

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

TREINAMENTO RESISTIDO E REPOSIÇÃO HORMONAL AUMENTAM A
ATIVIDADE DAS METALOPROTEINASES-2 E A QUALIDADE DE OSSO DE
RATAS OVARIECTOMIZADAS

Markus Vinicius Campos Souza

SÃO CARLOS – SP
2016

TREINAMENTO RESISTIDO E REPOSIÇÃO HORMONAL AUMENTAM A
ATIVIDADE DAS METALOPROTEINASES-2 E A QUALIDADE DE OSSO DE
RATAS OVARIECTOMIZADAS

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

TREINAMENTO RESISTIDO E REPOSIÇÃO HORMONAL AUMENTAM A
ATIVIDADE DAS METALOPROTEINASES-2 E A QUALIDADE DE OSSO DE
RATAS OVARIETOMIZADAS

Markus Vinicius Campos Souza

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas. Área de concentração: Fisiologia do Exercício.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Eduardo de Andrade Perez

SÃO CARLOS – SP
2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S729t Souza, Markus Vinicius Campos
Treinamento resistido e reposição hormonal aumentam a atividade das metaloproteinasas-2 e a qualidade de osso de ratas ovariectomizadas / Markus Vinicius Campos Souza. -- São Carlos : UFSCar, 2016. 58 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2016.

1. Osteoporose. 2. Treinamento resistido. 3. Ovariectomia. 4. Reposição hormonal. 5. Matrix metaloprotease 2 (MMP-2). I. Título.

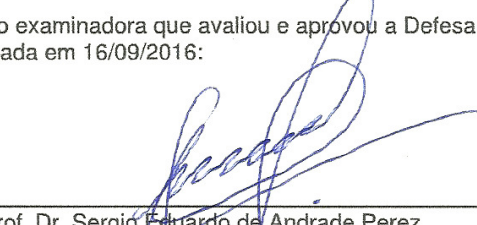


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

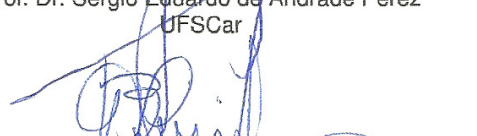
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Folha de Aprovação

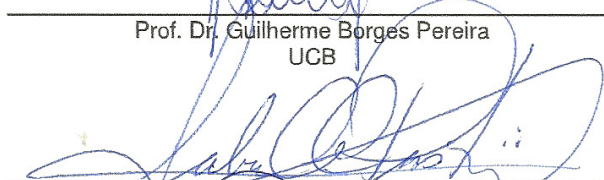
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Markus Vinicius Campos Souza, realizada em 16/09/2016:



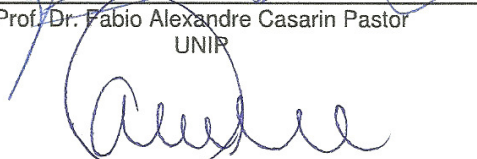
Prof. Dr. Sergio Eduardo de Andrade Perez
UFSCar



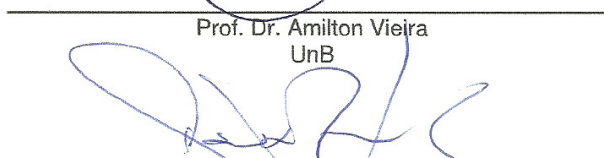
Prof. Dr. Guilherme Borges Pereira
UCB



Prof. Dr. Fabio Alexandre Casarin Pastor
UNIP



Prof. Dr. Arnilton Vieira
UnB



Prof. Dr. Gustavo Ribeiro da Mota
UFTM

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais ANTÔNIO EDSON DE SOUZA e CÉLIA CAMPOS SOUZA, por não medirem esforços para a minha formação profissional. Agradeço de coração pelo apoio prestado em mais uma etapa da minha vida.

Ao meu irmão MATHEUS CAMPOS SOUZA pelo apoio, incentivo e conversas sensatas que me fez ter mais forças para alcançar esta etapa.

Aos meus anjos que sempre pediram a Deus para iluminar meu caminho, minhas avós AUTA MARTINS DE OLIVEIRA CAMPOS E ILDA RODRIGUES PEIXOTO (*in memoriam*).

A minha grande esposa MICHELLE GOMIDES DUMONT CAMPOS, por caminhar ao meu lado dando todo apoio necessário para a conclusão deste trabalho.

Aos meus primos, tios e amigos de Uberaba que mesmo distante contribuíram com pensamentos positivos, dando-me forças para suportar a saudade de casa.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório que minimizaram os obstáculos no decorrer do caminho.

Ao amigo e irmão RICHARD DIEGO LEITE, por não medir esforços para me auxiliar, acompanhar e orientar desde a elaboração, até a conclusão desse manuscrito.

A todos os profissionais da área diretamente ligado ao remodelamento tecidual dos músculos esqueléticos, a obesidade e ao treinamento resistido.

A todos, Muito Obrigado!

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Densidade Mineral Óssea (DMO)

Conteúdo Mineral Ósseo (CMO)

Densidade Óssea (DO)

Treinamento Resistido (TR)

Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α)

Interleucina (IL-1)

Interleucina-1 β (IL-1 β)

Interleucina-6 (IL-6)

Receptor alfa ativado por proliferadores de peroxissomos (PPAR- α)

Receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomos (PPAR- γ)

Ativador do receptor ligante ao fator nuclear Kappa- β (RANK)

Ligante do ativador do receptor ligante ao fator nuclear Kappa- β (RANKL)

Fator de transcrição relacionado com a *runt* (RUNX-2),

Fator de transformação beta (TGF- β)

Osteoprotegerina (OPG)

Matriz extracelular (MEC)

Proteínas da matriz celular (MPs)

Metaloproteinases de Matriz (MMPs)

Metaloproteinases de Matriz-2 (MMP-2)

Metaloproteinases de Matriz-9 (MMP-9)

Receptor de estrógeno α (RE- α)

Receptor de estrógeno β (RE- β)

Absorciometria por dupla emissão de raios-x (DXA)

Reposição Hormonal (RH)

Ovariectomia (OVX)

Sham-operado Sedentário (SHAM Sed)

Ovariectomizado Sedentário (OVX Sed)

Sham-operado Treinamento Resistido (SHAM TR)

Ovariectomizado Treinamento Resistido (OVX TR)

Ovariectomizado sedentário Reposição Hormonal (OVX Sed-RH)

Ovariectomizado Treinamento Resistido e Reposição Hormonal (OVX TR-RH)

Fator de crescimento relacionado com a insulina (IGF-1)

SUMÁRIO

1-	REVISÃO DA LITERATURA.....	7
1.1-	INTRODUÇÃO.....	7
1.2-	INTER-RELAÇÃO GORDURA/OSSO.....	8
1.3-	REMODELAMENTO DA MATRIZ EXTRACELULAR.....	10
1.4-	REPOSIÇÃO HORMONAL X TECIDO ÓSSEO.....	13
1.5-	EXERCÍCIO RESISTIDO E OSSO.....	14
1.6-	EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO NA DENSIDADE MINERAL ÓSSEA (DMO).....	16
2-	JUSTIFICATIVA PARA REALIZAÇÃO DO TRABALHO.....	19
3-	MANUSCRITO.....	20
3.1-	TÍTULO.....	20
3.2-	RESUMO.....	20
3.3-	INTRODUÇÃO.....	22
3.4-	OBJETIVOS.....	25
3.5-	HIPÓTESE.....	25
3.6-	MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.6.1-	APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA.....	25
3.6.2-	ANIMAIS.....	25
3.6.3-	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	26
3.6.4-	PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS PARA OVARIECTOMIA E REPOSIÇÃO HORMONAL.....	26
3.6.5-	REPOSIÇÃO HORMONAL (RH).....	28
3.6.6-	TREINAMENTO RESISTIDO.....	28
3.6.7-	CONTROLE DA INGESTÃO ALIMENTAR E DA MASSA CORPORAL	30
3.6.8-	EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E RETIRADA DOS TECIDOS.....	31
3.6.9-	ANÁLISE DA ATIVIDADE DA MMP-2.....	31
3.6.10-	PROPRIEDADES BIOMÉTRICAS E BIOMECÂNICAS.....	32
3.6.11-	DENSITOMETRIA.....	33
3.6.12-	PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS.....	34
3.7-	RESULTADOS.....	34
3.8-	DISCUSSÃO.....	43
4-	REFERÊNCIAS.....	47

1- REVISÃO DA LITERATURA

1.1- INTRODUÇÃO

Obesidade e osteoporose são duas condições que aumentaram em incidência ao longo da última década. Estas desordens possuem características em comum e sofrem influências do ambiente, além disso, estão associadas com morbidade e mortalidade. São doenças que aumentam a incidência de acordo com o aumento da idade e podem ser ocasionadas por desequilíbrios de uma célula precursora em comum. Sendo assim, tem sido proposta uma relação entre osso e gordura (Rosen e Bouxsein, 2006).

A osteoporose é uma desordem caracterizada por aumento na fragilidade do esqueleto devido a redução na quantidade e qualidade do osso (Abdallah e Kassem, 2012). A etiologia das fraturas osteoporóticas é multifatorial, onde a baixa densidade mineral óssea (DMO), a alta taxa de *turnover* ósseo e a fragilidade física, são conhecidos como fatores preponderantes no desenvolvimento desses quadros clínicos (Abdallah e Kassem, 2012).

As interações entre o osso e a gordura se devem à unidade de remodelamento ósseo, que é composta por osteoblastos (formação óssea), osteoclastos (reabsorção óssea) e osteócitos (forma osteoblastos no interior da matriz óssea), esta unidade é amplamente estratégica.

Os osteoclastos originam-se de precursores hematopoiéticos na circulação e da medula óssea, enquanto que os osteoblastos são derivados de células tronco mesenquimais medulares óssea. A diferenciação destes dois tipos de células neste meio é coordenada durante a ativação do remodelamento ósseo.

A formação óssea tem seu auge entre 12 e 18 anos de idade, onde há trabalho coordenado entre organismo e o ambiente, favorecendo o aumento na espessura e comprimento do osso, através estimulação no desenvolvimento ósseo. No entanto, qualquer desordem que altere a gênese óssea, como: aumento da reabsorção óssea, pode levar a uma menor formação óssea e aumentar a fragilidade deste mais tarde na vida (Rosen e Bouxsein, 2006).

Com o envelhecimento e a redução dos hormônios sexuais, se instala um processo inexorável de perda óssea em homens e mulheres, onde a reabsorção óssea supera a formação. Este quadro se deve à ativação dos osteoclastos, que por sua vez aumentam a fragilidade do osso e o declínio da função dos osteoblastos, contribuindo para um menor desenvolvimento ósseo (Devlin, 2011; Dy *et al.*, 2011).

A prática de atividade física tem sido proposta como profilaxia e terapia contra a osteoporose (Bonner *et al.*, 2003; Ksiezopolska-Orlowska, 2010), devido a carga mecânica gerada no osso pelo exercício físico, sendo fator preponderante na regulação da atividade das células ósseas, conseqüentemente, estimulando a formação óssea. Os exercícios propostos na literatura são aqueles com capacidade de estimular a unidade de remodelamento do tecido ósseo, como caminhada, corrida, saltos, natação e exercícios resistidos (Ksiezopolska-Orlowska, 2010). Estudos prévios têm avaliado o efeito do treinamento resistido (TR) na DMO e há resultados mostrando o aumento na mineralização deste tecido, bem como a atenuação na desmineralização óssea (Anek *et al.*, 2015; Zhao, R., Zhao, M., *et al.*, 2015).

Frente ao exposto acima, o objetivo desta revisão é discutir a obesidade do tecido ósseo promovendo os quadros de osteoporose e a influência do TR na obesidade óssea e conseqüentemente na osteoporose.

1.2- INTER-RELAÇÃO GORDURA/OSSO

Atualmente sabe-se que o tecido adiposo atua também como um órgão endócrino liberando uma série de peptídeos e outros fatores que podem agir de forma autócrina e parácrina. Fatores estes que contribuem para o aumento da secreção de adipocinas consideradas pró-inflamatórias resultando em um processo inflamatório que pode influenciar diretamente o tecido ósseo (Rosen e Bouxsein, 2006; Cao, 2011). As adipocinas desempenham diversas funções que incluem desde a regulação da homeostase energética, função imunológica, cardiovascular, metabólica e até mesmo regulação do remodelamento ósseo. Sabe-se que a hipertrofia dos adipócitos está associada ao aumento da infiltração de macrófagos pró-inflamatórios que induz ao aumento na produção de adipocinas como, por exemplo, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6) (Cao, 2011). Concomitantemente, ocorre uma maior liberação de ácidos graxos, aumento na produção e liberação da leptina, resistina e adipocinas que promovem alterações metabólicas e inflamatórias que podem influenciar fortemente o tecido ósseo. A obesidade também implica no desenvolvimento ou progressão de doenças musculoesquelética (Anandacoomarasamy *et al.*, 2008).

Em um estudo com camundongos, Hotamisligil *et al.* (1995), observaram a elevação da expressão de citocinas pró-inflamatórias (TNF-alfa), evidenciando a relação entre obesidade e inflamação. Mais tarde após com a descoberta da leptina (pequeno

hormônio polipeptídico secretado pelos adipócitos), demonstrou-se que o tecido adiposo é também um órgão endócrino ativo (Hotamisligil, 2006). Desde então numerosos estudos epidemiológicos e clínicos têm estabelecido que a obesidade está associada com respostas inflamatórias crônicas, produção anormais de citocinas, ativação de vias de sinalização inflamatórias e que estes processos estão envolvidos e são responsáveis pelo desenvolvimento de doenças relacionadas com a obesidade, dentre elas a osteoporose (Cao, 2011).

Na obesidade, pode ocorrer a infiltração de uma maior quantidade de macrófagos no tecido adiposo, que são uma importante fonte de citocinas inflamatórias (Zhao, L. *et al.*, 2015). Zhao, L. *et al.* (2015), confirmaram que um aumento na produção de citocinas inflamatórias se torna um fator crítico para o desenvolvimento e progressão da obesidade.

O osso é um tecido dinâmico que sofre *turnover*, processo de modelamento/remodelamento, caracterizado pela reabsorção óssea pelos osteoclastos e formação óssea pelos osteoblastos (Novack e Teitelbaum, 2008). A diminuição das concentrações sanguíneas de hormônios esteroides com o envelhecimento, (andropausa no homem e menopausa na mulher), ocorre a diminuição da atividade e número de osteoblastos e o aumento do número e atividade dos osteoclastos (Cao *et al.*, 2005). Além disso, a menopausa pode estar associada à uma maior produção de citocinas pró-inflamatórias e ao aumento do acúmulo de gordura no osso. Este processo parece ser iniciado por mudanças na expressão de genes que aumentam a síntese de lipídios ao mesmo tempo em que diminuem a expressão de genes envolvidos na oxidação lipídica (Rosen e Buxsein, 2006).

Entre os fatores transcricionais que contribuem para a regulação do metabolismo lipídico no osso, apenas alguns demonstram claro papel predominante nesta regulação, como por exemplo, o Receptor alfa ativado por proliferadores de peroxissomos (PPAR- α) e o Receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomos (PPAR- γ) (Kohjima *et al.*, 2007; Domingos *et al.*, 2011; Takano *et al.*, 2011). O PPAR- α é altamente expresso em tecidos com elevada taxa de oxidação de ácidos graxos, sendo ativado pelos mesmos (Minnich *et al.*, 2001). O PPAR- γ é o regulador dominante da adipogênese óssea ao favorecer a diferenciação de células tronco mesenquimais em adipócitos ao invés de osteoblastos, sendo que a sua redução aumenta a osteoblastogênese *in vivo* (Akune *et al.*, 2004).

