



**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS  
ASSOCIAÇÃO AMPLA UFSCar/UNESP**

Via Washington Luiz, km 235 - Caixa Postal 676.  
Fone/Fax: (016) 3351 8328 – e-mail: ppgcf@power.ufscar.br  
13565-905 - São Carlos, SP – Brasil.



---

**EFEITO DO ENVELHECIMENTO E DO TREINAMENTO  
RESISTIDO SOBRE OSSOS DE RATOS**

**FABIO HENRIQUE BOGNI**

**SÃO CARLOS  
2013**



**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS  
ASSOCIAÇÃO AMPLA UFSCar/UNESP**

Via Washington Luiz, km 235 - Caixa Postal 676.  
Fone/Fax: (016) 3351 8328 – e-mail: ppgcf@power.ufscar.br  
13565-905 - São Carlos, SP – Brasil.



**EFEITO DO ENVELHECIMENTO E DO TREINAMENTO  
RESISTIDO SOBRE OSSOS DE RATOS**

**FABIO HENRIQUE BOGNI**

Dissertação apresentada Programa  
Interinstitucional de Pós-Graduação em  
Ciências Fisiológicas Associação ampla  
UFSCar/UNESP, como parte dos requisitos  
para obtenção do título de Mestre em Ciências  
Fisiológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Keico Okino Nonaka

SÃO CARLOS  
2013

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

B675ee Bogni, Fabio Henrique.  
Efeito do envelhecimento e do treinamento resistido sobre  
ossos de ratos / Fabio Henrique Bogni. -- São Carlos :  
UFSCar, 2013.  
73 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São  
Carlos, 2013.

1. Fisiologia. 2. Treinamento resistido. 3. Ratos idosos. 4.  
Metaloproteinase (MMP-2). 5. Biomecânica óssea. 6.  
Biofísica óssea. I. Título.

CDD: 612 (20<sup>a</sup>)

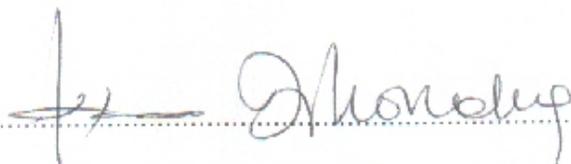
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências  
Fisiológicas  
Associação Ampla UFSCar/UNESP

Folha de Aprovação

Dissertação de Mestrado de Fabio Henrique Bogni

Dia 21/06/2013

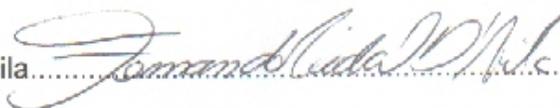
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Keico Okino Nonaka.....



Prof. Dr. Marcelo Rodrigues da Cunha.....



Prof. Dr. Fernando Vidal D'Avila.....



---

Orientadora  
Profa. Dra. Keico Okino Nonaka

*“A vida não é um jogo de palavras cruzadas  
onde tudo se encaixa”*

Humberto Guessinger

## DEDICATÓRIA

Gostaria de dedicar este trabalho, primeiramente, a *Deus*, pela minha existência e pela Sua constante presença em todos os momentos de minha vida.

À minha querida mãe e ao meu querido pai, *Benedita e Antônio*, que me acompanharam nesta longa jornada e etapa da vida, que estiveram presentes quando falhei e quando venci, sempre com palavras amigas e reconfortantes e sempre com o seu amor incondicional.

Ao meu irmão *Wagner* pela amizade e pelo carinho.

A todos os meus **familiares e amigos** que de alguma forma sempre se mostraram preocupados e deram forças para o meu estudo.

# AGRADECIMENTOS

À *Profa. Dra. Keico Okino Nonaka*, pela ótima oportunidade de participação neste programa de pós-graduação, o exemplo de ética profissional; grande caráter e sempre dedicada à arte de ensinar.

Aos *professores do Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas Associação Ampla UFSCar/UNESP*, sempre dedicados à arte de ensinar, pelo acolhimento e pelos ensinamentos recebidos.

À *Profa. Dra. Heloísa Sobreiro Silvestre de Araújo* por ter disponibilizado seu laboratório (Laboratório de Farmacologia, Bioquímica e Biologia Molecular / Departamento de Ciências Fisiológicas - UFSCar) para a realização da análise de zimografia.

À *Profa. Dra. Tânia de Fátima Salvini* por ter disponibilizado seu laboratório (Laboratório de Plasticidade Muscular/ Departamento de Fisioterapia - UFSCar) para a utilização do *software Gene Tools*.

Aos *professores Dr. Sergio Eduardo de Andrade Perez, Dr. Gilberto Eiji Shigemoto e Dr. Gerson Jhonatan Rodrigues* pelas contribuições importantes no Exame de Qualificação.

Ao técnico do laboratório, *Sérgio Dias*, pela amizade, pelo profundo senso de dedicação e responsabilidade e pela inestimável ajuda prestada neste trabalho.

Aos *demais funcionários do Departamento De Ciências Fisiológicas*, pelo carinho e atenção com que me trataram ao se dedicarem a questões que poderiam ser simplesmente fria e burocraticamente realizadas.

Aos alunos do Laboratório de Neuroendocrinologia (ex e atuais) *Charles, Fabio, Valéria, Foginho, José, Leo, Victor, Karina, Bruna, Marina* pelos momentos de amizade e companheirismo indispensável ao cumprimento deste trabalho.

A **todos os meus amigos**, pelos momentos de amizade, sincera e companheirismo compartilhados que ficarão para sempre.

## *AGRADECIMENTO ESPECIAL*

*À Profa. Dra. Keico Okino Nonaka*, pela ótima oportunidade de participação neste programa de pós-graduação, o exemplo de ética profissional, grande caráter e sempre dedicada à arte de ensinar de forma exigente e crítica, sempre contribuindo para meu crescimento e amadurecimento profissional.

Minha gratidão, respeito e admiração!

## RESUMO

A proposta deste estudo foi investigar a influência do treinamento resistido de alta intensidade sobre a atividade das metaloproteinases de matriz (MMPs), propriedades biométricas, biomecânicas, biofísicas e bioquímicas de ossos de ratos jovens e idosos. Foram utilizados 62 ratos intactos, *Ratus norvegicus albinos* (“Wistar”), do gênero masculino, distribuídos aleatoriamente em 4 grupos: jovens sedentários (JS), jovens treinados (JT), idosos sedentários (IS) e idosos treinados (IT). Os ratos (JT e IT) realizaram treinamento resistido durante 12 semanas, que consistia em escalar em uma escada vertical de 1,1m com pesos fixados em suas caudas. As sessões foram realizadas três vezes por semana, em dias intercalados. As análises biomecânicas, biofísicas, bioquímicas e atividade da MMP-2 dos ossos foram realizadas, respectivamente, utilizou-se uma máquina de ensaio universal, princípio de Arquimedes, kit comercial específico e zimografia. No presente estudo, o protocolo de treinamento promoveu diminuição da massa corporal dos animais JT, e redução da rigidez óssea e da atividade da pro MMP-2 no grupo IT. Com o envelhecimento ocorreu diferenças da carga de carregamento (absoluta e relativa) entre os grupos treinados (JT maior que IT) e massa corporal (aumento nos jovens; aumento da massa inicial e diminuição da massa final nos idosos), aumento do comprimento do fêmur direito, material mineral (cálcio e fósforo) e rigidez, porém, uma diminuição do material orgânico. No presente estudo, o protocolo de treinamento não promoveu efeito sobre o tecido ósseo escolhido para análise.

**Palavras chave:** treinamento resistido, ratos idosos, atividade de MMP-2 e propriedades biomecânicas e biofísicas do osso.

## ABSTRACT

The purpose of this study was to investigate the influence of high-intensity resistance training on the activity of bone matrix metalloproteinases (MMPs), biometric, biomechanical, biophysical and biochemical properties of young and aged rats. We used 62 intact male rats, *Rattus norvegicus albinos* ("Wistar") randomly distributed into 4 groups: young sedentary (YS), young trained (YT), older sedentary (OS) and old trained (OT). The rats (YT and OT) performed resistance training, during 12 weeks, consisted of climbing a vertical ladder with weights fixed on their tails. The sessions were executed three times a week, every other day. The biomechanical, physical, biochemical and MMP-2 activity of bones analysis were performed, respectively, using a universal testing machine, Archimedes principle, commercial kit and zymography. In this study, the training promoted a reduction of body mass in YT animals, and reduced bone stiffness and pro MMP activity in the OT group. With aging occurred differences of the charge of loading (absolute and relative) between the trained groups (YT greater than OT), body mass (increased among youth, increased initial mass and decreased final mass in the elderly), an increase in the right femur length, mineral material (calcium and phosphorus) and stiffness, however, a decrease of organic material. In this study, the training protocol did not cause effects on bone tissue chosen for analysis. In this study, the training protocol did not cause effects on bone tissue chosen for analysis.

**Keywords:** resistance training, aged rats, MMP-2 activity and physical and biomechanical properties of bone.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	Representação esquemática do protocolo experimental.....	17
FIGURA 2.	Representação esquemática dos aparatos de treinamento.....	18
FIGURA 3.	Máquina universal Instron (modelo 4444) utilizado para o ensaio de flexão a três pontos em fêmur de rato.....	22
FIGURA 4.	Gráfico Carga x Deformação, obtido com o teste de flexão, utilizado para determinação das propriedades biomecânicas.....	24
FIGURA 5.	Representação gráfica da média semanal da carga absoluta (g) (a) e relativa (b) de treinamento. JT, Jovem Treinado e IT, Idoso Treinado.....	28
FIGURA 6.	Representação gráfica da massa corporal inicial (g) (a) e (b) final (g) e (c) ganho de massa corporal ( $\Delta$ = massa final - massa inicial) (g). JS, Jovem Sedentário; JT, Jovem Treinado; IS, Idoso Sedentário; IT, Idoso Treinado.....	30
FIGURA 7.	Representação gráfica dos valores de comprimento (a) (em cm), peso úmido (b), seco (c) e das cinzas (d) (em g) dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais. JS, Jovem Sedentário; JT, Jovem Treinado; IS, Idoso Sedentário; IT, Idoso Treinado.....	32
FIGURA 8.	Representação gráfica da análise biofísica do fêmur direito: (a) Água (%), (b) material orgânico (%) e (c) material mineral (%). JS, Jovem Sedentário; JT, Jovem Treinado; IS, Idoso Sedentário; IT, Idoso Treinado.....	33
FIGURA 9.	Representação gráfica da análise bioquímica do fêmur direito: (a) conteúdo de cálcio (mg) e (b) fósforo (mg). JS, Jovem Sedentário; JT, Jovem Treinado; IS, Idoso Sedentário; IT, Idoso Treinado.....	35
FIGURA 10.	Representação gráfica da análise biomecânica do fêmur direito: (a) força máxima (N), (b) resiliência (J) e (c) Rigidez (N/mm). JS, Jovem Sedentário; JT, Jovem Treinado; IS, Idoso Sedentário; IT, Idoso Treinado.....	36
FIGURA 11.	Representação esquemática da atividade da pró MMP-2 (a) e da MMP-2 ativa (b) da tíbia direita obtidas por zimografia (c). JS, Jovem Sedentário; JT, Jovem Treinado; IS, Idoso Sedentário; IT, Idoso Treinado.....	37

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	Carga absoluta e relativa de treinamento (g) dos animais treinados. JT, Jovem Treinado; IT, Idoso Treinado.....	29
TABELA 2.	Massa corporal inicial, final e ganho de massa ( $\Delta$ massa) em gramas (g). JT, Jovem Treinado; IT, Idoso Treinado.....	31
TABELA 3.	Comprimento (cm) e pesos úmido, seco e das cinzas em gramas (g), dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais. JS, Jovem Sedentário; JT, Jovem Treinado; IS, Idoso Sedentário; IT, Idoso Treinado.....	32
TABELA 4.	Porcentual de água, material orgânico e mineral dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais. JS, Jovem Sedentário; JT, Jovem Treinado; IS, Idoso Sedentário; IT, Idoso Treinado. JS, Jovem Sedentário; JT, Jovem Treinado; IS, Idoso Sedentário; IT, Idoso Treinado.....	34
TABELA 5.	Conteúdo de cálcio e fósforo dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais. Controle. JS, Jovem Sedentário; JT, Jovem Treinado; IS, Idoso Sedentário; IT, Idoso Treinado.....	35
TABELA 6.	Parâmetros biomecânicos: Força Máxima (N), Resiliência (J) e Rigidez (N/mm) dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais. JS, Jovem Sedentário; JT, Jovem Treinado; IS, Idoso Sedentário; IT, Idoso Treinado.....	36
TABELA 7.	Atividade da pró MMP-2 e da MMP-2 ativa das tíbias direitas obtidas por zimografia dos animais dos diferentes grupos experimentais. JS, Jovem Sedentário; JT, Jovem Treinado; IS, Idoso Sedentário; IT, Idoso Treinado.....	38

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BMPs Proteínas Morfogenéticas Ósseas

DMO Densidade Mineral Óssea

C<sub>1</sub> Carga no Limite Elástico

C<sub>2</sub> Carga Máxima

Ca Cálcio

D<sub>1</sub> Deformação no Limite Elástico

EphrinB2 Receptores de Ativação

EphB4 Receptores de Ativação

g Gramas

GH Hormônio de Crescimento

GHR Receptor do Hormônio do Crescimento

IGF Fator de Crescimento Semelhante à Insulina

IGF-I Fator de Crescimento Semelhante à Insulina I

IGF-II Fator de Crescimento Semelhante à Insulina II

IGFBPs Proteína de Ligação do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina

JS Jovem Sedentário

JT Jovem Treinado

IS Idoso Sedentário

IT Idoso Treinado

l Litro

MEC Matriz Extracelular

MED Média

min Minutos

MMPs Metaloproteinases de Matriz

MMP-2 Metaloproteinase de Matriz do tipo 2

MT-MMPs Metaloproteinases de Matriz do Tipo Membrana

n Número de Animais

ONOO<sup>-</sup> peroxinitrito

OPG Osteoprotegerina

PEN Não enzimáticas Pentosidina

PDGF Fator de Crescimento Derivados de Plaquetas

pH Potencial Hidrogeniônico ou Potencial de Hidrogênio

Pm Peso do Material Mineral (cinzas)

Ps Peso Seco

PTH Hormônio da Paratireóide

Pu Peso úmido

RANK Receptor de Membrana de Osteoclastos e Pré-Osteoclastos

RANKL Ligante de Superfície dos Osteoblastos e Pré-Osteoblastos

ROS Espécies Reativas de Oxigênio

T Inclinação da Reta

TIMPs Inibidores Teciduais de Metaloproteinases de Matriz

vs Versus

°C Graus Celsius

2 N Dois Normal

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1	Tecido ósseo.....	1
1.1.1	Características da matriz óssea e componentes celulares.....	1
1.1.2	Crescimento e remodelação óssea.....	4
1.1.3	Metaloproteinases de matriz e tecido ósseo.....	7
1.2	Alterações decorrentes do processo de envelhecimento no tecido ósseo.....	8
1.3	Treinamento resistido e sua relação com o tecido ósseo.....	14
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
3.1	Aspectos éticos e legais.....	16
3.2	Animais.....	16
3.3	Protocolo Experimental.....	17
3.3.1	Protocolo de treinamento.....	18
3.4	Eutanásia e retirada dos tecidos.....	20
3.5	Parâmetros Analisados.....	21
3.5.1	Parâmetros Biométricos.....	21
3.5.2	Parâmetros Biomecânicos.....	21
3.5.3	Parâmetros Físicos.....	24
3.5.4	Propriedades Bioquímicas.....	26
3.5.5	Análise da atividade da MMP-2 por zimografia.....	26
3.6	Análises Estatísticas.....	27
3.7	Normas Técnicas Referentes à Elaboração do Trabalho.....	27

<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>27</b>
4.1	Carga Absoluta e relativa de treinamento.....	27
4.2	Parâmetros Biométricos.....	29
4.2.1	Massa Corporal.....	29
4.2.2	Análise do Fêmur Direito.....	31
4.3	Parâmetros Físicos.....	33
4.4	Análise Bioquímica.....	34
4.5	Parâmetros Biomecânicos.....	35
4.6	Análise da atividade da MMP-2 por zimografia.....	37
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>38</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>44</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>46</b>
	<b>APÊNDICE.....</b>	<b>72</b>

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 Tecido ósseo**

#### **1.1.1 Características da matriz óssea e componentes celulares**

O tecido ósseo é o constituinte principal do esqueleto, serve de suporte para as partes moles e protege órgãos vitais, como os contidos nas caixas torácica e craniana e no canal raquidiano, aloja e protege a medula óssea, formadora das células do sangue. Os ossos proporcionam apoio aos músculos esqueléticos, transforma suas contrações em movimentos úteis, e constituem um sistema de alavancas que amplia as forças geradas pela contração muscular. Além dessas funções, os ossos funcionam como depósito de cálcio, fosfato e outros íons, armazenando-os ou liberando-os de maneira controlada, para manter constante a concentração desses importantes íons nos líquidos corporais (BILEZIKIAN, RAIZ, RODAN, 1996; MARTINI, 1998; CONFAVREUX, 2010, 2011).

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo formado por células e material extracelular calcificado, a matriz óssea. Esse tecido é altamente vascularizado e metabolicamente ativo (KIERSZENBAUM, 2008).

As células do tecido ósseo são: osteoprogenitoras, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. As osteoprogenitoras são células tronco mesenquimais cuja capacidade de proliferação e diferenciação as permite se diferenciar em osteoblastos quando estimuladas por fatores, como proteínas e fatores de crescimento, podem se manter quiescentes ou ativas conforme a demanda metabólica imposta ao tecido. Quando ativos, os osteoblastos são responsáveis pela osteogênese, sintetizam a parte orgânica da matriz óssea, como colágeno tipo I e II, proteoglicanos e glicoproteínas da matriz extracelular adjacente, em arranjos

regulares que futuramente serão calcificados pela deposição dos componentes inorgânicos da matriz. Após a calcificação alguns osteoblastos ficam aprisionados em lacunas na matriz óssea mineralizada, em um estado morfofuncional diferente dos osteoblastos, sendo então denominados osteócitos. Cada lacuna contém apenas um osteócito das quais partem canalículos, e dentro destes os prolongamentos dos osteócitos estabelecem contato através de junções comunicantes, por onde podem passar cálcio, citoquinas e prostaglandinas de um osteócito para outro. A pequena quantidade de material extracelular presente no espaço entre os osteócitos (e seus prolongamentos) e a matriz óssea também constitui uma via de transporte de nutrientes e metabolitos entre os vasos sanguíneos e os osteócitos. Uma das funções do osteócito é traduzir a força mecânica imposta ao osso em sinais bioquímicos que regulam o “turnover” ósseo, além de manter a matriz óssea (NOMURA, YAMAMOTO, 2000; PALUMBO et al., 2001; MACKIE, 2003; BONEWALD, 2004; KNOTHE TATE et al., 2004; FERNÁNDEZ et al., 2006b; RUBIN, RUBIN, JACOBS, 2006; DEL FATTORE et al., 2010, ERIKSEN, 2010).

