

Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Campus de Araçatuba – Faculdade de Odontologia

Departamento de Ciências Básicas

Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas

Ricardo de Paula de Almeida

**Análise da expressão de proteínas autofágicas e
microestrutura do colo do fêmur de ratas no período
do envelhecimento após treinamento de força**

ARAÇATUBA

2017

Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Campus de Araçatuba – Faculdade de Odontologia

Departamento de Ciências Básicas

Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas

**Análise da expressão de proteínas autofágicas e
microestrutura do colo do fêmur de ratas no período
do envelhecimento após treinamento de força**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas para obtenção do título de mestre em Ciências Fisiológicas

Área de concentração: Fisiologia

Orientado: Ricardo de Paula de Almeida

Orientadora: Prof^a Dr^a Rita Cássia Menegati Dornelles

ARAÇATUBA

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - FOA/ UNESP

Almeida, Ricardo de Paula de

Análise da expressão de proteínas autofágicas e microestrutura do colo do fêmur de ratas no período do envelhecimento após treinamento de força/ Ricardo de Paula de Almeida. – Araçatuba, 2017

78 f.: il. + 1 CD-ROM.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Orientadora: Prof^ª Rita Cássia Menegati Dornelles

1. Envelhecimento, 2. Exercício físico, 3. Treinamento de força, 3. Periostropausa, 4. Microarquitetura óssea, 5. Osteoporose, 6. Autofagia

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ricardo de Paula de Almeida

Análise da expressão de proteínas autofágicas e microestrutura do colo do fêmur de ratas no período do envelhecimento após treinamento de força

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas para obtenção do título de mestre em Ciências Fisiológicas

Área de concentração: Fisiologia

Orientado: Ricardo de Paula de Almeida

Orientadora: Prof^a Dr^a Rita Cássia Menegati Dornelles

Aprovado em: 12/07/2017

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Eduardo Kokubun

Instituição: Instituto de Biociências de Rio Claro/ UNESP

Prof. Dr. Edilson Ervolino

Instituição: Faculdade de Odontologia de Araçatuba/ UNESP

Prof (a). Dr (a): Rita Cássia Menegati Dornelles

Instituição: Faculdade de Odontologia de Araçatuba/ UNESP

DADOS CURRICULARES

Nascimento: 18/01/1989, Birigui - SP

Filiação: Valdei Dias de Almeida

Jaci de Paula de Almeida

2007/2011: Curso de Graduação em Bacharelado para Educação Física Centro
Universitário Toledo de Araçatuba – UNITOLEDO – Araçatuba – SP.

2015/2017: Curso de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Fisiológicas, nível
de Mestrado, na Faculdade de Odontologia do *Campus* de Araçatuba –
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

DEDICATÓRIA

A minha família por me darem suporte em todos os momentos

AGRADECIMENTOS

À UNESP – Universidade Estadual Paulista, pela oportunidade de realizar este curso.

Ao diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP Prof. Titular Wilson Roberto Poi e ao vice-diretor Prof. Titular João Eduardo Gomes Filho pelo apoio.

Ao apoio financeiro da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa de mestrado.

À FUNDUNESP (Fundação para Desenvolvimento da UNESP) e a Pró-Reitoria de Pósgraduação da UNESP (PROPG-UNESP) pelo apoio financeiro durante as viagens para realização de disciplinas e conclusão dos experimentos.

A todos os funcionários da UNESP, que de acordo com suas funções, prestaram sua importante parcela de contribuição nos diferentes estágios de realização desta pesquisa.

À Prof^a Dr^a Sandra Helena Penha de Oliveira da UNESP/ FOA pelos pareceres semestrais do projeto e também pela concessão de uso de micrótomo para cortes de tecidos ósseos.

Ao Prof. Dr. Edilson Ervolino do Laboratório de Osteobiologia aplicada à Odontologia da UNESP/ FOA por toda a ajuda disponibilizada na realização deste projeto.

Ao Prof. Dr. Mário Jefferson Quirino Louzada do Laboratório de Biofísica da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - FMVZ - UNESP pela disponibilização de materiais necessários à realização deste projeto.

Ao Prof. Dr. Antônio Hernandes Chaves-Neto do Departamento de Ciências Básicas da UNESP/FOA pela colaboração durante a realização deste projeto.

À Professora Dr^a Andrea Machado Leopoldino do Departamento de Análises Clínicas, Toxicologia e Ciências Alimentares, Escola de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo pela colaboração no uso de técnicas utilizadas neste projeto.

À Professora Dr^a Titular Mariz Vainzof do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva (Centro de Estudos do Genoma Humano e Células – Tronco/ Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo) por gentilmente disponibilizar material utilizado neste projeto.

À administração do Laboratório Multiusuário para realização de análises de microtomografia óssea computadorizada.

Aos colegas de laboratório e de departamento que sempre se mostraram solidários nos momentos de necessidade.

À todos os docentes do Departamento de Ciências Básicas: Sandra Helena Penha de Oliveira, Ana Cláudia Stevanato Nakamune, Antônio Hernandes Chaves Neto, Cristina Antoniali Silva, Dóris Hissako Sumida, João Carlos Callera, João César Bedran de Castro e Wilson Galhego Garcia, por somarem seus conhecimentos durante meu aprendizado.

Aos Professores da banca: Prof. Titular João César Bedran de Castro, Prof^a Dr^a Sandra Helena Penha de Oliveira e Prof^a Dr^a Rita Cássia Menegati Dornelles, pela estimada contribuição intelectual para este trabalho.

A todos os funcionários da biblioteca e da seção de pós-graduação da FOA, por me auxiliarem em todos os momentos.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte das novas descobertas aqui relatadas.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha família que sempre soube me entender e incentivar durante este período de dedicação ao estudo e pesquisa.

Aos meus amigos e colegas pela compreensão e motivação que me deram durante este tempo

Aos colegas de laboratório e do departamento de Ciências Básicas da UNESP pelo suporte quando necessário e por tudo que me ensinaram

Aos colegas e amigos de outras instituições pelo trabalho e disponibilidade que tiveram na conclusão deste projeto

À minha orientadora Dr^a Rita Cássia Menegati Dornelles, que me proporcionou a oportunidade de crescer profissionalmente sob sua orientação e aconselhamento, sempre compreendendo as dificuldades encontradas neste trabalho

“Não é na ciência que está a felicidade, mas na aquisição da ciência”.

(Edgar Allan Poe)

RESUMO

ALMEIDA, R. P. **Análise da expressão de proteínas autofágicas e microestrutura do colo do fêmur de ratas no período do envelhecimento após treinamento de força.** 77 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.

RESUMO

A diminuição de massa óssea concomitante à progressão da idade resulta em maior incidência de fraturas, devido a mudanças microarquiteturais que são determinantes importantes para a qualidade óssea. Concomitantemente, mecanismos moleculares que agem na manutenção celular como a autofagia podem estar relacionados ao “turnover” ósseo no período do envelhecimento, sendo estes mecanismos relacionados ao processo de osteopenia/osteoporose. Neste estudo foram avaliados os efeitos do treinamento de força (TF) na microestrutura do colo do fêmur de ratas Wistar adultas (7 meses) e velhas (21 meses) submetidas ou não ao programa de exercício físico e distribuídas nos grupos: adultas não exercitadas (A/NEX); adultas exercitadas (A/EX); velhas não exercitadas (V/NEX) e velhas exercitadas (V/EX). O treinamento de força foi realizado utilizando-se escada com carga atrelada à cauda dos animais; 3 vezes por semana durante período de 120 dias. Resultados obtidos por microtomografia computadorizada (μ CT) após este período demonstraram que o TF foi capaz de aumentar a espessura (Ct. Th (mm); V/EX vs A/EX $p = 0,7863$), momento polar de inércia médio (p MOI (mm^4); A/NEX vs A/EX $p = 0,0362$; V/NEX vs V/EX $p = 0,0032$) e reduzir a porosidade da região cortical do colo do fêmur (Ct. Po (%); V/NEX vs V/EX $p = 0,0406$), causando aumento na área cortical total (Tt.Ar (mm^2); V/NEX vs V/EX $p = 0,0406$). No osso trabecular notou-se maior fração do volume ósseo (BV/TV (%); V/NEX vs V/EX $p = 0,006$); espessura trabecular (Tb.Th (mm); V/NEX vs V/EX $p = 0,0069$; V/EX vs A/EX $p < 0,0001$); número de trabéculas (Tb.N (1/mm) V/NEX vs V/EX $p = 0,0004$) e grau de anisotropia (DA V/NEX vs V/EX $p = 0,0088$). Estas modificações resultaram em redução do espaçamento trabecular (Tb.Sp (mm) V/EX vs A/EX $p = 0,0382$) e porosidade trabecular (Tb.Po (%) V/NEX vs V/EX $p = 0,0006$). Além destes parâmetros da estrutura cortical e trabecular, foram avaliados: capacidade de carregamento voluntário máximo (CCVM); peso corporal, do útero e do tecido adiposo retroperitoneal; biomarcadores para fosfatase alcalina plasmática (FAL) e fosfatase ácida resistente à tartarato sérica (TRAP); densidade mineral óssea areal (DMOa), Western blot para beclina-1, LC3, sequestossoma-1/p62

(SQSTM-1/p62), AKT, ERK1//2, pAKT (Ser473), pERK (Thr202/ Tyr204); e imunistoquímica (IHQ) para RUNX-2, FAL, TRAP, Osteocalcina (OCN) e beclina-1. As dosagens plasmáticas evidenciaram aumento na atividade da FAL após a realização do TF (A/NEX vs A/EX $p = 0,0002$). Concentrações plasmáticas de TRAP não apresentaram alterações significantes. Análises de marcadores autofágicos mostraram maior expressão para beclina-1 em A/EX e V/EX. LC3 também obteve elevada expressão em A/EX, mas em V/EX sua expressão foi menor. A expressão de SQSTM1/p62 foi reduzida após a realização do TF nas ratas A/EX e V/EX. AKT total (t-AKT) e AKT fosforilada (pAKT-Ser473) demonstrou expressão mais alta em A/EX comparados à A/NEX. Por outro lado, em V/EX, a fosforilação foi reduzida em Ser473 quando comparados à V/NEX, mas t-AKT permaneceu inalterada em ambos. Resultados para ERK1/2 demonstraram redução na expressão em A/EX comparados à A/NEX, mas em V/EX sua expressão foi melhorada comparados à V/NEX. A fosforilação de ERK em Thr202 foi aumentada em A/EX em relação à A/NEX, mas em ratas velhas não houveram modificações. No sítio Tyr204 também houve elevada fosforilação em A/EX comparados à A/NEX, mas foi reduzida em V/EX comparados à V/NEX. A imunomarcação de RUNX-2, FAL, OCN e beclina-1 foi menor em V/NEX mas em V/EX a marcação aumentou assemelhando -se à A/EX. TRAP, elevada em V/NEX, mostrou -se reduzida em V/EX. Em suma, neste estudo nós demonstramos a atuação do TF no metabolismo ósseo de ratas no período da periostropausa com resposta integrada entre exercício e idade. Este estudo também demonstrou que proteínas importantes relacionadas à regulação autofágica e metabolismo ósseo podem ser potencialmente alteradas pelo TF. Nossos resultados evidenciam atuação do TF na manutenção da massa óssea mostrando que essa modalidade de exercício pode prevenir e/ou diminuir danos causados pela osteoporose durante o estágio do envelhecimento.

PALAVRAS – CHAVE: Envelhecimento, exercício físico, treinamento de força, periostropausa, microarquitetura óssea, osteoporose, autofagia.

ABSTRACT

ALMEIDA, R. P. **Analysis of autophagic proteins expression and femoral neck bone microstructure of female rats in the aging period after strength training.** 2016. f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.

Abstract

The decrease in bone mass concomitant with the progression of age results in a higher incidence of fractures, due to microarchitectural changes that are important determinants of bone quality. Concomitantly, molecular mechanisms that act in cellular maintenance such as autophagy may be related to bone turnover in the aging period, and these mechanisms are related to the osteopenia/osteoporosis process. In this study were evaluated, the effects of strength training (ST) on the femoral neck microstructure of adult (7 months) and old (21 months) female Wistar rats submitted or not to the physical exercise program and distributed in the following groups: non-exercised adult groups (A/NEX); exercised adults (A/EX); non-exercised old (O/NEX) and old exercised (O/EX). Strength training was performed using a ladder with load attached to the tail of the animals; 3 times a week for a period of 120 days. Results obtained by computerized microtomography (μ CT) after this period demonstrated that the ST was able to increase the thickness (Ct.Th (mm), O/EX vs A/EX $p = 0.7863$), mean polar moment of inertia (mm^4), A/NEX vs A/EX $p = 0.0362$, O/NEX vs O/EX $p = 0.0032$) and reduce the porosity of the cortical region of the femoral neck (Ct Po (%); O/NEX vs O/EX $p = 0.0406$), causing increase in the total cortical area (Tt.Ar (mm^2); O/NEX vs O/EX $p = 0.0406$). In trabecular bone, a higher fraction of bone volume was observed (BV / TV (%), O/NEX vs O/EX $p = 0.006$); (Tb.Th (mm); O/NEX vs O/EX $p =$

0.0069; O/EX vs A/EX $p < 0.0001$); number of trabeculae (Tb.N (1/mm) O/NEX vs O/EX $p = 0.0004$) and degree of anisotropy (DA O/NEX vs O/EX $p = 0.0088$). These changes resulted in a reduction in trabecular spacing (Tb.Sp (mm) O/EX vs A/EX $p = 0.0382$) and trabecular porosity (Tb.Po (%) O/NEX vs O/EX $p = 0.0006$). In addition to these parameters of the cortical and trabecular structure, the following were evaluated: maximum voluntary carrying capacity (MVCC); body weight, uterus and retroperitoneal adipose tissue; biomarkers for plasmatic alkaline phosphatase (ALP) and serum tartrate resistant acid phosphatase (TRAP); Western blot for beclin-1, LC3, sequestosome-1/p62 (SQSTM-1 / p62), AKT, ERK1/2, pAKT (Ser473), pERK (Thr202/Tyr204) and immunohistochemistry (IHC) for RUNX-2, ALP, TRAP, osteocalcin (OCN) and beclin-1. Plasma dosages showed an increase in ALP activity after ST (A/NEX vs A/EX $p = 0.0002$). Plasmatic concentrations of TRAP did not show significant alterations. Analyzes of autophagic markers showed higher expression for beclin-1 in A/EX and O/EX. LC3 also had higher expression in A/EX, but in O/EX its expression was lower. Expression of SQSTM1/p62 was reduced after ST in the A/EX and O/EX rats. Total AKT (t-AKT) and phosphorylated AKT (pAKT-Ser473) demonstrated higher expression in A/EX compared to A/NEX. On the other hand, in O/EX, phosphorylation was reduced in Ser473 when compared to O/NEX, but t-AKT remained unchanged in both. Results for ERK1/2 demonstrated reduction in A/EX expression compared to A/NEX, but in O/EX their expression was improved compared to O/NEX. ERK phosphorylation in Thr202 was increased in A/EX relative to A/NEX, but in old rats there were no changes. At the Tyr204 site there was also high A/EX phosphorylation compared to A/NEX, but was reduced in O/EX compared to O/NEX. Immunostaining of RUNX-2, FAL, OCN and beclin-1 was lower in O/NEX but in O/EX the labeling increased resembling A/EX. TRAP, high in O/NEX, was reduced in O/EX. In summary, in this study we demonstrated the action of ST in bone metabolism of rats

in periostropause period with integrated response between exercise and age. This study also demonstrated that important proteins related to autophagic regulation and bone metabolism may be potentially be altered by ST. Our results demonstrate the role of ST in maintaining bone mass, showing that this exercise modality can prevent and/or reduce osteoporosis damage during the aging stage.

Keywords: Aging, bone microarchitecture, exercise, periostropause, strength training, osteoporosis, autophagy

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Vias de sinalização envolvidas na autofagia;

Figura 2 - Representação gráfica das fases do ciclo estral durante dias de coleta do esfregaço vaginal;

Figura 3^a - Escada utilizada para treinamento de força e testes de capacidade de carregamento voluntário máximo (CCVM);

Figura 3b - Periodização do treinamento de força;

Figura 4 - Peso do tecido adiposo e útero de ratas adultas e periostropausadas que fizeram ou não treinamento de força;

Figura 5 - Concentração de fosfatase alcalina;

Figura 6 - Densidade mineral óssea areal;

Figura 7 - Dados da microarquitetura cortical do colo do fêmur de ratas adultas e periostropausadas;

Figura 8 - Dados da microarquitetura trabecular do colo do fêmur de ratas adultas e periostropausadas;

Figura 9 - Dados de análise por Western blot de marcadores autofágicos e proteínas relacionadas ao metabolismo ósseo e exercício físico;

Figura 10 - Dados de análise de imunistoquímica.

Figura 11 - Marcadores metabólicos. Determinação das proteínas AKT, pAKT, ERK1/2, pERK1/2.

Figura 12 - Marcadores autofágicos. Determinação das proteínas Beclina -1, LC3 1/2 e SQSTM-1/p62.

Figura 13 - Análise por Western blot. Gráficos em barra representam valores de intensidade de banda.

LISTA DE ABREVIATURAS

UPS- sistema ubiquitina-proteassoma

CMA- autofagia mediada por chaperonas

RE- retículo endoplasmático

PAS- estrutura pré - autofagossomal

ATG- proteínas relacionadas à autofagia

ULK1- uncoordinated-51-like kinase 1

PtdIns3K- Complexo 1 classe III fosfatidilinositol 3 quinase

Vps- vacuolar protein sorting

mTORC1- alvo mamífero do complexo da rapamicina 1

FIP200- Focal adhesion kinase Family interacting protein of 200 KD

AMBRA1- Activating molecule in Beclin 1-regulated autophagy

TRAF6- TNF receptor associated factor 6

AKT- AKT serine/ threonine kinase

EGFR- Epidermal growth factor receptor

DFCP1- Double FYVE – domain containing protein 1

WIPI- WD repeat domain, phosphoinositide interacting

LC3- Microtubule associated protein 1 light chain 3

NDP52- Nuclear dot protein 52 KDa

NBR1- Neighbor of BRCA1 gene 1 (autophagy cargo receptor)

Alfy- Autophagy- linked FYVE protein

p62/ SQSTM1- sequestossoma 1

RC- Restrição calórica

IGF- Fator de crescimento semelhante à insulina

V/NEX- Ratas velhas não exercitadas

V/EX- Ratas velhas exercitadas

A/NEX- Ratas adultas não exercitadas

A/EX- Ratas adultas exercitadas

CCVM- Capacidade de carregamento voluntário máximo

DEXA- densitometria por dupla emissão de raios – X

μ CT- microtomografia computadorizada

FAL- fosfatase alcalina

TRAP- fosfatase ácida resistente ao tartarato

pNPP- p-nitrofenil fosfato

DMOa- Densidade mineral óssea areal

DICOM- Digital imaging and communications in medicine

Tt.Ar- área cortical total

CT.Ar- área óssea cortical

V/TV- Fração da área cortical

C/Th- Espessura cortical média

Ct/Po- porosidade cortical

Po.N- número de poros corticais

pMOI- momento de inércia polar médio

BV/TV- Fração do volume ósseo

Tb.Th- espessura trabecular

Tb.N- número de trabéculas

Tb.Sp- Separação trabecular

DA- grau de anisotropia

Tb.Po- porosidade trabecular

ELISA- enzyme-linked immunosorbent assay

ROI- region of interest

Sumário

1. Introdução.....	
2. Materiais e Métodos.....	
2.1 Modelo animal.....	
2.2 Capacidade de carregamento voluntário máximo (MVCC) e treinamento de força.....	
2.3 Peso corporal, do tecido adiposo e útero.....	
2.4 Avaliação dos biomarcadores do turnover ósseo.....	
2.5 Análise de densitometria por absorção de raios – X de dupla energia.....	
2.6 Microtomografia computadorizada.....	
2.7 Western blot.....	
2.8 Imunoistoquímica.....	
2.9 Análise estatística.....	
3. Resultados.....	
3.1 Treinamento de força reduz a massa corporal em ratas periestropausadas e aumenta ganho de força nos três primeiros meses de treinamento.....	
3.2 Biomarcadores do turnover ósseo.....	
3.3 Densitometria por absorção de raios-X de dupla energia.....	
3.4 Osso trabecular e cortical do colo do fêmur demonstra responsividade à tensão mecânica causada pelo treinamento de força em 120 dias.....	
3.5 TF não modifica a quantidade de t-AKT mas reduz pAKT (Ser473), sendo que aumenta a expressão de t-ERK1/2 reduzindo pERK (Tyr204) mas não pERK(Thr202).....	
3.6 A expressão de Beclina-1 é maior após TF em ratas velhas, mas não de LC3-I/II e SQSTM-1/p62.....	