O acúmulo de gordura nos ossos induz ao aumento nas concentrações de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , Interleucina 6 (IL-6) e Interleucina (IL-1), as quais são fatores chave para o processo de diferenciação dos osteoclastos e reabsorção óssea, ocasionando quadros de osteopenia e osteoporose. É consenso na literatura que os osteoblastos regulam o recrutamento e atividade dos osteoclastos por meio da expressão de ativador do receptor ligante ao fator nuclear Kappa- β (RANKL) e osteoprotegerina (OPG). A RANKL é expresso na superfície das células estromais dos osteoblastos e se ligam aos seus receptores, receptor de ativação do fator nuclear kappa- β (RANK), na superfície das células precursoras hematopoiéticas para estimular a diferenciação e maturação dos osteoclastos na presença do fator de estimulação da colônia de macrófagos (M-CSF). A OPG, que é um receptor secretado pelos osteoblastos, se ligam a RANKL para prevenir a ativação da RANK e então prevenir a diferenciação e ativação dos osteoclastos (15). Evidências científicas demonstram que o aumento na atividade dos osteoclastos e o aumento na reabsorção óssea em mulheres após a menopausa está relacionado com a super regulação da RANKL (16,17,18).

Colaborando com estes dados, Kimble *et al.* (1995) demonstraram que a inibição da IL-1 e do TNF- α diminui a formação de osteoclastos e a reabsorção óssea em camundongos castrados. Estas alterações na biogênese e no metabolismo das células adiposas no osso podem ser acompanhadas pelo remodelamento ósseo (Cao *et al.*, 2005; Novack e Teitelbaum, 2008; Shigemoto *et al.*, 2011). Em estudo, Kimble *et al.* (1995) evidenciaram que bloqueando a ação da IL-1 e do TNF-alfa, ocorre a diminuição da formação de osteoclastos e da reabsorção óssea em camundongos ovariectomizados. Diante do exposto, fica claro que as citocinas pró-inflamatórias como TNF-alfa, IL-6 e IL-1 são fatores chaves para o processo de diferenciação dos osteoclastos e reabsorção óssea, resultando em quadros de osteopenia e osteoporose. A acelerada perda de massa óssea com o envelhecimento se deve ao aumento dos níveis circulantes destas citocinas. Estas alterações na biogênese e no metabolismo das células adiposas no osso podem ser acompanhadas pelo remodelamento da matriz extracelular óssea.

1.3- REMODELAMENTO DA MATRIZ EXTRACELULAR

O osso possui uma extensa Matriz extracelular (MEC), onde a mais abundante proteína é o colágeno tipo I, capaz de promover integridade de estrutura, bem como fornecer suporte para forças mecânicas impostas a este tecido. Dentro da MEC, as proteínas da matriz celular (MPs), são responsáveis pelo desenvolvimento estrutural do tecido (Reich *et al.*, 2010). As proteínas da matriz se ligam aos receptores celulares, como por exemplo as integrinas, promovendo assim a interação com a matriz estrutural, com as proteases presente no líquido extracelular e diversos mecanismos que podem influenciar a atividade celular. Esta interação permite regular a atividade das proteínas na MEC. Proteínas estruturais da MEC como: fibronectina e colágeno também se ligam às integrinas, demonstrando que, as MPs apresentam potencial de modular suas funções pela competição nos sítios de ligação (Shigumoto *et al.*, 2012).

Existem dois tipos de MPs específicas, a osteopontina (OPN) e a Sialoproteína óssea (BSP), estas apresentam concentrações elevadas frente a processos inflamatórios e ao remodelamento tecidual (Giachelli e Steitz, 2000). Especificamente, estas se ligam aos receptores presentes na MEC para ativar as Metaloproteinases de Matriz (MMPs), no caso do tecido ósseo, principalmente a Metaloproteinases de Matriz do tipo 2 (MMP-2), mesmo em presença de seus inibidores (TIMPs 1 e 2) (Fedarko *et al.*, 2004; Shigumoto *et al.*, 2012)

As MMPs são uma família de endopeptidases dependentes de zinco capazes de degradar componentes da matriz extracelular, como colágeno, proteoglicanos, elastina, laminina, fibronectina e outras proteínas. As MMPs estão envolvidas em processos fisiológicos relacionadas ao *turnover* do tecido conectivo, remodelamento. Além disso, atuam também em processos patológicos como metástase de tumores, inflamação e artrites (Kjaer, 2004; Ali *et al.*, 2012).

Os principais grupos de MMPs são as colagenases intersticiais, que degradam colágeno do tipo I (exemplo MMP-2), duas gelatinases também conhecidas como gelatinases A (MMP-2) e gelatinase B (MMP-9) ambas eficientes em degradar o colágeno do tipo IV (presente no tendão); (III) estromalinas (exemplo MMP-3 e MMP-10) que possui substratos específicos para proteoglicanos, fibronectina, laminina e alguns tipos de colágeno; (IV) o subgrupo tipo membrana de seis MMPs (MT1-MMP a MT6-MMP) e (V) o subgrupo heterogêneo (MMP-7, MMP-12 e MMP-20) (Kjaer, 2004).

As metaloproteinases são sintetizadas na forma de um zimogênio inativo com um domínio pró-peptídico auto inibitório, além de um domínio catalítico que contém

íon de zinco (Zn^{2+}). As gelatinases (MMP-2 e MMP-9) apresentam três fibronectinas tipo II as quais formam um domínio com ligação ao colágeno permitindo a ligação e clivagem do colágeno tipo IV ou desnaturação deste colágeno. A ativação da MMP requer a dissociação da ligação entre a sufridil cisteína no domínio pró-peptídico e o íon Zn^{2+} catalítico. O resíduo cisteína e o domínio catalítico de Zn^{2+} são comuns a todas as MMPs. O chamado trocador de cisteína parecer ser um mecanismo de ativação comum para todas as MMPs. Essa interação entre o resíduo cisteína com o Zn^{2+} mantém a enzima na forma inativa ou latente (Pró-MMP). Por esse motivo é necessário a dissociação entre o resíduo cisteína e o Zn^{2+} . O complexo mecanismo de ativação das MMPs é coordenado por um mecanismo que é chamado de trocador de cisteína, sendo que se houver interação entre o resíduo cisteína e o Zn^{2+} a enzima estará inativada. Se por algum motivo ocorrer esta dissociação entre o resíduo e o Zn^{2+} ocorrerá à ativação das MMP (MMP ativa) (Kjaer, 2004).

Tipicamente as MMPs são expressas em tecidos quando há algum processo de reparação e/ou remodelamento fisiológico (Kjaer, 2004). A MMP-2 é uma gelatinase (gelatinase A) capaz de desnaturar o colágeno (gelatina). Além de sua capacidade em degradar colágenos dos tipos I, II, III e IV, ela também exerce uma ação sobre a elastina, a fibronectina e outros componentes da matriz extracelular sendo, sendo expressa e secretada constitutivamente em mioblastos e fibroblastos em condições fisiológicas. Alguns fatores, como as citocinas, podem aumentar sua expressão tecidual (Nyman *et al.*, 2011).

Como mencionado acima, as MMPs são enzimas proteolíticas que coletivamente degradam os componentes da matriz orgânica nos ossos e vários membros desta família (dentre elas MMP-2 e MMP-9) possuem habilidade de degradar o colágeno do tipo I (Nyman *et al.*, 2011). As MMP-2 e MMP-9 influenciam tanto as propriedades estruturais quanto biomecânicas dos ossos, uma vez que a expressão dos osteoblastos são mediadas via ativação MMPs, proporcionando desta maneira um equilíbrio entre formação e reabsorção óssea (Inoue *et al.*, 2006; Nyman *et al.*, 2011). Frente a isso, observa-se que o aumento na atividade das MMPs é usualmente indicativo de degradação da matriz que é necessária para permitir o crescimento tecidual (Marqueti *et al.*, 2008). A MMP-2, em sua forma ativa (62kD), é importante para a preservação da massa óssea. Já foi demonstrado que a deficiência da MMP-2 induz a um distúrbio ósseo caracterizado por destruição do tecido na forma de nodulose, artrite e osteólise, e também osteoporose generalizada (Inoue *et al.*, 2006), fato que sugere papel mais

complexo dessa gelatinase no desenvolvimento e manutenção do osso (Nyman *et al.*, 2011).

Recentemente Shigemoto *et al.* (2012) demonstram que a ovariectomia diminui a atividade da MMP-2 na tíbia de ratas e prejudica o remodelamento da matriz extracelular o que gera redução da força de resistência óssea. Ademais, foi especulado que a osteopontina e a sialoproteína óssea, presentes em concentrações elevadas em processos inflamatórios, podem estar envolvidas na ativação de metaloproteases de matriz do tipo 2 e do tipo 9.

1.4- REPOSIÇÃO HORMONAL X TECIDO ÓSSEO

A redução na produção dos hormônios sexuais que ocorre na menopausa, está associado a várias alterações metabólicas que podem comprometer a qualidade de vida, sendo uma questão de saúde pública, pois aproximadamente 40% das mulheres neste período procuram assistência médica para tratamento dos sintomas (Leite *et al.*, 2010). A menopausa por sua vez tem sido associada com aumento no risco de doenças como: diabetes, sarcopenia, mudanças na composição corporal, dislipidemias, redução da densidade óssea (DO) (osteopenia/osteoporose) (Leite *et al.*, 2010).

O conceito de que deficiência de estrógeno é crítico para o surgimento da osteoporose, é demonstrado através da relação direta entre os níveis de hormônios sexuais femininos e DMO. O remodelamento ósseo é acelerado na menopausa, devido ao aumento dos marcadores de reabsorção óssea e a não redução na formação óssea (Raisz, 2005). Dessa forma, a deficiência de estrógeno aumenta a reabsorção óssea e o tratamento com drogas análogas a este hormônio podem diminuir a reabsorção deste tecido.

Estudo em animais e em cultura de células é evidenciado que o estrógeno age no remodelamento ósseo via receptores de estrógeno [receptor de estrógeno α (RE- α) e receptor de estrógeno β (RE- β)]. O RE- α é o mediador da ação estrogênica no esqueleto. Isso acontece devido a capacidade do estrógeno em agir estimulando as células de linhagem osteoblástica, concomitantemente com ação sobre as células de linhagem hematopoiéticas (precursores de osteoclastos, osteoclastos maduros e linfócitos) (Raisz, 2005). As citocinas e fatores de crescimento podem mediar este efeito, a perda de massa óssea com a ausência dos hormônios ovarianos é estimulada

pela ativação de mediadores pró inflamatórios como: TNF- α e Interleucina-1 β , acelerando a ativação osteoclástica via RANKL/RANK/OPG (Boyce *et al.*, 2012).

Está estabelecido que os osteoblastos regulam o recrutamento e atividade dos osteoclastos por meio da expressão de (RANKL) e osteoprotegerina (OPG). A RANKL se expressam na superfície das células estromais dos osteoblastos e se ligam aos seus receptores, RANK, na superfície das células precursoras hematopoiéticas para estimular a diferenciação e maturação dos osteoclastos na presença do fator de estimulação da colônia de macrófagos (M-CSF). A OPG, um receptor secretado pelos osteoblastos, se ligam a RANKL para prevenir a ativação da RANK e então prevenir a diferenciação e ativação dos osteoclastos (15). Evidências científicas demonstram que o aumento na atividade dos osteoclastos e aumento na reabsorção óssea em mulheres após a menopausa está relacionado com a super regulação da RANKL (Mellis *et al.*, 2011).

As citocinas pró-inflamatórias como TNF-alfa, IL-6 e IL-1 são fatores chaves para o processo de diferenciação dos osteoclastos e reabsorção óssea, ocasionando quadros de osteopenia e osteoporose (Chen *et al.*, 2016). A acelerada perda de massa óssea com o envelhecimento se deve ao aumento dos níveis circulantes destas citocinas. Schett (2011) mostrou que o TNF- α é potente estimulador da osteoclastogênese por estimular os precursores dos osteoclastos e a IL-1 é importante na regulação dos osteoclastos e conseqüentemente na reabsorção óssea.

Diante disso, a deficiência de estrogênio é o maior fator para indução da redução na massa óssea com a menopausa e desenvolvimento subsequente de osteoporose. A reposição de hormônios sexuais após a menopausa é capaz de prevenir a perda de tecido ósseo, característica proveniente da estimulação da formação em detrimento da reabsorção do osso (Vural *et al.*, 2006). Há evidências que mostram a associação positiva entre reposição hormonal e reduções no risco de fratura de quadril e coluna (Brown, 2008; Callewaert *et al.*, 2010). A quantidade total de massa óssea acumulada ao longo da vida é dependente dos níveis de estrogênio liberado. Sendo assim, existe uma associação positiva entre reposição hormonal e massa óssea (Yang *et al.*, 2012).

1.5- EXERCÍCIO RESISTIDO E OSSO

Como mencionado anteriormente, o osso é um tecido que está em constante remodelamento, sendo desta maneira um tecido dinâmico, isso faz com que ele seja capaz de responder a muitos estímulos, inclusive ao exercício físico. Durante a prática

de exercícios, este tecido sobre forças de compressão, de atrito, gerando assim, respostas a estes estímulos, respostas estas que vão ao encontro da formação da massa óssea.

Os exercícios resistido e de impacto são potentes estimuladores do metabolismo ósseo. Em estudos prévios têm sido demonstrados que esta modalidade de exercício favorece a redução de fraturas. Howe *et al.* (2011), em estudo incluindo 4.320 participantes, verificaram que o exercício resistido de alta intensidade foi capaz de aumentar a densidade mineral no fêmur. Ainda observaram que para o aumento na densidade mineral nos ossos das vértebras é necessário a associação dos exercícios resistido, de impacto e aeróbio. No entanto, os exercícios de impacto apresentam limitações para determinadas condições como por exemplo: osteoartrite, hérnia de disco, fraturas vertebrais e problemas na articulação dos joelhos (Moreira *et al.*, 2014). Nestes casos, o mais indicado são exercícios com menos impacto (Moreira *et al.*, 2014).

Durante o TR a contração muscular é capaz de gerar estímulos mecânicos que afetam diretamente o osso, gerando respostas osteogênicas neste tecido. Estas forças no tecido ósseo geralmente são de tensão, compressão e torção, sendo elas as responsáveis pelo surgimento de sinais elétricos no tecido (conhecido como efeito piezoelétrico) (Rajabi *et al.*, 2015). Esse efeito acaba estimulando a ação osteoblástica favorecendo a formação óssea, dessa forma, o efeito piezoelétrico aumenta a DMO, por ocorrer deposição de minerais na porção que está sofrendo pressão (Rajabi *et al.*, 2015).

O TR de moderada a alta intensidade (70 a 90% da 1 repetição máxima), com realização de 3 a 4 exercícios com 8 a 12 repetições e frequência semanal de 2 a 3 vezes é capaz de manter e até mesmo melhorar a DMO do quadril e do fêmur de mulheres no período pós menopausa (Wilhelm *et al.*, 2012). Além disso, nesta sistemática revisão realizada por Wilhelm *et al.* (2012) em idosos com osteopenia e osteoporose, foi elucidado também o benéfico efeito do TR nas capacidades físicas (força, resistência, potência, agilidade etc), bem como na qualidade de vida diária. Estudos prévios têm apresentado que o TR com maiores efeitos sobre a massa óssea devem ser dinâmicos, de alta intensidade e curta duração (Balsamo *et al.*, 2013; Basat *et al.*, 2013).

Importante ressaltar que os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo refletem diretamente na formação/reabsorção do osso. Apesar de os mecanismos pelos quais o metabolismo ósseo é estimulado não estar completamente elucidado na literatura, sabe-se que os marcadores bioquímicos no tecido são sensíveis a estimulação pelo exercício resistido (Gombos *et al.*, 2016). Gombos *et al.* (2016) avaliaram o efeito

do exercício resistido e aeróbio nos marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e constataram que no exercício aeróbio há aumento nos marcadores relacionados com a formação óssea (osteogênese), enquanto que no exercício resistido, este aumento também existe e ainda é seguido por reduções no níveis de marcadores bioquímicos para a reabsorção óssea.

1.6- EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO NA DENSIDADE MINERAL ÓSSEA (DMO)

A redução na DMO está associada com o envelhecimento e redução na produção dos hormônios ovarianos. Esta alteração fisiológica predispõe o osso a micro danos que posteriormente pode ocasionar fraturas. Frente a isso, estratégias têm sido investigadas afim de minimizar este quadro e conseqüentemente reduzir os índices de fratura. Uma das estratégias é prescrição do exercício físico, que é conhecido por gerar estresse na estrutura de modo a aumentar a taxa de formação em detrimento da taxa de reabsorção (Betancourt Ortiz, 2014). A tabela a seguir apresenta alguns estudos que analisaram a influência do exercício na DMO.