Por fim, temos os osteoclastos (células gigantes móveis e multinucleadas), que são células promotoras da osteólise (reabsorvem tecido ósseo). Estas são originadas da diferenciação de células mononucleadas hematopoiéticas. Os osteoblastos são células com papel fundamental durante a fase inicial da osteoclastogênese por meio da produção do Fator Estimulante da Colônia de Macrófagos (M-CSF). Por meio de vias moleculares esse processo é regulado, sendo elas: OPG (osteoprotegerina, uma proteína solúvel sintetizada por osteoblastos e pré-osteoblastos), RANKL (um ligante situado sobre a superfície dos osteoblastos e pré-osteoblastos) e RANK (um receptor situado na membrana de osteoclastos e pré-osteoclastos). A interação entre RANKL e seu receptor inicia a atividade e diferenciação osteoclástica, e promove aumento da reabsorção. A ligação de OPG a RANK inativa esse receptor, sendo assim a diferenciação osteoclástica inibida. A regulação sistêmica se dá

principalmente através da ação do hormônio da paratireóide (PTH), que tem seu receptor nos osteoblastos, e uma ação parácrina sobre os osteoclastos. Nessas células, o PTH ativa a reabsorção do tecido mineralizado com finalidade da manutenção das concentrações dos íons de cálcio no sangue. O processo de reabsorção depende de interações especiais entre o osteoclasto e a superfície óssea, onde um espaço fechado forma-se entre a célula e a matriz. Nesse espaço, os osteoclastos deterioram a superfície óssea mineralizada e iniciam a absorção pela secreção de íons de hidrogênio e enzimas lisossomais, tais como a catepsina K, os quais podem degradar todos os componentes da matriz óssea, incluindo colágeno, em pH ácido (RAISZ, 1999; PALUMBO et al., 2001; TROEN, 2003; FERNÁNDEZ et al., 2006b; BOYCE et al., 2007; TAKAHASHI et al., 2011).

A matriz extracelular contém componentes orgânicos (30%) e inorgânicos (60%) e células ósseas (10%) (ROBEY, BOSKEY, 2008). A parte orgânica é determinante para a estrutura e propriedades mecânicas ósseas, sendo composta pelo osteóide (pré-osso) e pelas células do tecido ósseo. A matriz óssea é formada principalmente por colágeno tipo I e II e outras moléculas como fatores de crescimento, citoquinas e proteínas da matriz extracelular. O restante é formado por células ósseas. (EINHORN, 1996; HALL, 2005; FERNÁNDEZ et al., 2006a; ROBEY, BOSKEY, 2008).

A parte inorgânica (mineral) é composta principalmente por grandes quantidades de cálcio, fosfato e carbonato na forma de pequenos cristais de hidroxiapatita  $[Ca_{10}(PO)_6(OH)_2]$  e menores quantidades de magnésio, sódio, potássio, manganês e flúor em associação às fibras de colágeno (FERNÁNDEZ et al., 2006a).

### 1.1.2 Crescimento e remodelação óssea

O tecido ósseo é formado ou por um processo chamado de ossificação intramembranosa, que ocorre no interior de uma membrana conjuntiva, ou pelo processo de ossificação endocondral sobre um molde de cartilagem hialina (MARCUS, FELDMAN, KELSEY, 1996).

A ossificação intramembranosa tem lugar no interior de membranas de tecido conjuntivo, é restrito a ossos chatos e contribui para o crescimento de ossos curtos e em espessura para os ossos longos. O local da membrana conjuntiva, onde a ossificação começa, chama-se centro de ossificação primária. O processo tem início pela diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos e estes sintetizam o osteóide (matriz não mineralizada). A parte da membrana conjuntiva que não sofre ossificação passa a constituir o endóstio e perióstio (COHEN, 2000; FRANZ-ODENDAAL, 2011).

Já na ossificação endocondral, o processo de formação óssea tem início sobre uma peça de cartilagem hialina, de forma parecida à do osso que se vai formar, porém de tamanho menor. Este é o principal meio de formação de ossos curtos e longos, consistindo essencialmente em dois processos. Primeiro, a cartilagem hialina sofre modificações, há hipertrofia dos condrócitos, redução da matriz cartilaginosa a finos tabiques, sua mineralização e a morte dos condrócitos por apoptose. Segundo, as cavidades previamente ocupadas pelos condrócitos são invadidas por capilares sanguíneos e células osteogênicas oriundas do tecido conjuntivo adjacente. Essas células se diferenciam em osteoblastos, que depositarão matriz óssea sobre os tabiques de cartilagem (MACKIE et al., 2008; LONG, ORNITZ, 2013).

O crescimento ósseo consiste na formação de tecido ósseo novo, associado à reabsorção parcial do tecido já formado, mantendo assim sua forma enquanto crescem. Nos

ossos longos, as epífises aumentam de tamanho devido ao crescimento radial da cartilagem, acompanhado por ossificação endocondral. A diáfise cresce em extensão pela atividade dos discos epifisários, e em espessura pela formação de tecido ósseo na superfície externa (perióstio) da diáfise, com reabsorção da superfície interna (endóstio) (BILEZIKIAN, RAISZ, RODAN, 1996).

O processo denominado remodelamento ósseo, é regulado pelas células responsáveis pela formação (osteoblastos) e reabsorção (osteoclastos) do tecido em resposta a sinais químicos, mecânicos, elásticos e eletromagnéticos, cuja ação envolve a liberação de diversas enzimas, com o intuito de regular o “turnover” da matriz extracelular (MEC). Em condições normais, o equilíbrio entre a formação e a reabsorção está ligado as vias metabólicas associadas à homeostasia mineral necessária para manter a integridade estrutural e manutenção dos estoques de cálcio e fósforo (HILL, ORTH, 1998; STERNLICHT, WERB, 2001; FERNÁNDEZ et al., 2006b; ERIKSEN, 2010).

O sinal que inicia o processo de remodelamento permanece desconhecido, mas evidências mostram que o estresse mecânico pode alterar a arquitetura óssea local e as células de revestimento possuem receptores para diversos fatores sistêmicos e locais, como paratormônio (PTH) e prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). A partir do estímulo celular previamente aplicado por estes fatores, há síntese e liberação de proteases cuja ação expõe uma determinada área de matriz óssea mineralizada (EINHORN, 1996; HILL, ORTH, 1998), e os osteócitos determinam o local de remodelação (AIRES, 2008). O osso é reabsorvido pelos osteoclastos que criam um “microambiente fechado” onde tem lugar a reabsorção óssea. Este microambiente induz e permite a liberação de fatores de crescimento presentes dentro da matriz, como o fator de crescimento transformante beta (TGF- $\beta$ ), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento semelhante à insulina I e II (IGF-I e II) e proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs). Posteriormente, inicia-se o estágio de formação, em

que os fatores liberados durante a fase de reabsorção estimulam a diferenciação dos pré-osteoblastos. Em poucos dias, os osteoblastos diferenciados iniciam a síntese da matriz óssea, que posteriormente é mineralizada (PARFITT, CHIR, 1987; HILL, ORTH, 1998; FERNÁNDEZ et al., 2006b; DOMINGUEZ et al., 2011).

O desenvolvimento do tecido ósseo ocorre por meio de constantes modificações durante a vida do indivíduo. Essas alterações fisiológicas dar-se-ão pela relação entre formação e reabsorção do tecido ósseo, cujo pico máximo de desenvolvimento na espécie humana encontra-se aos 30 anos de idade, onde há prevalência da formação tecidual. Entre os 30 e 40 anos ocorre uma estabilização dos dois mecanismos (BERGLUND et al., 2000). Após esse período de equilíbrio, a reabsorção passa a prevalecer, e promove diminuição progressiva de massa óssea. Neste período há perda aproximada de 0,3- 0,5 % da massa óssea ao ano. Porém, a constante relação formação/reabsorção é de fundamental importância no estado fisiológico, pois contribui para a preservação de um tecido qualitativamente funcional, sempre renovado, e com sua integridade mecânica preservada (VAANANEN, 1991; YAMAMOTO, JEE, MA, 1995; MARCUS, FELDMAN, KELSEY, 1996; NORDIN, 1997; KANIS, 1998; TENENHOUSE et al., 2000; BARONCELLI, SAGGESE, 2000; HENRY, FATAYERJI, EASTELL, 2004; DARELID et al., 2010).

Uma classe de proteases são responsáveis pela exposição da matriz óssea mineralizada e pelo remodelamento da MEC denominadas como metalopeptidases de matriz (MMPs). Estas MMPs são enzimas responsáveis pelo desenvolvimento e manutenção da MEC, e desempenham atividade pertinente no remodelamento (VU, WERB, 2000).

### 1.1.3 Metaloproteinases de matriz e tecido ósseo

As metaloproteinases de matriz (MMPs) constituem uma família de endopeptidases dependentes de cálcio e zinco que desempenham um importante papel na degradação e remodelamento da MEC em vários processos fisiológicos e patológicos, no desenvolvimento embrionário, angiogênese, reparação de feridas, artrite reumatóide e metástases (BIRKEDAL-HANSEN, 1993; VU e WERB, 2000; CHAVEY et al., 2003). Desde a primeira descrição das MMPs em 1962, foram identificadas 30 enzimas pertencentes a essa família de endopeptidases, classificadas em seis grupos de acordo com seu substrato específico e com a organização de seu domínio catalítico (SNOEK-VAN BEURDEN e VON DEN HOFF, 2005; KUPAI et al., 2010; GEURTS et al., 2012).

Entre outras funções importantes das MMPs, a MMP-2 principalmente, desempenha um papel central na regulação da osteogênese, remodelação óssea (MOSIG et al., 2007) e degrada colágenos dos tipos I, II e III (AIMES, QUIGLEY, 1995; STAMENKOVIC, 2000; PATTERSON et al., 2001 KUBOTA, OKA, NAKAGAWA, 2002).

Por terem propriedades potencialmente destrutivas, são normalmente encontrados nos tecidos como pró MMPs (72 kDa), enzimaticamente inativas e denominada de zimogênios (NAGASE, WOESSNER, 1999; KJAER, 2004). Assim, a ativação enzimática requer a remoção do domínio pró-peptídeo por meio da degradação deste por outras proteases, tais como plasmina, ou por MT-MMPs (MMPs do tipo membrana) (MURPHY, NAGASE, 2008) o gera uma MMP intermediária inativa de 64 kDa (HADLER-OLSEN et al. 2011). Sua expressão é altamente regulada por meio dos inibidores específicos, conhecidos como inibidores teciduais de MMPs (TIMPs), fatores de crescimento e citocinas produzidas durante a remodelação do tecido, hormônios, estresse de cisalhamento e estresse oxidativo

(CARMELI et al., 2005; SPINALE, 2007), assim tornam-se essenciais para a manutenção e desenvolvimento de tecido saudável.

O aumento da atividade de MMPs é geralmente indicativo de degradação da matriz que é necessária para permitir o crescimento do tecido (MARQUETI et al., 2008). A MMP-2, ou gelatinase A, na sua forma ativa (62 kDa) é a MMP mais importante para a preservação da massa óssea. Evidências têm demonstrado que a deficiência de MMP-2 induz um distúrbio ósseo caracterizado por destruição do tecido ósseo, sob a forma de nódulos, artrite e osteólise (Síndrome nodulose artropatia osteólise), que também inclui osteoporose generalizada (MARTIGNETTI et al., 2001; AL-OTAIBI et al., 2002; INOUE et al., 2006).

## **1.2 Alterações no tecido ósseo decorrentes do processo de envelhecimento**

Segundo as projeções estatísticas (INSTITUTO DE PESQUISA APLICADA, 2010) estima-se que, no ano de 2040, o Brasil terá 55 milhões de idosos, o que representará 27% da população. Desses, 13 milhões terão mais de 80 anos. O crescimento da população brasileira acima dos 60 anos foi de 100% entre os anos de 1950 e 2000. As estimativas apontam para um crescimento ainda mais significativo para as próximas décadas, chegando-se em 2050 com cerca de 30% da população brasileira composta por idosos, além de um aumento significativo da população com idade superior a 80 anos. A projeção é que em 2050, eles sejam 6% da população brasileira (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2010).

O envelhecimento é um processo complexo multifatorial caracterizado pelo acúmulo de alterações deletérias nas células e tecidos, que culmina na deterioração progressiva da integridade estrutural e das funções fisiológicas (SEMBA, NICKLETT, FERRUCCI, 2010). Esses processos deletérios (perda da massa muscular, força, equilíbrio, deterioração dos

sistemas sensoriais e perda de densidade mineral óssea) em pessoas idosas, podem ocasionar quedas e lesões (MARQUES et al., 2011). Mudanças das propriedades estruturais e mecânicas do osso, decorrentes da idade, são as principais causas subjacentes de fraturas ósseas (RAISZ, 2005). A baixa densidade mineral óssea (DMO) está associada a fraturas tanto em homens quanto mulheres. Esta perda de massa óssea está associada a uma significativa redução do volume ósseo, volume trabecular e número de trabéculas, o que indica uma redução significativa e rápida da qualidade óssea. Além de uma redução do volume de osso trabecular em idosos, existe também uma redução do osso cortical (RECKER et al., 1992; GREEN et al., 2011). Essa redução do osso cortical é atribuída principalmente à reabsorção óssea na superfície endosteal, que ocorre em um taxa maior do que o crescimento aposicional periosteal (RUBIN, LANYON 1984; SEEMAN, 2003, 2008; SZULC, SEEMAN, 2009). Portanto, ocorre redução da largura do osso e mudança da arquitetura do osso cortical denso para poroso (RECKER et al., 1992; RUBIN, LANYON, 1985; SEEMAN, 2008).

O desequilíbrio na remodelação, visto na perda óssea relacionada à idade, pode ser devido à progressiva ausência de osteoblastos ativos, diferenciação células-tronco mesenquimais predominante em adipócitos e excesso de oferta dos osteoclastos, tendo como consequência aumento de reabsorção óssea e formação óssea insuficiente (DUQUE e TROEN, 2008). Esta falta de osteoblastogênese também está associada à vida útil mais curta dos osteoblastos maduros, devido aos elevados níveis de morte celular por apoptose (ROSEN et al., 2009).

A matriz de colágeno é uma das mais afetadas durante o envelhecimento (VIGUET-CARRIN, GARNERO, DELMAS, 2006; VIGUET-CARRIN et al., 2010), podem ocorrer alterações das quantidades das enzimas hidroxililpiridinolina e lisilpiridinolina, e de pentosidina (PEN), as quais são responsáveis pelas ligações cruzadas e promovem a

resistência mecânica da rede de colágeno (BANSE et al., 2002; SAITO, MARUMO, 2010; VIGUET- CARRIN et al., 2010).

Há uma relação direta entre o sistema endócrino e o metabolismo do tecido ósseo relacionado à idade.

O hormônio paratireoideano (PTH), sintetizado pelas glândulas paratireóides, tem como função controlar os níveis de cálcio sanguíneo, absorção de cálcio gastrointestinal, reabsorção renal de cálcio e fosfato e reabsorção óssea. Os receptores, localizados nos osteoblastos e ativados pelo PTH, desencadeiam ações parácrinas sobre os osteoclastos e seus precursores. Assim, o resultado refere-se ao aumento da retirada de cálcio ósseo e manutenção de seus níveis sanguíneos (MUNDY, MARTIN, 1993; SWARTHOUT et al., 2002; KOUSTENI, BILEZIKIAN, 2008). O paratormônio promove a remoção de cálcio do osso, atua como antagonista à ação de outro hormônio, a calcitonina, que limita a reabsorção do tecido ósseo (HENLEY et al., 2011). Sintetizada pelas células parafoliculares da glândula tireóide, este hormônio protéico abaixa a concentração plasmática de cálcio, cujo nível elevado exerce papel estimulante para a secreção do hormônio (AZRIA, 1989; NAOT, CORNISH, 2008; de PAULA, ROSEN, 2010).

A vitamina D é outro hormônio que têm participação sobre a formação e a reabsorção óssea D. Não se trata de um hormônio originário de uma glândula endócrina, mas seu mecanismo de ação semelhante aos hormônios esteróides justifica sua classificação como tal (MARCUS, FELDMAN, KELSEY, 1996; REICHRATH et al., 2007; ST-ARNAUD, 2008; ARMAS, HEANEY, 2011). Seja produzida na pele, por irradiação ultravioleta (D3), ou a ingerida pela dieta (D3 e D2), a vitamina D tem por funções aumentar o cálcio e fosfato no sangue através das suas interações com os rins, trato gastrointestinal e osso. No tecido ósseo, age nos receptores dos osteoblastos. Dessa forma, através de mecanismo parácrino, estimula a reabsorção óssea e ativa os osteoclastos. A vitamina D também induz a síntese de osteocalcina

e fibronectina e suprime a síntese de colágeno tipo I pelos osteoblastos (MUNDY, MARTIN, 1993; ST-ARNAUD, 2008; LANDRY, RUPPE, GRUBBS, 2011; ARMAS, HEANEY, 2011).

O hormônio do crescimento (GH), um hormônio sistêmico, tem um papel crucial na manutenção da massa óssea em adultos, regula a remodelação óssea através de uma complexa interação direta de GH e seus receptores (GHR) e indireta por meio de fatores de crescimento insulínicos (IGFs), proteína de ligação IGF (IGFBPs), e IGFs produzidos localmente e IGFBPs, age de uma forma autócrina e parácrina (UELAND, 2004; YAMAGUCHI et al., 2006).

Além da indicação de outros fatores atuantes sobre o tecido ósseo que alteram o micro-ambiente do mesmo, tais como fator de transformação do crescimento (TGF- $\beta$ ), proteínas morfogenéticas do osso (BMPs), fatores de crescimento fibroblástico (FGF), fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF), interleucinas (IL-1, IL-6, IL-11), fator de necrose tumoral (TNF-  $\alpha$ ), fator estimulador de colônias (CSF), osteoprotegerina (OPG) e receptores de ativação (RANK, RANKL, EphB4 e EphrinB2) (UELAND et al., 2003; THEOLEYRE et al., 2004; UNDALE et al., 2010).

O acúmulo de radicais livres [espécies reativas de oxigênio (ROS)], que causam disfunção osteoblástica e diminuição da formação óssea contribue para o processo de envelhecimento (ALMEIDA et al.; 2007; ALMEIDA et al.; 2010; MANOLAGAS, 2010; KOUSTENI, 2011). Juntamente com fatores exógenos e ambientais (por exemplo, radiação ionizantes e ultravioleta e produtos químicos do ambiente) podem prejudicar o reparo de defeitos causados no DNA. Se a taxa de danos ao DNA excede a capacidade da célula de reparo, podem ocorrer mutações somáticas, senescência ou câncer. Assim, não só o grau de dano celular, mas também o equilíbrio entre o dano e os mecanismos de reparo determinam a

integridade celular e tecidual, com consequências funcionais na formação óssea e massa óssea (AMBROGINI et al., 2010; RACHED et al., 2010).

A sincronia entre os diferentes hormônios, enzimas e processos metabólicos que interagem com o tecido ósseo permite a homeostase local e sistêmica no que se refere ao depósito e às concentrações sanguíneas de cálcio. No entanto, quando ocorre um desequilíbrio hormonal ou qualquer disfunção em uma das vias que controlam esse metabolismo, podem ocorrer modificações na estrutura do esqueleto. Algumas doenças estão relacionadas a estas alterações hormonais, como é o caso da osteoporose.

A osteoporose é uma doença caracterizada por baixa massa óssea e deterioração da microarquitetura do tecido ósseo, predispondo aumento do risco de fratura, considerada como um problema de saúde pública (HOLROYD, COOPER, DENNISON, 2008; SIPOS et al., 2009; PATSCH, DEUTSCHMANN, PIETSCHMANN, 2011).