4. Marcação para RUNX-2, beclina-1, FAL e OCN é aumentada no colo do fêmur após TF no período do envelhecimento.....
 5. Discussão.....
 6. Conclusão.....
- Referências.....
- Anexos

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O envelhecimento é caracterizado por crescente incapacidade para responder ao estresse e elevado desequilíbrio homeostático o qual poderá levar à maior incidência de doenças que poderão resultar em morte ou morbidade (Johnson *et al.*, 1999; Pal e Tyler, 2016). Dados das Nações Unidas relatam que a expectativa de vida em 2045/2050 pode atingir 83 anos de idade em regiões desenvolvidas e 75 anos de idade em regiões menos desenvolvidas (UNITED NATIONS, DEPARTMENT OF ECONOMIC AND SOCIAL AFFAIRS, 2013). Com o crescimento da população idosa, há possibilidade de aumento significativo na incidência de osteoporose e prevalência de fraturas osteoporóticas (Becker *et al.*, 2010; Cauley, 2013). Dados revelam que a quantidade de fraturas em 2050 irá atingir 6.3 milhões e representa custos anuais de 20 bilhões nos EUA e 30 bilhões na União Europeia. Na América Latina, o número de fraturas para mulheres e homens entre 50-64 anos de idade irá aumentar 400% até 2050 se comparados à 1990. Para pessoas mais velhas do que 65 anos o aumento irá atingir surpreendentes 700% (Cooper *et al.*, 1992).

A osteoporose também traz consigo problemas variados. Esta doença tipicamente condiciona às pessoas afetadas, que tenham cuidado excessivo com as atividades diárias, o que por sua vez reduz dramaticamente sua independência e sociabilidade. Em alguns casos mais extremos, é até mesmo possível que ao se curvar, tossir ou levantar ocorra o colapso de uma vértebra. Situações assim são ainda mais agravadas por quedas, que são a maior causa de fraturas do punho e quadril. O osso é formado por osteoblastos e osteócitos (células formadoras de osso), osteoclastos (células de reabsorção óssea) e osteóide (matriz óssea). Uma vez que o equilíbrio entre a quantidade de osso formado e reabsorvido seja modificado por reabsorção excessiva, ocorrerá perda óssea precursora da osteoporose.

A taxa de remodelamento ósseo é reduzida por estrógeno, o qual aumenta a apoptose de osteoclastos através de dois receptores: receptor de estrógeno α (ER α) e receptor de estrógeno β (ER β). A deficiência de estrógeno tem função essencial na osteoporose sendo associada à aumentada reabsorção óssea e prejudicada formação óssea. Mesmo sob indução de carga mecânica, a formação de tecido ósseo é reduzida na deficiência de estrógeno, o que sugere tanto uma função catabólica quanto anabólica (Lee *et al.*, 2003). A distribuição e grau de mineralização do osso estão intimamente ligados à frequência de ativação do remodelamento ósseo, sendo este influenciado pela idade, status hormonal, patologia e terapias (Boivin e Meunier, 2002; Roschger *et al.*, 2008). O hipoestrogenismo em mulheres, carga mecânica reduzida, hiperparatireoidismo, deficiência de cálcio e/ou vitamina D, a associação do envelhecimento e estresse oxidativo são fatores-chave que contribuem para osteoporose (Manolagas, 2010; Sorpreso *et al.*, 2015; Stringhetta-Garcia *et al.*, 2016).

O risco aumentado de fratura está intimamente relacionado à deterioração da competência mecânica do osso, que é determinada pela sua composição estrutural como um todo (ex. tamanho ósseo, geometria óssea, orientação trabecular e porosidade cortical) e de propriedades de materiais intrínsecos [ex. composição química e tamanho dos cristais de hidroxiapatita] (Augat e Schorlemmer, 2006). Várias estratégias têm sido utilizadas para tratar ou amenizar os danos causados pela osteoporose. Múltiplas drogas têm sido elaboradas na pretensão de evitar fraturas, mas boa parte destas tem demonstrado pouca eficácia, pobre adequação e efeitos colaterais. Além disso, a maioria das drogas com exceção da teriparatida, tem ação sobre a inibição da reabsorção óssea e não agem estimulando a formação óssea. Elas também não reparam a arquitetura trabecular danificada e nem fortalecem o osso cortical (Bandeira, 2017; Khosla *et al.*, 2017; Villiers, 2017). Recentemente, também foi aprovado uso de abaloparatida para o tratamento de osteoporose pós-menopausa

(Shirley, 2017). Apesar do tratamento farmacológico ser padrão, seus resultados apresentam limitações potenciais, como modesto incremento da densidade mineral óssea. Somado a isso, não exercem influência sobre os fatores de risco que levam a fratura, como força muscular reduzida, diminuída flexibilidade articular e agilidade e pobre movimento dinâmico e equilíbrio (Zhao *et al.*, 2015).

Contrariamente, estudos desde a década de 1990 demonstram a efetividade do exercício físico na redução da osteopenia/osteoporose (Gleeson *et al.*, 1990; Raab *et al.*, 1990; Silbermann *et al.*, 1990; Newhall *et al.*, 1991; Kerr *et al.*, 1996; Goodship *et al.*, 1998; Humphries *et al.*, 1999; Bergstrom *et al.*, 2008; Hamaguchi *et al.*, 2017; Seidelin *et al.*, 2017). Diferentes modalidades de exercícios já foram utilizadas para avaliar o metabolismo ósseo, dentre elas: corrida (Chen *et al.*, 2016), saltos (Falcai *et al.*, 2015), exercícios proprioceptivos (Stolzenberg *et al.*, 2013; Winkelmann *et al.*, 2015) entre outros. Foi demonstrado por estudos recentes de nosso grupo que o treinamento de força é capaz de aumentar a força óssea e osteoblastogênese, diminuindo a degradação na região do colo do fêmur de ratas hipoestrogênicas intactas e por ovariectomia mesmo quando não conjugado a aplicações de estrógeno, sendo estas atividades resultado de maior atividade de células tronco mesenquimais da medula óssea, causando também reduzida diferenciação adipogênica e concentração de citocinas pró-inflamatórias (Stringhetti-Garcia *et al.*, 2016; Singulani *et al.*, 2017). Adicionalmente, o estímulo mecânico causado pelo treinamento de força pode reverter o funcionamento do microambiente ósseo no período do envelhecimento *in vivo* e *in vitro* (Singulani *et al.*, 2017).

Outro evento que desempenha ação fundamental na instalação de doenças e pode estar envolvido com a fisiopatologia da osteoporose, é a alteração em fatores moleculares. Vias de sinalização transmitem às células estímulos provenientes do ambiente externo para que estas respondam rápida e adequadamente, garantindo o

equilíbrio homeostático e, conseqüentemente, a sobrevivência celular (Hohmann, 2002; Hersen *et al.*, 2008; Fulda *et al.*, 2010). Alterações relacionadas à idade, como acúmulo de macromoléculas danificadas – DNA, proteínas, lipídios e organelas celulares (mitocôndrias, retículo endoplasmático e peroxissomo), contribuem diretamente para a instauração do envelhecimento (Ravikumar *et al.*, 2010). Entre os mecanismos celulares que agem a favor da defesa/ morte celular está o processo autofágico (Fulda *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2016). Este processo possui ligações com apoptose, revelando uma função dual, por um lado autofagia degrada mitocôndrias danificadas e caspases, por outro lado, provê uma plataforma intracelular para o processamento de caspases na regulação da autofagia (Mariño *et al.*, 2014). O *cross-talk* entre autofagia-apoptose envolve a interação de várias proteínas com beclina-1, sendo que Bcl-2 é considerado principal regulador destas interações. Apesar de não completamente definida, já se sabe que a relação autofagia-apoptose envolve várias proteínas apoptóticas como: Noxa, Nix, Bax, PUMA, XIAP e Bim (Patingre *et al.*, 2005; Marquez e Xu, 2012). Isso caracteriza autofagia tanto como uma via de morte celular e de adaptação ao estresse que promove sobrevivência celular. Resultados de estudos que visam compreender a relação autofagia-apoptose permanecem conflitantes, sendo incerto se autofagia representa um mecanismo para prevenir apoptose ou para decretar morte celular programada não-apoptótica (Denton *et al.*, 2011). Autofagia inicia com a formação de membrana isolada ao redor de estrutura citosólica conhecida como estrutura pré-autofagossomal (PAS) em levedura. A membrana formada é chamada fagoporo, igualmente derivado da bicamada lipídica com contribuição do retículo endoplasmático e/ou o trans-Golgi e endossomos tardios. Intrigantemente, a origem exata do fagoporo ou a formação do PAS em mamíferos permanece controversa. Quatro grandes grupos funcionais de proteínas Atg (autophagy related proteins) são necessárias para a iniciação da formação do

autofagossomo: (1) Atg1 (ULK1 em mamíferos) – complexo quinase Atg 13-Atg 17, (2) o complexo 1 classe III fosfatidilinositol 3 – quinase (PtdIns3K), consistindo de Vps (vacuolar protein sorting) 34, Vps15, Atg6 e Atg14, (3) dois sistemas de conjugação semelhante à ubiquitina (Atg12 e Atg8) e Atg9 e seu sistema de ciclagem (Yang e Klionsky, 2010). Em geral, o processo autofágico compreende a interação de mais de 30 proteínas ATG com homologia entre os genomas de leveduras à mamíferos (Ohsumi, 2013).

Através da ação de indutores, tais como rapamicina e privação energética, mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) desfosforila ULK1 (uncoordinated 51-like kinase 1). Posteriormente, complexo formado por ULK1, ATG13, ATG101 e FIP200 (focal adhesion kinase (FAK) family interacting protein of 200 kD) dissocia-se do complexo mTORC1. ULK1 é randerizado enzimaticamente fosforilando ATG13 e FIP200, iniciando-se assim o processo autofágico. Em seguida, o complexo ULK1 ativado recruta o complexo Beclina1-Vps34 para local de formação do autofagossomo por meio da fosforilação de AMBRA1 (activating molecule in Beclin-1-regulated autophagy). Conseqüentemente, AMBRA1 interage com TRAF6 (TNF receptor associated factor 6), agindo como uma ubiquitina-ligase E3 para ULK1, resultando em autoassociação e estabilização de ULK1 através da ubiquitinação de K63. O complexo ULK1 fosforila diretamente Beclina1 melhorando a atividade do complexo Vps34 contendo ATG14 - L. Adicionalmente, AKT (AKT serine/threonine kinase) e EGFR (epidermal growth factor receptor) modulam a autofagia através da fosforilação de Beclina1 independente de mTORC1 (Fig. 1A). Então, fosfatidilinositol-3-fosfato produzido por Vps34 recruta DFCP1 (double FYVE-domain containing protein 1) para iniciar a nucleação da vesícula de dupla-membrana. A expansão ou conclusão do autofagossomo é mediada por ATG12-ATG5-ATG16L e ATG8 (LC3

[microtubule associated protein 1 light chain 3) fosfatidiletanolamina, agregadas em sistemas de conjugação semelhantes à ubiquitina.

No primeiro sistema, ATG12 é conjugada para ATG5 através da ação concentrada de ATG7 (enzima de ativação semelhante à ubiquitina E1) e ATG10 (enzima de conjugação semelhante à E2) (Fig. 1B). ATG12-ATG5 conjugados se ligam à ATG16L, formando complexo ATG12-ATG5-ATG16L, o qual então participa na conjugação de LC3-fosfatidiletanolamina. LC3, gerado de ProLC3 por ATG4 protease é conjugado à fosfatidiletanolamina por ATG7, ATG3 (outra enzima semelhante à E2) e o complexo ATG12-ATG5-ATG16L (agindo como um complexo semelhante à E3). Após o processamento, LC3 conjugado à lipídios (LC3-fosfatidiletanolamina ou LC3 II), o qual é localizado nas membranas autofagossomais, participa na formação e alongamento dos autofagossomos (Fig. 1C). A ancoragem de proteínas alvo e organelas destinadas para degradação para um autofagossomo em desenvolvimento ou engolfamento é facilitada por proteínas receptoras ou adaptadoras de autofagia (sequestossoma-1, também chamada p62), optineurina, NDP52, NBR1 e Alfya) agindo analogamente à uma ponte. Autofagossomos maduros se fundem com lisossomos para formar autofagolisossomos (autolisossomos), estruturas onde materiais ou organelas ancoradas por proteínas receptoras de autofagia são digeridas por enzimas lisossomais.

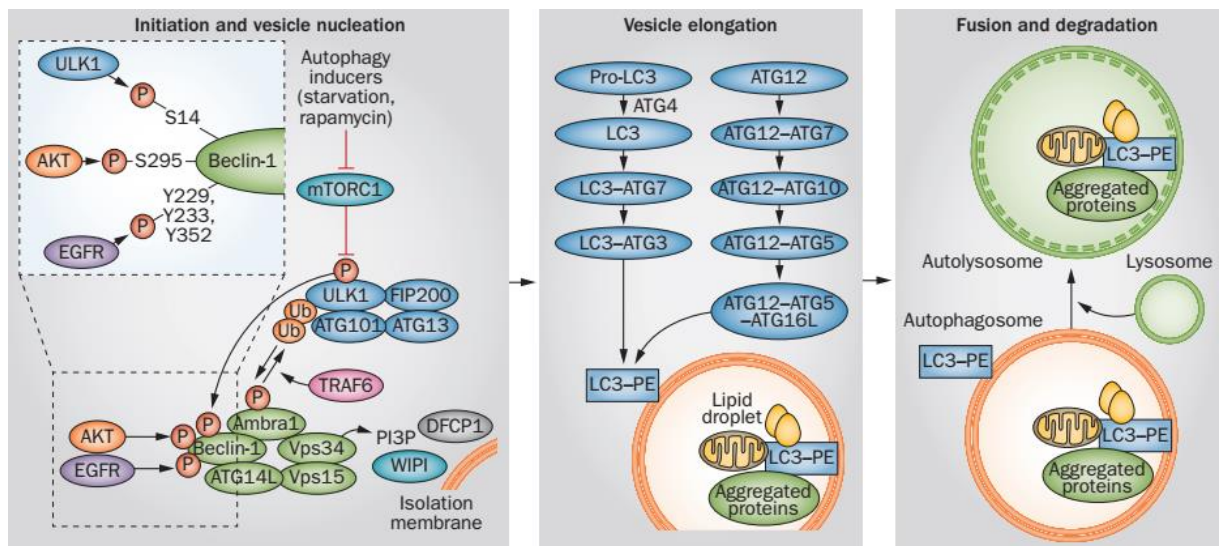


Fig. 1 Autofagia é regulada por múltiplas interações moleculares. Indutores autofágicos como jejum e rapamicina ativam o complexo ULK1 aumentando a atividade do complexo Beclina1 – Vps34 por meio da fosforilação de AMBRA1 e Beclina1 **(A)**. Consequentemente, AMBRA1 induz autofagia regulando a atividade quinase e a estabilidade de ULK1 através da interação com TRAF6. AKT e EGFR induzem autofagia através da fosforilação de Beclina-1 independentemente de mTORC1. Vps34 produz PI3P, o qual recruta proteínas efetoras, tais como DFCP1 e WIPI, promovendo a formação do autofagossomo. **(B)** Dois sistemas conjugados medeiam o alongamento do autofagossomo: ATG12 – ATG5 – ATG16L e LC3 – PE. **(C)** Uma vez que as vesículas autofágicas estejam completas, o autofagossomo maduro funde-se ao lisossomo criando autolisossomo, onde moléculas e organelas sequestradas serão degradadas. Adaptado de (Kim e Lee, 2014).

Interpretar mecanismos celulares da resposta óssea ao treinamento de força e autofagia pode ser crucial para a compreensão de doenças como a osteoporose. Neste sentido, investigamos alterações causadas pelo treinamento de força na microarquitetura óssea do colo do fêmur utilizando-se técnicas de densitometria óssea e microtomografia computadorizada somadas a análise imunohistoquímica e de ELISA para biomarcadores do turnover ósseo. Western blot foi realizado para avaliar a expressão dos marcadores autofágicos Beclina1, LC3 e p62/SQSTM1 e quinases importantes envolvidas no metabolismo e regulação autofágica como AKT e ERK1/2 (pAKT Ser473; pERK Thr202 e pERK Tyr204) no colo do fêmur de ratas com 21 meses de idade.

O colo do fêmur é área de recorrentes fraturas, de fato o risco para estas fraturas se eleva conforme as competências mecânicas do osso se deterioram. Essa competência mecânica compreende todas as propriedades estruturais do osso e suas propriedades materiais intrínsecas. Propriedades estruturais incluem características como geometria óssea, tamanho do osso e propriedades microestruturais tais como orientação trabecular e porosidade cortical. As propriedades materiais intrínsecas correspondem à densidade mineral óssea (DMO), composição química e tamanho de cristais de hidroxapatita. Setenta e cinco por cento (75%) de todas as fraturas no quadril ocorre em mulheres. É também sabido que a inatividade física e o estilo de vida sedentário comprometem a função neuromuscular, reduzindo força muscular e

prejudicando o equilíbrio na qual levará à risco mais elevado de fraturas (Gourlay *et al.*, 2015; Lafleur *et al.*, 2016; Cohen, 2017; Curtis *et al.*, 2017). Por outro lado, atividade física regular pode parar este processo (Nelson *et al.*, 1994; Ryan *et al.*, 1994; Layne e Nelson, 1999; Moreira *et al.*, 2014) bem como alterar a habilidade diminuída da célula para manter suas funções, parâmetro também intimamente ligado à autofagia.

Neste trabalho, buscamos averiguar como o colo do fêmur responde ao estresse mecânico causado pelo treinamento de força (conhecido mecanismo para evitar a perda óssea) no envelhecimento de ratas no período da periestropausa. Como **objetivo principal**, buscamos analisar os efeitos de TF na microarquitetura cortical e trabecular e caracterizar a expressão de proteínas relacionadas à autofagia. A **hipótese** do presente trabalho é que 120 dias de TF em ratas velhas pode melhorar a microarquitetura óssea e manter ou restaurar a expressão de proteínas relacionadas a autofagia no colo do fêmur, questões ainda não muito exploradas pela literatura.

MATERIAIS E MÉTODOS

2. Materiais e Métodos

2.1 Modelo animal

Todos os procedimentos realizados com os animais foram aprovados pelo Comitê Institucional de Ética no Uso e Cuidados com Animais (Univ. Estadual Paulista-UNESP, Araçatuba, SP, Brasil, Processo número 2015-00922) e cumpridos de acordo com o Guia para Uso e Cuidado de Animais de Laboratório (Animals, 2011).

