

BÁRBARA BRAGA FERNANDES

**INFLUÊNCIA DO TREINAMENTO DE BAIXA INTENSIDADE EM CORRIDA
E NATAÇÃO, SOBRE AS PROPRIEDADES ESTRUTURAIS E CELULARES
NO FÊMUR E TÍBIA DE RATAS OVARIECTOMIZADAS**

Tese apresentada à Universidade Federal
de Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Biologia
Celular e Estrutural, para obtenção do
título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2014**

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

F363i
2014
Fernandes, Bárbara Braga, 1983-
Influência do treinamento de baixa intensidade em corrida e
natação, sobre as propriedades estruturais e celulares no fêmur e
tíbia de ratas ovariectomizadas / Bárbara Braga Fernandes. –
Viçosa, MG, 2014.
xi, 67f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Clóvis Andrade Neves.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Osteoporose - Tratamento. 2. Menopausa. 3. Exercícios
físicos. 4. Ciência - Experiências. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de
Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

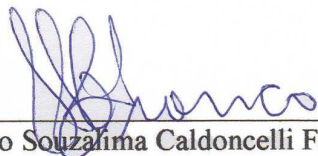
CDD 22. ed. 613.7045

BÁRBARA BRAGA FERNANDES

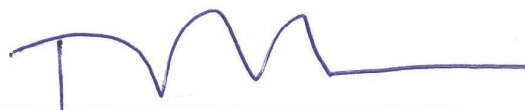
**INFLUÊNCIA DO TREINAMENTO DE BAIXA INTENSIDADE EM CORRIDA
E NATAÇÃO, SOBRE AS PROPRIEDADES ESTRUTURAIS E CELULARES
NO FÊMUR E TÍBIA DE RATAS OVARIECTOMIZADAS**

Tese apresentada à Universidade Federal
de Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Biologia
Celular e Estrutural, para obtenção do
título de *Doctor Scientiae*.

APROVADO: 28 de fevereiro de 2014.



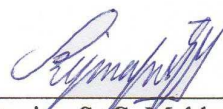
Frederico Souza Lima Caldoncelli Franco



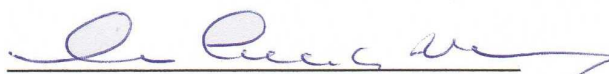
Thales Nicolau Primola Gomes



Ita de Oliveira Silva



Izabel Regina S.C. Maldonado



Clóvis Andrade Neves
(Orientador)

Para os fracos, é o inatingível.
Para os temerosos, o desconhecido.
Para os valentes, a oportunidade.
(Victor Hugo)

*Dedico ao meu esposo Hugo,
e aos que me dedicaram suas vidas:
meus pais, Eduardo e Maria de Fátima,
e aos meus irmãos Raniery e Michel.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por me permitir acreditar que tudo é possível.

Ao Hugo, meu esposo, companheiro e amigo, por estar sempre ao meu lado e por fazer parte desta trajetória.

Aos meus pais Eduardo e Maria de Fátima, exemplo de vida e coragem, que sempre estiveram ao meu lado acreditando que eu era capaz.

Aos meus irmãos Raniery e Michel pela amizade e confiança.

Ao José Renato, Imaculada, Iara e Rafael pela confiança e torcida.

A minha grande amiga Juliana, pela amizade e apoio sempre.

Às minhas amigas da Biologia Celular Mariana, Marli e Suellen, pelos momentos de alegrias e trocas de ensinamentos.

Aos amigos do Biotério de Experimentação Animal que fizeram parte de todo o processo experimental.

Ao professor e orientador Clóvis, pelos exemplos de profissionalismo, ética e pela pessoa incrível, pelos ensinamentos e todo o aprendizado. Obrigada pela confiança depositada em mim e por me ensinar o que é ser professor.

Ao professor e coorientador Antônio Natali, pelos anos de ensinamentos e pelo apoio.

Ao professor e coorientador Carlos Henrique pelos ensinamentos com a temida estatística.

Ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural pela oportunidade.

Ao professor Mário Jefferson, por disponibilizar seu laboratório na UNESP em Araçatuba, SP.

À professora Sílvia por disponibilizar o Laboratório de Citogenética de Insetos do Departamento de Biologia Geral.

Ao Departamento de Solos e ao Laboratório de Análises Bioquímicas (Bioagro) por ceder a infraestrutura para realização de análises.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural por todos os ensinamentos.

À CAPES, pela concessão da bolsa durante todo o período do doutorado.

À Beth secretária da Pós-Graduação pelo apoio e gentilezas prestadas.

À Universidade Federal de Viçosa pelo apoio em minha formação profissional e pessoal.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para que eu chegasse a este momento.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	x
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	4
ARTIGO 1.....	8
ARTIGO 2.....	28
ARTIGO 3.....	47
CONCLUSÕES GERAIS.....	67

RESUMO

FERNANDES, Bárbara Braga, D.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2014. **Influência do treinamento de baixa intensidade em corrida e natação, sobre as propriedades estruturais e celulares no fêmur e tíbia de ratas ovariectomizadas.** Orientador: Clóvis Andrade Neves. Coorientadores: Antônio José Natali.

Osteoporose é uma doença esquelética sistêmica com desequilíbrio na formação e reabsorção óssea, resultando em diminuição do conteúdo de matriz e da força do osso; sendo comum em mulheres na pós-menopausa. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do exercício de corrida e natação sobre as propriedades estruturais e celulares do fêmur e tíbia de ratas ovariectomizadas. Ratas Wistar com vinte semanas de idade ($271,42 \pm 17,6$ g) foram separadas em oito grupos, sendo: GBS (*baseline* SHAM; $n = 4$), GBO (*baseline* OVX; $n = 6$), NS (natação SHAM; $n = 12$), NO (natação OVX; $n = 12$), CS (corrida SHAM; $n = 12$), CO (corrida OVX; $n = 12$), CONS (controle SHAM; $n = 12$) e CONO (controle OVX; $n = 12$). Quatro grupos foram ovariectomizados (OVX) e quatro submetidos à laparotomia (SHAM). Os grupos GBS e GBO foram submetidos a eutanásia duas semanas após as cirurgias; os grupos NS e NO foram submetidos ao treinamento de natação com sobrecarga (5 dias/semana, 60 minutos/dia, com sobrecarga de 3% do peso corporal) por 10 semanas; os grupos CS e CO foram submetidos ao treinamento de corrida em esteira (5 dias/semana, 60 minutos/dia, 16m/min) por 10 semanas; e os grupos CONS e CONO permaneceram em gaiolas individuais sem exercício pelo mesmo período. Os grupos exercitados e controles foram submetidos à eutanásia doze semanas após a cirurgia. Utilizou-se ANOVA com nível de significância de $p < 0,05$. Avaliou-se a densidade mineral óssea (DMO) no fêmur (DEXA), a densidade mineral radiográfica (DMOR) no fêmur, o conteúdo mineral ósseo (CMO) na tíbia e os elementos celulares (osteoblastos, osteoclastos e osteócitos por área na região do colo e trocânter maior do fêmur). A DMO foi maior no grupo GBS ($0,255 \pm 0,003$ g/cm²) comparada aos grupos GBO ($0,226 \pm 0,022$ g/cm²) e SHAM ($0,229 \pm 0,018$ g/cm²). O conteúdo de zinco foi maior nos animais do grupo SHAM ($0,40 \pm 0$ mg/L) que os demais grupos (GBO = $0,26 \pm 0$ mg/L; GBS = $0,25 \pm 0$ mg/L; GOVX = $0,25 \pm 0$ mg/L). Houve diferença significativa apenas para a rigidez no colo do fêmur em que GBO foi maior que GOVX ($360,3 \pm 97,6$ N/mm vs $166,8 \pm 14,1$ N/mm, respectivamente) e GBS foi maior que SHAM ($455 \pm 53,4$ N/mm vs $192,4 \pm 19,1$ N/mm, respectivamente). O contrário foi observado para a rigidez na diáfise do fêmur em que GOVX foi maior que GBO ($289,1 \pm 12,1$ N/mm vs $207,1 \pm 10,5$ N/mm, respectivamente) e SHAM foi

maior que GBS ($316,9 \pm 12,6$ N/mm vs $221,9 \pm 10,6$ N/mm, respectivamente). Nos elementos celulares houve aumento no número de osteoblastos ($GOVX = 225,8 \pm 28,3$ vs $GBO = 150 \pm 15,4$) e redução de osteoclastos ($GOVX = 0,4 \pm 0,2$ vs $GBO = 2,8 \pm 1,2$) no colo do fêmur. Na região do trocânter maior do fêmur houve redução no número de osteoclastos ($GOVX = 0,4 \pm 0,2$ vs $GBO = 4 \pm 1,5$). A DMOR foi maior no grupo NO ($1,9 \pm 0,16$ mmAl) comparada aos grupos GBO ($1,6 \pm 0,06$ mmAl), CONO ($1,7 \pm 0,1$ mmAl) e NS ($1,8 \pm 0,13$ mmAl). O CMO de cálcio e magnésio na tíbia foi maior no grupo NO (204 ± 3 e $3,5 \pm 0,1$ mg/L, respectivamente) comparado ao grupo NS ($158,6 \pm 17,7$ e $2,7 \pm 0,3$ mg/L). No colo do fêmur, o número de osteoblastos foi maior no grupo NO ($274,1 \pm 11$) comparado ao grupo GBO ($150 \pm 19,5$). Registrou-se maior número de osteoclastos no grupo GBO ($2,8 \pm 1,2$) comparado aos grupos NO ($0,9 \pm 0,3$) e CONO ($0,4 \pm 0,2$). No trocânter maior do fêmur, os osteoblastos foram mais numerosos no grupo NO ($300,3 \pm 31,7$) que nos grupos GBO ($198 \pm 12,8$) e NS ($229,4 \pm 24,6$); já os osteoclastos foram maiores no grupo GBO ($4 \pm 1,5$) comparado aos grupos GBS ($0,5 \pm 0,4$), NO ($0,5 \pm 0,2$) e CONO ($0,4 \pm 0,2$). Os osteócitos também foram mais numerosos no grupo GBO ($205,7 \pm 22,2$) que nos grupos GBS ($136,5 \pm 15,5$) e NO ($156,3 \pm 8$). A DMOR foi maior no grupo CO ($1,79 \pm 0,1$ mmAl) comparada aos grupos GBO ($1,64 \pm 0,1$ mmAl) e CONO ($1,74 \pm 0,7$ mmAl). O CMO de zinco na tíbia foi maior no grupo CS ($0,4 \pm 0,2$ mg/L) comparada aos grupos GBS ($0,25$ mg/L ± 0) e CO ($0,24 \pm 0,2$ mg/L), e no grupo CONS ($0,4 \pm 0$ mg/L) comparada aos grupos GBS ($0,25 \pm 0$ mg/L) e CONO ($0,25 \pm 0$ mg/L). No colo do fêmur, registrou-se maior número de osteoblastos no grupo CO ($362,5 \pm 23,9$) que nos grupos GBO ($150 \pm 19,5$) e CONO ($225,8 \pm 22,4$). Houve maior número de osteoclastos no grupo CO ($1,9 \pm 0,6$) comparado aos CS (0 ± 0) e GBO ($2,8 \pm 1,2$) comparado aos CONO ($0,4 \pm 0,2$). O número de osteócitos e área de matriz foram superiores nos animais do grupo CS ($214,3 \pm 18,4$ e $172188,1 \pm 17973,5$ μ m, respectivamente) que nos demais grupos. No trocânter maior do fêmur o número de osteoblastos foi maior no grupo CO ($280,5 \pm 27,3$) comparado ao CS ($211,4 \pm 21,1$); já os osteoclastos foram mais numerosos no grupo GBO ($4 \pm 1,5$) comparados aos dos grupos GBS ($0,5 \pm 0,5$), CO ($1,1 \pm 0,5$) e CONO ($0,4 \pm 0,2$). A área de matriz foi menor no grupo CO ($115901,6 \pm 7298,8$ μ m) que nos grupos GBO e CONO ($165584,8 \pm 9814,9$ e $145561,8 \pm 4403,8$ μ m). Nossos resultados indicam que o treinamento de corrida de baixa intensidade não causou alterações expressivas nas propriedades estruturais e celulares no fêmur e na tíbia de ratas ovariectomizadas. Entretanto, o treinamento em

natação com sobrecarga aumentou a DMO no fêmur dos animais ovariectomizados, mas não causou alterações expressivas nas propriedades celulares destes animais.

ABSTRACT

FERNANDES, Barbara Braga, DS, Universidade Federal de Viçosa, February 2014.
Influence of low-intensity running and swimming training on femoral and tibial structural and cellular properties in ovariectomized rats. Adviser: Clovis Andrade Neves. Co-Advisers: Antônio José Natali.

Osteoporosis is a systemic skeletal disease commonly occurring in women after menopause. Its imbalance in bone formation and resorption leads to decreased bone strength and matrix content. The aim of this study was to investigate the effects of low-intensity running and swimming training on femoral and tibial structural and cellular properties in ovariectomized rats. Twenty-week old female Wistar rats ($271,42 \pm 17,6$ g) were either ovariectomized (OVX) or underwent laparotomy (SHAM) and were divided into groups as follows: GBS (baseline SHAM, $n = 4$), GBO (baseline OVX, $n = 6$), NS (swimming SHAM, $n = 12$), NO (swimming OVX, $n = 12$), CS (running SHAM, $n = 12$), CO (running OVX, $n = 12$), CONS (control SHAM, $n = 12$) and CONE (control OVX, $n = 12$). GBS and GBO groups were euthanized two weeks after surgery. NS and NO groups were submitted to swimming training (5 days/week, 60 min/day, load of 3 % of body weight) for 10 weeks. CS and CO groups were subjected to treadmill running training (5 days/week, 60 min/day, 16 m/min) for 10 weeks. CONS and CONO groups remained in individual cages without exercising for the same period. The exercise groups and controls groups were euthanized twelve weeks after surgery. ANOVA was used with a significance level of $p < 0.05$. Femoral bone mineral density (BMD) and radiographic mineral density (DMOR), tibial bone mineral content (BMC) and cellular components (osteoblasts, osteoclasts and osteocytes) in the femoral neck and great trochanter were assessed. BMD was higher in GBS (0.255 ± 0.003 g/cm²) compared to the GBO group (0.226 ± 0.022 g/cm²) and SHAM (0.229 ± 0.018 g/cm²) groups. Zinc content was higher in SHAM animals (0.40 ± 0 mg/L) as compared to other groups (GBO = 0.26 ± 0 mg/L; GBS = 0.25 ± 0 mg/L; GOVX = 0.25 ± 0 mg/L). Femoral neck stiffness was higher in GBO than in GOVX (360.3 ± 97.6 N/mm vs 166.8 ± 14.1 N/mm, respectively) and in GBS than in SHAM animals ($455 \pm 53,4$ N/mm vs $192,4 \pm 19.1$ N/mm, respectively). The femoral shaft stiffness was higher in GOVX than in GBO (289.1 ± 12.1 N/mm vs 207.1 ± 10.5 N/mm, respectively) and in SHAM than in GBS animals (316.9 ± 12.6 N/mm vs 221.9 ± 10.6 N/mm, respectively). In the femur, there

was an increase in the number of osteoblasts in GOVX as compared to GBO animals (225.8 ± 28.3 vs 150 ± 15.4 , respectively) and a reduction of osteoclasts in GOVX as compared to GBO animals (0.4 ± 0.2 vs 2.8 ± 1.2 , respectively). In the femoral greater trochanter there was a decreased number of osteoclasts in GOVX, as compared to GBO animals (0.4 ± 0.2 vs 4 ± 1.5 , respectively). DMOR was higher in NO group (1.9 ± 0.16 mmAl) compared to GBO (1.6 ± 0.06 mmAl), CONO (1.7 ± 0.1 mmAl) and NS (1.8 ± 0.13 mmAl) groups. The tibial content of calcium and magnesium was higher in NO (204 ± 3 mg/L and 3.5 ± 0.1 mg/L, respectively) than in NS (158.6 ± 17.7 mg/L and 2.7 ± 0.3 mg/L, respectively) group. In the femoral neck, the number of osteoblasts was higher in NO (274.1 ± 11) as compared to GBO (150 ± 19.5) group. In addition, a greater number of osteoclasts in GBO (2.8 ± 1.2) than in NO (0.9 ± 0.3) and CONO (0.4 ± 0.2) was observed. In the greater trochanter, the osteoblasts were more numerous in NO (300.3 ± 31.7) than in GBO (198 ± 12.8) and NS (229.4 ± 24.6) groups. Moreover, the number of osteoclasts was higher in GBO (4 ± 1.5) than in GBS (0.5 ± 0.4), NO (0.5 ± 0.2) and CONO (0.4 ± 0.2) groups. The osteocytes were also more numerous in GBO (205.7 ± 22.2) than in GBS (136.5 ± 15.5) and NO (156.3 ± 8) groups. Femoral DMOR was higher in CO (1.79 ± 0.1 mmAl) as compared to GBO (1.64 ± 0.1 mmAl) and CONO (1.74 ± 0.7 mmAL) groups. The tibial content of zinc was higher in CS (0.4 ± 0.2 mg/L) as compared to GBS (0.25 ± 0 mg/L) and CO (0.24 ± 0.2 mg/L) groups, as well as in CONS (0.4 ± 0 mg/L) than in GBS (0.25 ± 0 mg/L) and CONO (0.25 ± 0 mg/L) groups. In the femoral neck, there was a higher number of osteoblasts in CO (362.5 ± 23.9) than in GBO (150 ± 19.5) and CONO (225.8 ± 22.4) groups. A greater number of osteoclasts was also observed in CO (1.9 ± 0.6) as compared to CS (0 ± 0) and in GBO (2.8 ± 1.2) as compared to CONO (0.4 ± 0.2) groups. The number of osteocytes and the matrix area were higher in CS than in the other groups. In the greater trochanter, the number of osteoblasts was higher in CO ($280,5 \pm 27,3$) as compared to the CS (211.4 ± 21.1) group. Osteoclasts were more numerous in GBO ($4 \pm 1,5$) than in GBS (0.5 ± 0.5), CO (1.1 ± 0.5) and CONO (0.4 ± 0.2) groups. The matrix area was smaller in CO (115901.6 ± 7298.8 μ m) than in GBO ($165584,8 \pm 9814,9$ μ m) and CONO ($145561,8 \pm 4403,8$ μ m) groups. These results indicate that low-intensity running training did not influence significantly the femoral and tibial structural and cellular properties in ovariectomized rats. Nevertheless, low intensity swimming training increased the femoral BMD, but did not influence significantly the bone cellular properties in these animals.

INTRODUÇÃO GERAL

A osteoporose pós-menopausa é caracterizada como um distúrbio esquelético, com redução da densidade mineral óssea (DMO), deterioração gradual da microarquitetura do osso tornando-o mais frágil e suscetível a fraturas (LIN & LANE, 2004; D'AMELIO et al., 2008; RALSTON & UITTERLINDEN, 2010). Estima-se que uma em cada duas mulheres e um em cada quatro homens com mais de 50 anos de idade terão alguma fratura relacionada à osteoporose (GAMMAGE et al., 2009; YOON et al., 2012).

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde - OMS, aproximadamente um terço das mulheres de raça branca, com idade superior aos 65 anos, são portadoras de osteoporose (WHO, 1994). A menopausa tem sido associada com um aumento do risco de doenças cardiovasculares, diabetes mellitus, perda de massa muscular (sarcopenia), redução da massa óssea, alterações no metabolismo lipídico e na distribuição de gordura corporal (SAENGSIKISUWAN et al., 2009; LEITE et al., 2010).

Deficiência dos esteroides sexuais, predisposição genética, inatividade física, fatores ambientais (consumo de álcool, cafeína, etc.) deficiência de vitamina D e disfunções tireoidianas constituem fatores de risco para a gênese da osteoporose humana (COHEN et al., 2000; GAMMAGE et al., 2009; MADDALOZZO et al., 2009).

Estímulos sistêmicos ou locais (por tensão mecânica ou microfraturas) podem iniciar o processo de ativação da remodelação óssea. A liberação de hormônios e citocinas (PTH, 1,25-diidroxivitamina D, IL1, IL2, IL6, TNF- α) induzem o aumento na produção de RANKL (ligante do receptor ativador do fator nuclear $\kappa\beta$) pelos osteoblastos, que se ligam ao seu receptor RANK nas membranas das células hematopoiéticas precursoras, tornando os osteoclastos ativos. Substâncias inibidoras da reabsorção, tais como o estrogênio e as proteínas morfogenéticas ósseas (BMP), estimulam a produção de osteoprotegerina (OPG), que é um inibidor de RANK, pois ela captura o RANKL, impedindo sua ligação ao seu receptor, diminuindo, então, o número de osteoclastos ativos e induzindo a apoptose de osteoclastos maduros (ROBLING et al., 2006; D'AMELIO et al., 2008). Assim, a deficiência do estrogênio desencadeia um aumento da osteoclastogênese em mulheres pós-menopausa (D'AMELIO et al., 2008).

Ratas ovariectomizadas é o modelo experimental mais utilizado proporcionando um melhor entendimento da fisiopatologia da osteoporose em mulheres na pós-menopausa, uma vez que a perda óssea induzida pela ovariectomia em ratas compartilha

muitas das características clínicas observadas neste grupo de mulheres (TOSTESON et al., 2008; FRANCISCO et al., 2011).

As forças de tensão, compressão e cisalhamento geradas pelo suporte da massa corporal e pelas contrações musculares durante a atividade física constituem estímulos importantes para a formação óssea (BERGMAN et al., 2011) e desempenham papel importante para minimizar a perda óssea em mulheres pós-menopausa (CHIEN et al., 2000; VON STENGEL et al., 2011) e em ratas ovariectomizadas (BARENGOLTS et al., 1994; HONDA et al., 2003; OCARINO et al., 2007).

Estudos relatam que a prática de exercício físico contribui para a prevenção e tratamento da osteoporose devido ao efeito osteogênico gerado pelo estímulo mecânico no tecido ósseo (Mc VEIGH et al., 2010; BALSAMO et al., 2013). O aumento da secreção de proteínas morfogenéticas (BMPs) causada pela ação do exercício físico atua inibindo a reabsorção e estimulando a formação óssea (VAN DE LEST et al., 2003).

O papel do exercício na promoção da saúde óssea é tipicamente atribuído ao aumento da carga mecânica, o que induz adaptação funcional. No entanto, o exercício aeróbico crônico em particular, pode influenciar a capacidade aeróbia a nível celular (GOULET et al., 2011). Estudos mostram que receptores de estrogênio localizados em osteoblastos são responsáveis por mediar várias funções desse hormônio, como: regulação da proliferação e diferenciação em osteoblastos, síntese de proteínas da matriz óssea, sobrevivência dos osteócitos e apoptose de osteoclastos (JESSOP et al., 2004; LEE e LENYON, 2004; ALMEIDA et al., 2013); e que a perda óssea pós-menopausa pode estar ligada a redução no número ou função destes receptores, resultantes da deficiência de estrogênio. Estes mesmos autores afirmam que o exercício é capaz de promover a atividade destes receptores através de cargas mecânicas.

O treinamento aeróbico como a corrida (HUANG et al., 2008) e a natação (HUANG et al., 2003; MELTON et al., 2004), assim como os exercícios resistidos (NOTOMI et al., 2000; SUOMINEN, 2006; LEITE et al., 2010) promovem estímulos osteogênicos.

Tem sido demonstrado que diversos programas de exercícios provocam melhora na massa, densidade e força óssea prevenindo a osteoporose em modelo animal (IWAMOTO et al., 2005; HUANG et al., 2008; UNEMURA et al., 2008; OOI et al., 2009). Fonseca et al. (2011) verificaram que o exercício realizado em roda voluntária por ratas ovariectomizadas foi capaz de impedir a apoptose de osteócitos sugerindo um efeito protetor, sendo observado pelo aumento da força do fêmur dos animais.

No entanto, existem estudos em animais exercitados que não encontraram alterações nos parâmetros ósseos. Notomi et al. (2000) verificaram que o exercício não beneficiou a densidade mineral óssea (DMO), o conteúdo mineral ósseo (CMO) e o tamanho do osso em ratos treinados durante a fase de crescimento. Além disso, oito ou dez semanas de treinamento em esteira rolante não influenciaram a DMO e CMO do fêmur de ratos Wistar jovens (HUANG et al., 2003; 2008).

Embora a natação seja considerada uma atividade em que não há suporte do peso corporal, o aumento da densidade óssea em resposta ao exercício pode estar relacionado com a intensidade da atividade muscular. O exercício de natação pode ser considerado estratégico para reduzir o risco de osteoporose (HART et al., 2001). Alguns estudos indicam efeito positivo do exercício na redução da perda óssea em ratos (HUANG et al., 2003; MELTON et al., 2004; Mc VEIGH et al., 2010).

Assim, o presente estudo buscou investigar os efeitos dos exercícios de corrida em esteira de baixa intensidade e natação com sobrecarga sobre as propriedades estruturais e celulares do fêmur e tíbia de ratas ovariectomizadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida, M., S. Iyer, *et al.* Estrogen receptor-alpha signaling in osteoblast progenitors stimulates cortical bone accrual. J Clin Invest, v.123, n.1, Jan 2, p.394-404. 2013.

Balsamo, S.; Mota, L. M. H.; Santana, F.S.; Nascimento, D.C. *et al.* Treinamento de força versus hidroginástica: uma análise transversal comparativa da densidade mineral óssea em mulheres na pós-menopausa. Rev Bra Reumatol, v. 53, n. 2, p. 193–198. 2013.

Barengolts, E. I.; Lathon, P. V. *et al.* Effects of endurance exercise on bone histomorphometric parameters in intact and ovariectomized rats. Bone Miner, v.26, n.2, Aug, p.133-40. 1994.

Bergmann, P.; Body, J. J. *et al.* Loading and skeletal development and maintenance. J Osteoporos, p.786752. 2011.

Chien, M. Y.; Wu, Y.T. *et al.* Efficacy of a 24-week aerobic exercise program for osteopenic postmenopausal women. Calcif Tissue Int, v.67, n.6, Dec, p.443-8. 2000.

Cohen, A. J. e Roe, F. J. Review of risk factors for osteoporosis with particular reference to a possible aetiological role of dietary salt. Food Chem Toxicol, v.38, n.2-3, Feb-Mar, p.237-53. 2000.

D'amelio, P.; Grimaldi, A. *et al.* Estrogen deficiency increases osteoclastogenesis up-regulating T cells activity: a key mechanism in osteoporosis. Bone, v.43, n.1, Jul, p.92-100. 2008.

Francisco, J. I.; Yu, Y. *et al.* Relationship between age, skeletal site, and time post-ovariectomy on bone mineral and trabecular microarchitecture in rats. J Orthop Res, v.29, n.2, Feb, p.189-96. 2011.

Gammage, K. L.; Francoeur, C. *et al.* Osteoporosis health beliefs and knowledge in college students: the role of dietary restraint. Eat Behav, v.10, n.1, Jan, p.65-7. 2009.

Goulet, G. C.; Halonen, N. R. *et al.* Osteoblast response to ovariectomy is enhanced in intrinsically high aerobic-capacity rats. Calcif Tissue Int, v.88, n.4, Apr, p.325-35. 2011.

Hart, K. J.; Shaw, J. M. *et al.* Swim-trained rats have greater bone mass, density, strength, and dynamics. J Appl Physiol, v.91, n.4, Oct, p.1663-8. 2001.

Honda, A.; Sogo, N. *et al.* High-impact exercise strengthens bone in osteopenic ovariectomized rats with the same outcome as Sham rats. J Appl Physiol (1985), v.95, n.3, Sep, p.1032-7. 2003.

Huang, T. H.; Lin, S. C. *et al.* Effects of different exercise modes on mineralization, structure, and biomechanical properties of growing bone. J Appl Physiol, v.95, n.1, Jul, p.300-7. 2003.

Huang, T. H.; Chang, F. L. *et al.* Endurance treadmill running training benefits the biomaterial quality of bone in growing male Wistar rats. J Bone Miner Metab, v.26, n.4, p.350-7. 2008.

Iwamoto, J.; Takeda, T. *et al.* Effect of treadmill exercise on bone mass in female rats. Exp Anim, v.54, n.1, Jan, p.1-6. 2005.

Jessop, H. L.; Suswillo, R.F. *et al.* Osteoblast-like cells from estrogen receptor alpha knockout mice have deficient responses to mechanical strain. J Bone Miner Res, v.19, n.6, Jun, p.938-46. 2004.

Lee, K. C. e L. E. Lanyon. Mechanical loading influences bone mass through estrogen receptor alpha. Exerc Sport Sci Rev, v.32, n.2, Apr, p.64-8. 2004.

Leite, R. D.; Prestes, J. *et al.* Menopause: highlighting the effects of resistance training. Int J Sports Med, v.31, n.11, Nov, p.761-7. 2010.

Lin, J. T. e Lane, J. M. Osteoporosis: a review. Clin Orthop Relat Res, n.425, Aug, p.126-34. 2004.

Maddalozzo, G. F.; Turner, R. T. *et al.* Alcohol alters whole body composition, inhibits bone formation, and increases bone marrow adiposity in rats. Osteoporos Int, v.20, n.9, Sep, p.1529-38. 2009.

Mc Veigh, J.; Kingsley, S. *et al.* Swimming enhances bone mass acquisition in growing female rats. J Sports Sci Med, v.9, n.4, p.612-9. 2010.

Melton, S. A.; Hegsted, M. *et al.* Water exercise prevents femur density loss associated with ovariectomy in the retired breeder rat. J Strength Cond Res, v.18, n.3, Aug, p.508-12. 2004.

Notomi, T., Y. Okazaki, Y. *et al.* A comparison of resistance and aerobic training for mass, strength and turnover of bone in growing rats. Eur J Appl Physiol, v.83, n.6, Dec, p.469-74. 2000.

Ocarino, N. M.; Marubayashi, U. *et al.* Physical activity in osteopenia treatment improved the mass of bones directly and indirectly submitted to mechanical impact. J Musculoskelet Neuronal Interact, v.7, n.1, Jan-Mar, p.84-93. 2007.

Ooi, F. K.; Singh, R. *et al.* Minimum level of jumping exercise required to maintain exercise-induced bone gains in female rats. Osteoporos Int, v.20, n.6, Jun, p.963-72. 2009.

Ralston, S. H. e Uitterlinden, A. G. Genetics of osteoporosis. Endocr Rev, v.31, n.5, Oct, p.629-62. 2010.

Robling, A. G.; Castillo, A. B. *et al.* Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. Annu Rev Biomed Eng, v.8, p.455-98. 2006.

Saengsirisuwan, V.; Pongseeda, S. *et al.* Modulation of insulin resistance in ovariectomized rats by endurance exercise training and estrogen replacement. Metabolism, v.58, n.1, Jan, p.38-47. 2009.

Suominen, H. Muscle training for bone strength. Aging Clin Exp Res, v.18, n.2, Apr, p.85-93. 2006.

Tosteson, A. N.; Melton, L. J. 3rd, *et al.* Cost-effective osteoporosis treatment thresholds: the United States perspective. Osteoporos Int, v.19, n.4, Apr, p.437-47. 2008.

Umemura, Y., S. Nagasawa, *et al.* High-impact exercise frequency per week or day for osteogenic response in rats. J Bone Miner Metab, v.26, n.5, p.456-60. 2008.

Van De Lest, C. H; Brama, P. A. *et al.* The influence of exercise on bone morphogenic enzyme activity of immature equine subchondral bone. Biorheology, v.40, n.1-3, p.377-82. 2003.

Von Stengel, S.; Kemmler, W. *et al.* Effects of whole body vibration on bone mineral density and falls: results of the randomized controlled ELVIS study with postmenopausal women. Osteoporos Int, v.22, n.1, Jan, p.317-25. 2011.

Yoon, K. H.; Cho, D. C. *et al.* The Change of Bone Metabolism in Ovariectomized Rats: Analyses of MicroCT Scan and Biochemical Markers of Bone Turnover. J Korean Neurosurg Soc, v.51, n.6, Jun, p.323-7. 2012.

World Health Organization. Assessment of fracture risk and application to screening for postmenopausal osteoporosis. Washington, DC: Technical Report Series 843. p.1-129. 1994.

Artigo 1

EXPERIMENTAL OVARIECTOMY CAUSES NO SIGNIFICANT CHANGE IN BONE PARAMETERS OF ADULT WISTAR RATS

Fernandes, Bárbara B. Msc¹ ; Natali, Antônio J. PhD² ; Del Carlo, Ricardo J. PhD³ ;
Silva, Carlos Henrique O. PhD⁴ ; Louzada, Mario Jeferson Q. PhD⁵ ; Drummond, Lucas
R. BSc² ; Freitas, Juliana S. Msc¹ ; Neves, Clóvis A. PhD¹ .

¹ General Biology Departament, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais, Brazil.

² Physical Education Department, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais, Brazil.

³ Veterinary Medicine Department, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais, Brazil.

⁴ Statistics Department, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais, Brazil.

⁵ Basic Sciences Department, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Araçatuba, São Paulo, Brazil.

Corresponding Author : Bárbara Braga Fernandes
Rua Cento e Quarenta e Sete, 31/102, Bairro Eldorado
Cep:35181-213
Timóteo, Minas Gerais, Brazil
+55 (31) 9171-5328

[Email: barbara_bbf@yahoo.com.br](mailto:barbara_bbf@yahoo.com.br)

ABSTRACT

Investigate bone changes produced in ovariectomized adult female rats and the appropriateness of the animal model for the study of osteoporosis. The animals were separated into four groups: two groups of ovariectomized (OVX) rats and another two groups of rats that underwent laparotomy (SHAM). GBO groups (baseline OVX) and GBS (baseline SHAM) underwent euthanasia 2 weeks after surgery, and GOVX and SHAM underwent the same 12 weeks after surgery. We evaluated bone mineral density (BMD), mechanical parameters, bone mineral content (BMC), and cellular elements. BMD was higher in GBS groups as compared to GBO and SHAM groups. The BMC zinc tibia was higher in the SHAM group as compared to that in other groups. There was a significant difference only in the stiffness in the neck of femur, which was greater in GOVX group compared to GBO group and greater in GBS group compared to SHAM group. The opposite was observed for the diaphysis stiffness in the femur, as it was greater in GOVX group than in GBO group and in SHAM group than in GBS group. In cellular elements, increased number of osteoblasts and osteoclasts reduction in the femoral neck was observed in GOVX group than in GBO groups. In the region of greater trochanter, no reduction in the number of osteoclasts was observed in the GOVX group as compared to that in the GBO group. Ovariectomy of adult female Wistar rats did not significantly alter the main parameters of bone histophysiology up to 12 weeks after surgery.

Keywords: ovariectomy, bone, menopause, osteoporosis, histophysiology.

INTRODUCTION

Osteoporosis is characterized by gradual deterioration of bone microarchitecture, making it more fragile and susceptible to fractures [1,2]. It is estimated that one in two women and one in four men over 50 years of age develop some osteoporosis-related fracture [3,4]. Sex steroid deficiency, genetic predisposition, physical inactivity, environmental factors (e.g., alcohol and caffeine), Vitamin D deficiency, and thyroid disorders are risk factors for the genesis of human osteoporosis [5,3,6]. Estrogen deficiency as a result of menopause is directly involved in the decline of bone mineral density (BMD), putting menopausal women at high risk of osteoporosis [7,8].

Ovariectomized rats represent the most widely used model for research in osteoporosis, because surgery results in estrogen deficiency and loss of trabecular bone, increasing the overall rate of bone remodeling and changing the balance between formation and resorption, with a predominance of resorption in some skeletal sites [9]. Osteoporosis resulting from ovariectomy has a strong resemblance to osteoporosis in humans, because of the anatomical and physiological characteristics of the bone [9,10,4]. Nevertheless, there is still no standard model, because of variations in age of the animals, estimated location of the skeleton, and the time after ovariectomy [9].

Studies indicate significant bone loss in the femur of rats 30 days after removal of the ovaries; this loss does not occur in regions of the femoral neck (180 days) and lumbar vertebra (270 days), indicating that the loss of cancellous bone in these regions is slower and less pronounced than in the proximal tibia [11].

Our hypothesis was that in female adult rats would not influence growth in bone remodeling and that the time after ovariectomy leads to bone changes. To test this hypothesis, rats with initial age of 20 weeks were tested on the main parameters of histophysiology of bone regions of the neck and the greater trochanter of the femur and tibia at 15 days and 12 weeks after ovariectomy.

MATERIALS AND METHODS

Sample

We used 34 female Wistar rats (*Rattus norvegicus*), with initial age of 20 weeks (mean weight $271,42 \pm 17,6$ g) from the Central Animal Facility of the Center for Biological Sciences and Health, Universidade Federal de Viçosa. All procedures were

performed according to the Ethical Principles in Animal Experimentation and were approved by the Ethics Committee of the UFV (opinion number 02/2009).

Eighteen animals underwent ovariectomy (OVX group) and the remaining 16 underwent laparotomy to simulate removal of the ovaries (SHAM group). Before surgery, each animal was anesthetized with ketamine (20 mg/kg) and xylazine (2.71 mg/kg) intramuscularly, followed by subcutaneous administration of an anti-inflammatory agent (flunixin meglumine 0.68 mg/kg), and antibiotics (enrofloxocina 2.71 mg/kg). In the first 5 h after surgery, the animals were kept in heated chamber. Subsequently, the animals were divided into four experimental groups and housed in individual cages (20 x 20 x 30 cm height, width, and depth, respectively) at the temperature of $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, relative humidity of about 60%, and 12-h photoperiod. Each animal received daily 20 g of commercial feed (Socil[®]) and water *ad libitum*.

In summary, four experimental groups were formed:

GBS baseline (n = 4): SHAM rats euthanized 15 days after surgery at 22 weeks of age

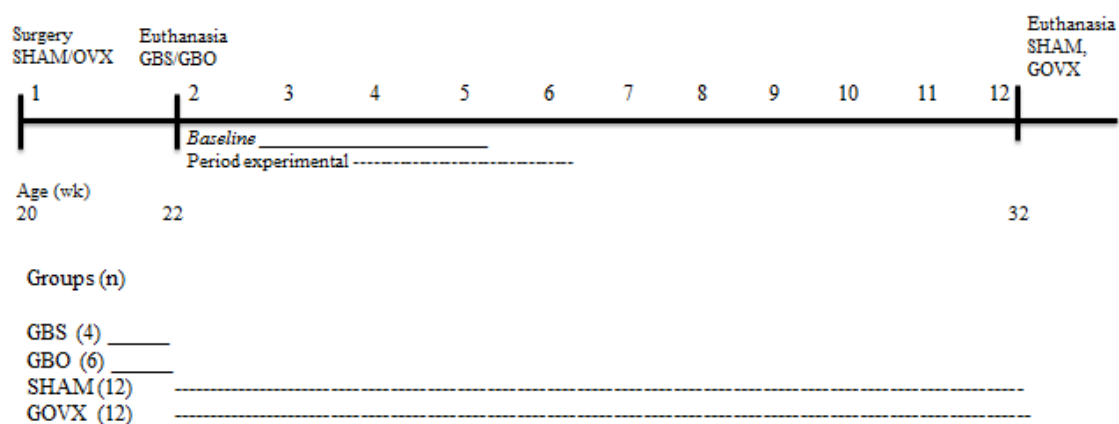
GBO baseline (n = 6): OVX rats euthanized 15 days after surgery at 22 weeks of age

SHAM (n = 12): SHAM rats that remained in cages for 12 weeks, also, at 32 weeks of age.

GOVX (n = 12): OVX rats that remained caged for 12 weeks, so, at 32 weeks of age

A group of 10 animals (baseline) consisting of 5 ovariectomized rats and 4 whole rats were euthanized 15 days after surgery to determine the influence of surgery on bone homeostasis. The remaining animals remained for 12 weeks in individual cages.

The experimental design is shown below:



The animals were weighed on a precision balance once a week during the 12-week trial period to record the body mass.

Assessment of Bone Mineral Density (BMD)

Immediately after euthanasia, the right femur of each animal was removed, the soft tissues were removed, and the bones were deposited in gauze soaked with saline and stored at -20°C . The samples were thawed immediately prior to analysis.

Analysis of BMD was performed on X-ray bone densitometer (DXA Lunar DPX-Alpha[®] -Japan) with specific software for small animals and calculated based on the formula: $\text{BMD (g/cm}^2\text{)} = \text{BMC (g)}/\text{AREA (cm}^2\text{)}$.

Determination of bone mineral content (BMC)

The right tibia was dissected, weighed, and stored in a refrigerator at 4°C . The bone was digested in concentrated nitric acid for 16 h and then diluted with deionized water to determine the concentrations of calcium, magnesium, and zinc in atomic absorption spectrometer (GBC 908 AA Perkin Elmer, USA). The samples were prepared according to the methodology recommended by the Association of Official Analytical Chemists [12].

All glassware used in the analysis was demineralized, and all analyzes were performed in duplicate.

Femoral mechanical properties measurements

The analysis of bone strength were performed on the same bones that were analyzed for BMD, as for Vicentini et al. [13] Bones were submitted for testing mechanical universal testing machine (EMIC[®] model DL 3000, Brazil), with an applied load of 5 mm/min. The computer system coupled to the device recorded the force (load) and displacement and allowed controlling all parameters of the mechanical test and getting the value of the force for each shift. The acquisition of these points was performed in standardized intervals of time defined by the application. The analysis was performed on the neck and the middle third of the diaphysis of each femur.

We used femoral diaphysis bending test at three points, that is, the support of the femur on two supports 20-mm apart from each other at a load of 2000 N applied to the center of the sample. The application used automatically registers each increment of load applied to the material and the deformation corresponding to plot a load versus deformation graph and to obtain the maximum tensile strength, stiffness, and tenacity of the samples.

The same parameters (maximum tensile strength, stiffness, and tenacity) were observed in the neck femur, and the records issued by the application [Time (s) x Displacement (mm) x Force (N)] were transferred to spreadsheets (Microsoft Office Excel 2010 and Origin 8.0) for the construction of graphics and calculation of mechanical properties.

Histomorphometry

The left femur and the bone dissected free of soft tissue were fixed in neutral formalin (10% formaldehyde in sodium phosphate buffer 0.1 M) for 1 week at room temperature. Subsequently, the femurs were placed in decalcification vat containing an aqueous solution of sodium citrate and 20% (65 mL) and 90% formic acid (35 mL) remaining in this solution for 8 days [14]. After the initial descaling, transverse cuts were made in the femur, removing the greater trochanter and femoral neck, which was returned to Cuba with decalcification new solution for 7 days. Subsequently, the samples were dehydrated in alcohol 70%, 80%, 90%, and 100%, cleared in xylene, and embedded in paraffin. Histological sections of 5- μ m thick were obtained with a rotary microtome (Spencer, model 19459, USA), stained with hematoxylin and eosin (HE), and mounted with Canada balsam synthetic.

Histological sections were analyzed with the application Image-Pro Plus version 4.5.0.29 (Media Cybernetics, USA). The images were scanned using light microscope (Olympus BX60 camera coupled Q color 3 Olympus, Japan) with a 40x objective for the analysis of trabecular bone. For trabecular bone, ten images per animal in each group in different fields were taken. We estimated the number of osteoblasts, osteoclasts, and osteocytes per area in the region of the neck and the greater trochanter.

The response variables (Y = area, osteoblasts, osteoclasts, and osteocytes) were subjected to analysis of variance (ANOVA), followed by the following fixed effects models: $Y_i = u + G_i + E_{ij}$. Where, u is the overall mean, G_i is the effect of the group ($i = 1, 2, \dots, 8$), and E_{ij} is the unobservable random error model, with the usual assumptions of normality with mean equal to zero and homogeneity of variance among groups. Having a significant effect for the F test of ANOVA (1% or 5%) significance, the mean values were compared by Tukey's test in accordance with the significant interactions. A fundamental assumption of ANOVA, i.e., the homogeneity of variances was checked by Levene's test. None of the response variables showed heterogeneity.

All analyzes were implemented in SAS (Statistical Analysis System, SAS Institute Inc., Cary, NC; www.sas.com/offices/latinamerica/brazil/, version 9.2, licensed for UFV, 2012).

RESULTS

Body weight (BW)

The results concerning body weight (BW) of the animals before surgery, 15 days after, and 12 weeks after surgery are shown in Table 1.

Table 1: Representation of the body weight for each group during the experiment

Group	BW initial (g)	Age (week)	BW final (g)	Age (week)
GBS (n=4)	287,3 ± 11,2	20	294,5 ± 12,2	22
GBO (n=6)	272,3 ± 12,1	20	308,0 ± 12,8	22
SHAM (n=12)	271,1 ± 5,2	20	297,75 ± 8,1 ^a	32
GOVX (n=12)	272 ± 5,1 ^a	20	347,3 ± 7,4	32

Data were expressed as mean ± SE. GBS = whole baseline; GBO = ovariectomized baseline; SHAM = whole; GOVX = ovariectomized, n = number of animals. ANOVA followed by Tukey's test. ^a $p < 0,05$ vs GOVX final; .

There was no significant difference in the BW of the different groups at the

beginning of the treatments proving homogeneity among the constituents of animal groups at this stage. The rats subjected to ovariectomy GOVX ($347,3 \pm 7,4\text{g}$) acquired BW during the trial period.

Bone Mineral Density (BMD)

Significant difference was observed in the femur between the groups GBO and GBS ($0,226 \pm 0,022 \text{ g/cm}^2$ vs $0,255 \pm 0,003 \text{ g/cm}^2$, respectively) and also between GBS and SHAM groups ($0,255 \pm 0,003 \text{ g/cm}^2$ vs $0,229 \pm 0,018 \text{ g/cm}^2$). However, this difference was not maintained in the GOVX group as compared to the SHAM group at 12 weeks of the experiment. The values relating to BMD by DXA calculated are shown in Figure 1.

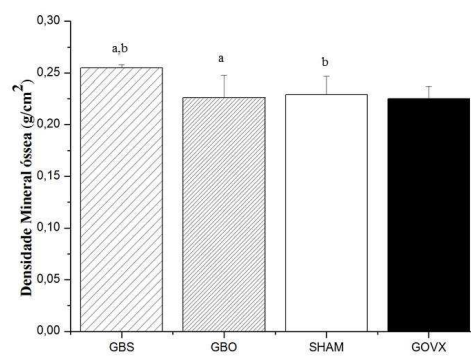


Figure 1: Bone mineral density of the femur of the experimental groups. Data expressed as mean $\pm$ SE. GBS = whole baseline (n = 4); GBO = ovariectomized baseline (n = 5); SHAM = whole (n = 12); GOVX = ovariectomized (n = 12), n = number of animals. ANOVA followed by Tukey's test. $p < 0,05$ equal letters differ.

Bone Mineral Content (BMC)

The difference was significant only in the zinc content, which was higher in the GBO, GBS, and GOVX groups as compared to the SHAM group ($0,40 \pm 0 \text{ mg/mL}$ vs $0,26 \pm 0 \text{ mg/mL}$; $0,25 \pm 0 \text{ mg/mL}$; $0,25 \pm 0 \text{ mg/mL}$, respectively). Other minerals analyzed showed no significant differences when compared to the different groups (Table 2).

Table 2: Content of calcium, magnesium, and zinc in the right tibia of rats of different experimental groups.

Groups	Ca ⁺² (mg/L)	Mg (mg/L)	Zn (mg/L)
GBS (n=2)	182,9 ±7,2	3,3 ±0,3	0,25 ±0 ^a
GBO (n=5)	204,46 ±5,3	3,6 ±0	0,26 ±0 ^a
SHAM (n=10)	179,82 ±3,9	3,07 ±0,1	0,40 ±0
GOVX (n=11)	201,06 ±10	3,26 ±0,2	0,25 ±0 ^a

Data expressed as mean ± SE. GBS = whole baseline; GBO = ovariectomized baseline; SHAM = whole; GOVX = ovariectomized, n = number of animals. ANOVA followed by Tukey's test. ^a p < 0,05 vs SHAM.

Femoral mechanical properties measurements

The results for bone strength in the femoral neck region show significant difference in stiffness with increase in the baseline group as compared with the other groups. However, the parameters tenacity and tensile strength had no difference (Figure 2). In femoral diaphysis, no significant difference was found with respect to stiffness. However, the results are contrary for the region of the femoral neck, because they indicate more rigidity in groups GOVX and SHAM compared to groups GBO and GBS. The toughness and tensile strength of femoral neck showed no significant differences among groups (Figure 3).

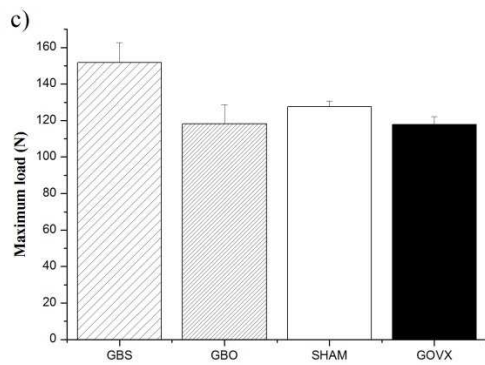
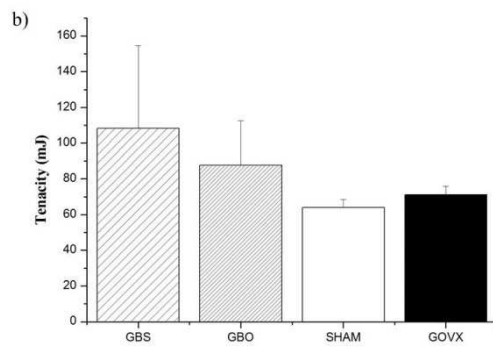
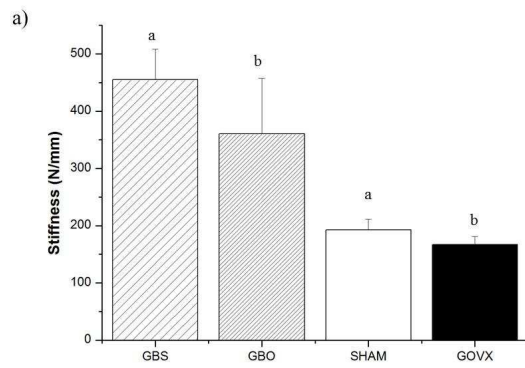


Figure 2: Femoral neck mechanical parameters. (a) Stiffness. (b) Tenacity. (c) Maximum load. Data expressed as mean $\pm$ SE. GBS (n = 4) whole baseline; GBO (n = 4) = ovariectomized baseline; SHAM (n = 12) = whole; GOVX (n = 12) = OVX. ANOVA followed by Tukey's test. $p < 0,05$ equal letters differ.

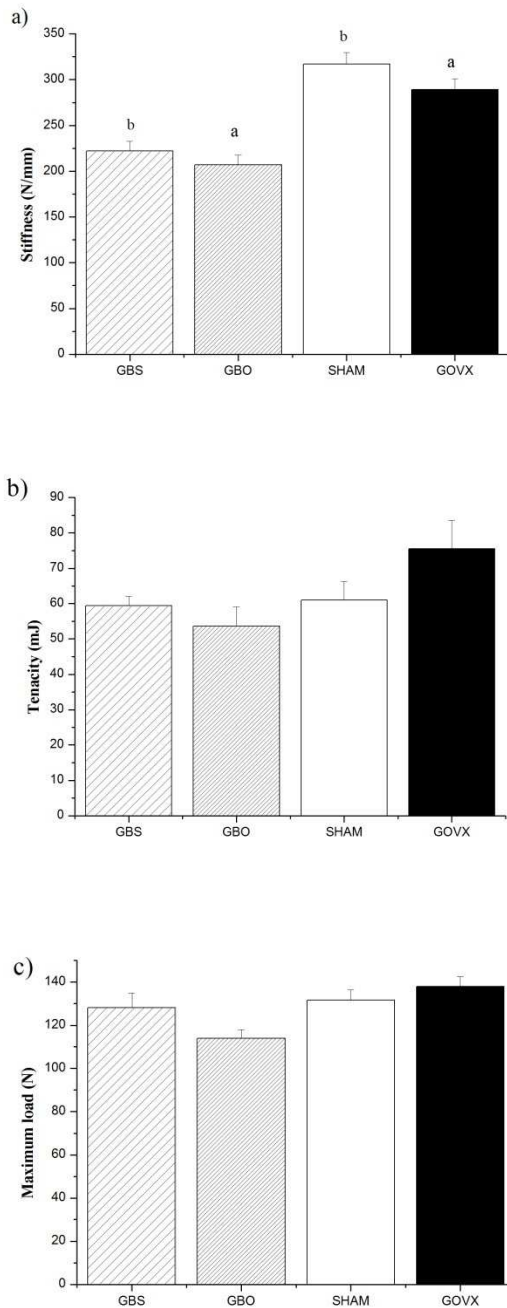


Figure 3: Femoral diaphysis mechanical parameters. (a) Stiffness. (b) Tenacity. (c) Maximum load. Data expressed as mean $\pm$ SE. Femoral neck mechanical parameters. (a) Stiffness. (b) Tenacity. (c) Maximum load. Data expressed as mean $\pm$ SE. GBS (n = 4) whole baseline; GBO (n = 6) = ovariectomized baseline; SHAM (n = 12) = whole; GOVX (n = 12) = OVX. ANOVA followed by Tukey's test. $p < 0,05$ equal letters differ.

Histomorphometry in the regions of the neck and greater trochanter

The results concerning the counting of cellular elements in the region of the femoral neck of the experimental groups are presented in Table 3.

Table 3: Area matrix and number of osteoblasts, osteoclasts, and osteocytes in the region of the femoral neck in rats of different experimental groups.

Groups	Ar (μm)	N.Ob	N.Oc	N.Ot
GBS (n=4)	160749,8 $\pm$ 10123,8	193,8 $\pm$ 24,7	0,75 $\pm$ 0,4	136,5 $\pm$ 13,5
GBO (n=5)	178722,3 $\pm$ 6822,6	150 $\pm$ 19,5 ^a	2,8 $\pm$ 1,2 ^a	172 $\pm$ 13,3
SHAM (n=9)	159821,8 $\pm$ 5941,7	164,8 $\pm$ 16,8	0 $\pm$ 0	150,6 $\pm$ 6,5
GOVX (n=8)	158507,9 $\pm$ 6225,7	225,8 $\pm$ 22,4	0,4 $\pm$ 0,2	182,3 $\pm$ 10,5

Data expressed as mean $\pm$ SE. GBS = whole baseline; GBO = ovariectomized baseline; SHAM = whole; GOVX = ovariectomized, n = number of animals. Ar = area array, N.Ob = number of osteoblasts, N.Oc = number of osteoclasts, N.Ot = number of osteocytes. ANOVA followed by Tukey's test. ^a p < 0,05 vs GOVX.

There were differences in the number of osteoblasts and osteoclasts between groups GBO and GOVX. Unlike osteoblasts, osteoclasts were more numerous in the first group. However, these differences were not observed among the other groups. The results concerning the counting of cellular elements in the region of the greater trochanter of the experimental groups are presented in Table 4. The number of osteoclasts was higher in the GBO group as compared to that in the GBS and GOVX groups (Table 4). No significant differences were observed for other cellular elements as well as in the matrix area in the region of the greater trochanter. The elements cellular assays are represented in Figure 4.

Table 4: Area matrix and number of osteoblasts, osteoclasts, and osteocytes in the region of the greater trochanter.

Groups	Ar (μm)	N.Ob	N.Oc	N.Ot
GBS (n=2)	164691,2 $\pm$ 11361,8	187,5 $\pm$ 12,5	0,5 $\pm$ 0,5	136,5 $\pm$ 16,5
GBO (n=3)	165584,8 $\pm$ 9814,9	198 $\pm$ 12,8	4 $\pm$ 1,5 ^{a,b}	205,7 $\pm$ 22,2
SHAM (n=8)	152083,4 $\pm$ 4679,5	264,8 $\pm$ 11,9	0 $\pm$ 0	166,6 $\pm$ 10
GOVX (n=8)	145561,8 $\pm$ 4403,8	245,1 $\pm$ 17,6	0,4 $\pm$ 0,2	189,3 $\pm$ 14,8

Data expressed as mean $\pm$ SE. GBS = whole baseline; GBO = ovariectomized baseline; SHAM = whole; GOVX = ovariectomized, n = number of animals. Ar = area array, N.Ob = number of osteoblasts, N.Oc = number of osteoclasts, N.Ot = number of osteocytes. ANOVA followed by Tukey's test. ^a $p < 0,05$ vs GOVX; ^b $p < 0,05$ vs GBS.

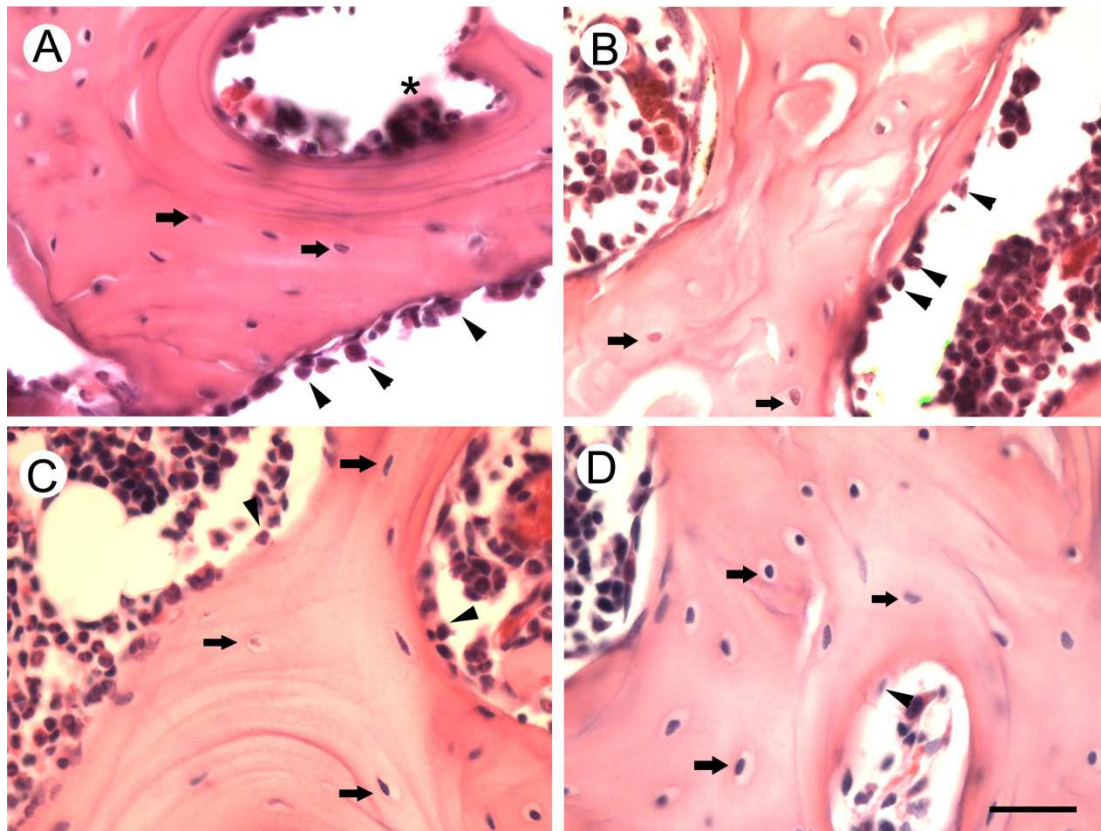


Figure 4: Photomicrographs of the region of the greater trochanter of the femur of rats. (A)

GBO = baseline OVX, (B) baseline SHAM = GBS, (C) GOVX = ovariectomized, (D) SHAM = whole. Cellular elements and the area of the matrix analyzed showed no significant differences among groups. Osteoblasts (arrowhead); Osteoclasts (asterisk); Osteocytes (arrows). HE. Bar: 40 μ .

DISCUSSION

In the present study, we investigated bone changes after ovariectomy in female rats of 22 (baseline) and 32 weeks of age. Compared with humans, mice have shorter childhood and an accelerated growth during childhood, and thus they become sexually mature at about 6 weeks. At baseline, when the animals were ovariectomized, they were in adulthood [15,16].

Rats of similar age as in the present study were used as a model of osteoporosis induced by ovariectomy [17,18,19,4]. Nevertheless, ovariectomized rats cannot yet be regarded as an ideal model for this study because the age of the animals, the variation of time after ovariectomy, and the bone influence the results obtained [9].

Animals showed increased BWs at the end of the experiment. However, the animals that underwent ovariectomy acquired BW during the trial period. This increased GBO groups and BW was GOVX result of ovariectomy and is consistent with reports from other studies [20,21,19,4,22]. Shinoda et al. reported that increased BW results are low hormone levels because of the ovariectomy, which leads to higher food intake and higher fat accumulation. In this study, the animals received the same amount of daily ration; therefore, the gain of BW is due to the effects of ovariectomy that probably reduced estrogen levels. The hormonal levels were not measured, but the ovariectomized animals were observed to be more stressed and apparently had greater appetite (personal observation). Poehlman et al. [23] reported that the reduction of estrogen levels determines decreased energy expenditure in postmenopausal women and, consequently, increased body fat.

Bone densitometry (DXA) is conventionally used to evaluate the degree of bone loss in postmenopausal women and is also frequently used in animal models. The femurs of the GBS groups showed higher BMD compared to the GBO and SHAM groups, but did not differ from that of the GOVX group. The DXA with software designed for small animals can be used to measure total and regional bone density. However, the apparent changes in BMD as measured by DXA growing animal is a

consequence of the growth and size, rather than the actual changes of BMD. In our study, the animals were adults, therefore, differences in BMD reflect differences in mineral concentration per area of bone tissue [10].

Our results indicate that ovariectomy resulted in lower femur. However, this loss was recovered over 12 weeks, because the GOVX group had no significant difference in BMD as compared to the GBO group. Probably the weight gain observed in GOVX determined BMD [24] increase to support the increase of BW. Park et al. [24] found that animals ovariectomized at 12 weeks of age showed significant reduction in femoral BMD with 6 and 8 weeks postsurgery as compared to the SHAM group and baseline. Likewise, Lei et al. [25] evaluated ovariectomized rats with initial age of 12 weeks, found that after 8 weeks the animals showed reduced BMD. We believe that these differences can be credited to the age of animals that were not yet adults [9] or the strain of rats used in the two studies cited were Sprague-Dawley rats [9,25].

The zinc content in the tibia was significantly lower in the GBO, GBS, and GOVX groups. Zinc is an essential element for bone metabolism and has a stimulatory effect on bone formation and mineralization *in vivo* and *in vitro*, decreases bone resorption, and stimulates alkaline phosphatase activity in cultured osteoblasts [26,27]. However, in this study, higher concentration of zinc was observed in the SHAM animals tibia in relation to the parameters reported in the literature. Omi [28] noted that the restriction of dietary calcium in ovariectomized animals resulted in a significant decrease in BMD and bone strength. Our results demonstrate that, although ovariectomy have influenced the zinc content, this decrease was not significant in terms of alterations in calcium content in the tibia of these animals.

The bending test was used to evaluate the mechanical properties of the proximal (femoral neck) and femoral shaft. The decrease in stiffness in the femur of older animals in the present study showed no association to ovariectomy with age, however this occurred indiscriminately in the GOVX and SHAM groups. The same reasoning can be used for the bending test at the femoral shaft. In this case, older animals showed greater strength in the femoral shaft.

In the femoral neck, the cortical diaphysis predominates instead of trabecular bone [29]. Natural metabolic processes in the bone tissue are more intense in than the trabecular bone cortex [30,31,32]. Thus, the results observed in the bending test in this study appeared to be related to the natural aging process, because, in addition to ovariectomy, it did not influence the stiffness and did not alter the parameters of

toughness and tensile strength of the femur.

Some studies with rats of 20 and 24 weeks of age showed a decrease in maximal strength in the femoral neck [33,34] and the shaft [34] of the tibia of ovariectomized animals [33].

The use of animals of the Sprague-Dawley strain by Peng et al. could explain the results contrary to ours. However, Abrahão et al. [34] used Wistar rats of similar age as used in this study and observed decrease in maximum force in the femur and the tibial shaft of ovariectomized rats, although they did not notice significant differences in stiffness in any of the regions.

The count of cellular elements in the region of the neck and greater trochanter of the femur showed increased osteoblasts, and osteoclasts decreased in ovariectomized animals during treatment. However, this finding does not appear to be significant, as there was no difference among the groups. The regions are analyzed for trabecular bone, and the fact that no changes occurred in the matrix, and the number of osteocytes indicates that the processes of bone formation and resorption were not significantly altered. Studies demonstrating changes in the cell number as a function of ovariectomy were developed in young rats of Sprague-Dawley strain and, in general, described, as expected, increased osteoclast and decreased osteoblast [35,25].

Thus, our results indicate that surgical removal of the ovaries of adult female rats does not significantly alter the main bone parameters up to 90 days of observation. On the other hand, it was evidenced that weight gain after menopause may have a protective effect on bone microarchitecture [36].

REFERENCES

1. Lin JT, Lane JM (2004) Osteoporosis: a review. Clin Orthop Relat Res Aug; 425:126-34.
2. Ralston SH, Uitterlinden AG (2010) Genetics of osteoporosis. Endocr Rev Oct;31(5):629-62.
3. Gammage KL, Francoeur C, Mack DE, Klentrou P (2009) Osteoporosis health beliefs and knowledge in college students: the role of dietary restraint. Eat Behav Jan;10(1):65-7.

4. Yoon KH, Cho DC, Yu SH, Kim KT, Jeon Y, Sung JK (2012) The change of bone metabolism in ovariectomized rats: Analyses of microCT scan and biochemical markers of bone turnover. *J Korean Neurosurg Soc Jun*;51(6):323-7.
5. Cohen AJ, Roe FJ (2000) Review of risk factors for osteoporosis with particular reference to a possible aetiological role of dietary salt. *Food Chem Toxicol Feb-Mar*;38(2-3):237-53.
6. Maddalozzo GF, Turner RT, Edwards CH, Howe KS, Widrick JJ, Rosen CJ, et al (2009) Alcohol alters whole body composition, inhibits bone formation, and increases bone marrow diposity in rats. *Osteoporos Int Sep*;20(9):1529-38.
7. Hart KJ, Shaw JM, Vajda E, Hegsted M, Miller SC (2001) Swim-trained rats have greater bone mass, density, strength, and dynamics. *J Appl Physiol Oct*;91(4):1663-8.
8. Gnudi S, Sitta E, Fiumi N (2007) Relationship between body composition and bone mineral density in women with and without osteoporosis: relative contribution of lean and fat mass. *J Bone Miner Metab* 25(5):326-32.
9. Francisco JI, Yu Y, Oliver RA, Walsh WR (2011) Relationship between age, skeletal site, and time post-ovariectomy on bone mineral and trabecular microarchitecture in rats. *J Orthop Res Feb*;29(2):189-96.
10. Hernandez L, Ramos AL, Micheletti KR, Santi AP, Cuoghi OA, Salazar M (2012) Densitometry, radiography, and histological assessment of collagen as methods to evaluate femoral bones in an experimental model of osteoporosis. *Osteoporos Int Feb*;23(2):467-73.
11. Li M, Shen Y, Wronski TJ (1997) Time course of femoral neck osteopenia in ovariectomized rats. *Bone Jan*; 20(1):55-61.
12. AOAC (1998) Official methods of analysis. Washington, D.C.

13. Vicentini CR, Rosa RAC, Ciarlini LDRP, Santos PH, Louzada MJQ (2007) Análise Biomecânica em fêmures de ratos submetidos à ausência de carga e atividade física em esteira. *Vet e Zootec Jun*;14(1):62-71.
14. Bancroft JD, Gamble, M (2008) *Theory and Practice of Histological Techniques*, 6th Ed. Churchill Livingstone, Elsevier, Philadelphia.
15. Quinn R (2005) Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? *Nutrition Jun*; 21(6):775-7.
16. Andreollo NA, Santos EF, Araujo MR, Lopes LR (2012) Rat's age versus human's age: what is the relationship? *Arq Bras Cir Dig Mar*; 25(1):49-51.
17. Omi N, Ezawa I(1995) The effect of ovariectomy on bone metabolism in rats. *Bone Oct*; 17(4 Suppl):163S-8S.
18. Netto CC, Franco M, Cunha MSCA, Miyasaka CK(2006) Efeitos da ovariectomia experimental no metabolismo ósseo de ratas wistar adultas: um modelo para estudo da osteoporese. *R Ci med biol Set/Dez*; 5(3): 231-8.
19. Miyagawa K, Kozai Y, Ito Y, Furuhami T, Naruse K, Nonaka K, et al. (2011) A novel underuse model shows that inactivity but not ovariectomy determines the deteriorated material properties and geometry of cortical bone in the tibia of adult rats. *J Bone Miner Metab Jul*; 29(4):422-36.
20. French DL, Muir JM, Webber CE (2008) The ovariectomized, mature rat model of postmenopausal osteoporosis: an assessment of the bone sparing effects of curcumin. *Phytomedicine Dec*;15(12):1069-78.
21. Fonseca H, Moreira-Goncalves D, Esteves JL, Viriato N, Vaz M, Mota MP, et al. (2011) Voluntary exercise has long-term in vivo protective effects on osteocyte viability and bone strength following ovariectomy. *Calcif Tissue Int Jun*; 88(6):443-54.
22. Shinoda M, Latour MG, Lavoie JM (2002) Effects of physical training on body

composition and organ weights in ovariectomized and hyperestrogenic rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* Mar;26(3):335-43.

23. Poehlman ET, Toth MJ, Gardner AW (1995) Changes in energy balance and body composition at menopause: a controlled longitudinal study. *Ann Intern Med* Nov;123(9):673-5.

24. Park SB, Lee YJ, Chung CK (2010). Bone mineral density changes after ovariectomy in rats as an osteopenic model : stepwise description of double dorso-lateral approach. *J Korean Neurosurg Soc* Oct;48(4):309-12.

25. Lei Z, Xiaoying Z, Xingguo L (2009) Ovariectomy-associated changes in bone mineral density and bone marrow haematopoiesis in rats. *Int J Exp Pathol* Oct;90(5):512.

26. Yamaguchi M (1998). Role of zinc in bone formation and bone resorption. *J Trace Elem Exp Med* 11:119-35.

27. Seo HJ, Cho YE, Kim T, Shin HI, Kwun IS (2010) Zinc may increase bone formation through stimulating cell proliferation, alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in osteoblastic MC3T3 E1 cells. *Nutr Res Pract* 4(5):356-361.

28. Omi N, Ezawa I (2011) Animal models for bone and joint disease. Low calcium diet-induced rat model of osteoporosis. *Clin Calcium* Feb;21(2):173-80.

29. Stenron M, Olander B, Lehto-Axitelius D, Madsen JE, Nordsletten L, Clarisson GA (2000) Bone mineral density and bone structure parameters as predictors of bone strength: an analysis using computerized microtomograph and gastrectomy-induced osteopenia in the rat. *J Biomech* 33:289-297.

30. Bagi CM, Ammann P, Rizzoli R, Miller SC (1997) Effect of estrogen deficiency on cancellous and cortical bone structure and strength of the femoral neck in rats. *Calcif Tissue Int* Oct;61(4):336-44.

31. Mosekilde L, Thomsen JS, Orhii PB, Kalu DN (1998) Growth hormone increases

vertebral and femoral bone strength in osteopenic, ovariectomized, aged rats in a dose-dependent and site-specific manner. *Bone* Oct;23(4):343-52.

32. Le Corroller T, Pithioux M, Chaari F, Rosa B, Parratte S, Maurel B, et al. (2013) Bone texture analysis is correlated with three-dimensional microarchitecture and mechanical properties of trabecular bone in osteoporotic femurs. *J Bone Miner Metab* Jan 31(1):82-8.

33. Peng ZQ, Vaananen HK, Tuukkanen J (1997) Ovariectomy-induced bone loss can be affected by different intensities of treadmill running exercise in rats. *Calcif Tissue Int* May;60(5):441-8.

34. Abrahão GS, Shimano AC, Picado CHE (2006) Ação da atividade física sobre as propriedades mecânicas dos fêmures e tíbias de ratas osteopênicas. *Acta Ortop Bras*14(5):242-45.

35. Wronski TJ, Lowry PL, Walsh CC, Ignaszewski LA (1985) Skeletal alterations in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* May; 37(3):324-8.

36. Petzel M (2007) Action of leptin on bone and its relationship to menopause. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* Dec;151(2):195-9.

TREINAMENTO EM NATAÇÃO: PROPRIEDADES ESTRUTURAIS E CELULARES NO FÊMUR E TÍBIA DE RATAS OVARIECTOMIZADAS

RESUMO

O estrogênio está diretamente ligado ao metabolismo ósseo e sua deficiência estimula a atividade dos osteoclastos podendo levar a uma redução da densidade mineral óssea. Neste estudo, analisamos a influência do treinamento de natação sobre alguns parâmetros estruturais do tecido ósseo de ratas ovariectomizadas (OVX) em comparação com ratas submetidas apenas a laparotomia (SHAM). Os animais foram separados em seis grupos, sendo: GBO (baseline OVX), GBS (baseline SHAM), NO (natação OVX), NS (natação SHAM), CONO (controle OVX) e CONS (controle SHAM). Os grupos GBO e GBS foram submetidos a eutanásia duas semanas após as cirurgias; os grupos NO e NS foram submetidos ao treinamento de natação com sobrecarga por 10 semanas; e os grupos CONO e CONS permaneceram em gaiolas individuais sem exercício pelo mesmo período. Os últimos quatro grupos foram eutanasiados doze semanas após a cirurgia. Avaliou-se a densidade mineral óssea radiográfica (DMOR), conteúdo mineral ósseo (CMO) e elementos celulares. A DMOR foi maior ($p < 0,05$) no grupo NO comparado aos grupos GBO, CONO e NS. O CMO de cálcio e magnésio na tíbia foi maior ($p < 0,05$) no grupo NO comparado ao grupo NS. No colo do fêmur, o número de osteoblastos foi maior ($p < 0,05$) no grupo NO comparado ao grupo GBO. Registrou-se maior ($p < 0,05$) número de osteoclastos no grupo GBO comparado aos grupos NO e CONO. No trocânter maior do fêmur, os osteoblastos foram mais numerosos ($p < 0,05$) no grupo NO que nos grupos GBO e NS; já os osteoclastos foram maiores ($p < 0,05$) no grupo GBO comparado aos grupos GBS, NO e CONO. Os osteócitos também foram mais numerosos ($p < 0,05$) no grupo GBO que nos grupos GBS e NO. Nossos resultados indicam que o treinamento em natação com sobrecarga pode ser um aliado no tratamento de distúrbios ósseos em mulheres pós-menopausa, visto que houve um aumento na DMO e no conteúdo de cálcio e magnésio nos animais ovariectomizados treinados.

Palavras chave: menopausa, ovariectomia, atividade física, osso, histofisiologia.

INTRODUÇÃO

O estrogênio interfere diretamente no metabolismo ósseo e sua deficiência provoca a redução da densidade mineral óssea (DMO), pois este hormônio inibe a saída de cálcio do osso, reduzindo a atividade dos osteoclastos e promovendo a diferenciação e maturação dos osteoblastos ^(5,7).

As forças de tensão, compressão e cisalhamento geradas pelo suporte da massa corporal e pelas contrações musculares durante o exercício físico constituem estímulos importantes para a formação óssea ⁽⁵⁾ e desempenham papel importante para minimizar a perda óssea em mulheres na pós-menopausa ^(3,6,40) e em ratas ovariectomizadas ^(4,15,27).

Há evidências crescentes de que a prática de exercício físico contribui para a prevenção e tratamento da osteoporose devido ao efeito osteogênico gerado pelo estímulo mecânico no tecido ósseo ^(3,25). A ação osteoindutiva do exercício físico ocorre em função do aumento da secreção de proteínas morfogenéticas (BMPs) que atuam inibindo a reabsorção e estimulando a formação óssea ⁽³⁸⁾. O treinamento aeróbico como a corrida ⁽¹⁸⁾ e a natação ^(17,26), assim como os exercícios resistidos ^(21,27,36) promovem estímulos osteogênicos.

O exercício de natação pode ser considerado estratégico para reduzir o risco de osteoporose ⁽¹⁴⁾. Alguns estudos indicam efeito positivo da natação na redução da perda óssea em ratos ^(17,25,26).

Ratas ovariectomizadas é o modelo animal mais utilizado na tentativa de entendimento da fisiopatologia da osteoporose em mulheres na pós-menopausa, uma vez que a perda óssea induzida pela ovariectomia em ratas compartilha muitas das características clínicas observadas neste grupo de mulheres ^(10,37).

No presente estudo, a hipótese é que o exercício de natação com sobrecarga minimizaria os efeitos deletérios da deficiência de estrogênio em ratas adultas. Assim, investigou-se os efeitos do exercício de natação sobre as propriedades estruturais e celulares do fêmur e tíbia de ratas ovariectomizadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostra

Foram utilizadas 58 ratas Wistar adultas (*Rattus norvegicus*), com idade inicial de 20 semanas, peso médio $271,42 \pm 17,6$ g, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, sendo aprovados pelo Comitê de Ética da UFV sob parecer nº 02/2009.

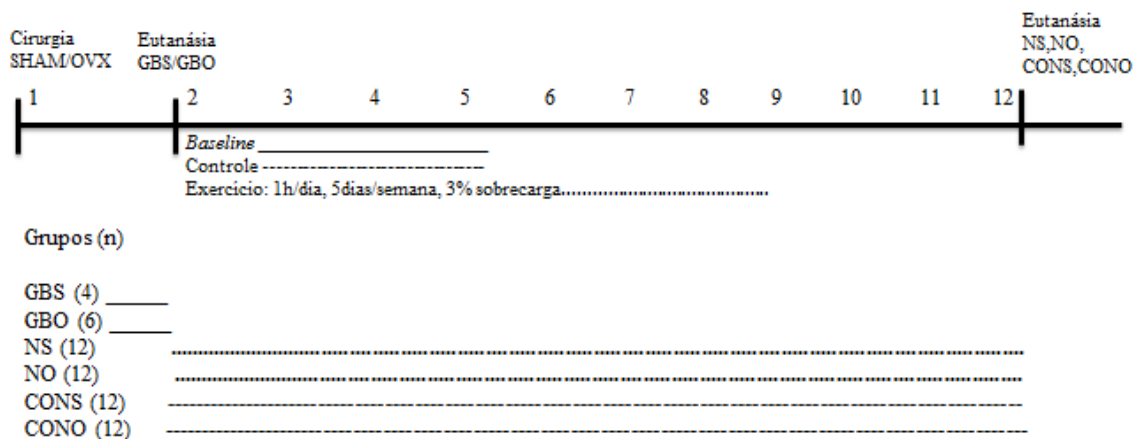
Trinta animais foram submetidos à ovariectomia (OVX) e os vinte e oito restantes somente à laparotomia com simulação da retirada dos ovários (SHAM). Antes das cirurgias, cada animal foi anestesiado com cetamina (20mg/kg) e xilazina (2,71mg/kg) via intramuscular; e receberam anti-inflamatório (flunixin meglumina: 0,68mg/kg) e antibiótico (enrofloxocina: 2,71mg/kg), ambos via subcutânea. Nas primeiras 5 horas após a cirurgia, os animais permaneceram em câmara aquecida.

Posteriormente, os animais foram distribuídos em seis grupos experimentais e alojados em gaiolas individuais (20x20x30cm de altura, largura e profundidade, respectivamente), mantidos em ambiente com temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de cerca de 60% e fotoperíodo de 12 horas. Cada animal recebeu, diariamente, 20g de ração comercial (Socil[®]) triturada e água *ad libitum*.

Um grupo de 10 animais (*baseline*) constituído de ratas ovariectomizadas (n=6) e inteiras (n=4) foi submetido à eutanásia 15 dias após a cirurgia, objetivando determinar a influência da cirurgia sobre a homeostase óssea. Os animais restantes permaneceram por 12 semanas em gaiolas individuais.

Em síntese, foram formados 6 grupos experimentais:

GBS *baseline* (n = 4): ratas SHAM submetidas à eutanásia 15 dias após cirurgia;
GBO *baseline* (n = 6): ratas OVX submetidas à eutanásia 15 dias após cirurgia;
NS (n = 12): ratas SHAM que realizaram o treinamento de natação por 10 semanas;
NO (n = 12): ratas OVX que realizaram o treinamento de natação por 10 semanas;
CONS (n = 12): ratas SHAM que permaneceram em gaiola por 12 semanas.
CONO (n = 12): ratas OVX que permaneceram em gaiola por 12 semanas;
O delineamento experimental está representado abaixo:



Os animais foram pesados em balança de precisão uma vez por semana durante as 12 semanas do período experimental para registro da massa corporal.

Protocolo de Exercício

Quinze dias após as cirurgias, os animais dos grupos NO e NS foram submetidos a um programa de natação com sobrecarga, 5 dias por semana e duração progressivas (adaptado de Huang ⁽¹⁷⁾) por 10 semanas (Tabela 1). O exercício foi realizado em um tanque de alvenaria quadrado (45 cm de profundidade, 55 cm de largura e comprimento) com água a temperatura média de $30 \pm 2^\circ\text{C}$. A sobrecarga de treino foi aplicada, conforme tabela 1, usando-se arruelas de metal atadas ao tórax do animal por uma tira elástica.

Tabela 1. Carga do treino em natação

Semana	Carga (% do peso corporal)	Duração (minutos)
1	0%	30
2	1%	50
3 a 6	2%	60
7 a 10	3%	60

NO: natação OVX. NS: natação SHAM

Avaliação do desempenho físico dos animais

Com o objetivo de avaliar a eficiência do treinamento aplicado na melhora do desempenho físico das ratas para a natação, todas foram submetidas a um teste de resistência à natação 48 horas após a última sessão de treino. Os animais foram colocados na água e nadaram com carga de quatro por cento (4%) do peso corporal (carga considerada abaixo do limiar de lactato para ratos) ^(12,39) o maior tempo possível, até a exaustão, que foi identificada quando o animal permanecia por 15 segundos submersos na água sem nadar. O tempo máximo de natação até a exaustão foi adotado como desempenho físico do animal para a natação.

Determinação da Densidade Mineral Óssea Radiográfica (DMOR)

A avaliação da Densidade Radiográfica foi realizada no fêmur direito em aparelho de Raios-X (Raios-X CRX500 ms 150KV) na dosagem de 40KV 50ms a 0,06 segundos e, com processadora automática.

Como referencial densitométrico nas tomadas radiográficas foi utilizada escada de alumínio (liga 6063, ABNT), colocada próxima aos fêmures, na direção do feixe principal dos Raios X ^(23,24). O programa computacional “Image J®” - versão 1.43u (domínio público – <http://rbs.info.nih.gov/ij>) foi utilizado para contornar toda a região de interesse, utilizando recurso de definição de área do programa, e, assim, determinar o nível de densidade média, em tons de cinza (até 256 níveis), dos fêmures e dos degraus da escada de alumínio. Os valores dos fêmures foram convertidos para valores relativos à espessura em milímetros de alumínio obedecendo às etapas descritas por metodologia de Louzada ⁽²²⁾. Desta maneira, a densidade óssea foi expressa em equivalente de alumínio (mmAl). A análise foi realizada na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), em Araçatuba, São Paulo.

Determinação do conteúdo mineral ósseo (CMO)

A tíbia direita foi dissecada, pesada e armazenada em refrigerador a 4°C. O osso foi digerido em ácido nítrico concentrado por 16 horas e, a seguir, diluído em água

deionizada para determinação da concentração de cálcio, magnésio e zinco em espectrômetro de absorção atômica (GBC 908 AA, Perkin Elmer – USA). As amostras foram preparadas segundo metodologia preconizada pela Association of Official Analytical Chemists ⁽¹⁾.

Toda vidraria utilizada na análise foi desmineralizada. Todas as análises foram realizadas em duplicata. Todos os procedimentos desta análise foram realizados no Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais.

Histomorfometria

O fêmur esquerdo foi dissecado e o osso, livre dos tecidos moles, foi fixado em solução de formalina neutra (formaldeído 10% em tampão fosfato de sódio 0,1M), por uma semana, a temperatura ambiente. Posteriormente, os fêmures foram colocados em cuba descalcificadora, contendo solução aquosa de citrato de sódio a 20% (65 mL), e ácido fórmico a 90% (35 mL) permanecendo nesta solução por 8 dias ⁽²⁾. Após a descalcificação inicial, foram feitos cortes transversais no fêmur, removendo-se o trocânter maior e o colo do fêmur, que retornaram à cuba descalcificadora com solução nova, por mais 7 dias. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em álcool 70%, 80%, 90% e 100%, diafanizadas em xilol, e incluídas em parafina. Secções histológicas de 5 micrômetros (µm) de espessura foram obtidas em micrótomo rotativo (Spencer, modelo 19459 - USA), coradas com hematoxilina e eosina (HE) e montadas com bálsamo do Canadá sintético.

As secções histológicas foram analisadas com auxílio do aplicativo Image-Pro Plus (figura 1A) versão 4.5.0.29 (Media Cybernetics; USA). As imagens foram digitalizadas utilizando fotomicroscópio (Olympus BX60 com câmera acoplada Q color 3 Olympus, Japan) com objetiva de 40x para análise do osso trabecular. No osso trabecular foram realizadas dez imagens por animal de cada grupo, em campos distintos (figura 1B). Estimou-se o número de osteoblastos, osteoclastos e osteócitos por área de matriz óssea na região do colo e do trocânter maior do fêmur. O preparo e a montagem das lâminas histológicas foram realizados no Laboratório de Histopatologia, do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais. As imagens obtidas em fotomicroscópio (BX-60, Olympus,

Japan) no Laboratório de Citogenética de Insetos do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais.

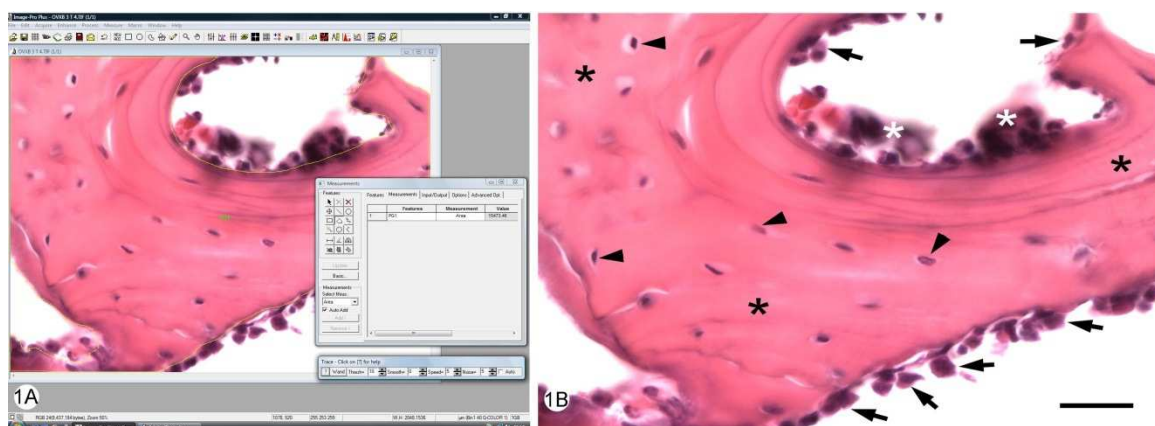


Figura 1: 1A: Imagem representativa da medida de área de matriz (linha amarela) utilizando o programa Image Pro Plus. 1B: Imagem representativa dos elementos celulares analisados na secção histológica do trocânter maior do fêmur. Setas - osteoblastos; cabeças de setas - osteócitos; asteriscos brancos - osteoclastos; asteriscos pretos - matriz. Coloração - hematoxilina e eosina. Barra: 20μ.

Análise Estatística

As variáveis respostas (Y = área, osteoblastos, osteoclastos e osteócitos) foram submetidas à análise de variância (ANOVA) seguindo-se os seguintes modelos de efeitos fixos: $Y_i = u + G_i + E_{ij}$. Em que u é a média geral, G_i é o efeito do i -ésimo grupo ($i=1,2, \dots, 8$) e E_{ij} é o erro aleatório não observável do modelo, com as pressuposições usuais de normalidade com média igual a zero e homogeneidade de variâncias entre os grupos. Havendo efeito significativo pelo teste F da ANOVA (a 1% ou a 5%) de significância, os valores médios foram comparados pelo teste de Tukey, apropriadamente de acordo com as interações significativas ou não. Uma pressuposição fundamental da ANOVA, a homogeneidade de variâncias, foi verificada pelo teste de Levene. Nenhuma das variáveis resposta apresentou heterogeneidade. Para as comparações entre os tratamentos com o grupo *baseline* adotou-se o teste de Dunnett.

Todas as análises foram implementadas no software SAS (Statistical Analysis System, SAS Institute Inc., Cary, NC -www.sas.com/offices/latinamerica/brazil/) versão 9.2, licenciada para a UFV, 2012.

RESULTADOS

Massa Corporal

Os resultados referentes à massa corporal (MC) dos animais antes da cirurgia, 15 dias após e 12 semanas após a cirurgia, estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Representação da massa corporal dos animais, por grupo, durante o experimento.

Grupo	MC inicial (g)	Idade (semanas)	MC final (g)	Idade (semanas)
GBS (n=4)	272,3 ± 11,2	20	294,5 ± 12,2	22
GBO (n=6)	272,3 ± 12,1	20	308,0 ± 12,8 ^a	22
NS (n=12)	271,7 ± 5,6	20	290,0 ± 6,2	32
NO (n=12)	272,3 ± 5,2	20	341,6 ± 6 ^b	32
CONS (n=12)	271,1 ± 5,2	20	297,75 ± 8,1 ^a	32
CONO (n=12)	272 ± 5,1	20	347,3 ± 7,4	32

Dados expressos em média ± erro padrão. SHAM = ratas inteiras; OVX = ratas ovariectomizadas. GBS = *baseline* SHAM; GBO = *baseline* OVX; NS = natação SHAM; NO = natação OVX; CONS = controle SHAM; CONO = controle OVX; n = número de animais. ANOVA seguida do teste de Tukey. ^a p<0,05 vs CONO; ^b p<0,05 vs NS.

No início do experimento não houve diferença de MC entre os animais dos diferentes grupos. Porém, após 15 dias de cirurgia, os animais OVX apresentaram maior massa corporal, em relação aos SHAM (305,0 ± 8,7 g vs 268,8 ± 8,8 g, respectivamente), independentemente do fator exercício. Esta diferença permaneceu ao final do experimento (OVX = 344,42 ± 4,7 g vs SHAM = 293,88 ± 5,1 g, respectivamente). Todavia, não foi observado efeito do exercício (NATAÇÃO = 315,79 ± 6,9 g vs CONTROLE = 322,50 ± 7,5 g) e não houve interação entre os fatores cirurgia e exercício para a massa corporal final (p > 0,05).

Desempenho físico dos animais

Os resultados mostram que os animais treinados em natação, tanto as ratas OVX quanto as SHAM, apresentaram maior ($p > 0,05$) desempenho físico para a natação que as respectivas controles (NO = $145,9 \pm 18,4$ min vs CONO = $42,7 \pm 7,2$ min; NS = $89,1 \pm 15,1$ min vs CONS = $28,5 \pm 5,8$ min).

Densidade Mineral Óssea Radiográfica (DMOR)

A densidade mineral óssea no grupo ovariectomizado treinado (NO) foi maior que o seu *baseline* (GBO), que o controle (CONO) e que os animais treinados inteiros (NS). Os resultados referente a densidade mineral óssea radiográfica dos seis grupos experimentais estão apresentados na figura 2.

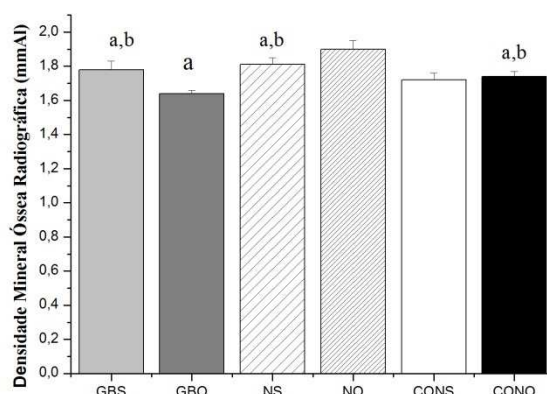


Figura 2: Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. SHAM = inteiras; OVX = ovariectomizadas. GBS (n=4) = *baseline* SHAM; GBO (n=6) = *baseline* OVX; NS (n=12) = natação SHAM; NO (n=12) = natação OVX; CONS (n=12) = controle SHAM; CONO (n=12) = controle OVX. ANOVA seguida do teste de Tukey. ^a $p < 0,05$ vs NO; ^b $p < 0,05$ vs CONS; ^c $p < 0,05$ vs GBO.

Conteúdo Mineral Ósseo (CMO)

O grupo ovariectomizado treinado (NO) apresentou diferença significativa nos minerais cálcio, magnésio e zinco quando comparado aos animais treinados inteiros

(NS). Os demais grupos experimentais apresentaram diferenças significativas apenas no conteúdo de zinco (Tabela 3).

Tabela 3: Conteúdo de cálcio, magnésio e zinco na tíbia direita das ratas dos diferentes grupos experimentais.

Grupos	Ca⁺² (mg/L)	Mg (mg/L)	Zn (mg/L)
GBS (n=2)	182,9 ±7,2	3,3 ±0,3	0,25 ±0,1 ^{a,b}
GBO (n=5)	204,5 ±5,3	3,6 ±0,1	0,26 ±0
NS (n=11)	158,6 ±17,7	2,7 ±0,3	0,37 ±0
NO (n=11)	204 ±2,9 ^a	3,5 ±0,1 ^a	0,28 ± 0 ^a
CONS (n=10)	179,8 ±3,9	3,1 ±0,1	0,40 ±0
CONO (n=11)	201,1 ±10,1	3,3 ±0,2	0,25 ±0 ^b

Dados expressos em média ± erro padrão. SHAM = ratas inteiras; OVX = ratas ovariectomizadas. GBS = *baseline* SHAM; GBO = *baseline* OVX; NS = natação SHAM; NO = natação OVX; CONS = controle SHAM; CONO = controle OVX; n = número de animais. ANOVA seguida do teste de Tukey. ^a p<0,05 vs NS; ^b p<0,05 vs CONS.

Histomorfometria nas regiões do colo e trocânter maior do fêmur

Os resultados referentes à contagem dos elementos celulares na região do colo do fêmur dos grupos experimentais estão apresentados na tabela 4.

No colo do fêmur, os osteoblastos foram mais numerosos nos animais ovariectomizados treinados (NO) do que no grupo *baseline* ovariectomizado (GBO). Contudo não houve diferença significativa entre NO e os demais grupos.

O número de osteoclastos foi maior no grupo *baseline* ovariectomizado (GBO) do que os animais ovariectomizados treinados (NO) e ovariectomizados controle (CONO).

Não foram observadas diferenças significativas no número de osteócitos e área de matriz entre os grupos experimentais.

Tabela 4: Área de matriz e número de osteoblastos, osteoclastos e osteócitos na região do colo do fêmur de ratas dos diversos grupos experimentais.

Grupos	Ar (μm)	N.Ob	N.Oc	N.Ot
GBS (n=4)	160749,8 $\pm$ 10123,8	193,8 $\pm$ 24,8	0,75 $\pm$ 0,4	136,5 $\pm$ 13,5
GBO (n=5)	178722,3 $\pm$ 6822,6	150 $\pm$ 19,5	2,8 $\pm$ 1,2	172 $\pm$ 13,3
NS (n=8)	152068,1 $\pm$ 5013	228 $\pm$ 31,6	0,37 $\pm$ 0,2	167,9 $\pm$ 4,7
NO (n=10)	146771,8 $\pm$ 6160,1	274,1 $\pm$ 11 ^a	0,9 $\pm$ 0,3 ^a	173,2 $\pm$ 11,2
CONS (n=9)	159821,8 $\pm$ 5941,8	164,8 $\pm$ 16,8	0 $\pm$ 0	150,6 $\pm$ 6,5
CONO (n=8)	158507,9 $\pm$ 6225,8	225,8 $\pm$ 22,4	0,4 $\pm$ 0,2 ^a	182,3 $\pm$ 10,5

Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. SHAM = inteiras; OVX = ovariectomizadas. GBS = *baseline* SHAM; GBO = *baseline* OVX; NS = natação SHAM; NO = natação OVX; CONS = controle SHAM; CONO = controle OVX; n = número de animais. Ar = área de matriz; N.Ob = número de osteoblastos; N.Oc = número de osteoclastos; N.Ot = número de osteócitos. ANOVA seguida do teste de Tukey. ^a p<0,05 vs GBO.

Os resultados referentes à contagem dos elementos celulares na região do trocânter maior do fêmur dos grupos experimentais estão apresentados na tabela 5.

No trocânter maior do fêmur, os osteoblastos foram mais numerosos nos animais ovariectomizados treinados (NO) comparado aos grupos *baseline* ovariectomizados (GBO) e treinados inteiros (NS).

Os osteoclastos foram mais numerosos nos animais do grupo GBO comparados aos grupos *baseline* inteiros (GBS), treinados ovariectomizados (NO) e controle ovariectomizados (CONO).

Os animais do grupo GBO apresentaram um maior número de osteócitos que os grupos GBS e NO.

Apenas o grupo NS apresentou uma maior área de matriz comparada ao grupo NO. Os demais grupos experimentais não apresentaram diferenças para a área de matriz.

Tabela 5: Área de matriz e número de osteoblastos, osteoclastos e osteócitos na região do trocânter maior do fêmur.

Grupos	Ar (μm)	N.Ob	N.Oc	N.Ot
GBS (n=2)	164691,2 $\pm$ 11361,8	187,5 $\pm$ 12,5	0,5 $\pm$ 0,5 ^b	136,5 $\pm$ 16,5 ^b
GBO (n=3)	165584,8 $\pm$ 9814,9	198 $\pm$ 12,8 ^a	4 $\pm$ 1,5	205,7 $\pm$ 22,2
NS (n=8)	151881,88 $\pm$ 5179,8 ^a	229,4 $\pm$ 24,7 ^a	0 $\pm$ 0	186,6 $\pm$ 14,5
NO (n=8)	132344,54 $\pm$ 6898,1	300,3 $\pm$ 31,7	0,5 $\pm$ 0,2 ^b	156,3 $\pm$ 10,1 ^b
CONS (n=8)	152083,4 $\pm$ 4679,5	264,8 $\pm$ 11,9	0 $\pm$ 0	166,6 $\pm$ 10
CONO (n=8)	145561,8 $\pm$ 4403,8	245,1 $\pm$ 17,6	0,4 $\pm$ 0,2 ^b	189,3 $\pm$ 14,8

Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. SHAM = inteiras; OVX = ovariectomizadas. GBS = *baseline* SHAM; GBO = *baseline* OVX; NS = natação SHAM; NO = natação OVX; CONS = controle SHAM; CONO = controle OVX; n = número de animais. Ar = área de matriz; N.Ob = número de osteoblastos; N.Oc = número de osteoclastos; N.Ot = número de osteócitos. ANOVA seguida do teste de Tukey. ^a p<0,05 vs NO; ^b p<0,05 vs GBO.

DISCUSSÃO

Neste estudo foram investigados os efeitos de um programa de natação com sobrecarga sobre propriedades estruturais e celulares no fêmur e na tíbia de ratas ovariectomizadas.

As ratas ovariectomizadas (OVX) apresentaram maior massa corporal em relação às ratas controle (SHAM). Este resultado está de acordo com os existentes na

literatura onde ratas OVX apresentam maior ganho de massa corporal, consequência da deficiência de estrogênio em resposta a alterações no metabolismo lipídico ^(15,16,32). O treinamento de natação com sobrecarga realizado por 10 semanas, não provocou redução na massa corporal total dos animais OVX. Entretanto, isso não significa que a composição corporal não tenha sido alterada pelo treinamento. Shinoda et al. ⁽³⁵⁾ observaram que mesmo que a massa corporal total não tenha sido alterada, o treinamento físico é capaz de reduzir a gordura corporal causada pela ovariectomia. Em estudo anterior (dados não publicados) os animais ovariectomizados treinados (NO) apresentaram redução na gordura visceral quando comparado ao seu controle (CONO).

O programa de natação usado foi eficiente em melhorar o desempenho físico das ratas OVX e SHAM treinadas. A capacidade das ratas treinadas de nadar com carga abaixo do limiar de lactato por um tempo maior que as controles confirma a maior capacidade aeróbica do grupo, conforme Gobatto et al. ⁽¹²⁾.

O exame de Raio X indicou uma leve redução na DMO do fêmur causada pela ovariectomia. Contudo, essa perda foi recuperada ao longo de 12 semanas, pois o grupo controle ovariectomizado (CONO) não apresentou diferença significativa da DMO em comparação com o seu *baseline*. O aumento da massa corporal das ratas ovariectomizadas pode ser o fator que desencadeou a recuperação da DMO nesse grupo, pois tem sido relatado na literatura uma correlação negativa entre a osteopenia promovida pela ovariectomia e o aumento da massa corporal ⁽⁴²⁾.

O exercício de natação com sobrecarga aplicado aumentou a DMO no fêmur de ratas ovariectomizadas (NO) e inteiras (NS) quando comparadas aos seus controles (CONO e CONS, respectivamente). Os resultados deste estudo sugerem que as tensões geradas pelas contrações musculares durante a natação podem levar a respostas osteogênicas no fêmur desses animais, e estão de acordo com outros estudos ^(26,41).

O grupo treinado ovariectomizado (NO) possuía maiores concentrações de cálcio e magnésio na tíbia do que o grupo treinado inteiro (NS). Resultados semelhantes foram encontrados por outros autores em ratas ovariectomizadas ^(9,14). O conteúdo aumentado de cálcio e magnésio na tíbia das ratas treinadas ovariectomizadas foi confirmado pelo aumento da DMO. Este resultado pode indicar que a presença de estrogênio não seja fundamental para a retenção de cálcio.

Os demais grupos experimentais apresentaram diferenças significativas apenas no conteúdo de zinco. O zinco é, também, um elemento essencial para o metabolismo ósseo, tendo efeito estimulador sobre a formação e mineralização ósseas, além de

reduzir a reabsorção óssea e estimular a atividade da fosfatase alcalina em culturas de osteoblastos ⁽³³⁾. Sendo assim, esperava-se que esse elemento também estivesse aumentado nos animais ovariectomizados treinados, o que surpreendentemente não ocorreu.

Omi ⁽³⁰⁾ observou que a restrição de cálcio na dieta de animais ovariectomizados resultou em diminuição significativa na densidade mineral e na resistência óssea. No presente estudo não houve restrição de cálcio na dieta dos animais. O treinamento em natação com sobrecarga não interferiu nos elementos analisados do CMO na tíbia, pois não se observou diferenças significativas entre o grupo treinado (NO) e o controle (CONO).

A contagem de elementos celulares nas regiões do colo e trocânter maior do fêmur indicou aumento no número de osteoblastos no grupo treinado ovariectomizado (NO) caracterizando um potencial incremento na produção de matriz, devido ao aumento destas células. Entretanto, o treinamento de natação em ratas OVX não provocou aumento na matriz óssea e no número de osteócitos.

As contrações musculares são responsáveis por grande parte da tensão sofrida pelo osso, produzindo estímulos osteogênicos que beneficiam a remodelação, resultando em aumento da deposição óssea ⁽¹⁰⁾. Há evidências de que as forças mecânicas geradas pela atividade física têm ação direta sobre a massa óssea devido ao incremento na oferta de oxigênio, o que contribui para o aumento da atividade osteoblástica, da conexão entre os osteócitos e da diferenciação osteogênica a partir de células-tronco mesenquimais ^(13,28,29).

O maior número de osteoblastos nas regiões analisadas neste estudo não refletiu no aumento da matriz óssea, provavelmente, devido a intensidade do exercício utilizado. Uma das funções do estrogênio é aumentar a sensibilidade a cargas mecânicas no osso. Há evidências de que receptores localizados em osteoblastos sejam responsáveis por mediar várias funções deste hormônio. Assim, a ovariectomia e a menopausa podem diminuir a ação destes receptores limitando a capacidade de resposta do osso as cargas mecânicas ^(19,20,31,34).

Shiguemoto et al. ⁽³⁴⁾ detectaram relação direta entre a maior intensidade do treinamento de resistência em escada e a melhora das propriedades biomecânicas e físicas no tecido ósseo. Entretanto, no presente estudo, não houve impacto do treinamento de natação sobre o aumento da matriz óssea dos animais. Em estudo anterior ⁽⁸⁾, observou-se que o programa de natação aplicado, também, não provocou

alterações das propriedades mecânicas do fêmur de ratas ovariectomizadas, o que confirma o não aumento da matriz óssea.

O número de osteoclastos nas regiões do colo e trocânter maior do fêmur foi maior no grupo *baseline* ovariectomizado (GBO) caracterizando um aumento da reabsorção óssea devido à deficiência do estrogênio no início dos tratamentos.

Apesar de não terem sido observadas alterações expressivas, notou-se uma pequena melhora na DMO do fêmur de ratas ovariectomizadas. Tal observação permite inferir que o treinamento em natação, pode ser um aliado no tratamento dos distúrbios ósseos observados em mulheres após a menopausa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AOAC. Official methods of analysis. Washington, D.C. 1998.
2. Bancroft JD, Gamble, M. Theory and Practice of Histological Techniques, 6th Ed. Churchill Livingstone, Elsevier, Philadelphia. 2008.
3. Balsamo S, Mota LMH, Santana FS, Nascimento DC, Bezerra LMA, Balsamo DOC, et al. Treinamento de força versus hidroginástica: uma análise transversal comparativa da densidade mineral óssea em mulheres na pós-menopausa. Rev Bra Reumatol 2013; 53(2):193–198.
4. Barengolts EI, Lathon PV, Curry DJ e Kukreja SC. Effects of endurance exercise on bone histomorphometric parameters in intact and ovariectomized rats. Bone and Mineral 1994; 26(2):133-40.
5. Bergmann P, Body JJ, Boonen S, Boutsen Y, Devogelaer JP, Goemaere S, et al. Loading and skeletal development and maintenance. J Osteoporos. 2011:786752.
6. Chien MY, Wu YT, Hsu AT, Yang RS. e Lai JS. Efficacy of a 24-week aerobic exercise program for osteopenic postmenopausal women. Calcified Tissue International 2000; 67(6):443-8.

7. Czeckuk A, Huk-Wieliczuk E, Michalska A, Bylina D, Soltan J, Zofia D. The effect of menopause on bone tissue in former swimmers and in non-athletes. *Adv Clin Exp Med*. 2012: Sep-Oct;21(5):645-52.
8. Fernandes BB, Del Carlo RJ, Peluzio MCG, Drummond LR, Silva CHO, Louzada MJQ, et al. Efeitos do treinamento em natação sobre propriedades mecânicas e estruturais do fêmur de ratas ovariectomizadas. *Biosci J*. 2014: Mar-Abr; 30 (2): 594-603.
9. Figard H, Mougin F, Gaume V, Berthelot A. Combined intervention of dietary soybean proteins and swim training: effects on bone metabolism in ovariectomized rats. *J Bone Miner Metab*. 2006;24(3):206-12.
10. Fonseca H, Moreira-Goncalves D, Esteves JL, Viriato N, Vaz M, Mota MP, et al. Voluntary Exercise has Long-Term In Vivo Protective Effects on Osteocyte Viability and Bone Strength Following Ovariectomy. *Calcif Tissue Int*. Jun;88(6):443-54.
11. Francisco JI, Yu Y, Oliver RA, Walsh WR. Relationship between age, skeletal site, and time post-ovariectomy on bone mineral and trabecular microarchitecture in rats. *J Orthop Res*. 2011 Feb;29(2):189-96.
12. Gobatto CA, Mello MA, Sibuya CY, Azevedo JR, Santos JA, Kokubun E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comparative Biochemistry and Physiology. A Molecular & Integrative Physiology* 2001; 130:21-7.
13. Goulet GC, Halonen NR, Koch LG, Britton SL, Zernicke RF, Kozloff KM. Osteoblast response to ovariectomy is enhanced in intrinsically high aerobic-capacity rats. *Calcif Tissue Int*. 2011 Apr;88(4):325-35.
14. Hart KJ, Shaw JM, Vajda E, Hegsted M, Miller SC. Swim-trained rats have greater bone mass, density, strength, and dynamics. *J Appl Physiol*. 2001 Oct;91(4):1663-8.
15. Heine PA, Taylor JA, Iwamoto GA, Lubahn DB, Cooke PS. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Nov 7;97(23):12729-34.

16. Honda A, Sogo N, Nagasawa S, Shimizu T e Umemura Y. High-impact exercise strengthens bone in osteopenic ovariectomized rats with the same outcome as sham rats. *Journal of Applied Physiology* 2003; 95(3):1032-7.
17. Huang TH, Lin SC, Chang FL, Hsieh SS, Liu SH e Yang RS. Effects of different exercise modes on mineralization, structure, and biomechanical properties of growing bone. *Journal of Applied Physiology* 2003; 95(1):300-7.
18. Huang TH, Muhlbauer RC, Tang CH, Chen HI, Chang GL, Huang YW, et al. Onion decreases the ovariectomy-induced osteopenia in young adult rats. *Bone*. 2008 Jun;42(6):1154-63.
19. Jessop HL, Suswillo RF, Rawlinson SC, Zaman G, Lee K, Das-Gupta V, et al. Osteoblast-like cells from estrogen receptor alpha knockout mice have deficient responses to mechanical strain. *J Bone Miner Res*. 2004 Jun;19(6):938-46.
20. Lee KC, Lanyon LE. Mechanical loading influences bone mass through estrogen receptor alpha. *Exerc Sport Sci Rev*. 2004 Apr;32(2):64-8.
21. Leite RD, Prestes J, Pereira GB, Shiguemoto GE, Perez SE. Menopause: highlighting the effects of resistance training. *Int J Sports Med*. 2010; 31(11):761-7.
22. Louzada MJQ. Densitometria Radiográfica. 2009. 65f. Tese Livre Docência. Faculdade de Odontologia, Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista.
23. Louzada MJQ et al. Metodologia para avaliação de densidade em imagens radiográficas. *Revista Brasileira de Engenharia - Caderno de Engenharia Biomédica*. 1998; 14(2): 37-47.
24. Louzada MJQ et al. Avaliações de densidade óssea em imagens radiográficas: estudo em peças ósseas de cães. *Revista Brasileira de Engenharia - Caderno de Engenharia Biomédica*. 1998; 14(1): 47-64.

25. McVeigh J, Kingsley S, Gray D, Loram LC. Swimming enhances bone mass acquisition in growing female rats. *J Sports Sci Med*. 2010; 9(4):612-9.
26. Melton SA, Hegsted M, Keenan MJ, Morris GS, O'Neil CE, Zablah-Pimentel EM. Water exercise prevents femur density loss associated with ovariectomy in the retired breeder rat. *J Strength Cond Res*. 2004 Aug;18(3):508-12.
27. Notomi T, Okazaki Y, Okimoto N, Saitoh S, Nakamura T, Suzuki M. A comparison of resistance and aerobic training for mass, strength and turnover of bone in growing rats. *Eur J Appl Physiol*. 2000 Dec;83(6):469-74.
28. Ocarino NM, Marubayashi U, Cardoso TGS, Guimarães CV, Silva AE, Torres, RCS et al. Physical activity in osteopenia treatment improved the mass of bones directly or indirectly submitted to mechanical impact. *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions* 2007; 7(1)84-93.
29. Ocarino NM, Boeloni JN, Goes AM, Silva JF, Marubayashi U, Serakides R. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from osteopenic rats subjected to physical activity with and without nitric oxide synthase inhibition. *Nitric Oxide*. 2008 Dec;19(4):320-5.
30. Omi N, Ezawa I. [Animal models for bone and joint disease. Low calcium diet-induced rat model of osteoporosis]. *Clin Calcium*. 2011 Feb;21(2):173-80.
31. Riggs BL, Khosla S, Melton LJ, 3rd. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev*. 2002 Jun;23(3):279-302.
32. Saengsirisuwan V, Pongseeda S, Prasannarong M, Vichaiwong K, Toskulkao C. Modulation of insulin resistance in ovariectomized rats by endurance exercise training and estrogen replacement. *Metabolism*. 2009 Jan;58(1):38-47.
33. Seo HJ, Cho YE, Kim T, Shin HI, Kwun IS. Zinc may increase bone formation through stimulating cell proliferation, alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in osteoblastic MC3T3 E1 cells. *Nutr Res Pract*. 2010 4(5):356-361.

34. Shiguemoto GE, Prestes J, Leite RD, Pereira GB, Pontes CL, D'Avila FV, 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*. 2011 Oct;22(5):607-17.
35. Shinoda M, Latour MG, Lavoie JM. Effects of physical training on body composition and organ weights in ovariectomized and hyperestrogenic rats. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2002 Mar;26(3):335-43.
36. Suominen H. Muscle training for bone strength. *Aging Clin Exp Res*. 2006 Apr;18(2):85-93.
37. Thorndike EA, Turner AS. In search of an animal model for postmenopausal diseases. *Front Biosci*. 1998 Apr 16;3:c17-26.
38. Van de Lest CH, Brama PA, van Weeren PR. The influence of exercise on bone morphogenic enzyme activity of immature equine subchondral bone. *Biorheology*. 2003; 40(1-3):377-82.
39. Voltarelli FA, Gobatto CA, Mello MA. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2002; 35(11):1389-94.
40. Von Stengel S, Kemmler M, Engelke K e Kalender WA. Effects of whole body vibration on bone mineral density and falls: results of the randomized controlled ELVIS study with postmenopausal women. *Osteoporosis International* 2011; 22(1):317-25.
41. Warner SE, Shea JE, Miller SC, Shaw JM. Adaptations in cortical and trabecular bone in response to mechanical loading with and without weight bearing. *Calcif Tissue Int*. 2006 Dec;79(6):395-403.
42. Zhao LJ, Jiang H, Papasian CJ, Maulik D, Drees B, Hamilton J, et al. Correlation of obesity and osteoporosis: effect of fat mass on the determination of osteoporosis. *J Bone Miner Res*. 2008 Jan;23(1):17-29.

TREINAMENTO EM CORRIDA DE BAIXA INTENSIDADE: PROPRIEDADES ESTRUTURAIS E CELULARES NO FÊMUR E TÍBIA DE RATAS OVARIETOMIZADAS.

RESUMO

A osteoporose altera o equilíbrio entre formação e reabsorção da matriz óssea, resultando em redução da força do osso e ocorre, principalmente, em mulheres na pós-menopausa. O objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos do exercício de corrida sobre as propriedades estruturais e celulares do fêmur e tíbia de ratas ovariectomizadas. Os animais foram separados em seis grupos, sendo: GBO (*baseline* OVX), GBS (*baseline* SHAM), CO (corrida OVX), CS (corrida SHAM), CONO (controle OVX) e CONS (controle SHAM); três ovariectomizados (OVX) e três submetidos a laparotomia (SHAM). Os grupos GBO e GBS foram submetidos a eutanásia duas semanas após as cirurgias; os grupos CO e CS ao treinamento de corrida em esteira por 10 semanas; e os grupos CONO e CONS permaneceram em gaiolas individuais sem exercício pelo mesmo período. Os últimos quatro grupos sofreram eutanásia doze semanas após a cirurgia. Avaliaram-se a densidade mineral óssea radiográfica (DMOR), o conteúdo mineral ósseo (CMO) e os elementos celulares. A DMOR foi maior ($p < 0,05$) no grupo CO comparada à dos grupos GBO e CONO. O CMO de zinco na tíbia foi maior ($p < 0,05$) no grupo CS comparada às dos grupos GBS e CO, e no grupo CONS comparada à dos grupos GBS e CONO. No colo do fêmur, registrou-se maior ($p < 0,05$) número de osteoblastos no grupo CO que nos grupos GBO e CONO. Houve maior ($p < 0,05$) número de osteoclastos nos animais OVX que nos SHAM. O número de osteócitos e área de matriz foram superiores ($p < 0,05$) nos animais do grupo CS que nos demais grupos. No trocânter maior do fêmur o número de osteoblastos foi maior ($p < 0,05$) no grupo CO comparado ao CS; já os osteoclastos foram mais numerosos ($p < 0,05$) no grupo GBO comparados aos dos grupos GBS, CO e CONO. A área de matriz foi menor ($p < 0,05$) no grupo CO que nos grupos GBO e CONO. Nossos resultados indicam que o treinamento de corrida de baixa intensidade não causou alterações expressivas nas propriedades estruturais e celulares no fêmur e na tíbia de ratas ovariectomizadas.

Palavras Chave: ovariectomia, menopausa, exercício, ratas, osso.

INTRODUÇÃO

Osteoporose é uma doença esquelética sistêmica com desequilíbrio na formação e reabsorção óssea, resultando em diminuição do conteúdo de matriz e da força do osso; sendo comum em mulheres na pós-menopausa ^(11,38,41).

Ratas ovariectomizadas é o modelo animal mais utilizado na tentativa de entendimento da fisiopatologia da osteoporose em mulheres na pós-menopausa, uma vez que a perda óssea induzida pela ovariectomia em ratas compartilha muitas das características clínicas observadas neste grupo de mulheres ^(9,37).

Tem sido demonstrado que diversos programas de exercícios provocam melhora na massa, densidade e força óssea prevenindo a osteoporose em modelo animal ^(17,21,31,39). No entanto, existem estudos em animais exercitados que não encontraram alterações nos parâmetros ósseos. Por exemplo, Notomi et al. ⁽²⁸⁾ verificaram que o exercício não beneficiou a densidade mineral óssea (DMO), o conteúdo mineral ósseo (CMO) e o tamanho do osso em ratos treinados durante a fase de crescimento. Além disso, oito ou dez semanas de treinamento em esteira rolante não influenciaram a DMO e CMO do fêmur de ratos Wistar jovens ^(15,16).

As forças de tensão, compressão e cisalhamento geradas pelo suporte da massa corporal e pelas contrações musculares durante a atividade física constituem estímulos importantes para a formação óssea ⁽⁴⁾ e desempenham papel importante para minimizar a perda óssea em mulheres pós-menopáusicas ^(7,41) e em ratas ovariectomizadas ^(3,14,29).

O exercício aeróbico interfere na osteogênese ⁽¹³⁾. As cargas mecânicas exercidas pelo exercício orientam a atividade dos osteoblastos, osteoclastos e osteócitos, células que estão mais ativamente ligadas ao processo de remodelação óssea ^(5,8).

No presente estudo, trabalhou-se com a hipótese de que o exercício de corrida de baixa intensidade em esteira minimizaria os efeitos deletérios da deficiência de estrogênio em ratas adultas. Assim, investigou-se os efeitos do exercício de corrida sobre as propriedades estruturais e celulares do fêmur e tíbia de ratas ovariectomizadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostra

Foram utilizadas 58 ratas Wistar adultas (*Rattus norvegicus*), com idade inicial de 20 semanas, peso médio $271,42 \pm 17,6$ g, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, sendo aprovados pelo Comitê de Ética da UFV sob parecer nº 02/2009.

Trinta animais foram submetidos à ovariectomia (OVX) e vinte e oito somente à laparotomia com simulação da retirada dos ovários (SHAM). Antes das cirurgias, cada animal foi anestesiado com cetamina (20mg/kg) e xilazina (2,71mg/kg) via intramuscular; e receberam anti-inflamatório (flunixin meglumina: 0,68mg/kg) e antibiótico (enrofloxocina: 2,71mg/kg), ambos por via subcutânea. Nas primeiras 5 horas após a cirurgia os animais permaneceram em câmara aquecida.

Posteriormente, os animais foram distribuídos em seis grupos experimentais e alojados em gaiolas individuais (20x20x30cm de altura, largura e profundidade, respectivamente), mantidos em ambiente com temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de cerca de 60% e fotoperíodo de 12 horas. Cada animal recebeu, diariamente, 20g de ração comercial (Socil[®]) triturada e água *ad libitum*.

Um grupo de 10 animais (*baseline*) constituído de ratas ovariectomizadas (n=6) e inteiras (n=4) foi submetido à eutanásia 15 dias após a cirurgia, objetivando determinar a influência da cirurgia sobre a homeostase óssea. Os animais restantes permaneceram por 12 semanas em gaiolas individuais.

Em síntese, foram formados 6 grupos experimentais:

GBS *baseline* (n = 4): ratas SHAM submetidas à eutanásia 15 dias após cirurgia;

GBO *baseline* (n = 6): ratas OVX submetidas à eutanásia 15 dias após cirurgia;

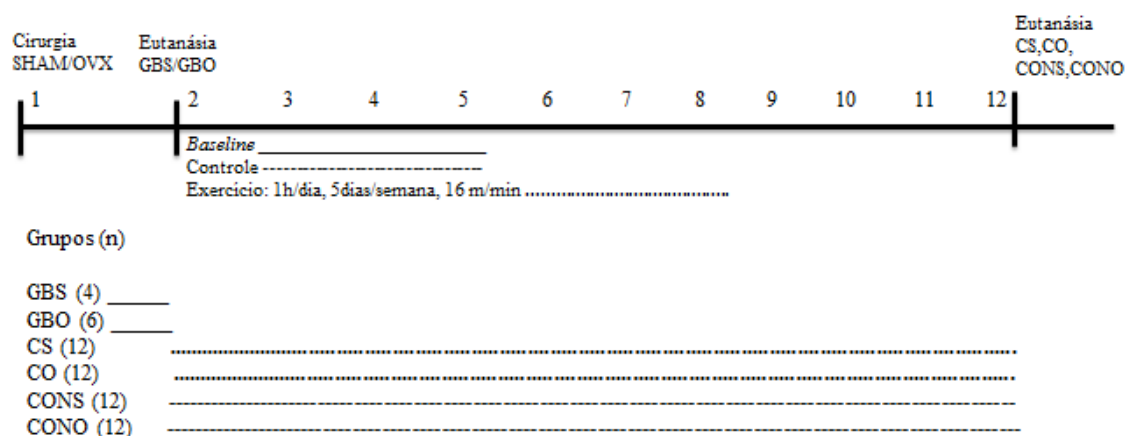
CS (n = 12): ratas SHAM que realizaram o treinamento de corrida em esteira por 10 semanas;

CO (n = 12): ratas OVX que realizaram o treinamento de corrida em esteira por 10 semanas;

CONS (n = 12): ratas SHAM que permaneceram em gaiola por 12 semanas.

CONO (n = 12): ratas OVX que permaneceram em gaiola por 12 semanas;

O delineamento experimental está representado abaixo:



Os animais foram pesados em balança de precisão uma vez por semana durante as 12 semanas do período experimental para registro da massa corporal.

Protocolo de Exercício

Quinze dias após as cirurgias, os animais dos grupos CO e CS foram submetidos a um programa progressivo de corrida em esteira rolante elétrica (Esteira Insight Instrumentos – Ribeirão Preto, SP, Brasil) 5 dias por semana, 60 minutos por dia, a uma velocidade média de 16m/min (adaptado de Iwamoto et al. ⁽²⁰⁾), por 10 semanas (Tabela 1).

Tabela 1. Protocolo de corrida em esteira.

Semana	Velocidade (m/min)	Inclinação (graus)	Duração (min)
1 ^a	10m/min	0	30
2 ^a	15m/min	0	50
3 ^a	16m/min	0	60
4 ^a	16m/min	0	60
5 ^a	16m/min	0	60
6 ^a	16m/min	0	60
7 ^a	16m/min	0	60
8 ^a	16m/min	0	60
9 ^a	16m/min	10	60
10 ^a	16m/min	10	60

Avaliação do desempenho físico dos animais

Para avaliar a eficiência do treinamento aplicado na melhora do desempenho físico das ratas, todas foram submetidas a um teste de resistência à corrida 48 horas após a última sessão de treino. Os animais foram colocados na esteira e correram à velocidade de 10m/min, com inclinação de 15° ^(12,40) o maior tempo possível até a exaustão, que foi identificada quando o animal não mais conseguia correr e ficava apoiado na esteira por mais de 10 segundos. O tempo de corrida até a exaustão foi adotado como desempenho físico para a corrida.

Determinação da Densidade Mineral Óssea Radiográfica (DMOR)

A avaliação da Densidade Radiográfica foi realizada no fêmur direito em aparelho de Raios-X (Raios-X CRX500 ms 150KV) na dosagem de 40KV 50ms a 0,06 segundos e, com processadora automática.

Como referencial densitométrico nas tomadas radiográficas foi utilizada escada de alumínio (liga 6063, ABNT), colocada próxima aos fêmures, na direção do feixe principal dos Raios X ^(26,27). O programa computacional “Image J®” - versão 1.43u (domínio público – <http://rbs.info.nih.gov/ij>) foi utilizado para contornar toda a região de interesse, utilizando recurso de definição de área do programa, e, assim, determinar o nível de densidade média, em tons de cinza (até 256 níveis), dos fêmures e dos degraus da escada de alumínio. Os valores dos fêmures foram convertidos para valores relativos à espessura em milímetros de alumínio obedecendo às etapas descritas por metodologia de Louzada ⁽²⁵⁾. Desta maneira, a densidade óssea foi expressa em equivalente de alumínio (mmAl). A análise foi realizada na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), em Araçatuba, São Paulo.

Determinação do conteúdo mineral ósseo (CMO)

A tíbia direita foi dissecada, pesada e armazenada em refrigerador a 4°C. O osso foi digerido em ácido nítrico concentrado por 16 horas e, a seguir, diluído em água deionizada para determinação da concentração de cálcio, magnésio e zinco em espectrômetro de absorção atômica (GBC 908 AA, Perkin Elmer – USA). As amostras

foram preparadas segundo metodologia preconizada pela Association of Official Analytical Chemists ⁽¹⁾.

Toda vidraria utilizada na análise foi desmineralizada. Todas as análises foram realizadas em duplicata. Todos os procedimentos desta análise foram realizados no Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais.

Histomorfometria

O fêmur esquerdo foi dissecado e o osso, livre dos tecidos moles, foi fixado em solução de formalina neutra (formaldeído 10% em tampão fosfato de sódio 0,1M), por uma semana, a temperatura ambiente. Posteriormente, os fêmures foram colocados em cuba descalcificadora, contendo solução aquosa de citrato de sódio a 20% (65 mL), e ácido fórmico a 90% (35 mL) permanecendo nesta solução por 8 dias ⁽²⁾. Após a descalcificação inicial, foram feitos cortes transversais no fêmur, removendo-se o trocânter maior e o colo do fêmur, que retornaram à cuba descalcificadora com solução nova, por mais 7 dias. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em álcool 70%, 80%, 90% e 100%, diafanizadas em xilol, e incluídas em parafina. Secções histológicas de 5 micrômetros (µm) de espessura foram obtidas em micrótomo rotativo (Spencer, modelo 19459 - USA), coradas com hematoxilina e eosina (HE) e montadas com bálsamo do Canadá sintético.

As secções histológicas (figura 1A) foram analisadas com auxílio do aplicativo Image-Pro Plus versão 4.5.0.29 (Media Cybernetics; USA). As imagens foram digitalizadas utilizando fotomicroscópio (Olympus BX60 com câmera acoplada Q color 3 Olympus, Japan) com objetiva de 40x para análise do osso trabecular. No osso trabecular foram realizadas dez imagens por animal de cada grupo, em campos distintos (figura 1B). Estimou-se o número de osteoblastos, osteoclastos e osteócitos por área na região do colo e do trocânter maior do fêmur. O preparo e a montagem das lâminas histológicas foram realizados no Laboratório de Histopatologia, do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais. As imagens obtidas em fotomicroscópio (BX-60, Olympus, Japan) no Laboratório de Citogenética de Insetos do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais.

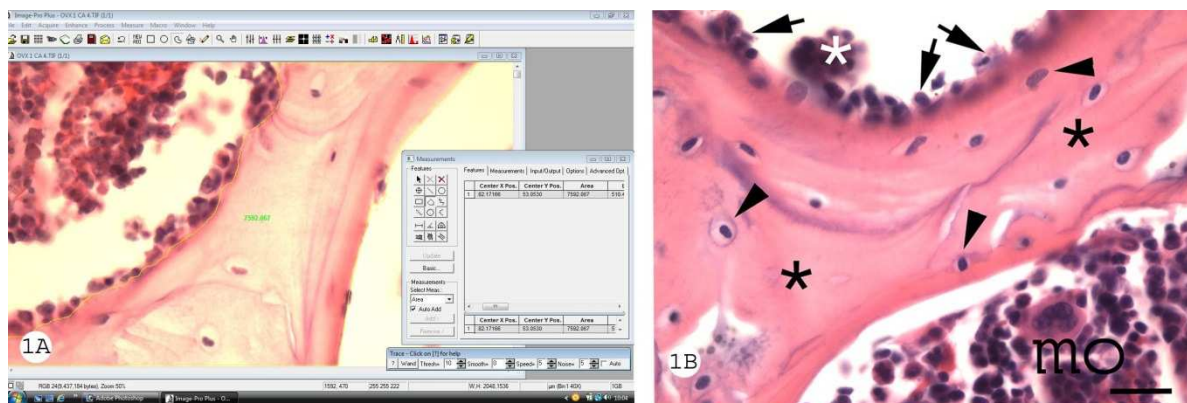


Figura 1: Imagem representativa da medida de área de matriz (linha amarela) utilizando o programa Image Pro Plus. 1B: Imagem representativa dos elementos celulares analisados na secção histológica do colo do fêmur. Setas - osteoblastos; cabeças de setas - osteócitos; asteriscos brancos - osteoclastos; asteriscos pretos – matriz; mo – medula óssea. Coloração - hematoxilina e eosina. Barra: 20 μ .

Análise Estatística

As variáveis respostas (Y = área, osteoblastos, osteoclastos e osteócitos) foram submetidas à análise de variância (ANOVA) seguindo-se os seguintes modelos de efeitos fixos: $Y_{ij} = u + G_i + E_{ij}$. Em que u é a média geral, G_i é o efeito do i -ésimo grupo ($i=1,2, \dots, 8$) e E_{ij} é o erro aleatório não observável do modelo, com as pressuposições usuais de normalidade com média igual a zero e homogeneidade de variâncias entre os grupos. Havendo efeito significativo pelo teste F da ANOVA (a 1% ou a 5%) de significância, os valores médios foram comparados pelo teste de Tukey, apropriadamente de acordo com as interações significativas ou não. Uma pressuposição fundamental da ANOVA, a homogeneidade de variâncias, foi verificada pelo teste de Levene. Nenhuma das variáveis resposta apresentou heterogeneidade. . Para as comparações entre os tratamentos com o grupo *baseline* adotou-se o teste de Dunnett.

Todas as análises foram implementadas no software SAS (Statistical Analysis System, SAS Institute Inc., Cary, NC -www.sas.com/offices/latinamerica/brazil/) versão 9.2, licenciada para a UFV, 2012.

RESULTADOS

Massa Corporal

Os resultados referentes à massa corporal (MC) dos animais antes da cirurgia, 15 dias após e 12 semanas após a cirurgia, estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Representação da massa corporal dos animais, por grupo, durante o período experimental.

Grupo	MC inicial (g)	Idade (semanas)	MC final (g)	Idade (semanas)
GBS (n=4)	272,3 ± 11,2	20	294,5 ± 12,2	22
GBO (n=6)	272,3 ± 12,1	20	308,0 ± 12,8 ^a	22
CS (n=12)	271,8 ± 4,9	20	300,6 ± 5,4	32
CO (n=12)	269,7 ± 5,6	20	324,6 ± 4,6	32
CONS (n=12)	271,1 ± 15,2	20	297,75 ± 8,1 ^a	32
CONO (n=12)	272 ± 5,1	20	347,3 ± 7,4	32

Dados expressos em média ± erro padrão. SHAM = ratas inteiras; OVX = ratas ovariectomizadas; GBS = *baseline* SHAM; GBO = *baseline* OVX; CS = corrida SHAM; CO = corrida OVX; CONS = controle SHAM; CONO = controle OVX; n = número de animais. ANOVA seguida do teste de Tukey. ^ap < 0,05 vs CONO.

Não houve diferença significativa na massa corporal dos animais dos diferentes grupos no início dos tratamentos. Ao final do experimento os animais OVX apresentaram maior (p < 0,05) massa corporal em relação aos SHAM (335,93 ± 23,70 g vs 299,28 ± 23,40 g, respectivamente), independentemente do fator exercício. Não foi observado efeito do exercício (CORRIDA = 312,61 ± 20,91 g vs CONTROLE = 322,52 ± 36,50 g) e não houve interação entre os fatores cirurgia e exercício para a massa corporal final (p > 0,05).

Desempenho dos animais

As ratas OVX treinadas em corrida apresentaram maior (p < 0,05) tempo de corrida até a exaustão (desempenho físico) em relação às respectivas controles (CO = 18 ± 7,3 min vs. CONO = 5 ± 1,4 min). Nas ratas SHAM, o tempo de corrida até a exaustão não foi estatisticamente diferente (CS = 18,8 ± 6,3 min vs. CONS = 13,8 ± 6,6 min; p > 0,05).

Densidade Mineral Óssea Radiográfica (DMOR)

A densidade mineral óssea no grupo de ratas ovariectomizadas treinado (CO) foi comparável ao grupo SHAM treinado (CS) e ao grupo *baseline* SHAM (GBS); e maior que os demais grupos (figura 2).

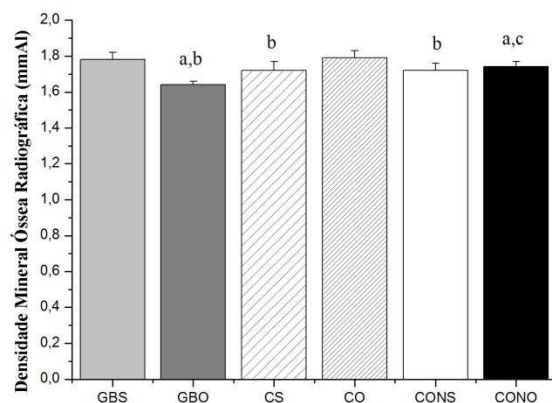


Figura 2: Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. SHAM = ratas inteiras; OVX = ratas ovariectomizadas; GBS (n = 4) = *baseline* SHAM; GBO (n = 6) = *baseline* OVX; CS (n = 12) = corrida SHAM; CO (n = 12) = corrida OVX; CONS (n = 12) = controle SHAM; CONO (n = 12) = controle OVX; ANOVA seguida do teste de Tukey. ^a p<0,05 vs CO; ^b p<0,05 vs GBS; ^c p<0,05 vs CONS.

Conteúdo Mineral Ósseo (CMO)

Observou-se diferença significativa apenas no conteúdo de zinco. Os demais minerais analisados não apresentaram diferenças significativas quando comparados os diversos grupos (Tabela 3).

Tabela 3: Conteúdo de cálcio, magnésio e zinco na tíbia direita das ratas dos diferentes grupos experimentais.

Grupos	Ca ⁺² (mg/L)	Mg (mg/L)	Zn (mg/L)
GBS (n=2)	182,9 ±7,2	3,3 ±0,3	0,25 ±0,1 ^a
GBO (n=5)	204,46 ±5,3	3,6 ±0,1	0,26 ±0 ^b
CS (n=11)	185,9 ±8,5	3,2 ±0,2	0,40 ±0,2 ^{b,c}
CO (n=10)	185,7 ±7,2	3,3 ±0,2	0,24 ±0,2
CONS (n=10)	179,82 ±3,9	3,07 ±0,1	0,40 ±0
CONO (n=11)	201,06 ±10,1	3,26 ±0,2	0,25 ±0 ^a

Dados expressos em média ± erro padrão. SHAM = ratas inteiras; OVX = ratas ovariectomizadas; GBS = *baseline* SHAM; GBO = *baseline* OVX; CS = corrida SHAM; CO = corrida OVX; CONS = controle SHAM; CONO = controle OVX; n = número de animais. ANOVA seguida do teste de Tukey. ^a p<0,05 vs CONS; ^b p<0,05 vs CO; ^c p<0,05 vs GBS.

Histomorfometria nas regiões do colo e trocânter maior do fêmur

No colo do fêmur, os osteoblastos foram mais numerosos nos animais ovariectomizados treinados (CO) do que no *baseline* ovariectomizado (GBO) e no seu controle (CONO). Contudo não houve diferença entre CO e os grupos *baseline* SHAM (GBS) e controle SHAM (CONS).

O exercício de corrida causou incremento do número de osteoclastos dos animais ovariectomizados se comparado aos animais SHAM.

Os osteócitos foram mais numerosos naqueles animais com os ovários preservados e submetidos ao treinamento de corrida; mesmo resultado observado para área de matriz.

Os resultados referentes à contagem dos elementos celulares e matriz na região do colo do fêmur dos grupos experimentais estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4: Área de matriz e número de osteoblastos, osteoclastos e osteócitos na região do colo do fêmur de ratas dos diversos grupos experimentais.

Grupos	Ar (μm^2)	N.Ob	N.Oc	N.Ot
GBS (n=4)	160749,8 $\pm$ 10123,8	193,8 $\pm$ 24,8	0,75 $\pm$ 0,4	136,5 $\pm$ 13,5
GBO (n=5)	178722,3 $\pm$ 6822,6 ^a	150 $\pm$ 19,5 ^a	2,8 $\pm$ 1,2 ^b	172 $\pm$ 13,3
CS (n=8)	172188,1 $\pm$ 1796,9 ^a	248,1 $\pm$ 19,6 ^a	0 $\pm$ 0 ^a	214,3 $\pm$ 18,4 ^{a,c,d}
CO (n=8)	123207,2 $\pm$ 3148,7	362,5 $\pm$ 23,8	1,9 $\pm$ 0,6	160 $\pm$ 12,1
CONS (n=9)	159821,8 $\pm$ 5941,8	164,8 $\pm$ 16,8	0 $\pm$ 0	150,6 $\pm$ 6,5
CONO (n=8)	158507,9 $\pm$ 6225,8	225,8 $\pm$ 22,4 ^a	0,4 $\pm$ 0,2	182,3 $\pm$ 10,5

Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. SHAM = ratas inteiras; OVX = ratas ovariectomizadas; GBS = *baseline* SHAM; GBO = *baseline* OVX; CS = corrida SHAM; CO = corrida OVX; CONS = controle SHAM; CONO = controle OVX; n = número de animais. Ar = área de matriz; N.Ob = número de osteoblastos; N.Oc = número de osteoclastos; N.Ot = número de osteócitos. ANOVA seguida do teste de Tukey. ^a p<0,05 vs CO; ^b p<0,05 vs CONO; ^c p<0,05 vs GBS; ^d p<0,05 vs CONS.

No trocânter maior do fêmur, os osteoblastos foram mais numerosos nos animais ovariectomizados treinados (CO) comparados aos SHAM (CS).

Houve um maior número de osteoclastos no grupo *baseline* ovariectomizado (GBO) do que nos grupos *baseline* SHAM (GBS), ovariectomizados treinados (CO) e controle (CONO). Este aumento também foi observado nos animais do grupo CO comparado aos do grupo CS.

Não foram observadas diferenças significativas para o número de osteócitos na região do trocânter maior do fêmur.

A área de matriz foi menor nas ratas ovariectomizadas submetidas ao treinamento de corrida (CO) comparado ao seu *baseline* (GBO) e controle (CONO). O

mesmo foi observado para os animais treinados SHAM (CS) comparados ao seu *baseline* (GBS).

Os resultados referentes à contagem dos elementos celulares e matriz na região do trocânter maior do fêmur dos grupos experimentais estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5: Área de matriz e número de osteoblastos, osteoclastos e osteócitos na região do trocânter maior do fêmur.

Grupos	Ar (μm^2)	N.Ob	N.Oc	N.Ot
GBS (n=2)	164691,2 $\pm$ 11361,8 ^c	187,5 $\pm$ 12,5	0,5 $\pm$ 0,5 ^a	136,5 $\pm$ 16,5
GBO (n=3)	165584,8 $\pm$ 9814,9	198 $\pm$ 12,8	4 $\pm$ 1,5	205,7 $\pm$ 22,2
CS (n=8)	138218,7 $\pm$ 6027,8	211,4 $\pm$ 21,1	0,25 $\pm$ 0,2	179,6 $\pm$ 8,9
CO (n=8)	115901,6 $\pm$ 7298,8 ^{a,b,c}	280,5 $\pm$ 27,3 ^c	1,1 $\pm$ 0,5 ^{a,c}	164,3 $\pm$ 16,2
CONS (n=8)	152083,4 $\pm$ 4679,5	264,8 $\pm$ 11,9	0 $\pm$ 0	166,6 $\pm$ 10
CONO (n=8)	145561,8 $\pm$ 4403,8	245,1 $\pm$ 17,6	0,4 $\pm$ 0,2 ^a	189,3 $\pm$ 14,8

Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. SHAM = ratas inteiras; OVX = ratas ovariectomizadas; GBS = *baseline* SHAM; GBO = *baseline* OVX; CS = corrida SHAM; CO = corrida OVX; CONS = controle SHAM; CONO = controle OVX; n = número de animais. Ar = área de matriz; N.Ob = número de osteoblastos; N.Oc = número de osteoclastos; N.Ot = número de osteócitos. ANOVA seguida do teste de Tukey. ^a p<00,5 vs GBO; ^b p<0,05 vs CONO; ^c p<0,05 vs CS.

DISCUSSÃO

Neste estudo foram investigados os efeitos de um programa de corrida de baixa intensidade sobre propriedades estruturais e celulares no fêmur e na tíbia de ratas ovariectomizadas.

As ratas ovariectomizadas (OVX) apresentaram maior massa corporal em relação às ratas controle (SHAM), comprovando as consequências da deficiência de estrogênio sobre o ganho de massa corporal em resposta a alterações no metabolismo lipídico, conforme descrições anteriores ^(33,36). O treinamento de corrida em esteira de baixa intensidade realizado por 10 semanas, não provocou redução na massa corporal total dos animais OVX. Entretanto, isso não significa que a composição corporal não tenha sido alterada pelo treinamento. Shinoda et al. ⁽³⁶⁾ observaram que mesmo que a massa corporal total não tenha sido alterada, o treinamento físico é capaz de reduzir a gordura corporal causada pela ovariectomia.

Ressalta-se também que o programa de corrida usado foi eficiente em melhorar o desempenho físico das ratas OVX treinadas. A capacidade das ratas OVX treinadas de correr com carga abaixo do limiar de lactato por um tempo maior que as controles confirma a maior capacidade aeróbica do grupo. O mesmo desempenho não foi observado nos animais treinados SHAM, talvez a intensidade do treinamento para ratas inteiras tenha que ser maior da utilizada neste estudo. Shiguemoto et al. ⁽³⁵⁾ observaram que o treinamento de resistência com intensidade mais elevada promoveu uma remodelação óssea tanto em ratas ovariectomizadas quanto nas inteiras, fato não observado no presente estudo.

Os resultados do presente estudo indicam que a ovariectomia provocou leve diminuição na DMO do fêmur pelo exame de Raio X. Contudo, essa perda foi recuperada ao longo de 12 semanas, pois o grupo controle ovariectomizado (CONO) não apresentou diferença significativa da DMO em comparação com o seu *baseline*. O aumento da massa corporal das ratas ovariectomizadas pode ser o fator que desencadeou a recuperação da DMO nesse grupo, pois tem sido relatada na literatura, correlação negativa entre a osteopenia promovida pela ovariectomia e o aumento da massa corporal ⁽⁴³⁾.

O exercício de corrida de baixa intensidade aplicado aumentou a DMO no fêmur de ratas ovariectomizadas quando comparadas ao seu controle, mas não interferiu no conteúdo mineral ósseo (CMO) na tíbia destes animais. Estes resultados estão de acordo com outros e sugerem que a influência positiva do treinamento de corrida de baixa a moderada intensidade na DMO ocorre em locais específicos, aqueles onde predominam a sustentação do peso ^(6,19,20).

O conteúdo de zinco na tíbia foi menor nos animais ovariectomizados treinados (CO) e controle ovariectomizados (CONO). O zinco é um elemento essencial para o

metabolismo ósseo, tendo efeito estimulador sobre a formação e mineralização ósseas, além de diminuir a reabsorção óssea e estimular a atividade da fosfatase alcalina em culturas de osteoblastos ^(34,42). Contudo, não foi possível observar, no presente estudo, reflexos da menor concentração de zinco na tíbia dos animais ovariectomizados após 10 semanas sobre os outros parâmetros analisados e nem relação aos parâmetros citados na literatura. Omi ⁽³⁰⁾ observou que a restrição de cálcio na dieta de animais ovariectomizados resultou em diminuição significativa na densidade mineral e na resistência óssea. Os resultados do presente estudo demonstram que, apesar da ovariectomia ter influenciado no conteúdo de zinco, essa diminuição não determinou alterações significativas no conteúdo de cálcio na tíbia desses animais. E o treinamento de corrida de baixa intensidade não foi capaz de provocar alterações nos minerais analisados em ratas ovariectomizadas.

A contagem de elementos celulares nas regiões do colo e trocânter maior do fêmur indicaram aumento no número de osteoblastos e osteoclastos no grupo CO, caracterizando um possível processo de remodelação óssea, com potencial para um incremento na produção de matriz, devido ao aumento no número de osteoblastos. Entretanto, o treinamento de corrida em ratas OVX não provocou aumento na matriz óssea. O papel do exercício na promoção da saúde óssea é tipicamente atribuído ao aumento da carga mecânica, que induz adaptação funcional. No entanto, o exercício aeróbico crônico, em particular, pode influenciar a capacidade aeróbica em nível celular ⁽¹³⁾. Estudos demonstram que os receptores de estrogênio localizados em osteoblastos são responsáveis por mediar várias funções desse hormônio, como: regulação da proliferação e diferenciação em osteoblastos, síntese de proteínas da matriz óssea, sobrevivência dos osteócitos e apoptose de osteoclastos ^(22,24). Acredita-se que a deficiência estrogênica provoque a redução tanto quantitativa, quanto qualitativa destes receptores limitando a capacidade de resposta do osso as cargas mecânicas ^(22,24,32,35). Tais alterações se tornam mais expressivas quando se considera cargas mecânicas de muito baixa intensidade ⁽²³⁾.

O maior número de osteoblastos nas regiões analisadas neste estudo não refletiu no aumento da matriz óssea, provavelmente, devido a baixa intensidade do exercício utilizado e uma possível redução no número ou função dos receptores de estrogênio causada pela deficiência do hormônio.

Fonseca et al. ⁽⁸⁾ observaram que o exercício realizado em roda voluntária por animais ovariectomizados pode ser eficaz para a prevenção ou retardo da apoptose de

osteócitos, beneficiando a força óssea. No entanto, no presente estudo, esse aumento não foi observado no número de osteócitos e na área de matriz sugerindo que o treinamento de corrida forçada de baixa intensidade não foi capaz de provocar formação de matriz óssea. Em estudo anterior (“in press”⁽¹⁰⁾) foram avaliadas as propriedades mecânicas no fêmur de ratas ovariectomizadas e observou-se que o programa de corrida aplicado não provocou alterações no osso quando comparados ao seu controle, o que poderia ser um reflexo do não aumento de matriz óssea. A ausência de efeito do exercício pode ter ocorrido em função de que a resposta do osso trabecular ao exercício difere de acordo com a carga mecânica sofrida pelo osso ^(6,18).

Assim, os resultados do presente estudo demonstram que o treinamento de corrida de baixa intensidade em esteira não provocou alterações expressivas capazes de alterar as propriedades estruturais e celulares do fêmur e da tíbia de ratas ovariectomizadas, analisadas no presente estudo.

Novas análises buscando relações entre o exercício de corrida e a idade, o tempo pós ovariectomia e o efeito sobre as células ósseas devem ser desenvolvidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AOAC. Official methods of analysis. Washington, D.C. 1998.
2. Bancroft JD, Gamble, M. Theory and Practice of Histological Techniques, 6th Ed. Churchill Livingstone, Elsevier, Philadelphia. 2008.
3. Barengolts EI, Lathon PV, Curry DJ, Kukreja SC. Effects of endurance exercise on bone histomorphometric parameters in intact and ovariectomized rats. Bone Miner. 1994 Aug;26(2):133-40.
4. Bergmann P, Body JJ, Boonen S, Boutsen Y, Devogelaer JP, Goemaere S, et al. Loading and skeletal development and maintenance. J Osteoporos. 2011;786752.
5. Civitelli R. Cell-cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage. Arch Biochem Biophys. 2008 May 15;473(2):188-92.

6. Chang TK, Huang CH, Chen HC, Cheng CK. The influence of long-term treadmill exercise on bone mass and articular cartilage in ovariectomized rats. *BMC Musculoskelet Disord*. 2010 11:185.
7. Chien MY, Wu YT, Hsu AT, Yang RS, Lai JS. Efficacy of a 24-week aerobic exercise program for osteopenic postmenopausal women. *Calcif Tissue Int*. 2000 Dec;67(6):443-8.
8. Fonseca H, Moreira-Goncalves D, Esteves JL, Viriato N, Vaz M, Mota MP, et al. Voluntary Exercise has Long-Term In Vivo Protective Effects on Osteocyte Viability and Bone Strength Following Ovariectomy. *Calcif Tissue Int*. 2011 Jun;88(6):443-54.
9. Francisco JJ, Yu Y, Oliver RA, Walsh WR. Relationship between age, skeletal site, and time post-ovariectomy on bone mineral and trabecular microarchitecture in rats. *J Orthop Res*. 2011 Feb;29(2):189-96.
10. Fernandes BB, Del Carlo RJ, Drummond LR, Peluzio MCG, Silva CHO, Louzada MJQ, et al. Treinamento em corrida de baixa intensidade não altera propriedades estruturais e mecânicas da epífise proximal do fêmur de ratas osteopênicas. *Rev Bras Cienc Esporte*. 2014.
11. Gammage KL, Francoeur C, Mack DE, Klentrou P. Osteoporosis health beliefs and knowledge in college students: the role of dietary restraint. *Eat Behav*. 2009 Jan;10(1):65-7.
12. Gobatto CA et al. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 2001;130(1): 21-27.
13. Goulet GC, Halonen NR, Koch LG, Britton SL, Zernicke RF, Kozloff KM. Osteoblast response to ovariectomy is enhanced in intrinsically high aerobic-capacity rats. *Calcif Tissue Int*. 2011 Apr;88(4):325-35.

14. Honda A, Sogo N, Nagasawa S, Shimizu T, Umemura Y. High-impact exercise strengthens bone in osteopenic ovariectomized rats with the same outcome as Sham rats. *J Appl Physiol*. 2003 Sep;95(3):1032-7.
15. Huang TH, Yang RS, Hsieh SS, Liu SH. Effects of caffeine and exercise on the development of bone: a densitometric and histomorphometric study in young Wistar rats. *Bone*. 2002 Jan;30(1):293-9.
16. Huang TH, Lin SC, Chang FL, Hsieh SS, Liu SH, Yang RS. Effects of different exercise modes on mineralization, structure, and biomechanical properties of growing bone. *J Appl Physiol*. 2003 Jul;95(1):300-7.
17. Huang TH, Chang FL, Lin SC, Liu SH, Hsieh SS, Yang RS. Endurance treadmill running training benefits the biomaterial quality of bone in growing male Wistar rats. *J Bone Miner Metab*. 2008;26(4):350-7.
18. Iwamoto J, Takeda T, Ichimura S. Effect of exercise on tibial and lumbar vertebral bone mass in mature osteopenic rats: bone histomorphometry study. *J Orthop Sci*. 1998;3(5):257-63.
19. Iwamoto J, Yeh JK, Aloia JF. Differential effect of treadmill exercise on three cancellous bone sites in the young growing rat. *Bone*. 1999 Mar;24(3):163-9.
20. Iwamoto J, Shimamura C, Takeda T, Abe H, Ichimura S, Sato Y, et al. Effects of treadmill exercise on bone mass, bone metabolism, and calciotropic hormones in young growing rats. *J Bone Miner Metab*. 2004; 22(1):26-31.
21. Iwamoto J, Takeda T, Sato Y. Effect of treadmill exercise on bone mass in female rats. *Exp Anim*. 2005 Jan;54(1):1-6.
22. Jessop HL, Suswillo RF, Rawlinson SC, Zaman G, Lee K, Das-Gupta V, et al. Osteoblast-like cells from estrogen receptor alpha knockout mice have deficient responses to mechanical strain. *J Bone Miner Res*. 2004 Jun;19(6):938-46.

23. Kiuchi A, Shimegi S, Tanaka I, Izumo N, Fukuyama R, Nakamuta H, Koida M. Dose-response effects of exercise intensity on bone in ovariectomized rats. *Int J Sport Health Sci* 2006; 4: 10-18.
24. Lee KC, Lanyon LE. Mechanical loading influences bone mass through estrogen receptor alpha. *Exerc Sport Sci Rev.* 2004 Apr;32(2):64-8.
25. Louzada MJQ. Densitometria Radiográfica. 2009. 65f. Tese Livre Docência. Faculdade de Odontologia, Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista.
26. Louzada MJQ et al. Metodologia para avaliação de densidade em imagens radiográficas. *Revista Brasileira de Engenharia - Caderno de Engenharia Biomédica.* 1998; 14(2): 37-47.
27. Louzada MJQ et al. Avaliações de densidade óssea em imagens radiográficas: estudo em peças ósseas de cães. *Revista Brasileira de Engenharia - Caderno de Engenharia Biomédica.* 1998; 14(1): 47-64.
28. Notomi T, Okazaki Y, Okimoto N, Saitoh S, Nakamura T, Suzuki M. A comparison of resistance and aerobic training for mass, strength and turnover of bone in growing rats. *Eur J Appl Physiol.* 2000 Dec;83(6):469-74.
29. Ocarino NM, Marubayashi U, Cardoso TG, Guimaraes CV, Silva AE, Torres RC, et al. Physical activity in osteopenia treatment improved the mass of bones directly and indirectly submitted to mechanical impact. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2007 Jan-Mar;7(1):84-93.
30. Omi N, Ezawa I. [Animal models for bone and joint disease. Low calcium diet-induced rat model of osteoporosis]. *Clin Calcium.* 2011 Feb;21(2):173-80.
31. Ooi FK, Singh R, Singh HJ, Umemura Y. Minimum level of jumping exercise required to maintain exercise-induced bone gains in female rats. *Osteoporos Int.* 2009 Jun;20(6):963-72.

32. Riggs BL, Khosla S, Melton LJ, 3rd. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev.* 2002 Jun;23(3):279-302.
33. Saengsirisuwan V, Pongseeda S, Prasannarong M, Vichaiwong K, Toskulkao C. Modulation of insulin resistance in ovariectomized rats by endurance exercise training and estrogen replacement. *Metabolism.* 2009 Jan;58(1):38-47.
34. Seo HJ, Cho YE, Kim T, Shin HI, Kwun IS. Zinc may increase bone formation through stimulating cell proliferation, alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in osteoblastic MC3T3 E1 cells. *Nutr Res Pract.* 2010 4(5):356-361.
35. Shiguemoto GE, Prestes J, Leite RD, Pereira GB, Pontes CL, D'Avila FV, 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.* 2012 Oct;22(5):607-17.
36. Shinoda M, Latour MG, Lavoie JM. Effects of physical training on body composition and organ weights in ovariectomized and hyperestrogenic rats. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2002 Mar;26(3):335-43.
37. Thorndike EA, Turner AS. In search of an animal model for postmenopausal diseases. *Front Biosci.* 1998 Apr 16;3:c17-26.
38. Tosteson AN, Melton LJ, 3rd, Dawson-Hughes B, Baim S, Favus MJ, Khosla S, et al. Cost-effective osteoporosis treatment thresholds: the United States perspective. *Osteoporos Int.* 2008 Apr;19(4):437-47.
49. Umemura Y, Nagasawa S, Honda A, Singh R. High-impact exercise frequency per week or day for osteogenic response in rats. *J Bone Miner Metab.* 2008;26(5):456-60.
40. Voltarelli FA, Gobatto CA, de Mello MA. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. *Braz J Med Biol Res.* 2002 Nov;35(11):1389-94.

41. Von Stengel S, Kemmler W, Engelke K, Kalender WA. Effects of whole body vibration on bone mineral density and falls: results of the randomized controlled ELVIS study with postmenopausal women. *Osteoporos Int.* 2011 Jan; 22(1):317-25.
42. Yamaguchi M. Role of zinc in bone formation and bone resorption. *Journal of Trace Elements in Experimental Medicine.* 1998 11:119-35.
43. Zhao LJ, Jiang H, Papasian CJ, Maulik D, Drees B, Hamilton J, et al. Correlation of obesity and osteoporosis: effect of fat mass on the determination of osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 2008 Jan;23(1):17-29.

CONCLUSÕES GERAIS

- A ovariectomia em ratas Wistar adultas não alterou os principais parâmetros ósseos analisados neste estudo, até o período de 90 dias de observação.
- O treinamento em natação promoveu um aumento na DMO no fêmur de ratas ovariectomizadas.
- Nas regiões do colo e trocânter maior do fêmur o treinamento em natação levou a um aumento no número de osteoblastos nas ratas ovariectomizadas, mas não provocou aumento na matriz óssea e no número de osteócitos.
- O treinamento em corrida de baixa intensidade aumentou a DMO no fêmur de ratas ovariectomizadas, mas não provocou alterações no CMO na tíbia destes animais.
- Nas regiões do colo e trocânter maior do fêmur o treinamento em corrida de baixa intensidade provocou um aumento no número de osteoblastos e osteoclastos, mas não foi capaz de provocar aumento na matriz óssea.