Um quadro de osteopenia, ou seja, massa óssea reduzida ocorre após cessação ou diminuição dos níveis de hormônios esteróides sexuais, o que caracteriza a menopausa e a andropausa em humanos. Ambos os sexos são afetados, mas a carga principal da doença é em mulheres na menopausa (DY et al., 2011; PATSCH, DEUTSCHMANN, PIETSCHMANN, 2011). A diferença de diagnóstico entre osteopenia e osteoporose é baseado na medida da densidade mineral óssea (DMO) realizada pela técnica *dual-energy x-ray absorptometry* (DEXA). A interpretação dos resultados é feita sempre pela comparação com padrões de normalidade para adulto jovens. O escore *T* é o número de desvios padrão (DP) distante da média da massa óssea de um grupo de adultos jovens (KANIS et al., 1994):

Escore T até -1 DP: Resultado Normal

Escore T abaixo de -1 até -2,5 DP: Osteopenia

Escore T abaixo de -2,5 DP: Osteoporose

A osteoporose pode ser classificada em primária e secundária. A primária, que ocorre mais frequentemente, pode ainda ser dividida em tipo I e tipo II. Na osteoporose primária tipo I, classificação da osteoporose pós-menopausal, ocorre alta reabsorção óssea, em estágio precoce, o que denota potente ação dos osteoclastos e atinge predominantemente osso trabecular (GALLAGHE, LEVINE, 2011). Já na osteoporose tipo II classificação da osteoporose senil relacionada ao envelhecimento, a perda óssea dá-se de forma mais gradual. Sugere-se, neste caso, que haja atividade diminuída dos osteoblastos, deficiência crônica de cálcio, entre outros fatores (ALONSO-BOUZON, DUQUE, 2011). A osteoporose secundária normalmente é decorrente de processos inflamatórios e doenças que podem ocasionar má absorção intestinal de cálcio ou hipostrogenismo precoce. São exemplos: hipertireoidismo; mieloma múltiplo; câncer; doenças inflamatórias intestinais crônicas; síndrome de Cushing; *Diabetes mellitus*; hipogonadismo; doenças renais crônicas; doenças hematológicas; doenças reumatológicas; doenças do tecido conjuntivo; anorexia nervosa (HOFBAUER, HAMANN, EBELING, 2010; BARTL, BARTL, 2011).

Não há uma cura para a osteoporose. No entanto, há tratamentos que procuram amenizar as sequelas desencadeadas pela perda excessiva de massa óssea. Na terapêutica são utilizados suplementos de cálcio, reposição hormonal baseado em esteróides anabólicos, vitamina D, paratormônio e calcitonina. Os bifosfonatos, análogos sintéticos do pirofosfato, um regulador natural da mineralização óssea, também têm sido indicados como inibidores da reabsorção e estimuladores da formação óssea (GALLACHER, DIXON, 2010; KARAGUZEL, HOLICK, 2010; GALLAGHER, LEVINE, 2011; RACHNER, KHOSLA, HOFBAUER, 2011).

Exercícios físicos com carga de baixo impacto são indicados para estimular a ação osteoblástica e, em uma fase precoce, prevenir acentuada perda de massa óssea e, com a

doença instalada, diminuir os efeitos da espoliação óssea (SUOMINEN, 2006; BRENTANO et al., 2008).

### **1.3 Treinamento resistido e sua relação com o tecido ósseo**

A partir de uma perspectiva de saúde pública, a prevenção desse fenômeno complexo e multifatorial que constitui a osteoporose é extremamente significativa para a promoção da saúde no envelhecimento, dado o impacto de fraturas ósseas sobre a independência funcional e qualidade de vida das pessoas idosas (KANNUS et al., 2005).

A atividade física é um dos principais métodos não-farmacológicos para aumentar e manter a densidade mineral óssea (DMO) e sua geometria. Como tal, tem um papel importante na manutenção da massa óssea e força, assim, pode reduzir o risco de fraturas osteoporóticas futuras (TURNER, ROBLING, 2003; BAILEY, BROOKE-WAVELL, 2008; HELGE et al., 2010; HOWE et al., 2011).

A condição muscular determina, com grande correlação, a condição óssea. Músculos fracos levam a ossos fracos e músculos fortes levam a ossos fortes (QIN, BAUMAN, CARDOZO, 2010). Os ossos, assim como os músculos, tendem a se tornar mais fortes e resistentes quanto mais forem usados e exercitados, com certos limites (BAILEY, BROOKE-WAVELL, 2010). Pessoas idosas com antecedentes de atividade física regular possuem, em média, uma massa óssea mais elevada do que pessoas sedentárias da mesma idade (GUADALUPE-GRAU et al., 2009).

Como se sabe, o tecido ósseo é dinâmico, ou seja, está em constante renovação para adaptar-se às cargas que lhe são impostas. Suominen (2006), referindo-se à atividade física, especialmente àquelas que envolvem peso, sugere um aumento da densidade óssea. As forças mecânicas proporcionadas pelo exercício agem sobre os osteoblastos para formar osso novo.

O osso adapta-se à carga mecânica através do efeito piezoelétrico. O primeiro relato das propriedades piezoelétricas do osso foi feito por Fukada e Yasuda (1957) que, em um estudo com ossos humanos, constataram a piezoeletricidade do osso, pois este produziu, sob ação de uma carga mecânica, uma polarização elétrica, converte então a energia mecânica em energia elétrica, assim, ocasiona um aumento de densidade óssea. A estrutura do colágeno ósseo, que preenche as características de material piezoelétrico, sob deformação mecânica (como a produzida por tração, compressão ou torção) pode sofrer modificações espaciais e produzir uma polarização elétrica (LIRANI, LAZARETTI-CASTRO, 2005). A força mecânica produzida pelas tensões musculares é um fator determinante na manutenção da massa óssea (KSIEZOPOLSKA-ORŁOWSKA, 2010).

A lei de *Wolff* descrita pelo anatomista Julius Wolff, em 1982, afirma que toda mudança da função de um osso é seguida por certas mudanças na arquitetura interna e na conformação externa. Portanto, o tamanho e a forma dos ossos mudarão à medida que forem utilizados de diferentes maneiras (CHEN et al., 2010). O osso trabecular parece ser mais sensível à atividade física do que o osso cortical, cuja reação é menor ou pelo menos mais lenta (CHAPPARD et al., 2008).

O treinamento resistido aumenta as concentrações de osteoproteínas e de minerais nos ossos (BEAN 1999). Pode aumentar a densidade mineral óssea em pessoas de todas as idades. Fatores como os genéticos, hormonais e nutricionais desempenham papéis importantes na saúde óssea, e o treinamento resistido é uma atividade que pode desenvolver um sistema musculoesquelético mais forte e ajuda os ossos a resistirem à deterioração (BENTON, WHITE, 2006). Alguns estudos têm demonstrado que atividades como caminhada, ginástica e dança podem melhorar a densidade óssea, mas a literatura tem evidenciado que o treinamento resistido pode ser mais eficiente pelo fato da tensão mecânica desenvolvida pelos músculos agirem de forma uniforme em todo o corpo, além de influenciar de maneira positiva a

produção de osteoproteínas e de proporcionar uma retenção maior de minerais (GUADALUPE-GRAU et al., 2009).

Estudos que utilizam o modelo animal são utilizados para demonstrar o impacto do exercício de alta intensidade sobre o tecido ósseo. (SMITH et al., 2008; SHIGUEMOTO et al., 2012).

## **2 OBJETIVOS**

O objetivo desse trabalho foi verificar o efeito do envelhecimento e exercício resistido na atividade das MMPs propriedades biomecânicas, biofísicas e bioquímicas em ossos de ratos.

## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 Aspectos éticos e legais**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Experimental em Animais da Universidade Federal de São Carlos (protocolo CEEA nº. 031/2011).

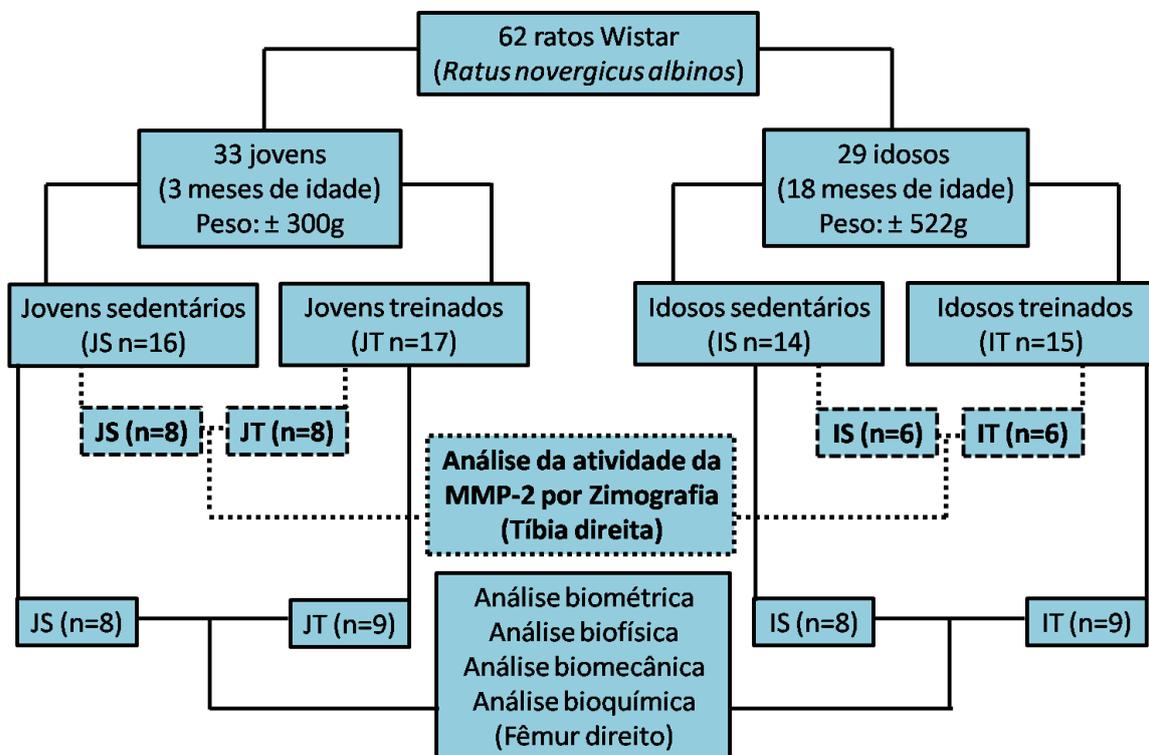
### **3.2 Animais**

Foram utilizados 62 ratos, *Ratus norvegicus albinos* (“Wistar”), machos, com idades diferentes: 33 ratos jovens com 3 meses e média de peso corporal inicial de 300g e 29 ratos idosos com 18 meses e média de peso corporal inicial de 522g (SENGUPTA, 2011, 2013) (figura 1), provenientes do Biotério Central da UNESP (Campus de Botucatu). O experimento foi realizado no laboratório de Neuroendocrinologia do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar. Os ratos foram mantidos no biotério do laboratório durante o

protocolo experimental, sob as seguintes condições: temperatura controlada ( $25^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), regime de luz (10 horas claro e 14 horas escuro), alimentação com ração comercial e água “*ad libitum*”.

### 3.3 Protocolo Experimental

Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos experimentais: jovens sedentários (JS n=16); jovens que realizam o treinamento resistido (JT n=17); idosos sedentários (IS n=14), e idosos que realizaram o treinamento resistido (IT n=15). Foram utilizados 16 animais jovens (JS=8 e JT=8) e 12 animais idosos (IS=6 e IT=6) para a análise da atividade da metaloproteinase 2 (MMP-2) por zimografia nas tíbias direitas. E 17 animais jovens (JS=8 e JT=9) e 17 animais idosos (IS=8 e IT=9) foram utilizados para as análises biométrica, biofísica, biomecânica e bioquímica do fêmur direito (figura 1).

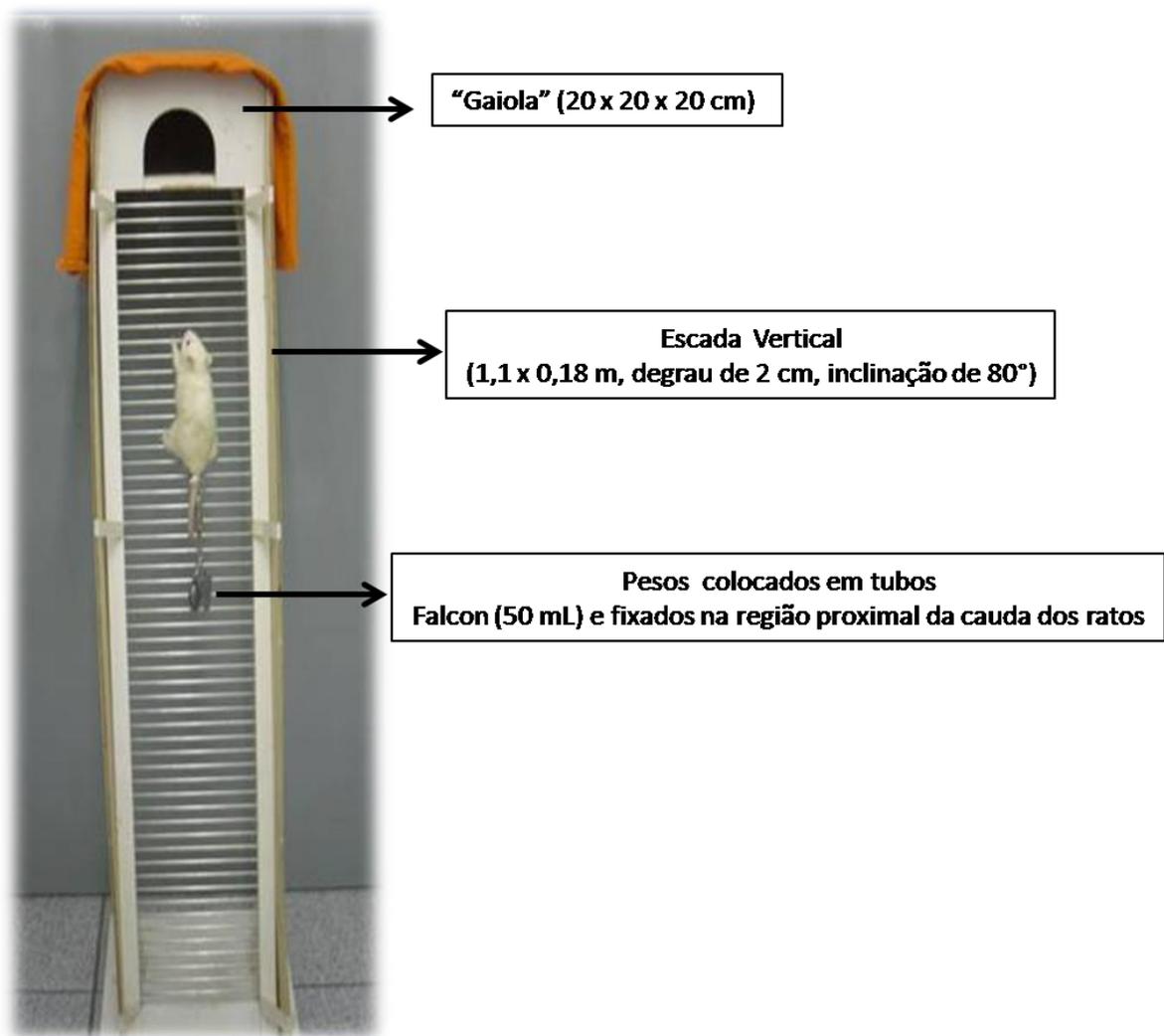


**Figura 1:** Representação esquemática do protocolo experimental.

### 3.3.1 Protocolo de treinamento físico

#### Aparatos de treinamento físico

Consistiam de uma escada vertical (1,1 x 0,18 m, degrau de 2-cm, inclinação de 80°), e de pesos colocados em tubos Falcon (50 mL) fixados na região proximal da cauda dos ratos com uma fita auto-adesiva (figura 2).



**Figura 2:** Representação esquemática dos aparatos de treinamento.

### **Período de treinamento e periodização**

Os animais dos grupos JT e IT realizaram um treinamento resistido por 12 semanas, três vezes por semana, em dias intercalados.

### **Adaptação**

Os ratos realizaram duas sessões de familiarização com a escada, com 8-12 movimentos por escalada. Com o aparato de carga fixado à cauda, os ratos foram colocados na parte inferior da escada e familiarizados com a mesma. No topo da escada os ratos alcançaram uma gaiola (20 x 20 x 20 cm) onde descansaram durante 2 minutos (figura 2). Este procedimento foi repetido até que os animais consigam voluntariamente escalar a escada, três vezes consecutivas.

### **Determinação da capacidade de transporte de carga máxima**

Três dias após esta familiarização, a primeira sessão de treinamento consistiu de 4-8 escaladas na escada com cargas progressivamente maiores. A escalada inicial consistiu em carregar uma carga de 75% da massa corporal do animal. Em seguida, foi adicionado um peso de 30g até uma carga com a qual o rato não conseguisse escalar toda a escada. A maior carga carregada por toda a escalada foi considerada como a capacidade máxima de carregamento do rato para aquela sessão de treinamento.

### **Carga absoluta e relativa de carregamento**

A carga absoluta de treinamento correspondeu à média da carga de carregamento dos grupos treinados, descrito em gramas (g) (LEITE et al., 2009; Prestes et al., 2009; SHIGUEMOTO et al., 2012).

Para normalizar as cargas de treinamento, fizemos individualmente uma relação da carga de treinamento pela massa corporal (carga relativa) - carga de carregamento/peso corporal.

### **Protocolo de treinamento**

O protocolo de treinamento foi o adaptado de Hornberger e Farrar (2004) de acordo com as necessidades do presente estudo. As sessões de treinamento consistiram de quatro escaladas com 65%, 85%, 95% e 100% da capacidade máxima de carregamento do animal, determinada na sessão anterior. Durante as escaladas subsequentes foram adicionados 30g até que uma nova capacidade máxima de carregamento fosse determinada.

### **3.4 Eutanásia e retirada dos tecidos**

Após 48 h do término do período experimental, os animais foram eutanasiados por decapitação. Os fêmures direitos foram dissecados e mantidos em solução de salina 0,9% a -20°C para as subsequentes análises. As tíbias direitos foram dissecadas, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80 °C para as subsequentes análises.

