

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

CAMPUS DE ARAÇATUBA - FACULDADE DE ODONTOLOGIA

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS

PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS

CAMILA TAMI STRINGHETTA GARCIA

INFLUÊNCIA DO TREINAMENTO RESISTIDO E DO
RALOXIFENO NO METABOLISMO ÓSSEO DE RATAS
WISTAR

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do *Campus* de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, para obtenção do título de “Mestre em Ciências Fisiológicas”.
Orientadora: Prof.^a Rita Cássia Menegati Dornelles

Araçatuba

2012

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Camila Tami Stringhetta Garcia

INFLUÊNCIA DO TREINAMENTO RESISTIDO E DO RALOXIFENO
NO METABOLISMO ÓSSEO DE RATAS WISTAR

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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rita Cássia Menegatti Dornelles

Araçatuba

2012

Dedicatória

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, que colocou em minha vida todas as pessoas citadas abaixo, que fazem da minha vida tão feliz e tão especial, tornando-me uma pessoa privilegiada.

A meus pais, Claudemiro e Sandra, fonte de inesgotável experiência e conhecimento, não os das ciências, mas da alma, com sábios conselhos, apoio incondicional e amor sem igual. Pelos exemplos de educação, humildade, caráter, honestidade, companheirismo, sem os quais hoje eu certamente não seria quem sou.

À minha irmã Karina, pela parceria destes anos todos, pelo apoio, amor, conselhos e também pelas conversas, que por sua experiência, apesar de ser a caçula, tornaram algumas fases deste trabalho menos árduas para mim.

A meu marido, Gabriel, minha alma gêmea, acredite isto existe, por sua companhia nos congressos e finais de semana no laboratório, por seu amor, sua amizade, pela cumplicidade, apoio incondicional, paciência e sabedoria no direcionamento de seus conselhos, e agora, também pela nossa bebê que está por chegar, para deixar nossas vidas ainda mais felizes.

A minhas avós, tias, tios e primos, por sempre acreditar e torcer por mim.

Acreditem, foram vocês quem me fizeram chegar até aqui.

Muito obrigada a todos. Amo vocês!

Agradecimentos Especiais

À Deus, que me deu forças e o discernimento necessário, para realização deste projeto, de maneira que as coisas complicadas, tornaram-se simples.

A minha orientadora, professora Rita Cássia Menegati Dornelles, pela orientação científica, por toda sua ética profissional, o que a torna uma profissional diferenciada. Agradeço também por todos seus conselhos quando tudo parecia ir mal, dando novas e boas perspectivas.

Ao professor Mário Jefferson Quirino Louzada, que sabendo da minha intenção de fazer um curso de mestrado, foi até mim, e me deu orientações valiosas, sem as quais, provavelmente não estaria concluindo agora esta dissertação.

À professora Ana Cláudia Stevanato Nakamune por todas as vezes que cedeu espaço em seu laboratório para as análises bioquímicas e por toda atenção que sempre dispensa aos alunos.

A todos os professores do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, pelo apoio e disponibilidade.

Ao professor Edilson Ervolino, pela paciência e atenção sempre que necessário. Ao professor João da endodontia, que em um momento difícil, não hesitou em abrir as portas do seu laboratório; professor Marcelo da

patologia, pela promissora aliança firmada com nosso laboratório, à técnica de laboratório da patologia Elaine pela ajuda e ao técnico Marcelinho, por toda sua paciência, conhecimento e vontade de ajudar. Ao Pedro, técnico do professor Mário Jefferson, que sempre me ajudou.

Ao professor Euclides Braga Mallheiros, da UNESP de Jaboticabal, pela ajuda na análise estatística.

A todos os meus colegas de departamento, que mais ou menos próximos, por muitos ou poucos dias, em alguma etapa deste trabalho me ajudaram com muita boa vontade.

A todos vocês, muito obrigada, foi muito bom poder compartilhar estes anos com vocês.

Agradecimentos

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

À Diretora da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, Prof^a. Adj. Ana Maria Pires Soubhia e ao Vice-Diretor Prof. Titular Wilson Roberto Poi pelo apoio.

Ao apoio financeiro da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de mestrado e à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela concessão do auxílio à pesquisa.

À FUNDUNESP (Fundação para Desenvolvimento da UNESP) e a Pró-Reitoria de pós-graduação da UNESP (PROPG-UNESP) pelo apoio nas viagens para realização das disciplinas.

A todos os funcionários da UNESP, obrigada pela atenção.

“Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor, mas lutamos para que o melhor fosse feito. Não somos o que deveríamos ser, não somos o que iremos ser, mas Graças a Deus não somos o que éramos.”

Martin Luther King

STRINGHETTA-GARCIA, CT. Influência do treinamento resistido e do raloxifeno no metabolismo ósseo de ratas Wistar. 2012. 53 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2012.

Resumo

A fragilidade óssea, resultante da osteoporose, aumenta a possibilidade da ocorrência de fraturas e de morbimortalidade. A deficiência de estrogênio que acomete a mulher durante a menopausa, exerce ação primordial no desenvolvimento desta patologia. Entre os fármacos estudados como possíveis agentes terapêuticos para a osteoporose, o cloridrato de raloxifeno (RLX) mimetiza os efeitos benéficos do estrógeno sem estimular tecidos como mama e endométrio. A realização de exercícios resistidos tem se mostrado grande aliado para o aumento da densidade mineral óssea, pelo recrutamento de células ósseas. Desta forma, este estudo analisou se o treinamento resistido (EX), o raloxifeno ou a associação destes propicia alteração óssea no colo do fêmur de ratas no período do envelhecimento. Para tanto, ratas Wistar (14 meses) foram divididas aleatoriamente nos grupos experimentais: G1- Sham/NaCl; G2 - Sham/NaCl + EX; G3- Sham/RLX; G4 - Sham/RLX + EX; G5- OVX/NaCl; G6- OVX/NaCl + EX; G7- OVX/RLX; G8 - OVX/RLX + EX. Durante 120 dias as ratas receberam, por gavagem diária, solução fisiológica (grupos 1, 2, 5 e 6) ou RLX (grupos 3, 4, 7 e 8). Os animais dos grupos 2, 4, 6 e 8 realizaram 4 séries de 5 repetições de exercício em escada, com peso equivalente a 80% da sua força durante 3 vezes na semana. A região da epífise proximal dos fêmures destes animais foi analisada por densitometria e microtomografia óssea bem como dosagens plasmáticas de Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato (TRAP), Osteocalcina (OC), Osteoprotegerina (OPG) e Fosfatase Alcalina total (FAL) como indicadores de predisposição à reabsorção ou formação de tecido ósseo. Os resultados evidenciam alterações morfológicas e nas concentrações plasmáticas de FAL, OC, OPG e TRAP. Nos animais sham-OVX, a associação de RLX e EX desencadeou aumento na atividade de FAL e diminuição de TRAP quando comparado com o grupo que recebeu RLX. Entretanto, as concentrações plasmáticas de OPG diminuíram após a associação ou não dos tratamentos. Nos grupos de ratas OVX, a atividade da FAL aumentou significativamente e as concentrações plasmáticas de OC e OPG diminuíram após as diferentes situações experimentais (EX, RLX ou EX + RLX). A densidade mineral óssea areal foi menor nos animais OVX/NaCl. Além disso, foi verificado que a osteopenia na região de colo femoral de ratas de 18 meses foi acentuada pela OVX. Nos animais OVX os tratamentos resultaram em aumento no número de

trabéculas, na conectividade trabecular e porosidade fechada. Estes resultados indicam que terapia anti-reabsortiva, treinamento resistido ou a associação destes desencadeiam efeitos benéficos na microestrutura óssea de animais de 18 meses, revertendo em diferentes graus a osteopenia imposta a este tecido.

Palavras-chaves: Ovariectomia, Raloxifeno, Exercício, Envelhecimento, Osteoporose.

STRINGHETTA-GARCIA, CT. Influence of resistance training and raloxifene on bone metabolism of female Wistar rats. 2012. 53 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2012.

Abstract

The bone fragility resulting from osteoporosis increases the possibility of fractures and mortality occurrences. The estrogen deficiency that affects women during menopause exerts a major action on the development of this pathology. Among the drugs we've studied as possible therapeutic agents for osteoporosis, raloxifene hydrochloride (RLX) mimics the beneficial effects of estrogen without stimulating tissues such as the breast and the endometrium. Moreover, it turned out resistance exercises is a great ally to the increasing of bone mineral density through the recruitment of bone cells. Thus, this study examined whether the resistant training, raloxifene hydrochloride or combination of these provided favorable changes in the femur of rats on their aging period. Therefore, 14 months old (Wistar) rats, after analysis of the estrous cycle, were randomly divided in experimental groups: G1-Sham/NaCl; G2 – Sham/ NaCl + EX; G3-Sham/ RLX; G4 – Sham/ RLX + exercise; G5-OVX / NaCl; G6-OVX /NaCl + exercise; G7-OVX / RLX; G8-OVX/RLX + exercise. For 120 days the rats received by gavage daily physiological solution (Group 1,2,5 and 6) or RLX(Group 3,4,7 and 8). Animals in group 2, 4, 6 and 8 underwent 4 series of 5 repetition of ladder exercises, with the equivalent weight of 80% of their strength for 3 times a week. The region of epiphysis proximal femurs of these animals were analyzed by microtomography and bone densitometry as well as plasma tartrate-resistant acid phosphatase (ALP), Osteocalcin (OC), Osteoprotegerin (OPG) and Alkaline phosphatase indicates of a predisposition to resorption or formation of bone tissue. The results show changes in plasma concentrations of ALP, OC, OPG, and TRAP. In sham-OVX animals, the combination of RLX and EX triggered increased activity of ALP and TRAP decreased when compared with the group that received RLX. However, plasma concentrations of OPG decreased after treatment of the association or not. In groups of OVX rats, the activity of ALP increased significantly and plasma concentrations of OC and OPG decreased after the different experimental situations (EX, EX + RLX or RLX). The areal bone mineral density was lower in OVX / NaCl. Furthermore, it was found that the osteopenia in the femoral neck region of 18-month-old rats were marked by OVX. In the OVX animals, treatment resulted in an increase in the number of trabeculae, connectivity trabecular and closed porosity. These results indicate that antireabsorptive therapy, resistance training or a combination of these have beneficial effects on 18-month-old bones, at different degrees reversing osteopenia imposed on this tissue.

Keywords: Ovariectomy. Raloxifene. Exercise-Induced. Aging. Osteoporosis.

Lista de Figuras

- Figura 1* - Remodelação do tecido ósseo, indicando as fases de reabsorção, reversão e formação óssea. Adaptado de Lerner, 2006. 19
- Figura 2* - Citocinas envolvidas no processo de remodelação óssea. M-CSF (Fator Estimulante da Colônia de Monócitos), RANK (receptor ativador do fator nuclear-kB), RANK Ligand (ligante do receptor ativador do fator nuclear-kB) e OPG (Osteoprotegerina). 20
- Figura 3* - Mecanismo de ação do Raloxifeno. Rey e colaboradores, 2009. 22
- Figura 4* - Ação do estímulo mecânico sobre o gene *SOST* e a expressão de esclerotina, sua ação sobre a via Wnt, atuando sobre precursores de osteoblastos e conseqüentemente sobre a formação de massa óssea. Boskey e Coleman, 2010. 24
- Figura 5* - Mudança cronológica em padrões reprodutivos de ratas entre 9 e 26 meses. Lu e colaboradores, 1979. 27
- Figura 6* - Escada utilizada para o treinamento resistido. Animais realizando o treinamento resistido. 28
- Figura 7* - Densitômetro DPX-ALPHA LUNAR. 30
- Figura 8* - Microtomografia Óssea. À esquerda, região de interesse da imagem obtida na microtomografia óssea (270 fatias abaixo da primeira imagem óssea), à direita região de interesse manualmente interpolada do osso trabecular. 31
- Figura 9* - Análise do ciclo estral de 80 ratas de 14 meses. Metaestro (40%), Diestro (49,36%), Proestro (4,04%) e Estro (6,60%). 34
- Figura 10* - Concentração plasmática de cálcio (A), fósforo (B), fosfatase alcalina total (C), de ratas sham ou ovariectomizadas (OVX) com 18 meses que receberam, durante 120 dias, NaCl (0,15M) ou RLX (1 mg/Kg/dia) associados ou não ao exercício (EX). ^ap<0,05 vs Sham/NaCl, ^cp<0,05 vs Sham/RLX, ^dp<0,05 vs Sham/RLX/EX. 35
- Figura 11* - Concentração plasmática de osteocalcina (A), osteoprotegerina (OPG;B), fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP;C), de ratas sham ou ovariectomizadas (OVX) com 18 meses que receberam, durante 120 dias, NaCl (0,15M) ou RLX (1 mg/Kg/dia) associados ou não ao exercício (EX). ^ap<0,05 vs Sham/NaCl, ^bp<0,05 vs Sham/EX, ^cp<0,05 vs Sham/RLX, ^Ap<0,05 vs OVX/NaCl. 36