Tabela 1: Estudos ilustrando os efeitos dos exercícios físicos na DMO.

Exercício	Autor/Ano	Objetivos	Resultados
ER + Pliometria	Hinton <i>et al.</i> (2015)	Avaliar o efeito de 12 semanas de ER e Exercício com saltos na DMO	ER e Pliometria aumentam da DMO e o ER aumentou também a DMO do quadril.
ER + Pliometria	Winters-Stone <i>et al.</i> (2013)	Avaliar o efeito de 12 semanas de ER e Exercício com saltos na DMO e composição corporal de mulheres pós menopausa e que passaram pelo tratamento de câncer de mama.	ER e Pliometria aumentam da DMO e melhora a composição corporal.
ERF e ERP	Gray <i>et al.</i> (2013)	Avaliar o efeito de 48 semanas de ER de força e ER de potência na DMO	Ambos exercícios são técnicas importantes para a manutenção da DMO.

		mulheres pós menopausa.	
ER e ERA	Balsamo <i>et al.</i> (2013)	Analisar os efeitos do ER e dos exercícios com massa corporal na água.	ER e exercícios aquáticos são eficientes em preservar a massa óssea em mulheres pós menopausa
ER, EA e Flexibilidade	Shah <i>et al.</i> (2011)	Avaliar o efeito do treinamento físico e da redução do massa corporal em relação a DMO	A dieta reduz massa corporal e aumenta a degradação óssea, enquanto o treinamento reduz o massa corporal e aumenta a formação óssea.
EF e agentes anti-reabsorção	Zhao, R., Xu, Z., <i>et al.</i> (2015)	Esta meta análise objetivou avaliar o efeito do exercício junto as drogas que inibem a reabsorção óssea.	O exercício físico foi capaz de aumentar a capacidade de atuação das drogas que são utilizadas para inibir a reabsorção óssea.
ER	Zhao, R., Zhao, M., <i>et al.</i> (2015)	Meta análise com o objetivo de avaliar o efeito de diferentes protocolos de exercício resistido na DMO	ER de alta intensidade e impacto foi mais eficiente em aumentar a DMO do que ER com característica de resistência.
Exercício físico	Xu <i>et al.</i> (2016)	Revisão com objetivo de avaliar o impacto de mais de um tipo de exercício resistido no osso de mulheres jovens e no período pós menopausa.	ER de alta intensidade e impacto foram mais eficientes em preservar e aumentar a massa óssea das mulheres nos períodos pré e pós menopausa.

ER: Exercício Resistido; EA: Exercício Aeróbio; ERA: Exercícios com massa corporal na água; ERF: Exercício Resistido com objetivo de aumento de Força; ERP: Exercício Resistido com o objetivo de aumento de potência; EF: Exercício Físico

2- JUSTIFICATIVA PARA REALIZAÇÃO DO TRABALHO

Frente aos saberes supracitados, nota-se que os exercícios físicos junto a reposição hormonal desempenham papel importante na prevenção da osteoporose e redução nos riscos de fratura. No entanto, como apresentado na meta análise de Zhao, R., Xu, Z., *et al.* (2015), os efeitos positivos do exercício podem ser mascarados com a deficiência de estrógeno, devido a redução no número e função dos receptores de estrógeno, uma vez que este hormônio regula as respostas do tecido ósseo frente a imposição das cargas mecânicas.

Atualmente, a administração de estrógeno é fator estimulante das respostas osteogênicas quando o osso é submetido à cargas mecânicas, isso acontece por ocorrer a super regulação dos receptores de estrógeno no tecido. A reposição hormonal deprime a reabsorção óssea, enquanto o exercício aumenta a formação óssea. Frente a isso, acredita-se que a somatória do exercício com a reposição hormonal produzirá efeitos positivos na DMO.

Já tem atraído grande atenção da comunidade científica a combinação entre a utilização da reposição hormonal e o exercício físico, mas ainda não há consenso dos efeitos destes tratamentos propostos devido a inconsistência que existe nos resultados (Zhao, R., Xu, Z., *et al.*, 2015). Estes resultados são inconsistentes, uma vez que há grande variação no tamanho da amostra, o regime de utilização das drogas e a frequência/intensidade dos programas de exercícios.

Sendo assim, se faz necessário combinar o efeito da reposição hormonal, do exercício físico, bem como a combinação de ambos para melhorar o poder dos resultados que já existem na literatura. Para tanto, este trabalho que será exposto a seguir vem para preencher uma porção da lacuna que existe na literatura a respeito do exercício resistido e reposição hormonal.

3- MANUSCRITO

3.1- TÍTULO

Treinamento resistido e reposição hormonal aumentam a atividade da MMP-2, qualidade e quantidade de osso de ratas ovariectomizadas

Treinamento resistido, reposição hormonal e saúde óssea em ratas ovariectomizadas

3.2- RESUMO

Objetivo: o objetivo do presente estudo foi investigar a influência do treinamento resistido (TR) e reposição hormonal (RH) na atividade das metaloproteínas 2 (MMP-2), nas propriedades biomecânicas e biofísicas do osso de ratas ovariectomizadas (OVX). **Métodos:** fêmeas albinas foram agrupadas em seis grupos (11 animais por grupo): Sham Sedentário (SHAM Sed); Ovariectomizado Sedentário (OVX Sed); Sham Operado Treinamento Resistido (SHAM TR); Ovariectomizado Treinamento Resistido (OVX TR); Ovariectomizado Sedentário com Reposição Hormonal (OVX Sed-RH) e Ovariectomizado Treinamento Resistido com Reposição Hormonal (OVX TR-RH). Os animais dos grupos que receberam RH tiveram capsulas de silastic implantadas com uma solução de óleo de girassol com 180µg de 17β-estradiol/mL. Os animais foram submetidos ao TR por 12 semanas (3 vezes por semana, onde realizavam de 4-9 escaladas), o treinamento acontecia em uma escada vertical de 1,1m com os pesos fixados em sua cauda. As análises biomecânicas e biofísicas foram realizadas utilizando a máquina de teste universal e a atividade da MMP-2 por zimografia. **Resultados:** a densidade óssea e o conteúdo mineral ósseo foram maior nos grupos TR e RH. A atividade da MMP-2 também foi maior nos grupos que foram submetidos ao TR e RH. A análise biomecânica (rigidez, carga no ponto de fratura e carga máxima) utilizada para demonstrar a qualidade do osso foi maior no grupo TR com associação do RH. **Conclusão:** nossos resultados indicam que o TR e RH foram eficientes em aumentar a atividade da MMP-2, as propriedades biomecânicas e biofísicas dos ossos de ratas ovariectomizadas.

Palavras Chave: Osteoporose, Treinamento Resistido, Ovariectomia, Reposição Hormonal e Matrix Metaloprotease 2 (MMP-2).

ABSTRACT

Purpose: The aim of the present study was to investigate the influence of resistance training (RT) and hormone replacement (HR) on MMP-2 activity, biomechanical and physical properties bone of ovariectomized (OVX) rats. **Methods:** Sprague-Dawley female rats were grouped into six experimental groups (n = 11 per group): sham-operated sedentary (SHAM Sed), ovariectomized sedentary (OVX Sed), sham-operated resistance training (SHAM RT), ovariectomized resistance training (OVX RT), (OVX Sed-HR), and OVX RT-HR. HR groups received implanted silastic capsules with a 5% solution of 17β -estradiol (50 mg 17β -estradiol/ml of sunflower oil). In a 12-week RT period (27 sessions; 4–9 climbs) the animals climbed a 1.1 m vertical ladder with weights attached to their tails. Biomechanical and physical bone analyses were performed using a universal testing machine, and MMP-2 activity analysis was done by zymography. **Results:** Bone density and bone mineral content was higher in the RT and HR groups. The MMP-2 activity was higher in the RT and HR groups. The biomechanical analysis (stiffness, fracture load and maximum load) demonstrated better bone tissue quality in the RT associated with HR. **Conclusion:** The RT alone as well as when it is associated with HR was efficient in increasing MMP-2 activity, biomechanical and biophysical properties bone of ovariectomized rats.

Keywords: Osteoporosis, Resistance Training, Ovariectomy, Hormone Replacement and metalloproteinase-2 (MMP-2).

3.3- INTRODUÇÃO

A osteoporose é uma doença esquelética multifatorial, descrita pelo declínio da massa óssea e desorganização na microarquitetura deste tecido, resultando em redução da força mecânica e aumento no risco de fratura (Rosen e Bouxsein, 2006). Esta doença é um sério problema de saúde para mulheres na menopausa, uma vez que aproximadamente 20% delas são detectadas com osteoporose (Sipos *et al.*, 2009). Dentre os principais fatores de risco para surgimento da osteoporose destacam-se a idade, o gênero, a obesidade e a deficiência de estrógeno (Yang *et al.*, 2012). Muitos tratamentos medicamentosos tem sido proposto com o objetivo de prevenir a redução na massa óssea, no entanto estes geram muitos efeitos colaterais no organismos e tendem a ser de alto custo (Sipos *et al.*, 2009). Frente a isso, a busca por estratégias que favoreçam o aumento na massa óssea e previna a perda deste tecido torna-se grande desafio para os estudiosos desta área da ciência.

O osso é um tecido dinâmico que está em constante processo de formação/reabsorção, isso se deve à atividade dos osteoblastos e osteoclastos, respectivamente. O equilíbrio entre estes dois tipos de células pode contribuir para o desenvolvimento do osso (Rosen e Bouxsein, 2006). Concentrações séricas de hormônios e fatores locais inibem a atividade osteoclástica e regulam o remodelamento do tecido. Ou seja, reduções na quantidade de hormônios sexuais resulta em aumento no *turnover* ósseo, proporcionando aumento taxa de reabsorção (aumento na atividade dos osteoclastos) e redução na taxa de formação (redução na atividade dos osteoblastos), fato este que resulta em redução da massa óssea (Rosen e Bouxsein, 2006). Além disso, a falta dos hormônios ovarianos pode ainda contribuir para o aumento na excreção urinária de cálcio (Gala *et al.*, 2001). Isto parece ocorrer por causa que os hormônios ovarianos favorecem a reabsorção tubular do cálcio (Dempster e Lindsay, 1993), contribuindo assim, para a redução no conteúdo mineral do osso (CMO) e também para a diminuição na densidade óssea (DO).

O *turnover* é um dos principais fatores determinante da integridade estrutural do tecido ósseo. Qualquer mudança na taxa ótima de *turnover*, tais como um drástico aumento após a menopausa e ovariectomia tem potencial de alterar a microestrutura e os aspectos mecânicos do osso. Para avaliar a qualidade e quantidade do tecido ósseo, analisa os parâmetros que mostram a organização tridimensional das trabéculas ósseas, mostrando a microarquitetura, a geometria, microfraturas existentes no osso por meio da

absorciometria por dupla emissão de raios-x (DXA). Pode ainda realizar avaliações que apresentam as propriedades intrínsecas da matriz extracelular (MEC), via atividade das Metaloproteinases do tipo 2 (MMP-2) (Cabral *et al.*, 2014).

O exercício físico possui efeito positivo no esqueleto e a carga mecânica gerada pela prática de atividade física tem sido reportada como fator preponderante de preservação e aumento da massa e força óssea, respectivamente (Iwamoto *et al.*, 2009; Shiguemoto *et al.*, 2012). Em modelos de osteoporose com ratos vários tipos de exercícios, incluindo o exercício em esteira (Simoes *et al.*, 2008), exercícios com saltos (Marqueti *et al.*, 2008), exercícios com vibração corporal (De Oliveira *et al.*, 2010), exercício resistido em escada (Shiguemoto *et al.*, 2012), natação (Falcai *et al.*, 2014) foram estudados para analisar a eficiência destes protocolos na perda de massa óssea. Assim, faz se necessários estudos que avaliam as respostas do treinamento juntamente com a reposição hormonal (RH). Esta RH tem sido prescrita principalmente para reposição dos hormônios sexuais, visando compensar a perda óssea e minimizar os sintomas causados pela falta destes hormônios.

A qualidade do osso pode ser alterada por um número de fatores, tais como, as alterações na matriz extracelular (MEC) causadas por variações na composição, arranjo e comunicação dos constituintes orgânicos (colágeno e proteínas não colagenosas na MEC) e também por constituintes inorgânicos (cristais de hidroxiapatita) (Nordin e Morris, 1989). Além disso, o osso acumula micro danos com o envelhecimento devido a incapacidade de reparar as micro fraturas que ocorrem no osso (Chapurlat e Delmas, 2009) . Todas estas mudanças refletem não apenas na quantidade do osso, mas também na qualidade da MEC deste tecido. O papel e a magnitude das mudanças na MEC causadas pela menopausa e envelhecimento ainda são pouco compreendidos.

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são importantes para manutenção da integridade da MEC nos tecidos. A MEC envolve as células ósseas oferecendo suporte estrutural e proteção, os quais são essenciais para manutenção da integridade do esqueleto. A integridade da matriz envolve a síntese e degradação dos constituintes da mesma, incluindo colágeno, glicoproteínas, glicosaminoglicanos e proteoglicanos (Kjaer, 2004). MMPs, principalmente a MMP-2 e MMP-9, iniciam degradação do colágeno no ambiente extracelular (Shiguemoto *et al.*, 2012). A expressão das MMP-2 são altamente regulados por fatores de crescimento, por citocinas produzidas durante o remodelamento tecidual, por agentes bioquímicos e também por interação da matriz com a célula (Kjaer, 2004). Estas enzimas possuem papel essencial na proliferação e

diferenciação, regeneração após danos e na homeostasia tecidual. O aumento na atividade das MMPs é indicativo de degradação da matriz, processo este importante no crescimento, desenvolvimento e fortalecimento do tecido. A MMP-2 em sua forma ativa (62kD) preserva a massa óssea. Estudos prévios demonstraram que a diminuição na MMP-2 causa destruição do tecido ósseo, favorecendo a osteoporose, fato este que demonstra a importância da MMP-2 no desenvolvimento e manutenção do osso (Matsuo e Nango, 2012).

A ovariectomia diminui a atividade da MMP-2 e a produção de colágeno do tipo I e III. Colágeno do tipo I é encontrado abundantemente no osso e tem função de promover elasticidade junto com força no tecido ósseo (Cao, 2011). Frente a isso, mudanças no colágeno ósseo como ocorre no processo de osteoporose pode afetar as propriedades mecânicas do tecido e deixa-lo suscetível a fraturas (Isaksson *et al.*, 2009). A desmineralização e a diminuição do colágeno no tecido ósseo estão associados com a alta taxa de remodelamento ósseo (balanço ósseo negativo), promovendo assim a redução nas propriedades biofísicas e biomecânicas dos ossos (Shigemoto *et al.*, 2012). Sendo assim, utiliza-se a RH na tentativa de reverter os efeitos da ovariectomia.

A RH promove remodelamento tecidual, favorecendo a ativação de biomarcadores envolvidos neste processo, são eles: 1) marcadores que refletem a reabsorção óssea; 2) marcadores que refletem o número de osteoclastos e 3) marcadores que refletem a formação óssea. Marcadores de formação óssea podem ser divididos em duas categorias: 1) Proteínas que refletem o aumento na diferenciação dos osteoblastos e 2) fragmentos pro colágenos que são liberados durante a incorporação do colágeno na MEC do osso (Sorensen *et al.*, 2007).

Entre as estratégias experimentais investigadas, TR reduziu massa corporal e massa gordo concomitantemente ao aumento na massa magro (Leite *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2010; Shigemoto *et al.*, 2012; Leite *et al.*, 2013; Souza *et al.*, 2014). No entanto o efeito direto do TR e RH no tecido ósseo necessita de mais investigações. Um melhor entendimento da atividade da MMP-2 poderá elucidar as respostas fisiológicas nos ossos frente a diferentes estímulos. Sendo assim, o objetivo deste estudo é investigar a influência do TR na qualidade dos ossos e atividade da MMP-2 neste tecido de animais ovariectomizadas.

3.4- OBJETIVOS

Determinar os efeitos do protocolo de TR de alta intensidade associado ou não com RH na atividade da MMP-2, propriedades biomecânicas e biofísicas do tecido ósseo de ratas ovariectomizadas.

3.5- HIPÓTESE

Nossa hipótese é que a ovariectomia influencia negativamente a saúde do tecido ósseo devido a redução na quantidade e qualidade deste tecido e o TR juntamente com a RH será eficiente em aumentar a quantidade e qualidade do tecido ósseo.

3.6- MATERIAIS E MÉTODOS

3.6.1- APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos Protocolo no 005/2013 e conduzidos de acordo com o guia de cuidados e manuseio de animais laboratoriais dos Estados Unidos da América (National Research Council's, 1996).

3.6.2- ANIMAIS

Foram utilizadas 66 ratas Holtzman (*Rattus norvegicus*), adultas, obtidas do Biotério da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, campus Araraquara. Durante o período experimental, os animais foram mantidos em gaiolas coletivas três ratas por gaiola no biotério do laboratório de Fisiologia do exercício, do departamento de Ciências Fisiológicas, sob condições constantes de temperatura $22 \pm 2^\circ\text{C}$, com iluminação em ciclo invertido (20:00-08:00h ciclo claro; 08:00-22:00h ciclo escuro) com oferta de água e dieta *ad libitum*.

Após a chegada ao biotério do Laboratório de Fisiologia do Exercício - UFSCar os animais permaneceram por três semanas em condição de aclimatação ao biotério e ao ciclo invertido. Após este período, os animais foram distribuídos nos seis grupos experimentais conforme descrito abaixo.

3.6.3- GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram aleatoriamente distribuídos em seis grupos experimentais (figura 1), sendo eles:

1. Sham-operado Sedentário (SHAM Sed);
2. Ovariectomizado Sedentário (OVX Sed);
3. Sham-operado Treinamento Resistido (SHAM TR)
4. Ovariectomizado Treinamento Resistido (OVX TR);
5. Ovariectomizado sedentário Reposição Hormonal (OVX Sed-RH);
6. Ovariectomizado Treinamento Resistido e Reposição Hormonal (OVX TR-RH).

Os animais sedentários (SHAM Sed, OVX Sed e OVX Sed-RH) foram mantidos em gaiolas por todo o período experimental sem nenhum tipo de treinamento. Os animais ovariectomizados (OVS Sed, OVX TR, OVS Sed-RH e OVX TR-RH) tiveram seus ovários removidos (figura 2). Os animais do grupo treinado (SHAM TR, OVX TR e OVX TR-RH) realizaram 12 semanas de TR em escada.

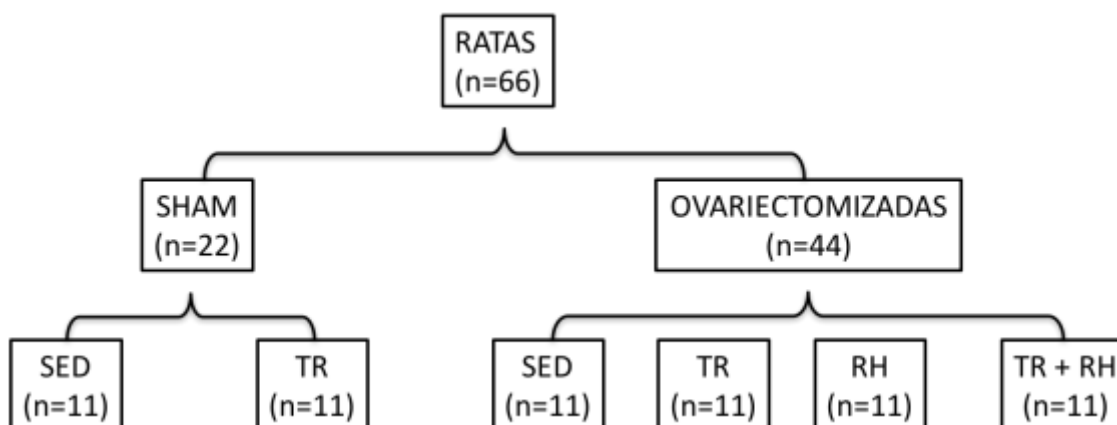


Figura 1. Distribuição dos grupos experimentais.

3.6.4- PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS PARA OVARIECTOMIA E REPOSIÇÃO HORMONAL.

Todos os procedimentos anestésicos e cirúrgicos foram realizados pelo médico veterinário Thiago Francisco de Moraes CRMV – SP 24016.

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados com as ratas sob efeito anestésico de uma mistura de Ketamina-Xilazina (61,5-7,6 mg/kg respectivamente) injetada intraperitonealmente. Para a ovariectomia foi realizada uma pequena incisão bilateral (1,0 -1,5 cm) através da pele e da camada muscular, entre a última costela e a coxa, em paralelo com a linha corporal do animal. A cavidade peritoneal foi aberta e realizada uma ligadura abaixo da fimbria (Figura 2). Os ovários foram removidos e as incisões feitas na pele e músculos suturados. A cirurgia SHAM foi realizada através dos mesmos procedimentos da ovariectomia, com exceção da ligadura abaixo da fimbria e da remoção dos ovários, os quais foram apenas expostos e devolvidos ao local de origem. Após 7 dias de ovariectomia, foi realizado o implante da cápsula Silastic® nos grupos RH e placebo através de uma incisão de 0,5 cm no dorso das ratas com posterior sutura da pele. A adaptação ao treinamento iniciou-se 3 dias após o implante. Foi utilizado Cloridrato de Tramadol, 20 mg/kg por via subcutânea para ação antibiótica a cada 24 horas durante cinco dias após os procedimentos cirúrgicos.

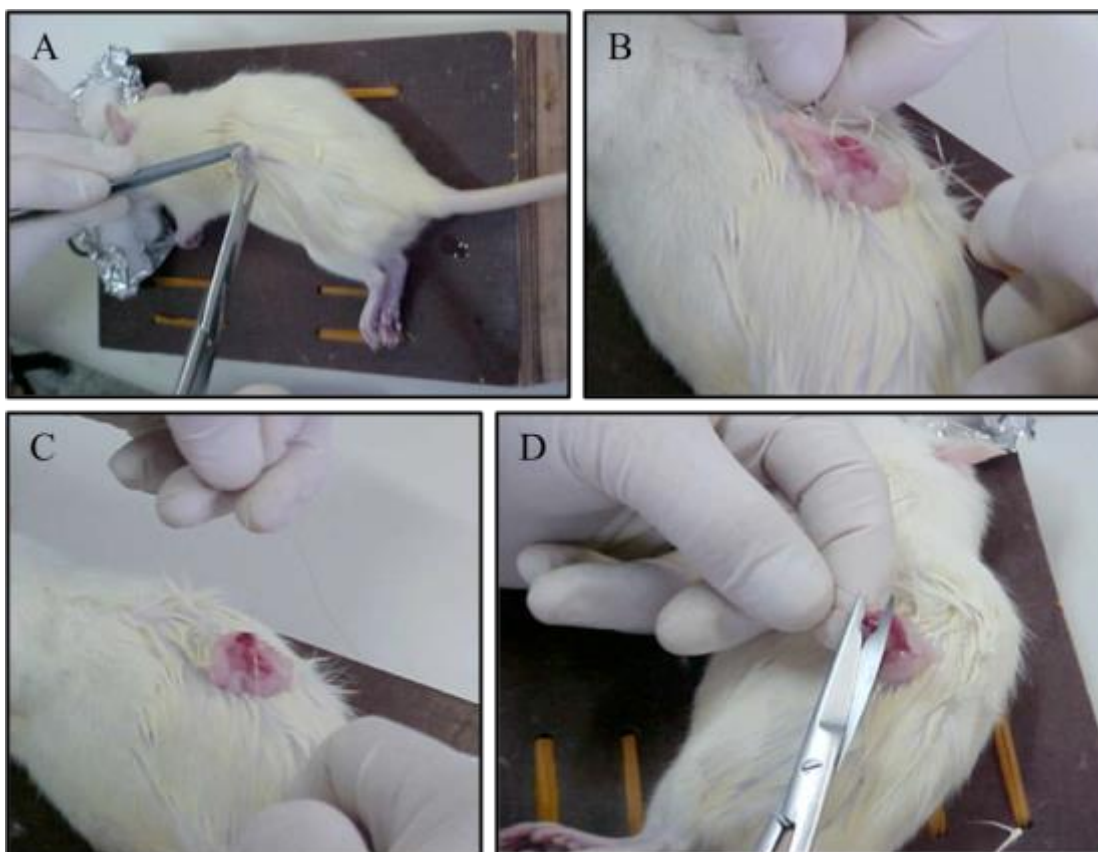


Figura 2. Figura retirada e adaptada de (Pereira, 2010). Procedimento de ovariectomia. A) Anestesia e incisão lateral. B) Exposição do ovário. C) Laqueadura com linha cirúrgica do ovário. D) Remoção do ovário, reintrodução para a cavidade abdominal e sutura final com linha cirúrgica.

3.6.5- REPOSIÇÃO HORMONAL (RH)

A RH foi realizada de acordo com o protocolo de Ingberg *et al.* (2012), por meio de cápsulas Silastic® (Dow Corning, VWR International, Buffalo Grove, IL, EUA) de 15 mm de comprimento e diâmetro interno de 1,02 mm, com uma solução de 5% de 17 β -Estradiol (180 μ g de 17 β -Estradiol/mL dissolvido em óleo de girassol). O volume da solução administrada em cada cápsula foi de 10 μ L, após adição, as cápsulas foram seladas em ambos os lados com cola Silastic®. As cápsulas foram armazenadas a seco por 24h para secagem da cola. Após a secagem, foram mantidas em solução fisiológica (Salina 0,9%) por no mínimo 2h. O veículo utilizado nas cápsulas dos grupos com RH e placebo foi o óleo de girassol.

3.6.6- TREINAMENTO RESISTIDO

3.6.6.1- APARATOS DE TREINAMENTO

Foi utilizada uma escada vertical (1,1 x 0,18 m, degraus de 2 cm, inclinação de 80°) com uma gaiola de dimensões 20 x 20 x 20 cm. Foi utilizado tubo falcon com chumbada de pesca atado à porção proximal a cauda das ratas como carga de carregamento (Figura 2).

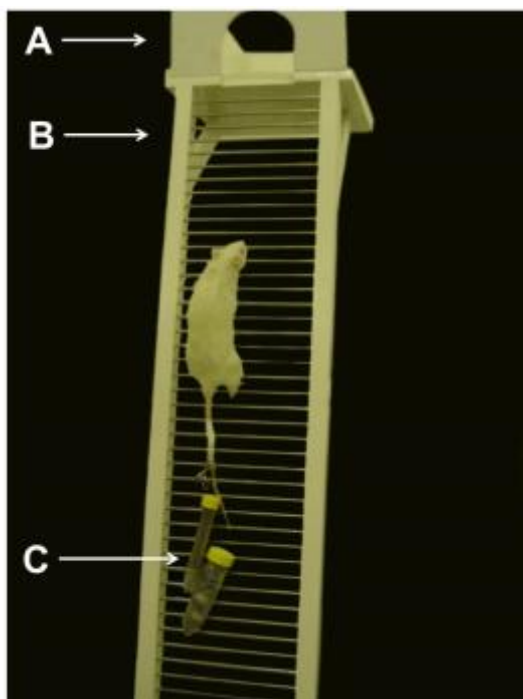


Figura 3. Escada para treinamento de força (Leite *et al.*, 2009). A = Local de descanso depois de cada subida (2 minutos de descanso); B = Escada utilizada para a realização do TR; C = tubo falcon atado a cauda do animal contendo pesos utilizados como carga de treinamento.

3.6.6.2- FAMILIARIZAÇÃO AO TREINAMENTO

A familiarização ao treinamento foi realizada por 2 dias consecutivos seguindo os seguintes critérios:

- com o aparato fixado a cauda, as ratas eram colocadas na parte inferior da escada e familiarizadas com a escalada.
- caso necessário, um estímulo com dedos em movimento de pinça era aplicado na cauda do animal para iniciar o movimento de escalada.
- as dimensões da escada obrigavam os animais a realizarem 8-12 movimentos por escalada.
- ao atingir a gaiola no topo da escada as ratas descansavam durante 2 minutos.
- este procedimento repetia-se até que os animais escalassem voluntariamente a escada por três vezes consecutivas, sem a necessidade de estímulo.

3.6.6.3- DETERMINAÇÃO DA CARGA DE CARREGAMENTO

Três dias após a familiarização, foi realizada a determinação da carga máxima de carregamento, da seguinte maneira:

- a primeira escalada consistiu em carregar uma carga de 75% da massa corporal do animal.
- após 2 minutos de recuperação, a segunda escalada foi realizada com a adição de um peso de 30g.
- este acréscimo de 30 g na carga foi repetido em cada escalada até uma carga com a qual a rata não conseguiu escalar toda a escada mesmo após três estímulos sucessivos na cauda.
- a maior carga efetivamente carregada por toda a escada foi considerada a capacidade máxima de carregamento da rata.

3.6.6.4- SESSÕES DE TREINAMENTO

As sessões de treinamento aconteceram seguindo os seguintes critérios:

- cada sessão de treino consistiu em um mínimo de quatro, e um máximo de nove escaladas.
- as quatro escaladas iniciais consistiam respectivamente a 50%, 75%, 90% e

100% da capacidade máxima de carregamento do animal, determinada na sessão anterior.

- após a quarta escalada foram realizadas um máximo de cinco escaladas adicionando-se 30g de carga até que uma nova capacidade máxima de carregamento fosse determinada (Figura 4).

- as sessões de treino foram realizadas a cada 72 horas não havendo dias semanais fixos para treinamento, durante 12 semanas, totalizando 27 sessões de treino resistido. Esse protocolo de TR foi adaptado de (Hornberger e Farrar, 2004), mediante as necessidades do presente estudo.

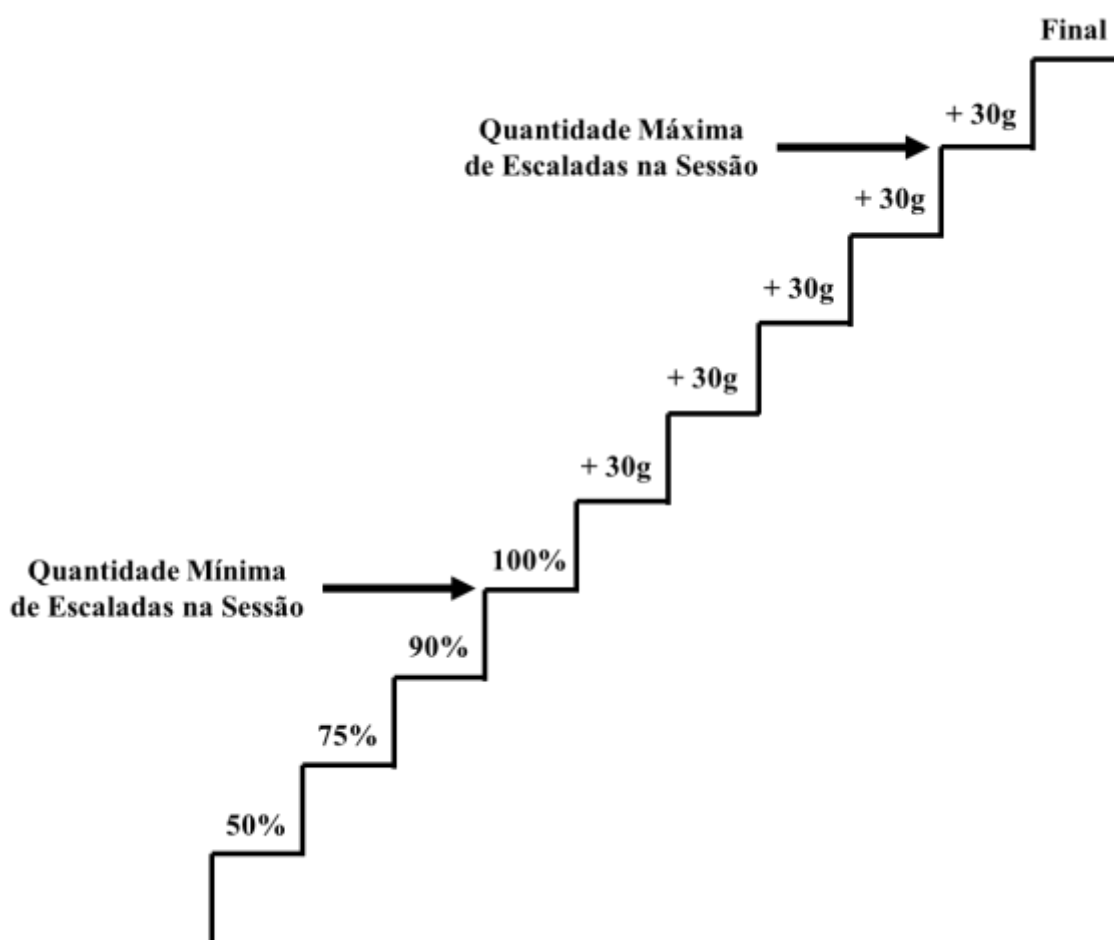


Figura 4. Organização da carga de carregamento por sessão de treino.

3.6.7- CONTROLE DA INGESTÃO ALIMENTAR E DA MASSA CORPORAL

A ingestão alimentar (gramas de ração consumida por gaiola) foi monitorada diariamente, sempre no mesmo horário do dia. A massa corporal foi verificada sempre

as segundas, quartas e sextas-feiras sempre no mesmo horário em uma balança digital de precisão KERN® modelo 573 (Balingen, Alemanha). Ambos os procedimentos foram realizados durante todo o período experimental. Esses controles foram realizados para identificar possíveis alterações causadas pelas diferentes intervenções realizadas.

3.6.8- EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E RETIRADA DOS TECIDOS

Ao término do período experimental os animais foram eutanasiados por decapitação, com igual período de intervenções experimentais sendo os grupos treinados, eutanasiados 48 horas após a última sessão de treino. Os tecidos foram retirados na seguinte ordem:

- 1- Fígado;
- 2- Útero;
- 3- Gordura mesentérica, parametrial e retroperitoneal;
- 4- Músculos: sóleo, plantar e gastrocnêmio;
- 5- Tíbias e Fêmures;

Todos os tecidos foram armazenados primeiramente em nitrogênio líquido e em seguida estocados no freezer -80°C, inclusive os ossos, para em seguida realizar as análises bioquímicas e biomecânicas. A Tíbia direita foi utilizada para análise da atividade da MMP-2 e a tíbia esquerda para análise das propriedades físicas e biomecânicas do tecido ósseo. O fêmur direito foi utilizado para avaliação do conteúdo de cálcio e fósforo e o fêmur esquerdo para análise da densitometria óssea.

3.6.9- ANÁLISE DA ATIVIDADE DA MMP-2

As técnicas para determinação da atividade da MMP-2 nos ossos foram realizadas de acordo com protocolo estabelecido por (Marqueti *et al.*, 2008), o qual foi adaptado para este estudo. Cada grupo de animais foi analisado separadamente. Foi realizada a limpeza da tíbia e a remoção do tecido periférico (células musculares e demais membranas) e 100mg do terço proximal da tíbia (abaixo da epífise de crescimento) foi macerado em nitrogênio líquido. As amostras foram homogeneizadas e incubadas em 1,5 ml de tampão de extração [10mM de ácido cacodílico (pH 5,0), 0,15 M NaNO₃ e 0,01% de Triton X-100] a 4°C por um período de 24 horas.

Após este tempo o tampão de extração foi coletado por centrifugação (20 minutos, 4°C em 13.000 rpm). As amostras foram concentradas de maneira que cada poço do gel de zimografia tinha 10 µg de proteína e 10 µl de tampão de amostra sem β-mercapto (agente redutor), totalizando 20 µl de solução por poço. As amostras foram resolvidas por eletroforese em gel de policriamida contendo SDS e gelatina na concentração final de 2mg/ml.

Depois de corrido o gel foi lavado uma vez durante 30 minutos em solução 2,5% de Triton X-100 para remoção do SDS. O gel foi incubado no tampão de substrato (Tris-HCl 50mM pH 8,0, CaCl₂ mM e NaN₃ 0,02%), a 37°C, durante 20 horas. Após este tempo, os géis foram corados com Coomassie Blue Brilliant R-250 (Bio-Rad®) por 1 h e 30 minutos e descorados posteriormente com ácido acético, para visualização das áreas de atividade.

A atividade genotóxica foi visualizada como faixas claras no gel corado. Os géis foram fotografados com uma câmara Canon G6 Power Shot 7.1 megapixels (Virginia, USA). As médias de intensidade de banda foram mensuradas por meio do software Gene Tools® (Philimath, OR, USA). Foi utilizado o software “Kodak Digital Science 1D” para fotografar o gel e visualizar a atividade proteolítica das bandas. Os dados foram expressos como a concentração da MMP-2 (ou seja, a totalidade da densidade óptica integrada para a MMP-2 pró-enzima, intermediária e ativo). As análises foram realizadas no Laboratório de Fisiologia do Exercício, Farmacologia, Bioquímica e Biologia Molecular do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar.

3.6.10- PROPRIEDADES BIOMÉTRICAS E BIOMECÂNICAS

3.6.10.1- MEDIDA DO COMPRIMENTO DA TÍBIA ESQUERDA

As medidas foram realizadas com utilizando-se um paquímetro (precisão de 0,05 mm) tomando como referência o platô tibial e o maléolo tibial.

3.6.10.2- ANÁLISES BIOMECÂNICAS

Após as análises biométricas das tíbias esquerdas dos animais, os ossos foram mantidos em um dessecador por 24 horas com objetivo da retirada do ar presente nos

poros. Em seguida foram obtidas as massas imersa (M_i) e úmida (M_u); a partir desse ponto, iniciou-se as análises biomecânicas. As propriedades mecânicas das tíbias esquerdas foram mensuradas por intermédio do teste de flexão em três pontos realizado em uma máquina de ensaio universal Instron modelo 4444 (Instron, Canton, MA, USA), com célula de carga com capacidade de 100 kgf. As extremidades (regiões metafisárias) dos ossos foram apoiadas em dois roletes com diâmetro de 3 mm, distanciados em 21,70 mm e a carga aplicada na região central de cada osso (Trebacz e Zdunek, 2006). No início do teste foi aplicada uma pré-carga de 10 N por uma haste cilíndrica com um rolete de 3 mm na extremidade, no sentido pósterio-anterior e perpendicular ao eixo longitudinal para estabilizar a tibia. O tempo de acomodação foi de um minuto para todos os grupos e após a estabilização e a acomodação, foi aplicada uma força no mesmo sentido, com velocidade constante de 0,5 cm/min até o momento da fratura. Como resultado da força aplicada à tibia, obteve-se um gráfico força-deformação fornecido pelo software Instron Series IX. Por meio desta curva, obtiveram-se as principais propriedades biomecânicas: - Carga máxima (N): a maior força suportada pelo osso durante o teste;

- Força de ruptura (N): força obtida no momento da fratura;

- Rigidez (N/mm): capacidade do material de sofrer força sem se deformar permanente.

3.6.11- DENSITOMETRIA

Depois das análises biomecânicas foi analisado usando o aparelho de densitometria DPX-ALPHA, com um software específico para animais (Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba/UNESP, Araçatuba - SP) a área (cm^2), o conteúdo mineral ósseo (CMO em mg) e a densidade mineral óssea (DMO em mg/cm^3) (Lelovas *et al.*, 2008).

Cálculo da densidade mineral óssea:

$$DMO = CMO/\text{Área}$$

3.6.12- PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS

3.6.12.1- CONTEÚDO DE CÁLCIO DO FÊMUR DIREITO

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

Análise Estatística

Foi realizado o Teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. As diferenças entre os grupos foram analisadas por ANOVA one-way, seguido do teste de post-hoc de Fisher ($p < 0,05$).

Todos os procedimentos estatísticos foram realizados pelo pacote estatístico SPSS statistics (versão 20)

3.7- RESULTADOS

Não houve diferença estatística na massa corporal dos animais no início no experimento. Os grupos OVX Sed, OVX Sed-RH e OVX TR apresentaram massa corporal significativamente maior quando comparado com os grupos SHAM Sed e SHAM TR ($p < 0,05$; Tabela 2). Não diferença estatística entre os grupos OVX TR-RH e Sham (Sed e TR). O grupo OVX Sed obteve valores significativamente maiores no consumo alimentar e menor peso na tibia e útero ($p < 0,05$; tabela 2). A associação do TR e RH demonstraram ser mais efetiva do que apenas o TR isolado. Ainda, foi observado maior peso da tibia nos animais do grupo OVX TR-RH quando comparado com os grupos SHAM Sed e OVX Sed ($p < 0,05$; tabela 2).

Os grupos treinados demonstraram aumentos progressivos na carga de trabalho por sessão (aumentando da sessão 1 para a 13 e da sessão 13 para a 27). A maior carga de trabalho foi observada na sessão 27 ($p < 0,05$; Tabela 3).

Tabela 2: Massa corporal (g), Consumo alimentar (g/d), Peso do útero (g), Peso da tibia (g) e Comprimento da tibia (mm).

	Grupos Experimentais					
	Grupos Sham (SHAM)		Grupos Ovariectomizados (OVX)			
	Sed	RT	Sed	RT	Sed-HR	RT-HR
PC Inicial	246,8±12,3	250,1±13,8	240,2±14,6	245,3±15,4	247,1±15,6	251,5±16,0
PC Final	305,6±18,6 ^a	317,4±12,9 ^{ab}	358,9±33,5 ^{ab}	346,2±23,0 ^{abcd}	306,5±30,2 ^{acd}	316,1±30,2 ^{abde}
Consumo alimentar	21,0±0,5	22,7±0,5	23,3±0,9 ^b	23,2±0,6 ^b	22,2±0,8	22,5±0,7
Peso do útero	0,67±0,0	0,63±0,0	0,11±0,0 ^{bc}	0,09±0,0 ^{bc}	0,64±0,0 ^{de}	0,62±0,0 ^{de}
Peso Tibia	0,57±0,0	0,66±0,0	0,61±0,0 ^{bc}	0,65±0,0 ^b	0,60±0,0	0,61±0,0 ^b
Comprimento da Tibia	4,02±0,1	4,06±0,0	4,13±0,0	4,11±0,0	3,97±0,0	3,98±0,0

Os valores são apresentados em media desvio padrão (DP), (n=11 animais por grupo). PC indica massa corporal. ^a, Diferença estatística quando comparado PC final com os PC inicial (p<0,05). ^b, Diferença significativa entre o grupo Sham Sed (p<0,05). ^c, Diferença estatística quando comparado com o grupo Sham-RT (p<0,05). ^d, Diferença estatística quando comparado com o grupo Ovx-Sed (p<0,05). ^e, Diferença significativa quando comparado com o grupo Ovx-RT (p<0,05).

Tabela 3: Carga Máxima de Trabalho (g)

Grupos	TR Sessão 1	TR Sessão 13	TR Sessão 27
SHAM RT	370,5 ± 43,7	755,09 ± 100,32 ^a	962,3 ± 92,05 ^{bc}
OVX RT	334,3 ± 57,1	762,5 ± 84,4 ^a	926,1 ± 78,2 ^b
OVX RT-HR	350,0 ± 44,3	750,9 ± 96,5 ^a	971,8 ± 111,1 ^{bc}

Valores são apresentados em média desvio padrão da média (DP), (n= 11 animais por grupo). TR indica treinamento resistido. ^a, Diferença significativa quando comparado com a sessão 1 de treinamento (p<0,05). ^b, Diferença estatística quando comparado as sessões 1 e 13 (p<0,05). ^c, Diferença significativa quando comparado com o grupo OVX RT.

A figura 5 apresenta os resultados das análises físicas: DO, CMO e área. Quando comparado os grupos SHAM Sed e SHAM TR, o grupo SHAM TR obteve valores superiores de área óssea (3,2%), de CMO (10%) e de DO (18,7%). Para a comparação entre os grupos SHAM Sed e OVX Sed, o grupo SHAM Sed obteve valores superiores de área (5,4%), CMO (9,5%) e DO (15,2%). Já na análise entre os grupos OVX TR e OVX Sed, o grupo OVX TR apresentou uma maior área (5,4%), maior CMO (11,7%) e DO (16,9%). Quando avaliado os grupos OVX RH e OVX Sed, a RH foi capaz de aumentar em 3,4% a área do osso, 20% o CMO e em 26,6% a DO. Por fim, no comparativo dos grupos OVX RH TR com o OVX Sed, a RH e o TR aumentaram a área (9,1%), o CMO (24,5%) e a DO (34,3%). Sendo estes valores apresentados acima com (p<0,05).

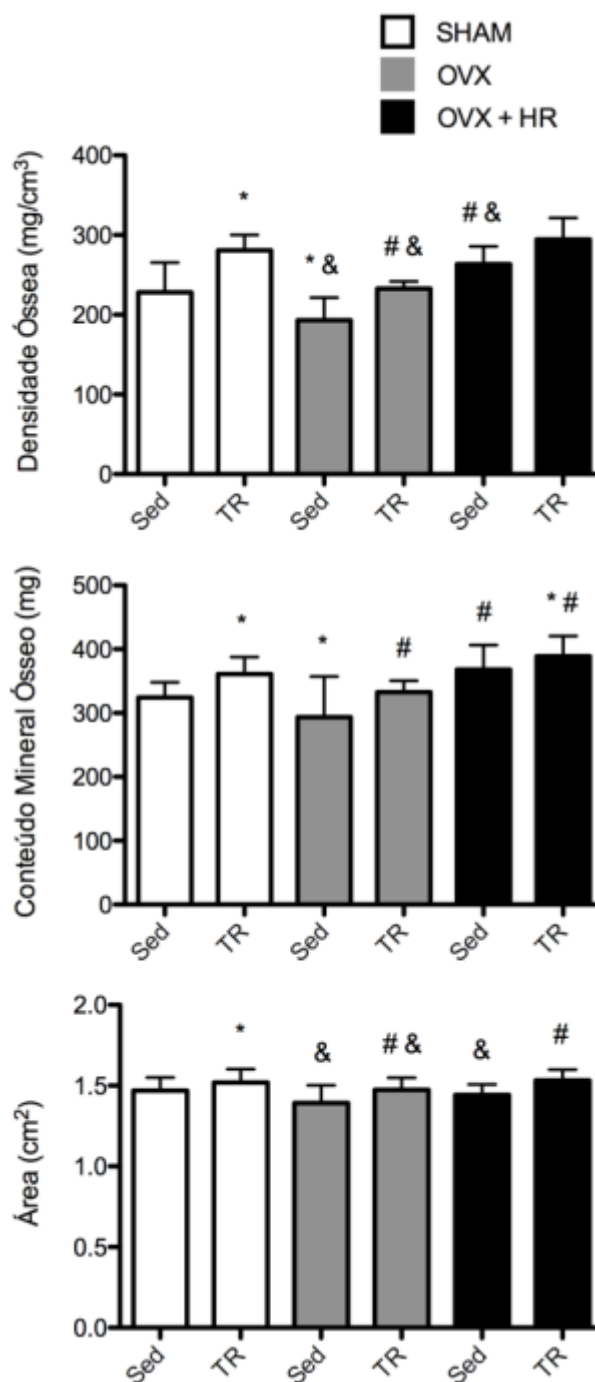


Figura 5: Análise física da tíbia esquerda. Densidade óssea (DO) em miligramas por centímetro cúbico (mg/cm^3), Conteúdo mineral ósseo (CMO) em miligramas (mg) e Área em centímetro ao quadrado (cm^2). Valores apresentados em média \pm desvio padrão da média, $p < 0,05$. * Diferença estatística quando comparado com o grupo SHAM Sed, # Diferença estatística quando comparado com o grupo OVX Sed e & Diferença estatística quando comparado com o grupo OVX TR-RH.

O TR foi capaz de aumentar as concentrações de cálcio e fósforo nos ossos. Quando comparado os grupos SHAM Sed e SHAM RT, o TR induziu significantes aumentos nas concentrações de cálcio (7,8%) e fósforo (17,5%) ($p < 0,05$; Figura 6). Por outro lado, a ovariectomia reduziu as concentrações de cálcio (10,2%) e fósforo (17,4%), isto pode ser observado quando comparado os grupos OVX Sed com o SHAM Sed ($p < 0,05$). Quando comparado o grupo OVX TR com OVX Sed, observamos que o grupo treinado obteve valores superiores de concentração de cálcio (12,8%) e fósforo (22,8%) quando comparado com o grupo OVX Sed. Ainda, o grupo OVX RH apresentou valores superiores de concentração de cálcio (9,1%) e fósforo (5,9%) em relação ao grupo OVX Sed. Por fim, o grupo OVX TR RH apresentou a concentração de cálcio maior 11,5% e de fósforo 24,4% quando comparado com o grupo OVX Sed, todos estes valores foram significativamente diferentes ($p < 0,05$), mas não houve diferença estatística entre estas variáveis, isto é observado nos grupos OVX TR, OVX Sed-RH e OVX TR-RH quando comparado com o grupo OVX Sed.

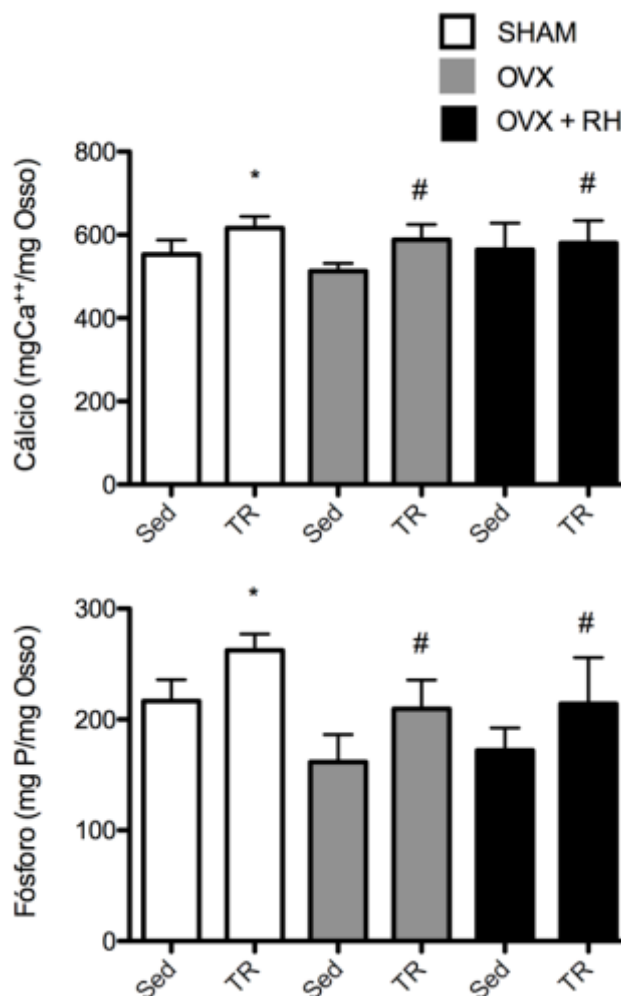


Figura 6: Apresenta a análise de cálcio (Ca⁺⁺) e Fósforo (P) em grama de fósforo por grama de tecido ósseo (g P/g de osso) na tíbia esquerda. Cálcio em miligramas de cálcio por miligramas de tecido ósseo (mg Ca⁺⁺/mg de osso). Valores apresentados em média \pm desvio padrão da média, $p < 0,05$. * Diferença estatística quando comparado com o grupo SHAM Sed, # Diferença estatística quando comparado com o grupo OVX Sed.

A figura 7 apresenta o gráfico para as variáveis biomecânicas. O grupo OVX Sed apresentou os valores das variáveis biomecânicas significativamente menores do que no grupo SHAM Sed ($p < 0,05$). A comparação entre o SHAM Sed e SHAM TR demonstra que o TR induziu maior rigidez (20,4%), carga no ponto de fratura (15%) e carga máxima (24,5%) ($p < 0,05$). Quando comparado dos grupos OVX Sed com SHAM Sed, observa-se que os valores das análises biomecânicas foram superiores no grupo SHAM Sed, sendo a rigidez superior 19,9%, a carga no ponto de fratura 30,2%, e a carga máxima 23,1%. Na comparação entre os grupos ovariectomizados, observa-se que o grupo OVX TR obteve valor biomecânicos superiores ao grupo OVX Sed, sendo eles: rigidez superior 22,3%, a carga no ponto de fratura 37%, e a carga máxima 35%. O

grupo OVX RH também obteve valores superiores nas análises biomecânicas, onde rigidez superior 26,7%, a carga no ponto de fratura 37,0%, e a carga máxima 29,2%. Por fim, estas análises também foram superiores no grupo OVX RH TR: rigidez superior 33,4%, a carga no ponto de fratura 39,0%, e a carga máxima 42,3%. Sendo estes valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

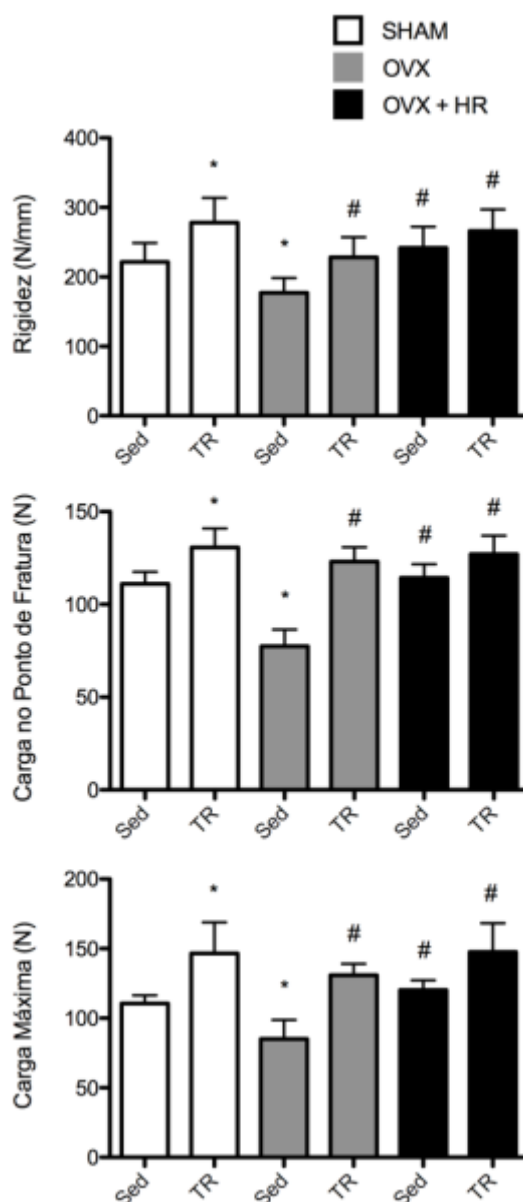


Figura 7: Apresenta as análises biomecânicas na tíbia esquerda. Rigidez (N/mm), Carga no ponto de fratura (N) e Carga máxima (N). Valores apresentados em média \pm desvio padrão da média, $p < 0,05$. * Diferença estatística quando comparado com o grupo SHAM Sed, # Diferença estatística quando comparado com o grupo OVX Sed.

Nós observamos maior atividade da MMP-2 [isoformas pró (75,2%) e ativa (73,5%)] (figura 8) quando comparamos os grupos SHAM TR ao grupo SHAM Sed ($p < 0,05$). O procedimento da ovariectomia reduziu em 17,3% as isoformas pró e em 8,5% a ativa da MMP-2 ($p < 0,05$). Quando comparado os grupos OVX TR com OVX Sed no grupo OVX TR as isoforma pró aumentaram 75,4% e a ativa 63,0% ($p < 0,05$). Na comparação entre os grupos OVX Sed e OVX RH, a RH aumentou em 78% a MMP-2 pró e em 69,6% a MMP-2 ativa. E por fim, quando comparamos os grupos OVX TR-RH com OVX Sed, a associação do TR com RH aumentou as isoforma pró em 82,4% e a ativa em 77,8% ($p < 0,05$).

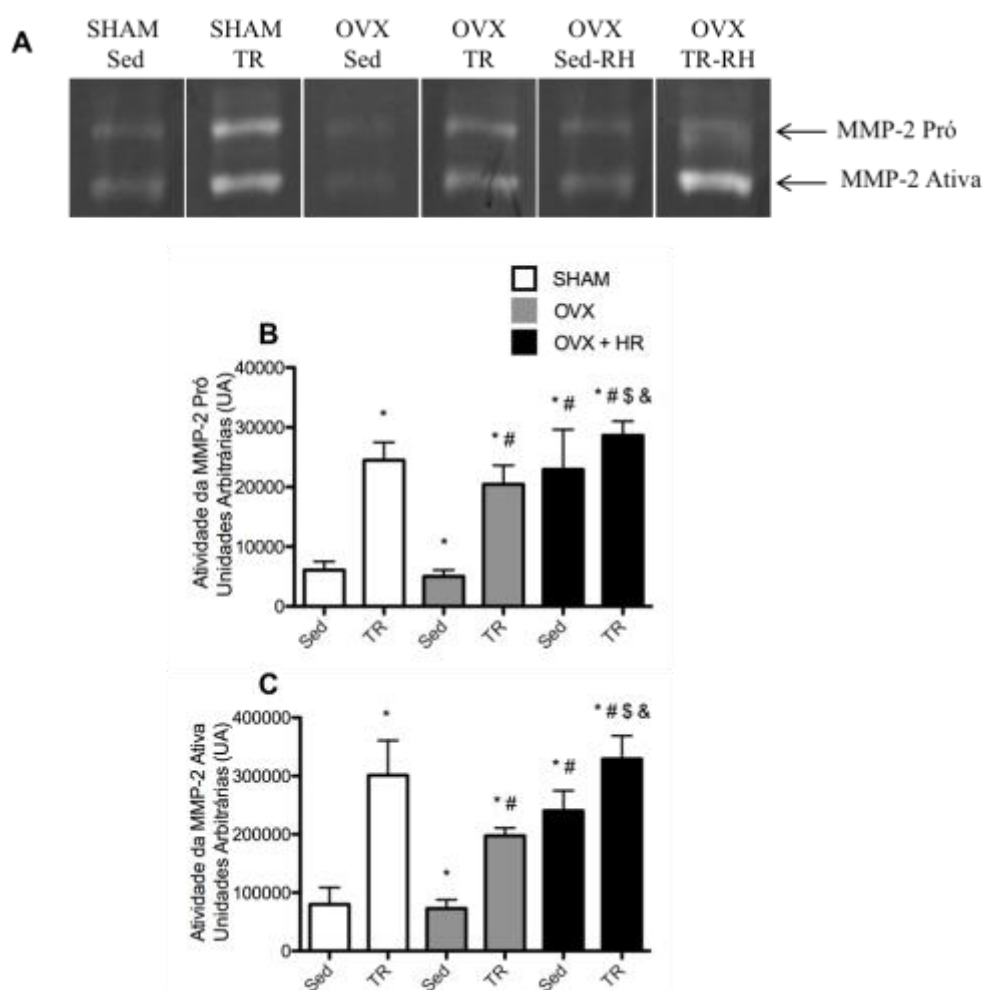


Figura 8: Apresenta os efeitos do treinamento resistido (TR), da ovariectomia e reposição hormonal na MMP-2 em suas formas pró e ativa, análise realizada na tibia direita. Os dados são expressos em unidades arbitrárias (UA). Valores apresentados em média \pm desvio padrão da média, $p < 0,05$. * Diferença estatística quando comparado com o grupo SHAM Sed, # Diferença estatística quando comparado com o grupo OVX Sed. \$Diferença estatística quando comparado com o grupo OVX Sed-RH e &Diferença estatística quando comparado com todos os demais grupos.

3.8- DISCUSSÃO

Este estudo investigou os efeitos da ovariectomia (OVX), reposição hormonal (RH), TR e a combinação do TR com RH no tecido ósseo de ratas. A ovariectomia contribuiu para um aumento na massa corporal e significantes reduções no CMO, DO nos animais do grupo OVX Sed quando comparado com os dos grupos SHAM Sed e SHAM TR, isto mostra que o aumento na massa corporal foi acompanhada por reduções na qualidade do tecido ósseo.

O aumento na massa corporal das ratas ovariectomizadas foi acompanhado por reduções nas concentrações de cálcio, fósforo e atividade da MMP no osso, mostrando que há relação entre os hormônios ovarianos e os marcadores bioquímicos no tecido ósseo. Estas mudanças bioquímicas refletem negativamente nas análises biomecânica (rigidez e força) dos ossos, reduzindo assim, a quantidade e qualidade do tecido. Estes efeitos foram prevenidos com TR e com a combinação entre TR e RH. Interessantemente o TR aumentou as concentrações de cálcio, fósforo e atividade da MMP-2, o que contribuiu para maior força e remodelamento tecidual. Ainda, a associação entre o TR e RH proposto em nosso trabalho aumentou significativamente a atividade da MMP-2. Confirmando nossa hipótese, a atividade da MMP-2 nos grupos TR, com RH e TR + RH foi maior do que nos demais grupos estudados.

A fase mineral do tecido ósseo é composta por cristais de hidroxiapatita e reflete no CMO e na DO. No estudo os níveis de cálcio e fósforo foram maiores nos animais dos grupos treinados e que receberam a RH, mostrando assim que o TR e RH foram efetivos em promover a deposição destes minerais no tecido ósseo e contribuíram para o aumento na força e rigidez deste tecido. O treinamento e a RH foram capazes de aumentar a força, rigidez e carga de fratura do osso. Vários mecanismos que influenciam na atividade osteoclástica e osteoblástica interferindo no remodelamento ósseo pode explicar estes achados. Um dos mecanismos que influenciam a atividade dos osteoblastos e osteoclastos, interferindo no remodelamento do osso está associado com os danos renais que afetam o metabolismo dos minerais como cálcio e fósforo (Rai *et al.*, 2013). O estrógeno é capaz de promover reabsorção tubular de cálcio e consequentemente promover reduções na reabsorção do tecido ósseo, frente a falta dos hormônios ovarianos, os rins poderão reduzir este trabalho, por aumentar a liberação de cálcio na urina. Um aumento na excreção urinária de cálcio é fator estimulante da osteopenia (Nordin e Morris, 1989). Por outro lado, é estabelecido na literatura que o

estresse mecânico produzido pelo exercício pode aumentar a massa óssea (Martin e Houston, 1987; Nguyen, 2012). Este resultado parece ser mediado pela liberação do fator de crescimento relacionado com a insulina (IGF-1) pelos osteoblastos, os quais promovem a proliferação destas células (Milliken *et al.*, 2003; Stanosz *et al.*, 2009). Ainda, o sedentarismo aumentou o remodelamento do osso concomitantemente com uma redução na formação óssea, devido ao aumento na atividade dos osteoclastos e diminuição na atividade dos osteoblastos (Nilsson *et al.*, 2009; Nilsson *et al.*, 2014). Resultados similares foram observados em estudos anteriores (Shiguemoto *et al.*, 2012), o qual demonstrou a interação entre o TR e o aumento na qualidade e quantidade de osso dos ossos de ratas ovariectomizadas. Alguns fatores podem ter contribuído para esta interação, são eles: o aumento na carga de trabalho (massa corporal + carga de treinamento), o aumento nas concentrações hormonais e na deposição de minerais no tecido (Kjaer, 2004). Os resultados do nosso estudo foram compatíveis com os de Pierce *et al.* (2010), que mostraram que o TR de intensidade moderada e alta promovem aumentos no CMO em ratos durante o crescimento. Yang *et al.* (2012) analisando a capacidade de formação óssea a reposição de estrógeno observaram aumentos na formação juntamente com a reabsorção do tecido ósseo.