### **3.5 Parâmetros Analisados**

#### **3.5.1 Parâmetros Biométricos**

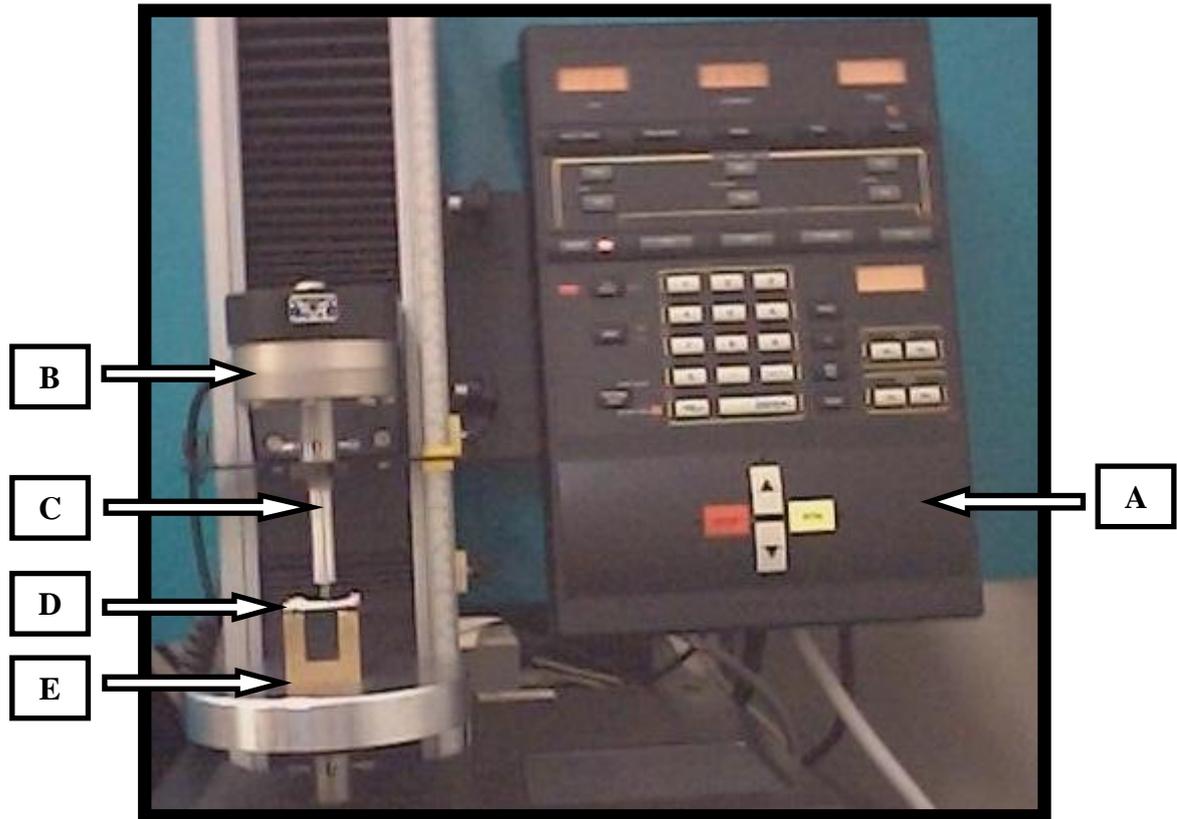
##### **Massa corpórea e medida do comprimento do fêmur direito**

Massa corporal: durante as 12 semanas de tratamento, os animais foram pesados três vezes por semana em dias intercalados.

Comprimento do fêmur direito: as medidas foram realizadas com um paquímetro (precisão de 0,05 mm) seguindo a padronização referencial: região distal dos côndilos femorais (face articular com a tibia) e saliência óssea mais proximal do trocânter maior.

#### **3.5.2 Parâmetros Biomecânicos**

As propriedades biomecânicas foram determinadas por meio do teste de flexão a três pontos, foi utilizada uma máquina de teste universal (Instron, modelo 4444, Canton, Massachusetts, EUA) (Figura 3), com célula de carga de 100 kgf de capacidade máxima. As extremidades dos fêmures foram apoiadas em dois roletes com diâmetro de 3 mm, distanciados em 21,70 mm e a região central (diáfise) dos ossos foi selecionada para a aplicação da carga (ROBLING, TURNER, 2002; SHIMANO, SHIMANO, VOLPON, 2002; AKHTER et al., 2003; AKHTER et al., 2004).



**Figura 3:** Máquina de Ensaio Universal Instron (modelo 4444) utilizada para o ensaio de flexão a três pontos em fêmures de ratos. **A:** painel de controle; **B:** célula de carga ligada à ponte de extensimetria (1 kN); **C:** haste cilíndrica para a aplicação de carga (força); **D:** osso (fêmur de rato); **E:** suporte.

Doze horas antes do início do ensaio, os ossos foram descongelados à temperatura ambiente e mantidos em solução salina até o momento antecedente ao teste (ENGESAETER, EKELAND, LANGELAND, 1978; PENG et al., 1994).

No início do teste, aplicou-se uma pré-carga de 5 N por meio de uma haste cilíndrica com um rolete de 3 mm em sua extremidade, no sentido pósterio-anterior e perpendicular ao eixo longitudinal para acomodação da amostra (estabilização do fêmur). Padronizou-se o tempo de acomodação em um minuto para todas as amostras e após este período, aplicou-se uma força no mesmo sentido, com velocidade constante de 0,5 cm/min, até o momento da fratura do osso.

Os resultados dos ensaios foram registrados pelo software Instron Series IX na forma gráfica, o qual gera uma curva: carga x deformação (Figura 4). Da análise das curvas

obtiveram-se as seguintes propriedades biomecânicas: força máxima (N), resiliência (J), rigidez (N/mm) e força de fratura (N).

### **Força Máxima (N)**

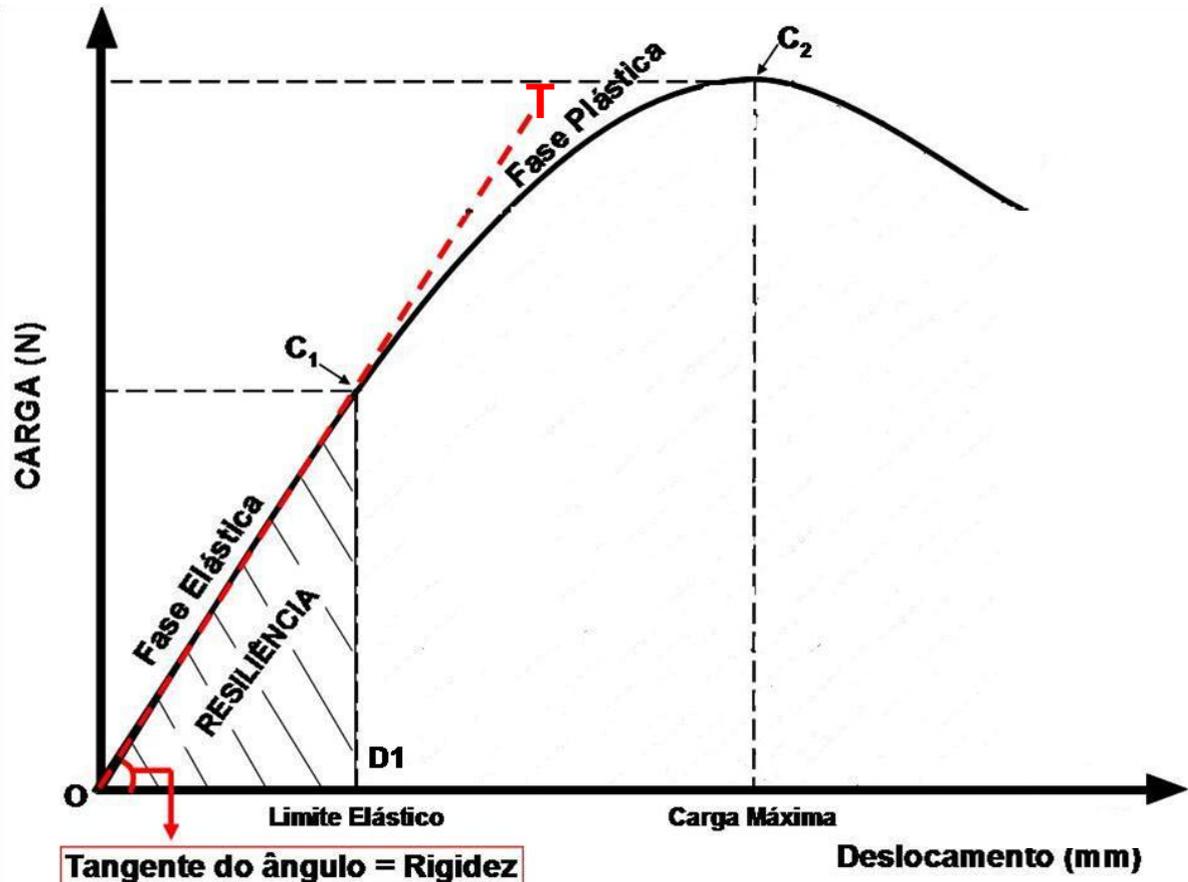
Corresponde a maior carga suportada pela amostra (fêmur) durante o ensaio (C<sub>2</sub>, na figura 4).

### **Resiliência (J)**

Corresponde à área sob a curva carga x deformação até o limite elástico. Representa a energia absorvida pelo tecido ósseo durante a fase elástica, ou seja, o impacto que a amostra suporta sem deformar-se permanentemente.

### **Rigidez (N/mm)**

Determinada por meio da inclinação da reta (T) ajustada aos pontos da curva carga x deformação na fase elástica (SOGAARD et al., 1997). Representa a capacidade de resistir a deformações.



**Figura 4:** Gráfico Carga x Deformação utilizado para determinação das propriedades biomecânicas:  $C_1$ : Carga no Limite Elástico;  $D_1$ : Deformação (deslocamento) no Limite Elástico;  $C_2$ : Carga Máxima;  $O/C_1/D_1$ : a área desta região corresponde a Resiliência (a energia absorvida na fase elástica);  $T$ : tangente da região  $O/C_1$  da curva, sendo o ângulo desta correspondente a Rigidez.

### 3.5.3 Parâmetros Físicos

Após a verificação dos parâmetros biométricos dos fêmures dos animais, mantiveram-se os ossos (imersos em água destilada) em um dessecador por um período de 24 horas tendo como objetivo a retirada do ar presente nos poros ósseos. Em seguida obtiveram-se o peso úmido ( $P_u$ ). Esse dado foi coletado antes do ensaio biomecânico e, após o mesmo, as amostras foram armazenadas em uma estufa na temperatura de  $100^\circ\text{C}$  durante 24 horas com o intuito de desidratação e, posteriormente, obteve-se o peso seco ( $P_s$ ). Para obtenção do peso das cinzas (material mineral -  $P_m$ ), os ossos foram colocados em uma mufla a  $800^\circ\text{C}$  por um

período de 24 horas (NORDSLETTEN et al., 1994). Todas as medidas citadas foram obtidas por meio de uma balança eletrônica (marca Chyo).

Com os valores do  $P_u$ ,  $P_s$  e  $P_m$  foram mensurados os percentuais ósseos de água, material orgânico e material mineral, por meio das fórmulas citadas abaixo (MARTIN, 1990):

$$\text{Percentual Ósseo de Água} = \frac{100 \times (P_u - P_s)}{P_u}$$

$P_u$

$$\text{Percentual Material Orgânico} = \frac{100 \times (P_s - P_m)}{P_u}$$

$P_u$

$$\text{Percentual Material Mineral} = \frac{100 \times P_m}{P_u}$$

$P_u$

Onde:

$P_u$  = peso úmido ósseo

$P_s$  = peso ósseo da amostra desidratada

$P_i$  = peso imerso ósseo

$P_m$  = peso do material mineral (cinzas)

$\rho$  = densidade da água

### 3.5.4 Propriedades Bioquímicas

#### Conteúdo de Cálcio e Fósforo do Fêmur Direito

Com a obtenção do material mineral dos fêmures direitos, realizou-se solubilização em ácido clorídrico 2N. Posteriormente, por meio de ensaio colorimétrico, o conteúdo de cálcio e fósforo dos ossos foram determinados por meio de um kit comercial específico Labtest®.

### 3.5.5 Análise da atividade da MMP-2 por zimografia

Os procedimentos para a determinação da atividade da MMP-2 na tíbia direita foi realizado de acordo com o protocolo estabelecido por Marqueti et al. (2008), que foi adaptado para o presente estudo. Aproximadamente 100mg de tecido ósseo do terço proximal da tíbia direita foi removido e macerado em nitrogênio líquido. A amostra de osso macerado foi incubada 1,5 ml de tampão extração (ácido cacodílico 10 mM, pH 5,0; NaCl 0,15 M; ZnCl<sub>2</sub> 1M; CaCl<sub>2</sub> 20mM; NaN<sub>3</sub> 1,5 mM; Triton X-100 0,01% [v / v]), a 4 °C por 24 horas. Após este período, a solução foi centrifugada por 10 min (13000 g, a 4 °C). Amostras com 10 mg de proteínas totais foram submetidas à eletroforese em gel de policrilanida contendo SDS 10% e gelatina na concentração de 1mg/ml. Após a eletroforese, os géis foram lavados duas vezes em 2,5% de Triton X-100 para remover o SDS e incubados em tampão de substrato (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; CaCl<sub>2</sub> 5 mM; NaN<sub>3</sub> 0,02%) a 37 °C por 20 h. Os géis foram corados com Comassie Blue Brilliant R-250 (Bio-Rad) por 1h30 e descorados com ácido acético: metanol: água (1:4:5, v:v:v), para visualização das bandas de atividade. Os géis foram fotografados com uma câmera Canon G6 Power Shot 7.1 mega pixels e as médias da intensidade da banda foram medidas com o software *Gene Tools*.

### 3.6 Análises Estatísticas

Os dados encontram-se apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e comparados por meio de uma análise de variância (Anova two- way) com o teste *post hoc* de Tukey comparando os fatores idade e treinamento dos diferentes grupos. A análise foi realizada por meio do software SigmaStat 3.5 sendo adotado um nível de significância menor que 5% ( $p < 0,05$ ).

### 3.7 Normas Técnicas Referentes à Elaboração do Trabalho

As referências e citações, bem como a estrutura geral deste trabalho seguem as normas da Universidade Federal de São Carlos/UFSCar versão on-line, acesso em março de 2013.

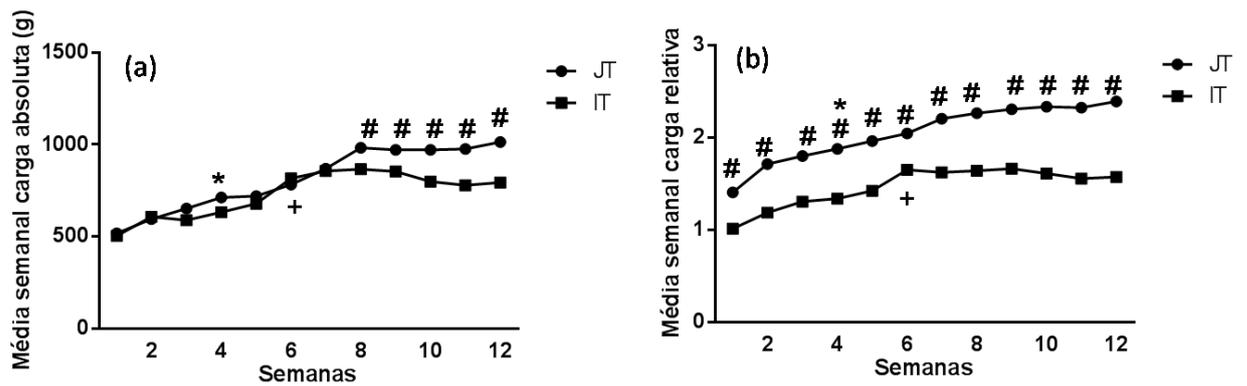
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Carga Absoluta e relativa de treinamento

Na figura 5 encontra-se representada a média semanal dos valores da carga absoluta (a) e relativa (b) de treinamento dos animais dos treinados (JT e IT) durante 12 semanas. A partir da oitava semana de treinamento, a carga de absoluta de treinamento do grupo JT foi maior que a do grupo e IT. A carga de absoluta de treinamento do grupo JT foi maior a partir da quarta semana de treinamento em relação à primeira semana enquanto que, no grupo IT foi maior a partir da sexta semana. A carga relativa de treinamento foi maior no grupo JT desde a primeira semana de treinamento em relação ao grupo IT. A carga de relativa de treinamento

do grupo JT foi maior a partir da quarta semana de treinamento em relação à primeira semana enquanto que no grupo IT foi maior a partir da sexta semana.

A tabela 1 apresenta os valores médios com seus respectivos erros padrões da carga absoluta e relativa.



**Figura 5:** Representação gráfica dos valores da média semanal da carga absoluta (g) (a) e relativa (b) de treinamento. # vs IT; \* diferença estatística no grupo JT a partir da quarta semana em relação à primeira semana; + diferença estatística no grupo IT a partir da sexta semana em relação à primeira semana (ANOVA One-way e teste *post hoc* Bonferroni). JT, Jovem Treinado (n=17); IT, Idoso Treinado (n=15).

**Tabela 1:** Carga absoluta e relativa de treinamento (g) dos animais treinados. JT, Jovem Treinado; IT, Idoso Treinado.

Semanas	Grupos Experimentais			
	JT (17)		IT (15)	
	Parâmetros			
	Carga Absoluta (g)	Carga relativa (g)	Carga Absoluta (g)	Carga Relativa (g)
1ª semana	518,48 ± 29	1,41 ± 0,03 <sup>#</sup>	503,81 ± 28	1,01 ± 0,005
2ª semana	595,26 ± 29,1	1,71 ± 0,005 <sup>#</sup>	608,13 ± 45,5	1,18 ± 0,01
3ª semana	653,33 ± 31	1,80 ± 0,01 <sup>#</sup>	589,33 ± 47,4	1,31 ± 0,02
4ª semana	712,80 ± 37,5 <sup>*</sup>	1,88 ± 0,01 <sup>#*</sup>	632,92 ± 62,5	1,34 ± 0,009
5ª semana	720,33 ± 34,6	1,96 ± 0,007 <sup>#</sup>	678,88 ± 66,6	1,42 ± 0,007
6ª semana	782,79 ± 33	2,04 ± 0,04 <sup>#</sup>	817,14 ± 64,3 <sup>+</sup>	1,65 ± 0,003 <sup>+</sup>
7ª semana	869,45 ± 40	2,20 ± 0,003 <sup>#</sup>	857,03 ± 66,2	1,62 ± 0,002
8ª semana	983,04 ± 44,9 <sup>#</sup>	2,26 ± 0,03 <sup>#</sup>	866,33 ± 64,5	1,64 ± 0,01
9ª semana	971,54 ± 49,5 <sup>#</sup>	2,31 ± 0,01 <sup>#</sup>	854,77 ± 64,6	1,66 ± 0,15
10ª semana	971,54 ± 56,6 <sup>#</sup>	2,33 ± 0,001 <sup>#</sup>	799,55 ± 63,4	1,61 ± 0,003
11ª semana	977,20 ± 53,7 <sup>#</sup>	2,33 ± 0,003 <sup>#</sup>	779,25 ± 68,2	1,55 ± 0,01
12ª semana	1014,78 ± 57 <sup>#</sup>	2,39 ± 0,003 <sup>#</sup>	794,44 ± 62,2	1,57 ± 0,01

Média ± Erro Padrão (EPM); p<0,05: <sup>#</sup> vs IT; \* diferença estatística no grupo JT a partir da quarta semana em relação à primeira semana; <sup>+</sup> diferença estatística no grupo IT a partir da sexta semana em relação à primeira semana; ( ) = n°. animais.

