was efficient in combating these effects, including presenting modeling effects.

Keywords: ovariectomy, rats, resistance training, MMP-2 activity, biomechanical and biophysical properties of bone.

INTRODUCTION

Osteoporosis is a metabolic bone disease characterized by microarchitectural alterations and compromised bone strength, leading to an increased susceptibility to fragility fractures [1]. Osteoporosis is worldwide recognized as a serious public health problem, causing 1.5 million fractures annually in United States [2]. The etiology of osteoporotic fractures is multifactorial, with low bone mass, high bone turnover, and physical frailty being recognized as important contributing factors [3]. The loss of ovarian function may be related to severe decline in muscle function, biomechanical properties of the bone, and underlying catabolic-inflammatory process [4].

Bone turnover is one of the most important determinant factors of the structural integrity of bone. Any change to the optimal bone turnover rate, such as the increase that occurs following ovariectomy (OVX) or menopause, has the potential to dramatically change the bone at microstructural and bone material levels [5].

The quantity of bone tissue, evaluated by measuring bone mineral density (BMD) using dual X-ray absorptiometry (DXA), is not an accurate predictor of bone strength, but certainly is the major parameter influencing bone strength. Other factors that determine bone quality, such the three-dimensional organization of the trabeculae (microarchitecture), the shape and the geometry of bones, the potential existence of microdamages, and the intrinsic properties of the matrix (mineral and collagen) also contribute to bone strength [6]. Bone quality can be altered by a number of factors, including the changes in its extracellular matrix caused by the variations in the composition, arrangement, and interaction of its organic (collagen and noncollagenous matrix proteins) and inorganic constituents (hydroxyapatite) [7]. Additionally, bone accumulates microdamage with aging because its ability to target and

repair microcracks is reduced [8]. It is important to observe that all those alterations above cited do not mirror only bone quantity, but mainly the bone extracellular matrix quality. The role and magnitude of matrix alterations caused by aging and menopause, and their relationship with bone fractures remain poorly understood. The lack of research into the organic level of these alterations is the widely held belief that brittle bone results from increased mineralization. However, the lack of correlation between the measures of bone mineralization and bone fracture indices, as well as the growing body of evidence showing that collagen-level modifications can also introduce brittle bone behavior, has motivated researchers to explore the role of the collagen modifications in promoting skeletal fragility [9].

The bone tissue is largely composed by Extracellular Matrix (ECM) whose predominant fibrillar protein in ECM is the type I collagen, that promotes structural integrity and account for mechanical strength. The ECM of bone also contains matricellular proteins (MP), which rather than playing structural roles, primarily serve as biological modulators [10]. MP interact with cell surface receptors (such as integrins), the structural matrix, and soluble extracellular factors (such as growth factors and proteases). Through these multiple mechanisms, MP can influence cell function, as well as regulate the availability or activity of proteins sequestered in the matrix. Structural ECM proteins like fibronectin and collagen also bind to integrins, thus, MP have the potential to modulate their function through competitive binding [11]. Two different types of MPs, osteopontin (OPN) and bone sialoprotein (BSP) showed high concentrations in inflammatory process and tissue remodeling [12], and specifically bind to and promote activation of matrix metalloproteinases (MMP)-2 and -3, respectively, even in the presence of MMP-specific tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP).

The matrix metalloproteinases (MMPs) comprise an enzyme family of more than 20 zinc-dependent proteases that are primarily responsible for the degradation of ECM and therefore cardinal agents of ECM remodeling. The simple view that this family of proteases, including MMP-2, presented destructive functions, must be altered by that that MMPs can alter the microenvironment, modulate the activity of bioactive molecules and regulate the activity of other proteases, thereby playing roles in cell adhesion, proliferation, differentiation and apoptosis [13]. Specifically, the gelatinases MMP-2 and -9 presented important role in tendon remodeling since start non-fibrillar type I and IV collagen degradation [14]. Among other important tasks, MMPs, mainly MMP-2, are considered to play a pivotal role in the regulation of osteogenesis and bone remodeling during embryogenesis, adolescence and bone healing [15].

The hormonal replacement therapy (HRT) is the gold standard treatment that has been strongly recommended for osteoporosis, specifically the estrogen replacement. HRT prevent the loss of bone mass and enhance BMD, resulting in reduction of osteoporotic fractures [16]. Nevertheless, HRT is not universally accept, mainly due the contra-indication for several patients, low adhesion, reluctance and aversion to the side effects by many women, and the long term risks of some types of cancer [17] and myocardial infarction [18].

Physical exercise compose an alternative, cheap, and efficient form to prevent and treat the deleterious effects of osteoporosis, since the physical activity program are appropriately structured to this goal [19]. Physical exercise programs in humans, as well in animal experiments, have been showed that high-intensity exercise that presented high impact on bone tissue are the best recommended to promote sufficient mechanical load to strain and stimulate bone osteogenesis [20, 21].

In view the arguments above exposed, the objective of this study was verify the effect of the high intensity resistance training on MMP-2 activity and biomechanical and biophysics properties of bone tissue of ovariectomized and intact rats.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Forty eight female Wistar rats (*Rattus norvegicus var. albinus*, Rodentia, Mammalia) (13 weeks old) from the breeding colony of Federal University of São Carlos (UFSCar), SP, Brazil, with an initial body mass of approximately 247.74 ± 12.73 g were used. The animals had free access to water and chow, were kept in collective cages (4 rats per cage) at a constant temperature of $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, and had a cycle of 12 hours light/12 hours dark, with light from 06:00h to 18:00h. All the animals were fed with Labina® (a standard rat chow diet provided by Purina, Brazil).

Experimental Design

The rats were randomly distributed into two experimental groups, ovariectomy group (OVX) and intact group (Int), and were subdivided into three distinct groups with eight animals each. The groups were designed and distributed as follow:

c) Ovariectomy Group (OVX):

- (1) Ovariectomy Sedentary Group (*OVX-Sed*): underwent ovariectomy and were kept in their cages during three months without any type of exercise;
- (2) Ovariectomy Acute Exercise Group (*OVX-Ex-Ac*): underwent ovariectomy and after three months of housing were adapted to resistance exercise (one session) and their maximal loads

were determined in another session; after this they performed only one acute resistance exercise session.

(3) Ovariectomy Chronic Exercise Group (*OVX-Ex-Cr*): underwent ovariectomy and performed 12 weeks of resistance exercise. The training started at the same time of the intact group.

d) Intact Group (Int):

(4) Intact Sedentary Group (*Int-Sed*): did not undergo ovariectomy and were kept in their cages during three months without any type of exercise;

(5) Intact Acute Exercise Group (*Int-Ex-Ac*): did not undergo ovariectomy and after three months of housing were adapted to resistance exercise (one session) and their maximal loads were determined in another session; after this they performed only one acute resistance exercise session.

(6) Intact Chronic Exercise Group (*Int-Ex-Cr*): did not undergo ovariectomy and performed 12 weeks of resistance exercise. The training started at the same time of the intact group.

Ovariectomy

The rats of OVX group underwent the ovarian withdrawal according to the technique proposed by Kalu [22] at thirteen weeks of life. The ovariectomized (OVX) rat model is the FDA-recommended model for testing preclinical therapies for osteoporosis [23].

Resistance Training Protocol

Training Apparatus: (1) vertical ladder (1.1 x 0.18 m, 2-cm grid, 80° incline), and (2) weights placed into Falcon tubes (50mL) and secured to proximal rats' tail with a self-adhesive foam strip.