Os marcadores da matriz extracelular (MEC) também estão envolvidos no remodelamento do osso, Isaksson *et al.* (2009) observaram que o exercício de corrida em ratos por seis meses foi capaz de aumentar a força e rigidez do tecido ósseo por aumentar a deposição mineral e formação de rede de colágeno na matriz. Ainda, Shiguemoto *et al.* (2012) com o mesmo protocolo de treinamento adotado neste estudo reportaram que o TR foi efetivo em aumentar as capacidades biomecânicas por favorecer o aumento na reabsorção deste tecido. A reabsorção óssea acontece em vários passos, incluindo diferenciação e ativação dos osteoclastos, mobilização de minerais e deposição dos mesmos nos ossos e pela degradação das proteínas de matriz (entre elas as Metaloproteinases – MMPs) (Kusano *et al.*, 1998).

As MMPs são importantes para o remodelamento fisiológico e patológico do osso e são proteases dependentes do zinco. Estas proteases são encontradas na forma de pro-MMPs e são reguladas por fatores de crescimento e citocinas produzidas durante o remodelamento tecidual, tornando assim, cruciais para o desenvolvimento do tecido (Kjaer, 2004). O aumento na atividade das MMPs é indicativo de degradação da matriz, um processo necessário para o crescimento do tecido. A MMP-2 em sua forma ativa preserva a massa óssea. Estudos prévios demonstraram que a diminuição na MMP-2

promove destruição do tecido ósseo, favorecendo a osteoporose, fato este que demonstra a importância da MMP-2 no desenvolvimento e manutenção do tecido ósseo (Matsuo e Nango, 2012).

A ovariectomia diminui a atividade da MMP-2 e a produção de colágeno do tipo I e III. No osso, o colágeno do tipo I é encontrado abundantemente e tem a função de promover elasticidade e força no osso (Cao, 2011). Sendo assim, mudanças na quantidade ou estrutura do colágeno, como acontece na osteoporose, pode afetar a propriedade mecânica do tecido e deixa-lo suscetível a fraturas (Isaksson *et al.*, 2009). A desmineralização do osso e a diminuição no colágeno associado com a alta taxa de remodelamento do tecido (balanço ósseo negativo), promove reduções nas propriedades biofísicas e biomecânicas (Shiguemoto *et al.*, 2012). Recentes estudos têm demonstrado que a MMP-2 no osso está diretamente envolvida com a degradação e renovação do colágeno (Matsuo e Nango, 2012).

Nossos resultados mostram uma marcada redução na atividade da MMP-2 e nas suas formas pro e ativa nos animais do grupo OVX Sed quando comparados com os demais grupos, por outro lado, o TR e a reposição hormonal (RH) foram capazes de aumentar tanto a isoforma pro, quanto a ativa da MMP-2. Os resultados de CMO e DO, rigidez e força no ponto de fratura do osso aumentaram, mostrando que há uma relação entre as variáveis de qualidade e quantidade do osso com a atividade da MMP-2, onde a redução na atividade destas metalloproteinas favorecem a degradação do tecido e da estrutura do colágeno e predispõem o osso à osteoporose. Frente a isso, pode-se notar que a ovariectomia favorece o aumento exacerbado da *turnover* ósseo, seguido por rápida perda de massa óssea, estes resultados também foram observados em estudos anteriores. No estudo de Shiguemoto *et al.* (2012), os autores demonstraram que o TR tem efeito na atividade da MMP-2 no osso e causa significantes mudanças na qualidade e quantidade deste tecido. Ramage *et al.* (2009) também mostrara que o estresse mecânico do treinamento junto com a sinalização das citocinas pró-inflamatórias estimulam os condrócitos cartilagosos. Com isto, notamos que o treinamento proposto foi efetivo em reduzir os danos causados pela ovariectomia no tecido ósseo.

A deficiência de estrógeno está relacionada com a ocorrência e progresso do processo de osteopenia e osteoporose (Yang *et al.*, 2012). Baixos níveis hormonais está diretamente relacionados com os aumentos nos níveis de TNF- α (Prior, 2007), de maneira geral a supressão na produção de estrógeno culmina na redução do TNF- α , uma potente citocina que é mediadora primária da reabsorção óssea, ela age via

osteoprotegerina (OPG), um marcador de ativação do fator- $k\beta$ (RANK) e inibe a transformação das células tronco mesenquimais em osteoclastos, que para ser ativada dependem dos fatores de transcrição relacionado com a runt (RUNX-2), de proteínas morfogenéticas do osso e fator transformante beta (TGF- β) (Rosen e Bouxsein, 2006). Diminuição nos níveis de estrogênio ocasiona liberação do TNF- α pelas células imunes e o TNF- α estimula diretamente catabolismo ósseo por ativação dos osteoclastos. Interessantemente, a falta dos hormônios ovarianos pode não apenas suprimir a osteoblastogênese, mas pode promover a reabsorção por causa dos adipócitos presentes na medula óssea, que são moléculas de gordura que secretam citocinas pró-inflamatórias capaz de destruir as células osteoclásticas (Prior, 2007).

Além disso há uma complexa inter-relação entre os níveis de estrogênio e gordura no interior do tecido ósseo (Mansell *et al.*, 2007). Martin e Zissimos (1991) mostraram que existe grande infiltração de gordura na medula óssea de ratas após a ovariectomia, propondo assim, que o estrogênio possui papel fundamental na formação dos adipócitos na medula óssea. Por outro lado, a presença de aromatases nos adipócitos permite maior conversão intra medular da testosterona em estrogênio ou estradiol, o que pode conter a reabsorção óssea (Mansell *et al.*, 2007).

O treinamento e a reposição hormonal proposto neste estudo aumentou significativamente a atividade da MMP-2, isto foi acompanhado por aumentos no CMO, na DO, rigidez e força do osso. Estes resultados também foram observados em outros estudos com animais intactos (Shigemoto *et al.*, 2012), demonstrando que o TR de alta intensidade afeta positivamente a massa óssea desses animais. O efeito positivo da RH nas características e mudanças na matriz óssea é amplamente observado.

A RH promove remodelamento tecidual por favorecer a ativação de biomarcadores envolvidos no processo, sendo eles: 1- marcadores que atuam na reabsorção óssea, como as citocinas pró-inflamatórias; 2- marcadores que atuam na diferenciação dos osteoclastos como a RANKL e IL-6, favorecendo a reabsorção do tecido e 3- marcadores que atuam na formação óssea. Os marcadores de formação podem ser divididos em duas categorias: 1- proteínas que refletem o aumento e diferenciação dos osteoclastos como TGF- β e RUNX-2; 2- fragmentos de pró-colágeno que são liberados durante a incorporação do colágeno na matriz óssea (Sorensen *et al.*, 2007).

Os resultados mostram que o TR em escada pode melhorar as propriedades biomecânicas e biofísicas do tecido ósseo de ratas ovariectomizadas, melhorando assim

o remodelamento do tecido por aumentar a atividade da MMP-2 na tíbia, o aumento nos níveis de cálcio e fósforo permitiram o tecido aumentar a força e rigidez. Uma limitação do nosso estudo é a falta de análises do colágeno, citocinas pró-inflamatórias e os marcadores da diferenciação dos osteoblastos e osteoclastos, uma vez que estas variáveis têm importância na função, promoção de elasticidade e força do osso.

Neste estudo, foi apresentada evidências de que a ovariectomia promove mudanças drásticas e negativas na atividade da MMP-2 e favorece reduções nas propriedades biofísicas e biomecânicas do osso, mimetizando assim, os efeitos da menopausa no remodelamento do tecido ósseo. No entanto, o TR de alta intensidade proposto no estudo foi efetivo em prevenir os efeitos da ausência dos hormônios ovarianos no osso de ratas ovariectomizadas. E quando associou-se o TR com a RH estes resultados foram mais favoráveis para a saúde do tecido ósseo, apresentando efeito modelador na massa óssea dos animais, confirmando assim, a hipótese do nosso estudo. Provavelmente o TR e RH proporcionarão efeitos positivos no tecido ósseo, no entanto, são necessários mais estudos com este protocolo, para testar os mecanismos exatos envolvidos neste tecido e no sistema como um todo.

4- REFERÊNCIAS

ABDALLAH, B. M.; KASSEM, M. New factors controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis. **Bone**, v. 50, n. 2, p. 540-5, Feb 2012. ISSN 1873-2763 (Electronic)

1873-2763 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21745614> >.

AKUNE, T. et al. PPARgamma insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. **J Clin Invest**, v. 113, n. 6, p. 846-55, Mar 2004. ISSN 0021-9738 (Print)

0021-9738 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15067317> >.

ALI, M. A. et al. Mechanisms of cytosolic targeting of matrix metalloproteinase-2. **J Cell Physiol**, v. 227, n. 10, p. 3397-404, Oct 2012. ISSN 1097-4652 (Electronic)

0021-9541 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22212960> >.

ANANDACOOMARASAMY, A. et al. The impact of obesity on the musculoskeletal system. **Int J Obes (Lond)**, v. 32, n. 2, p. 211-22, Feb 2008. ISSN 1476-5497 (Electronic)

0307-0565 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17848940> >.

ANEK, A.; KANUNGSUKASEM, V.; BUNYARATAVEJ, N. Effects of Aerobic Step Combined with Resistance Training on Biochemical Bone Markers, Health-Related Physical Fitness and Balance in Working Women. **J Med Assoc Thai**, v. 98 Suppl 8, p. S42-51, Sep 2015. ISSN 0125-2208 (Print)

0125-2208 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26529814> >.

BALSAMO, S. et al. Resistance training versus weight-bearing aquatic exercise: a cross-sectional analysis of bone mineral density in postmenopausal women. **Rev Bras Reumatol**, v. 53, n. 2, p. 193-8, Apr 2013. ISSN 1809-4570 (Electronic)

0482-5004 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23856796> >.

BASAT, H.; ESMAEILZADEH, S.; ESKIYURT, N. The effects of strengthening and high-impact exercises on bone metabolism and quality of life in postmenopausal women: a randomized controlled trial. **J Back Musculoskelet Rehabil**, v. 26, n. 4, p. 427-35, 2013. ISSN 1878-6324 (Electronic)

1053-8127 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23948830> >.

BETANCOURT ORTIZ, S. L. [Bone mineral density, dietary calcium and risk factor for presumptive osteoporosis in Ecuadorian aged women]. **Nutr Hosp**, v. 30, n. 2, p. 372-84, 2014. ISSN 1699-5198 (Electronic)

0212-1611 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25208793> >.

BONNER, F. J., JR. et al. Health professional's guide to rehabilitation of the patient with osteoporosis. **Osteoporos Int**, v. 14 Suppl 2, p. S1-22, 2003. ISSN 0937-941X (Print)

0937-941X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12759719> >.

BOYCE, B. F. et al. The osteoclast, bone remodelling and treatment of metabolic bone disease. **Eur J Clin Invest**, v. 42, n. 12, p. 1332-41, Dec 2012. ISSN 1365-2362 (Electronic)

0014-2972 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22998735> >.

BROWN, M. Skeletal muscle and bone: effect of sex steroids and aging. **Adv Physiol Educ**, v. 32, n. 2, p. 120-6, Jun 2008. ISSN 1522-1229 (Electronic)

1043-4046 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18539850> >.

CABRAL, W. A. et al. Abnormal type I collagen post-translational modification and crosslinking in a cyclophilin B KO mouse model of recessive osteogenesis imperfecta. **PLoS Genet**, v. 10, n. 6, p. e1004465, Jun 2014. ISSN 1553-7404 (Electronic)

1553-7390 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24968150> >.

CALLEWAERT, F.; BOONEN, S.; VANDERSCHUEREN, D. Sex steroids and the male skeleton: a tale of two hormones. **Trends Endocrinol Metab**, v. 21, n. 2, p. 89-95, Feb 2010. ISSN 1879-3061 (Electronic)

1043-2760 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19837603> >.

CAO, J. J. Effects of obesity on bone metabolism. **J Orthop Surg Res**, v. 6, p. 30, 2011. ISSN 1749-799X (Electronic)

1749-799X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21676245> >.

CAO, J. J. et al. Aging increases stromal/osteoblastic cell-induced osteoclastogenesis and alters the osteoclast precursor pool in the mouse. **J Bone Miner Res**, v. 20, n. 9, p. 1659-68, Sep 2005. ISSN 0884-0431 (Print)

0884-0431 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16059637> >.

CHAPURLAT, R. D.; DELMAS, P. D. Bone microdamage: a clinical perspective. **Osteoporos Int**, v. 20, n. 8, p. 1299-308, Aug 2009. ISSN 1433-2965 (Electronic)

0937-941X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19291343> >.

CHEN, Q. et al. Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts? **Cell Death Differ**, v. 23, n. 7, p. 1128-39, Jul 2016. ISSN 1476-5403 (Electronic)

1350-9047 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26868907> >.

DE OLIVEIRA, M. L. et al. Mechanical vibration preserves bone structure in rats treated with glucocorticoids. **Bone**, v. 46, n. 6, p. 1516-21, Jun 2010. ISSN 1873-2763 (Electronic)

1873-2763 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20152951> >.

DEMPSTER, D. W.; LINDSAY, R. Pathogenesis of osteoporosis. **Lancet**, v. 341, n. 8848, p. 797-801, Mar 27 1993. ISSN 0140-6736 (Print)

0140-6736 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8096008> >.

DEVLIN, M. J. Estrogen, exercise, and the skeleton. **Evol Anthropol**, v. 20, n. 2, p. 54-61, Mar-Apr 2011. ISSN 1520-6505 (Electronic)

1060-1538 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22034104> >.

DOMINGOS, M. M. et al. Resistance training restores the gene expression of molecules related to fat oxidation and lipogenesis in the liver of ovariectomized rats. **Eur J Appl Physiol**, Aug 10 2011. ISSN 1439-6327 (Electronic)

1439-6319 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21830097> >.

DY, C. J. et al. Sex and gender considerations in male patients with osteoporosis. **Clin Orthop Relat Res**, v. 469, n. 7, p. 1906-12, Jul 2011. ISSN 1528-1132 (Electronic)

0009-921X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21400003> >.

FALCAI, M. J. et al. The osteogenic effects of swimming, jumping, and vibration on the protection of bone quality from disuse bone loss. **Scand J Med Sci Sports**, Apr 30 2014. ISSN 1600-0838 (Electronic)

0905-7188 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24779886> >.

FEDARKO, N. S. et al. Three small integrin binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs) bind and activate specific matrix metalloproteinases. **FASEB J**, v. 18, n. 6, p. 734-6, Apr 2004. ISSN 1530-6860 (Electronic)

0892-6638 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14766790> >.

GALA, J. et al. Short- and long-term effects of calcium and exercise on bone mineral density in ovariectomized rats. **Br J Nutr**, v. 86, n. 4, p. 521-7, Oct 2001. ISSN 0007-1145 (Print)

0007-1145 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11591240> >.

GIACHELLI, C. M.; STEITZ, S. Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization. **Matrix Biol**, v. 19, n. 7, p. 615-22, Dec 2000. ISSN 0945-053X (Print)

0945-053X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11102750> >.

GOMBOS, G. C. et al. Direct effects of physical training on markers of bone metabolism and serum sclerostin concentrations in older adults with low bone mass. **BMC Musculoskelet Disord**, v. 17, n. 1, p. 254, 2016. ISSN 1471-2474 (Electronic)

1471-2474 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27278385> >.

GRAY, M.; DI BREZZO, R.; FORT, I. L. The effects of power and strength training on bone mineral density in premenopausal women. **J Sports Med Phys Fitness**, v. 53, n. 4, p. 428-36, Aug 2013. ISSN 0022-4707 (Print)

0022-4707 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23828291> >.

HINTON, P. S.; NIGH, P.; THYFAULT, J. Effectiveness of resistance training or jumping-exercise to increase bone mineral density in men with low bone mass: A 12-month randomized, clinical trial. **Bone**, v. 79, p. 203-12, Oct 2015. ISSN 1873-2763 (Electronic)

1873-2763 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26092649> >.

HORNBERGER, T. A., JR.; FARRAR, R. P. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. **Can J Appl Physiol**, v. 29, n. 1, p. 16-31, Feb 2004. ISSN 1066-7814 (Print)

1066-7814 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15001801> >.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 860-7, Dec 14 2006. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17167474> >.

HOTAMISLIGIL, G. S. et al. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. **J Clin Invest**, v. 95, n. 5, p. 2409-15, May 1995. ISSN 0021-9738 (Print)

0021-9738 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7738205> >.

HOWE, T. E. et al. Exercise for preventing and treating osteoporosis in postmenopausal women. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 7, p. CD000333, 2011. ISSN 1469-493X (Electronic)

1361-6137 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21735380> >.

INGBERG, E. et al. Methods for long-term 17beta-estradiol administration to mice. **Gen Comp Endocrinol**, v. 175, n. 1, p. 188-93, Jan 1 2012. ISSN 1095-6840 (Electronic)
0016-6480 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22137913> >.

INOUE, K. et al. A crucial role for matrix metalloproteinase 2 in osteocytic canalicular formation and bone metabolism. **J Biol Chem**, v. 281, n. 44, p. 33814-24, Nov 3 2006. ISSN 0021-9258 (Print)
0021-9258 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16959767> >.

ISAKSSON, H. et al. Physical exercise improves properties of bone and its collagen network in growing and maturing mice. **Calcif Tissue Int**, v. 85, n. 3, p. 247-56, Sep 2009. ISSN 1432-0827 (Electronic)
0171-967X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19641838> >.

IWAMOTO, J. et al. Role of sport and exercise in the maintenance of female bone health. **J Bone Miner Metab**, v. 27, n. 5, p. 530-7, 2009. ISSN 1435-5604 (Electronic)
0914-8779 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19350198> >.

KIMBLE, R. B. et al. Simultaneous block of interleukin-1 and tumor necrosis factor is required to completely prevent bone loss in the early postovariectomy period. **Endocrinology**, v. 136, n. 7, p. 3054-61, Jul 1995. ISSN 0013-7227 (Print)
0013-7227 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7789332> >.

KJAER, M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. **Physiol Rev**, v. 84, n. 2, p. 649-98, Apr 2004. ISSN 0031-9333 (Print)
0031-9333 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15044685> >.

KOHJIMA, M. et al. Re-evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease. **Int J Mol Med**, v. 20, n. 3, p. 351-8, Sep 2007. ISSN 1107-3756 (Print)
1107-3756 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17671740> >.

KSIEZOPOLSKA-ORLOWSKA, K. Changes in bone mechanical strength in response to physical therapy. **Pol Arch Med Wewn**, v. 120, n. 9, p. 368-73, Sep 2010. ISSN 1897-9483 (Electronic)
0032-3772 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20864911> >.

KUSANO, K. et al. Regulation of matrix metalloproteinases (MMP-2, -3, -9, and -13) by interleukin-1 and interleukin-6 in mouse calvaria: association of MMP induction with bone resorption. **Endocrinology**, v. 139, n. 3, p. 1338-45, Mar 1998. ISSN 0013-7227 (Print)

0013-7227 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9492070> >.

LEITE, R. D. et al. Resistance training may concomitantly benefit body composition, blood pressure and muscle MMP-2 activity on the left ventricle of high-fat fed diet rats. **Metabolism**, v. 62, n. 10, p. 1477-84, Oct 2013. ISSN 1532-8600 (Electronic)

0026-0495 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23790633> >.

LEITE, R. D. et al. Effects of ovariectomy and resistance training on lipid content in skeletal muscle, liver, and heart; fat depots; and lipid profile. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 34, n. 6, p. 1079-86, Dec 2009. ISSN 1715-5312 (Print)

1715-5312 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20029517> >.

LEITE, R. D. et al. Menopause: highlighting the effects of resistance training. **Int J Sports Med**, v. 31, n. 11, p. 761-7, Nov 2010. ISSN 1439-3964 (Electronic)

0172-4622 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21058218> >.

LELOVAS, P. P. et al. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. **Comp Med**, v. 58, n. 5, p. 424-30, Oct 2008. ISSN 1532-0820 (Print)

1532-0820 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19004367> >.

MANSELL, J. P.; BAILEY, A. J.; YARRAM, S. J. Could bone tissue be a target for luteinizing hormone/chorionic gonadotropin? **Mol Cell Endocrinol**, v. 269, n. 1-2, p. 99-106, Apr 15 2007. ISSN 0303-7207 (Print)

0303-7207 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17368927> >.

MARQUETI, R. C. et al. MMP-2, jumping exercise and nandrolone in skeletal muscle. **Int J Sports Med**, v. 29, n. 7, p. 559-63, Jul 2008. ISSN 0172-4622 (Print)

0172-4622 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18050056> >.

MARTIN, A. D.; HOUSTON, C. S. Osteoporosis, calcium and physical activity. **CMAJ**, v. 136, n. 6, p. 587-93, Mar 15 1987. ISSN 0820-3946 (Print)

0820-3946 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3545420> >.

MARTIN, R. B.; ZISSIMOS, S. L. Relationships between marrow fat and bone turnover in ovariectomized and intact rats. **Bone**, v. 12, n. 2, p. 123-31, 1991. ISSN 8756-3282 (Print)

1873-2763 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2064840> >.

MATSUO, K.; NANGO, N. [Osteocytic osteolysis : measurements of the volume of osteocytic lacunae]. **Clin Calcium**, v. 22, n. 5, p. 677-83, May 2012. ISSN 0917-5857 (Print)

0917-5857 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22549192> >.

MELLIS, D. J. et al. The skeleton: a multi-functional complex organ: the role of key signalling pathways in osteoclast differentiation and in bone resorption. **J Endocrinol**, v. 211, n. 2, p. 131-43, Nov 2011. ISSN 1479-6805 (Electronic)

0022-0795 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21903860> >.

MILLIKEN, L. A. et al. Effects of exercise training on bone remodeling, insulin-like growth factors, and bone mineral density in postmenopausal women with and without hormone replacement therapy. **Calcif Tissue Int**, v. 72, n. 4, p. 478-84, Apr 2003. ISSN 0171-967X (Print)

0171-967X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12574871> >.

MINNICH, A. et al. A potent PPARalpha agonist stimulates mitochondrial fatty acid beta-oxidation in liver and skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 280, n. 2, p. E270-9, Feb 2001. ISSN 0193-1849 (Print)

0193-1849 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11158930> >.

MOREIRA, L. D. et al. Physical exercise and osteoporosis: effects of different types of exercises on bone and physical function of postmenopausal women. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 58, n. 5, p. 514-22, Jul 2014. ISSN 1677-9487 (Electronic)

0004-2730 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25166042> >.

NGUYEN, V. H. Osteoporosis prevention and motivation for weight-bearing physical activity and calcium consumption. **Perspect Public Health**, v. 132, n. 6, p. 276, Nov 2012. ISSN 1757-9139 (Print)

1757-9147 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23111081> >.

NILSSON, M. et al. Previous sport activity during childhood and adolescence is associated with increased cortical bone size in young adult men. **J Bone Miner Res**, v. 24, n. 1, p. 125-33, Jan 2009. ISSN 1523-4681 (Electronic)

0884-0431 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18767931> >.

NILSSON, M. et al. Exercise during growth and young adulthood is independently associated with cortical bone size and strength in old Swedish men. **J Bone Miner Res**, v. 29, n. 8, p. 1795-804, Aug 2014. ISSN 1523-4681 (Electronic)

0884-0431 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24585379> >.

NORDIN, B. E.; MORRIS, H. A. The calcium deficiency model for osteoporosis. **Nutr Rev**, v. 47, n. 3, p. 65-72, Mar 1989. ISSN 0029-6643 (Print)
 0029-6643 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2649803> >.

NOVACK, D. V.; TEITELBAUM, S. L. The osteoclast: friend or foe? **Annu Rev Pathol**, v. 3, p. 457-84, 2008. ISSN 1553-4006 (Print)
 1553-4006 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18039135> >.

NYMAN, J. S. et al. Differential effects between the loss of MMP-2 and MMP-9 on structural and tissue-level properties of bone. **J Bone Miner Res**, v. 26, n. 6, p. 1252-60, Jun 2011. ISSN 1523-4681 (Electronic)
 0884-0431 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21611966> >.

PEREIRA, G. B. **EFEITOS DA OVARIETOMIA E TREINAMENTO RESISTIDO NA ATIVIDADE DA METALOPROTEINASE-2 NO TENDÃO CALCÂNEO DE RATAS**. 2010. Dissertação de Mestrado

PEREIRA, G. B. et al. Effects of ovariectomy and resistance training on MMP-2 activity in rat calcaneal tendon. **Connect Tissue Res**, v. 51, n. 6, p. 459-66, Dec 2010. ISSN 1607-8438 (Electronic)
 0300-8207 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20388014> >.

PIERCE, R. A. et al. Different training volumes yield equivalent increases in BMD. **Int J Sports Med**, v. 31, n. 11, p. 803-9, Nov 2010. ISSN 1439-3964 (Electronic)
 0172-4622 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20703976> >.

PRIOR, J. C. FSH and bone--important physiology or not? **Trends Mol Med**, v. 13, n. 1, p. 1-3, Jan 2007. ISSN 1471-4914 (Print)
 1471-4914 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17141571> >.

RAI, R. K. et al. Total water, phosphorus relaxation and inter-atomic organic to inorganic interface are new determinants of trabecular bone integrity. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e83478, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic)
 1932-6203 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24386209> >.

RAISZ, L. G. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. **J Clin Invest**, v. 115, n. 12, p. 3318-25, Dec 2005. ISSN 0021-9738 (Print)
 0021-9738 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16322775> >.

RAJABI, A. H.; JAFFE, M.; ARINZEH, T. L. Piezoelectric materials for tissue regeneration: A review. **Acta Biomater**, v. 24, p. 12-23, Sep 2015. ISSN 1878-7568 (Electronic)

1742-7061 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26162587> >.

RAMAGE, L.; NUKI, G.; SALTER, D. M. Signalling cascades in mechanotransduction: cell-matrix interactions and mechanical loading. **Scand J Med Sci Sports**, v. 19, n. 4, p. 457-69, Aug 2009. ISSN 1600-0838 (Electronic)

0905-7188 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19538538> >.

REICH, A. et al. Involvement of matrix metalloproteinases in the growth plate response to physiological mechanical load. **J Appl Physiol (1985)**, v. 108, n. 1, p. 172-80, Jan 2010. ISSN 1522-1601 (Electronic)

0161-7567 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19850728> >.

ROSEN, C. J.; BOUXSEIN, M. L. Mechanisms of disease: is osteoporosis the obesity of bone? **Nat Clin Pract Rheumatol**, v. 2, n. 1, p. 35-43, Jan 2006. ISSN 1745-8382 (Print)

1745-8382 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16932650> >.

SCHETT, G. Effects of inflammatory and anti-inflammatory cytokines on the bone. **Eur J Clin Invest**, v. 41, n. 12, p. 1361-6, Dec 2011. ISSN 1365-2362 (Electronic)

0014-2972 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21615394> >.

SHAH, K. et al. Exercise training in obese older adults prevents increase in bone turnover and attenuates decrease in hip bone mineral density induced by weight loss despite decline in bone-active hormones. **J Bone Miner Res**, v. 26, n. 12, p. 2851-9, Dec 2011. ISSN 1523-4681 (Electronic)

0884-0431 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21786319> >.

SHIGUEMOTO, G. E. et al. Effects of resistance training on matrix metalloproteinase-2 activity and biomechanical and physical properties of bone in ovariectomized and intact rats. **Scand J Med Sci Sports**, Mar 1 2011. ISSN 1600-0838 (Electronic)

0905-7188 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21362057> >.

_____. 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**, v. 22, n. 5, p. 607-17, Oct 2012. ISSN 1600-0838 (Electronic)

0905-7188 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21362057> >.

SIMOES, P. A. et al. Effect of treadmill exercise on lumbar vertebrae in ovariectomized rats: anthropometrical and mechanical analyses. **Acta Bioeng Biomech**, v. 10, n. 2, p. 39-41, 2008. ISSN 1509-409X (Print)
 1509-409X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19031996> >.

SIPOS, W. et al. Pathophysiology of osteoporosis. **Wien Med Wochenschr**, v. 159, n. 9-10, p. 230-4, May 2009. ISSN 1563-258X (Electronic)
 0043-5341 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19484205> >.

SORENSEN, M. G. et al. Biochemical markers in preclinical models of osteoporosis. **Biomarkers**, v. 12, n. 3, p. 266-86, May-Jun 2007. ISSN 1354-750X (Print)
 1354-750X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17453741> >.

SOUZA, M. V. et al. Resistance training improves body composition and increases matrix metalloproteinase 2 activity in biceps and gastrocnemius muscles of diet-induced obese rats. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 69, n. 4, p. 265-70, 2014. ISSN 1980-5322 (Electronic)
 1807-5932 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24714835> >.

STANOSZ, S. et al. Influence of modified transdermal hormone replacement therapy on the concentrations of hormones, growth factors, and bone mineral density in women with osteopenia. **Metabolism**, v. 58, n. 1, p. 1-7, Jan 2009. ISSN 1532-8600 (Electronic)
 0026-0495 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19059524> >.

TAKANO, M. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor activity is involved in the osteoblastic differentiation regulated by bone morphogenetic proteins and tumor necrosis factor-alpha. **Mol Cell Endocrinol**, Aug 25 2011. ISSN 1872-8057 (Electronic)
 0303-7207 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21888945> >.

TREBACZ, H.; ZDUNEK, A. Three-point bending and acoustic emission study of adult rat femora after immobilization and free remobilization. **J Biomech**, v. 39, n. 2, p. 237-45, 2006. ISSN 0021-9290 (Print)
 0021-9290 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16321625> >.

VURAL, P.; AKGUL, C.; CANBAZ, M. Effects of hormone replacement therapy on plasma pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines and some bone

turnover markers in postmenopausal women. **Pharmacol Res**, v. 54, n. 4, p. 298-302, Oct 2006. ISSN 1043-6618 (Print)

1043-6618 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16879975> >.

WILHELM, M. et al. Effect of resistance exercises on function in older adults with osteoporosis or osteopenia: a systematic review. **Physiother Can**, v. 64, n. 4, p. 386-94, Fall 2012. ISSN 0300-0508 (Print)

0300-0508 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23997394> >.

WINTERS-STONE, K. M. et al. Impact + resistance training improves bone health and body composition in prematurely menopausal breast cancer survivors: a randomized controlled trial. **Osteoporos Int**, v. 24, n. 5, p. 1637-46, May 2013. ISSN 1433-2965 (Electronic)

0937-941X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22996743> >.

XU, J. et al. Effects of Exercise on Bone Status in Female Subjects, from Young Girls to Postmenopausal Women: An Overview of Systematic Reviews and Meta-Analyses. **Sports Med**, Feb 8 2016. ISSN 1179-2035 (Electronic)

0112-1642 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26856338> >.

YANG, J. H. et al. Effect of combined sex hormone replacement on bone/cartilage turnover in a murine model of osteoarthritis. **Clin Orthop Surg**, v. 4, n. 3, p. 234-41, Sep 2012. ISSN 2005-4408 (Electronic)

2005-291X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22949956> >.

ZHAO, L. et al. Chronic inflammation aggravates metabolic disorders of hepatic fatty acids in high-fat diet-induced obese mice. **Sci Rep**, v. 5, p. 10222, 2015. ISSN 2045-2322 (Electronic)

2045-2322 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25974206> >.

ZHAO, R.; XU, Z.; ZHAO, M. Antiresorptive agents increase the effects of exercise on preventing postmenopausal bone loss in women: a meta-analysis. **PLoS One**, v. 10, n. 1, p. e0116729, 2015. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25615597> >.

ZHAO, R.; ZHAO, M.; XU, Z. The effects of differing resistance training modes on the preservation of bone mineral density in postmenopausal women: a meta-analysis. **Osteoporos Int**, v. 26, n. 5, p. 1605-18, May 2015. ISSN 1433-2965 (Electronic)

0937-941X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25603795> >.