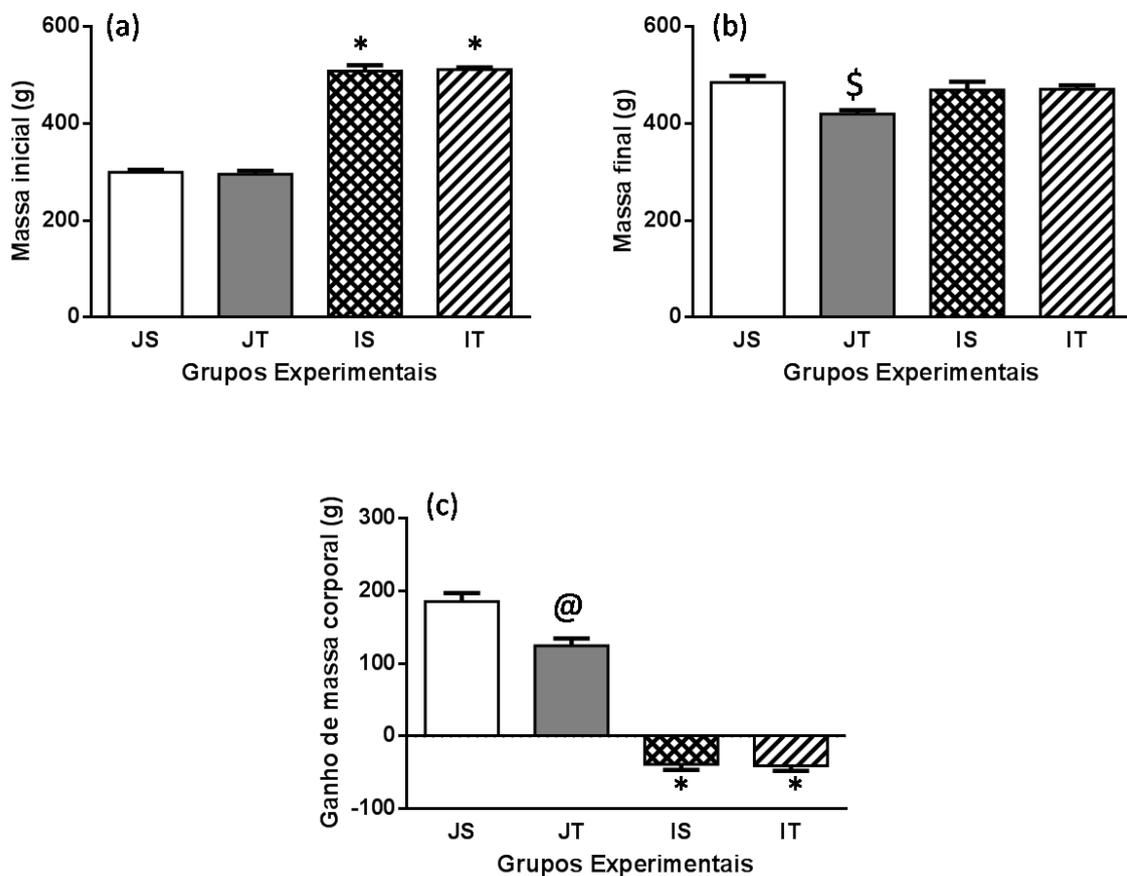
## 4.2 Parâmetros Biométricos

### 4.2.1 Massa Corporal

Os valores da massa corporal inicial, massa final, ganho de massa corporal dos animais dos grupos JS, JT, IS e IT durante as 12 semanas de experimento, encontram-se representados na figura 6. Pode ser observado que a massa corporal inicial dos grupos JS e JT foram menores do que os dos grupos IS e IT. Quanto à massa corporal final, observou-se uma

homogeneidade entre os grupos, exceto o grupo JT que foi menor em relação aos demais grupos. Observa-se que ocorreu um ganho médio de aproximadamente 185g e 124g, respectivamente, nos grupos JS e JT, enquanto que nos grupos IS e IT, respectivamente, ocorreu uma perda média de 38g e 40g.

A tabela 2 apresenta os valores médios com seus respectivos erros padrões da massa corporal inicial, final e ganho de massa dos diferentes grupos experimentais (JS, JT, IS, IT).



**Figura 6:** Representação gráfica dos valores da massa corporal inicial (g) (a), (b) final (g) e (c) ganho de massa corporal ( $\Delta$ = massa final - massa inicial) (g). Os valores são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média,  $p < 0,05$ . \* vs JS e JT, \$ vs JS, IS e IT; @ vs JS, IS e IT (ANOVA two-way e teste *post hoc* Tukey). JS, Jovem Sedentário (n=16); JT, Jovem Treinado (n=17); IS, Idoso Sedentário (n=14); IT, Idoso Treinado (n=15).

**Tabela 2:** Massa corporal inicial, final e ganho de massa ( $\Delta$  massa) em gramas (g). JS, Jovem Sedentário; JT, Jovem Treinado; IS, Idoso Sedentário; IT, Idoso Treinado.

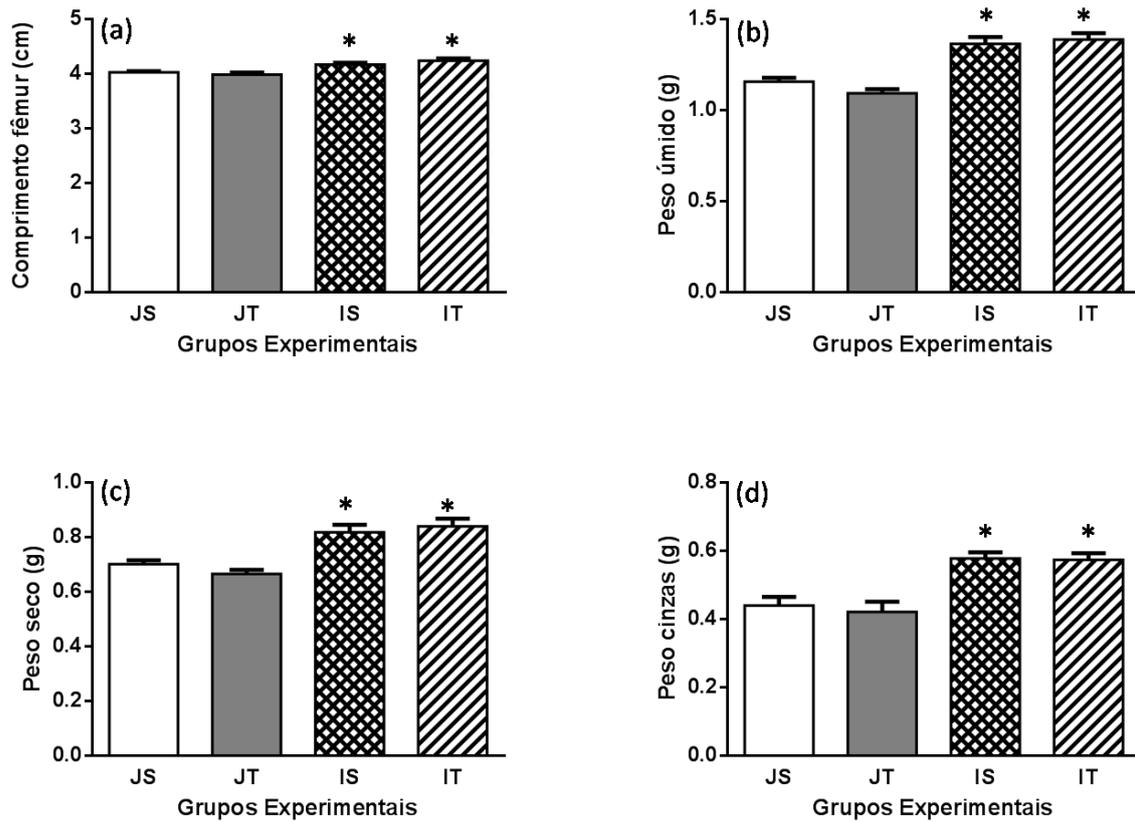
Parâmetros	Grupos Experimentais			
	JS (16)	JT (17)	IS (14)	IT (15)
Massa inicial (g)	299 $\pm$ 5,44	301 $\pm$ 6,95	507 $\pm$ 12,62 *	508 $\pm$ 4,61 *
Massa final (g)	484 $\pm$ 15,40	414 $\pm$ 6,59 <sup>s</sup>	469 $\pm$ 17,34	469 $\pm$ 8,70
$\Delta$ massa (g)	185 $\pm$ 12,75	113 $\pm$ 8,25 <sup>@</sup>	-38 $\pm$ 8,11 *	-39 $\pm$ 7,70 *

Média  $\pm$  Erro Padrão (EPM);  $p < 0,05$ : \* vs JS e JT, <sup>s</sup> vs JS, IS e IT; <sup>@</sup> vs JS, IS e IT; ( ) = n°. animais.

#### 4.2.2 Análise do Fêmur Direito

A figura 7 expressa os valores do comprimento e peso úmido, imerso, seco e das cinzas dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais (JS, JT, IS e IT). Houve um aumento de todos os parâmetros nos grupos idosos (IS e IT) quando comparados com os grupos jovens (JS e JT).

A tabela 3 apresenta os valores médios com os respectivos erros padrões, dos parâmetros descritos acima.



**Figura 7:** Representação gráfica dos valores de comprimento (a) (em cm), peso úmido (b), seco (c) e das cinzas (d) (em g) dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais. Os valores são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. \* vs JS e JT (ANOVA two-way e teste *post hoc* Tukey). JS, Jovem Sedentário (n=8); JT, Jovem Treinado (n=9); IS, Idoso Sedentário (n=8); IT, Idoso Treinado (n=9).

**Tabela 3:** Comprimento (em cm) e pesos úmido, seco e das cinzas em gramas (g), dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais. JS, Jovem Sedentário; JT, Jovem Treinado; IS, Idoso Sedentário; IT, Idoso Treinado. JS, Jovem Sedentário; JT, Jovem Treinado; IS, Idoso Sedentário; IT, Idoso Treinado.

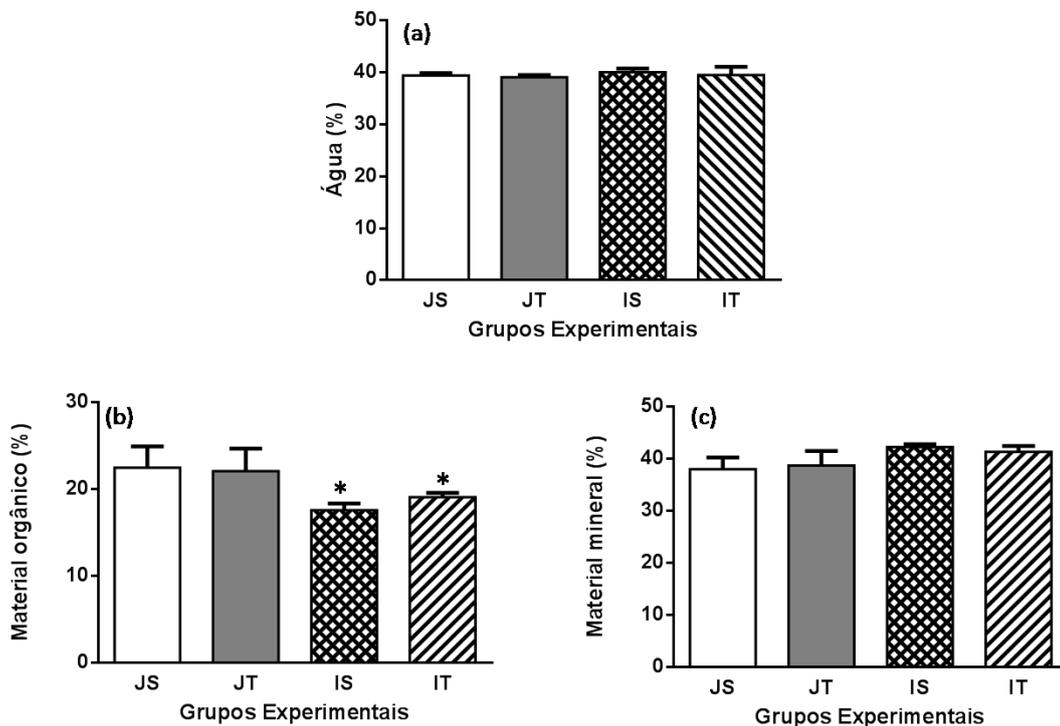
Parâmetros	Grupos Experimentais			
	JS (8)	JT (9)	IS (8)	IT (9)
Comprimento (cm)	4,03 $\pm$ 0,01	3,99 $\pm$ 0,03	4,17 $\pm$ 0,03*	4,24 $\pm$ 0,53*
Peso Úmido (g)	1,16 $\pm$ 0,02	1,11 $\pm$ 0,03	1,37 $\pm$ 0,03*	1,40 $\pm$ 0,03*
Peso Seco (g)	0,70 $\pm$ 0,01	0,67 $\pm$ 0,02	0,81 $\pm$ 0,02*	0,83 $\pm$ 0,02*
Peso das Cinzas (g)	0,49 $\pm$ 0,03	0,43 $\pm$ 0,02	0,57 $\pm$ 0,01*	0,57 $\pm$ 0,02*

Média  $\pm$  Erro Padrão (EPM);  $p < 0,05$ : \* vs JS e JT; ( ) = n<sup>o</sup>. animais.

### 4.3 Parâmetros Físicos

Na figura 8 encontram-se representados os resultados de porcentagem de água, de material orgânico e de material mineral do fêmur direito dos animais dos diferentes grupos experimentais (JS, JT, IS e IT). Nenhuma diferença foi encontrada em relação aos parâmetros físicos porcentagem de água e de material mineral. Entretanto, houve diferença estatística entre os grupos IS e IT em relação aos grupos JS e JT, que apresentaram diminuição da porcentagem de material orgânico.

A tabela 4 apresenta os valores médios com os respectivos erros padrões, dos parâmetros descritos acima.



**Figura 8:** Representação gráfica da análise biofísica do fêmur direito: (a) Água (%), (b) material orgânico (%) e (c) material mineral (%). Os valores são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. \* vs JS e JT (ANOVA two-way e teste *post hoc* Tukey). JS, Jovem Sedentário (n=8); JT, Jovem Treinado (n=9); IS, Idoso Sedentário (n=8); IT, Idoso Treinado (n=9).

**Tabela 4:** Porcentual de água, material orgânico e mineral dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais. Controle. JS, Jovem Sedentário; JT, Jovem Treinado; IS, Idoso Sedentário; IT, Idoso Treinado.

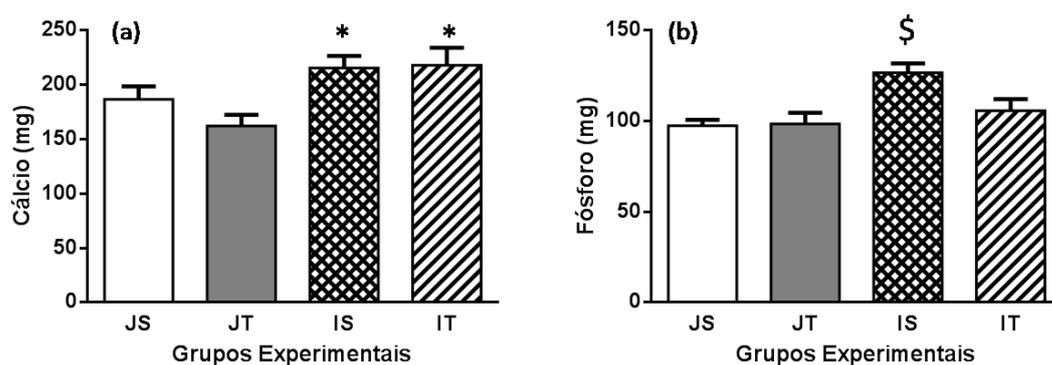
Parâmetros	Grupos Experimentais			
	JS (8)	JT (9)	IS (8)	JT (9)
Água no Osso (%)	38,86 ± 0,37	39,40 ± 0,47	40,46 ± 0,75	40,35 ± 1,67
Material Orgânico (%)	18,62 ± 2,25	20,99 ± 1,83	17,63 ± 0,69	18,86 ± 0,45
Material Mineral (%)	42,30 ± 2,32	39,59 ± 1,93	41,89 ± 0,62	40,78 ± 1,27

Média ± Erro Padrão (EPM); p<0,05; ( ) = nº. animais.

#### 4.4 Análise Bioquímica

Os resultados bioquímicos do fêmur direito estão representados na figura 9, mensurados por meio de colorimétrico das cinzas dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais (JS, JT, IS, e IT). Os animais idosos apresentaram maior conteúdo de cálcio no fêmur direito do que os animais jovens. Os animais do grupo IS apresentaram maior conteúdo de fósforo do que os demais grupos experimentais.

A tabela 5 apresenta os valores médios com os respectivos erros padrões, dos parâmetros descritos acima.



**Figura 9:** Representação gráfica da análise bioquímica do fêmur direito: (a) conteúdo de cálcio (mg) e (b) fósforo (mg). Os valores estão representados como média  $\pm$  erro padrão da média,  $p < 0,05$ . \* vs JS e JT; § vs todos os grupos experimentais (ANOVA two-way e teste *post hoc* Tukey). JS, Jovem Sedentário (n=8); JT, Jovem Treinado (n=9); IS, Idoso Sedentário (n=8); IT, Idoso Treinado (n=9).

**Tabela 5:** Conteúdo de cálcio e fósforo dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais. JS, Jovem Sedentário; JT, Jovem Treinado; IS, Idoso Sedentário; IT, Idoso Treinado.

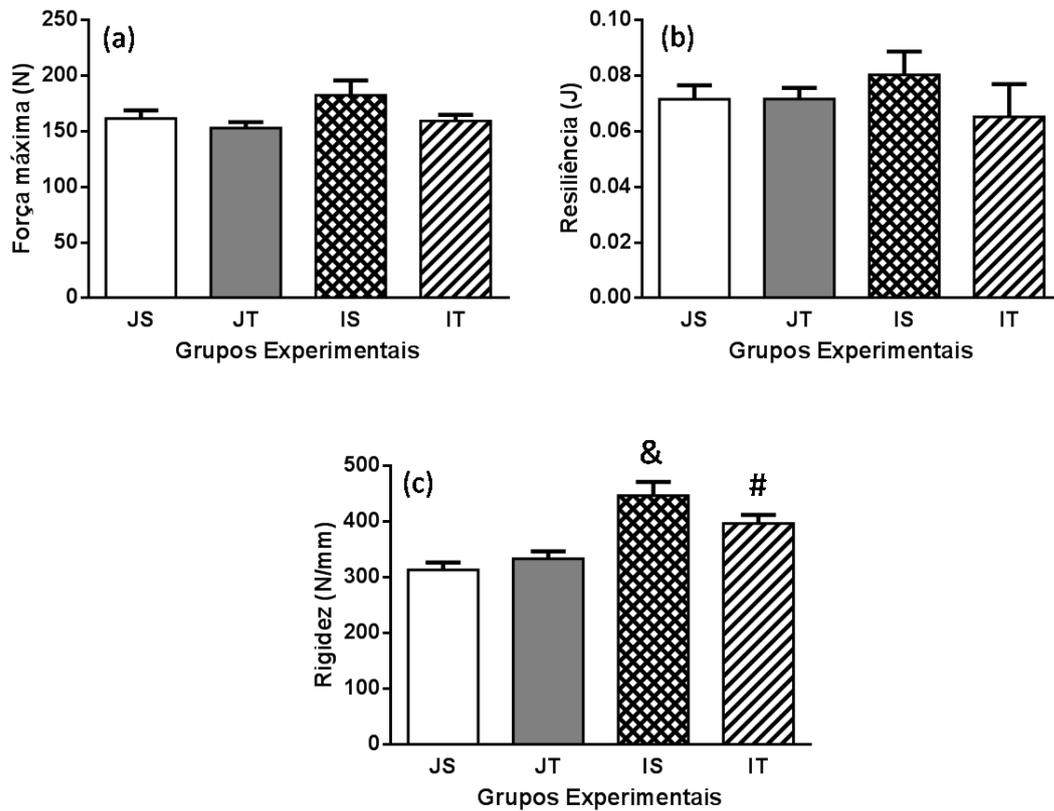
Parâmetros	Grupos Experimentais			
	JS (8)	JT (9)	IS (8)	IT (9)
Cálcio Ósseo (mg)	183,86 $\pm$ 9,61	160,40 $\pm$ 9,84	212,56 $\pm$ 10,95 *	213,94 $\pm$ 15,53 *
Fósforo Ósseo (mg)	97,57 $\pm$ 3,28	98,51 $\pm$ 5,85	126,64 $\pm$ 4,81 §	105,79 $\pm$ 6,04

Média  $\pm$  Erro Padrão (EPM);  $p < 0,05$ : \* vs JS e JT; § vs todos os grupos experimentais; ( ) = n<sup>o</sup>. animais.