Training Period and Periodization: chronic groups (OVX and intact) performed the resistance training over twelve weeks, once every three days; acute groups performed only 1 training session, overlapping with the last chronic training session.

Adaptation (Familiarization): rats performed one familiarization session with ladder and climbing before start the training. The size of the ladder induced the animals to perform 8-12 dynamic movements per climb. In this process, rats climbed with weights 50% equivalent of their body mass. With the load apparatus secured to the tail, the rats were placed at the bottom of the ladder and familiarized with climbing. If necessary a stimuli with a tweezers was applied to the animals' tail to initiate the movement. At the top of the ladder the rats reached a housing chamber (20 x 20 x 20 cm) where they were allowed to rest for 120 seconds. This procedure was repeated until the rats would voluntarily climb the ladder, three consecutive times, without stimuli.

Determination of Maximal Carrying Load Capacity: three days after this familiarization, the first training session consisted of 4-8 ladder climbs while carrying progressively heavier loads. The initial climb consisted of carrying a load that was 75% of the animal's body mass. After this, an additional 30g weight was added until a load was reached with which the rat could not climb the entire length of the ladder. Failure was determined when the animal could not progress up the ladder after three successive stimuli to the tail. The highest load successfully carried the entire length of the ladder was considered as the rat's "maximal carrying capacity" for that training session.

Training Protocol: adapted from Hornerberg Jr. and Farrar [24] protocol to the needs of this study, training sessions consisted of 4 ladder climbs, with 50%, 75%, 90%, and 100% of their previous maximal carrying capacity, determined in the previous session. During

subsequent ladder climbs an additional 30g load was added until a new maximal carrying capacity was determined.

Euthanasia

Animals were sacrificed by decapitation after the last resistance exercise chronic sessions and after the acute sessions. Sedentary animals were also sacrificed at the same period. Soon after, tibias and femurs were retired. Bones were frozen in liquid nitrogen and stored at -84°C for biochemical analysis. Only tibias were utilized to this study. The right tibia was utilized to matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) activity analysis, and the left tibia to biophysics and biomechanics bone properties analyses.

MMP-2 Activity Analysis

The procedures to bone MMP-2 activity determination were performed according to protocol established by Marqueti et al [25], and adapted to this study. Each group was analyzed separately ($n = 8$). The proximal third was removed and macerated with liquid nitrogen. The macerated bone sample was incubated in 2mL of extraction buffer (10mM cacodylic acid, pH 5.0; 0.15M NaCl; 1M ZnCl_2 ; 20mM CaCl_2 ; 1.5mM NaN_3 ; 0.01% Triton X- 100 [v/v]), at 4°C overnight in continuous stirring. After this period, the solution was centrifuged for 10 minutes ($9000 \times g$ at 4°C). Samples applied 20 μg of total protein in each lane of sodium dodecyl sulfate (SDS) 10% polyacrylamide gels prepared with 1mg/mL gelatin. After electrophoresis, the gels were washed twice in 2.5% Triton X-100 to remove the SDS. Gels were incubated in buffer substrate (50mM Tris-HCl, pH 8.0; 5mM CaCl_2 ; 0.02% NaN_3) at 37°C for 20 hours. Gels were stained with Comassie brilliant blue for 1.5 hours and destained with acetic acid: methanol: water (1:4:5) for visualization of the activity bands. The gels were photographed with a Canon G6 Power Shot 7.1 mega pixels camera (Virginia, USA). The averages of band intensity were measured using Gene Tools software®

(Philomath, OR, USA). The bands found in all groups were 72–62 kDa, suggesting the activation of MMP-2 as proposed by Fredericks & Mook [26].

Biometric, Biomechanics, and Biophysics Analyses

Biometric Analysis: (1) Left Tibia Length: measures were performed using a caliper rule (precision of 0.05 mm), taking as references the tibial plateau and the medial malleolus; (2) Body Mass: rats were weighted before the training sessions in a precision digital weighing-machine (KERN®, model 573, Balingen, Deustch) to longitudinal accompaniment.

Biomechanical Analysis: after the biometric analysis, bones were kept in a desiccator during 24 hours to remove the air present in bone pores. Follow this, immersed (M_{imm}) and wet mass (m_{wet}) were obtained; then, the biomechanical analysis started. The biomechanical properties were measured by the three-point bending test using a universal test machine (Instron, model 4444, Canton, MA, USA), load cell with capacity of 100Kgf. The bones extremities were supported in 2 rollers with 3mm of diameter, distanced 21.70mm, and the load applied in the central region of each bone [27]. At the beginning of the test, a 10N pre-load was applied in the posterior-anterior way (perpendicular to longitudinal axis) to established the tibia; after a 1 minute accommodation and stabilization time, a force was applied in the same way at a constant velocity of 0.5 cm/min up to fracture moment. As result, the force applied to the tibia, the Instron software (series IX) generated a graphic load-strain; in this graphic, were obtained the main biomechanical properties: Maximum Force (N), Rupture Force (N), and Stiffness (N/mm).

Biophysical Analysis: after biomechanical analysis, bones were kept into a greenhouse at 100°C during 24hs to be dehydrated; at this point, was obtained the dry mass (m_{dri}). To obtain the ash mass, bones were placed into a muffle at 800°C during 24hs. All the measures were obtained by an electronic digital weighing-machine (Chyo, model JEX 200, Instruchem

Inc, Manila, Philippines). Using the Archimedes Principle, was obtained the bone volume (BV); then, the bone density (BD) and mineral density (MD) were obtained following the formulas ($\rho = \text{water density}$): (1) bone volume (BV) = $m_{\text{wet}} - m_{\text{imm}} / \rho$ (cm^3); (2) bone density (BD) = $m_{\text{wet}} / \text{BV}$ (mg/cm^3); and (3) mineral density (MD) = $m_{\text{ash}} / \text{BV}$ (mg/cm^3).

Statistical Analysis

All data were presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). The statistical analysis was initially performed by the normality Shapiro-Wilk and by the homocedasticity (Bartlett criterion) tests. All variables presented normal distribution and homocedasticity so the two-way ANOVA test was used, (taking in consideration the variables resistance exercise x ovariectomy). In the maximal workload analysis two-way ANOVA test was used, (taking in consideration the variables ovariectomy x time). For the data of the animals' body mass (g) at week 1 and week 12, ANOVA three-way was conducted (exercise x ovariectomy x week). When the difference presented was significant, the Bonferroni's test was applied for multiple comparisons. The software package Statistica® 6.1 (Stat. Soft Inc., Tulsa, OK, USA) was used with an alpha level of 0.05.

Ethical & Legal Aspects

The research was approved by the Federal University of São Carlos Committee of Experimental Animals (protocol n^o. 048/2007). All the animal procedures were conducted in accordance with the USA Guide for care and use of laboratory animals (National Research Council's, 1996).

RESULTS

Table 1 presented the temporal evolution and evaluation of the rat body mass.

Table 1 – Temporal Evaluation of Rat Body Mass (grams).

<i>Evaluation of Body Mass</i>	<i>Experimental Groups</i>					
	<i>Ovariectomy Group (OVX)</i>			<i>Intact Group (Int)</i>		
	<i>OVX-Sed</i>	<i>OVX-Ex-Ac</i>	<i>OVX-Ex-Cr</i>	<i>Int-Sed</i>	<i>Int-Ex-Ac</i>	<i>Int-Ex-Cr</i>
<i>Initial</i> (13 weeks of age)	254.86 ^a ± 2.62	237.89 ^a ± 2.50	254.57 ^a ± 5.16	242.71 ^a ± 3.86	249.43 ^a ± 3.40	247.00 ^a ± 7.39
<i>Intermediate</i> (6 Weeks of Training)	290.57 ^a ± 3.96	291.86 ^a ± 5.69	283.14 ^{a,b} ± 6.53	258.71 ^c ± 8.22	278.28 ^c ± 5.85	263.14 ^{b,c} ± 7.20
<i>Final</i> (12 Weeks of Training)	331.86 ^a ± 4.67	334.43 ^a ± 5.79	298.57 ^b ± 6.23	305.57 ^b ± 7.69	303.14 ^b ± 6.91	290.57 ^b ± 7.98

Values are expressed as Mean ± Standard Error of Mean (SEM). Number of rats in each group equal eight (n = 8). Values at the same line with different letters are different among themselves ($p \leq 0.05$, ANOVA Three-Way and *post-hoc* Bonferroni test). Ovariectomy Group (*OVX*): Ovariectomy Sedentary (*OVX-Sed*), Ovariectomy Acute Exercise (*OVX-Ex-Ac*), and Ovariectomy Chronic Exercise (*OVX-Ex-Cr*). Intact Group (*Int*): Intact Sedentary (*Int-Sed*), Intact Acute Exercise (*Int-Ex-Ac*), and Intact Chronic Exercise (*Int-Ex-Cr*).

The initial body mass of all rats did not differ statistically, demonstrating homogeneity among the initial sample in relationship of this biometric datum. When the analysis is directed to the final body mass, observed that the groups *OVX-Sed* and *OVX-Ex-Ac* increased

significantly their body mass in relationship to the others groups ($p \leq 0,05$); however, the OVX-Ex-Cr group presented minor final body mass compared with the others OVX groups, and similar to all the intact groups. The Int-Ex-Cr, although has presented minor final body mass, did not presented significance statistic in relationship to the groups Int-Sed, Int-Ex-Ac, and OVX-Ex-Cr.

The Figure 1 shows the Maximal Workload data found in this study. During 12 weeks of training, no interaction was observed between group and time, indicating that the groups Int-Ex-Cr and OVX-Ex-Cr increase the maximal carrying capacity similarly during the training period. Loads increased after week 6 and week 12 compared to week 1, and after 12 weeks compared to 6 weeks. Thus, there was no difference in maximum loads between both groups chronically trained during 12 weeks.

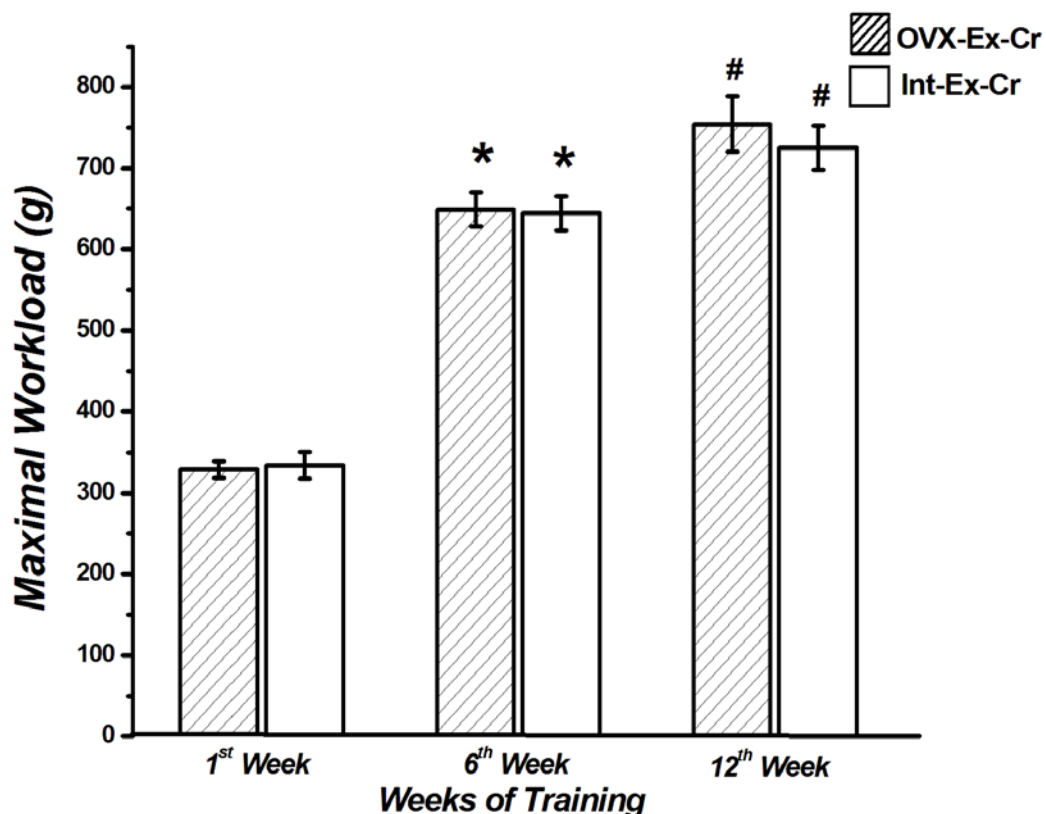


Fig. 1 - Maximal Workload (g) of the groups OVX Chronic Exercise (OVX-Ex-Cr) and Intact Chronic Exercise (Int-Ex-Cr) at weeks 1, 6, and 12. Values are presented as mean \pm standard error of mean (SEM), $p \leq 0.05$ ($n = 8$ per group). (*) Difference statistically significant compared with week 1; (#) difference statistically significant compared between week 6 and 12 (ANOVA Two-way and *post hoc* Bonferroni's test).

Figure 2 shows the results of activity of MMP-2 in their Pro and Active isoforms. Chronic resistance training was observed to increase the activity of active MMP-2 for both intact and OVX groups compared to the other four groups. In contrast, ovariectomy decreased drastically the activity of Active MMP-2, even in the group that performed an acute bout of training ($p \leq 0.05$). It is important note that the acute session of training does not alter the activity of active MMP-2 for both OVX and intact groups when compared to their respective sedentary groups. The Pro MMP-2 showed increased activity significantly greater for OVX-Ex-Cr, Int-Ex-Cr and Int-Ex-Ac, compared to the other three groups ($p \leq 0.05$). In the intact group, the acute training increased activity of this isoform of MMP-2, but the Int-Sed group showed no difference in activity for groups OVX-Sed and OVX-Ex-Ac.

Figure 3 shows the results of the biophysical analysis, mineral density (DM) and bone density (BD). The chronically trained groups (12 weeks), for both intact (Ex-Int-Cr) and OVX (OVX-Ex-Cr) groups, had higher mineral density (MD) and bone density (BD) compared to the sedentary and acute training ($p \leq 0.05$). We emphasize that there were no statistical and clinical differences between chronically trained groups (intact and OVX), a fact which corroborates the results obtained in maximal workload. Another important data to be emphasized refers to the values obtained by the OVX-Sed and OVX-Ex-Ac groups, which showed MD and BD lower than all other groups.

The biophysical data presented in Figure 3 are also confirmed by the results of biometric and biomechanical analyses (Figure 4 and 5), with some differences. The length of the tibia (biometric analysis) was higher in the rats of group Int-Ex-Cr, compared with the rats of all other groups ($p \leq 0.05$). The OVX-Ex-Cr group was also benefited by the strength training, since its bone development was greater than the other two OVX groups, and equivalent to sedentary and acute exercise intact groups.

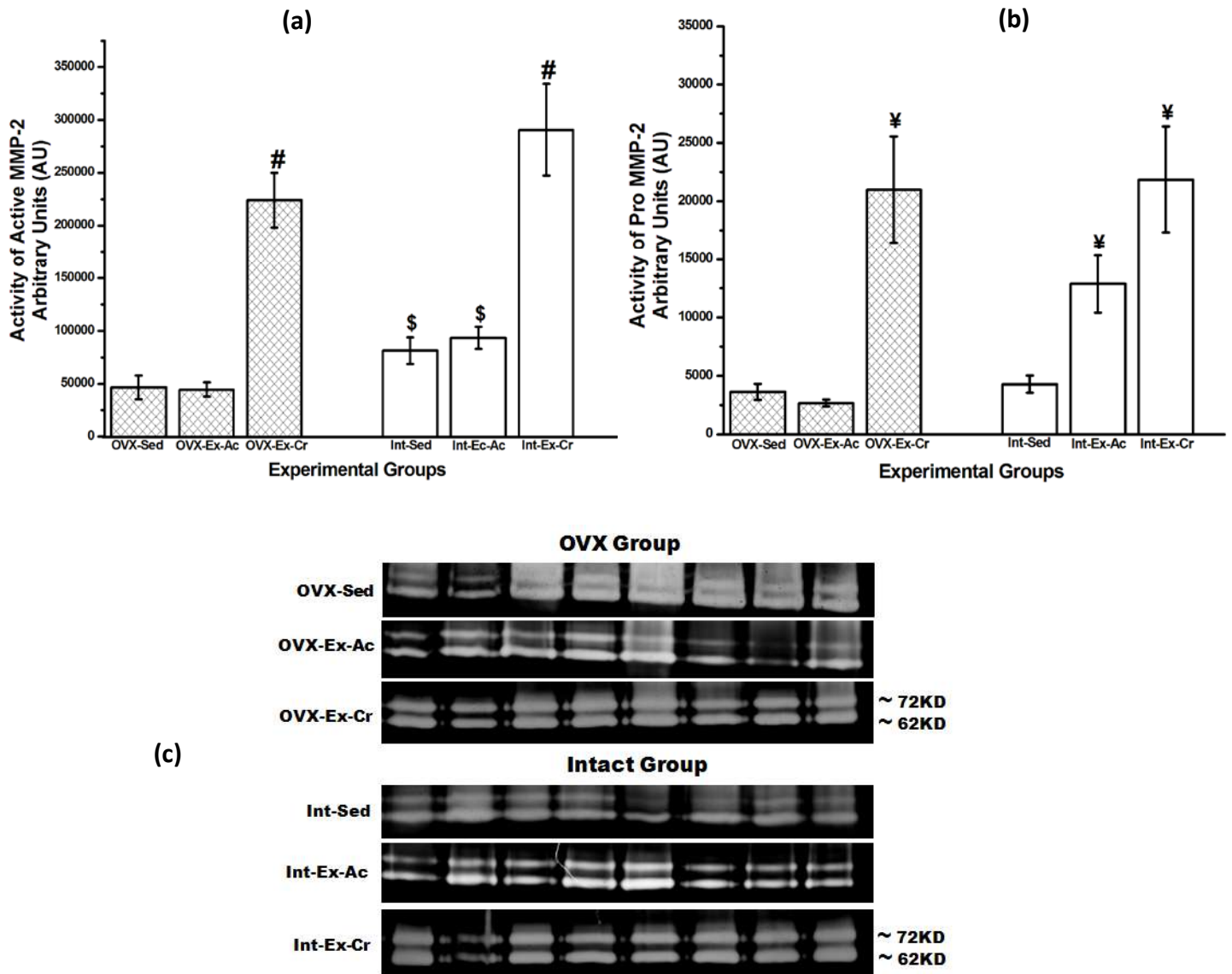


Fig. 2 - Activity of Active (a) and Pro MMP-2 (b) of the right tibia obtained by zymography (c) and expressed in arbitrary units (AU). Values are presented as mean \pm standard error of mean (SEM), $p \leq 0.05$. Ovariectomy Group (OVX): Ovariectomy Sedentary (OVX-Sed), Ovariectomy Acute Exercise (OVX-Ex-Ac) and Ovariectomy Chronic Exercise (OVX-Cr-Ex). Intact Group (Int): Intact Sedentary (Int-Sed), Intact Acute Exercise (Int-Ex-Ac) and Intact Chronic Exercise (Int-Cr-Ex). (#) Statistically significant difference compared to group Int-Sed, Ex-Int-Ag, OVX-Sed and OVX-Ex-Ac; (\$) statistically significant compared with groups OVX-Sed and OVX-Ex-Ac; (¥) statistically significant difference compared with Int-Sed groups, OVX-Sed and OVX-Sed-Ex-Ac (ANOVA Two-Way and *post hoc* Bonferroni's test).

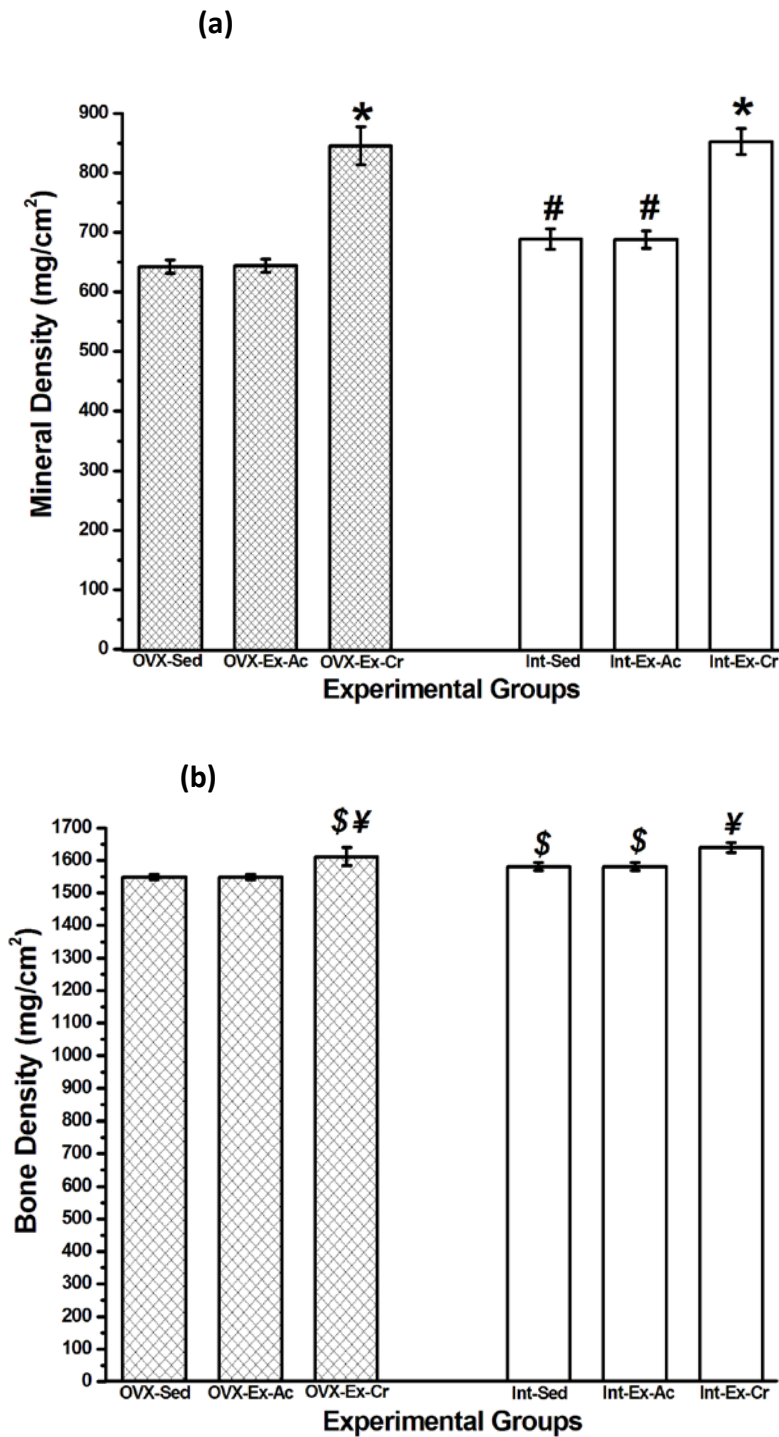


Fig. 3 - Biophysical Analysis of the left tibia: (a) Mineral Density (MD) and (b) Bone Density (BD) expressed in mg/cm². Values are presented as mean \pm standard error of mean (SEM), $p \leq 0.05$. Ovariectomy Group (OVX): Ovariectomy Sedentary (OVX-Sed), Ovariectomy Acute Exercise (OVX-Ex-Ac) and Ovariectomy Chronic Exercise (OVX-Cr-Ex). Intact Group (Int): Intact Sedentary (Int-Sed), Intact Acute Exercise (Int-Ex-Ac) and Intact Chronic Exercise (Int-Cr-Ex). (*) Statistically significant difference compared to group Int-Sed, Ex-Int-Ag, OVX-Sed and OVX-Ex-Ac; (#) statistically significant compared with groups OVX-Sed and OVX-Ex-Ac; (¥) statistically significant difference compared to group Int-Sed, Int-Ex-Ac, OVX-Sed and OVX-Ex-Ac; (\$) Statistically significant compared with groups OVX-Sed and OVX-Ex-Ac (ANOVA Two-Way and *post hoc* Bonferroni's test).

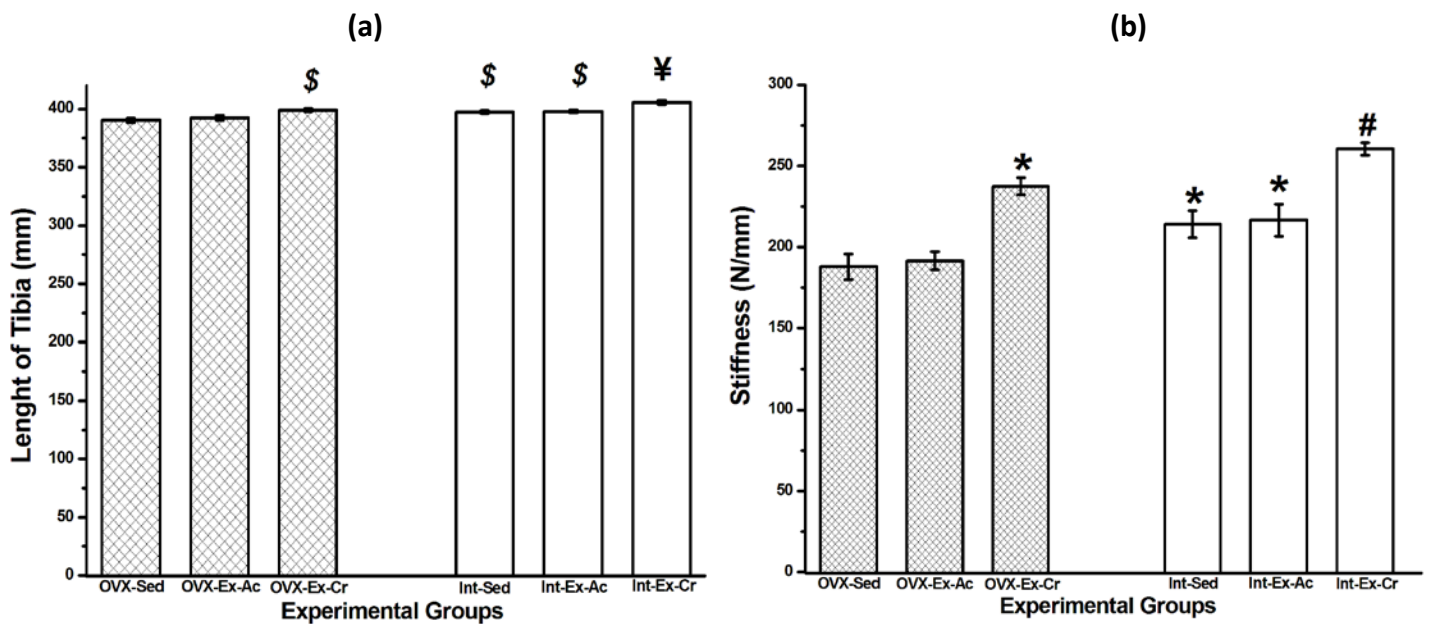


Fig. 4 - Biometrics and Biomechanics Analysis of the left tibia: (a) Length of Tibia (mm) and (b) Stiffness (N/mm). Values are presented as mean \pm standard error of mean (SEM), $p \leq 0.05$. Ovariectomy Group (OVX): Ovariectomy Sedentary (OVX-Sed), Ovariectomy Acute Exercise (OVX-Ex-Ac) and Ovariectomy Chronic Exercise (OVX-Ex-Cr). Intact Group (Int): Intact Sedentary (Int-Sed), Intact Acute Exercise (Int-Ex-Ac) and Intact Chronic Exercise (Int-Ex-Cr). (¥) Statistically significant differences for all other experimental groups; (\$) statistically significant difference compared with the groups OVX-Sed and OVX-Ex-Ac; (#) statistically significant difference compared with all other groups; (*) statistically significant difference compared with the groups OVX-Sed and OVX-Ex-Ac (ANOVA Two-Way and *post hoc* Bonferroni's test).

In relation to biomechanical analyses, data show that the fracture load is higher for groups chronically trained and much lower for the OVX sedentary and acute trained groups. However, for maximum load and stiffness, Int-Ex-Cr group showed significantly and clinically greater values than all other groups, indicating increased biomechanical strength in this group; the OVX-Ex-Cr group was benefited by the strength training proposed since it showed greater values of maximum load and stiffness greater than the other OVX groups and the intact sedentary and acute trained ones, but with statistical significance only for OVX groups.

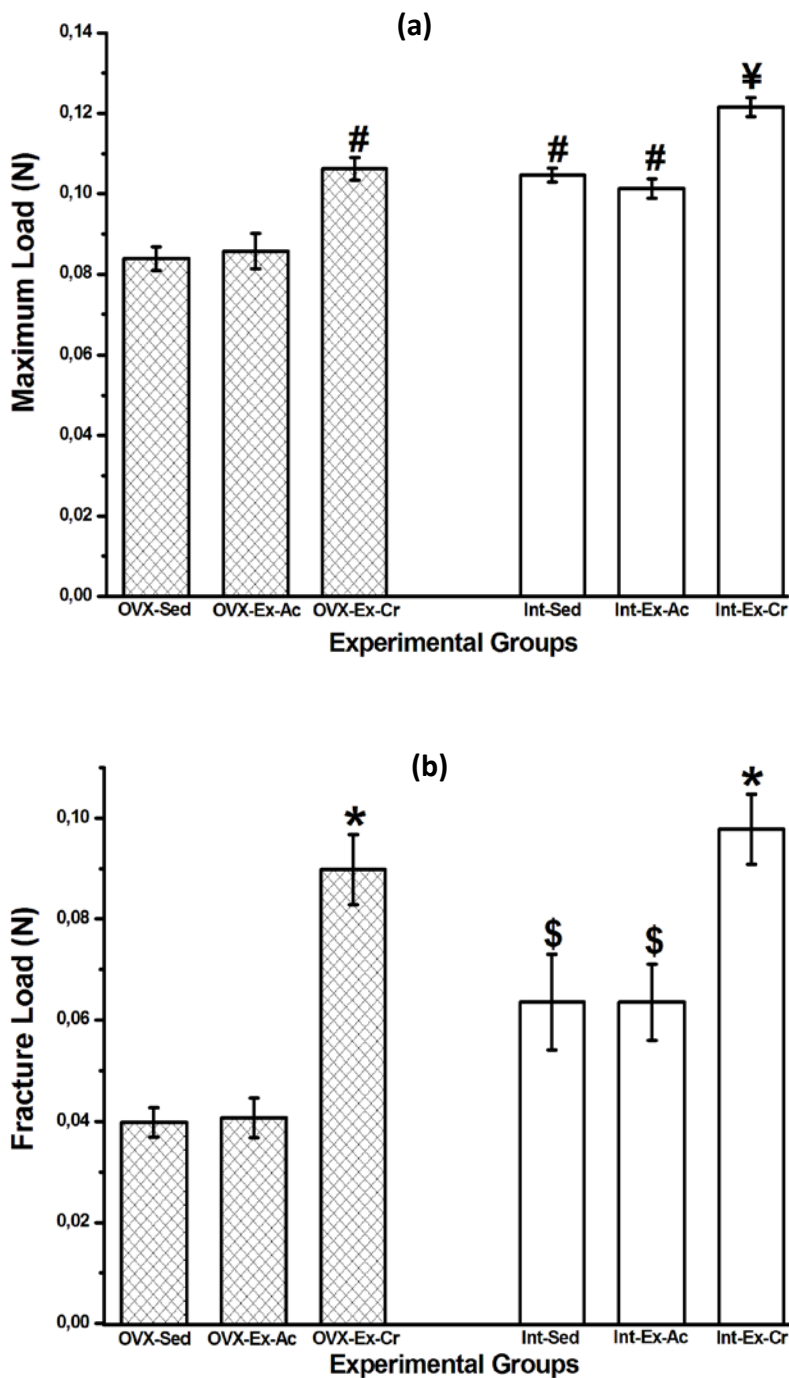


Fig. 5 - Biomechanical Analysis of the left tibia: (a) Maximum Load (N) and (b) Fracture Load (N). Values are presented as mean \pm standard error of mean (SEM), $p \leq 0.05$. Ovariectomy Group (OVX): Ovariectomy Sedentary (OVX-Sed), Ovariectomy Acute Exercise (OVX-Ex-Ac) and Ovariectomy Chronic Exercise (OVX-Ex-Cr). Intact Group (Int): Intact Sedentary (Int-Sed), Intact Acute Exercise (Int-Ex-Ac) and Intact Chronic Exercise (Int-Ex-Cr). (¥) Statistically significant differences for all other experimental groups; (#) statistically significant difference compared with the groups OVX-Sed and OVX-Ex-Ac; (\$) statistically significant compared with groups OVX-Sed and OVX-Ex-Ac; (*) statistically significant compared to group Int-Sed, Ex-Int-Ac, OVX-Sed and OVX-Ex-Ac (ANOVA Two-Way and *post hoc* Bonferroni's test).

DISCUSSION

The increase in body mass found in our study in ovariectomized rats has been reported in the literature as a protective mechanism to prevent the osteopenia promoted by ovariectomy, being related to the mechanical load imposed by the body mass [28]; nevertheless in our study, despite the increase in body mass of OVX rats in sedentary and acute trained groups, mineral density (MD) and bone density (BD) of these two groups were at lower levels than all other groups, particularly related to the chronically trained groups (OVX and Intact), indicating that the increase in body mass does not exert a protective effect on bone mass. Our results corroborate with the results of Jiang et al [29], showed that this protective effect on bone mineral density (BMD) does not occur and directly relate the increase in body mass with hyperphagia and fat accumulation induced by ovariectomy. An interesting finding of the body mass is related to the group OVX-Ex-Cr, which showed lower final body weight than the other two OVX groups ($p \leq 0.05$) and similar to the all intact groups, demonstrating that resistance training proposed was effective in preventing the increase in body mass provided by ovariectomy. Recent work performed with the same training protocol in OVX rats, showed that this type of training was able to partly reduce liver fat, fat deposits (mesenteric and retroperitoneal), and soleus and tibialis anterior fat [30]. In previous studies in OVX rats that performed jump training in water and with electric stimulation, the increase in body mass was not prevented by training [20, 31].

Our work is the first that studied the relationship among resistance training, activity of MMP-2 and biomechanical and biophysical properties of bone tissue in ovariectomized and intact rats.

The matrix metalloproteinase (MMP) form a family of proteases essential for various physiological and pathological events such as embryonic development, angiogenesis, wound repair, rheumatoid arthritis and metastasis [32]. MMPs are usually found in tissues as pro-MMPs [14] and its expression is highly regulated by growth factors and cytokines produced during tissue remodeling [33], becoming therefore crucial to the maintenance and development of healthy tissue. The increase in activity of MMPs is usually indicative of matrix degradation that is needed to allow tissue growth [25]. MMP-2 in its active form (62kD) is the most important MMP in preserving bone mass. Recent evidences have demonstrated that deficiency of MMP-2 induces a bone disorder characterized by destruction of bone tissue in the form of nodules, arthritis, and osteolysis (NAO Syndrome), which also includes generalized osteoporosis [34, 35], occurrence that suggests more complex role of this gelatinase in the development and maintenance of bone [15]. Ovariectomy reduces the activity and expression of MMP-2, and also the expression of type I and III collagen [36]. Type I collagen is the most abundant type of collagen in bone tissue, comprising about 95% of bone collagen and 80% of the total protein [37]. In all connective tissues, collagen presents mechanical functions, providing elasticity and structure to their tissue components. In bone, type I collagen is one of the major determinants of mechanical properties. Changes in the properties of collagen, such as occur in *osteogenesis imperfecta* and osteoporosis, may therefore affect the mechanical properties of bone, and thus increase susceptibility to fractures [6]. The high rate of bone remodeling is associated with bone demineralization and decreased content of collagen cross-links (negative bone balance), promoting thus a decrease in biomechanical and biophysical properties of bone. Recent studies have demonstrated that MMP-2 is directly involved with the degradation and replacement of collagen [35, 15].

In our study, ovariectomy reduced drastically and significantly the activity of active MMP-2 in the sedentary and acute exercise OVX groups, when compared to other groups, confirming the results obtained by Zecchin et al [36], which showed decreased activity of MMP-2 in oral mucosal wound caused by molar extraction in OVX rats. The decrease in activity of MMP-2 was also accompanied by a decrease in mineral density (MD) and bone density (BD), and decrease in mechanical properties (fracture load, maximum load and stiffness) and biometric analysis (tibia length), confirming the hypotheses suggested above that the decrease in activity of MMP-2 promotes bone destruction and disruption of collagen structure, determining the clinical pathology similar to that offered by osteopenia and osteoporosis menopause. As can be noticed, the ovariectomy mimics very intrinsically the state in which postmenopausal estrogen levels are reduced and bone tissue undergoes a dramatic increase in bone turnover, followed by accelerated loss of bone mass in various regions of the body [38]. A recent study of Jiang et al [29] found a decrease in femoral BMD and lumbar spine of OVX rats compared to intact groups, also confirming that ovariectomy is the model to mimic menopause.

On the other hand, it is observed that resistance training proposed in our work significantly increased the activity of active MMP-2 in the two groups chronically trained (OVX-Ex-Cr and Int-Ex-Cr) compared to all other groups, although did not differ among themselves (Figure 2). It is noteworthy that the activity of active MMP-2 in the Int-Ex-Cr group showed relatively higher than in the OVX-Ex-Cr, but not significant, datum accompanied by increased bone density, tibia length, maximum load and stiffness, all with statistical significance. These results have been observed in other studies with intact rats [20, 39], demonstrating that the resistance training exert modeling effect on bone mass in intact rats [40]. Regarding the group OVX-Ex-Cr, we can observe that the increased activity of

MMP-2 was accompanied by significant and positive changes in biophysical, biomechanical and biometrics properties, compared to the other two OVX groups; when compared to the Int-Sed and Int-Ex-Ac groups, the results are only meaningful when related to mineral density and fracture load. In light of these results, we can state that the proposed resistance training is effective in combating the harmful effects caused by ovariectomy on bone tissue.

In this regard it is important to note that one of the functions of estrogen in bone is to increase the sensitivity to mechanical loads [41], thus the ovariectomy or menopause may decrease the sensitivity of the bone receptors to mechanical loads. In consequence of this fact, the estrogen-deficient bone cannot detect mechanical loads of very low intensity [40]; this study showed that the effect of resistance training on the recovery of the lost bone mass by ovariectomized rats (5 months after ovariectomy) is "dose-dependent" (sensitivity), because their results have clearly shown that low loads do not produce beneficial effects on recovery of bone mass, while medium and high loads regained the lost bone mass of OVX rats compared to intact control group. It is also proposed that the resistance training with high loads have mechanical loads upward the mechanical strain "conservation mode", increasing the "modeling" bone while exercising on a treadmill have loads on the level of conservation mode, providing therefore only remodeling bone. Corroborating with the results presented above, Tae-Woong et al [42] compared resisted running exercise and endurance on a treadmill, and found that resistive running increased bone mass of OVX rats significantly compared to OVX-Sed and the endurance running; the endurance running group showed minor increase, but also significant in relation the OVX-Sed. The high workloads proposed in our study to the rats training corroborate with the hypothesis proposed above, demonstrating that our resistance training has modeling effect on bone tissue of OVX and intact rats.

Another result that directly contributed to this modeling effect was the maximal force load, which increased significantly in both groups trained chronically (OVX and intact); it is noteworthy that there was no significant difference between groups. For the group OVX-Ex-Cr, this result seems to have been determinant in increasing bone mass, because sarcopenia, defined as the physiological decline of mass and muscle function in aging, may lead to senile and postmenopausal osteoporosis [4], since muscle mass and mechanics of muscle contraction stimulate bone formation [43]. Sarcopenia and consequent decrease in muscle strength, is an additional factor for the increased risk of fracture [4]. Many studies have shown a positive relationship between lean mass and BMD [44], and osteoporotic women have significantly lower muscle mass in the appendicular skeleton compared with their non-osteoporotic controls [45].

In our study, there were not muscle histomorphometric analysis, a fact which somewhat limits our conclusions to this effect, but the data of the maximal workload, provide indications that other studies should be carried out to obtain more accurate responses on this intrinsic relationship between sarcopenia and osteopenia, adding also *in situ* analyses of the activity of MMP-2 on bone and muscle with the concept above exposed.

CONCLUSIONS

In summary, our findings allow us to conclude that there is a strong relationship between the activity of MMP-2 and biomechanical and biophysical properties of bone tissue. Additionally, we can also conclude that ovariectomy imposes drastic and negative changes in the activity of MMP-2, and thus decrease the biomechanical and biophysical properties of bone, mimicking intrinsically deleterious effects of menopause on bone tissue.

Finally, resistance training performed in our study, was effective in preventing the deleterious changes on the bone tissue from OVX rats, including preventing modeling effects on bone of these rats, confirming previous hypotheses, that resistance training directed to OVX rats and postmenopausal women, should be done with loads upward the mechanical strain “conservation mode” (dose-dependence) and started as early as possible during menopause.

REFERENCES

1. NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis and Therapy: Osteoporosis prevention, diagnosis and therapy. *JAMA* 2001;285:785-795.
2. NAMS POSITION STATEMENT: Management of osteoporosis in postmenopausal women: 2006 Statement Position of The North American Menopause Society. *Menopause* 2006;13:340-367.
3. Widrick JJ, Fuchs R, Maddalozzo GF, Marley K, Snow C: Relative effects of exercise training and alendronate treatment on skeletal muscle function of ovariectomized rats. *Menopause* 2007;14:528-534.
4. Walsh MC, Hunter GR, Livingstone MB: Sarcopenia in premenopausal and postmenopausal women with osteopenia, osteoporosis and normal bone mineral density. *Osteoporos Int* 2006;17:61-67.
5. Kennedy OD, Brennan O, Rackard SM, Staines A, O'Brien JO, Taylor D, Lee TC: Effects of Ovariectomy on Bone Turnover, Porosity, and Biomechanical Properties in Ovine Compact Bone 12 Months Postsurgery. *J Orthop Res* 2008;27:303-309.

6. Viguet-Carrin S, Garnero P, Delmas PD: The role of collagen in bone strength. *Osteoporos Int* 2006;17:319–336.
7. Vashishth D: Age-dependent biomechanical modifications in bone. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2005;15:343–358.
8. Waldorff E, Goldstein SA, McCreadie BR: Age-dependent microdamage removal following mechanically induced microdamage in trabecular bone in vivo. *Bone* 2007;40:425–432.
9. Vashishth D: The Role of the Collagen Matrix in Skeletal Fragility. *Curr Osteop Rev* 2007;5:62–66.
10. Bornstein P, Sage EH: Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Curr Opin Cell Biol* 2002;14:608–16.
11. Alford AI, Hankenson KD: Matricellular proteins: Extracellular modulators of bone development, remodeling, and regeneration. *Bone* 2006;38:749–757.
12. Giachelli CM, Steitz S: Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization. *Matrix Biol* 2000;19:615–622.
13. Stamenkovic I: Extracellular matrix remodeling: The role of matrix metalloproteinases. *J Pathol* 2003;200:448–464.
14. Kjaer M: Role of Extracellular Matrix in Adaptation of Tendon and Skeletal Muscle to Mechanical Loading. *Physiol Rev* 2004;84:649-698.
15. Mosig RA, Dowling O, DiFeo A, Ramirez MCM, Parker IC, Abe E, Diouri J, Al Aqeel A, Wylie JD, Oblander SA, Madri J, Bianco P, Apte SS, Zaidi M, Doty SB, Majeska RJ, Schaffler MB, Martignetti JA: Loss of MMP-2 disrupts skeletal and craniofacial development and results in decreased bone mineralization, joint erosion and defects in osteoblast and osteoclast growth. *Hum Mol Genet* 2007;16:1113–1123.

16. Hoshino S, Ouchi Y: Right or wrong of the hormone replacement therapy involving osteoporosis. *Clinical Calcium* 2004;14:87–98.
17. Zhang SM, Manson JE, Rexrode KM, Cook NR, Buring JE, Lee I: Use of Oral Conjugated Estrogen Alone and Risk of Breast Cancer. *Am J Epidemiol* 2007;165:524-529.
18. Azoulay C: “Hormone replacement therapy” is not what it used to be anymore. *Rev Med Interne* 2004;25:806–815.
19. Benton MJ: Osteoporosis: Recommendations for Resistance Exercise and Supplementation with Calcium and Vitamin D to Promote Bone Health. *J Community Health Nurs* 2006;23:201–211.
20. Shiguemoto GE, Rossi EA, Baldissera V, Gouveia SH, Vargas GMFV, Perez SEA: Isoflavone-supplemented soy yoghurt associated with resistive physical exercise increase bone mineral density of ovariectomized rats. *Maturitas* 2007;57:261-270.
21. Turner CH, Robling AG: Designing exercise regimens to increase bone strength. *Exerc Sport Sci Rev* 2003;31:45–50.
22. Kalu DN: The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner* 1991;15:175-192.
23. Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM, Ke HZ: FDA Guidelines and Animal Models for Osteoporosis. *Bone* 1995;17:125S-133S.
24. Hornberger Jr. TA, Farrar RP: Physiological Hypertrophy of the FHL Muscle Following 8 Weeks of Progressive Resistance Exercise in the Rat. *Can J Appl Physiol* 2004;29:16-31.
25. Marqueti RC, Prestes J, Stotzer US, Paschoal M, Leite RD, Perez SEA, Selistre-de-Araujo HS: MMP-2, jumping exercise and nandrolone in skeletal muscle. *Int J Sports Med* 2008;29:559-563.

26. Frederiks WM, Mook ORF: Metabolic Mapping of Proteinase Activity with Emphasis on In Situ Zymography of Gelatinases: Review and Protocols. *J Histochem Cytochem* 2004;52:711–722.
27. Trebacz H, Zdunek A: Three-point bending and acoustic emission study of adult rat femora after immobilization and free remobilization. *J Biomech* 2006;39:237-245.
28. Zhao LJ, Jiang H, Papasian CJ, Maulik D, Drees B, Hamilton J, Deng HW: Correlation of obesity and osteoporosis: effects of fat mass on the determination of osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2008;23:17–29.
29. Jiang JMY, Sacco SM, Ward WE: Ovariectomy-Induced Hyperphagia Does Not Modulate Bone Mineral Density or Bone Strength in Rats. *J Nutr* 2008;138:2106–2110.
30. Leite RD, Prestes J, Bernardes CF, Shiguemoto GE, Pereira GB, Duarte JO, Domingos MM, Baldissera V, Perez SEA: Effects of ovariectomy and resistance training on lipid content in skeletal muscle, liver, heart, fat depots and lipid profile. *App Phys Nut Met* 2009;34:1079-1086.
31. Notomi T, Okimoto N, Okazaki Y, Nakamura T, Suzuki M: Tower climbing exercise started 3 months after ovariectomy recovers bone strength of the femur and lumbar vertebrae in aged osteopenic rats. *J Bone Miner Res* 2003;18:140-149.
32. Chavey C, Mari B, Monthouel MN, Bonnafous S, Anglard P, Van Obberghen E, Tartare-Deckert S: Matrix metalloproteinases are differentially expressed in adipose tissue during obesity and modulate adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 2003;278:11888–11896.
33. Carmeli E, Moas M, Lennon S, Powers SK: High intensity exercise increases expression of matrix metalloproteinases in fast skeletal muscle fibres. *Exp Physiol* 2005;90:613–619.
34. Al-Otaibi L, Al-Mayouf SM, Majeed M, Al-Eid W, Bahabri S, Hugosson CO: Radiological findings in NAO syndrome. *Pediat Radiol* 2002;32:465-539.

35. Inoue K, Mikuni-Takagaki Y, Oikawa K, Iyoh T, Inada M, Noguchi T, Jin-Sung P, Onodera T, Krane SM, Noda M, Itohara S: A Crucial Role for Matrix Metalloproteinase 2 in Osteocytic Canalicular Formation and Bone Metabolism. *J Biol Chem* 2006;281:33814–33824.
36. Zecchin KG, Pereira MC, Coletta RD, Graner E, Jorge J: Ovariectomy Reduces the Gelatinolytic Activity and Expression of Matrix Metalloproteinases and Collagen in Rat Molar Extraction Wounds. *Calcif Tissue Int* 2005;76:136–145.
37. Niybizi C, Eyre DR: Bone type V collagen: chain composition and location of a trypsin cleavage site. *Connect Tissue Res* 1989;20:247–250.
38. Egermann M, Goldhahn J, Schneider E: Animal models for fracture treatment in osteoporosis. *Osteoporos Int* 2005;16:S129–138S.
39. Umemura Y, Nagasawa S, Sogo N, Honda A: Effects of jump training on bone are preserved after detraining, regardless of estrogen secretion state in rats. *J App Phys* 2008;104:1116–1120.
40. Kiuchi A, Shimegi S, Tanaka I, Izumo N, Fukuyama R, Nakamuta H, Koida M: Dose-response effects of exercise intensity on bone in ovariectomized rats. *Int J Spo Heal Sci* 2006;4:10-18.
41. Lee KCL, Lanyon LE: Mechanical loading influences bone mass through estrogen receptor α . *Exerc Sport Sci Rev* 2004;32:64-68.
42. Tae-Wong O, Soon-Gill L, Mitsuru H: Resistance Running Exercise Effectively Prevents Bone Loss in Ovariectomized Rats. *Waseda Spo* 2006;3:8-17.
43. Coin A, Perissinotto E, Enzi G, Zamboni M, Inelmen EM, Frigo AC, Manzato E, Busetto L, Buja A, Sergi G: Predictors of low bone mineral density in the elderly: the role of dietary intake, nutritional status and sarcopenia. *Eur J Clin Nutrition* 2008;62:802–809.

44. Bakker I, Twisk JW, Van Mechelen W, Kemper HC: Fat-free body mass is the most important body composition determinant of 10-year longitudinal development of lumbar bone in adult men and women. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:2607–2613.
45. Gillette-Guyonnet S, Nourhashemi F, Laque S, Grandjean H, Vellas B: Body composition and osteoporosis in elderly women. *Gerontology* 2000;46:189–193.