Quarenta ratas Wistar do Centro de Criação Animal da Faculdade de Odontologia (Univ. Estadual Paulista- UNESP- Araçatuba, SP, Brasil), com idade de 07 e 21 meses foram distribuídas em grupos com 3 a 4 animais por gaiola e mantidas em ambiente com temperatura de 22°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo claro/escuro de 12/12 h. Foram alimentadas com dieta pelitizada (Presence® Ratos e Camundongos, Paulínia, SP, Brasil) com acesso *ad libitum* para comida e água. A vida reprodutiva destes animais ocorre entre o 2° e 8° mês de idade marcando sua maturidade (Gabriel *et al.*, 1992). Entretanto, o envelhecimento nestes animais é caracterizado por ciclo estral progressivamente irregular, quando se observa fase de estro constante e diestro prolongado (Long e Evans, 1922; Finch, 2014). Esta irregularidade pontua a periestro-pausa em ratas a qual é similar a perimenopausa em mulheres. Baseados nisto, nós validamos a periestro-pausa nestes animais através de análises diárias de esfregaço vaginal durante quatro meses. Os animais que demonstraram aciclicidade foram arranjados nos grupos de velhas, que são: velhas não exercitadas (V/NEX), n= 10) e velhas exercitadas (V/EX, n= 10) enquanto que as adultas com ciclo estral regular, foram distribuídas nos grupos: adultas não exercitadas (A/NEX, n= 10) e adultas exercitadas (A/EX, n= 10). Após a validação e distribuição dos grupos experimentais, os animais estavam prontos para serem submetidos para o período de familiarização.

2.2 Capacidade de carregamento voluntário máximo (CCVM) e treinamento de força

Os grupos selecionados para treinamento foram submetidos à sessões de escalada em escada (Fig. 2 A; 1.13 × 0.18 m, grade de 2 cm, ângulo de 80°, com área de descanso de 20 × 20 × 20 cm diâmetro no topo – fabricada pelo Setor de Manutenção - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP, Araçatuba, SP, Brasil) três vezes por semana em dias não consecutivos efetuando entre 48 e 62 movimentos dinâmicos (isotônicos) por série (Hornberger e Farrar, 2004), durante 120 dias no período que compreende à fase escura, após as 18 horas, a qual é o período ativo dos roedores (Smale *et al.*, 2003). Cada sessão de treinamento consistiu de 6 escaladas e período de descanso de 120 segundos entre cada série. Durante uma semana antes do começo do treinamento, período de familiarização foi realizado sem carga anexada à cauda, em todos os animais. As ratas não respondentes à escalada voluntária foram substituídas por outro animal e realocadas no grupo NEX, animais que respondentes à subida foram inseridos no grupo EX.

Posteriormente à familiarização, teste de capacidade de carregamento voluntário máximo (CCVM) adaptado de elegantes estudos de Hornberger e Farrar (Hornberger e Farrar, 2004), Prestes e colaboradores (Prestes *et al.*, 2009) e Sanches e colaboradores (Sanches *et al.*, 2014) foi realizado anexando dois tubos plásticos (BD Falcon 50 mL tubo cônico, BD Biosciences®, Bedford, MA, USA) preenchidos com esferas de aço (Esferas de aço, Cabana S/A, SP, Brasil) anexados à cauda com fita adesiva (Missner, Missner & Missner Ltda, Blumenau, SC, Brasil) nos grupos AEX e VEX. Utilizamos 75% do peso corporal como parâmetro inicial para avaliação da força máxima. Sendo assim, adicionando 30 gramas nos tubos e aumentando deste modo até o animal atingir o CCVM (*i.e* até a falha). A antepenúltima repetição antes da falha foi considerada o valor de força máxima e usado como base de cálculo percentual para a próxima semana de treinamento. É importante ressaltar que

nenhum tipo de estímulo foi dado ao animal para executar a tarefa. Durante o período de treinamento, a carga foi de 60, 70 e 80% a cada semana, sendo mantida em 80% até o fim dos 120 dias. Juntamente, novo teste de CCVM foi realizado em cada mês experimental para reajustar a carga (Fig 2B).

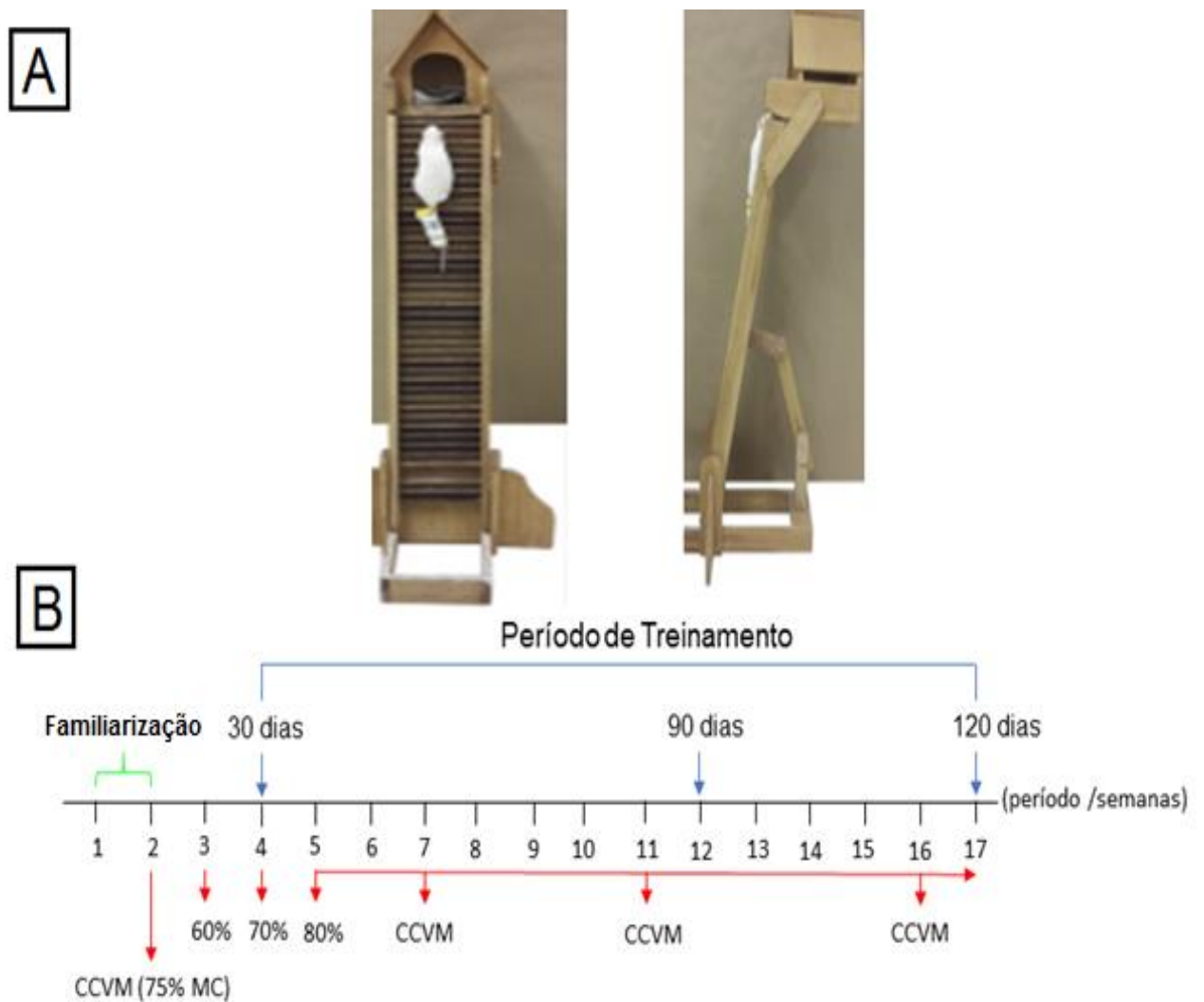


Fig. 2. Escada utilizada para realização do treinamento de força (A). Periodização do treinamento de força, após período de familiarização foi realizado teste de capacidade de carregamento voluntário máximo (CCVM) e utilizado 75% da carga máxima obtida (B). Ao início do treinamento, efetuou-se aumento progressivo da carga (60, 70 e 80%) por semana. A carga obtida de 80% foi utilizada como base para os subsequentes testes de CCVM realizados em cada mês do período experimental.

2.3 Peso corporal, do tecido adiposo e útero

Após 120 dias de experimentação, todos os animais foram pesados em balança de precisão (Bel Mark 500, Bel Engineering, Bel Equipamentos Analíticos LTDA, Piracicaba, SP, Brasil) e anestesiados (80mg/kg/pc de Cetamina Vetaset®, Fort Dodge Saude Animal Ltda, Porto Feliz, SP, Brasil associado a 10mg/ Kg/ pc/ip de xilazina Coopazine®, Coopers Brasil Ltda, Porto Feliz, SP, Brasil). Após isso, foram sacrificados por decapitação e realizado coleta de sangue, tecido adiposo, útero e fêmures.

O tecido adiposo e tecido uterino foram pesados em balança de precisão para checar possíveis alterações causadas pelo treinamento e senescência reprodutiva nestas estruturas. Os fêmures foram usados para medir densidade mineral óssea, microtomografia computadorizada (microCT), DEXA, imunistoquímica e Western blot.

2.4 Avaliação dos biomarcadores do turnover ósseo

As amostras de sangue (3 mL) foram coletadas e centrifugadas. O plasma foi separado por centrifugação (2256 x g; 15 min) e mantidos em temperatura de -20°C; soro foi separado do sangue total por centrifugação a 1000 x g, durante 10 min, acondicionado em tubos e estocado à temperatura de -20° C. Concentração plasmática de fosfatase alcalina (FAL) e sérica de fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) foram determinadas por protocolo adaptado de ensaio colorimétrico (Granjeiro *et al.*, 1997; Janckila *et al.*, 2005).

Brevemente, uma alíquota de 25 de μ L foi examinada em 0.5 mL da mistura de reação consistindo de 10 mM de p- nitrofenil fosfato (pNPP) (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA), 100 mM de sódio acetato (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA), pH 5.8, 50

mM sódio tartarato (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA) e 1 mM de p-hidroxi mercúrio benzoato (pHMB) (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA), o último age inibindo fosfatases de baixo peso molecular (Laidler *et al.*, 1982).

A reação foi iniciada adicionando o substrato e seguida por 1h em 37°C em banho-maria. O ensaio foi finalizado adicionando 0.25 mL de 1 M NaOH e a absorbância determinada em 405 nm para determinar a quantidade de p-nitrofenolato (pNP) formado durante a reação. Os controles sem enzima foram incluídos com cada ensaio para ajustar para hidrólise não enzimática de pNPP. Uma unidade da atividade da enzima é definida como a quantidade da enzima que é necessária para hidrolisar 1 µmol de pNPP por min em 37° C.

2.5 Análise de densitometria por absorção de raios-X de dupla energia

Os fêmures extraídos foram limpos com tecido leve mantidos congelados em -20°C. Para análise subsequente, os fêmures foram lentamente descongelados e mantidos imersos em solução salina até o teste. Para medições de densidade mineral óssea areal (DMOa), os fêmures foram posicionados no plano frontal e ântero-posterior na mesa do scanner, todos orientados da mesma forma, e foram completamente escaneados submersos em uma bacia com 2 cm de água, de acordo com as instruções do fabricante.

A DMOa dos fêmures foi amostrada utilizando absorção de raios-X de dupla energia (Lunar DPX Alpha, WI, USA) e software para análise óssea em pequenos animais. O equipamento foi calibrado conforme as instruções do fabricante. O mesmo investigador analisou todos os escaneamentos.

2.6 Microtomografia computadorizada

Utilizando dispositivo Skyscan 1172 (Skyscan, Leuven, Bélgica), foram feitas análise de microtomografia (microtomografia computadorizada [μ CT]) dos fêmures em 50 kV e 800 mA. Então, imagens de cada fêmur com 6 X 6 X 6 μ m foram analisadas posicionando-as em orientação craniocaudal. As imagens foram importadas para o software NRecon (Skyscan, Leuven, Bélgica) e convertidos para escala de cinza no formato *Digital Imaging and Communications in Medicine* (DICOM). O osso cortical e trabeculado do colo do fêmur foram obtidos quantificando o volume de interesse (VOI) de estruturas tridimensionais (3D) de todos os animais e extraíndo medições de cada grupo de dados no software *CT-Analyzer* (Skyscan, Leuven, Bélgica).

Utilizando a ferramenta de seleção de polígonos, foram definidos a área do osso cortical e trabeculado circundando a margem externa (cortical) e interna (trabecular) do colo do fêmur. Conseqüentemente, maior fidelidade para a área selecionada foi adquirida utilizando ferramenta de interpolação dinâmica.

Para as imagens binárias, nós asseguramos o uso apropriado do limiar dos valores de osso cortical e trabecular, os quais foram utilizados para todas as análises morfométricas subseqüentes. O processamento da imagem foi necessário para a análise 3D dos parâmetros morfométricos que influenciam nas propriedades mecânicas e estruturais. Estes parâmetros foram calculados utilizando o software *CT-Analyzer 3D* (Skyscan, Leuven, Bélgica) baseado em modelo de volume. A segmentação de cada colo femoral foi realizada utilizando o mesmo software.

Os parâmetros de mensuração e abreviações para análise morfométrica 3D do microCT foram: Osso cortical= área cortical total (Tt.Ar [mm^2]; área óssea cortical (Ct.Ar [mm^2]); fração da área cortical V/TV (Ct.Ar/ Tt.Ar [%]); espessura cortical média (Ct.Th [mm]); porosidade cortical (Ct.Po [%]); número de poros corticais (Po.N [n]) e momento de inércia polar (pMOI [mm^4]). Osso trabecular = fração do volume osso

(BV/TV [%]); espessura trabecular (Tb.Th [μm]); número trabecular (Tb.N [1/mm]); separação trabecular (Tb.Sp [μm]), grau de anisotropia [DA]) e porosidade trabecular (Tb.Po [%]).

2.7 Extração de proteína do fêmur

Os ossos foram macerados em nitrogênio líquido, e em seguida foi adicionado o tampão de extração de proteínas CellLytic (Sigma) contendo inibidores de fosfatases e proteases. Os tecidos foram rompidos com tissue ruptor (Qiagen), e sonicados 5 vezes. Em seguida o lisado foi centrifugado por 30 min a 4°C à 20.000xg. O sobrenadante foi transferido para um tubo novo e as proteínas foram quantificadas por Bradford (Bradford, 1976).

2.8 Western Blot

Amostras de proteínas (40 a 100 μg) foram separadas por SDS-PAGE em gel 8-a 15% (Laemmli, 1970). Foi utilizado o sistema vertical de eletroforese Mini-PROTEAN® (Bio-Rad Laboratories) conforme instruções do fabricante. Utilizou - se padrão de massa molecular para proteínas *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder* (26619, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). As seguintes condições de eletroforese foram configuradas: amperagem constante de 12 mA/gel e voltagem limite de 110 V durante 90 a 120 minutos. A corrida foi realizada em tampão de eletroforese Tris-glicina (Tris 25 mM, glicina 250 mM, SDS 0,1%, pH 8,3). Em seguida as proteínas foram eletrotransferidas para membranas de PVDF (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido), com tampão de transferência de bicarbonato (bicarbonato de sódio 10 mM e carbonato de sódio 3,0 mM, pH 9.9) ou com tampão de eletroforese Tris-glicina com metanol (Tris 12 mM, glicina 96 mM e 20% metanol)

para a transferência de proteínas de alta massa molecular, por 90 minutos a 350 mA/gel. Após a transferência, a membrana foi incubada em solução de bloqueio (solução de leite desnatado 5% em solução salina tamponada de Tris-TBS/T-Tris.Cl 25 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1%) por uma hora a temperatura ambiente. Após bloqueio, a membrana foi lavada 3x com TBS/T durante 5 minutos e incubada com o anticorpo primário em TBS/T, na diluição específica para cada anticorpo (Tabela 1) *overnight* a 4°C. A seguir, a membrana foi novamente lavada 3x com TBS/T durante 5 minutos, três vezes, e incubada por uma hora com o anticorpo secundário conjugado à peroxidase diluído em solução de bloqueio, seguido de lavagem com TBS/T e visualização de quimioluminescência utilizando o sistema ECL Western Blotting Detection Kit (GE HealthCare). A membrana de PVDF foi exposta a filme para Raio-X Ortho CP-G Plus (AGFA), com auxílio de um cassete para exposição da membrana ao filme. Posteriormente, as intensidades das bandas foram medidas utilizando-se software ImageJ (National Institutes of Health - EUA). Informações sobre os anticorpos utilizados estão dispostas na tabela 1 abaixo.

Tabela 1: Descrição dos anticorpos utilizados, origem, diluição e empresas fornecedoras.

Anticorpo	Código	Origem	Diluição	Fabricante
Beclina – 1	(#3495)	rabbit	1:1000 BSA 5%	Cell Signaling Technology
pAKT ser 473	(#4058)	rabbit	1:1000 BSA 5%	Cell Signaling Technology
AKT	(#9272)	rabbit	1:1000 BSA 5%	Cell Signaling Technology
pERK1/2 (Thr202/Thr204)	(#4377)	rabbit	1:1000 BSA 5%	Cell Signaling Technology
ERK1/2	(M5670)	rabbit	1:6000 BSA 5%	Sigma-Aldrich Corporation
SQSTM/p62	(SC 28359)	mouse	1:1000 BSA 5%	Santa Cruz Biotechnology
LC3	(#3868)	rabbit	1:1000 em TBS – T 0,1% Tween TBS	Cell Signaling Technology
B - actina	(sc 47778)	mouse	1:4000 em TBS – T1X	Santa Cruz Biotechnology

2.9 Imunoistoquímica

Para a análise imunoistoquímica os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol e hidratados em série decrescente de etanol (100° - 100° - 100° - 90° - 70° GL). A recuperação antigênica foi realizada através da imersão das lâminas histológicas em tampão citrato (Diva decloaker[®], Biocare Medical, Concord, CA, EUA), em câmara pressurizada (Decloaking chamber[®], Biocare Medical, Concord, CA, EUA) a 95°C, por 20 minutos. No final de cada etapa da reação imunoistoquímica, as lâminas histológicas foram lavadas em PBS 0,1 M, pH 7,4. Posteriormente, as lâminas foram imersas em 3% de peróxido de hidrogênio por 1 hora e 1% de soro albumina bovino por 12 horas para bloqueio da peroxidase endógena e bloqueio dos sítios inespecíficos, respectivamente. As lâminas contendo amostras de cada grupo experimental foram divididas em quatro lotes, e cada lote foi incubado com um dos seguintes anticorpos primários: anti-RUNX-2 do rato gerado em coelho (SC-10758, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), anti-OCN do rato gerado em cabra (SC-18319, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), anti-FAL do rato gerado em cabra (SC-30833, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), anti-TRAP (SC-30833; 1:200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) e anti-BCN do rato gerado em coelho (D40C5, Cell Signaling, Cell Signaling Technology, 3 Trask Lane Danvers, MA 01923). Os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotinilado por 2 horas e subsequentemente tratados com estreptavidina conjugada com peroxidase da raiz forte-HRP por 1 hora (Universal Dako Labeled HRP Streptavidin-Biotin Kit[®], Dako Laboratories, CA, EUA). As revelações foram realizadas utilizando como cromógeno o 3,3'-tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB chromogen Kit[®], Dako Laboratories, CA, EUA). Foi realizada a contracoloração com *Fast Green*, para RUNX-2, e com *Hematoxilina de Harris*, para OCN, ALP e BCN, e

em seguida a desidratação em etanol, diafanização em xilol e, recobrimento com meio de montagem (Permount, Fisher Scientific, San Diego, CA, USA) e lamínulas de vidro. Como controle negativo, os espécimes foram submetidos aos procedimentos descritos anteriormente suprimindo-se a utilização do anticorpo primário.