#### 4.5 Parâmetros Biomecânicos

Os resultados biomecânicos, mensurados por meio do ensaio biomecânico, do fêmur direito dos animais dos diferentes grupos experimentais (JS, JT, IS e IT) encontram-se representados na figura 10. Foi observado que não ocorreu diferença estatística entre os grupos experimentais em relação à força máxima e resiliência. Entretanto, ocorreu aumento da rigidez nos grupos IS e IT em relação aos grupos JS e JT.

A tabela 6 apresenta os valores médios com os respectivos erros padrões, dos parâmetros descritos acima.



**Figura 10:** Representação gráfica da análise biomecânica do fêmur direito: (a) força máxima (N), (b) resiliência (J) e (c) Rigidez (N/mm). Os valores são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média,  $p < 0,05$ . <sup>&</sup> vs JS, JT e IT; <sup>#</sup> vs JS, JT e IS (ANOVA two-way e teste *post hoc* Tukey). JS, Jovem Sedentário (n=8); JT, Jovem Treinado (n=9); IS, Idoso Sedentário (n=8); IT, Idoso Treinado (n=9).

**Tabela 6:** Parâmetros biomecânicos: Força Máxima (N), Resiliência (J) e Rigidez (N/mm) dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais. JS, Jovem Sedentário; JT, Jovem Treinado; IS, Idoso Sedentário; IT, Idoso Treinado.

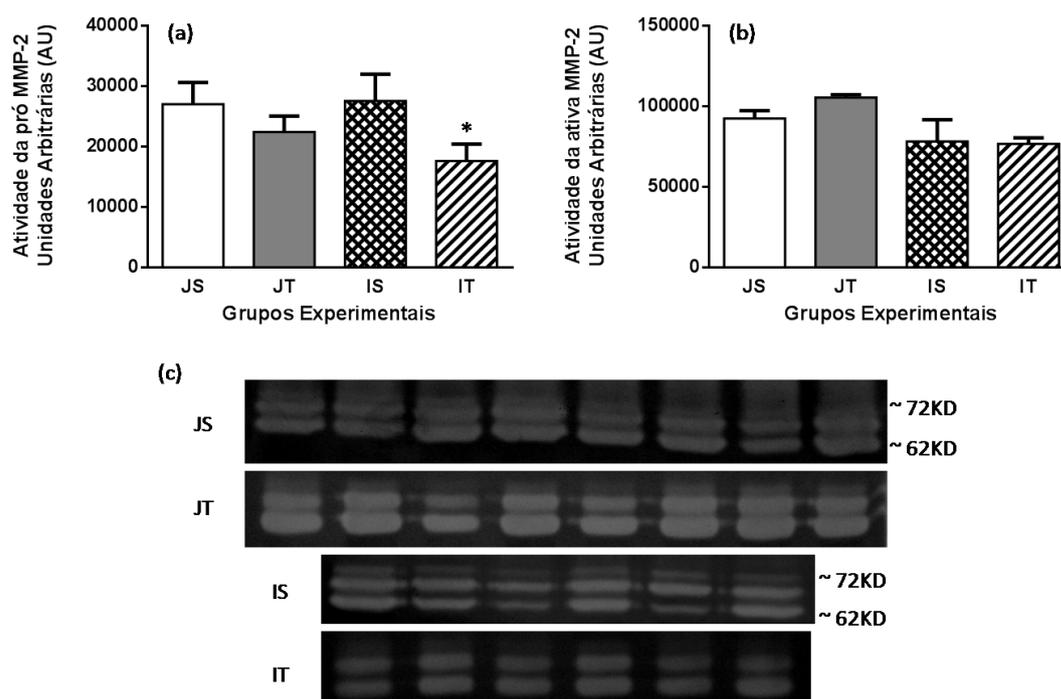
Parâmetros	Grupos Experimentais			
	JS (8)	JT (9)	IS (8)	IT (9)
Força Máxima (N)	165,7 $\pm$ 7,13	153,63 $\pm$ 5,12	179,93 $\pm$ 12,10	167,01 $\pm$ 10,13
Resiliência (J)	0,06 $\pm$ 0,003	0,06 $\pm$ 0,003	0,07 $\pm$ 0,007	0,07 $\pm$ 0,03
Rigidez (N/mm)	339,86 $\pm$ 14,09	340,85 $\pm$ 11,95	436,48 $\pm$ 24,08 <sup>&amp;</sup>	408,05 $\pm$ 20,90 <sup>#</sup>

Média  $\pm$  Erro Padrão (EPM);  $p < 0,05$ : <sup>&</sup> vs JS, JT e IT; <sup>#</sup> vs JS, JT e IS; ( ) = n°. animais.

#### 4.6 Análise da atividade da MMP-2 por zimografia

Na Figura 11 encontram-se representados os resultados da atividade de MMP-2, em suas isoformas pró e ativa, das tíbias direitas, mensurados por zimografia, das tíbias direitas dos animais dos diferentes grupos experimentais (JS, JT, IS e IT). No grupo IT houve diminuição da atividade da pró MMP-2 quando comparada com os outros grupos. Não ocorreu diferença estatística da atividade da MMP-2 ativa entre os grupos experimentais.

A tabela 7 apresenta os valores médios com os respectivos erros padrões, das mensurações descritas acima.



**Figura 11:** Representação esquemática da atividade da pró MMP-2 (a) e da MMP-2 ativa (b) da tíbia direita obtidas por zimografia (c). Os valores estão representados como média  $\pm$  erro padrão da média,  $p < 0,05$ . \* vs outros grupos experimentais (ANOVA two-way e teste *post hoc* Tukey). JS, Jovem Sedentário (n=8); JT, Jovem Treinado (n=8); IS, Idoso Sedentário (n=6); IT, Idoso Treinado (n=6).

**Tabela 7:** Atividade da pró MMP-2 e da MMP-2 ativa das tíbias direitas obtidas por zimografia dos animais dos diferentes grupos experimentais. JS, Jovem Sedentário; JT, Jovem Treinado; IS, Idoso Sedentário; IT, Idoso Treinado.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	JS (8)	JT (8)	IS (6)	IT (6)
Pró MMP-2 (UA)	27074,18 ± 3609,47	22489,91 ± 2632,90	27613,38 ± 4434,87	17693,47 ± 2773,25 *
MMP-ativa (UA)	92670,26 ± 4924,75	105730,3 ± 1727,77	78424,97 ± 13573,69	76964,76 ± 3727,973

Média ± Erro Padrão (EPM); p<0,05: \* vs outros grupos experimentais; ( ) = n°. animais.

## 5 DISCUSSÃO

Nosso trabalho foi pioneiro ao analisar os efeitos do treinamento resistido (protocolo de treinamento em escada) em ratos idosos, comparar a carga de carregamento (absoluta e relativa) entre ratos treinados (JT e IT), propriedades biomecânicas, biofísicas, bioquímicas e atividade das MMPs em ossos de ratos jovens e idosos.

A massa corporal de ratos e de humanos aumenta durante a maior parte do período de desenvolvimento. Os ratos adultos jovens são magros, com pouca gordura, a maior parte intra-abdominal. À medida que envelhecem, ocorre aumento da massa magra e gorda até o final da meia idade e velhice precoce. A massa gorda continua a acumular-se ao longo do tempo de vida, tanto a subcutânea como a visceral. Os animais em envelhecimento possuem uma maior proporção da massa de gordura periférica. Depois da meia idade, a massa muscular esquelética começa a declinar, desenvolvendo sarcopenia ao atingir a senescência. Por fim, na velhice, as massas corporais começam a diminuir, e tanto a massa gorda como a magra diminuem. (ST-ONGE, 2005; WOLDEN-HANSON, 2010).

O treinamento resistido de alta intensidade diminui o teor de lipídios no fígado, músculos sóleo e tibial anterior, além de diminuir os depósitos de gordura (mesentérica e retroperitoneal) (LEITE et al., 2009).

A massa corporal e a tensão muscular são variáveis importantes, pois exercem estresse mecânico sobre os ossos e contribuem para o ganho de massa óssea (KSIEZOPOLSKA-ORŁOWSKA, 2010).

No presente estudo, a massa corporal dos animais jovens aumentou, e ao final do experimento os animais do grupo JT tiveram ganho de massa corporal menor em relação aos jovens sedentários, possivelmente o treinamento de alta intensidade diminuiu a massa gorda desses animais. Ao final do experimento, os animais idosos, com 21 meses de idade, apresentaram diminuição da massa corporal para valores semelhantes aos dos animais jovens. A perda de massa corpórea do grupo IS pode ter ocorrido por uma perda de massa magra não compensada pelo acúmulo de massa gorda, enquanto que no grupo IT a redução da massa corporal pode ter ocorrido devido à possível perda de massa gorda (ST-ONGE, 2005; WOLDEN-HANSON, 2010; LEITE et al., 2009).

Com o envelhecimento há um relativo declínio da força e massa muscular (BAUMGARTNER et al., 2004), com perda preferencial para as fibras do tipo II, (MARCELL, 2003), além da elevação da massa gorda (BAUMGARTNER et al., 1995; GALLAGHER et al., 1997; SCHULTZ et al., 2002), fatores que podem criar um ambiente ideal para o catabolismo muscular, declínio da função física, exaustão, lentidão e fraqueza nos indivíduos. Os principais mecanismos fisiológicos influentes que podem levar ao prejuízo funcional e incapacidade muscular incluem: diminuição do número de fibras, densidade e qualidade muscular, declínio dos níveis hormonais, aumento de gordura intramuscular, inflamação, estresse oxidativo, aspectos psicossociais, desenvolvimento de dor articular e comportamento sedentários (VINCENT et al., 2012).

Baseado na literatura, os animais jovens possuem maior massa corporal, e maior massa muscular, quando comparados aos animais idosos conseqüentemente, eles conseguem carregar uma maior carga. Nos idosos, o processo de envelhecimento contribui para a

diminuição da massa muscular, em específico fibras do tipo II, o que diminui a força dos animais, e assim carregariam menor carga em relação aos jovens (ST-ONGE, 2005; WOLDEN-HANSON, 2010; BAUMGARTNER et al., 2004; BAUMGARTNER et al., 2004).

Shiguemoto et al. (2012) analisaram tíbias direitas, e Prestes et al. (2009) analisaram diferentes grupos musculares, ambos utilizaram ratas Wistar ovariectomizadas (aproximadamente 3 meses de idade) e com o mesmo protocolo de treinamento do presente estudo, observaram que os grupos treinados (íntactas e ovariectomizadas) tiveram aumento semelhante da carga de carregamento após a sexta e décima segunda (em comparação com a primeira semana) e após a décima segunda semana (em comparação com a sexta semana). No presente estudo, os resultados da carga de carregamento do grupo IT foram similares aos de Shiguemoto et al. (2012) e Prestes et al. (2009), tendo o aumento após a sexta semana de treinamento (em comparação com a primeira semana). Entretanto, no grupo JT os resultados foram conflitantes, pois aumento da carga de carregamento ocorreu após a quarta semana de treinamento (em comparação com a primeira semana).

O comprimento do fêmur foi maior nos animais idosos, com valores semelhantes nos dois grupos (IS e IT). Isto se deve ao crescimento ósseo longitudinal (LOVERIDGE, 1999; DE BAAT, HEIJBOER, DE BAAT, 2005; GRABOWSKI, 2009), e o treinamento não influenciou este crescimento.

Com o crescimento ósseo longitudinal, o volume ósseo aumenta. Assim, os animais idosos (IS e IT) apresentaram maior conteúdo de cálcio do que os animais jovens. E, os animais do grupo IS apresentaram maior conteúdo de fósforo, e o treinamento não modificou estes parâmetros bioquímicos. Estes resultados estão de acordo com os obtidos de porcentagem mineral, e apesar de não significante eles mostraram tendência de serem maiores nos animais idosos. Este conteúdo ósseo maior de minerais explicaria o aumento da rigidez

dos fêmures dos animais idosos (IS e IT) em relação aos dos animais jovens (JS e JT). Entretanto, o treinamento promoveu diminuição da rigidez óssea nos animais do grupo IT, mas não nos animais jovens. A região mineralizada do osso controla a rigidez e estudos indicaram que a composição relativa dos minerais é deslocada pelo exercício em favor da região óssea mais mineralizada promovendo aumento da rigidez (ISAKSSON et al., 2009). Possivelmente em nosso estudo o protocolo de treinamento utilizado não foi capaz de promover estímulo suficiente para aumentar a rigidez nos animais IT.

Raab et al. (1990), utilizaram ratas Fischer 344 jovens (2,5 meses de idade) e idosas (25 meses de idade), com um protocolo de treinamento em esteira e analisou o fêmur direito encontrou dados similares com diferenças relacionadas à idade JS + JT versus IS + IT em relação à massa corporal e comprimento do fêmur. Por outro lado, Beyer et al. (1985) analisaram fêmures, e encontraram aumento do cálcio quando realizaram treinamento em esteira com ratos idosos *Sprague Dawley* (26 meses de idade), com um declínio nos animais sedentários. Shiguemoto et al. (2012) encontraram aumento da rigidez óssea nos animais treinados em relação aos sedentários. A discrepância de resultados relacionados ao cálcio encontrados por Beyer et al. (1985) pode ter ocorrido pelo fato do estudo utilizar espécies de ratos diferentes, com maior idade (26 meses) e protocolo de treinamento diferente em relação ao presente estudo. Enquanto que, os resultados divergentes da rigidez encontrados por Shiguemoto et al. (2012) possivelmente ocorreram pela menor idade e massa corporal dos animais, tipo de osso analisado, sexo e ovariectomia.

O aumento da atividade de MMPs é um indicativo de remodelamento da matriz necessária para o crescimento do tecido (PAGE-MCCAW et al., 2007). Com o envelhecimento, o turnover do colágeno (BAILEY, PAUL, KNOTT, 1998), os níveis de expressão de MMPs e suas atividades enzimáticas são reduzidos (BIRCH et al., 2008).

Em nosso estudo, o treinamento promoveu redução da atividade da pro MMP-2 (tendência no grupo JT e uma redução no grupo IT) nas tíbias dos animais jovens e idosos, e nenhum efeito da idade foi observado. Em relação à atividade da MMP-2 ativa, observou-se uma tendência de redução nos grupos idosos (IS e IT), que estariam de acordo com o observado por Birch et al., 2008, sem efeito do treinamento. Assim, provavelmente o treinamento teria inibido a síntese da pró-MMP-2 nos animais idosos, mas não sua conversão à forma ativa. Isto estaria em desacordo com os dados obtidos de porcentagem óssea de material orgânico, em que os grupos idosos apresentaram menores valores (IS e IT). Estes resultados indicam que outras MMPs, que não a MMP-2, seriam mais importantes no tecido ósseo (MMP-9).

Outro fato a ser considerado é que a MMP-2 é uma gelatinase que é expressa de forma constitutiva. Possui um domínio chamado de “*fibronectin like*”, que é responsável pelo reconhecimento do colágeno tipo I, IV, V, VII e X, gelatina (colágeno desnaturado), laminina e elastina<sup>23</sup>. A pró-MMP-2 (72 KDa) é processada por ação combinada da MMP-14 e do TIMP-2 a uma forma enzimaticamente ativa (64 KDa). Entretanto, o estresse oxidativo aumentado e a ação do peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) podem ativar a pró-MMP-2 sem remover o pró-peptídeo auto-inibitório, mantendo o mesmo peso molecular da forma inativa (72 KDa) (SCHULZ, 2007; CASTRO et al., 2009; KANDASAMY et al., 2010; LUCCHETTI et al., 2010; CASTRO et al., 2012; MESCHIARI, 2013). Com o envelhecimento há um acúmulo de radicais livres (ALMEIDA et al., 2007; ALMEIDA et al., 2010; MANOLAGAS, 2010; KOUSTENI, 2011) entretanto, o exercício resistido pode reduzir o estresse oxidativo (PARISE et al., 2005; VINCENT, BOURGUIGNON, VINCENT, 2006). Fatos que podem ajudar a compreender a redução da atividade da pro MMP-2 (tendência no grupo JT e uma redução no grupo IT) do presente estudo. Pois o exercício resistido pode aumentar, através de um mecanismo de *up-regulation*, enzimas antioxidantes tais como, a superóxido dismutase

(Cu-Zn isoforma), que pode eliminar os radicais livres, e a catalase que pode reduzir os peróxidos (PARISE et al., 2005).

O teste biomecânico neste estudo mostrou aumento da rigidez nos ossos dos animais idosos, e o treinamento modificou este parâmetro. Não foram observadas diferenças da resiliência e da força máxima entre os diferentes grupos experimentais, o que indica a não influência da idade e do treinamento.

Shiguemoto et al. (2012) mostraram aumento tanto da pró como da MMP-2 ativa nos ossos dos animais treinados em relação aos sedentários. Estes autores observaram força máxima maior quando submeteram os ossos dos animais treinados ao teste biomecânico. Os resultados divergentes encontrados por Shiguemoto et al. (2012) em relação ao nosso estudo possivelmente ocorreram pela menor idade e massa corporal dos animais, tipo de osso analisado, sexo e ovariectomia.

Raab et al. (1990), submetendo ossos ao mesmo teste biomecânico, encontraram aumento da força máxima correlacionada com a idade (JS e JT maior que IS e IT) e com o treinamento (JT e IT maior que IS e IT). Sogaard et al. (1994), realizaram treinamento de ratas Fischer com 2 e 6 meses de idade em esteira e avaliaram o fêmur esquerdo, encontraram diferenças entre jovens sedentárias e treinadas (aumento com o treinamento), mas nenhuma diferença entre adultas sedentárias e treinadas analisaram força máxima e rigidez no teste biomecânico.

Hornberger e Farrar (2004), utilizaram um protocolo de treinamento em escada por um período de 8 semanas, analisaram os seguintes grupos musculares: sóleo, plantar, flexor longo do hálux, gastrocnêmio e quadríceps. Estes autores observaram hipertrofia apenas do músculo flexor longo do hálux, e nenhuma alteração nos demais grupos musculares analisados. A condição muscular determina, com grande correlação, a condição óssea. Os ossos, assim como os músculos, tendem a se tornar mais fortes e resistentes quanto mais forem usados e

exercitados, obedecendo a certos limites (BAILEY, BROOKE-WAVELL, 2010). Provavelmente, devido à semelhança dos protocolos de treinamento (escada) utilizada neste estudo e no de Hornberger e Farrar (2004), a musculatura exercitada pelos animais foram semelhantes. Tal musculatura não afetaria o tecido ósseo analisado neste estudo, explicando a não influência do treinamento sobre a biomecânica dos ossos analisados.

Dependendo da espécie animal, idade, duração, intensidade e tipo de treinamento, vários experimentos têm mostrado maior, menor, ou nenhuma diferença sobre o tecido ósseo (RAAB et al., 1990; HAGIHARA et al., 2005; JÄRVINEN, 2003).

## 6 CONCLUSÕES

### **Efeito do envelhecimento em ossos de ratos:**

- Com o envelhecimento ocorreu diferenças da carga de carregamento:
  - ❖ Absoluta: JT aumento a partir da quarta semana (em comparação com a primeira semana), IT aumento a partir da sexta semana (em comparação com a primeira semana) e JT maior que IT a partir da oitava semana.
  - ❖ Relativa: JT aumento a partir da quarta semana (em comparação com a primeira semana), IT aumento a partir da sexta semana (em comparação com a primeira semana) e JT foi maior que IT a partir da primeira semana de treinamento.
- Nenhum efeito foi observado na atividade da pro MMP-2 nos grupos experimentais. Em relação à atividade da MMP-2 ativa, observou-se uma tendência de redução nos grupos idosos (IS e IT).
- Em relação à massa corporal:
  - ❖ Ocorreu um aumento nos jovens.
  - ❖ Maior massa inicial e diminuição da massa final nos idosos.