- Figura 12* - Reconstrução em 3D de 60 fatias) da microtomografia do osso trabecular da região do colo femoral de ratas Sham/OVX e OVX com 18 meses, que receberam por 120 dias NaCl (0,15M) ou RLX (1 mg/Kg/dia) associados ou não ao exercício (EX). 38
- Figura 13* - Espessura Trabecular (A), Número de Trabéculas (B), media do padrão de fator trabecular (conectividade, C) e porosidade fechada (D) de ratas sham ou ovariectomizadas (OVX) com 18 meses que receberam, durante 120 dias, NaCl (0,15M) ou RLX (1 mg/Kg/dia) associados ou não ao exercício (EX). ^ap<0,05 vs Sham/NaCl, ^cp<0,05 vs Sham/RLX, ^dp<0,05 vs Sham/RLX/EX, ^Ap<0,05 vs OVX/NaCl, ^Bp<0,05 vs OVX/EX, ^Cp<0,05 vs OVX/RLX. 39

Lista de Tabelas

- Tabela 1* - Protocolo de treinamento resistido. 29
- Tabela 2* - Densidade Mineral Óssea Inicial (I) e final (F). Conteúdo Mineral Ósseo (CMO, g), área total (cm²) e Densidade Mineral Óssea areal (aDMO, g/cm²) de ratas sham ou ovariectomizadas com 18 meses que receberam por 120 dias NaCl (0,15M) ou RLX (1 mg/Kg/dia) associados ou não ao exercício (EX). p<0,05 vs Inicial. 37

Lista de Abreviaturas

- aDMO: Densidade Mineral Óssea areal
- CMO: Conteúdo Mineral Ósseo
- d: dia
- DMO: Densidade Mineral Óssea
- DNA: Ácido Desoxirribonucleico
- EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
- EPM: Erro Padrão da Média
- EX: Exercício
- FAL: Fosfatase Alcalina
- Fig.: Figura
- G1: Grupo 1
- G2: Grupo 2
- G3: Grupo 3
- G4: Grupo 4
- G5: Grupo 5
- G6: Grupo 6
- G7: Grupo 7
- G8: Grupo 8
- i.m: Intra muscular
- IL -1: Interleucina 1
- IL-6: Interleucina 6
- Kg: quilograma

- M-CSF : Fator Estimulante da Colônia de Monócito
- mL: mililitro
- mg: miligrama
- NaCl: Cloreto de Sódio
- OC: Osteocalcina
- OPG: Osteoprotegerina
- OVX: Ovariectomizadas
- RLX: Cloridrato de Raloxifeno
- RANK: receptor ativador do fator nuclear-Kb
- RANKL: ligante do receptor ativador do fator nuclear-kB
- SERM: Modulador Seletivo do Receptor de Estrógeno
- SERMs: Moduladores Seletivos do Receptor de Estrógeno
- Tb. Pf: Fator de padrão trabecular
- TFM: Teste de Força Máxima
- TNF α : Fator de Necrose Tumoral alfa
- TR: Treinamento Resistido
- TRAP: Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato
- 2D: duas dimensões
- 3D: três dimensões
- μ CT: microtomografia

Sumário

1 Introdução	18
2 Objetivos	25
3 Metodologia	26
3.1 Animais	26
3.2 Ciclo Estral	26
3.3 Ovariectomia	27
3.4 Tratamento	27
3.5 Treinamento Resistido	28
3.6 Coleta de Materiais	29
3.7 Densitometria Óssea	30
3.8 Microtomografia Óssea	30
3.9 Análises Bioquímicas	32
3.9.1 Cálcio	32
3.9.2 Fósforo	32
3.9.3 Fosfatase Alcalina	32
3.10 Determinação das concentrações de TRAP, OPG e Osteocalcina	32
3.11 Análise Estatística	33
4 Resultados	34
5 Discussão	40
6 Conclusões	45
Referências	47
Anexo	53

1 Introdução

Com o envelhecimento da população brasileira há o aumento alarmante de comorbidades, como a osteoporose. As fraturas ocasionadas pela fragilidade óssea, não causam diretamente a morte, mas se associam ao aumento grande da morbimortalidade.¹ Conseqüentemente, há evidente deterioração da qualidade de vida associada ao incremento da mortalidade, especialmente por causas infecciosas e cardiovasculares, tornando a osteoporose problema crescente de saúde pública. Portanto, a prevenção de fraturas osteoporóticas deve fazer parte da estratégia para o envelhecimento bem-sucedido.

O tecido ósseo, tipo especializado de tecido conectivo, é formado por células (osteoclastos, osteoblastos e osteócitos) e matriz extracelular calcificada, cujo processo de remodelação é constante no organismo e permite a auto-reparação e adaptação às forças submetidas.^{2, 3}

Para ocorrer o início da remodelação óssea, células precursoras dos osteoclastos, presentes nos tecidos hematopoiéticos, são recrutadas para o osso respondendo a sinais físicos e hormonais. Estas células concentram-se na superfície que será reabsorvida, fundem-se e transformam-se em osteoclastos multinucleados, que irão degradar tanto os componentes minerais quanto os orgânicos com secreção de enzimas ácidas e hidrolíticas, liberando fragmentos minerais ósseos e colagenosos.³ Em seguida, células mononucleadas da linhagem de macrófagos e monócitos preparam a superfície onde os osteoblastos podem se aderir e iniciar sua função, caracterizando a fase de reversão.

Inicia-se, então, cascata complexa de eventos da formação óssea, que envolve a proliferação de células mesenquimais primitivas em precursoras de osteoblastos e por fim em osteoblastos maduros, que sintetizam colágeno e outras proteínas da matriz, preenchendo a cavidade de reabsorção com osteóide lamelar novo seguida de deposição mineral, resultando em osso novo.

A mineralização do osso ocorre com deposição de cristais de hidroxiapatita na matriz extracelular, que consiste de colágeno tipo I e proteínas não colagenosas. Estas proteínas atuam na regulação da mineralização, manutenção da força, estabilidade e integridade do osso. Estudos revelaram que há redução destas proteínas na osteoporose.⁴

A figura 1 apresenta esquema das fases da remodelação do tecido ósseo. A atividade dinâmica de formação-reabsorção óssea pode ser regulada por fatores locais, citocinas, hormônios e forças mecânicas.⁵

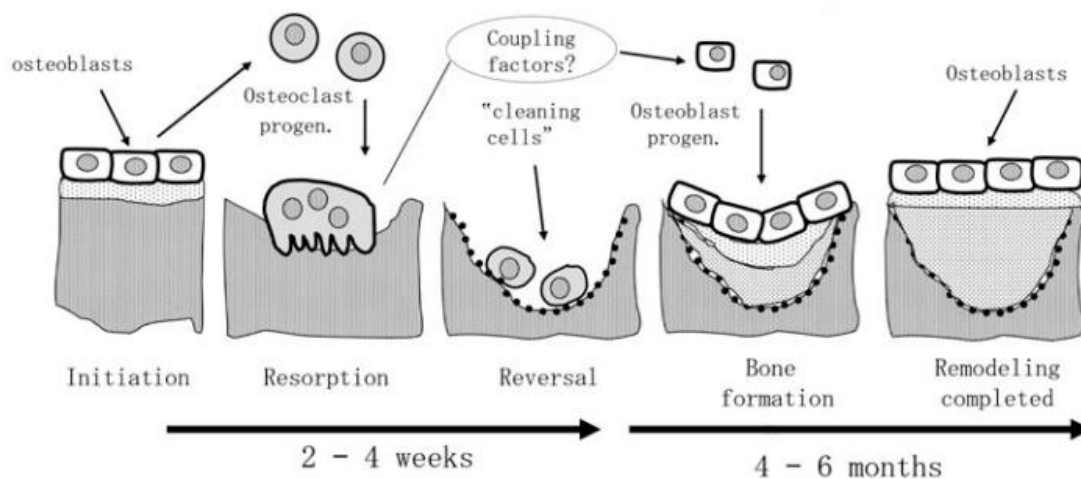


Figura 1 - Remodelação do tecido ósseo, indicando as fases de reabsorção, reversão e formação óssea. Lerner, 2006.⁶

Entre as citocinas que atuam no processo de remodelação óssea, o fator estimulante da colônia de monócito (M-CSF) e o ligante do receptor ativador do fator nuclear- κ B (RANKL) foram identificados^{7, 8} como fatores principais envolvidos na gênese de osteoclastos. M-CSF é essencial para a proliferação de progenitores de osteoclastos, enquanto que RANKL controla diretamente o processo de diferenciação pela ativação com RANK (receptor ativador do fator nuclear- κ B). É de conhecimento que RANK localiza-se na superfície de precursores de osteoclastos e de osteoclastos maduros e que a ligação RANK-RANKL causa a inibição da apoptose dos osteoclastos bem como estimula a diferenciação e ativação dos osteoclastos (Figura 2), o que causará reabsorção. A osteoprotegerina (OPG) tem ação contrária, isto é, liga-se a

RANK inibindo sua ligação com RANKL, inibindo a diferenciação e ativação osteoclástica.^{5, 9-13} Desta forma, o equilíbrio entre RANKL/OPG, é essencial para a manutenção da densidade mineral óssea normal.⁹

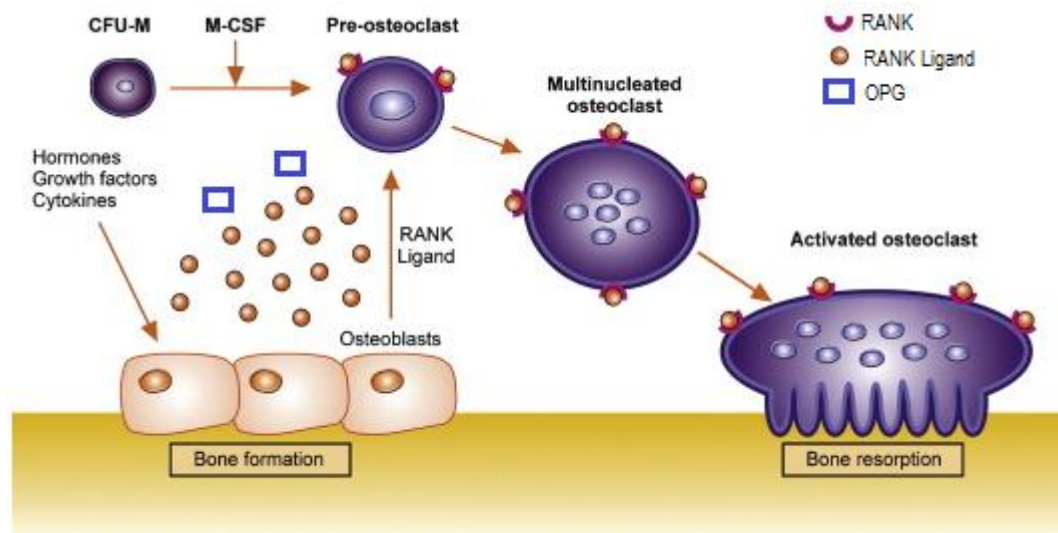


Figura 2 - Citocinas envolvidas no processo de remodelação óssea. M-CSF (Fator Estimulante da Colônia de Monócitos), RANK (receptor ativador do fator nuclear- κ B), RANK Ligand (ligante do receptor ativador do fator nuclear- κ B) e OPG (Osteoprotegerina). Adaptado de Boyle e colaboradores, 2003.¹⁴

Dentre os hormônios, o estrógeno exerce atuação importante para o tecido ósseo, visto que diminuição na concentração plasmática deste hormônio está relacionada com patologias, como a osteoporose.¹⁵ Evidências sugerem que o estrógeno atua sobre os monócitos promovendo redução plasmática de Interleucina 1 (IL-1) e Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α).^{16, 17} Estas substâncias estimulam a produção de citocinas como Interleucina 6 (IL-6) e M-CSF, as quais regulam a fusão e a diferenciação de células precursoras de osteoclastos. O estrógeno atua sobre os osteoblastos, via receptores α ¹⁸, induzindo a síntese de matriz óssea¹⁹ e promovendo a liberação de fatores, como TGF- β , que atuam sobre os osteoclastos²⁰, inibindo a reabsorção óssea e estimulando a morte dos osteoclastos.²¹ Além disso, em experimentação *in vitro*, Kameda e cols²² observaram apoptose de osteoclastos tratados com 17 β -

estradiol, sugerindo ação direta sobre essas células, nas quais a presença de receptores α^{23} e β específicos para o estrógeno (RE α e RE β) foi demonstrada.