2.10 Análise estatística

Os resultados foram apresentados utilizando – se os valores da média \pm EPM e as comparações múltiplas foram realizadas por análise de variância (ANOVA) a dois critérios, seguida de pós-teste de Tukey. O nível de significância utilizado foi de $p < 0,05$ para todas as comparações. Para avaliação dos resultados de IHQ, foi realizado teste de Kruskal-Wallis não paramétrico seguida por pós-teste de Newman-Keuls e nível de significância utilizado de $p < 0,05$ para todas as comparações. As análises estatísticas foram realizadas utilizando GraphPadPrism (versão 6.01, GraphPad Software, Inc).

RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1 Redução da massa corporal e aumento na capacidade de carregamento voluntário de ratas na periestro pausa após treinamento de força

Para avaliar possíveis alterações nos parâmetros corporais dos animais experimentais foram realizadas pesagens da massa corporal, útero e tecido adiposo. Os animais adultos, exercitados ou não, apresentaram aumento na composição corporal durante o período experimental. Entretanto, ratas velhas NEX demonstraram maior composição corporal em relação aos animais de mesma idade e que realizaram TF (Fig. 3). O teste CCVM realizado com animais dos grupos AEX e VEX demonstrou aumento de carga entre o primeiro e o terceiro mês de teste. Entre o terceiro e quarto, nenhum ganho de carga foi observado (Fig. 1B). Não houve interação significativa da idade e TF para o teste de CCVM.

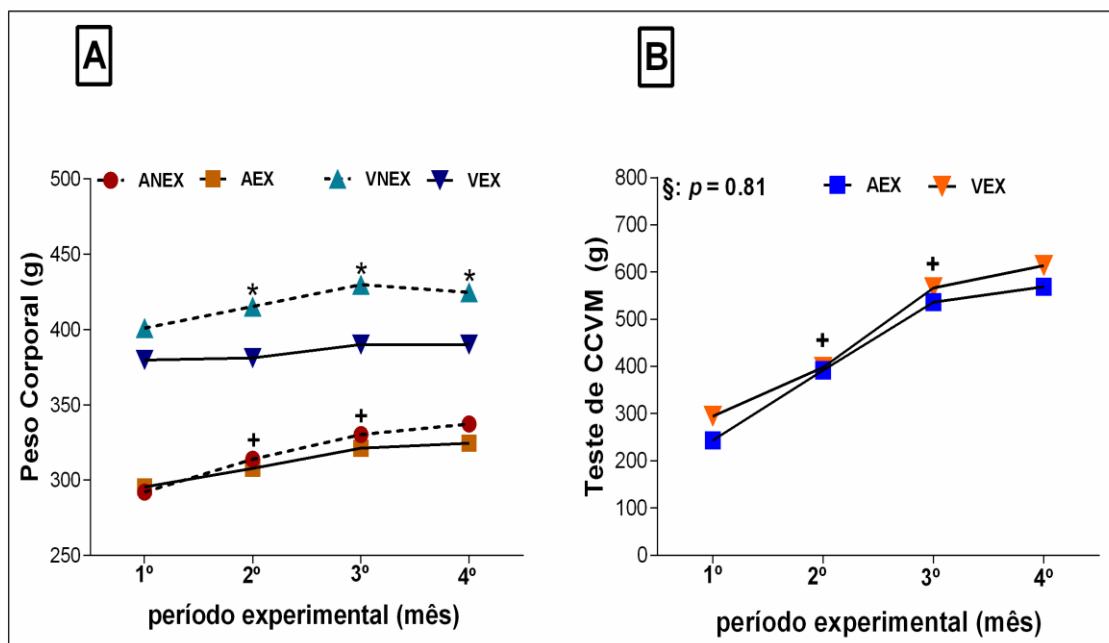


Fig.3: Peso corporal e Capacidade de Carregamento Voluntário Máximo (CCVM). O peso corporal de ratas fêmeas adultas e velhas as quais fizeram ou não treinamento de força durante o período experimental (A). Demonstração da progressão da carga de treinamento em teste de capacidade de carregamento voluntário máximo (CCVM) realizado durante os meses de experimento (B). Resultados foram expressos por média \pm EPM; Análise estatística foi feita com ANOVA (One-way; GraphPad Prism 6.0), seguido de teste *post-hoc* de Tukey ($p < 0.05$) para analisar o efeito do treinamento de força (TF) e quaisquer interações (TF \S Idade). Abreviações e símbolos: ANEX= adulta

não exercitada; AEX= adulta exercitada; VNEX= velha não exercitada; VEX= velha exercitada; 8-10 animais por grupo. *vs VEX no mesmo período experimental; + vs mês anterior no mesmo grupo de animais.

Adicionalmente, não foram observadas diferenças significantes no peso do útero entre os animais ($p > 0,05$). O tecido adiposo extraído da região retroperitoneal demonstrou diferenças significantes entre as ratas velhas e adultas. Ratas VNEX apresentaram maior adiposidade comparadas à ANEX ($p = 0,0050$) e AEX ($p = 0,0036$) [Fig. 4]. Não houve interação significativa entre idade e TF para composição corporal, útero e tecido adiposo.

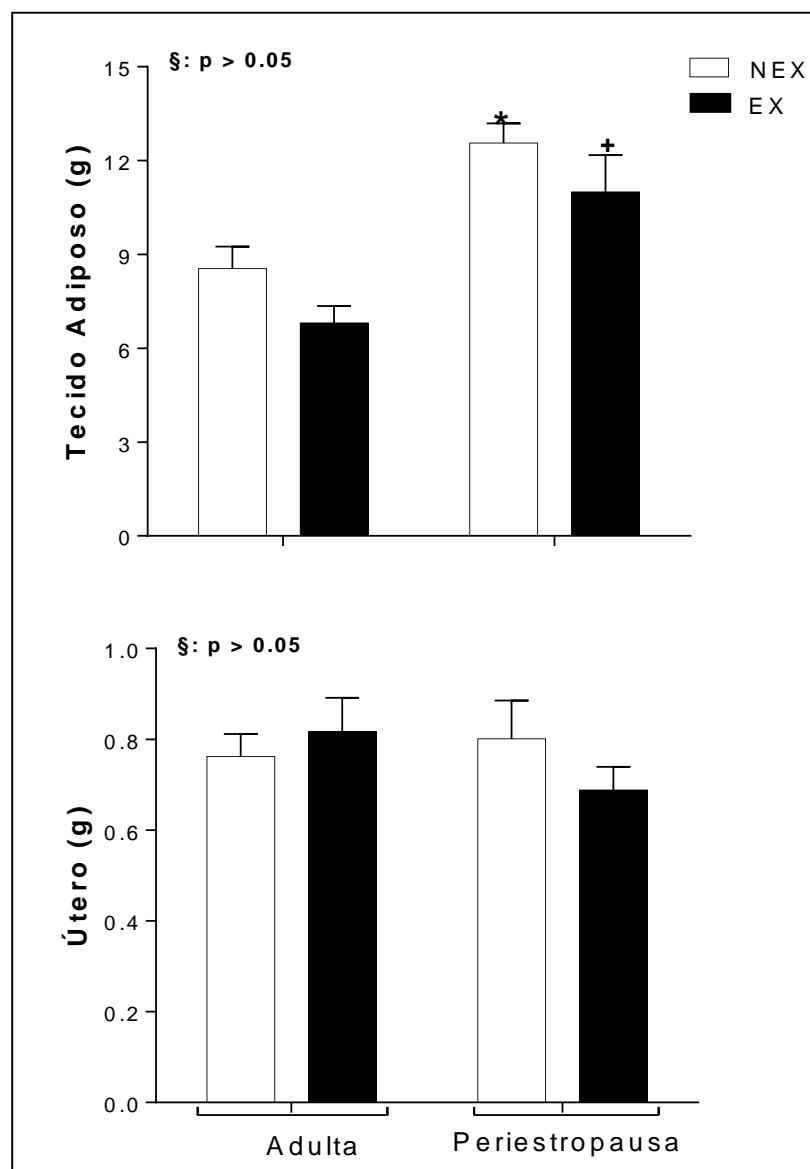


Fig. 4. Peso do tecido adiposo e útero de ratas adultas e na peri menopausa que realizaram ou não treinamento de força. Valores representam média \pm SEM. ANEX = adultas não exercitadas; AEX = adultas exercitadas; VNEX = velhas não exercitadas; VEX = velhas exercitadas; * $p < 0,05$ vs ANEX; † $p < 0,05$ vs AEX.

3.2 Análise de biomarcadores do *turnover* ósseo

As concentrações plasmáticas e séricas dos biomarcadores ósseos FAL e TRAP foram avaliadas utilizando-se ELISA. Dados obtidos revelam que os animais do grupo A/EX obtiveram maior atividade de FAL quando comparado ao controle ($p = 0,0002$; Fig. 5A). A interação idade e TF é considerada extremamente significativa ($p = 0,0005$). Diferentemente, as ratas V/EX apresentaram reduzida atividade de FAL quando comparado à do grupo A/EX ($p < 0,0001$). As medições para TRAP não demonstraram diferenças significantes.

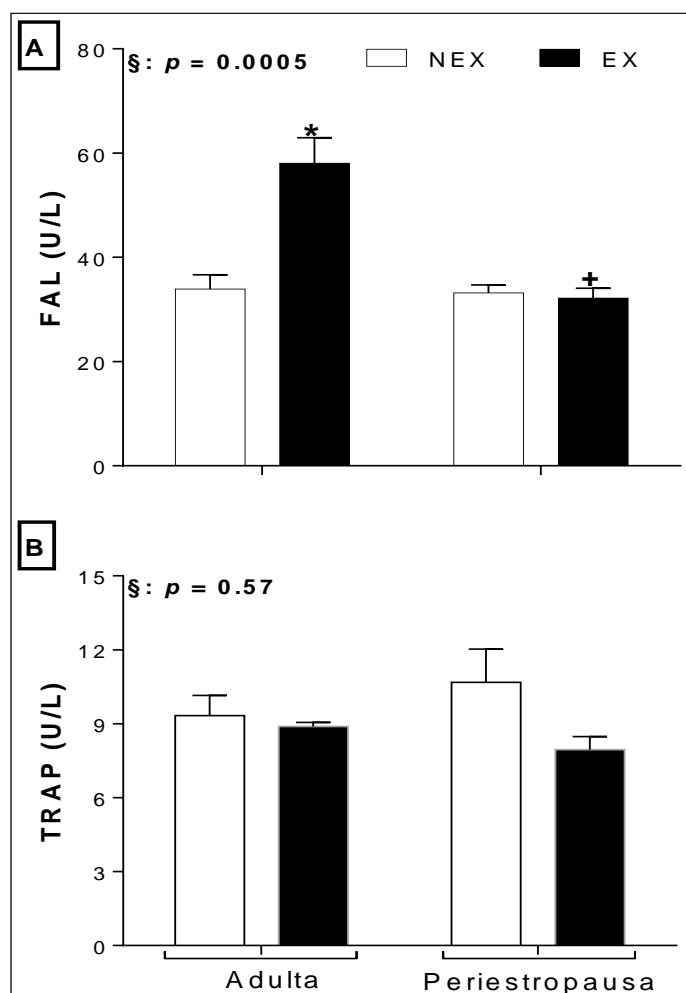


Fig. 5. Concentração de fosfatase alcalina (A) e fosfatase ácida resistente à tartarato (B). Fosfatase alcalina e TRAP de ratas adultas e na peri menopausa exercitadas e não exercitadas por treinamento de força durante o período experimental. Os resultados foram expressos por média \pm SEM. Análise estatística foi feita com ANOVA (Two-way; GraphPad Prism 6.0), seguido de teste *post-hoc* de Tukey ($p < 0,05$) para analisar o efeito do treinamento de força (TF) e quaisquer interações (TF \times Idade). Abreviações e símbolos: ANEX= adulta não exercitada; AEX= adultas + treinamento de força; VNEX= velhas não exercitadas; VEX= velhas exercitadas; 8-10 animais por grupo. * $p = 0,0002$ vs A/NEX; + $p < 0,0001$ vs AEX.

3.3 Densitometria por absorção de raios-X de dupla energia

Análise total do fêmur por absorção de raios-X de dupla energia foi realizada para analisar DMOa. Os animais alocados no grupo A/EX exibiram DMOa mais alta do que os A/NEX ($p = 0,0008$). Por outro lado, o grupo V/EX demonstrou perfil oposto, com DMOa mais baixa do que seus controles sedentários ($p = 0,0002$) e também quando comparado à A/EX ($p < 0,0001$). Como demonstrado na figura 6, ANOVA two-way demonstrou interação significativa entre idade e TF em relação à DMOa ($p = 0,0001$).

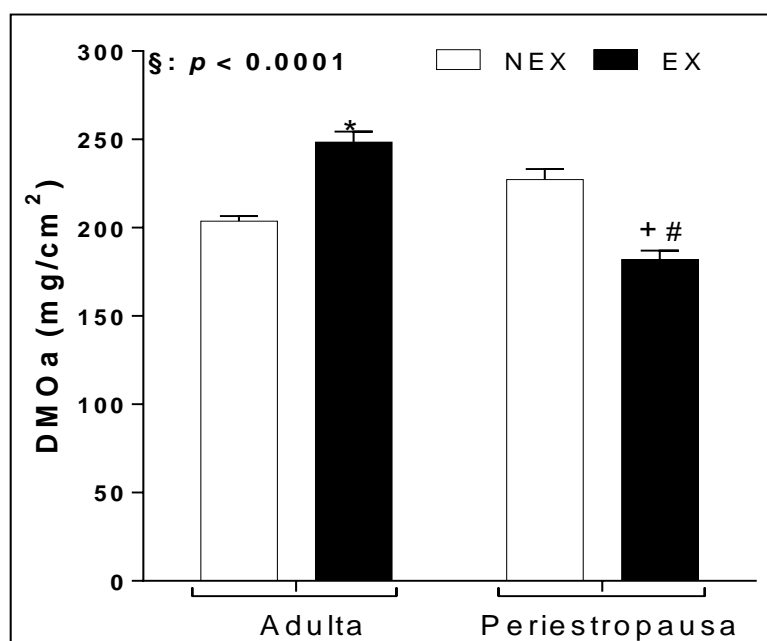


Fig. 6. Densidade mineral ósseo areal *ex vivo*. Fêmures de ratas adultas e adultas e na periostropausa que fizeram ou não treinamento de força durante período experimental foram analisados utilizando-se absormetria por emissão de raios-X de dupla energia e software para análise óssea em animais pequenos. Análise estatística foi efetuada com ANOVA (*Two-way*; GraphPad Prism 6.0), seguido por teste *post-hoc* de Tukey ($p < 0,05$) para analisar o efeito do treinamento de força (TF) e quaisquer interações (TF § Idade). Abreviações e símbolos: ANEX = ratas adultas não exercitadas; AEX = ratas adultas + treinamento de força; VNEX = ratas velhas não exercitadas; VEX = ratas velhas + treinamento de força; 8 – 10 animais por grupo. * $p < 0,0001$ vs ANEX; + $p < 0,0001$ vs AEX; # $p < 0,0002$ vs VNEX.

3.4 Osso cortical e trabecular do colo do fêmur demonstra responsividade à tensão mecânica após o treinamento de força em 120 dias.

As imagens da região de interesse (ROI) obtidas por microtomografia computadorizada, demonstrando o osso cortical e trabeculado das ratas adultas e velhas estão representadas na figura 7 (modelo em 2 dimensões) e na figura 8 (modelo em 3 dimensões).

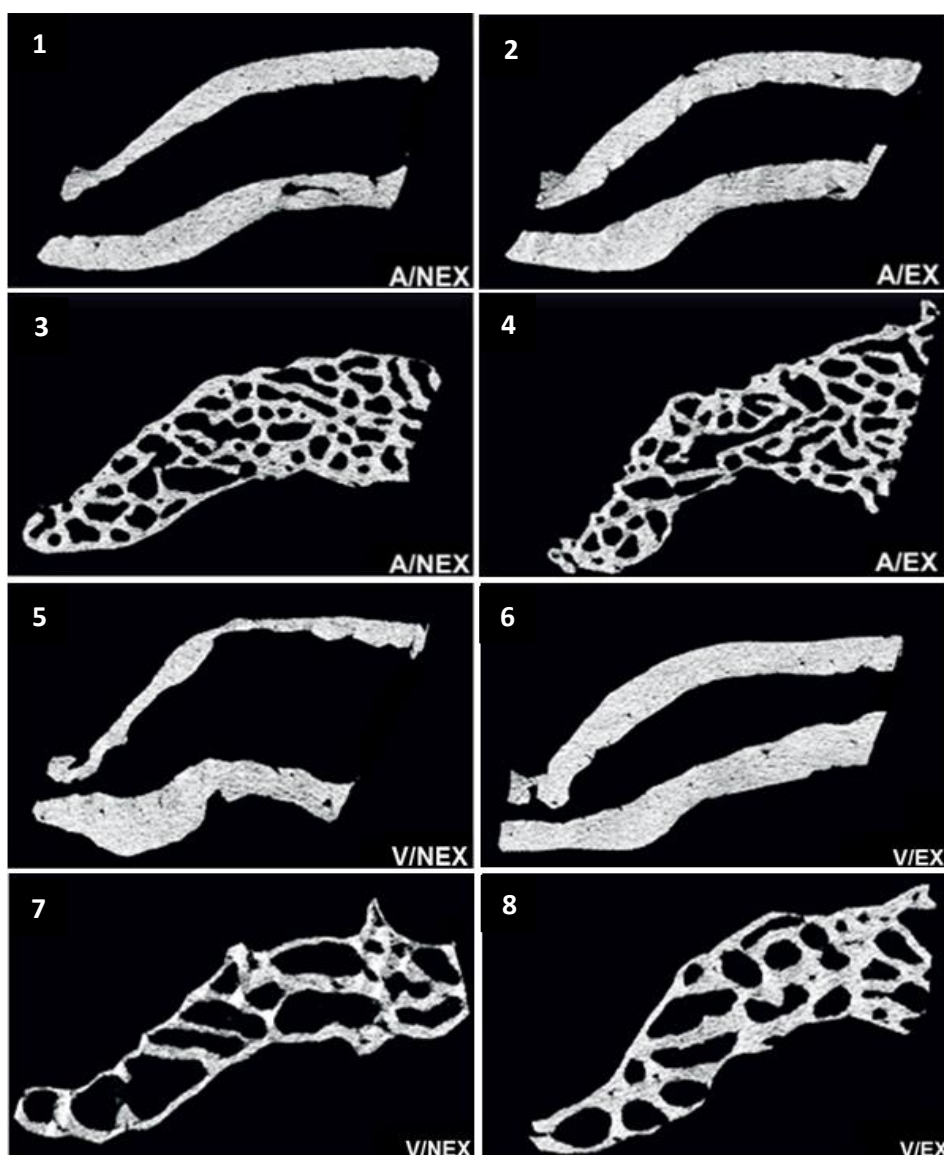


Fig.7: Representação em 2D do colo do fêmur de ratas Wistar adultas (1-4) e no período do envelhecimento (5-8). Região cortical e trabecular do colo do fêmur de animais adultos (1 e 3) e na periostropausa (5 e 7) que não realizaram TF; região cortical e trabecular do colo do fêmur após o TF de animais adultos (2 e 4) e na periostropausa (6 e 8).

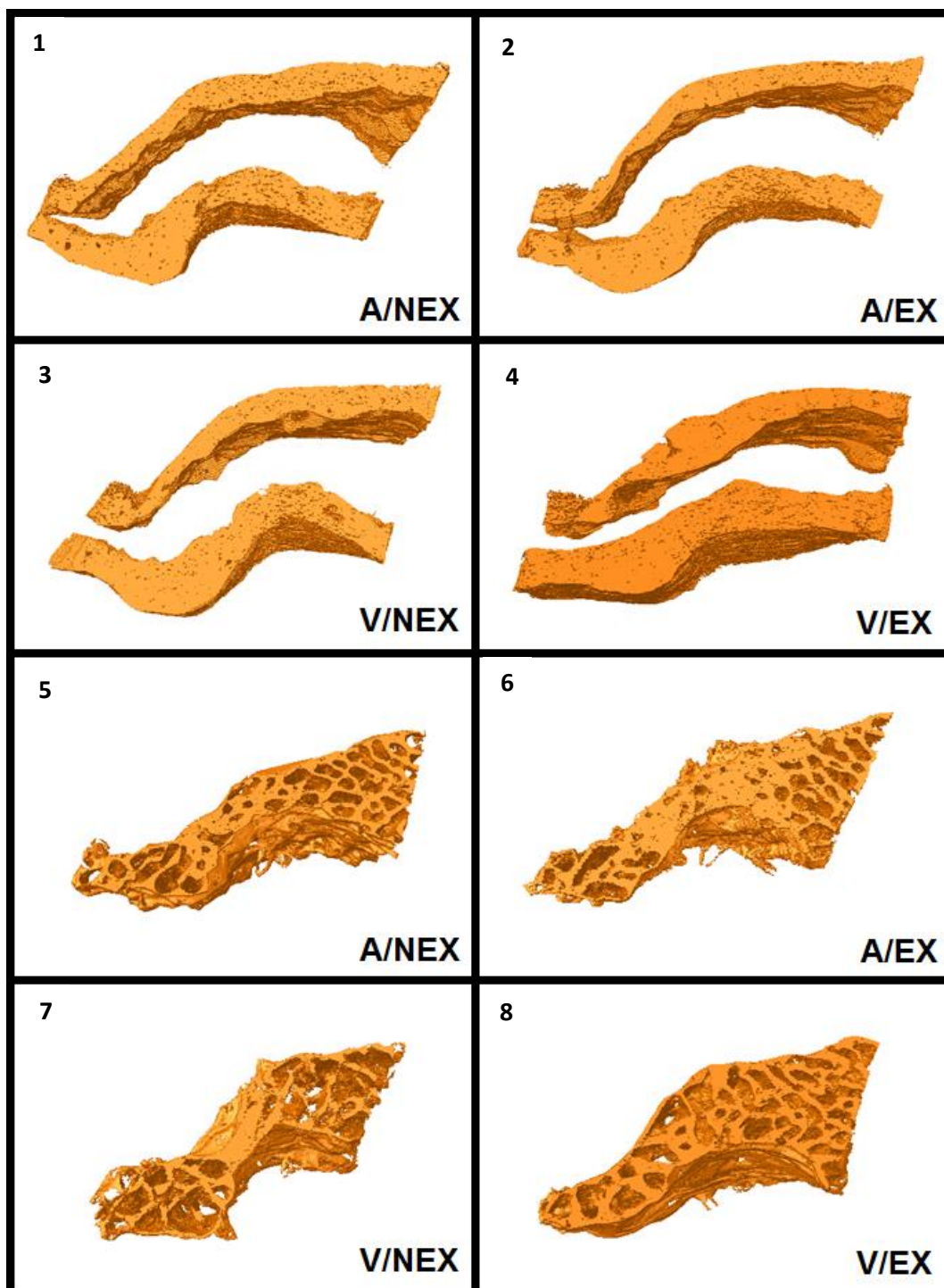


Fig.8: Representação em 3D do colo do fêmur de ratas Wistar adultas (1, 2, 5 e 6) e no período do envelhecimento (3, 4, 7 e 8). Região cortical e trabecular do colo do fêmur de animais adultos (1 e 5) e na periostropausa (3 e 7) que não realizaram TF; região cortical e trabecular do colo do fêmur após o TF de animais adultos (2 e 6) e na periostropausa (4 e 8).

As análises da microarquitetura óssea cortical e trabecular do colo dos fêmures de ratas Wistar adultas e na periostropausa, após a realização de TF, estão apresentadas graficamente nas figuras 8 e 9, respectivamente.

A microarquitetura óssea cortical *ex vivo* do colo do fêmur (Fig. 9) das ratas adultas que realizaram TF quando comparado com as ratas adultas que não realizaram TF, apresentou diferença significativa no momento de inércia polar médio (pMOI). Ressaltamos que nos demais parâmetros analisados (Ct.Ar/Tt.Ar, Tt.Ar, Ct.Ar, Ct.Po e Ct.Th), não foram detectadas diferenças significantes entre os animais adultos. Entretanto, as ratas na periostropausa que realizaram TF apresentaram aumento na área cortical total (Tt.Ar; $p = 0,0035$) e pMOI bem como diminuição na porosidade cortical (Ct.Po) quando comparado às ratas do grupo V/NEX. A comparação da espessura cortical média (Ct.Th) entre ratas adultas e velhas evidenciou que esse parâmetro é maior nas ratas velhas que realizaram ou não TF.

A análise do osso trabecular (Fig.10) de ratas adultas não evidenciou diferenças significantes entre A/NEX e A/EX. Nas ratas velhas foi detectado aumento da fração óssea (BV/TV; $p = 0,0033$), número trabecular (Tb.N; $p = 0,0004$) e espessura trabecular (Tb.Th; $p = 0,0069$) em comparação às ratas do grupo V/NEX. O maior número de trabéculas nas ratas V/EX resultou em menor separação trabecular (Tb.Sp), a qual também contribuiu para diminuir a área medular óssea. Destacamos a menor porosidade trabecular (Tb.Po) nas ratas velhas após o TF comparadas as ratas VNEX ($p = 0,0006$). Quando comparamos as ratas adultas e velhas não exercitadas, verificamos menor BV/TV e Tb.N e maior Tb.Po e Tb.Sp nas ratas velhas (Fig. 10). Estes resultados foram revertidos nas fêmeas velhas após a realização do TF. Two-way ANOVA demonstrou interação significativa entre idade e TF em relação à BV/TV ($p = 0,0009$), Tb.Th ($p = 0,0003$), Tb.N ($p = 0,0011$), Tb.Po ($p = 0,0010$) e DA ($p = 0,0179$).

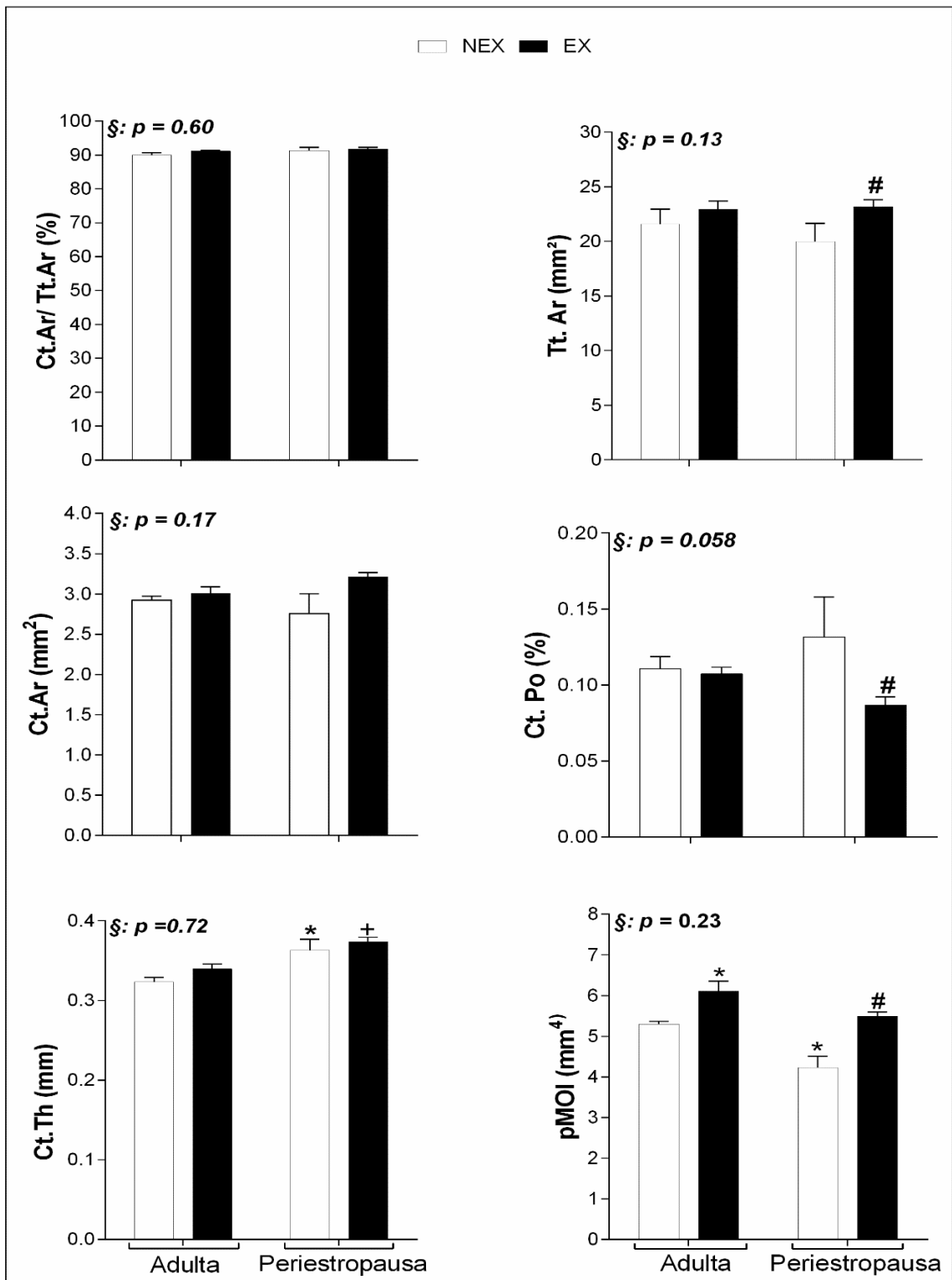


Fig 9. Microarquitetura óssea cortical *ex vivo*. A área cortical total (Tt.Ar), área óssea cortical (Ct.Ar), fração da área cortical (Ct.Ar/Tt.Ar), espessura cortical média (Ct.Th), porosidade cortical (Ct. Po) e momento de inércia polar médio (pMOI) do colo do fêmur de ratas adultas e velhas que fizeram ou não treinamento de força durante período experimental foram obtidos por microtomografia computadorizada. Análise estatística foi feita com ANOVA (Two-Way; GraphPad Prism 6.0), seguido por teste *post-hoc* de Tukey ($p < 0.05$) para analisar o efeito do treinamento de força (TF) e quaisquer interações (TF \times Idade). Abreviações e símbolos: ANEX= ratas adultas não exercitadas; AEX= ratas adultas + treinamento de força; VNEX = ratas velhas não exercitadas; VEX= ratas velhas + treinamento de força; 8-10 animais por grupo. * $p < 0,05$ vs ANEX; # $p < 0,05$ vs VNEX; + $p < 0,05$ vs AEX;

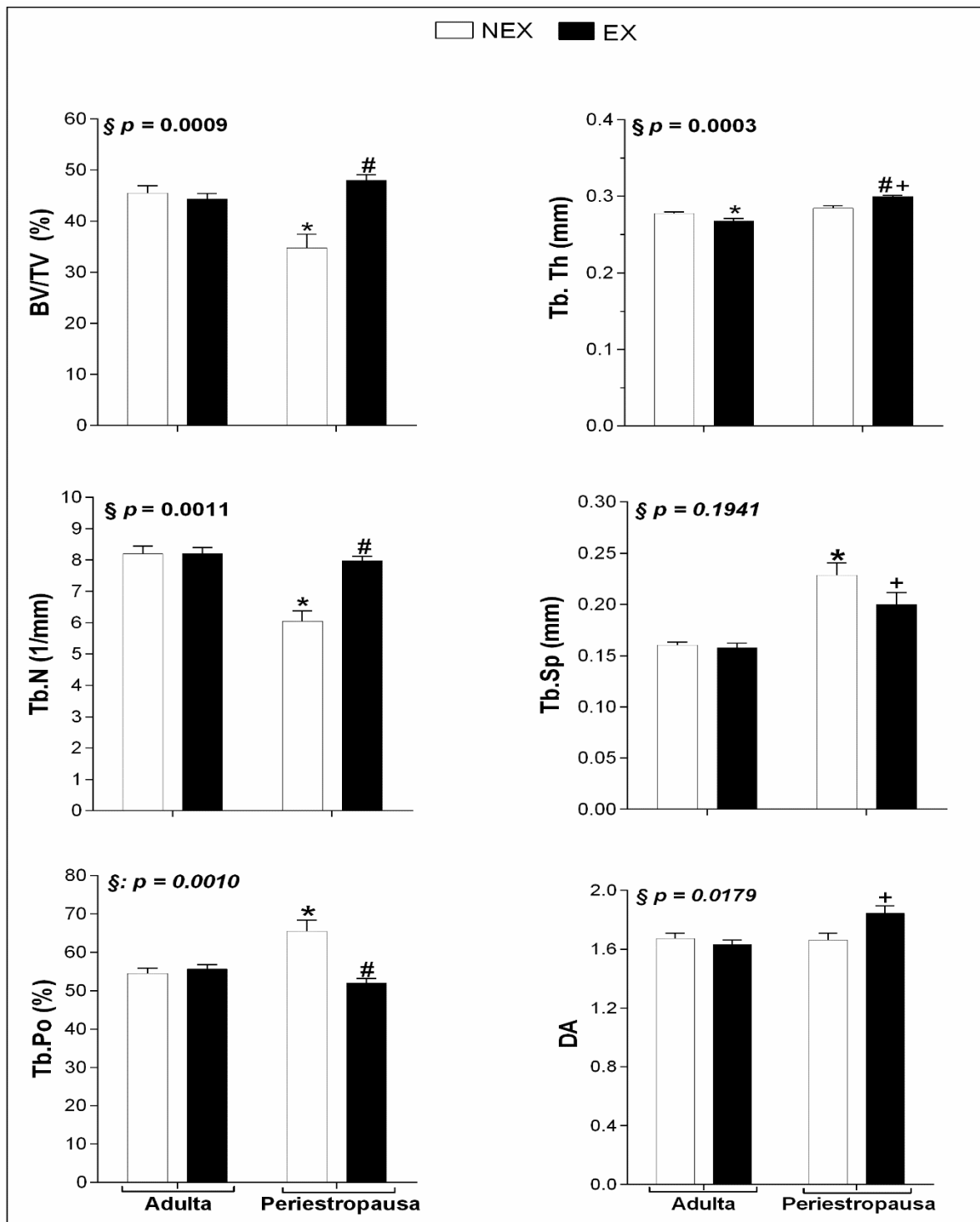


Fig. 10 Microarquitetura óssea trabecular *ex vivo*. O volume da fração óssea (BV/TV), espessura trabecular (Tb.Th), número trabecular (Tb.N), separação trabecular (Tb.Sp), porosidade trabecular (Tb.Po) e grau de anisotropia (DA) do colo do fêmur de ratas adultas e velhas que fizeram ou não treinamento de força durante período experimental foram obtidos por microtomografia óssea. Análise estatística foi feita com (Two-way; GraphPad Prism 6.0), seguido por teste *post-hoc* de Tukey ($p < 0.05$) para analisar o efeito do treinamento de força (TF) e quaisquer interações (TF § Idade). Abreviações e símbolos: A/NEX= ratas adultas não exercitadas; A/EX= ratas adultas + treinamento de força; V/NEX = ratas velhas não exercitadas; V/EX= ratas velhas + treinamento de força; 8-10 animais por grupo. * $p < 0,05$ vs A/NEX; + $p < 0,05$ vs A/EX; # $p < 0,05$ vs V/NEX.

3.5 Quantificação, por western blotting, de proteínas envolvidas na via de sinalização de AKT total, pAKT, ERK 1/2 total, pERK (Tyr202) e pERK(Thr204) de ratas após a realização do TF

Foram amostradas através de análise por Western Blot as atividades de proteínas-chave como AKT e ERK1/2 e suas porções fosforiladas p-AKT (Ser473), p-ERK (Thr202/Tyr204) respectivamente (Fig. 11). As intensidades das bandas para cada proteína amostrada foram medidas utilizando-se software específico Image-J (National Institutes of Health). A influência do TF foi suficientemente capaz de modular a expressão de AKT e p-AKT em ratas adultas submetidas à treinamento de força quando comparadas à A/NEX, aumentando a sua expressão. Nas ratas em periostropausa, não foi detectada modificação em AKT na sua forma total após a realização do TF. Entretanto, a porção fosforilada da AKT (Ser473) apresentou quantificação maior nas ratas peristropausadas quando comparada com as ratas adultas e após a realização do TF foi detectado redução na fosforilação de AKT em Ser473 se comparados à A/EX e V/NEX. A análise da expressão ERK 1/2, por Western blot, demonstrou a não ocorrência de alteração expressiva na quantidade de ERK1/2 total avaliada entre os grupos experimentais adultos. Nos animais velhos, a quantificação evidenciou maior expressão de ERK 1/2 após a realização do TF em relação à V/NEX. Em relação aos resíduos passíveis de fosforilação de ERK 1/2, houveram alterações diferentes das observadas em seu perfil total e entre os grupos experimentais. Em ratas adultas exercitadas em ambos resíduos Thr202 e Tyr204 houve aumento da fosforilação, quando se compara ratas as quais não fizeram TF. O que se contrapõe à tendência de redução em sua forma total. Contrariamente, em V/EX a fosforilação dos resíduos analisados foi expressivamente reduzida em comparação à V/NEX e A/EX (Fig. 11-12).

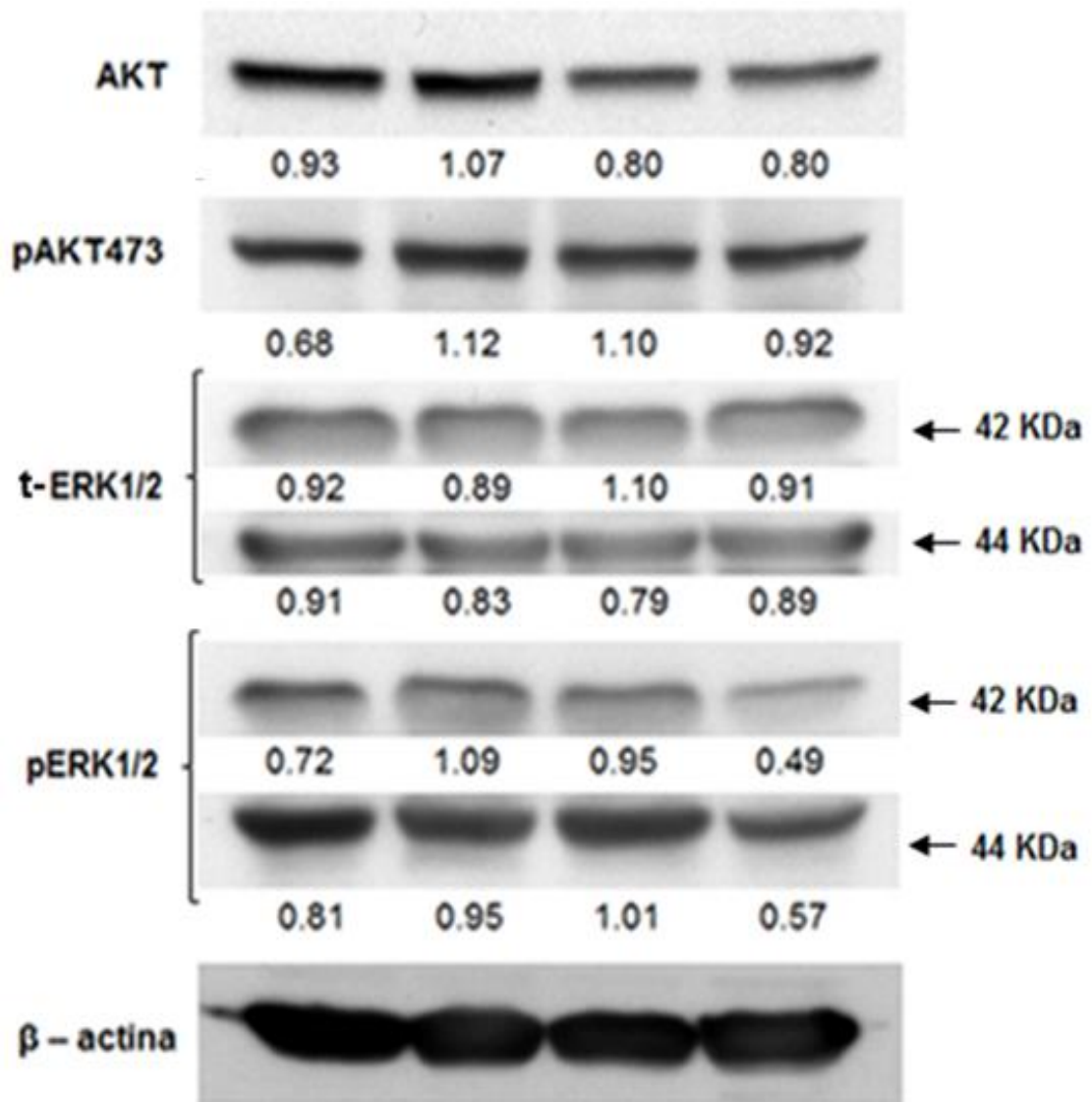


Fig.11: Marcadores metabólicos. Determinação das proteínas AKT, pAKT, ERK1/2, pERK1/2, do fêmur de ratas adultas e velhas que realizaram (A/EX; V/EX) ou não treinamento de força (A/NEX; V/NEX) durante 120 dias.

3.6 Quantificação, por western blotting, das proteínas Beclina-1, LC3-I/II e SQSTM-1/p62 envolvidas na via de sinalização da autofagia das células ósseas de ratas após a realização de TF

Foram analisadas também os marcadores autofágicos beclina-1, LC3-I/II e SQSTM-1/p62. Em nosso estudo, a expressão de beclina-1 foi maior em ratas adultas que realizaram TF em comparação as que não realizaram treinamento. Também em ratas na periestropausa e que fizeram TF, houve elevação de sua expressão quando comparada à ratas que não fizeram TF, de modo que suas expressões ficaram próximas ao observado nas ratas do grupo A/EX. Analisando os resultados representativos para LC3 I (citoplasmática) e II (conjugada a membrana do autofagossomo ou lipidada), pode-se observar que tanto em sua forma citoplasmática quando em sua forma lipidada, houve maior expressão em A/EX quando comparadas à A/NEX. Em V/EX pode-se observar redução na expressão desta proteína em relação à A/EX e V/NEX. De maneira geral, grupos A/NEX e V/EX possuem menor expressão de LC3 I/II do que grupos A/EX e V/NEX. Em p62 foi possível amostrar redução de sua expressão quando comparando A/NEX e V/NEX, sendo a redução mais acentuada após a realização do TF tanto em ratas adultas quanto nas periestropausadas.

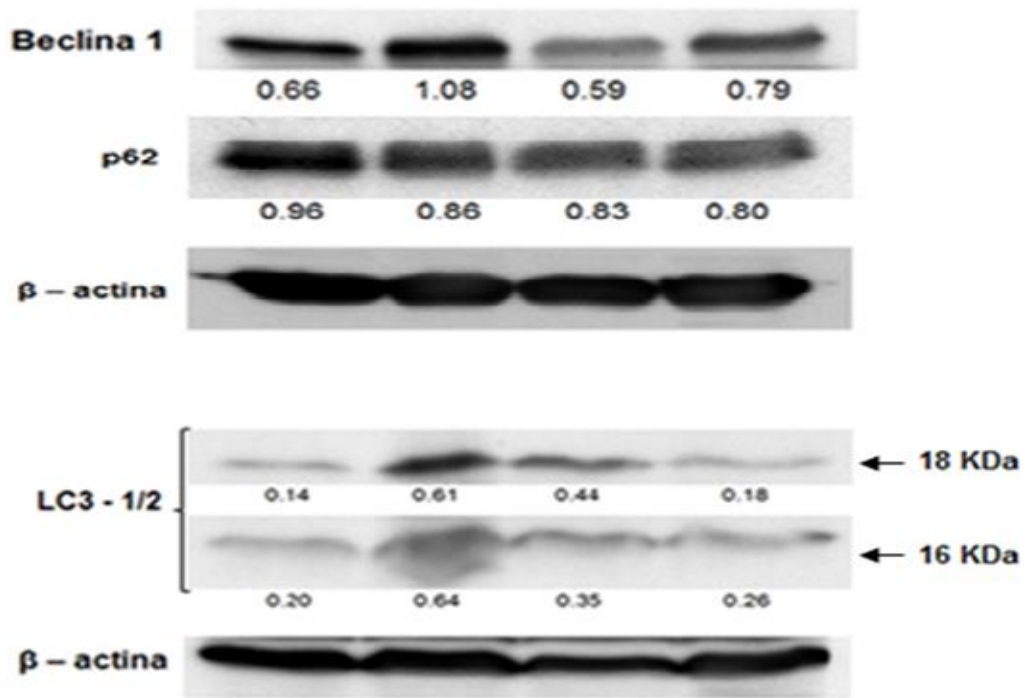


Fig.12: Marcadores autofágicos. Determinação das proteínas Beclina -1, LC3 1/2 e SQSTM-1/p62 do fêmur de ratas adultas e velhas que realizaram (A/EX; V/EX) ou não treinamento de força (A/NEX; V/NEX) durante 120 dias.

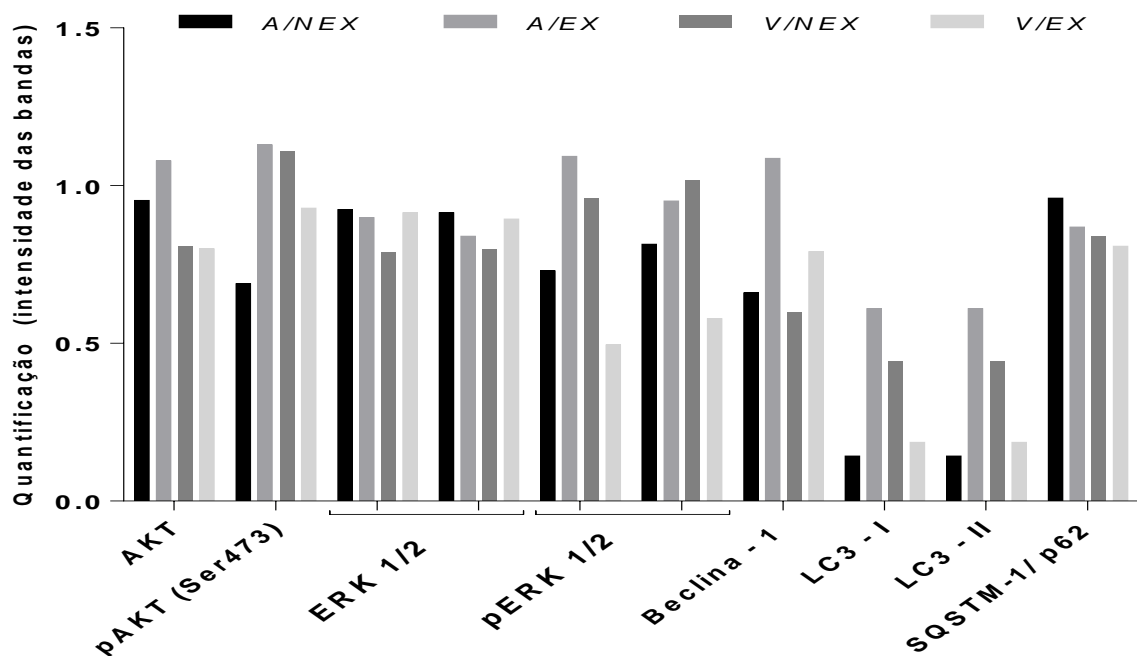


Fig. 13: Análise por Western blot realizado para avaliar a expressão e atividade representativa de proteínas do fêmur de ratas adultas e velhas que realizaram (A/EX; V/EX) ou não treinamento de força (A/NEX; V/NEX) durante 120 dias. Gráficos em barra representam valores de intensidade de banda.

4. Imunomarcção para RUNX-2, FAL, OCN e beclina-1 no colo do fêmur após TF no período do envelhecimento

Para verificar as alterações no colo do fêmur das ratas que realizaram ou não TF foram realizadas marcações imunoistoquímicas para RUNX-2, FAL, TRAP, OCN e beclina-1 (Fig. 13). As imunomarcações para RUNX-2 não demonstraram alterações significantes quando analisadas entre os grupos de ratas adultas. Por outro lado, nas ratas no período da periostropausa apresentaram imunomarcção reduzida deste fator de transcrição, o qual é fundamental para a diferenciação de osteoblastos. A análise realizada nos fêmures das ratas periostropausadas e que realizaram o TF, evidenciou aumento de imunomarcção de RUNX-2, equivalente à detectada no animal adulto. Similarmente, o grupo A/EX quando comparadas às que não fizeram TF (A/NEX) possuíram marcação elevada para FAL no colo do fêmur. Resposta similar foi constatada para ratas periostropausadas que realizaram TF em relação à V/NEX, o que sugere maior mineralização no colo femoral do grupo V/EX. Visto que marcação elevada para RUNX-2 e FAL foram observadas, o que constata perfil pró-formação óssea, nós hipotetizamos que possivelmente o TF também pudesse influenciar a marcação para OCN, importante regulador da mineralização e da homeostase de íons cálcio. Nossos resultados demonstram que o hipoestrogenismo causado pelo avanço da idade reduziu as concentrações de OCN quando observados comparativamente entre A/NEX e V/NEX. Após a intervenção do TF, observou-se que A/EX foi mais responsivo para a marcação de OCN no colo do fêmur quando comparada à A/NEX, mas o TF também participou no aumento da imunomarcção em ratas do grupo VEX em relação à V/NEX. Adicionalmente, como descrito previamente no início deste trabalho, foi objetivado também avaliar o comportamento molecular possivelmente alterado pelo TF na autofagia. Para tal averiguação, foi feita

marcação para beclina-1, proteína esta que está envolvida na regulação autofágica e morte celular. Os resultados obtidos mostram que em ambos os grupos EX independentemente da idade, o TF elevou as marcações para beclina-1 de maneira muito significativa.

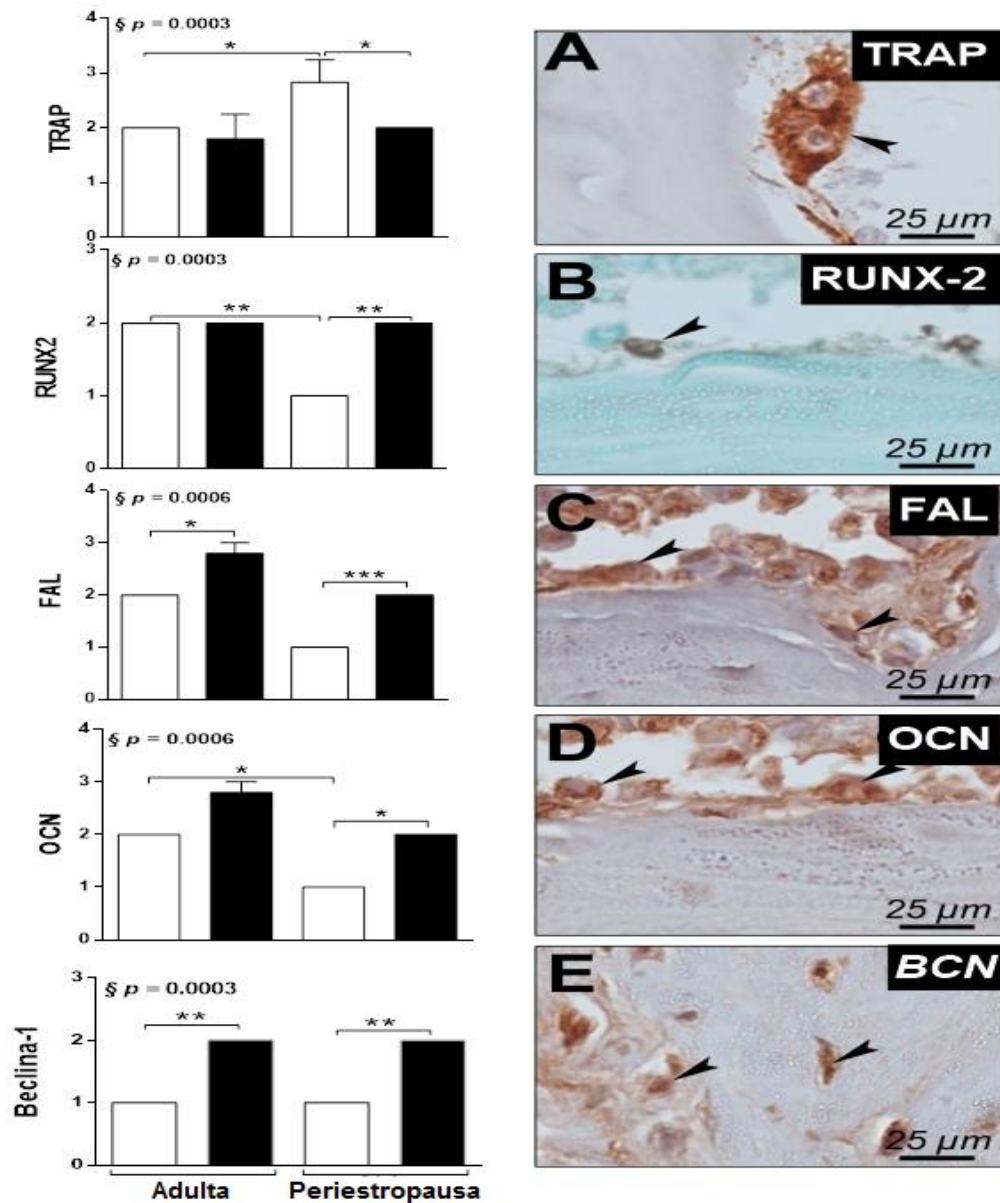


Fig 13: Imunoistoquímica para TRAP, RUNX-2, FAL, OCN e Beclina-1. Gráficos demonstrando valores obtidos por imunomarcção para TRAP, RUNX-2, OCN e Beclina-1 na região óssea cortical e trabecular do colo do fêmur de ratas adultas e na periostropausa que não realizaram TF (barras claras) e que realizaram TF no período de 120 dias (barras escuras). Cada coluna representa média \pm erro padrão da média (EPM). Análise estatística realizada com teste não-paramétrico Kruskal-Wallis, seguido por pós-teste de Newman-Keauls. Fotomicrografias mostrando osteoclastos TRAP-positivos (A), osteoblastos RUNX2-positivos (B), osteoblastos FAL-positivos (C), osteoblastos OCN-positivos (D) e osteócitos BCN-positivos (E). Indicações acima das barras representam comparações entre os grupos experimentais e seus valores de significância estatística. * = $p < 0,05$, ** $p = 0,01$, *** = $p < 0,001$.

Discussão

O propósito deste estudo foi avaliar as propriedades da microestrutura cortical e trabecular juntamente com marcadores autofágicos no colo do fêmur de ratas no período da peri menopausa após realização de treinamento de força. Nossa hipótese é de que a carga aumentada durante o exercício em ratas velhas atue como estímulo e potencialize resposta osteogênica melhorando sua estrutura cortical e trabecular além de aumentar autofagia. Os resultados indicaram que 12 semanas de treinamento de força com aumento progressivo de cargas contribuiu para aumento significativo na área, espessura e número trabecular, além de redução da porosidade trabecular nos animais do grupo V/EX comparados aos animais do grupo V/NEX. A importância deste estudo é demonstrar como o treinamento de força pode ser relevante alternativa para evitar condições de baixa qualidade óssea, possivelmente contribuindo para a redução da incidência de fraturas no colo do fêmur que é a causa da maior parte de morbidade e mortalidade (Karlsson e Rosengren, 2012).

A osteoporose, além de seus componentes genéticos (Huang *et al.*, 2003; Huang e Kung, 2006; Makovey *et al.*, 2007; Ralston, 2007), tem sido associada com a falta de atividade física, a qual agrava os efeitos do envelhecimento em mulheres (Bainbridge *et al.*, 2004; Heidari *et al.*, 2015; Huovinen *et al.*, 2016). Neste estudo, nós utilizamos modelo em envelhecimento de ratas como descrito em estudos anteriores de nosso grupo (Ferreira *et al.*, 2015; Nicola *et al.*, 2016), sendo que este modelo não está ligado a qualquer tipo de tratamento ou procedimento, como a ovariectomia para determinar perfil hipostrogênico, diferente disso, o animal passou pelo processo fisiológico do envelhecimento até alcançar a idade de 21 meses. Com base nos resultados obtidos em estudos anteriores (Ferreira *et al.*, 2015; Nicola *et al.*, 2016; Singulani *et al.*, 2017), nós utilizamos ratas naturalmente envelhecidas, modelo com escassa descrição na literatura, considerando a avaliação do ciclo estral para validar

o período de periostropausa nestes animais, período semelhante a perimenopausa em mulheres.

A maior parte dos estudos que investigam a influência do exercício na massa óssea tanto em humanos quanto em animais envolvem atividades como natação (Gómez-Bruton *et al.*, 2016), corrida (Kirk *et al.*, 1989), ciclismo (Nagle e Brooks, 2011), corrida em roda (Newhall *et al.*, 1991), saltos (Notomi *et al.*, 2000) e corrida em esteira (Peng *et al.*, 1994). Como tal, compreender como a microarquitetura óssea se adapta à tensão causada pelo treinamento de força é altamente relevante, sendo que a habilidade do osso em resistir à fratura é dependente de sua distribuição espacial (macro e microarquitetura) e não somente de sua massa óssea (Brandi, 2009). A acumulação de microdanos e alterações na morfologia causadas pelo envelhecimento são típicas do remodelamento prejudicado (Karim e Vashishth, 2011). Nossa avaliação por DEXA de todo o osso demonstrou reduzida DMOa em V/EX a qual de fato não significa que o TF não fora capaz de melhorar a massa óssea nestes animais. Em concordância com isto, já é conhecido que a resistência à fratura depende da quantidade de tecido mineralizado presente (tamanho e densidade, algumas vezes referidos como DMO) e vários outros fatores que estão relacionados à “qualidade óssea”. Estes fatores incluem composição (porcentagem de peso de cada componente), mineralização (organização do mineral e seu tamanho e perfeição dos cristalitos), ligações cruzadas de colágeno, conteúdo de colágeno, microarquitetura, presença de micro rachaduras e morfologia (Ruppel *et al.*, 2008). A composição heterogênea do osso formado por estes fatores pode variar com o estado de saúde, doença e terapias farmacológicas. Entre outras alterações, o envelhecimento diminui a heterogeneidade desta composição induzindo o aumento dos tipos de ligações cruzadas de colágeno (enzimáticas e não enzimáticas) resultando em melhora da força mecânica (osso mais quebradiço) (Boskey, 2013). Portanto, para usar DMOa

como único índice para se predizer o risco de fratura pode não ser adequado, tendo em vista que este inter-relacionamento pode ser desproporcional (Häussler *et al.*, 2007; Seeman *et al.*, 2008).

As estimulações das tensões causadas pelo exercício estão ligadas ao envolvimento de moléculas de adesão celular como integrinas e caderinas. A primeira transduz sinais da matriz extracelular (MEC) para componentes extracelulares e vice-versa, o último agindo através de suas interligações com citoesqueletos de células vizinhas. A deformação da membrana celular e também o estresse de cisalhamento mediado pelo fluxo fluido nos canalículos dos osteócitos resulta em alterações nas ligações entre integrinas e MEC/ caderinas e células vizinhas, modificando a organização do citoesqueleto e a adesão de proteínas nas adesões focais e junções aderentes (Carvalho *et al.*, 2003; Amizuka, 2016; Li *et al.*, 2016). De fato, o citoesqueleto parece estar diretamente envolvido na regulação celular das concentrações de Ca^{2+} . Quando força é aplicada, há acumulação de actina no córtex da submembrana sendo que este processo está profundamente ligado ao influxo de Ca^{2+} . A ativação de canais de cálcio mecanossensíveis (Tipo ativado por alongamento, tipo AS) e voltagem sensíveis (tipo- L) antecipam a resposta das células ósseas para o estímulo mecânico (Laino *et al.*, 2005; Robinson *et al.*, 2010; Wen *et al.*, 2012). Estes processos de influxo de Ca^{2+} e mobilização de estoques internos também tem a ativação de vias de sinalização envolvendo proteínas quinase como proteína quinase ativada por mitôgenio (AMPK), fosfoinositol-3-quinase (PI3K), proteína quinase A (PKA) e proteína quinase C (PKC) (Danciu *et al.*, 2003; Ramage *et al.*, 2009). A ativação destas proteínas converte força mecânica em sinal bioquímico. A regulação de genes envolvidos na mecanotransdução tem a ação de complexos multiproteicos chamados mecanossomos. Movendo-se entre os complexos de adesão e o núcleo, eles podem se ligar a sequências específicas nos

genes promotores mecanossensíveis, regulando sua expressão (Pavalko, Gerard, *et al.*, 2003; Pavalko, Norvell, *et al.*, 2003; Bidwell e Pavalko, 2010b; a).

Em nosso estudo, nós utilizamos o treinamento de força feito em escada adaptada para ratos, estratégia que já tem sido utilizada em outros estudos associados com junções neuromusculares de machos adultos e velhos (Deschenes *et al.*, 2015), hipertensão (Anuniação *et al.*, 2016), perda óssea em ratos obesos (Tang *et al.*, 2016) ou perda óssea devido ao hipoestrogenismo/ envelhecimento (Stringhetta-Garcia *et al.*, 2016; Singulani *et al.*, 2017). Nosso programa de treinamento induziu melhoras na capacidade de carregamento voluntário máximo (Fig.1A), o qual resultou em peso corporal final mais baixos (Tabela – 1), similarmente com os resultados de Stotzer e colaboradores (Stotzer *et al.*, 2015) em estudo com ratas ovariectomizadas que efetuaram sessões de escalada em escada. É importante notar as diferenças de resposta entre osso cortical e trabecular ao treinamento de força. Menor porosidade cortical e momento de inércia polar foram verificados nas ratas velhas que realizaram TF. A análise da porosidade cortical e a constatação de maior porcentagem deste parâmetro nos animais V/NEX evidencia aumento no número e tamanho dos poros pela aderência de cavidades de remodelamento adjacentes (como por exemplo, canais Haversianos), aumento na superfície disponível para remodelamento do córtex resultando em menor força e resistência óssea à compressão (Seeman, 2008). Sendo que esta perda óssea é reconhecida como processo de “trabecularização” do osso cortical, o TF surge como agente para evitar este processo no período do envelhecimento (Bala e Seeman, 2015; Bala *et al.*, 2015).

Adicionalmente, no processo do envelhecimento há menor momento de inércia polar (medida geométrica da resistência à compressão/ torção), o qual resulta em força óssea cortical menor (Burstein *et al.*, 1976; Augat e Schorlemmer, 2006; Malo *et al.*, 2013). Nosso estudo demonstra que o momento de inércia polar foi reestabelecido

em ratas velhas após TF. Tomados juntos tanto a melhora na porosidade cortical e no momento de inércia polar resulta em osso cortical mais fortalecido. Nossos resultados demonstram aumento na área cortical total, a qual pode estar relacionado à maior resposta do perióstio do que endocortical ao TF como similarmente observado em estudo com ratas ovariectomizadas (Notomi *et al.*, 2003). Mais estudos investigando as propriedades do córtex ósseo são necessários, sendo que neste sítio ocorre significativa diminuição óssea na idade avançada (Bala *et al.*, 2015).

Após o TF foi possível verificar respostas significantes para a maior parte dos parâmetros avaliados no osso trabecular. Os animais que realizaram TF apresentaram, na região do colo do fêmur, maior volume de tecido ósseo, maior número e espessamento de trabéculas. Isto resultou em menor separação entre trabéculas e elevado grau de anisotropia. É importante notar também, que a porosidade trabecular foi menor, a qual assegura que o osso possa ser mais resistente à fratura. O osso trabecular obteve maior volume ósseo do que o osso cortical, sendo assim exposto à maior remodelamento o qual resulta em perda óssea mais rápida do que o osso cortical (Seeman, 2008).

É altamente importante ressaltar que as respostas analisadas para osso trabecular neste estudo tiveram interação predominante entre idade e treinamento na maior parte da avaliação. A melhora óssea em animais de 7 meses não é tão visível quanto em animais velhos. Animais adultos, que não têm seu *turnover* ósseo afetado pelo hipoestrogenismo, apresentam manutenção da massa óssea causada pelo TF. Por outro lado, em animais velhos, TF pode evitar a perda óssea durante o envelhecimento algumas vezes retornando alguns aspectos similarmente aos observados em animais adultos, o qual nos permite acertar que quanto mais precoce a aplicação do TF menos massa óssea será reduzida durante o período do envelhecimento. A realização do exercício físico, mais especificamente do TF, é das mais importantes intervenções

para retardar a sarcopenia/ osteopenia e os eventos relacionados à esta condição como por exemplo, a osteoporose. Cada vez mais é possível associar os benefícios deste tipo de treinamento não somente aos parâmetros ósseos e musculares esqueléticos, mas também a melhora cognitiva e social de pessoas idosas.

AKT é uma proteína reguladora mestre da longevidade, sendo estimulada por fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-1) e insulina (Houtkooper *et al.*, 2010). Nossos resultados mostram que a quantidade total de AKT não foi modificada pelo treinamento mas reduziu a fosforilação de AKT em Ser473 em V/EX. AKT em Ser473 é fosforilada por mTORC2 e após sua ativação, transloca-se para o núcleo afetando a atividade de vários fatores transcricionais (Vadlakonda *et al.*, 2013). Tem sido demonstrado que reduzir, mas não obliterar a atividade de AKT aumenta o tempo de vida de leveduras à mamíferos (O' Neill, 2013). Suas funções no envelhecimento relacionam-se inclusive a doenças como Alzheimer (Lee *et al.*, 2009). AKT elevada em osteoblastos e osteoclastos demonstrou também levar à osteopenia por baixo *turnover* em ambas as células (Kawamura *et al.*, 2007). Outros demonstraram que AKT pode prejudicar a transativação de BIM (potente pró-apoptótico em osteoblastos) pela fosforilação de FOXO3a (Tran *et al.*, 2003). A ablação total de AKT também reduz a fertilidade e torna o animal menor em tamanho, além de diminuir a massa cortical e trabecular. Em osteoblastos, a deficiência de AKT causa três anormalidades celulares autônomas: aumentada susceptibilidade à apoptose, diferenciação e função suprimida e expressão reduzida de RANK-L para suportar a osteoclastogênese (Kawamura *et al.*, 2007). O treinamento de força não sendo capaz de reduzir totalmente AKT, mas sim, de atenuar sua expressão no osso de ratas velhas demonstra ser benéfico, especificamente evitando os efeitos osteopênicos tanto de supressão como de sua amplificação elevadas. Agindo sinergisticamente com AKT está ERK1/2, ambos ativam mTORC1 o qual tem função inibitória sobre a autofagia

(Winter *et al.*, 2011). Em nosso estudo, ERK1/2 foi elevada em ratas velhas que fizeram treinamento de força, mas sua fosforilação foi reduzida em seu resíduo Tyr204, mas não reduziu a fosforilação em Thr202. ERK1/2 assim como AKT, estimula a proliferação celular sob influência de fatores de crescimento e, adicionalmente, sua sinalização regula autofagia e a expressão de genes lisossomais (Dibble e Manning, 2013). Tem sido demonstrado que ERK1/2, LC3 e p62 possuem interrelação, sugerindo *crosstalk* bidirecional entre ERK e autofagia, além de ERK se localizar na face extraluminal do autofagossomo (Kim *et al.*, 2014; Kim e Lee, 2014).

Adicionalmente, avaliamos por imunistoquímica região do colo do fêmur que demonstrou que o TF aumentou a marcação para beclina-1, OCN e FAL em ambos os grupos adultas e velhas que realizaram TF. Também se constatou aumento da marcação para RUNX-2 em V/EX. As marcações para OCN e RUNX-2 corroboram com resultados de trabalho prévio de nosso grupo (Stringhetta-Garcia *et al.*, 2016). Estes resultados demonstram que especificamente o colo do fêmur foi estimulado pelo TF, demonstrando a importância deste estímulo para maior atividade osteogênica nessa região, além de possivelmente estimular o início da atividade autofágica baseada na elevada marcação de beclina-1.

Baseados nisso, visão clara sobre os benefícios do TF é importante para a população geral. Este estudo contribui para a compreensão de como o osso se adapta ao TF. Sem precedentes, nossos resultados demonstram respostas interessantes que o osso pode desenvolver para este tipo de estimulação no período da periostropausa/perimenopausa.

Em suma, nossos dados demonstram que o treinamento de força no modelo de ratas velhas foi efetivo na melhora da massa e estrutura óssea no colo do fêmur. Os resultados indicam que o TF é estratégia válida para manutenção da massa óssea no envelhecimento e previne essa perda temporal se aplicado precocemente. Essa

redução na diminuição óssea pode estar intrinsicamente ligada à manutenção autofágica, de modo que a intervenção do TF foi capaz de regular positivamente a autofagia no tecido ósseo. Essas modificações parecem ser, pelo menos em parte, resultado da remodelação óssea mais equilibrada em ratas velhas. A utilização deste modelo em ratas pode levar à maior compreensão de como o exercício de força pode ser efetivo em aumentar a massa óssea e em mitigar a diminuição óssea associada à deficiência hormonal e a idade.

CONCLUSÃO

4 CONCLUSÃO

A compreensão dos mecanismos celulares responsáveis pela mecanotransdução no osso é essencial para o desenvolvimento de estratégias de exercício e farmacêuticas voltadas para o aumento e/ou prevenção da diminuição de massa em tecidos críticos no envelhecimento e hipoestrogenia. Com base nos resultados obtidos, redução da diminuição óssea pode estar intrinsicamente ligada à manutenção autofágica, de modo que a intervenção do TF foi capaz de regular a autofagia no tecido ósseo. Essas modificações parecem ser, pelo menos em parte, resultado da remodelação óssea mais equilibrada em ratas velhas. A utilização deste modelo em ratas pode levar à maior compreensão de como o exercício de força pode ser efetivo em aumentar a massa óssea e em mitigar a osteopenia durante o período de envelhecimento.

Nosso estudo não só contribui, mas também confirma o potencial do treinamento de força como meio extremamente importante e estrategicamente exequível não somente como tratamento, mas como prevenção da osteoporose. Mostrando assim, que os efeitos do exercício físico, especialmente o treinamento de força não limitados pela idade. Além disso, adiciona e abre questionamentos de como é regulado o metabolismo ósseo a nível molecular pós – exercício através de importante meio de proteção e sobrevivência celular como a autofagia.

REFERÊNCIAS

AMIZUKA, N. 1. Morphological Implication on Cellular Response to Mechanical Stress in Bone. **J Orthop Trauma**, v. 30, n. 8, p. S2, Aug 2016. ISSN 1531-2291. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27441762> >.

ANIMALS, N. R. C. U. C. F. T. U. O. T. G. F. T. A. U. O. L., Ed. **Guide for the Care and Use of Laboratory Animals**: National Academies Press (US)ed. 2011.

ANUNCIACÃO, P. G. et al. Blood pressure and autonomic responses following isolated and combined aerobic and resistance exercise in hypertensive older women. **Clin Exp Hypertens**, v. 38, n. 8, p. 710-714, 2016 2016. ISSN 1525-6006. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27936947> >.

AUGAT, P.; SCHORLEMMER, S. The role of cortical bone and its microstructure in bone strength. **Age Ageing**, v. 35 Suppl 2, p. ii27-ii31, Sep 2006. ISSN 0002-0729. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16926200> >.

BAINBRIDGE, K. E. et al. Risk factors for low bone mineral density and the 6-year rate of bone loss among premenopausal and perimenopausal women. **Osteoporos Int**, v. 15, n. 6, p. 439-46, Jun 2004. ISSN 0937-941X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15205714> >.

BALA, Y.; SEEMAN, E. Bone's Material Constituents and their Contribution to Bone Strength in Health, Disease, and Treatment. **Calcif Tissue Int**, v. 97, n. 3, p. 308-26, Sep 2015. ISSN 1432-0827. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25712256> >.

BALA, Y.; ZEBAZE, R.; SEEMAN, E. Role of cortical bone in bone fragility. **Curr Opin Rheumatol**, v. 27, n. 4, p. 406-13, Jul 2015. ISSN 1531-6963. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26002033> >.

BANDEIRA, L. Novel Therapies for Postmenopausal Osteoporosis. v. 46, n. 1, p. 207–219, March 2017 2017. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2016.11.001> >.

BECKER, D. J.; KILGORE, M. L.; MORRISEY, M. A. The societal burden of osteoporosis. **Curr Rheumatol Rep**, v. 12, n. 3, p. 186-91, Jun 2010. ISSN 1523-3774. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11926-010-0097-y> >.

BERGSTROM, I. et al. Physical training preserves bone mineral density in postmenopausal women with forearm fractures and low bone mineral density. **Osteoporos Int**, v. 19, n. 2, p. 177-83, Feb 2008. ISSN 0937-941X (Print)0937-941x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00198-007-0445-6> >.

BIDWELL, J. P.; PAVALKO, F. M. Mechanosomes carry a loaded message. **Sci Signal**, v. 3, n. 153, p. pe51, Dec 2010a. ISSN 1937-9145. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21177492> >.

_____. The Load-Bearing Mechanosome Revisited. **Clin Rev Bone Miner Metab**, v. 8, n. 4, p. 213-223, Nov 2010b. ISSN 1534-8644. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21479153> >.

BOIVIN, G.; MEUNIER, P. J. Changes in bone remodeling rate influence the degree of mineralization of bone. **Connect Tissue Res**, v. 43, n. 2-3, p. 535-7, 2002. ISSN 0300-8207 (Print)0300-8207. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BOSKEY, A. L. Bone composition: relationship to bone fragility and antiosteoporotic drug effects. **Bonekey Rep**, v. 2, p. 447, 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24501681> >.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 1976. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051> >.

BRANDI, M. L. Microarchitecture, the key to bone quality. **Rheumatology (Oxford)**, v. 48 Suppl 4, p. iv3-8, Oct 2009. ISSN 1462-0332. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19783591> >.

BURSTEIN, A. H.; REILLY, D. T.; MARTENS, M. Aging of bone tissue: mechanical properties. **J Bone Joint Surg Am**, v. 58, n. 1, p. 82-6, Jan 1976. ISSN 0021-9355. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1249116> >.

CARVALHO, R. S. et al. Selective adhesion of osteoblastic cells to different integrin ligands induces osteopontin gene expression. **Matrix Biol**, v. 22, n. 3, p. 241-9, May 2003. ISSN 0945-053X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12853034> >.

CAULEY, J. A. Public health impact of osteoporosis. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 68, n. 10, p. 1243-51, Oct 2013. ISSN 1079-5006. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/gerona/glt093> >.

CHEN, X. et al. Treadmill running exercise prevents senile osteoporosis and upregulates the Wnt signaling pathway in SAMP6 mice. **Oncotarget**, v. 7, n. 44, p. 71072-71086, Nov 01 2016. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.12125> >.

COHEN, A. Premenopausal Osteoporosis. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v. 46, n. 1, p. 117-133, Mar 2017. ISSN 0889-8529. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecl.2016.09.007> >.

COOPER, C.; CAMPION, G.; MELTON, L. J., 3RD. Hip fractures in the elderly: a world-wide projection. **Osteoporos Int**, v. 2, n. 6, p. 285-9, Nov 1992. ISSN 0937-941X (Print)0937-941x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

CURTIS, E. M. et al. The impact of fragility fracture and approaches to osteoporosis risk assessment worldwide. **Bone**, Jan 22 2017. ISSN 1873-2763. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2017.01.024> >.

DANCIU, T. E. et al. Calcium regulates the PI3K-Akt pathway in stretched osteoblasts. **FEBS Lett**, v. 536, n. 1-3, p. 193-7, Feb 2003. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12586362> >.

DENTON, D.; NICOLSON, S.; KUMAR, S. Cell death by autophagy: facts and apparent artefacts. **Cell Death & Differentiation**, v. 19, n. 1, p. 87-95, 2011-11-04 2011. ISSN 1350-9047. Disponível em: < <http://www.nature.com/cdd/journal/v19/n1/full/cdd2011146a.html> >.

DESCHENES, M. R. et al. Effect of resistance training on neuromuscular junctions of young and aged muscles featuring different recruitment patterns. **J Neurosci Res**, v. 93, n. 3, p. 504-13, Mar 2015. ISSN 1097-4547. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25287122> >.

DIBBLE, C. C.; MANNING, B. D. Signal integration by mTORC1 coordinates nutrient input with biosynthetic output. **Nat Cell Biol**, v. 15, n. 6, p. 555-64, Jun 2013. ISSN 1465-7392 (Print)1476-4679 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2763> >.

FALCAI, M. J. et al. The osteogenic effects of swimming, jumping, and vibration on the protection of bone quality from disuse bone loss. **Scand J Med Sci Sports**, v. 25, n. 3, p. 390-7, Jun 2015. ISSN 0905-7188. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/sms.12240> >.

FERREIRA, L. B. et al. Activity of neurons in the preoptic area and their participation in reproductive senescence: Preliminary findings. **Exp Gerontol**, v. 72, p. 157-61, Dec 2015. ISSN 1873-6815. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26456420> >.

FINCH, C. E. The menopause and aging, a comparative perspective. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 0, p. 132-41, Jul 2014. ISSN 0960-0760 (Print)1879-1220 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.03.010> >.

FULDA, S. et al. Cellular stress responses: cell survival and cell death. **Int J Cell Biol**, v. 2010, p. 214074, 2010. ISSN 1687-8884. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20182529> >.

GABRIEL, S. M.; RONCANCIO, J. R.; RUIZ, N. S. Growth hormone pulsatility and the endocrine milieu during sexual maturation in male and female rats. **Neuroendocrinology**, v. 56, n. 5, p. 619-25, Nov 1992. ISSN 0028-3835 (Print)0028-3835. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

GLEESON, P. B. et al. Effects of weight lifting on bone mineral density in premenopausal women. **J Bone Miner Res**, v. 5, n. 2, p. 153-8, Feb 1990. ISSN 0884-0431 (Print)0884-0431. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jbmr.5650050208> >.

GOODSHIP, A. E. et al. Bone loss during long term space flight is prevented by the application of a short term impulsive mechanical stimulus. **Acta Astronaut**, v. 43, n. 3-6, p. 65-75, Aug-Sep 1998. ISSN 0094-5765 (Print)0094-5765. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

GOURLAY, M. L. et al. Baseline age and time to major fracture in younger postmenopausal women. **Menopause**, v. 22, n. 6, p. 589-97, Jun 2015. ISSN 1072-3714. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1097/gme.0000000000000356> >.

GRANJEIRO, J. M.; TAGA, E. M.; AOYAMA, H. Purification and characterization of a low-molecular-weight bovine kidney acid phosphatase. **An Acad Bras Cienc**, v. 69, n. 4, p. 451-60, 1997. ISSN 0001-3765 (Print)0001-3765. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

GÓMEZ-BRUTON, A. et al. Swimming and bone: Is low bone mass due to hypogravity alone or does other physical activity influence it? **Osteoporos Int**, v. 27, n. 5, p. 1785-93, May 2016. ISSN 1433-2965. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26694592> >.

HAMAGUCHI, K. et al. The effects of low-repetition and light-load power training on bone mineral density in postmenopausal women with sarcopenia: a pilot study. **BMC Geriatr**, v. 17, n. 1, p. 102, May 02 2017. ISSN 1471-2318. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/s12877-017-0490-8> >.

HEIDARI, B. et al. Factors affecting bone mineral density in postmenopausal women. **Arch Osteoporos**, v. 10, p. 15, 2015. ISSN 1862-3514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25972061> >.

HERSEN, P. et al. Signal processing by the HOG MAP kinase pathway. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 20, p. 7165-70, May 2008. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18480263> >.

HOHMANN, S. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 66, n. 2, p. 300-72, Jun 2002. ISSN 1092-2172 (Print)1092-2172. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

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

HOUTKOOPER, R. H.; WILLIAMS, R. W.; AUWERX, J. Metabolic networks of longevity. **Cell**, v. 142, n. 1, Jul 9 2010. ISSN 0092-8674 (Print)1097-4172 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.029> >.

HUANG, Q. Y.; KUNG, A. W. Genetics of osteoporosis. **Mol Genet Metab**, v. 88, n. 4, p. 295-306, Aug 2006. ISSN 1096-7192. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16762578> >.

HUANG, Q. Y.; RECKER, R. R.; DENG, H. W. Searching for osteoporosis genes in the post-genome era: progress and challenges. **Osteoporos Int**, v. 14, n. 9, p. 701-15, Sep 2003. ISSN 0937-941X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12904838> >.

HUMPHRIES, B. et al. The relationship between dynamic, isokinetic and isometric strength and bone mineral density in a population of 45 to 65 year old women. **J Sci Med Sport**, v. 2, n. 4, p. 364-74, Dec 1999. ISSN 1440-2440 (Print)1878-1861. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

HUOVINEN, V. et al. Bone mineral density is increased after a 16-week resistance training intervention in elderly women with decreased muscle strength. **Eur J Endocrinol**, v. 175, n. 6, p. 571-582, Dec 2016. ISSN 1479-683X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27634943> >.

HÄUSSLER, B. et al. Epidemiology, treatment and costs of osteoporosis in Germany--the BoneEVA Study. **Osteoporos Int**, v. 18, n. 1, p. 77-84, Jan 2007. ISSN 0937-941X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17048064> >.

JANCKILA, A. J. et al. Properties and expression of human tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5a by monocyte-derived cells. **J Leukoc Biol**, v. 77, n. 2, p. 209-18, Feb 2005. ISSN 0741-5400 (Print)0741-5400. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.0504287> >.

JOHNSON, F. B.; SINCLAIR, D. A.; GUARENTE, L. Molecular biology of aging. **Cell**, v. 96, n. 2, p. 291-302, Jan 1999. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9988222> >.

KARIM, L.; VASHISHTH, D. Role of trabecular microarchitecture in the formation, accumulation, and morphology of microdamage in human cancellous bone. **J Orthop Res**, v. 29, n. 11, p. 1739-44, Nov 2011. ISSN 1554-527X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21538510> >.

KARLSSON, M. K.; ROSENGREN, B. E. Training and bone - from health to injury. **Scand J Med Sci Sports**, v. 22, n. 4, p. e15-23, Aug 2012. ISSN 0905-7188. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0838.2012.01461.x> >.

KAWAMURA, N. et al. Akt1 in osteoblasts and osteoclasts controls bone remodeling. **PLoS One**, v. 2, n. 10, p. e1058, Oct 24 2007. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0001058> >.

KERR, D. et al. Exercise effects on bone mass in postmenopausal women are site-specific and load-dependent. **J Bone Miner Res**, v. 11, n. 2, p. 218-25, Feb 1996. ISSN 0884-0431 (Print)0884-0431. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jbmr.5650110211> >.

KHOSLA, S. et al. Addressing the Crisis in the Treatment of Osteoporosis: A Path Forward. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 32, n. 3, p. 424-430, 2017. ISSN 1523-4681. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jbmr.3074/abstract> >. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jbmr.3074/full> >. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jbmr.3074/pdf> >.

KIM, J. H. et al. Raf/MEK/ERK can regulate cellular levels of LC3B and SQSTM1/p62 at expression levels. **Exp Cell Res**, v. 327, n. 2, p. 340-52, Oct 1 2014. ISSN 0014-4827 (Print)1090-2422 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.08.001> >.

KIM, K. H.; LEE, M. S. Autophagy as a crosstalk mediator of metabolic organs in regulation of energy metabolism. **Rev Endocr Metab Disord**, v. 15, n. 1, p. 11-20, Mar 2014. ISSN 1573-2606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24085381> >.

KIRK, S. et al. Effect of long-distance running on bone mass in women. **J Bone Miner Res**, v. 4, n. 4, p. 515-22, Aug 1989. ISSN 0884-0431. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2510467> >.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, Aug 15 1970. ISSN 0028-0836 (Print)0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

LAFLEUR, J. et al. Fracture Rates and Bone Density Among Postmenopausal Veteran and Non-Veteran Women From the Women's Health Initiative. **Gerontologist**, v. 56 Suppl 1, p. S78-90, Feb 2016. ISSN 0016-9013. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/geront/gnv677> >.

LAIDLER, P. M.; TAGA, E. M.; VAN ETEN, R. L. Human liver acid phosphatases: cysteine residues of the low-molecular-weight enzyme. **Arch Biochem Biophys**, v. 216, n. 2, p. 512-21, Jul 1982. ISSN 0003-9861 (Print)0003-9861. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

LAINO, G. et al. A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). **J Bone Miner Res**, v. 20, n. 8, p. 1394-402, Aug 2005. ISSN 0884-0431. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16007337> >.

LAYNE, J. E.; NELSON, M. E. The effects of progressive resistance training on bone density: a review. **Med Sci Sports Exerc**, v. 31, n. 1, p. 25-30, Jan 1999. ISSN 0195-9131 (Print)0195-9131. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

LEE, H. K. et al. The Insulin/Akt Signaling Pathway Is Targeted by Intracellular β -Amyloid. In: (Ed.). **Mol Biol Cell**, v.20, 2009. p.1533-44. ISBN 1059-1524 (Print)1939-4586 (Electronic).

LEE, K. et al. Endocrinology: bone adaptation requires oestrogen receptor-alpha. **Nature**, v. 424, n. 6947, p. 389, Jul 24 2003. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/424389a> >.

LI, Y. et al. Surface chemistry regulates the sensitivity and tolerability of osteoblasts to various magnitudes of fluid shear stress. **J Biomed Mater Res A**, v. 104, n. 12, p. 2978-2991, Dec 2016. ISSN 1552-4965. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27466082> >.

LONG, J. A.; EVANS, H. M. **The oestrous cycle in the rat and its associated phenomena**. Berkeley, Calif.: University of California Press, 1922. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MAKOVEY, J. et al. Genetic effects on bone loss in peri- and postmenopausal women: a longitudinal twin study. **J Bone Miner Res**, v. 22, n. 11, p. 1773-80, Nov 2007. ISSN 0884-0431. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17620052> >.

MALO, M. K. et al. Longitudinal elastic properties and porosity of cortical bone tissue vary with age in human proximal femur. **Bone**, v. 53, n. 2, p. 451-8, Apr 2013. ISSN 1873-2763. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23334084> >.

MANOLAGAS, S. C. From estrogen-centric to aging and oxidative stress: a revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis. **Endocr Rev**, v. 31, n. 3, p. 266-300, Jun 2010. ISSN 0163-769x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1210/er.2009-0024> >.

MARIÑO, G. et al. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, p. 81-94, 2014-01-08 2014. ISSN 1471-0072. Disponível em: < <http://www.nature.com/nrm/journal/v15/n2/full/nrm3735.html> >.

MARQUEZ, R. T.; XU, L. Bcl-2:Beclin 1 complex: multiple, mechanisms regulating autophagy/apoptosis toggle switch. **Am J Cancer Res**, v. 2, n. 2, p. 214-21, 2012. ISSN 2156-6976 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MOREIRA, L. D. et al. Physical exercise and osteoporosis: effects of different types of exercises on bone and physical function of postmenopausal women. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 58, n. 5, p. 514-22, Jul 2014. ISSN 0004-2730. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

NAGLE, K. B.; BROOKS, M. A. A Systematic Review of Bone Health in Cyclists. **Sports Health**, v. 3, n. 3, p. 235-243, May 2011. ISSN 1941-0921. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22164312> >.

NELSON, M. E. et al. Effects of high-intensity strength training on multiple risk factors for osteoporotic fractures. A randomized controlled trial. **Jama**, v. 272, n. 24, p. 1909-14, Dec 28 1994. ISSN 0098-7484 (Print)0098-7484. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

NEWHALL, K. M. et al. Effects of voluntary exercise on bone mineral content in rats. **J Bone Miner Res**, v. 6, n. 3, p. 289-96, Mar 1991. ISSN 0884-0431. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2035355> >.

NICOLA, A. C. et al. The transition to reproductive senescence is characterized by increase in A6 and AVPV neuron activity with attenuation of noradrenaline content. **Exp Gerontol**, v. 81, p. 19-27, Aug 2016. ISSN 1873-6815. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27108180> >.

NOTOMI, T. 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, p. 469-74, Dec 2000. ISSN 1439-6319. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11192051> >.

_____. Tower climbing exercise started 3 months after ovariectomy recovers bone strength of the femur and lumbar vertebrae in aged osteopenic rats. **J Bone Miner Res**, v. 18, n. 1, p. 140-9, Jan 2003. ISSN 0884-0431. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12510816> >.

O' NEILL, C. PI3-kinase/Akt/mTOR signaling: impaired on/off switches in aging, cognitive decline and Alzheimer's disease. **Exp Gerontol**, v. 48, n. 7, p. 647-53, Jul 2013. ISSN 1873-6815. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23470275> >.

OHSUMI, Y. Historical landmarks of autophagy research. **Cell Research**, v. 24, n. 1, p. 9-23, 2013-12-24 2013. ISSN 1001-0602. Disponível em: < <http://www.nature.com/cr/journal/v24/n1/full/cr2013169a.html> >.

PAL, S.; TYLER, J. K. Epigenetics and aging. **Sci Adv**, v. 2, n. 7, p. e1600584, Jul 2016. ISSN 2375-2548. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1126/sciadv.1600584> >.

PATTINGRE, S. et al. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. **Cell**, v. 122, n. 6, p. 927-39, Sep 23 2005. ISSN 0092-8674 (Print)0092-8674. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2005.07.002> >.

PAVALKO, F. M. et al. Fluid shear stress inhibits TNF-alpha-induced apoptosis in osteoblasts: a role for fluid shear stress-induced activation of PI3-kinase and inhibition of caspase-3. **J Cell Physiol**, v. 194, n. 2, p. 194-205, Feb 2003. ISSN 0021-9541. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12494458> >.

_____. A model for mechanotransduction in bone cells: the load-bearing mechanosomes. **J Cell Biochem**, v. 88, n. 1, p. 104-12, Jan 2003. ISSN 0730-2312. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12461779> >.

PENG, Z.; TUUKKANEN, J.; VÄÄNÄNEN, H. K. Exercise can provide protection against bone loss and prevent the decrease in mechanical strength of femoral neck in ovariectomized rats. **J Bone Miner Res**, v. 9, n. 10, p. 1559-64, Oct 1994. ISSN 0884-0431. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7817801> >.

PRESTES, J. et al. Effects of ovariectomy and resistance training on MMP-2 activity in skeletal muscle. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 34, n. 4, p. 700-6, Aug 2009. ISSN 1715-5312 (Print)1715-5312. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1139/h09-059> >.

RAAB, D. M. et al. Bone mechanical properties after exercise training in young and old rats. **J Appl Physiol (1985)**, v. 68, n. 1, p. 130-4, Jan 1990. ISSN 8750-7587 (Print)0161-7567. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

RALSTON, S. H. Genetics of osteoporosis. **Proc Nutr Soc**, v. 66, n. 2, p. 158-65, May 2007. ISSN 0029-6651 (Print)0029-6651. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1017/s002966510700540x> >.

RAMAGE, L.; NUKI, G.; SALTER, D. M. Signalling cascades in mechanotransduction: cell-matrix interactions and mechanical loading. **Scand J Med Sci Sports**, v. 19, n. 4, p. 457-69, Aug 2009. ISSN 1600-0838. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19538538> >.

RAVIKUMAR, B. et al. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. **Physiol Rev**, v. 90, n. 4, p. 1383-435, Oct 2010. ISSN 0031-9333. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00030.2009> >.

ROBINSON, L. J. et al. Regulation of bone turnover by calcium-regulated calcium channels. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1192, p. 351-7, Mar 2010. ISSN 1749-6632. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20392259> >.

ROSCHGER, P. et al. Bone mineralization density distribution in health and disease. **Bone**, v. 42, n. 3, p. 456-66, Mar 2008. ISSN 8756-3282 (Print)1873-2763. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2007.10.021> >.

RUPPEL, M. E.; MILLER, L. M.; BURR, D. B. The effect of the microscopic and nanoscale structure on bone fragility. **Osteoporos Int**, v. 19, n. 9, p. 1251-65, Sep 2008. ISSN 0937-941x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00198-008-0579-1> >.

RYAN, A. S. et al. Effects of strength training on bone mineral density: hormonal and bone turnover relationships. **J Appl Physiol** (1985), v. 77, n. 4, p. 1678-84, Oct 1994. ISSN 8750-7587 (Print)0161-7567. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SANCHES, I. C. et al. Standardization of resistance exercise training: effects in diabetic ovariectomized rats. **Int J Sports Med**, v. 35, n. 4, p. 323-9, Apr 2014. ISSN 0172-4622. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1055/s-0033-1351254> >.

SEEMAN, E. Bone quality: the material and structural basis of bone strength. **J Bone Miner Metab**, v. 26, n. 1, p. 1-8, 2008. ISSN 0914-8779. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18095057> >.

SEEMAN, E. et al. Strontium ranelate reduces the risk of vertebral fractures in patients with osteopenia. **J Bone Miner Res**, v. 23, n. 3, p. 433-8, Mar 2008. ISSN 0884-0431. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1359/jbmr.071105> >.

SEIDELIN, K. et al. Adaptations with Intermittent Exercise Training in Post- and Premenopausal Women. **Med Sci Sports Exerc**, v. 49, n. 1, p. 96-105, Jan 2017. ISSN 0195-9131. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1249/mss.0000000000001071> >.

SHIRLEY, M. Abaloparatide: First Global Approval | SpringerLink. **Drugs**, p. 1-6, 2017 2017. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs40265-017-0780-7> >.

SILBERMANN, M. et al. Long-term physical exercise retards trabecular bone loss in lumbar vertebrae of aging female mice. **Calcif Tissue Int**, v. 46, n. 2, p. 80-93, Feb 1990. ISSN 0171-967X (Print)0171-967x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SINGULANI, M. P. et al. Effects of strength training on osteogenic differentiation and bone strength in aging female Wistar rats. **Sci Rep**, v. 7, 2017. ISSN 2045-2322 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/srep42878> >.

SMALE, L.; LEE, T.; NUNEZ, A. A. Mammalian diurnality: some facts and gaps. **J Biol Rhythms**, v. 18, n. 5, p. 356-66, Oct 2003. ISSN 0748-7304 (Print)0748-7304. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SORPRESO, I. C. et al. Female aging. **Rev Assoc Med Bras** (1992), v. 61, n. 6, p. 553-6, Nov-Dec 2015. ISSN 0104-4230. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1590/1806-9282.61.06.553> >.

STOLZENBERG, N. et al. Bone strength and density via pQCT in post-menopausal osteopenic women after 9 months resistive exercise with whole body vibration or proprioceptive exercise. **J Musculoskelet Neuronal Interact**, v. 13, n. 1, p. 66-76, Mar 2013. ISSN 1108-7161 (Print)1108-7161. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

STOTZER, U. S. et al. Resistance training suppresses intra-abdominal fatty acid synthesis in ovariectomized rats. **Int J Sports Med**, v. 36, n. 3, p. 226-33, Mar 2015. ISSN 1439-3964. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25415388> >.

STRINGHETTA-GARCIA, C. T. et al. The effects of strength training and raloxifene on bone health in aging ovariectomized rats. **Bone**, v. 85, p. 45-54, Apr 2016. ISSN 1873-2763. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2015.11.023> >.

TANG, L. et al. Ladder-Climbing Training Prevents Bone Loss and Microarchitecture Deterioration in Diet-Induced Obese Rats. **Calcif Tissue Int**, v. 98, n. 1, p. 85-93, Jan 2016. ISSN 1432-0827. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26410845> >.

TRAN, H. et al. The many forks in FOXO's road. **Sci STKE**, v. 2003, n. 172, p. Re5, Mar 04 2003. ISSN 1525-8882. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1126/stke.2003.172.re5> >.

VADLAKONDA, L. et al. The Paradox of Akt-mTOR Interactions. **Front Oncol**, v. 3, 2013. ISSN 2234-943X (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2013.00165> >.

VILLIERS, T. J. D. The quest for new drugs to prevent osteoporosis-related fractures. <http://dx.doi.org/10.1080/13697137.2017.1289659>, 3 Mar 2017 2017. Disponível em: < <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/13697137.2017.1289659?journalCode=icmt20> >.

WEN, L. et al. L-type calcium channels play a crucial role in the proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 424, n. 3, p. 439-45, Aug 2012. ISSN 1090-2104. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22771798> >.

WINKELMANN, A. et al. [New strategies for exercise training in osteoporosis]. **Unfallchirurg**, v. 118, n. 11, p. 933-7, Nov 2015. ISSN 0177-5537. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00113-015-0080-1> >.

WINTER, J. N.; JEFFERSON, L. S.; KIMBALL, S. R. ERK and Akt signaling pathways function through parallel mechanisms to promote mTORC1 signaling. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 300, n. 5, p. C1172-80, May 2011. ISSN 0363-6143. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00504.2010> >.

YANG, Z.; KLIONSKY, D. J. Eaten alive: a history of macroautophagy. **Nat Cell Biol**, v. 12, n. 9, p. 814-22, Sep 2010. ISSN 1465-7392. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/ncb0910-814> >.

ZHANG, H.; PULESTON, D. J.; SIMON, A. K. Autophagy and Immune Senescence. **Trends Mol Med**, v. 22, n. 8, p. 671-86, Aug 2016. ISSN 1471-4914. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2016.06.001> >.

ZHAO, R.; ZHAO, M.; XU, Z. The effects of differing resistance training modes on the preservation of bone mineral density in postmenopausal women: a meta-analysis. **Osteoporos Int**, v. 26, n. 5, p. 1605-18, May 2015. ISSN 0937-941x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00198-015-3034-0> >.