- Observamos um aumento (fêmures direitos):
  - ❖ Comprimento dos animais idosos.
  - ❖ Da rigidez dos animais idosos.
  - ❖ Do material mineral [cálcio (IS e IT) e fósforo (IS)].
- Diminuição do material orgânico dos fêmures direitos dos animais idosos.

**Efeito do treinamento resistido em ossos de ratos:**

- Diminuição da massa corporal dos animais JT.
- Redução da rigidez óssea e da atividade da pró MMP-2 no grupo IT .
- Em relação à atividade da MMP-2 ativa, propriedades biomecânicas (resiliência e força máxima), biofísicas e bioquímicas não foram encontrados efeitos do treinamento.

No presente estudo, o protocolo de treinamento não promoveu efeito sobre o tecido ósseo escolhido para análise.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIMES, R.T.; QUIGLEY, J.P. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase: inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. **J Biol Chem.**, 270:5872–5876, 1995.

AIRES, M. M. **Fisiologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p.1251, 2008.

AKHTER, M. P.; IWANIEC, U.T.; HAYNATZKI, G.R.; FUNG, Y.K.; CULLEN, D.M.; RECKER, R.R. Effects of nicotine on bone mass and strength in aged female rats. **Journal Orthopedic Research**, v. 1, n. 21, p. 14-19, 2003.

AKHTER, M.P.; WELLS, D.J.; SHORT, S.J.; CULLEN, D.M.; JOHNSON, M.L.; HAYNATZKI, G.R.; BABIJ, P.; ALLEN, K.M.; YAWORSKY, P.J.; BEX, F.; RECKER, R.R. Bone biomechanical properties in LRP5 mutant mice. **Bone**, v. 35, n. 1, p. 162-169, july 2004.

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

ALMEIDA, M.; HAN, L.; MARTIN-MILLAN, M.; PLOTKIN, L.I.; STEWART, S.A.; ROBERSON, P.K.; KOUSTENI, S.; O'BRIEN, C.A.; BELLIDO, T.; PARFITT, A.M.; WEINSTEIN, R.S.; JILKA, R.L.; MANOLAGAS, S.C. Skeletal involution by age-associated

oxidative stress and its acceleration by loss of sex steroids. **Biol Chem.**, Sep 14; 282(37):27285-97, 2007.

ALMEIDA, M.; HAN, L.; AMBROGINI, E.; BARTELL, S.M.; MANOLAGAS, S.C. Oxidative stress stimulates apoptosis and activates NF-kappaB in osteoblastic cells via a PKCbeta/p66shc signaling cascade: counter regulation by estrogens or androgens. **Mol Endocrinol**, Oct;24 (10):2030-7, 2010.

ALONSO-BOUZON, C.; DUQUE, G. Senile osteoporosis: an update. **Rev Esp Geriatr Gerontol.**, 46(4):223-9, 2011.

AMBROGINI, E.; ALMEIDA, M.; MARTIN-MILLAN, M.; PAIK, J.H.; DEPINHO, R.A.; HAN, L.; GOELLNER, J.; WEINSTEIN, R.S; JILKA, R.L.; O'BRIEN, C.A.; MANOLAGAS, S.C. FoxO-mediated defense against oxidative stress in osteoblasts is indispensable for skeletal homeostasis in mice. **Cell Metab.**, 11, 136–146, 2010.

ARMAS, L.A.; HEANEY, R.P. Vitamin D: the iceberg nutrient. **J Ren Nutr.**, 21(2): 134-9, 2011.

AZRIA, M. Las Calcitoninas. **Fisiología y Farmacología**. España: Ediciones Mayo, 154p, 1989.

BAILEY, A.J.; PAUL, R.G.; KNOTT, L. Mechanisms of maturation and ageing of collagen. **Mech Ageing Dev.**, 106:1–56, 1998.

BAILEY, C.A.; BROOKE-WAVELL, K. Exercise for optimising peak bone mass in women. **Proc Nutr Soc**, 67(1):9-18, 2008.

BAILEY, C.A.; BROOKE-WAVELL, K. Optimum frequency of exercise for bone health: randomised controlled trial of a high-impact unilateral intervention. **Bone**, 46(4):1043-9, 2010.

BANSE, X.; DEVOGELAER, J.P.; LAFOSSE, A.; SIMS, T.J.; GRYPAS, M.; BAILEY, A.J. Crosslink profile of bone collagen correlates with structural organization of trabeculae. **Bone**, 31, 70–76, 2002.

BARONCELLI, G.I.; SAGGESE, G. Critical ages and stages of puberty in the accumulation of spinal and femoral bone mass: the validity of bone mass measurements. **Horm Res**, 54 Suppl 1:2-8, 2000.

BARTL, C.; BARTL, R. Secondary osteoporosis: pathogenesis, types, diagnostics and therapy. **Radiologe**, 51(4): 307-24; 2011.

BAUMGARTNER, R.N.; STAUBER, P.M.; MCHUGH, D.; KOEHLER, K.M.; GARRY, P.J. Crosssectional age differences in body composition in persons 60+ years of age. **J. Geront. A: Biol. Sci. Med. Sci.**, 50, M307–M316, 1995.

BAUMGARTNER, R.N.; WAYNE, S.J.; WATERS, D.L.; JANSSEN, I.; GALLAGHER, D.; MORLEY, J.E. Sarcopenic obesity predicts instrumental activities of daily living disability in the elderly. **Obes. Res.**, 12, 1995–2004, 2004.

BEAN, A. O guia completo de treinamento de força. **São Paulo: Manole**, 1999.

BENTON, M.J.; WHITE, A. Osteoporosis: recommendations for resistance exercise and supplementation with calcium and vitamin D to promote bone health. **J Community Health Nurs**, 23(4):201-11, 2006.

BERGLUND, M.; AKESSON, A.; BJELLERUP, P.; VAHTER, M. Metal-bone interactions. **Toxicology Letters**, v. 112-113, p. 219-225, 2000.

BEYER, R.E.; HUANG, J.C.; WILSHIRE, G.B. The effect of endurance exercise on bone dimensions, collagen, and calcium in the aged male rat. **Exp Gerontol**, 20(6): 315-23, 1985.

BILEZIKIAN, J.P.; RAISZ, L.G.; RODAN, G.A. Principles of bone biology. **Academic Press.**, capítulo 1, p. 11-13, 1996.

BIRCH, H.L.; WORBOYS, S.; EISSA, S.; JACKSON, B.; STRASSBURG, S.; CLEGG, P.D. Matrix metabolism rate differs in functionally distinct tendons. **Matrix Biol.**, 27(3):182-9, 2008.

BIRKEDAL-HANSEN, H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. **J Periodontol.**,64: 474-84,1993.

BONEWALD, L. F. Osteocyte biology: its implications for osteoporosis. **Journal of Musculoskeletal Neuronal Interactions**, v. 4, n. 1, p. 101-104, 2004.

BOYCE, B.F.; XING, L. A Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. **Arthritis Res Ther.**, 9 Suppl 1:S1, 2007.

BRENTANO, M.A.; CADORE, E.L.; DA SILVA, E.M.; AMBROSINI, A.B.; COERTJENS, M.; PETKOWICZ, R.; VIERO, I.; KRUEL, L.F. Physiological adaptations to strength and circuit training in postmenopausal women with bone loss. **J Strength Cond Res**, 22(6):1816-25, 2008.

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

CASTRO, M.M.; RIZZI, E.; RODRIGUES, G.J.; CERON, C.S.; BENDHACK, L.M.; GERLACH, R.F.; TANUS-SANTOS, J.E. Antioxidant treatment reduces matrix metalloproteinase-2-induced vascular changes in renovascular hypertension. **Free Radic Biol Med.**, 1;46(9):1298-307, 2009.

CASTRO, M.M.; RIZZI, E.; CERON, C.S.; GUIMARAES, D.A.; RODRIGUES, G.J.; BENDHACK, L.M.; GERLACH, R.F.; TANUS-SANTOS, J.E. Doxycycline ameliorates 2K-1C hypertension-induced vascular dysfunction in rats by attenuating oxidative stress and improving nitric oxide bioavailability. **Nitric Oxide.**, 31;26(3):162-8, 2012.

CHAPPARD, D.; BASLÉ, M.F.; LEGRAND, E.; AUDRAN, M. Trabecular bone microarchitecture: a review. **Morphologie**, 92(299):162-70, 2008.

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.**, 278: 11888–11896, 2003.

CHEN, J.H.; LIU, C.; YOU, L.; SIMMONS, C.A. Boning up on Wolff's Law: mechanical regulation of the cells that make and maintain bone. **J Biomech**, 43(1):108-18, 2010.

COHEN, M.M. JR. Merging the old skeletal biology with the new. I. Intramembranous ossification, endochondral ossification, ectopic bone, secondary cartilage, and pathologic considerations. **J Craniofac Genet Dev Biol.**, 20(2):84-93, 2000.

CONFAVREUX, C.B. Interactions between bone tissue and energy metabolism. **Joint Bone Spine.**, 77(4):287-9, 2010.

CONFAVREUX, C.B. Bone: from a reservoir of minerals to a regulator of energy metabolism. **Kidney Int Suppl.**, ( 121):S14-9, 2011.

DARELID, A.; OHLSSON, C.; RUDÄNG, R.; KINDBLOM, J.M.; MELLSTRÖM, D.; LORENTZON, M. Trabecular volumetric bone mineral density is associated with previous fracture during childhood and adolescence in males: the GOOD study. **J Bone Miner Res.**, 25(3): 537-44, 2010.

DE BAAT, P.; HEIJBOER, M.P.; DE BAAT, C. Development, physiology, and cell activity of bone. **Ned Tijdschr Tandheelkd.**, 112(7):258-63, 2005.

DE PAULA, F.J.; ROSEN, C.J. Back to the future: revisiting parathyroid hormone and calcitonin control of bone remodeling. **Horm Metab Res**, 42(5):299-306, 2010.

DEL FATTORE, A.; CAPANNOLO, M.; RUCCI, N. Bone and bone marrow: the same organ. **Arch Biochem Biophys.**, 503(1):28-34, 2010.

DOMINGUEZ, L.J.; DI BELLA, G.; BELVEDERE, M.; BARBAGALLO, M. Physiology of the aging bone and mechanisms of action of bisphosphonates. **Biogerontology.** , 12(5):397-408, 2011.

DUQUE, G., TROEN, B. Understanding the mechanisms of senile osteoporosis: new facts for a major geriatric syndrome. **J. Am. Geriatr. Soc.**, 56, 935–944, 2008.

DY, C.J.; LAMONT, L.E.; TON, Q.V.; LANE, J.M. Sex and gender considerations in male patients with osteoporosis. **Clin Orthop Relat Res**, 469(7):1906-12, 2011.

EINHORN, T A. The bone organ system: form and function. In: MARCUS, R., FELDMAN, D., KELSEY, J. Osteoporosis. **San Diego: Academic Press**, p. 3-22, 1996.

ENGESAETER, L. B.; EKELAND, A.; LANGELAND, N. Methods for testing the mechanical properties of the rat femur. **Acta Orthopaedica Scandinavia.**, v. 49, p. 512-518, 1978.

ERIKSEN, E.F. Cellular mechanisms of bone remodeling. **Rev Endocr Metab Disord.**, 11(4):219-27, 2010.

FERNÁNDEZ TRESGUERRES HERNÁNDEZ GIL, I.; ALOBERA GRACIA, M.A.; DEL CANTO PINGARRÓN, M.; BLANCO JEREZ, L. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. **Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 11, p. E47-E51, 2006a.

FERNÁNDEZ TRESGUERRES HERNÁNDEZ GIL, I.; ALOBERA GRACIA, M.A.; DEL CANTO PINGARRÓN, M.; BLANCO JEREZ, L. Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. **Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 11, p. E151-E157, 2006b.

FRANZ ODENDAAL, T.A. Induction and patterning of intramembranous bone. **Front Biosci.**,16:2734-46, 2011.

FUKADA, E.; YASUDA, I. On the piezoelectric effect of bone. **J Phys Soc Japan**, 12:1158-62, 1957.

GALLACHER, S.J.; DIXON, T. Impact of treatments for postmenopausal osteoporosis (bisphosphonates, parathyroid hormone, strontium ranelate, and denosumab) on bone quality: a systematic review. **Calcif Tissue Int**, 87(6):469-84, 2010.

GALLAGHER, J.C; LEVINE, J.P. Preventing osteoporosis in symptomatic postmenopausal women. **Menopause**, 18(1):109-18, 2011.

GALLAGHER, D.; VISSER, M.; DE MEERSMAN, R.E.; SEPÚLVEDA, D.; BAUMGARTNER, R.N.; PIERSON, R.N.; HARRIS, T.; HEYMSFIELD, S.B. Appendicular

skeletal muscle mass: effects of age, gender, and ethnicity. **J Appl Physiol.**, 83(1):229-39, 1997.

GEURTS, N.; OPDENAKKER, G.; VAN DEN STEEN, P. E. Matrix Metalloproteinases as therapeutic targets in protozoan parasitic infections. **Pharmacology & Therapeutics**, v.133, n.3, p.257-279, 2012.

GRABOWSKI, P. Physiology of bone. **Endocr Dev.**, 16:32-48, 2009.

GREEN, J.O.; NAGARAJA, S.; DIAB, T.; VIDA KOVIC, B.; GULDBERG, R.E. Age-related changes in human trabecular bone: Relationship between microstructural stress and strain and damage morphology. **J Biomech.**, 2011.

GUADALUPE GRAU, A.; FUENTES, T.; GUERRA, B.; CALBET, J.A. Exercise and bone mass in adults. **Sports Med**, 39(6):439-68, 2009.

HADLER OLSEN, E.; FADNES, B.; SYLTE, I.; UHLIN-HANSEN, L.; WINBERG, J.O. Regulation of matrix metalloproteinase activity in health and disease. **FEBS J.** 278(1):28-45, 2011.

HAGIHARA, Y.; FUKUDA, S.; GOTO, S.; IIDA, H.; YAMAZAKI, M.; MORIYA, H. How many days per week should rats undergo running exercise to increase BMD? **J Bone Miner Metab.**, 23(4):289-94, 2005.

HALL, B. K. *Bones and Cartilage: Developmental and Evolutionary Skeletal Biology*. Elsevier, 800 p., 2005.

HELGE, E.W.; AAGAARD, P.; JAKOBSEN, M.D.; SUNDSTRUP, E.; RANDERS, M.B.; KARLSSON, M.K.; KRUSTRUP, P. Recreational football training decreases risk factors for bone fractures in untrained premenopausal women. **Scand J Med Sci Sports.**, 20(Suppl. 1): 31–39, 2010.

HENRY, Y.M.; FATAYERJI, D.; EASTELL, R. Attainment of peak bone mass at the lumbar spine, femoral neck and radius in men and women: relative contributions of bone size and volumetric bone mineral density. **Osteoporos Int.**, 15(4):263-73, 2004.

HENLEY, C. 3RD.; YANG, Y.; DAVIS, J.; LU, J.Y.; MORONY, S.; FAN, W.; FLORIO, M.; SUN, B.; SHATZEN, E.; PRETORIUS, J.K.; RICHARDS, W.G.; ST JEAN, D.J. JR; FOTSCH, C.; REAGAN, J.D. Discovery of a calcimimetic with differential effects on parathyroid hormone and calcitonin secretion. **J Pharmacol Exp Ther.**, 337(3):681-91, 2011.

HILL, P. A.; ORTH, M. Bone Remodeling. **British Journal of Orthodontics**, v. 25, p. 101-107, 1998.

HOFBAUER, L.C.; HAMANN, C.; EBELING, P.R. Approach to the patient with secondary osteoporosis. **Eur J Endocrinol**, 162(6):1009-20, 2010.

HOLROYD, C.; COOPER, C.; DENNISON, E. Epidemiology of osteoporosis. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, 22(5):671-85, 2008.

HORNBERGER, J.R.; 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.**, 29: 16-31, 2004.

HOWE, T.E; ROCHESTER, L.; JACKSON, A.; BANKS, P.M.; BLAIR, V.A. Exercise for improving balance in older people. **Cochrane Database Syst Rev.**, 9;(11), 2011.

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**, 281: 33814–33824, 2006.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Estimativas de projeção da população. **Projeções 1980-2050**; 2010.

INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA APLICADA (IPEA). Brasil em desenvolvimento 2010: Estado, planejamento e políticas públicas. **Brasília: Ipea**, 210 p, 2010..

ISAKSSON, H.; TOLVANEN, V.; FINNILÄ, M.A.; IIVARINEN, J.; TUUKKANEN, J.; SEPPÄNEN, K.; AROKOSKI, J.P.; BRAMA, P.A.; JURVELIN, J.S.; HELMINEN, H.J.; Physical exercise improves properties of bone and its collagen network in growing and maturing mice. **Calcif Tissue Int.**, v.85 n.3, Sep, p.247-56. 2009.

JÄRVINEN, T.L.; PAJAMÄKI, I.; SIEVÄNEN, H.; VUOHELAINEN, T.; TUUKKANEN, J.; JÄRVINEN, M.; KANNUS, P. Femoral neck response to exercise and subsequent deconditioning in young and adult rats. **J Bone Miner Res.**, 18(7):1292-9, 2003.

KANDASAMY, A.D.; CHOW, A.K.; ALI, M.A.; SCHULZ, R. Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: beyond the matrix. **Cardiovasc Res.**, 85(3):413-23, 2010.

KANIS, J.A.; MELTON, L.J. III; CHRISTIANSEN, C.; JOHNSTON, C.C.; KHALTAEV, N. Perspective. The diagnosis of osteoporosis. **J Bone Miner Res.**, 9: 1137–1141, 1994.

KANIS, J.A. Estrogens, the menopause, and osteoporosis. **Bone**, 19(5): 185S-190S, 1998.

KANNUS, P.; SIEVANEN, H.; PALVANEN, M.; JARVINEN, T.; PARKKARI, J. Prevention of falls and consequent injuries in elderly people. **Lancet**, 366:1885–1893, 2005.

KARAGUZEL, G.; HOLICK, M.F. Diagnosis and treatment of osteopenia. **Rev Endocr Metab Disord**, 11(4):237-51, 2010.

KIERSZENBAUM, A.L. Histologia e Biologia Celular: uma Introdução à patologia. 2.ed, Rio de Janeiro: **Elsevier**. p.696, 2008.

KJAER, M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. **Physiol Rev.**, 84: 649–698, 2004.

KOUSTENI, S.; BILEZIKIAN, J.P. The cell biology of parathyroid hormone in osteoblasts.

**Curr Osteoporos Rep.**, 6(2):72-6, 2008.

KOUSTENI, S. FoxOs: Unifying links between oxidative stress and skeletal homeostasis.

**Curr Osteoporos Rep.**, 9(2):60-6, 2011.

KSIEZOPOLSKA ORŁOWSKA, K. Changes in bone mechanical strength in response to physical therapy. **Pol Arch Med Wewn**, 120(9):368-73, 2010.

KUBOTA, Y.; OKA, S.; NAKAGAWA, S.; SHIRASUNA, K. Interleukin-1 $\alpha$  enhances type I collagen-induced activation of matrix metalloproteinase-2 in odontogenic keratocyst fibroblasts. **J. Dent. Res.**, v.81, n.1, p.23-7, 2002.