A deficiência de estrogênio na mulher menopausada²⁴ é um dos fatores que contribuem para o desequilíbrio entre reabsorção e formação óssea. Na situação em que a reabsorção é maior que a formação, instala-se a osteoporose, patologia que afeta milhões de pessoas ao redor do mundo. É caracterizada por perda de massa óssea e deterioração da microarquitetura do tecido ósseo, levando a fragilidade óssea e conseqüente aumento do risco de fraturas.⁴ Segundo a Organização Mundial de Saúde, a fratura de fêmur em decorrência da osteoporose é a mais grave, com incidência maior nas mulheres, índice alto de hospitalização e associada a morbidades. Números reduzidos de idosos que tiveram este tipo de fratura retomam sua mobilidade, sendo que 10% ficam dependentes em todas suas atividades diárias e 19% precisam de cuidados de enfermagem em casa por longo tempo.²⁵ Portanto, diversos são os tratamentos estudados como possíveis agentes terapêuticos para patologias como a osteoporose.

A ferramenta farmacológica mais utilizada no tratamento e prevenção da osteoporose é a reposição hormonal com 17 β -estradiol, cuja eficácia esta bem estabelecida, já que reduz os sintomas da menopausa, inclusive prevenindo doenças cardiovasculares. Contudo, efeitos colaterais como ganho de peso e risco de carcinoma de mama e de endométrio são preocupantes²⁶, tornando esta terapia menos aplicável. Assim, uma possibilidade terapêutica são os moduladores seletivos do receptor de estrógeno (SERMs), que constituem classe de moléculas não hormonais que se ligam aos receptores de estrógeno e podem funcionar como agonistas ou antagonistas do estrógeno na dependência do tecido-alvo. O cloridrato de raloxifeno (RLX), derivado benzotiofênico e classificado como SERM de segunda geração, mimetiza os efeitos benéficos do estrógeno sem estimular tecidos como mama e endométrio.

O mecanismo de ação molecular deste SERM envolve afinidade alta de ligação com o receptor de estrógeno, provocando alteração conformacional na estrutura do receptor, sua dimerização e associação com elementos resposta do DNA específicos para o RLX (figura 3).^{27, 28}

Estudos recentes indicam que o RLX poderia talvez influenciar a transcrição gênica, pela intermediação do receptor de estrogênio. O RLX estimula a ativação de TGF β 3, importante regulador da remodelação óssea. Estudo de Clemett e colaboradores²⁹, mostra que o RLX diminui concentrações máximas de marcadores de formação e reabsorção ósseos, quando comparados com animais que receberam placebo, indicando que o RLX, pelo menos parcialmente, retorna o turnover ósseo a índices da pré-menopausa.²⁹

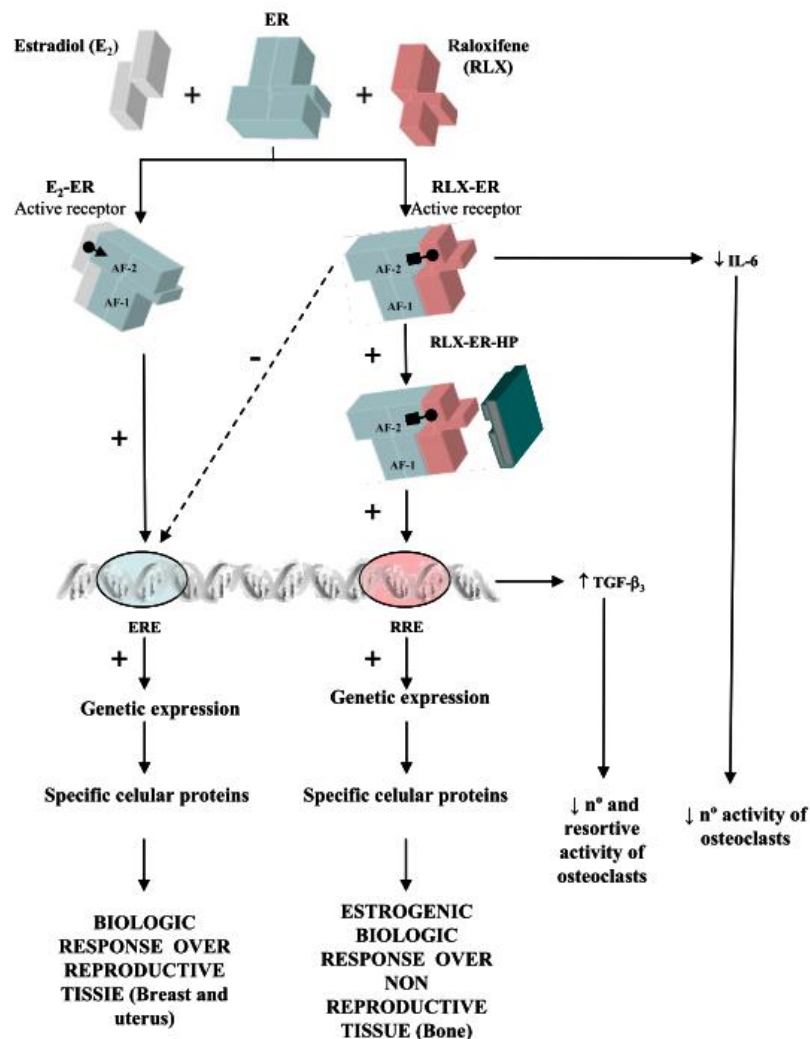


Figura 3 - Mecanismo de ação do Raloxifeno. Rey e colaboradores, 2009.³⁰

Além de fármacos, a influência de forças mecânicas também é analisada nos processos de remodelação óssea. É consenso na literatura que atividades físicas de maior sobrecarga, bem como o treinamento de força causem estímulos osteogênicos devido ao aumento do estresse mecânico. Este efeito osteogênico parece ser maior em indivíduos que praticam exercícios que

envolva grande força muscular do que aqueles com menor ou nenhuma força, uma vez que a densidade mineral óssea (DMO) é menor nestes indivíduos.³¹

Parece que o processo de remodelação óssea, induzido pela sobrecarga, é realizado pela ação dos osteócitos, que atuam como receptores mecânicos do estresse aplicado e enviam sinais para recrutar osteoblastos e osteoclastos, resultando em ganho ou perda óssea.³²⁻³⁶ Existem muitos pontos de discussão sobre qual melhor método de treinamento de força, levando em consideração os exercícios, a intensidade e o período necessário para se obter a resposta óssea, além das considerações individuais dos praticantes.³⁷

Bailey e Brooke-Wavel³⁸ mostram em seu estudo, que exercícios de alto impacto realizados diariamente tem melhor resposta no aumento da densidade mineral óssea do que nos indivíduos controle ou nos que realizavam exercícios 2 vezes por semana. Desta forma, muitos protocolos estão sendo realizados para estudo do metabolismo ósseo, envolvendo diferentes formas de exercício³⁹, como corrida em esteira⁴⁰⁻⁴³, natação^{40, 44}, saltos⁴⁵⁻⁴⁷ e subida em escadas.^{48, 49}

Os osteócitos atuam como mecanorreceptores sensíveis ao estresse mecânico e respondem ao estímulo osteogênico proporcionado por exercícios de maior impacto, resultando em ganho ou perda de massa óssea. Está sendo hipotetizado que os osteócitos funcionam como o "cérebro" do osso, devido seus numerosos prolongamentos citoplasmáticos os quais formam rede de comunicação, onde a informação do microambiente circundante é transmitida. Os osteócitos detectam o dano, desencadeiam o processo de remodelação e adaptam o osso a carga mecânica mudando o tamanho, a forma e adequando a deposição de massa óssea. O processo de adaptação do tecido ósseo à carga está associado com a esclerotina, produzida pelo gene SOST.⁵⁰ A literatura descreve que a proteína esclerotina é inibidor potente da formação óssea, agindo sobre a sinalização Wnt. A esclerotina, inibe o desenvolvimento dos osteoblastos *in vitro* por inibir a proliferação e a diferenciação dos osteoblastos, além de estimular a apoptose de osteoblastos. Estudo recente, com experimentação *in vivo* mostrou que a expressão de esclerotina pelos osteócitos foi reduzida por estimulação mecânica e aumentada pela falta de carga

mecânica, desta forma, a esclerotina e a sinalização Wnt tem importância fundamental na etiologia das desordens proximais do fêmur.⁵¹ A figura 4 apresenta a ação do estímulo mecânico sobre o tecido ósseo, sua ação sobre o gene *Sost* e a expressão de esclerotina.

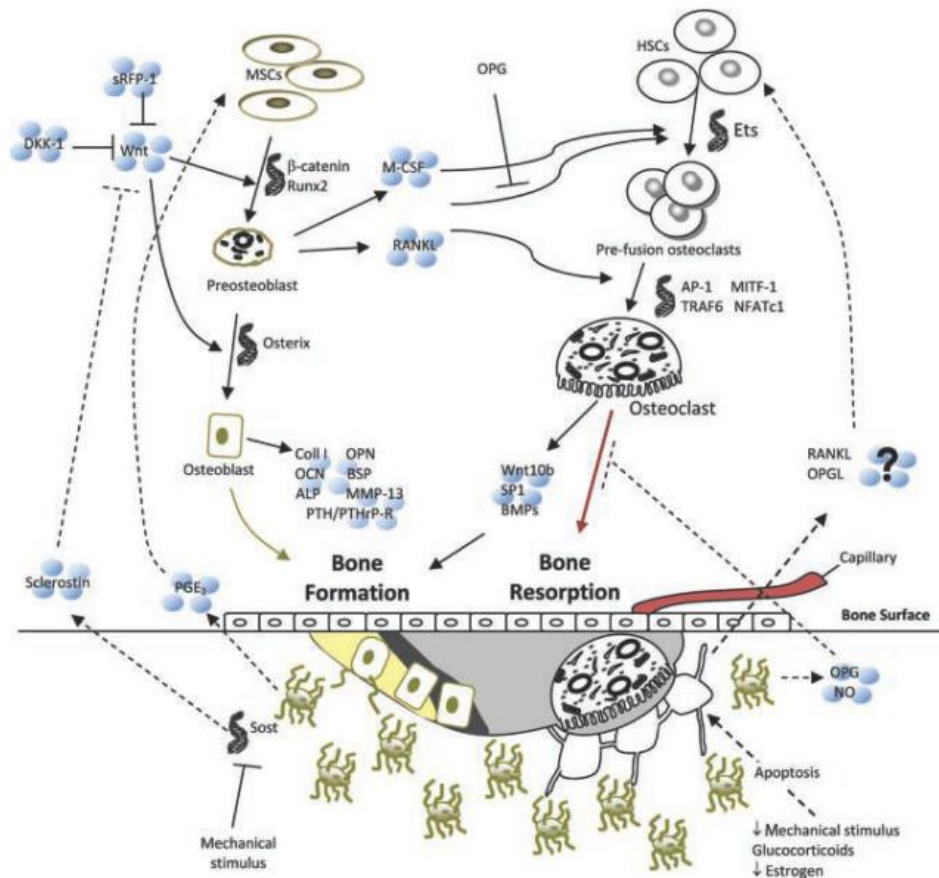


Figura 4 - Ação do estímulo mecânico sobre o gene *SOST* e a expressão de esclerotina, sua ação sobre a via Wnt, atuando sobre precursores de osteoblastos e conseqüentemente sobre a formação de massa óssea. Boskey e Coleman, 2010.⁵²

2 Objetivos

Objetivo Geral:

Propomos estudo para analisar a região do colo do fêmur de ratas no período do envelhecimento, após a realização de atividade física de resistência associada ou não a administração de RLX. Com este estudo pretendemos contribuir com informações que visem à prevenção de osteopenia e melhor qualidade de vida para organismos femininos na senilidade.

Objetivos Específicos:

- ✚ Avaliar o efeito de 04 meses de treinamento resistido (EX) sobre a estrutura óssea de ratas sham e OVX com 18 meses de vida;
- ✚ Analisar a ação de raloxifeno, associado ou não ao treinamento resistido, por meio das concentrações plasmáticas de TRAP, OPG, osteocalcina e fosfatase alcalina como indicadores de predisposição à reabsorção ou formação de tecido ósseo.
- ✚ Verificar a qualidade do tecido ósseo da região epifisária proximal dos fêmures de ratas sham e OVX de todos os grupos experimentais, pela análise de densitometria óssea e microtomografia óssea.

3 Metodologia

O protocolo experimental deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Experimental Animal (CEEA) da Faculdade de Odontologia do *Campus* de Araçatuba – FOA/UNESP (001397-2010) (anexo A).

3.1 Animais

Para o presente estudo, foram utilizadas 80 ratas Wistar (18 meses) shans e ovariectomizadas. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (quatro animais/caixa) em ambiente com temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo de luz controlado (12/12 h), com acesso livre a água e ração. Os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais:

- G1- Sham/NaCl
- G2- Sham/NaCl + EX
- G3- Sham + raloxifeno
- G4- Sham + raloxifeno + EX
- G5- OVX/NaCl
- G6- OVX/NaCl + EX
- G7- OVX + raloxifeno
- G8- OVX + raloxifeno + EX

3.2 Ciclo estral

O acompanhamento e análise do ciclo estral das ratas foi realizado durante 15 dias. Os animais que apresentaram aciclicidade foram aleatoriamente divididos nos grupos experimentais. O acompanhamento do ciclo estral de todos os animais foi realizado por meio do esfregaço vaginal colhido no período matutino (9h) e analisado a fresco ao microscópio óptico, segundo a técnica de Long e Evans.⁵³ A figura 5 apresenta a incidência de ratas que apresentam mudanças no padrão reprodutivo em relação à idade (meses).

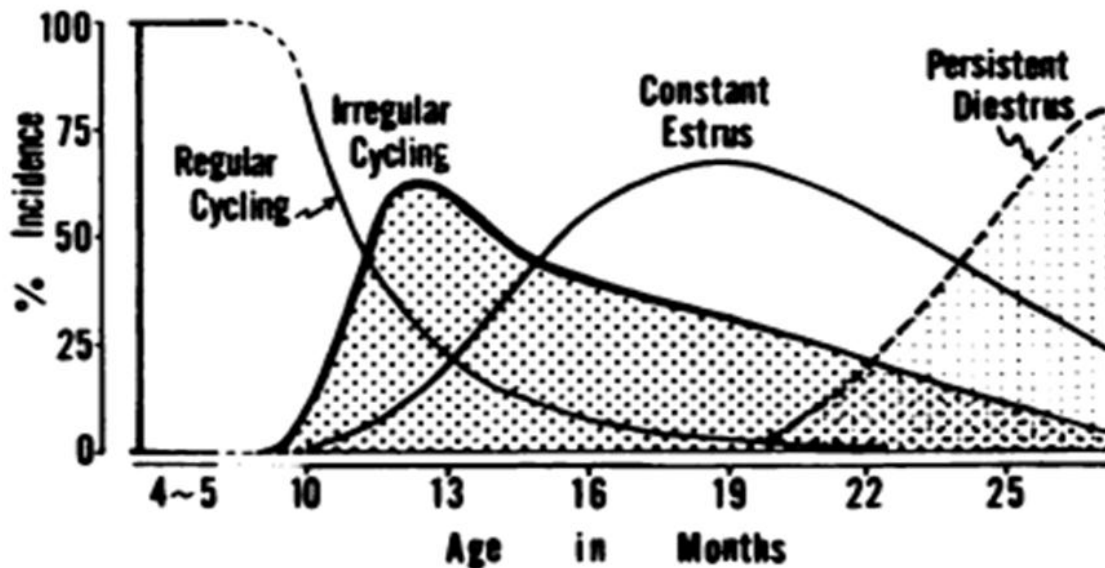


Figura 5 - Mudança cronológica em padrões reprodutivos de ratas entre 9 e 26 meses. Lu e colaboradores, 1979.⁵⁴

3.3 Ovariectomia

Após análise do ciclo estral, as ratas (14 meses) foram sham ovariectomizadas ou ovariectomizadas (OVX).⁵⁵ Os animais foram anestesiados com cloridrato de quetamina (Vetaset - Fort Dodge/ 50 mg/Kg p.c., i.p.) e xilazina (Coopazine - Coopers Brasil Ltda/25 mg/Kg p.c., i.p.), para a realização de incisões abdominais laterais e exposição das porções distais do útero. Logo após, foi realizada a remoção dos ovários nos animais dos grupos G5 ao G8. Os animais dos grupos G1 a G4 tiveram as porções distais devolvidas para a cavidade abdominal. Em seguida, todos os animais experimentais foram suturados e receberam dose profilática de antibiótico (Pentabiótico Veterinário, 0,2 mL/animal, i.m.).

3.4 Tratamento

Após 10 dias da OVX e durante 120 dias, foi administrado diariamente, por gavagem, solução fisiológica (0,3 mL/NaCl 0,15M) nos animais dos grupos 1, 2, 5 e 6 e RLX (1 mg/Kg/d) nos animais dos grupos

3, 4, 7 e 8.

3.5 Treinamento Resistido

Os animais dos grupos 2, 4, 6 e 8, realizaram treinamento resistido em escada [1.1 3 x 0.18 m; 2 cm grade; 80° de inclinação; com local para descanso no topo (diâmetro de 20 x 20 x 20 cm)]⁴⁸ três vezes por semana, durante 120 dias. A figura 6 apresenta a escada utilizada para o treinamento resistido e os animais executando o treinamento.

Dez dias após a cirurgia e durante uma semana, os animais foram submetidos a período de adaptação à escada. Na segunda semana, os animais foram submetidos a teste de força máxima, com uso de dois tubos de carga (esferas de aço) acoplados à cauda. A partir da segunda semana foram acoplados à cauda de cada um, os tubos de carga relativos a 20 % da força máxima, que foi semanalmente progredido em 10% até atingir 80% da força máxima. Após este período, foi realizado novo teste de força máxima para readequação da carga e realização de exercícios com 80 % da força máxima por quatro semanas.

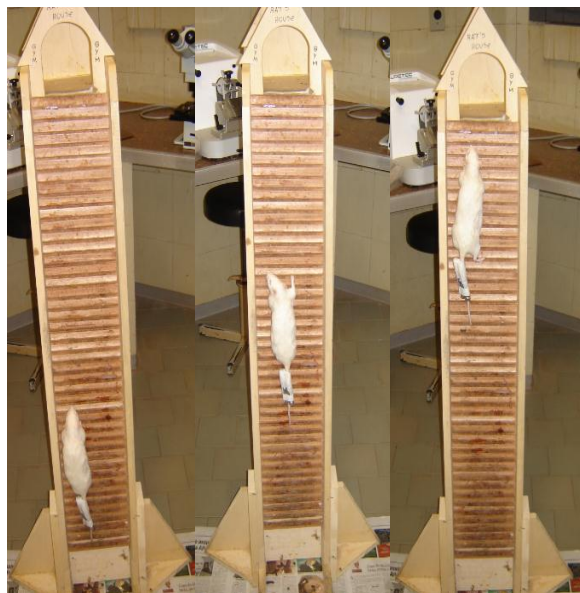


Figura 6 - Escada utilizada para o treinamento resistido. Animais realizando o treinamento resistido.

Ao final do 3º mês de exercício, os animais foram submetidos a novo teste de força máxima para readequação da carga, o que permitiu a realização dos exercícios com 80% da força máxima, até o final da 16ª semana. A tabela 1 apresenta o protocolo do treinamento resistido estabelecido para este estudo.

Tabela 1 - Protocolo de treinamento resistido.

Semanas	Dias	Carga(%)
1ª		Adaptação
2ª	1	TFM*
	2-7	20%
3ª		30%
4ª		40%
5ª		50%
6ª		60%
7ª		70%
8ª		80%
9ª	1	TFM
	2-7	80%
10ª/12ª		80%
13ª	1	TFM
	2-7	80%
14ª a 16ª		80%

*Teste de Força Máxima

3.6 Coleta de Materiais

Vinte e quatro horas após o último dia de treinamento e administração de RLX, os animais foram anestesiados e realizada a coleta sanguínea, de acordo com técnica descrita por Harms e Ojeda.⁵⁶ O sangue foi centrifugado (2.500 RPM; 15 min; 2⁰C) e o plasma armazenado para dosagens posteriores de marcadores de atividade celular do metabolismo ósseo. Após coleta sanguínea, os animais foram sacrificados com dose excessiva de anestésico para a retirada dos fêmures, os quais foram utilizados para densitometria óssea, testes biomecânicos e microtomografia.

3.7 Densitometria Óssea

A densidade mineral óssea areal e o conteúdo mineral ósseo foram determinados nos fêmures direitos dos animais, utilizando densitômetro modelo DPX-ALPHA LUNAR (Figura 7), com software especial para pequenos animais pertencente ao Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal – FOA/UNESP.

A avaliação densitométrica foi realizada no início do experimento, ou seja, na ocasião da separação dos grupos e após o sacrifício dos animais e dissecação dos fêmures.



Figura 7 - Densitômetro DPX-ALPHA LUNAR.

3.8 Microtomografia Óssea

Foi realizada avaliação tridimensional não destrutiva da arquitetura óssea dos fêmures, com microtomógrafo computadorizado Skyscan 1172 (Aartselaar, Bélgica). O fêmur foi posicionado craniocaudalmente para a obtenção das fatias, resolução de 12x12x12 μm .⁵⁷ A região de interesse de osso trabecular foi manualmente interpolada e foram analisados 60 fatias, na região que compreende cabeça, colo e trocânter maior do fêmur, 270 fatias abaixo da primeira imagem óssea. A figura 8 apresenta a região analisada na microtomografia óssea.

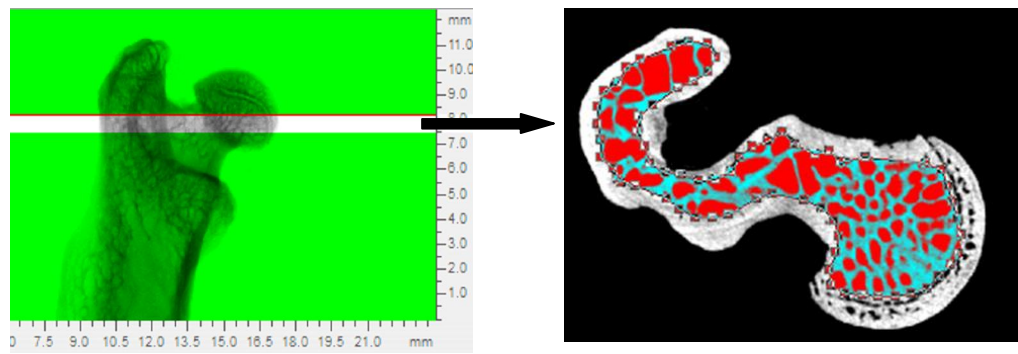


Figura 8 - Microtomografia Óssea. À esquerda, região de interesse da imagem obtida na microtomografia óssea (270 fatias abaixo da primeira imagem óssea), à direita região de interesse manualmente interpolada do osso trabecular.

As análises de espessura trabecular e número de trabéculas foram realizadas em 3D, já as análises de fator de padrão trabecular (conectividade) e porosidade fechada foram realizadas em 2D. A porosidade fechada em 2D é mensurada fatia por fatia no CT analyser. Objetos binarizados são identificados contendo espaços totalmente fechados, e a porosidade fechada é a área destes espaços como porcentagem da área total do objeto binarizado. A mensuração de porosidade fechada ignora espaços que não são totalmente circundados por sólido. Porosidade fechada em 2D é geralmente muito maior que seu equivalente em 3D, pois uma região do espaço é mais provável de ser circundada por sólido em plano único e transversal em 2D do que em todas as direções em 3D.

Fator de padrão trabecular (Tb.Pf) é o índice inverso da conectividade, aplicou-se originalmente para imagens 2D de osso trabecular, e ele calcula índice de convexidade relativa ou concavidade da superfície óssea total, no princípio de que concavidade indica conectividade, e convexidade indica estruturas desconectadas. Tb.Pf é calculado em 2D comparando área e perímetro de sólido binarizado antes e depois da aplicação de dilatação. Como resultado, valores inferiores de Tb.Pf significa trabéculas mais conectadas, enquanto valores maiores de Tb.Pf significa trabeculado mais desconectado. A prevalência de cavidades fechadas e superfícies côncavas pode levar Tb.Pf para valores negativos.⁵⁸

3.9 Análises Bioquímicas

Foram realizadas análises bioquímicas de cálcio, fósforo e fosfatase alcalina para verificação da atividade celular do metabolismo ósseo.

3.9.1 Cálcio

As determinações de cálcio foram realizadas por método espectrofotométrico (Kit marca Labtest cat. 90). O cálcio reage com a púrpura de ftaleína em meio alcalino, formando complexo de cor violeta. A absorbância foi determinada em 570 nm.

3.9.2 Fósforo

As determinações de fósforo foram realizadas pelo método espectrofotométrico de Daly e Ertingshausen (1972)⁵⁹ modificado, utilizando kits comerciais, marca Labtest (Cat. 12). O fósforo inorgânico reage com o molibdato de amônio na presença de ácido sulfúrico, resultando na formação de complexo fosfomolibdato não reduzido, que foi determinado em 340 nm.

3.9.3 Fosfatase alcalina

A fosfatase alcalina foi determinada por método de ROY (1970)⁶⁰ modificado, com o emprego de Kits da marca Labtest (Cat. 40), por reação de ponto final, utilizando como substrato timolftaleína monofosfato.

3.10 Determinação das concentrações plasmáticas de TRAP, OPG e Osteocalcina

Foi realizado, por técnica quantitativa e imunoenensaio em sanduiche com enzima ligada (ELISA), a determinação das concentrações plasmáticas de TRAP [Acid phosphatase 5, Tartrate resistant (Catalog: E90902Ra)], OPG [Osteoprotegrin (Catalog: E90108Ra)] e osteocalcina [Osteocalcin (Catalog: E90471Ra)] como indicadores de predisposição à reabsorção ou formação de tecido ósseo, utilizando kits específicos para ratos da marca Uscn Life Science Inc. (Wuhan, China).

3.11 Análise Estatística

A normalidade dos dados foi analisada e os mesmos submetidos a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Newman-Keuls, utilizando o programa GraphPad Prism. O nível crítico foi fixado em 5% ($p < 0,05$) para se admitir diferença de valores como estatisticamente significantes.

4 Resultados

O acompanhamento do ciclo estral dos animais experimentais evidencia que a maioria dos animais com 14 meses, antes de serem separados nos diferentes grupos apresentavam-se em diestro persistente ou metaestro prolongado (figura 9), evidenciando irregularidade do ciclo. Neste estudo foram utilizadas as ratas que estavam em diestro persistente.

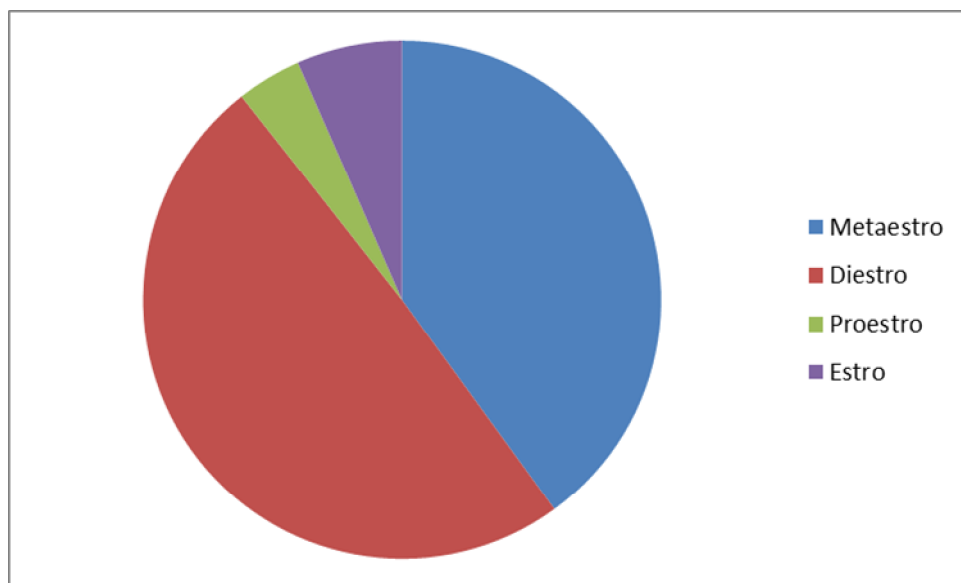


Figura 9 - Análise do ciclo estral de 80 ratas de 14 meses. Metaestro (40%), Diestro (49,36%), Proestro (4,04%) e Estro (6,60%).

Os ensaios bioquímicos evidenciaram que as concentrações plasmáticas de cálcio e fósforo dos animais de todos os grupos experimentais mantiveram o equilíbrio (Fig. 10 A, B). Entretanto, a atividade da FAL nas ratas OVX foi significativamente maior, exceto no grupo de ratas que realizaram treinamento resistido (Fig. 10 C).

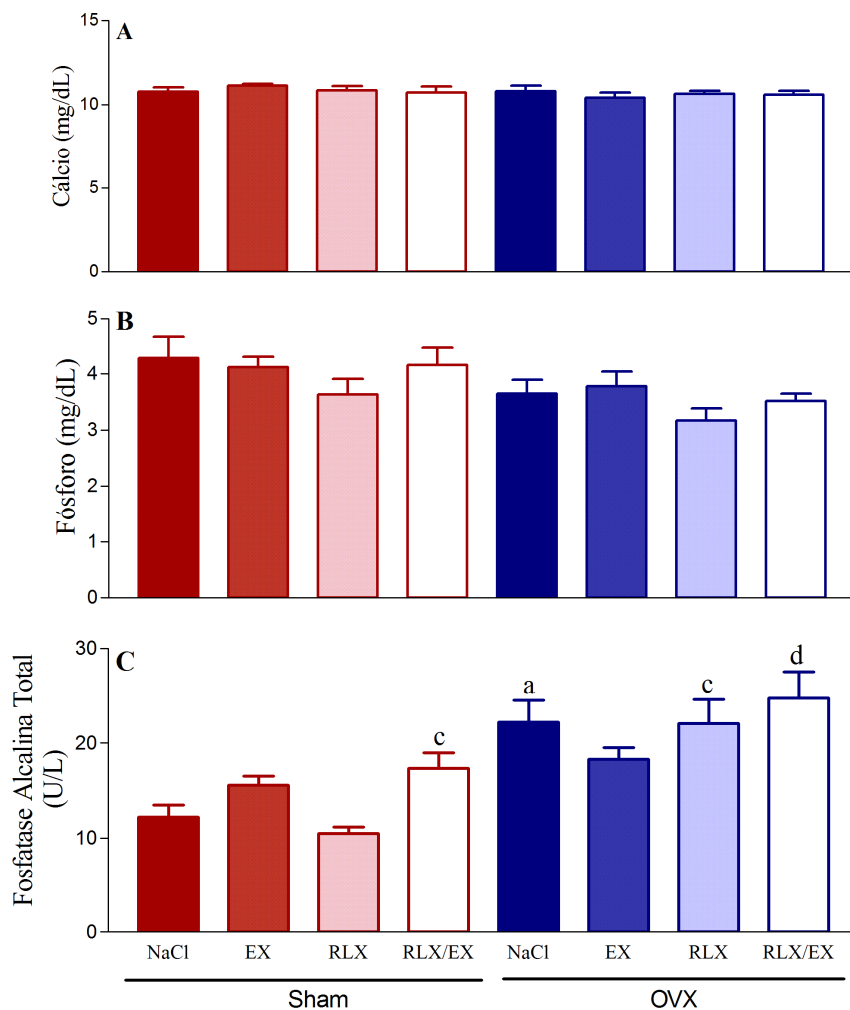


Figura 10 - Concentração plasmática de cálcio (A), fósforo (B), fosfatase alcalina total (C), de ratas sham ou ovariectomizadas (OVX) com 18 meses que receberam, durante 120 dias, NaCl (0,15M) ou RLX (1 mg/Kg/dia) associados ou não ao exercício (EX). ^ap<0,05 vs Sham/NaCl, ^cp<0,05 vs Sham/RLX, ^dp<0,05 vs Sham/RLX/EX.

Nos animais sham-OVX a associação de RLX com exercício (grupo RLX/EX) resultou em diminuição significativa na concentração plasmática de osteocalcina (OC, Fig. 11A) e também do aumento de TRAP desencadeado por RLX (Fig. 11C). A concentração plasmática de OPG, das ratas sham-OVX, diminuiu após os diferentes tratamentos (Fig. 11 B).

Nos animais OVX, o exercício e RLX associados ou não, diminuíram a concentração plasmática de OC (Fig. 11A) e de OPG (Fig. 11B). A

concentração plasmática de TRAP nos animais OVX não foi alterada em nenhum dos grupos experimentais (Fig. 11C).

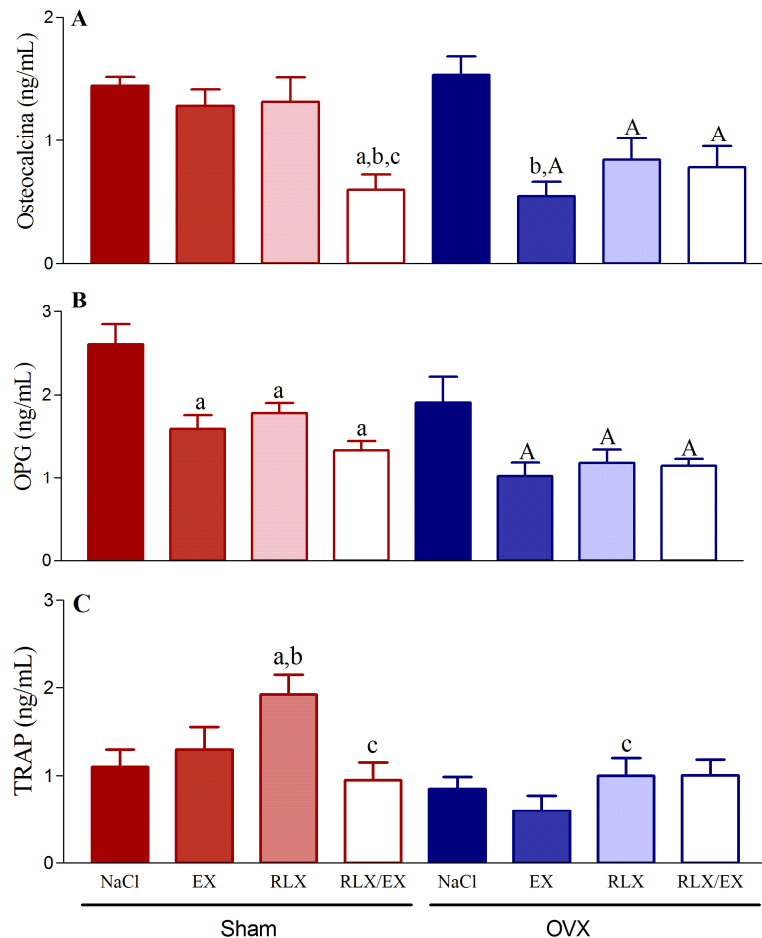


Figura 11 - Concentração plasmática de osteocalcina (A), osteoprotegerina (OPG;B), fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP;C), de ratas sham ou ovariectomizadas (OVX) com 18 meses que receberam, durante 120 dias, NaCl (0,15M) ou RLX (1 mg/Kg/dia) associados ou não ao exercício (EX). ^ap<0,05 vs Sham/NaCl, ^bp<0,05 vs Sham/EX, ^cp<0,05 vs Sham/RLX, ^Ap<0,05 vs OVX/NaCl.

A análise da densitometria óssea inicial (14 meses) e final (18 meses) dos animais mostra em todos os grupos, conteúdo mineral ósseo (CMO;g) e área total (área; cm²) significativamente maiores ao final dos 18 meses, já, quando temos a relação de CMO e área, dada pela densidade mineral óssea areal (aDMO), o grupo OVX/NaCl evidencia significativa diminuição deste parâmetro ao final do experimento (Tabela 2).

Tabela 2 - Densidade Mineral Óssea Inicial (I) e final (F), Conteúdo Mineral Ósseo (CMO, g), area total (cm²) e Densidade Mineral Óssea areal (aDMO, g/cm²) de ratas sham ou ovariectomizadas com 18 meses que receberam por 120 dias NaCl (0,15M) ou RLX (1 mg/Kg/dia) associados ou não ao exercício (EX). $p < 0,05$ vs Inicial.

	Grupos Experimentais															
	Sham/NaCl		Sham/EX		Sham/RLX		Sham/R/E		OVX/NaCl		OVX/EX		OVX/RLX		OVX/R/E	
	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F
CMO (g)	0,28	0,40 ^x	0,27	0,39 ^x	0,29	0,40 ^x	0,30	0,41 ^x	0,28	0,35 ^x	0,28	0,37 ^x	0,29	0,37 ^x	0,30	0,38 ^x
Área (cm ²)	1,16	1,89 ^x	1,12	1,85 ^x	1,33	1,81 ^x	1,31	1,93 ^x	1,14	1,89 ^x	1,32	1,84 ^x	1,30	1,90 ^x	1,37	1,91 ^x
aDMO (g/cm ²)	0,24	0,21	0,24	0,21	0,23	0,22	0,23	0,21	0,25	0,18 ^x	0,22	0,20	0,23	0,19	0,22	0,21

A análise morfométrica da microtomografia óssea (Fig. 12) da região trabecular do colo femoral das ratas com 18 meses, utilizadas neste estudo, evidencia osteopenia, sendo mais intensa nos animais dos grupos de ratas OVX. Nas ratas OVX, o período de realização do treinamento resistido desencadeou formação óssea ligeiramente menor do que a administração de RLX durante o mesmo período de tempo. Nos animais OVX/RLX observa-se trabeculado mais organizado e com maior quantidade de massa óssea do que nos sham que receberam RLX. Além disso, pode ser constatada a formação de placa óssea nos ossos dos animais do grupo sham que receberam RLX. A associação dos tratamentos resultou em maior formação óssea em ambos os grupos (sham e OVX). Entretanto, o grupo de ratas sham que recebeu as duas terapias apresentou trabeculado ósseo mais consistente e organizado que os demais grupos experimentais.

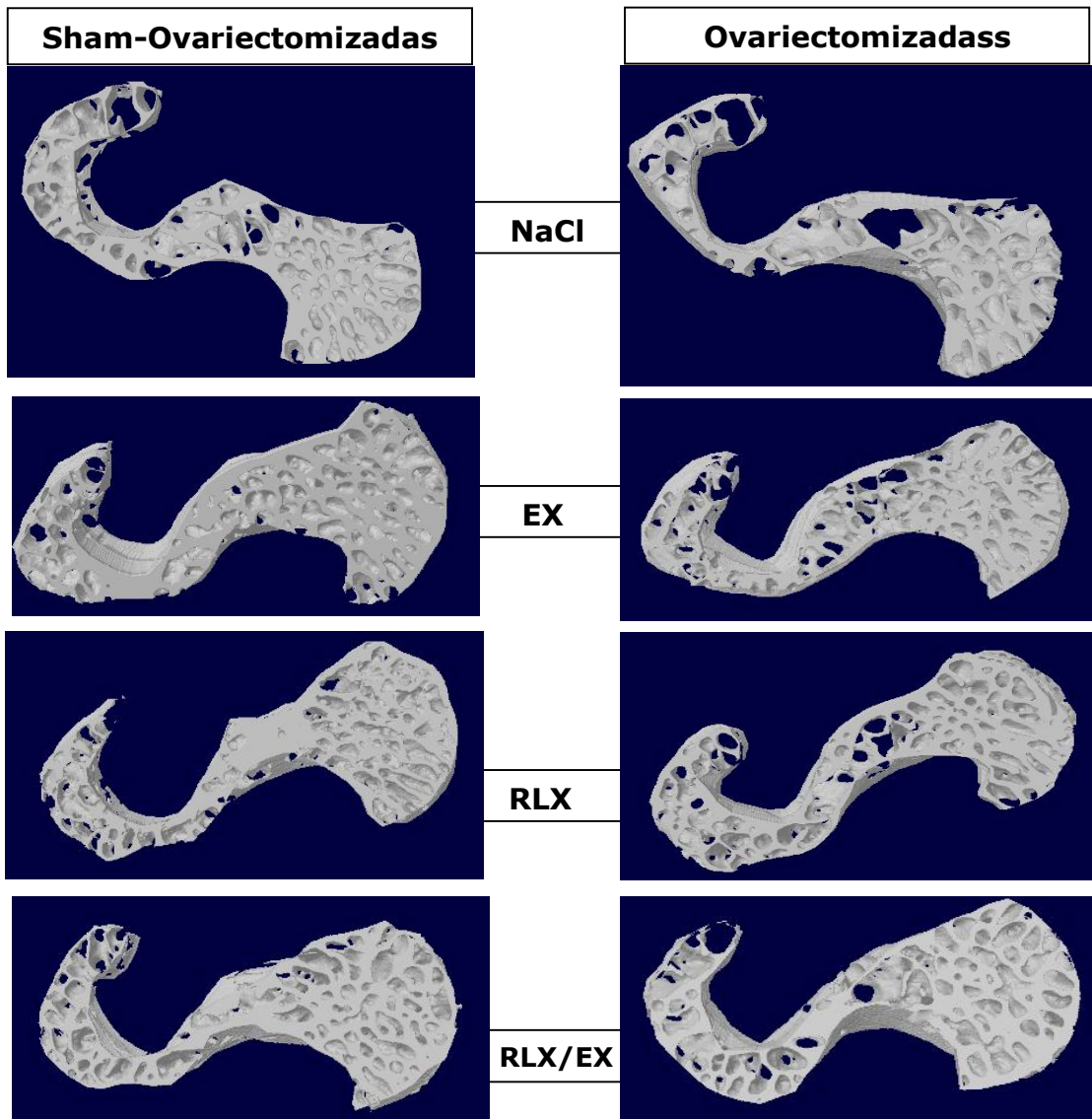


Figura 12 - Reconstrução em 3D de 60 fatias (protocolo descrito acima) da microtomografia do osso trabecular da região do colo femoral de ratas Sham/OVX e OVX com 18 meses, que receberam por 120 dias NaCl (0,15M) ou RLX (1 mg/Kg/dia) associados ou não ao exercício (EX).

Entre os grupos experimentais de ratas sham-OVX não foi detectada diferença significativamente estatística nas análises de espessura, número de trabéculas bem como no grau de porosidade e conectividade das trabéculas dos fêmures na região do colo femoral (Fig. 13). Nas ratas OVX o perfil de resposta foi diferente, como por exemplo, a maior espessura trabecular das ratas OVX/NaCl foi significativamente reduzida com a realização de exercícios, pelo tratamento com RLX ou em resultado à associação destes (Fig 13A). Entretanto, nos animais OVX que receberam

RLX ou a associação de RLX e EX observa-se aumento no número de trabéculas em relação às OVX/NaCl (Fig. 13B). Os animais OVX que receberam RLX apresentaram maior grau de conectividade e maior porosidade fechada em relação a todos os outros grupos OVX e a seu controle sham (Fig. 13C; D).

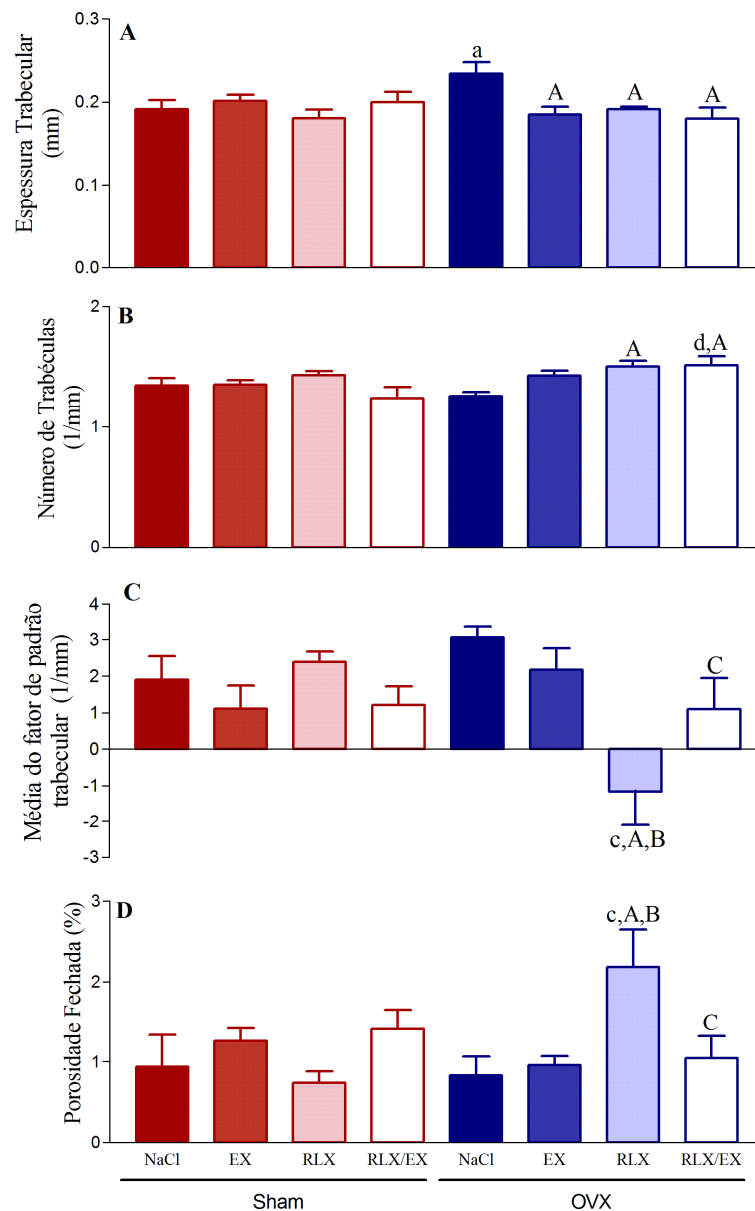


Figura 13 - Espessura Trabecular (A), Número de Trabéculas (B), media do padrão de fator trabecular (conectividade, C) e porosidade fechada (D) de ratas sham ou ovariectomizadas (OVX) com 18 meses que receberam, durante 120 dias, NaCl (0,15M) ou RLX (1 mg/Kg/dia) associados ou não ao exercício (EX). ^a $p < 0,05$ vs Sham/NaCl, ^c $p < 0,05$ vs Sham/RLX, ^d $p < 0,05$ vs Sham/RLX/EX, ^A $p < 0,05$ vs OVX/NaCl, ^B $p < 0,05$ vs OVX/EX, ^C $p < 0,05$ vs OVX/RLX.

5 Discussão

Os resultados obtidos neste estudo revelam a ocorrência de osteopenia na região trabecular do colo femoral das ratas com 18 meses, sendo esta acentuada pela ovariectomia. A realização do treinamento resistido, a administração de RLX e, principalmente, a associação destes desencadearam aumento de massa óssea nos animais experimentais e reverteram em diferentes graus o quadro de osteopenia.

Alguns autores correlacionam à osteoporose que acomete as mulheres na pós-menopausa com vários fatores, como por exemplo, o estresse oxidativo⁶¹. Entretanto, é consenso na literatura que a diminuição da concentração plasmática do esteróide sexual feminino impõe ao tecido ósseo aumento da taxa de remodelamento, danos à microarquitetura óssea, diminuição da força óssea e, conseqüentemente, aumento do risco de fraturas.^{62, 63}

Em estudos com experimentação animal, a ovariectomia tem sido utilizada como modelo para desencadear osteopenia induzida pela deficiência de estradiol, como em mulheres na pós-menopausa⁶⁴. Entretanto, são organismos jovens com concentração plasmática menor de esteróide e que não apresentam as alterações decorrentes do envelhecimento, como mudanças na densidade e área transversal do colo do fêmur.^{65,66} Neste estudo foram analisadas estruturas ósseas e concentrações plasmáticas de marcadores do metabolismo ósseo de ratas com 18 meses, isto é, em animais com idade que corresponde ao período inicial da menopausa em mulheres. Esses animais foram submetidos a tratamento com SERMs e/ou atividade física durante período que antecede a estropausa (14 aos 18 meses) para estudo e determinação de metodologia que contribua com prevenção à osteopenia desencadeada pelo envelhecimento. Além disso, foram analisados os mesmos parâmetros em ratas de mesma idade e ovariectomizadas há 04 meses, para estudar a

ação do SERM e atividade física em organismos após a diminuição abrupta de estradiol.

Nos dois grupos analisados (sham e OVX) foi constatado osteopenia na região de colo femoral. Os resultados obtidos na reconstrução 3D da microtomografia óssea evidenciam que a osteopenia da região trabecular do colo femoral das ratas foi acentuada pelo hipoestrogenismo desencadeado pela OVX, evidenciado pela diminuição da DMO final, espaços intertrabeculares maiores e concentrações plasmáticas aumentadas de fosfatase alcalina, sinalizando fragilidade óssea maior no grupo de ratas OVX/NaCl.

A mineralização óssea está envolvida com as alterações na massa óssea bem como na qualidade óssea, pois o conjunto das proteínas não colagenosas presentes na matriz extracelular atua regulando a mineralização e mantendo a resistência, estabilidade e integridade óssea⁶⁷⁻⁶⁹. No osso osteopênico, a relação entre proteínas não colagenosas e conteúdo mineral é requerida para estabelecer a formação de tecido calcificado em padrões de normalidade e patológico, bem como para desenvolver estratégias para prevenir a perda óssea. Alguns estudos têm indicado que o conteúdo destas proteínas foi reduzido em osso osteopênico⁷⁰⁻⁷², desencadeando alterações na qualidade e quantidade de matriz orgânica e mineral nestes ossos.

Mediante o exposto, sugerimos que a diminuição na concentração plasmática de estradiol nas ratas OVX contribuiu significativamente para o processo de osteopenia verificado neste grupo de animais, possivelmente devido ao aumento do turnover ósseo, ou seja, aumento da atividade osteoclástica que resultou em maior reabsorção. Associado a isto, a deficiência estrogênica alterou, possivelmente, a produção de proteínas não colagenosas, por meio de seu efeito sobre as células ósseas, resultando em remodelamento ósseo alterado.

A realização do treinamento resistido, administração de RLX e a associação destes, desencadearam aumento de massa óssea nos animais

dos diferentes grupos experimentais e reverteram em diferentes graus o quadro de osteopenia.

Estudos revelam que níveis séricos aumentados de OC e FAL são detectados em mulheres, principalmente nos primeiros cinco anos após menopausa e podem estar associados com aumento do risco de fraturas e osteoporose.⁷³ No presente estudo, a concentração plasmática de fosfatase alcalina total é maior nos animais OVX e os tratamentos realizados diminuíram os níveis séricos de OC bem como OPG, evidenciando alteração no turnover ósseo promovida pelo EX e/ou RLX, controlando a diferenciação e atividade osteoclástica.

O estímulo proporcionado pelo treinamento resistido, com duração de 120 dias, promoveu diminuição nos espaços intertrabeculares, alterando a quantidade e a distribuição de mineral no tecido. Possivelmente, a atividade física realizada atuou regulando a apoptose de osteócitos, pela ação da esclerotina, sendo esta resposta modulada pelo estradiol.

Estudo realizado com ratas Fisher de 18 meses, OVX e tratadas durante 180 dias com RLX evidenciou aumento no volume ósseo trabecular, espessura trabecular e maior resistência na compressão.⁷⁴ Entretanto, em cadelas beagle intactas, o RLX (0,50 mg/kg/dia) diminuiu o turnover ósseo, não produziu diferenças significativas na densidade mineral óssea areal e volumétrica, porém, a medida de força independente da BMD, calculada por carga máxima/aBMD, foi maior nos animais RLX quando comparados com os controle. Os autores concluíram que o RLX produz melhorias nas propriedades mecânicas do osso sem envolver aumento na BMD.⁷⁵

Esses dados são evidenciados em nosso estudo pela diminuição da concentração plasmática de OPG nos animais que receberam RLX, assim como pela diminuição da concentração de OC nos animais OVX que receberam RLX, além do aumento de número de trabéculas, grau de conectividade e porosidade fechada, apresentados na μ CT óssea, mostrando melhora da microarquitetura deste tecido. Os resultados obtidos em nosso estudo evidenciam que em ratas estrógeno-deficientes o

tratamento com agente anti-reabsortivo foi benéfico na microarquitetura, mineralização e turnover ósseo.

Nas ratas sham, a transição para ciclos irregulares foi de maneira gradual e não abrupta, caracterizando o envelhecimento. As imagens das microtomografias evidenciam que neste grupo de animais o exercício físico realizado desencadeou melhora na microarquitetura óssea, com diminuição dos espaços intertrabeculares e melhor organização do trabeculado. A administração de RLX nestes animais também alterou estes parâmetros, porém, chama a atenção os valores obtidos no ensaio para determinar a concentração plasmática de TRAP, os quais foram maiores nos animais sham/RLX. Aventamos a possibilidade da ocorrência de mecanismo de controle da formação de massa óssea uma vez que o RLX atua estimulando a formação de massa óssea. Além disso, a diminuição da concentração plasmática de OPG evidencia atuação em prol da osteoblastogênese e controle na osteoclastogênese. A associação do tratamento anti-reabsortivo e realização do exercício físico melhorou o trabeculado ósseo destes animais, sendo esta resposta melhor que a ocorrida no grupo de ratas OVX. Reforçando este resultado, detectamos diminuição plasmática de proteína não colagenosa mais abundante da matriz óssea, a OC, o que pode evidenciar potencial preventivo desta associação e favorecer o trabeculado ósseo.

Este conjunto de resultados indica que a ocorrência de osteopenia na região do colo do fêmur de ratas com 18 meses (período inicial da estropausa) pode ser prevenida com a realização de atividade física associada ou não ao SERM. Nossos resultados sugerem que a realização de treinamento resistido durante 120 dias no período inicial da aciclicidade estral desencadeia trabeculado ósseo mais organizado nos animais sham quando comparado com ratas OVX, de mesma idade. Além disso, evidencia que nos animais OVX 120 dias de treinamento resistido não foram suficientes para desencadear as mesmas respostas que nos animais sham, necessitando de tempo maior de treinamento resistido. Possivelmente esta diferença de resposta ocorreu devido à diminuição abrupta do estrogênio

imposto pela ovariectomia. Estes resultados sugerem que o exercício físico de resistência desencadeou aumento na deposição de matriz osteóide pelos osteoblastos em cada ciclo de remodelação, corroborando com os resultados obtidos por Delmas⁷⁶ e Russo⁷⁷.

Nos animais que receberam terapia anti-reabsortiva com RLX, notamos diferentes perfis de resposta entre os animais sham-ovariectomizados e ovariectomizados, pois a formação óssea nos animais OVX parece ser maior que nos animais sham, mostrando trabeculado melhor. Estes resultados evidenciam a eficácia na ação da terapia anti-reabsortiva que objetiva o aumento da densidade óssea atuando na diminuição da reabsorção ou no aumento na formação óssea.^{78, 79} Ao reduzir a atividade osteoclástica os agentes anti-reabsortivos permitem que as lacunas ósseas sejam preenchidas por osso novo antes que outro ciclo de remodelação se inicie.⁸⁰ Nos animais sham, ocorreu formação de placas ósseas na região do colo femoral, nestes animais, acreditamos estar ocorrendo mecanismo de retroalimentação controlando a formação óssea excessiva, o que poderia explicar as altas concentrações plasmáticas de TRAP nestes animais.

A associação das terapias, ou seja, RLX associado ao EX diminuiu as diferenças descritas acima, na formação e distribuição da massa óssea na região de colo femoral das ratas sham e OVX, observando-se assim nos animais sham o trabeculado ósseo melhor distribuído.

6 Conclusões

Com base na metodologia utilizada neste estudo e os resultados obtidos, podemos concluir que:

- o modelo experimental de ratas Wistar com 18 meses é viável para estudos das desordens ósseas durante o envelhecimento, pois alterações decorrentes do processo fisiológico de envelhecimento, como osteopenia e alteração no trabeculado ósseo, foram verificadas nestes animais;

- a realização de treinamento resistido, durante 120 dias, no período inicial da aciclicidade estral desencadeia maior formação de massa óssea e trabeculado ósseo mais organizado na região do colo do fêmur de ratas com 18 meses;

- o período de 120 dias de treinamento de força não é suficiente para a reversão da osteopenia nas ratas OVX;

- a eficácia de ação da terapia anti-reabsortiva, ou seja, o aumento na formação óssea foi favorecido pela diminuição abrupta do estradiol proporcionada pela OVX;

- a utilização de terapia anti-reabsortiva e a realização de treinamento resistido proporcionam efeitos benéficos sobre o tecido ósseo de organismos no período do envelhecimento e são modulados pelo estradiol.

Estes resultados sinalizam que há terapias adequadas a cada paciente, conforme seu perfil hormonal. É de fundamental importância traçar o perfil hormonal das pacientes, saber se elas estão passando pelo processo fisiológico de envelhecimento, onde as diminuições das concentrações de estrógeno ocorrem de forma gradual ou se por algum motivo foram expostas à retirada abrupta do estrógeno devido, por exemplo, a histerectomia radical. Portanto, nosso estudo evidencia que estas informações são importantes para determinar a escolha terapêutica

para os pacientes visando o potencial preventivo das terapias, evitando gastos com saúde pública além de possibilitar melhor qualidade de vida aos pacientes.

Referências

1. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicador de população. 2000. [citado 2010 mar 10]. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao>.
2. Bonewald LF, Johnson ML. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone*. 2008;**42**(4):606-15.
3. Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS. The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol*. 2008;**61**(5):577-87.
4. Huang J, Wang X, Zhang TL, Wang K. Alterations of ovariectomized rat bone and impact of non-collagenous proteins on mineralization. *Joint Bone Spine*. 2009;**76**(2):176-183.
5. Amadei SU, Silveira VAS, Pereira AC, Carvalho YR, Rocha RF. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. *J Bras Patol Med Lab*. 2006;**42**(1):5-12.
6. Lerner UH. Bone remodeling in post-menopausal osteoporosis. *J Dent Res*. 2006;**85**(7):584-95.
7. Wiktor-Jedrzejczak W, Bartocci A, Ferrante AW, Ahmed-Ansari A, Sell KW, Pollard JW, et al. Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;**87** (12): 4828-32.
8. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;**95**(7):3597-602.
9. Burgess TL, Qian Y, Kaufman S, Ring BD, Van G, Capparelli C, et al. The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J Cell Biol*. 1999;**145**(3):527-38.
10. Grimaud E, Soubigou L, Couillaud S, Coipeau P, Moreau A, Passuti N, et al. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) ratio is increased in severe osteolysis. *Am J Pathol*. 2003;**163**(5):2021-31.
11. Kearns AE, Khosla S, Kostenuik PJ. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocr Ver*. 2008;**29**(2):155-92.

12. Nakamura H, Tsuji T, Hirata A, Yamamoto T. Localization of osteoprotegerin (OPG) on bone surfaces and cement lines in rat tibia. *J Histochem Cytochem.* 2002;**50**(7):945-53.
13. Schoppet M, Preissner KT, Hofbauer LC. RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;**22**(4):549-53.
14. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* 2003;**423**(6937):337-42.
15. Riggs BL. The mechanisms of estrogen regulation of bone resorption. *J Clin Invest.* 2000;**106**(10):1203-4.
16. Pacifici R. Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 1996;**11**(8):1043-51.
17. Pacifici R, Rifas L, McCracken R, Vered I, McMurtry C, Avioli LV, et al. Ovarian steroid treatment blocks a postmenopausal increase in blood monocyte interleukin 1 release. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;**86**(7):2398-402.
18. Bonnelye E, Kung V, Laplace C, Galson DL, Aubin JE. Estrogen receptor-related receptor alpha impinges on the estrogen axis in bone: potential function in osteoporosis. *Endocrinology.* 2002;**143**(9):3658-70.
19. Chow JW, Lean JM, Chambers TJ. 17 beta-estradiol stimulates cancellous bone formation in female rats. *Endocrinology.* 1992;**130**(5):3025-32.
20. Oursler MJ, Cortese C, Keeting P, Anderson MA, Bonde SK, Riggs BL, et al. Modulation of transforming growth factor-beta production in normal human osteoblast-like cells by 17 beta-estradiol and parathyroid hormone. *Endocrinology.* 1991;**129**(6):3313-20.
21. Hughes DE, Dai A, Tiffée JC, Li HH, Mundy GR, Boyce BF. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. *Nat Med.* 1996;**2**(10):1132-6.
22. Kameda T, Mano H, Yuasa T, Mori Y, Miyazawa K, Shiokawa M, et al. Estrogen inhibits bone resorption by directly inducing apoptosis of the bone-resorbing osteoclasts. *J Exp Med.* 1997;**186**(4):489-95.
23. Bonnelye E, Aubin JE. Differential expression of estrogen receptor-related receptor alpha and estrogen receptors alpha and beta in osteoblasts in vivo and in vitro. *J Bone Miner Res.* 2002;**17**(8):1392-400.

24. Cardoso Neto C, Franco M, Cunha, M.S.C.A., Miyasaka CK. Efeitos da ovariectomia experimental no metabolismo ósseo de ratas wistar adultas: um modelo para estudo da osteoporose. *Rev Cienc Med Biol.* 2006;**5**(3):231-8.
25. World Health Association. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Geneva: World Health Organization; 1994.
26. Giacomini DR, Mella EAC. Reposição hormonal: vantagens e desvantagens. *Semina Cienc Biol Saude.* 2006;**17**(1):71-92.
27. Kato S. [Molecular mechanism of tissue-specific actions of SERM]. *Clin Calcium.* 2006;**16**(9):1469-74. [japonês]
28. Ramalho ACR, Castro ML, Solal MEC, Vernejoul MC. Porque estrógeno e raloxifeno melhoram a densidade mineral óssea? Mecanismo de ação do estrógeno e de um modulador seletivo do receptor de estrógeno (SERM) no osso. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2000; **44**(6):471-82.
29. Clemett D, Spencer CM. Raloxifene: a review of its use in postmenopausal osteoporosis. *Drugs.* 2000;**60**(2):379-411.
30. Rey JR, Cervino EV, Rentero ML, Crespo EC, Alvaro AO, Casillas M. Raloxifene: mechanism of action, effects on bone tissue, and applicability in clinical traumatology practice. *Open Orthop. J* 2009;**3**:14-21.
31. Menkes A, Mazel S, Redmond RA, Koffler K, Libanati CR, Gundberg CM, et al. Strength training increases regional bone mineral density and bone remodeling in middle-aged and older men. *J Appl Physiol.* 1993;**74**(5):2478-84.
32. Aguirre JI, Plotkin LI, Stewart SA, Weinstein RS, Parfitt AM, Manolagas SC, et al. Osteocyte apoptosis is induced by weightlessness in mice and precedes osteoclast recruitment and bone loss. *J Bone Miner Res.* 2006;**21**(4):605-15.
33. Andreoli A, Monteleone M, Van Loan M, Promenzio L, Tarantino U, De Lorenzo A. Effects of different sports on bone density and muscle mass in highly trained athletes. *Med Sci Sports Exerc.* 2001;**33**(4):507-11.
34. Mullender MG, van der Meer DD, Huiskes R, Lips P. Osteocyte density changes in aging and osteoporosis. *Bone.* 1996;**18**(2):109-13.
35. Noble BS. The osteocyte lineage. *Arch Biochem Biophys.* 2008;**473**(2):106-11.

36. Pajevic PD. Regulation of bone resorption and mineral homeostasis by osteocytes. *IBMS BoneKey*. 2009;**6**:63-70.
37. Cadore EL, Brentano MA, Kruehl LFM. Efeitos da atividade física na densidade mineral óssea e na remodelação do tecido ósseo. *Rev Bras Med Esporte*. 2005;**11**(6):373-79.
38. Bailey CA, Brooke-Wavell K. Optimum frequency of exercise for bone health: randomised controlled trial of a high-impact unilateral intervention. *Bone*. 2010;**46**(4):1043-49.
39. Manske SL, Lorincz CR, Zernicke RF. Bone health: part 2, physical activity. *Sports Health*. 2009;**1**(4):341-6.
40. Huang TH, Lin SC, Chang FL, Hsieh SS, Liu SH, Yang RS. Effects of different exercise modes on mineralization, structure, and biomechanical properties of growing bone. *J Appl Physiol*. 2003;**95**(1):300-7.
41. Simões PA, Zamarioli A, Blóes P, Mazzocato FC, Pereira LH, Volpon JB, et al. Effect of treadmill exercise on lumbar vertebrae in ovariectomized rats: anthropometrical and mechanical analyses. *Acta Bioeng Biomech*. 2008;**10**(2):39-41.
42. Tae-Woong OH, Soon-Gill L, Mitsuru H. Resistance running exercise effectively prevents bone loss in ovariectomized rats. *Sports Sci*. 2006;**3**:8-17.
43. Wu J, Wang XX, Higuchi M, Yamada K, Ishimi Y. High bone mass gained by exercise in growing male mice is increased by subsequent reduced exercise. *J Appl Physiol*. 2004;**97**(3):806-10.
44. Kemper C, Oliveira RJ, Bottaro M, Moreno R, Bezerra LMA, Guido M, et al. Efeitos da natação e do treinamento resistido na densidade mineral óssea de mulheres idosas. *Rev Bras Med Esporte*. 2009;**15**(1):10-3.
45. Honda A, Sogo N, Nagasawa S, Shimizu T, Umemura Y. High-impact exercise strengthens bone in osteopenic ovariectomized rats with the same outcome as Sham rats. *J Appl Physiol*. 2003;**95**(3):1032-7.
46. Honda A, Sogo N, Nagasawa S, Kato T, Umemura Y. Bones benefits gained by jump training are preserved after detraining in young and adult rats. *J Appl Physiol*. 2008;**105**(3):849-53.
47. Umemura Y, Nagasawa S, Sogo N, Honda A. Effects of jump training on bone are preserved after detraining, regardless of estrogen secretion state in rats. *J Appl Physiol*. 2008;**104**(4):1116-20.

48. Hornberger Jr TA, Farrar RP. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. *Can J Appl Physiol.* 2004;**29**(1):16-31.
49. Notomi T, Okazaki Y, Okimoto N, Tanaka Y, Nakamura T, Suzuki M. Effects of tower climbing exercise on bone mass, strength, and turnover in orchidectomized growing rats. *J Appl Physiol.* 2002;**93**(3):1152-8.
50. Ksiezopolska-Orłowska K. Changes in bone mechanical strength in response to physical therapy. *Pol Arch Med Wewn.* 2010;**120**(9):368-73.
51. Power J, Poole KE, van Bezooijen R, Doube M, Caballero-Alías AM, Lowik C, et al. Sclerostin and the regulation of bone formation: Effects in hip osteoarthritis and femoral neck fracture. *J Bone Miner Res.* 2010;**25**(8):1867-1876.
52. Boskey AL, Coleman R. Aging and bone. *J Dent Res.* 2010;**89**(12):1333-48.
53. Long JA, Evans HM. The oestrus cycle in the rat and its related phenomena. *Mem Univer Calif.* 1922;**6**:1-148.
54. Lu KH, Hopper BR, Vargo TM, Yen SS. Chronological changes in sex steroid, gonadotropin and prolactin secretions in aging female rats displaying different reproductive states. *Biol Reprod.* 1979;**21**(1):193-203.
55. Waynforth HB. Experimental and surgical technique in the rat. London and New York: Academic Press, 1980.
56. Harms PG, Ojeda SR. A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein. *J Appl Physiol.* 1974;**36**(3):391-2.
57. Tatsumi S, Ito M, Asaba Y, Tsutsumi K, Ikeda K. Life-long caloric restriction reveals biphasic and dimorphic effects on bone metabolism in rodents. *Endocrinology.* 2008;**149**(2):634-41.
58. Skyscan. Structural parameters measured by Skyscan™ CT-analyzer software. Aartselaar: Skyscan; 2009.
59. Daly JA, Ertingshausen G. Direct method for determining inorganic phosphate in serum with the "CentrifiChem". *Clin Chem.* 1972;**18**(3):263-5.
60. Roy AV. Rapid method for determining alkaline phosphatase activity in serum with thymolphthalein monophosphate. *Clin Chem.* 1970;**16**(5):431-6.

61. Manolagas SC, Parfitt AM. What old means to bone. *Trends Endocrinol Metab.* 2010;**21**(6):369-74.
62. Zallone A. Direct and indirect estrogen actions on osteoblasts and osteoclasts. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;**1068**:173-9.
63. Ramanadham S, Yarasheski KE, Silva MJ, Wohltmann M, Novack DV, Christiansen B, et al. Age-related changes in bone morphology are accelerated in group VIA phospholipase A2 (iPLA2beta)-null mice. *Am J Pathol.* 2008;**172**(4):868-81.
64. Priemel M, Schilling AF, Haberland M, Pogoda P, Rueger JM, Amling M. Osteopenic mice: animal models of the aging skeleton. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2002;**2**(3):212-8.
65. Havill LM, Mahaney MC, L Binkley T, Specker BL. Effects of genes, sex, age, and activity on BMC, bone size, and areal and volumetric BMD. *J Bone Miner Res.* 2007;**22**(5):737-46.
66. Poole KE, Mayhew PM, Rose CM, Brown JK, Bearcroft PJ, Loveridge N, et al. Changing structure of the femoral neck across the adult female lifespan. *J Bone Miner Res.* 2010;**25**(3):482-91.
67. Roach HI. Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralisation and resorption. *Cell Biol Int.* 1994;**18**(6):617-28.
68. Roy ME, Nishimoto SK. Matrix Gla protein binding to hydroxyapatite is dependent on the ionic environment: calcium enhances binding affinity but phosphate and magnesium decrease affinity. *Bone.* 2002;**31**(2):296-302.
69. Pampena DA, Robertson KA, Litvinova O, Lajoie G, Goldberg HA, Hunter GK. Inhibition of hydroxyapatite formation by osteopontin phosphopeptides. *Biochem J.* 2004;**378**(Pt 3):1083-7.
70. Young MF. Bone matrix proteins: their function, regulation, and relationship to osteoporosis. *Osteoporos Int.* 2003;**14 Suppl 3**:S35-42.
71. Grynblas MD, Tupy JH, Sodek J. The distribution of soluble, mineral-bound, and matrix-bound proteins in osteoporotic and normal bones. *Bone.* 1994;**15**(5):505-13.
72. Ferris BD, Klenerman L, Dodds RA, Bitensky L, Chayen J. Altered organization of non-collagenous bone matrix in osteoporosis. *Bone.* 1987;**8**(5):285-8.

73. Atalay S, Elci A, Kayadibi H, Onder CB, Aka N. Diagnostic utility of osteocalcin, undercarboxylated osteocalcin, and alkaline phosphatase for osteoporosis in premenopausal and postmenopausal women. *Ann Lab Med.* 2012;**32**(1):23-30.
74. Cheng Z, Yao W, Zimmermann EA, Busse C, Ritchie RO, Lane NE. Prolonged treatments with antiresorptive agents and PTH have different effects on bone strength and the degree of mineralization in old estrogen-deficient osteoporotic rats. *J Bone Miner Res.* 2009;**24**(2):209-20.
75. Allen MR, Iwata K, Sato M, Burr DB. Raloxifene enhances vertebral mechanical properties independent of bone density. *Bone.* 2006;**39**(5):1130-5.
76. Delmas PD. Treatment of postmenopausal osteoporosis. *Lancet.* 2002;**359**(9322):2018-26.
77. Russo LAT. Osteoporose pós-menopausa: opções terapêuticas. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2001;**45**(4):401-6.
78. Roberts MD, Santner TJ, Hart RT. Local bone formation due to combined mechanical loading and intermittent hPTH-(1-34) treatment and its correlation to mechanical signal distributions. *J Biomech.* 2009;**42**(15):2431-8.
79. Poole KE, Treece GM, Ridgway GR, Mayhew PM, Borggrefe J, Gee AH. Targeted regeneration of bone in the osteoporotic human femur. *PLoS One.* 2011;**6**(1):e16190.
80. Boonen S, Haentjens P, Vandenput L, Vanderschueren D. Preventing osteoporotic fractures with antiresorptive therapy: implications of microarchitectural changes. *J Intern Med.* 2004;**255**(1):1-12.

Anexo A



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba



COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto **"INFLUÊNCIA DO TREINAMENTO RESISTIDO E DO RALOXIFENO NO METABOLISMO ÓSSEO DE RATAS WISTAR"** sob responsabilidade do **Profa. Dra. Rita Cássia Menegati Dornelles** e colaboração de **Camila Tami Stringhetta Garcia** está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA número de protocolo número 001397-2010

Araçatuba, 14 de Março de 2010

Prof.^a Adj. Tereza Cristina Cardoso da Silva
Presidente da CEEA- FOA/UNESP