KUPAI, K.; SZUCS, G.; CSEH, S.; HAJDU, I.; CSONKA, C.; CSONT, T.; FERDINANDY, P. Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography. **Journal of Pharmacological and toxicological methods**, v.61, n.2, p.205-209, 2010.

LANDRY, C.S.; RUPPE, M.D.; GRUBBS, E.G. Vitamin D receptors and parathyroid glands.

**Endocr Pract.**, 17 Suppl 1:63-8, 2011.

LEITE, R.D.; PRESTES, J.; BERNARDES, C.F.; SHIGUEMOTO, G.E.; PEREIRA, G.B.; DUARTE, J.O.; DOMINGOS, M.M.; BALDISSERA, V.; DE ANDRADE PEREZ, S.E. Effects of ovariectomy and resistance training on lipid content in skeletal muscle, liver, and heart; fat depots; and lipid profile. **Appl Physiol Nutr Metab.** 34 (6):1079-86, 2009.

LIRANI, A.N.R.; LAZARETTI CASTRO, M. Evidências da ação de agentes físicos sobre o metabolismo do tecido ósseo e seus potenciais usos clínicos. **Arq Bras Endocrinol Metab**, vol 49 nº 6, 2005.

LONG, F.; ORNITZ, D.M. Development of the endochondral skeleton. **Cold Spring Harb Perspect Biol.**, 1;5(1), 2013.

LOVERIDGE, N. Bone: More Than Stick. **Journal of Animal Science**, v. 77, p. 190-196, 1999.

LUCCHETTI, G.; GRANERO, A.L.; NOBRE, F.; AVEZUM, J.R. A Inibição de metaloproteinases da matriz extracelular: uma possível estratégia terapêutica na hipertensão arterial? **Rev Bras Hipertens**. vol.17 (4):226-230, 2010.

MACKIE, E. J. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 35, p. 1301-1305, 2003.

MACKIE, E.J; AHMED, Y.A; TATARCZUCH, L.; CHEN, K.S.; MIRAMS, M. Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. **Int J Biochem Cell Biol.**, 40(1):46-62, 2008.

MANOLAGAS, S.C. From estrogen-centric to aging and oxidative stress: a revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis. **Endocr. Rev**, 31, 266–300, 2010.

MARCELL, T.J. Sarcopenia: causes, consequences, and preventions. **J. Geront: A. Biol. Sci. Med. Sci.**, 58, M911–M916, 2003.

MARCUS, R., FELDMAN, D., KELSEY, J. Osteoporosis. **San Diego: Academic Press**, p.3-22, 1996.

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

MARQUES, E.A.; MOTA, J.; MACHADO, L.; SOUSA, F.; COELHO, M.; MOREIRA, P.; CARVALHO, J. Multicomponent training program with weight-bearing exercises elicits favorable bone density, muscle strength, and balance adaptations in older women. **Calcif Tissue Int.**, 88(2):117-29, 2011.

MARTIGNETTI, J.A.; AQEEL, A.A.; SEWAIRI, W.A.; BOUMAH, C.E.; KAMBOURIS, M.; MAYOUF, S.A.; SHETH, K.V.; EID, W.A.; DOWLING, O.; HARRIS, J.; GLUCKSMAN, M.J.; BAHABRI, S.; MEYER, B.F.; DESNICK, R.J. Mutation of the matrix metalloproteinase 2 gene (MMP2) causes a multicentric osteolysis and arthritissyndrome. **Nat Genet.**, 28:261–265, 2001.

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

MARTINI, F.H. Fundamentals of anatomy and physiology. 4a edition. **New Jersey, Prentice Hall**, 1123 p., 1998.

MESCHIARI, C.A.; IZIDORO TOLEDO, T.; GERLACH, R.F.; TANUS SANTOS, J.E. Nitric oxide attenuates matrix metalloproteinase-9 production by endothelial cells independent of cGMP- or NF $\kappa$ B-mediated mechanisms. **Mol Cell Biochem.**, 2013.

MOSIG, R.A.; DOWLING, O.; DIFEO, A.; RAMIREZ, M.C.M.; PARKER, I.C.; ABE, E.; DIOURI, J.; AL AQEEL, A.; WYLIE JD 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.**, 16: 1113–1123, 2007.

MUNDY, G.R.; MARTIN, T.J. Physiology and pharmacology of bone. **Springer-Verlag**, 762p., 1993.

MURPHY, G.; NAGASE, H. Progress in matrix metalloproteinase research. **Mol Aspects Med.**, 29(5):290-308, 2008.

NAGASE, H.; WOESSNER JR, J.F. Matrix metalloproteinases. **J Biol Chem.**, 274(31):21491-4, 1999.

NAOT, D.; CORNISH, J. The role of peptides and receptors of the calcitonin family in the regulation of bone metabolism. **Bone**, 43(5):813-8, 2008.

NOMURA, S.; YAMAMOTO, T. T. Molecular event caused by mechanical stress in bone. **Matrix Biology**, v. 19, p. 91-6, 2000.

NORDIN, B.E.C. Calcium and Osteoporosis. **Nutrition**, v.13, n.7/8, p.664-686, 1997.

NORDSLETTEN, L.; KAASTAD, T.S.; MADSEN, J.E.; REIKERÅS, O.; OVSTEBØ, R.; STRØMME, J.H.; FALCH, J. The development of femoral osteopenia in ovariectomized rats is not reduced by high intensity treadmill training: a mechanical and densitometric study. **Calcified Tissue International**, v. 55, p. 436-442, 1994.

PAGE-MCCAW, A.; EWALD, A.J.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. **Nat Rev Mol Cell Biol**. 8(3):221-33, 2007.

PALUMBO, C.; FERRETTI, M.; ARDIZZONI, A.; ZAFFE, D.; MAROTTI, G. Osteocyte-osteoclast morphological relationships and the putative role of osteocytes in bone remodeling. **J Musculoskelet Neuronal Interact**, 1(4):327-32, 2001.

PARISE, G.; PHILLIPS, S.M.; KACZOR, J.J.; TARNOPOLSKY, M.A. Antioxidant enzyme activity is up-regulated after unilateral resistance exercise training in older adults. **Free Radic Biol Med**.39:289 –95, 2005.

PATTERSON, M.L.; ATKINSON, S.J.; KNÄUPER, V.; MURPHY, G. Specific collagenolysis by gelatinase A, MMP-2, is determined by the hemopexin domain and not the fibronectin-like domain. **FEBS Lett**, 503: 158–162, 2001.

PARFITT, A. M.; CHIR, M. B. B. Bone remodeling and bone loss: understanding the pathophysiology of osteoporosis. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 30, n. 4, p. 789-811, 1987.

PATSCH, J.M.; DEUTSCHMANN, J.; PIETSCHMANN, P. Gender aspects of osteoporosis and bone strength. **Wien Med Wochenschr**, 161(5-6):117-23, 2011.

PENG, Z.; TUUKKANEN, J.; ZHANG, H.; JÄMSÄ, T.; VÄÄNÄNEN, H.K. The mechanical strength of bone in different rat models of experimental osteoporosis. **Bone**, v. 15, n. 5, p. 523-532, 1994.

PRESTES, J.; DE CÁSSIA MARQUETI, R.; SHIGUEMOTO, G.E.; LEITE, R.D.; PEREIRA, G.B.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; BALDISSERA, V.; DE ANDRADE PEREZ, S.E. Effects of ovariectomy and resistance training on MMP-2 activity in skeletal muscle. **Appl Physiol Nutr Metab.**, 34(4):700-6, 2009.

QIN, W.; BAUMAN, W.A.; CARDOZO, C. Bone and muscle loss after spinal cord injury: organ interactions. **Ann N Y Acad Sci**, 1211:66-84, 2010.

RAAB, D.M.; SMITH, E.L.; CRENSHAW, T.D.; THOMAS, D.P. Bone mechanical properties after exercise training in young and old rats. **J Appl Physiol.**, 68(1):130-4, 1990.

RACHED, M.T.; KODE, A.; SILVA, B.C.; JUNG, D.Y.; GRAY, S.; ONG, H.; PAIK, J.H.; DEPINHO, R.A.; KIM, J.K.; KARSENTY, G.; KOUSTENI, S. FoxO1 expression in

osteoblasts regulates glucose homeostasis through regulation of osteocalcin in mice. **J. Clin. Invest**, 120, 357–368, 2010.

RACHNER, T.D.; KHOSLA, S.; HOFBAUER, L.C. Osteoporosis: now and the future. **Lancet**, 377(9773):1276-87, 2011.

RAISZ, L.G. Physiology and pathophysiology of bone remodeling. **Clinical Chemistry**, v. 45, n. 8, p. 1353-1358, 1999.

RAISZ, L.G. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. **J Clin Invest**, 115(12):3318-25, 2005.

RECKER, R.R.; DAVIES, K.M.; HINDERS, S.M.; HEANEY, R.P.; STEGMAN, M.R.; KIMMEL, D.B. Bone gain in young adult women. **JAMA**, 268:2403–8, 1992.

REICHRATH, J.; LEHMANN, B.; CARLBERG, C.; VARANI, J.; ZOUBOULIS, C.C. Vitamins as hormones. **Horm Metab Res.**, 39(2):71-84, 2007.

ROBEY, P.G.; BOSKEY A.L. The composition of bone. In *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. ed. **CJ Rosen**, pp. 32–38. Washington, DC: Am. Soc. Bone Miner. Res., 2008.

ROBLING, A. G.; TURNER, C. H. Mechanotransduction in bone: genetic effects on mechanosensitivity in mice. **Bone**, v. 31, n. 5, p. 562 – 69, 2002.

ROSEN, C.J.; ACKERT BICKNELL, C.; RODRIGUEZ, J.P.; PINO, A.M. Marrow fat and the bone microenvironment: developmental, functional, and pathological implications. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr.**,19 (2):109-24, 2009.

RUBIN, C.T.; LANYON, L.E. Regulation of bone formation by applied dynamic loads. **J Bone Joint Surg Am**, 66:397–402, 1984.

RUBIN, C.T.; LANYON, L.E. Regulation of bone mass by mechanical strain magnitude. **Calcif Tissue Int**, 37:411–7, 1985.

RUBIN, J.; RUBIN, C.; JACOBS, C. R. Molecular pathways mediating mechanical signaling in bone. **Gene**, v. 367, p. 1-16, 2006.

SAITO, M.; MARUMO, K. Collagen cross-links as a determinant of bone quality: a possible explanation for bone fragility in aging, osteoporosis, and diabetes mellitus. **Osteoporos Int.**, 21(2):195-214, 2010.

SCHULTZ, Y.; KYLE, U.U.; PICHARD, C. Fat-free mass index and fat mass index percentiles in Caucasians aged 18–98 y. **Int. J. Obes.**, 26, 953–960, 2002.

SEEMAN, E. Reduced bone formation and increased bone resorption: rational targets for the treatment of osteoporosis. **Osteoporos Int.**, 3:S2-8, 2003.

SEEMAN, E. Structural basis of growth-related gain and age-related loss of bone strength. **Rheumatology**, 47 Suppl 4:iv2-8, 2008.

SEMBA, R.D.; NICKLETT, E.J.; FERRUCCI, L. Does accumulation of advanced glycation end products contribute to the aging phenotype? **J Gerontol A Biol Sci Med Sci.**, 65: 963-75, 2010.

SENGUPTA, P. A. Scientific Review of Age Determination for a Laboratory Rat: How Old is it in Comparison with Human Age? **Biomed Int.** 2:81-89, 2011.

SENGUPTA, P. The Laboratory Rat: Relating Its Age with Human's. **International Journal of Preventive Medicine.** Vol 4, No 6, June, 2013.

SHIGUEMOTO, G.E.; PRESTES, J.; LEITE, R.D.; PEREIRA, G.B.; PONTES, C.L.; D'ÁVILA, F.V.; BOTERO, J.P.; BALDISSERA, V.; NONAKA, K.O.; SELISTRE DE ARAÚJO, H.S.; PEREZ, S.E. Effects of resistance training on matrix metalloproteinase-2 activity and biomechanical and physical properties of bone in ovariectomized and intact rats. **Scand J Med Sci Sports.** 22 (5):607-17, 2012.

SHIMANO, M. M.; SHIMANO, A. C.; VOLPON, J. B. Histerese de fêmures de ratas submetidas a ensaio de flexão, em diferentes faixas etárias. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**, v. 18, n. 2, p. 89-97, 2002.

SCHULZ, R. Intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in cardiac disease: rationale and therapeutic approaches. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.**, 47:211-42, 2007.

SIPOS, W.; PIETSCHMANN, P.; RAUNER, M.; KERSCHAN-SCHINDL, K.; PATSCH, J. Pathophysiology of osteoporosis. **Wien Med Wochenschr**, 159(9-10):230-4, 2009.

SMITH, M.Z.; GOETTSCHE, B.M.; VAN RAMSHORST, R.D.; O'BRIEN, J.A.; JAQUE, S.V.; SUMIDA, K.D. Resistance training and bone mineral density during growth. **Int J Sports Med**, 29(4):316-21, 2008.

SNOEK-VAN BEURDEN, P. A.; VON DEN HOFF, J. W. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. **Biotechniques**, v.38, n.1, p.73-83, 2005.

SOGAARD, C.H.; DANIELSEN, C.C.; THORLING, E.B.; MOSEKILDE, L. Long term exercise of young and adult female rats: effect on femoral neck biomechanical competence and bone structure. **J Bone Miner Res**. 9(3):409-16, 1994.

SOGAARD, C. H., MOSEKILDE, L. I., THOMSEN, J. S., RICHARDS, A., McOSKER, J. E. A comparison of the effects of two anabolic agents (Fluoride and PTH) on ash density and bone strength assessed in osteopenic rat model. **Bone**, v. 20, p. 439-449, 1997.

STAMENKOVIC, I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastases. **Cancer Biology**, v.10, 415-33, 2000.

ST-ARNAUD, R. The direct role of vitamin D on bone homeostasis. **Arch Biochem Biophys**, 15; 473(2):225-30, 2008.

ST-ONGE, M.P. Relationship between body composition changes and changes in physical function and metabolic risk factors in aging. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, (5):523-8, 2005.

STERNLICHT, M. D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annual Reviews Cell Development Biology**, v. 17, p. 463-516, 2001.

SUOMINEN, H. Muscle training for bone strength. **Aging Clin Exp Res**, 18(2):85-93, 2006.

SPINALE, F.G. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. **Physiol Rev.**, 87(4):1285-342, 2007.

SZULC, P.; SEEMAN, E. Thinking inside and outside the envelopes of bone: dedicated to PDD. **Osteoporos Int.**, 20(8):1281-8, 2009.

SWARTHOUT, J.T.; D'ALONZO, R.C.; SELVAMURUGAN, N.; PARTRIDGE, N.C. Parathyroid hormone-dependent signaling pathways regulating genes in bone cells. **Gene**, 282(1-2):1-17, 2002.

TAKAHASHI, N.; MAEDA, K.; ISHIHARA, A.; UEHARA S, KOBAYASHI Y. Regulatory mechanism of osteoclastogenesis by RANKL and Wnt signals. **Front Biosci**, 16:21-30, 2011.

KNOTHE TATE, M.L.; ADAMSON, J.R.; TAMI, A.E.; BAUER, T.W. The osteocyte. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, p. 1-8, 2004.

TENENHOUSE, A.; JOSEPH, L.; KREIGER, N.; POLIQUIN, S.; MURRAY, T.M.; BLONDEAU, L.; BERGER, C.; HANLEY, D.A.; PRIOR, J.C. Estimation of the prevalence of low bone density in Canadian women and men using a population-specific DXA reference

standard: the Canadian Multicentre Osteoporosis Study (CaMos). **Osteoporos Int.**, 11:897–904, 2000.

THEOLEYRE, S.; WITTRANT, Y.; TAT, S.K.; FORTUN, Y.; REDINI, F.; HEYMANN, D. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. **Cytokine Growth Factor Rev**, 15(6):457-75, 2004.

TROEN, B. R. Molecular mechanisms underlying osteoclast formation and activation. **Experimental Gerontology**, v. 38, p. 605-614, 2003.

TURNER, C.H.; ROBLING, A.G. Designing exercise regimens to increase bone strength. **Exerc Sport Sci Rev.**, 31: 45–50, 2003.

UELAND, T.; ODGREN, P.R.; YNDESTAD, A.; GODANG, K.; SCHREINER, T.; MARKS, S.C.; BOLLERSLEV, J. Growth hormone substitution increases gene expression of members of the IGF family in cortical bone from women with adult onset growth hormone deficiency-relationship with bone turn-over. **Bone**, 33(4):638-45, 2003.

UELAND, T. Bone metabolism in relation to alterations in systemic growth hormone. **Growth Horm IGF Res.**, 14(6):404-17, 2004.

UNDALE, A.; SRINIVASAN, B.; DRAKE, M.; MCCREADY, L.; ATKINSON, E.; PETERSON, J.; RIGGS, B.L.; AMIN, S.; MODDER, U.I.; KHOSLA, S. Circulating osteogenic cells: characterization and relationship to rates of bone loss in postmenopausal women. **Bone**, 47(1):83-92, 2010.

VAANANEN, H. K. Pathogenesis of Osteoporosis. **Calcified Tissue International**, v. 49, p. S11-S14, 1991.

VINCENT, H.K.; BOURGUIGNON, C.; VINCENT, K.R. Resistance training lowers exercise-induced oxidative stress and homocysteine levels in overweight and obese older adults. **Obesity**, 14, 1921–1930, 2006.

VINCENT, H.K.; RAISER, S.N.; VINCENT, K.R. The aging musculoskeletal system and obesity-related considerations with exercise. **Ageing Res Rev.**,11(3):361-73, 2012.

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

VIGUET-CARRIN, S.; FOLLET, H.; GINEYTS, E.; ROUX, J.P.; MUNOZ, F.; CHAPURLAT, R.; DELMAS, P.D.; BOUXSEIN, M.L. Association between collagen cross-links and trabecular microarchitecture properties of human vertebral bone. **Bone**, 46(2):342-7, 2010.

VU, T. H.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. **Genes & Development**, v. 14, p. 2123-133, 2000.

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.**, 78 (1):18-24, 2006.

YAMAMOTO, N.; JEE, W. S. S.; MA, Y. F. Bone Histomorphometric Changes in the Femoral Neck of Aging and Ovariectomized Rats. **The Anatomical Record**, n. 243, p. 175-185, 1995.

WOLDEN-HANSON, T. Changes in body composition in response to challenges during aging in rats. **Interdiscip Top Gerontol**, 37: 64-83, 2010.

## **Apêndice**

APÊNDICE A: PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

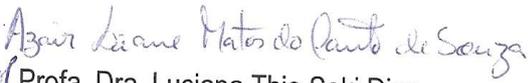
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA  
*Comissão de Ética no Uso de Animais*  
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676  
Fones: (016) 3351.8025 / 3351.9679  
Fax: (016) 3351.8025  
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil  
[ceua@ufscar.br](mailto:ceua@ufscar.br) - [www.propq.ufscar.br](http://www.propq.ufscar.br)

**Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais**  
**nº 044/2011**

Protocolo nº. 031/2011

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos - CEUA/UFSCar **APROVOU** o projeto de pesquisa intitulado "*Avaliação dos efeitos do treinamento resistido sobre fêmures de ratos jovens e idosos*" submetido pelo pesquisador Fábio Henrique Bogni.

São Carlos, 20 de setembro de 2011.

  
Prof. Dra. Luciana Thie Seki Dias

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais