

**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

**MELISE JACON PERES UENO**

Efeito do pré-tratamento do treinamento de força e  
raloxifeno na periostropausa sobre a cicatrização  
óssea

**Araçatuba**

**2019**

**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

**MELISE JACON PERES UENO**

**Efeito do pré-tratamento do treinamento de força e  
raloxifeno na periostropausa sobre a cicatrização  
óssea**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas – Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do grau de doutora em Ciências Fisiológicas.

**Orientadora: Prof. Dr. Rita Cássia Menegati Dornelles**

**Araçatuba**

**2019**

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

U22e

Ueno, Melise Jacon Peres.

Efeito do pré-tratamento do treinamento de força e raloxifeno na periostropausa sobre a cicatrização óssea / Melise Jacon Peres Ueno. – Araçatuba, 2019

105 f. : il. ; tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Orientadora: Profa. Rita Cassia Menegati Dornelles

1. Osteoporose 2. Reparo ósseo 3. Treinamento de força  
4. Envelhecimento 5. Raloxifeno 6. Osteotomia I. T.

CDD 612

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

# **Comissão Examinadora**

## **Dados Curriculares**

**Melise Jacon Peres Ueno**

**Nascimento:** 26 de abril de 1988; Birigüi/SP.

**Filiação:** João Miguel Gualberto Peres

**Filiação:** Ana Clara Jacon

**2007/2010:** Graduação em Fisioterapia, Universidade Estadual de Londrina (UEL).

**2013/2015:** Curso de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, nível Mestrado Acadêmico, pelo Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Foa/Unesp).

**2016/2019:** Curso de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, nível Doutorado Acadêmico, pelo Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Foa/Unesp).



# **Dedicatória**

*Dedico essa tese à minha filha Maria Clara.*

# **Epígrafe**

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação” (Simone de Beauvoir)

# Agradecimentos

## Agradecimentos

À Sociedade Brasileira de Fisiologia pela criação do Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas.

Ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas pela oportunidade e privilégio de realizar este curso inovador e enriquecedor.

À Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho e à Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA-UNESP) por toda a infra-estrutura e possibilidades de realizar a maior parte deste trabalho.

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

Ao professor Mário Jefferson Quirino Louzada por ter me acompanhado por todos esses anos. Difícil não me emocionar quando o cito, pois muitas vezes além de professor e colaborador desse trabalho, foi ombro amigo e pai. Professor, ficarei sempre sem palavras para te agradecer.

Ao professor Edilson Ervolino, pelas incansáveis vezes que nos atende em sua sala e em seu laboratório, sempre com muito carinho e disposição. Por todo o material que disponibilizou para a execução deste trabalho, pelas análises e foto documentações. Muito obrigada, professor.

Ao professor Antonio Chaves-Neto, que além da parceria e amizade, contribuiu imensamente com este trabalho. Muito obrigada por ceder todo o material necessário para realização das análises de estresse oxidativo e biomarcadores ósseos, mas acima de tudo, muito obrigada pela amizade e carinho que sempre teve comigo.

À professora Sandra Helena Penha pela parceria. Muito obrigada por ceder todo o material necessário para realização da técnica de PCR, sem sua valiosa ajuda certamente este trabalho não teria o mesmo sucesso, mas acima de tudo, muito obrigada por acreditar neste trabalho e por ser sempre solícita, atenciosa e generosa.

Aos professores Antonio Augusto Carvalho e Leda Maria Pescinini Salzedas por acreditarem nesse trabalho e por me ajudarem a realizar a técnica de Raio-x. Mesmo com escassez de material e de professores em vosso departamento, vocês se desdobraram para que essas análises fossem feitas. Eu ficarei eternamente grata a vocês, por todo carinho e disposição.

À professora Cristina pela coordenação do Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas.

Aos professores do departamento de Ciências Básicas da FOA pela convivência, companheirismo e disposição em ajudar.

Aos funcionários da limpeza, em especial à Márcia, pela amizade, companheirismo e dedicação. Muito obrigada Márcia, eu nunca vou me esquecer do seu maravilhoso café e principalmente do seu carinho conosco.

Agradeço também a todos os animais utilizados para o desenvolvimento do presente projeto.

A todos os funcionários da UNESP, muito obrigada.

## **Agradecimentos Especiais**

Dedico este trabalho primeiramente a Deus pois Ele me sustentou para que eu pudesse chegar até aqui.

Ao meu marido Gustavo que sempre esteve ao meu lado, sonhou os meus sonhos e me incentivou a continuar. Meu amor, muito obrigada por ser esse marido tão compreensivo, generoso e bondoso, muito obrigada pela sua alegria contagiante que me alegrava nos dias exaustivos, muito obrigada pelos conselhos e carinho quando eu não tinha mais forças, e principalmente, muito obrigada por dar o suporte, pois muitas vezes você ficou sobrecarregado para que esse sonho se tornasse realidade, certamente eu não conseguiria sem você. Eu te amo!

À minha filha Maria Clara que um dia lerá minha tese e gostaria de deixar registrado o meu amor e minha eterna gratidão. Filha, no ventre da mamãe você participou de boa parte dos experimentos deste projeto; no treinamento dos animais, nas análises dos dados e até mesmo nos trabalhos de madrugada sem reclamar. Você nasceu junto com esse trabalho, e por isso, mamãe desde o seu primeiro mês de vida se abdicou de alguns momentos da maternidade para dar continuidade à ciência. Por isso, não tem como não te agradecer, pois mesmo ausente em alguns momentos você sempre me recebeu sorridente, se aconchegando em meu colo, me dando todo amor que eu poderia receber e força para continuar. Eu te amo muito filha, obrigada por ser tão companheira com tão pouco tempo de vida.

Ao meu pai, João Miguel (*in memoriam*) e à minha mãe, Ana Clara. Mãe, antes eu podia imaginar, mas hoje com a maternidade me sensibilizo e vejo as dificuldades da dupla jornada, trabalho, estudo, além de filhos pequenos sem o suporte de um

companheiro. Quero que saiba que és minha inspiração, tenha certeza que o seu grande esforço gerou muitos frutos e que nada foi em vão. Muito obrigada pelo seu apoio incondicional, por todo o seu amor e cuidado comigo e minha família. Eu te amo muito!

Ao meu irmão, Michel, pela amizade, companheirismo e amor incondicional. Não tenho palavras para descrever o quanto eu te amo Mi. A verdadeira amizade é aquela que vibra com as suas conquistas e chora com as suas perdas, e vejo que além de irmão, você é o meu melhor amigo. Estaremos juntos para sempre.

Aos meus amigos e familiares que me deram todo apoio para que eu realizasse a pós-graduação, sobretudo aos meus avós: Ilma e Miguel. Foram tantas festas, aniversários, almoços, encontros que não pude comparecer, foram tantas conversas interrompidas pela correria do dia a dia, mas agradeço pela paciência, compreensão e oração. Eu amo vocês e espero poder retribuir todo esse carinho.

À minha sogra Lurdinha, minha segunda mãe, que me deu todo apoio e suporte todos esses anos. Obrigada sogrinha, pela prontidão em ajudar nas horas de aperto, pela torcida e oração.

À minha orientadora, professora Rita Cássia Menegati Dornelles, não só pela orientação científica, mas por todo carinho, cuidado e incentivo que recebi nesses anos. Agradeço por sempre acreditar em mim em momentos que eu mesma não acreditava. Eu aprendi a ser forte com a senhora, a confiar no poder de uma mulher determinada, a deixar a tristeza ou adversidades da vida para trás e seguir o rumo com foco e cabeça erguida. Apreendi a ser mãe e pesquisadora, esposa e professora, a ser mulher e não me esmorecer. Não foram fáceis os meses e anos após a vinda da Maria Clara, conciliar tudo foi o meu maior desafio, mas te agradeço pela compreensão em tantos momentos e também pelo rigor, além de ser necessário para que esse trabalho concluísse com êxito, me deixou mais forte pois vi que posso ir além. Levarei comigo todos os seus

ensinamentos e muito obrigada por me receber tão bem e por sempre confiar em mim. Conte comigo sempre.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório, que sentirei falta de nossas risadas, companheirismo e amizade. Agradeço a cada um de vocês por toda ajuda, que foram muitas, e por todo esse tempo de excelente convivência. Em especial à Fernanda Fernandes que nunca titubeou em oferecer ajuda nos dias e horários mais difíceis, que estive ao meu lado nos momentos tristes, mas também nos momentos mais felizes, que me alegrava e me acalmava nos áudios intermináveis e que deixou mais leve essa caminhada com sua amizade e lealdade. Ferzinha, você não tem ideia do quanto foi importante para que esse trabalho pudesse ser concretizado. Você é muito especial, obrigada por tudo. Ângela Nicola, foram tantas cirurgias e suturas que já ficamos craques, não é mesmo? Obrigada por todas as conversas, por ser sempre tão generosa, solícita e nunca ter me negado ajuda. O seu amor à pesquisa e à ciência me inspira. Camila Stringhetta, que me ajudou imensamente no início do doutorado e sobretudo, na minha carreira como docente. Cá, suas dicas e ajuda foram muito importantes para minha caminhada, nunca vou me esquecer de sua generosidade. Aos amigos pós-graduandos Luis Fernando, Débora, Samuel, Rafael, Ricardo e Larissa, que mesmo por pouco tempo, mostraram o quanto são especiais e incríveis. Aos alunos de iniciação científica que passaram pelo laboratório, em especial ao Adailton e Viviane, que foram fundamentais para que esse trabalho fosse realizado. Dá e Vivi, que saudade de vocês, minha eterna gratidão por serem tão comprometidos, por todo carinho e respeito com os animais desse estudo, pelo profissionalismo e sobretudo, por todo carinho que sempre recebi de vocês.

A todos os meus colegas de departamento, em especial, ao Victor, Murilo, Jéssica e Sabrina que me alegravam todos os dias com suas risadas, brincadeiras, além da disposição em ajudar durante todos estes anos.

A todos vocês, muito obrigada, foi muito bom poder compartilhar esses anos com vocês, e não se esqueçam: “You've got a friend in me, You've got a friend in me, You got troubles, then I got 'em too, There isn't anything I wouldn't do for you, If we stick together, we can see it through, 'Cause you've got a friend in me, Yes, you've got a friend in me” (Randy Newman).



## Resumo

PERES-UENO, MJ. Efeito do pré-tratamento do treinamento de força e do raloxifeno na periostropausa na cicatrização óssea. 2019. 103 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2019.

### RESUMO

Há evidências de que o treinamento de força (TF) e raloxifeno (Ral) durante a periostropausa promove melhor qualidade óssea. No entanto, nos perguntamos se os benefícios esqueléticos do TF ou Ral realizados durante a periostropausa persistiriam após a fratura. Portanto, o presente estudo teve como objetivo analisar a influência do pré-tratamento de TF e administração de Ral durante o período de periostropausa na cicatrização óssea após osteotomia unilateral total. Durante 120 dias, ratas Wistar senescentes (18 a 21 meses completos) realizaram TF em escada três vezes por semana, receberam Ral (2,3mg/Kg/dia) via gavagem, ou realizaram TF associado ao tratamento com Ral. Após este período, os tratamentos foram interrompidos e a osteotomia total foi realizada na tíbia esquerda em todos os animais, que foram eutanasiados 1 ou 8 semanas após a cirurgia. A administração de Ral durante a periostropausa piorou o perfil bioquímico e oxidativo, diminuiu a expressão gênica de marcadores relacionados à reabsorção e remodelação óssea, que afetaram negativamente as propriedades físico-químicas, levando a alterações na microarquitetura e massa dos calos ósseos, bem como na diminuição da resistência do calo à deformação torcional, resultando em menor qualidade do tecido durante a cicatrização óssea. Por outro lado, o TF realizado antes da osteotomia resultou em melhor cicatrização óssea, melhorando o perfil bioquímico e oxidativo, alterando o perfil genético em favor da formação e reabsorção óssea, bem como as propriedades físico-químicas do calo. Essas alterações levaram a uma melhor microarquitetura e massa óssea e aumentaram a resistência do calo à deformação

torcional, confirmando seu efeito benéfico na qualidade do tecido ósseo, proporcionando aceleração da consolidação óssea. A combinação de terapias, nessa intensidade de exercício e dosagem da droga, o efeito negativo de Ral, superou o efeito positivo do TF, levando à diminuição da qualidade do tecido no processo de cicatrização óssea. Portanto, os resultados indicam que, além de excelente terapia não farmacológica e ação na prevenção da osteoporose, o TF realizado no período de envelhecimento pode aumentar a qualidade óssea no início da cicatrização e proporcionar melhor consolidação óssea. Além disso, o efeito anti-reabsortivo de Ral mostrado neste modelo atrasou o processo de reparo ósseo, trazendo considerável preocupação clínica.

Palavras-chave: OSTEOPOROSE; REPARO ÓSSEO; TREINAMENTO DE FORÇA; ENVELHECIMENTO; RALOXIFENO; OSTEOTOMIA

PERES-UENO, MJ. **Effect of pre-treatment of strength training and raloxifene in periostropause on bone healing**. 2019. 103 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2019.

## **ABSTRACT**

There is evidence that strength training (ST) and raloxifene (Ral) treatment during periostropause promotes better bone quality. We wanted to determine whether the skeletal benefits of ST or Ral treatment, performed during periostropause, would persist after fracture. Therefore, the present study aimed to analyze the influence of pre-treatment with ST and administration of Ral during periostropause on bone healing after total unilateral osteotomy. Senescent female Wistar rats between 18–21 months of age, performed ST on a ladder three times per week, were administered Ral by gavage (2.3 mg/kg/day), or an association of both. After 120 days, the treatments were interrupted, and a total osteotomy was performed on the left tibia in all animals. They were euthanized 1 and 8 weeks post-osteotomy. The administration of Ral during periostropause worsened the biochemical and oxidative profile, decreased gene expression of markers related to bone resorption and remodeling, which negatively affected the physicochemical properties; this led to changes in the bone callus microarchitecture and mass, as well as a decrease in callus resistance to torsional deformation, resulting in lower tissue quality during bone healing. In contrast, ST performed prior to the osteotomy resulted in better bone healing, improvement of the biochemical and oxidative profile, alteration of the genetic profile in favor of bone formation and resorption, as well as the physicochemical properties of the callus. These changes led to better microarchitecture and bone mass and increased callus resistance to torsional deformation, confirming its beneficial effect on the quality of bone tissue,

providing acceleration of bone consolidation. The combination of therapies at this exercise intensity and drug dosage showed a negative interaction, where the negative effect of Ral overcame the positive effect of ST, leading to decreased tissue quality in the bone healing process. This study indicates that in addition to excellent non-pharmacological therapy and action in the prevention of osteoporosis, ST performed during the aging period may increase bone quality at the onset of healing and provide improved bone consolidation. Furthermore, the anti-osteoclastogenic effect of Ral shown in this model delayed the bone repair process, resulting in considerable clinical concern.

**Keywords:** OSTEOPOROSIS; HEALING FRACTURE; STRENGTH TRAINING; AGING; RALOXIFENE; OSTEOTOMY

## Sumário

Lista de figuras.....	24
Lista de tabelas.....	29
Lista de abreviações.....	30
Lista de símbolos.....	33
Introdução.....	36
Hipótese.....	43
Objetivos.....	45
Metodologia.....	48
Desenho do estudo.....	48
Animais.....	49
Raloxifeno e via de administração.....	49
Capacidade de carga máxima voluntária (CCMV) e treinamento de força.....	50
Osteotomia tibial unilateral.....	51
Radiografia.....	53
Análise <i>post-mortem</i> .....	53
Análise bioquímica.....	54
Análise da expressão gênica por reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa em tempo real (qRT-PCR) do calo ósseo tibial.....	56

	23
Análise histopatológica.....	59
Microespectroscopia de Raman.....	60
Microtomografia óssea computadorizada.....	61
Densitometria óssea (DXA).....	61
Análise estatística.....	62
Resultados.....	64
Condições gerais.....	64
Capacidade de carga máxima voluntária (CCMV).....	65
Perfil bioquímico.....	66
Perfil oxidativo.....	68
Expressão relativa de RNAm ósseos do calo ósseo tibial após o pré-tratamento com Ral e/ou TF.....	71
Histopatologia do calo ósseo tibial após o pré-tratamento com Ral e/ou TF.....	76
Propriedades físico-químicas do calo ósseo após o pré-tratamento com Ral e/ou TF.....	78
Microarquitetura óssea do calo mole e duro após o pré-tratamento com Ral e/ou TF.....	80
Densidade mineral óssea areal da tíbia e do calo tibial após tratamento com Ral e/ou TF.....	84
Discussão.....	86
Conclusão.....	95
Referências bibliográficas.....	97
ANEXO.....	102
Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais.....	103

## Lista de Figuras

**Figura 1.** Estágios da cicatrização óssea. As fases da cicatrização das fraturas são apresentadas no contexto de quatro principais estágios biológicos: Estágio 1 – hematoma; Estágio 2 - formação do calo mole; Estágio 3 - formação do calo duro e Estágio 4 - remodelação óssea. O período de tempo de sua prevalência em cada estágio é indicado (A). Os tipos primários de células encontrados em cada estágio contribuindo para os processos de reparo de fraturas estão mostrados respectivamente (B). Modelo anabólico / catabólico de reparo de fraturas (C). A escala de tempo de cicatrização é equivalente a fratura em roedores.....41

**Figura 2.** Linha do tempo. Ratas Wistar com 18 meses de idade foram distribuídas nos grupos: não treinado mais veículo (NT/Veh n = 30); não treinado mais raloxifeno (NT/Ral, n = 30); treinamento de força mais veículo (TF/Veh n = 30) e treinamento de força mais raloxifeno (TF/Ral, n = 30). O período experimental foi de 120 dias. Todos os animais com 21 meses completos foram submetidos a osteotomia unilateral da tíbia. Doze (12) animais de cada grupo foram eutanasiados 1 semana após a osteotomia e dezoito (18) animais de cada grupo foram

eutanasiados 8 semanas após a osteotomia, com 23 meses de idade. Linha tracejada: sem tratamento; linha vermelha pontilhada: Ral; linha azul contínua: TF.....48

**Figura 3.** Animal recebendo via gavagem o cloridrato de Raloxifeno.....50

**Figura 4.** Escada utilizada para o treinamento de força, mostrando o animal realizando TF com carga acoplada a cauda.....51

**Figura 5.** Preparação da tibia para a osteotomia: (A) assepsia com gaze estéril e iodopovidona; (B) incisão da pele por acesso ântero-medial com bisturi; (C) divulsão da pele e dos músculos; (D e E) exposição da diáfise tibial para a osteotomia; (F) tibia esquerda com osteotomia transversal; (G) fio de Kirschner sendo inserido no canal medular e (H) tibia com fratura estabilizada.....52

**Figura 6.** Radiografia mostrando osteotomia tibial imediatamente no pós-operatório com estabilização do fio de Kirschner (A) e 8 semanas pós-operatório (B).....53

**Figura 7.** Comparação dos testes de CCMV progressivos realizados durante 120 dias de treinamento de força (ST) dos grupos TF/Veh e TF/Ral. Os testes de CCMV foram realizados: 1 (primeiro teste - após adaptação ao exercício), 2 (após 30 dias), 3 (após 60 dias), 4 (após 90 dias), pré-OT (pré-osteotomia, após 120 dias de intervenção) e pós-OT (pós-osteotomia, 8 semanas após a osteotomia). Abreviações: TF/Veh = treinamento de força e tratado com veículo e TF/Ral = treinamento de força e tratado com raloxifeno. Os valores são apresentados como média  $\pm$  SEM. \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  usando o teste t não pareado para comparação entre os grupos.....66

**Figura 8.** Concentrações plasmáticas de cálcio, fosfatase alcalina e TRAP em ratas wistar senescentes com 1 (21 meses) e 8 semanas (23 meses) após osteotomia tibial. (A) Ca, (B) FAL e (C) TRAP. Os gráficos representam a média  $\pm$  erro padrão da média ( $n = 6$ ). A análise estatística foi realizada com ANOVA de duas vias, seguida pelo teste *post hoc* de Tukey ( $p < 0,05$ ) para analisar o efeito do tratamento com treinamento de força (TF) e raloxifeno (Ral) e quaisquer interações (TF§Ral). Abreviações e símbolos: # efeito principal de Ral, + efeito principal de TF, § interação de TF e Ral, para diferença significativa entre os grupos na 1 ou 8 semanas, \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$ , ° para comparação entre 1 e 8 semanas. NT/Veh = não treinado e tratado com veículo; NT/Ral = não treinado e tratado com raloxifeno; TF/Veh =

treinamento de força e tratado com veículo; TF/Ral = treinamento de força e tratado com raloxifeno.....67

**Figura 9.** Concentrações séricas de estrogênio e progesterona em ratas wistar senescentes (23 meses). (A) estradiol ( $E_2$ ) e (B) progesterona ( $P_4$ ). Os gráficos representam a média  $\pm$  erro padrão da média ( $n = 6$ ). A análise estatística foi realizada com ANOVA de duas vias, seguida pelo teste *post hoc* de Tukey ( $p < 0,05$ ) para analisar o efeito do tratamento com treinamento de força (TF) e raloxifeno (Ral) e quaisquer interações (TF§Ral). Abreviações e símbolos: + efeito principal de TF. NT/Veh = não treinado e tratado com veículo; NT/Ral = não treinado e tratado com raloxifeno; TF/Veh = treinamento de força e tratado com veículo; TF/Ral = treinamento de força e tratado com raloxifeno.....68

**Figura 10.** Efeito do pré-tratamento do treinamento de força e do raloxifeno em ratas wistar senescentes com 1 (21 meses) e 8 semanas (23 meses) após osteotomia tibial nos marcadores de estresse oxidativo. (A) CAT, (B) SOD, (C) MDA, (D) TOS, (E) TAS e (F) FRAP. Os gráficos representam a média  $\pm$  erro padrão da média ( $n = 12$ ). A análise estatística foi realizada com ANOVA de duas vias, seguida de teste *post hoc* de Tukey para analisar o efeito do tratamento com treinamento de força (TF) e raloxifeno (Ral) e quaisquer interações (TF§Ral). Abreviações e símbolos: # efeito principal de Ral, + efeito principal de TF, § interação de TF e Ral, — para diferença significativa entre os grupos na 1 ou 8 semanas, \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$ , ° para comparação entre 1 e 8 semanas. NT/Veh = não treinado e tratado com veículo; NT/Ral = não treinado e tratado com raloxifeno; TF/Veh = treinamento de força e tratado com veículo; TF/Ral = treinamento de força e tratado com raloxifeno; CAT = catalase; SOD = superóxido dismutase; MDA = malondialdeído; FRAP = poder antioxidante do redutor férrico; TOS = status oxidante total e TAS = status antioxidante total.....70

**Figura 11.** Expressão gênica do fator de transcrição *Catnb* em ratas Wistar senescentes após realização de TF, tratamento com Ral ou associação de TF e Ral por 120 dias, após 1 semana (com 21 meses) e 8 semanas (com 23 meses) de osteotomia tibial. Os gráficos representam a média  $\pm$  erro padrão da média ( $n = 5$ ). A análise estatística foi realizada com ANOVA de duas vias, seguida pelo teste *post hoc* de Tukey para analisar o efeito do tratamento com treinamento de força (TF) e raloxifeno (Ral) e quaisquer interações (TF § Ral). Abreviações e símbolos: § interação de TF e Ral, ° para comparação entre 1 e 8 semanas. NT/Veh = não treinado e tratado com veículo; NT/Ral = não treinado e tratado com raloxifeno; TF/Veh = treinamento de

força e tratado com veículo e TF/Ral = treinamento de força e tratado com raloxifeno.....71

**Figura 12.** Expressão gênica dos marcadores de formação óssea, (A) Bsp, (C) Opn, (D) Alp, (E) Ocn, (F) Col1a1 e (G) Bmp2, em ratas Wistar senescentes após realização de TF, tratamento com Ral ou associação de TF e Ral por 120 dias, após 1 semana (com 21 meses) e 8 semanas (com 23 meses) de osteotomia tibial. Os gráficos representam a média  $\pm$  erro padrão da média (n = 5). A análise estatística foi realizada com ANOVA de duas vias, seguida pelo teste post hoc de Tukey para analisar o efeito do tratamento com treinamento de força (TF) e raloxifeno (Ral) e quaisquer interações (TF  $\times$  Ral). Abreviações e símbolos: # efeito principal de Ral, + efeito principal de TF,  $\times$  interação de TF e Ral,  $\square$  para diferença de significância entre os grupos na 1 ou 8 semanas, \* p <0,05, \*\* p <0,01 e \*\*\*\* p <0,0001,  $\circ$  para comparação entre 1 e 8 semanas. NT/Veh = não treinado e tratado com veículo; NT/Ral = não treinado e tratado com raloxifeno; TF/Veh = treinamento de força e tratado com veículo e TF/Ral = treinamento de força e tratado com raloxifeno.....73

**Figura 13.** Expressão gênica dos marcadores de reabsorção óssea (A) Trap e (B) Ctsk em ratas Wistar senescentes após realização de TF, tratamento com Ral ou associação de TF e Ral por 120 dias, após 1 semana (com 21 meses) e 8 semanas (com 23 meses) de osteotomia tibial. Os gráficos representam a média  $\pm$  erro padrão da média (n = 5). A análise estatística foi realizada com ANOVA de duas vias, seguida pelo teste post hoc de Tukey para analisar o efeito do tratamento com treinamento de força (TF) e raloxifeno (Ral) e quaisquer interações (TF  $\times$  Ral). Abreviações e símbolos: # efeito principal de Ral, + efeito principal de TF,  $\times$  interação de TF e Ral,  $\square$  para diferença de significância entre os grupos na 1 ou 8 semanas, \* p <0,05, \*\* p <0,01, \*\*\* p <0,001 e \*\*\*\* p <0,0001,  $\circ$  para comparação entre 1 e 8 semanas. NT/Veh = não treinado e tratado com veículo; NT/Ral = não treinado e tratado com raloxifeno; TF/Veh = treinamento de força e tratado com veículo e TF/Ral = treinamento de força e tratado com raloxifeno.....74

**Figura 14 .** Expressão gênica de marcadores de remodelação óssea (A) Rank, (B) Rankl e (C) Opg em ratas Wistar senescentes após realização de TF, tratamento com Ral ou associação de TF e Ral por 120 dias, após 1 semana (com 21 meses) e 8 semanas (com 23 meses) de osteotomia tibial. Os gráficos representam a média  $\pm$  erro padrão da média (n = 5). A análise estatística foi realizada com ANOVA de duas vias, seguida pelo teste post hoc de Tukey para analisar o efeito do tratamento com treinamento de força (TF) e raloxifeno (Ral) e quaisquer interações (TF  $\times$  Ral). Abreviações e símbolos: # efeito principal de Ral, + efeito principal de TF,  $\times$  interação de TF e Ral,  $\square$  para diferença de significância entre os grupos na 1 ou 8

semanas, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , ° para comparação entre 1 e 8 semanas. NT/Veh = não treinado e tratado com veículo; NT/Ral = não treinado e tratado com raloxifeno; TF/Veh = treinamento de força e tratado com veículo e TF/Ral = treinamento de força e tratado com raloxifeno.....76

**Figura 15.** Aspecto histopatológico da área fraturada e circunferência nos grupos NT/Veh (A, E), NT/Ral (B, F), TF/Veh (C, G), TF/Ral (D, H) em 1 (A - D) e 8 semanas (E - H) após a osteotomia. Abreviações e símbolos: asteriscos, infiltrado inflamatório; ct, tecido conjuntivo; c, cartilagem; tecido ósseo. Coloração: HE. Barras de escala: 50  $\mu\text{m}$ .....78

**Figura 16.** Efeito do pré-tratamento do treinamento de força e do raloxifeno em ratas Wistar senescentes, 8 semanas após osteotomia tibial, nos parâmetros de microespectroscopia de Raman obtidos no calo ósseo, (A) Razão mineral / colágeno ( $\nu\text{1PO4} / \text{Amida III}$ ), (B) substituição de carbonato de tipo B ( $\text{CO3} / \nu\text{1PO4}$ ) e (C) cristalinidade. Os gráficos representam a média  $\pm$  erro padrão da média ( $n = 6$ ). A análise estatística foi realizada com ANOVA de duas vias, seguida pelo teste post hoc de Tukey para analisar o efeito do tratamento com treinamento de força (TF) e raloxifeno (Ral) e quaisquer interações (TF  $\&$  Ral). Abreviações e símbolos: # efeito principal de Ral, + efeito principal de TF e  $\&$  interação de TF mais Ral. NT/Veh = não treinado e tratado com veículo; NT/Ral = não treinado e tratado com raloxifeno; TF/Veh = treinamento de força e tratado com veículo; TF/Ral = treinamento de força e tratado com raloxifeno.....80

**Figura 17.** Efeito do pré-tratamento do treinamento de força e do raloxifeno em ratas Wistar senescentes, 8 semanas após osteotomia tibial na microtomografia do calo ósseo. (A) Imagem digitalizada da tíbia, com dimensões da região de interesse da diáfise tibial (600 fatias) e a caracterização do calo ósseo mole (esquerda) e calo duro (direita) a partir do diagrama esquemático do limiar do micro-CT, onde os pontos cor de rosa são analisados pelo programa. (B) Reconstrução em 3D do calo ósseo na região da diáfise tibial, 8 semanas após a osteotomia, onde a média dos valores de volume total (VT) foi utilizada para selecionar as amostras representativas de cada grupo. Superior: imagens completas, inferior: seção coronal.....81

**Figura 18.** Efeito do pré-tratamento do treinamento de força e do raloxifeno em ratas Wistar senescentes, 8 semanas após osteotomia tibial sobre a microarquitetura do calo mole e duro. (A) BV/TV, (B) Tb.Th, (C) Tb.N, (D) J, (E) I max e (F) I min. Os gráficos representam a média  $\pm$  erro padrão da média ( $n = 6$ ). A análise estatística foi realizada com ANOVA de duas vias,

seguida pelo teste post hoc de Tukey para analisar o efeito do tratamento com treinamento de força (TF) e raloxifeno (Ral) e quaisquer interações (TF § Ral). Abreviações e símbolos: # efeito principal de Ral, + efeito principal de TF e § interação de TF mais Ral, para diferença de significância entre os grupos no calo mole ou duro, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . NT/Veh = não treinado e tratado com veículo; NT/Ral = não treinado e tratado com raloxifeno; TF/Veh = treinamento de força e tratado com veículo; TF/Ral = treinamento de força e tratado com raloxifeno, BV / TV = fração do volume ósseo; Tb.Th = espessura trabecular; Tb.N = número trabecular;  $J$  = momento de inércia polar,  $I_{max}$  = momento de inércia máximo e  $I_{min}$  = momento de inércia mínimo.....83

**Figura 19.** Efeito do pré-tratamento do treinamento de força e do raloxifeno em ratas Wistar senescentes, 8 semanas após osteotomia tibial, na densidade mineral óssea areal ex vivo (DMOa), (A) DMOa da tibia total e (B) DMOa do calo ósseo. Os gráficos representam a média  $\pm$  erro padrão da média ( $n = 6$ ). A análise estatística foi realizada com ANOVA de duas vias, seguida pelo teste post hoc de Tukey para analisar o efeito do tratamento com treinamento de força (TF) e raloxifeno (Ral) e quaisquer interações (TF § Ral). Abreviações e símbolos: # efeito principal de Ral e § interação de TF mais Ral. NT/Veh = não treinado e tratado com veículo; NT/Ral = não treinado e tratado com raloxifeno; TF/Veh = treinamento de força e tratado com veículo; TF/Ral = treinamento de força e tratado com raloxifeno.....84

**Figura 20.** Resumo dos efeitos individuais de Ral, TF e interações TF§Ral pela análise de variância ANOVA de duas vias.....93

## Lista de Tabelas

**Tabela 1** - Relação dos ensaios TaqMan™ utilizados.....58

**Tabela 2** - Massa corporal inicial (18 meses), pré-osteotomia (21 meses) e pós-osteotomia (21 e 23 meses); massa uterina e ovariana em ratas Wistar senescentes com 1 e 8 semanas pós-osteotomia, que foram previamente treinadas ou não, tratadas com Veh ou Ral. A análise estatística foi realizada com ANOVA de duas vias, seguida pelo teste post hoc de Tukey ( $p < 0,05$ ) para analisar o efeito do tratamento com treinamento de força (TF) e raloxifeno (Ral) e quaisquer interações (TF§Ral). Abreviações e símbolos: # efeito principal de Ral, + efeito principal de TF, § interação de TF mais Ral. a vs NT/Veh; b vs NT/Ral; c vs TF/Veh. ° para comparação entre 1 e 8 semanas. NT/Veh = não treinado e tratado com veículo; NT/Ral = não treinado e tratado com raloxifeno; TF/Veh = treinamento de força e tratado com veículo e TF/Ral = treinamento de força e tratado com raloxifeno.....65

## Lista de Abreviaturas

Actb - beta actin

Alp - Fosfatase Alcalina

ANOVA - Análise de Variância

Bmp2 - bone morphogenetic protein 2

BSP - Sialoproteína óssea

BV/TV - Fração de Volume Ósseo

CAT - Catalase

Catnb -  $\beta$ -catenina

CCMV - Capacidade de Carga Máxima Voluntária

cDNA - Ácido Desoxirribonucléico complementar

CO<sub>3</sub> - Carbonato

CO<sub>3</sub>/ v1PO<sub>4</sub> – Substituição do carbonato tipo beta

Col1a1 - collagen type I alpha 1

Ctsk - Catepsina K

DMO - Densidade Mineral Óssea

DMOa - Densidade Mineral Óssea areal

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

ER - Receptor de estrógeno

ERR - Elemento Resposta ao Raloxifeno

EUA - Estados Unidos da América

Fal - Fosfatase alcalina

FRAP - Potencial Antioxidante do Redutor Férrico

*I* máx - Momento Máximo de Inércia

*I* mín - Momento Mínimo de Inércia

i.m - Intramuscular

IL-1 - Interleucina 1

IL-6 - interleucina 6

*J* - Momento Polar de Inércia

LH - Hormônio Luteinizante

M-CSF - Fator Estimulador da Colônia de Macrófagos

MDA - Malondialdeído

Micro-CT - Microtomografia óssea

NaCl - Cloreto de Sódio

NT/Ral - Não treinadas que receberam Ral

NT/Veh - Não treinadas que receberam veículo

OCN - Osteocalcina

ONU - Organização das Nações Unidas

OPG - Osteoprotegerina

OPN - Osteopontina

OVX - Ovariectomia

PCR - Reação em Cadeia Polimerase

p-ER $\alpha$  - Receptor de estrógeno  $\alpha$ fosforilado

pH – potencial hidrogeniônico

PO<sub>4</sub> - Fosfato

PSP - placa fotoestimulável do fósforo

Ral - Raloxifeno

RANK - Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa $\beta$

RANKL - Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa $\beta$

RNA - Ácido Ribonucléico

RNAm - Ácido Ribonucléico mensageiro

ROI - Região de Interesse

SERMs - Moduladores Seletivos do Receptor de Estrógeno

SOD - Superóxido dismutase

TAS - Status antioxidante total

Tb.N - Número de Trabéculas

Tb.Th - Espessura Trabecular

TF - Treinamento de Força

TF/Ral - Treinadas que receberam Ral

TF/Veh - Treinadas que receberam veículo

TF§Ral - Interação entre TF e Ral

TNF- $\alpha$  - Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$

TOS – Status oxidante total

TRAP - Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato

VOI - Volume de Interesse

Wnt - Via de Sinalização Canônica

v1PO<sub>4</sub> / Amida III - Razão mineral / colágeno

## Lista de Símbolos

- - Menos

% - Porcentagem / Por cento

\* - Asterisco

: - Para (razão matemática)

± - Maios ou menos

< - Menor que

Δ - Variação

ΔΔ - Variação da variação

® - Marca registrada

mm - centímetro

cm<sup>2</sup> - centímetro quadrado

g/cm<sup>2</sup> - grama por centímetro quadrado

g - grama

Hz - hertz

Kg - quilograma

Kv - kilovolt

L - litro

m - média

mA - microampère

mg/dL - miligrama por decilitro

mg - miligrama

mJ - milijoule

mL - mililitro

mm - milímetro

mmol/L -milimolar por litro

nmol - nanomolar

° - Grau

°C - Graus Celsius

rpm - rotações por minuto

TM - Trademark; Marca comercial

U/L - unidade por litro

U/ml - unidade por milímetro

μm - micrometro

um<sup>2</sup> - micrometro quadrado

μmol/L - micromolar por litro

μW - microwatt

W: watt

α - Alfa

β - Beta

# **INTRODUÇÃO**

## 1. Introdução

A população brasileira envelheceu consideravelmente nas últimas décadas e estima-se que até 2050 os idosos representarão 23% de toda população (1, 2). Com o envelhecimento, há maior incidência de comorbidades e complicações sistêmicas aumentando a ocorrência de doenças crônicas, como a osteoporose (3).

A osteoporose é caracterizada pela diminuição da massa óssea e deterioração da microarquitetura óssea a qual resulta na diminuição na densidade mineral óssea (DMO), seguida pela diminuição da resistência óssea com maior suscetibilidade às fraturas (4). As fraturas osteoporóticas, além de gastos públicos elevados, são causas de comorbidade e incapacidade em pessoas idosas, reduzindo a qualidade e expectativa de vida desses pacientes (5). Além disso, a redução da qualidade e massa óssea nos sítios esqueléticos do idoso pode resultar em atraso ou não consolidação da fratura (6). Como a maioria dos pacientes com osteoporose não recebe tratamento adequado, visando à redução na ocorrência de fratura por fragilidade (7), a incidência mundial de fratura de quadril está prevista para chegar a 6,3 milhões em 2050, com  $\frac{3}{4}$  destas fraturas ocorrendo na Ásia e em populações latino-americanas (8). Portanto, medidas públicas como intervenção preventiva deve ser aplicada em todo o mundo para conter a incidência crescente de fratura por fragilidade e diminuir gastos demasiados com internações e complicações causadas por esta doença.

A menor concentração plasmática de estrógeno, como a detectada em mulheres na menopausa, favorece a incidência de osteoporose e o risco de fratura (7, 9), uma vez que essa deficiência propicia o desequilíbrio entre reabsorção e formação óssea, onde o aumento da reabsorção óssea excede a de formação (10), contribuindo para a diminuição da qualidade do tecido (11). O estrógeno estimula a expressão de osteoprotegerina (OPG) (12) e inibe a ativação do ligante do receptor ativador do fator

nuclear Kappa $\beta$  (RANKL) (13), além de atuar sobre os monócitos promovendo redução plasmática de Interleucina-1 (IL-1) e Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (14, 15), substâncias que regulam a fusão e a diferenciação de células precursoras de osteoclastos. Na tentativa de reduzir ou minimizar esses efeitos deletérios do climatério, estudos recentes têm focado em pesquisas voltadas à prevenção e promoção da saúde, especialmente no período da perimenopausa, período climatérico anterior à menstruação final, estágio crucial da vida da mulher pois é marcado por flutuações nos hormônios reprodutivos (16, 17). Portanto, como as mulheres passam aproximadamente um terço de suas vidas na menopausa, promover comportamentos saudáveis durante o período anterior a esta fase pode resultar em consequências benéficas de longo alcance, especialmente na qualidade óssea, pois "a perimenopausa é a oportunidade para a promoção da saúde" (18).

O exercício físico, se adequadamente prescrito, é consenso na literatura de que é capaz de influenciar a saúde óssea, preservando a massa e a força óssea, prevenindo a morte das células ósseas com ação antienvhecimento, tornando-se estratégia vital na prevenção e controle da osteoporose (19). De acordo com a teoria do mecanostato de Frost (20), exercícios que produzem alta tensão podem melhorar muito as propriedades mecânicas do osso e, em apoio a essa teoria, o treinamento de resistência progressiva de alta intensidade tem sido reconhecido como estratégia para estimular a resposta osteogênica e preservar a qualidade do tecido ósseo. Em revisão sistemática e metanálise, Martyn-St James e colaboradores (21) concluíram que programas de exercícios combinados de alto impacto com treinamento de resistência de alta magnitude são eficazes no aumento da densidade mineral óssea no quadril e na coluna vertebral em mulheres na pré-menopausa, evitando assim o risco de fratura.

Para o tratamento da osteoporose, a reposição hormonal é bem estabelecida, uma vez que o estrogênio atua nos monócitos promovendo redução plasmática de IL-1 e TNF- $\alpha$  (22, 23), substâncias que estimulam a produção de citocinas como interleucina-6 (IL-6) e fator estimulador da colônia de macrófagos (M-CSF), as quais regulam a fusão e a diferenciação de células precursoras de osteoclastos. Entretanto, há restrições para indicação desta terapia, sendo necessárias outras formas de prevenção e tratamento para osteopenia. Entre estas, destacamos os moduladores seletivos do receptor de estrogênio (SERMs) que constituem classe de moléculas não hormonais com alta afinidade de ligação aos receptores de estrogênio (ER). O SERM raloxifeno (Ral) exerce ação eficaz na prevenção da diminuição óssea em mulheres na pós-menopausa (24). Para isso, liga-se ao ER, e, na presença de proteínas auxiliares, pode ativar sequência específica do DNA, conhecida como Elemento Resposta ao Raloxifeno (ERR) exercendo o efeito agonista do estrogênio (25, 26). Além disso, o Ral atua diminuindo a expressão de RNAm para RANKL (27) e aumentando o colágeno tipo I na matriz óssea (28), sendo eficaz no tratamento para osteoporose (29, 30).

Estudos anteriores de nosso laboratório mostraram que o treinamento de força (TF) e o tratamento com Ral resultaram em melhor microarquitetura óssea no colo do fêmur no modelo de rata ovariectomizada (OVX) (31) e de ratas naturalmente envelhecidas, no período da periostropausa (32). No entanto, embora a interação dos tratamentos tenha sido benéfica, apenas o TF melhorou a microarquitetura cortical e a força óssea no colo do fêmur de ratas na periostropausa. Apesar da existência de evidências na literatura sobre a eficácia do treinamento de força e administração do raloxifeno na melhoria da qualidade óssea, não há evidências de que esses tratamentos realizados previamente a fratura óssea durante o período da perimenopausa possam acelerar o reparo ósseo. Há estudos evidenciando a ação positiva de Ral, porém após a

fratura, como realizado por Stuermer e colaboradores (33) em que administraram o SERM ou estrógeno em ratas ovariectomizadas (OVX) e observaram o aumento da cicatrização e formação do calo ósseo. Contraditoriamente, Cao e colaboradores (34), ao avaliarem o efeito do Ral, estrógeno ou alendronato no processo de reparo da fratura em ratas OVX, concluíram que o alendronato foi superior aos demais fármacos, apresentando maior formação no tecido ósseo.

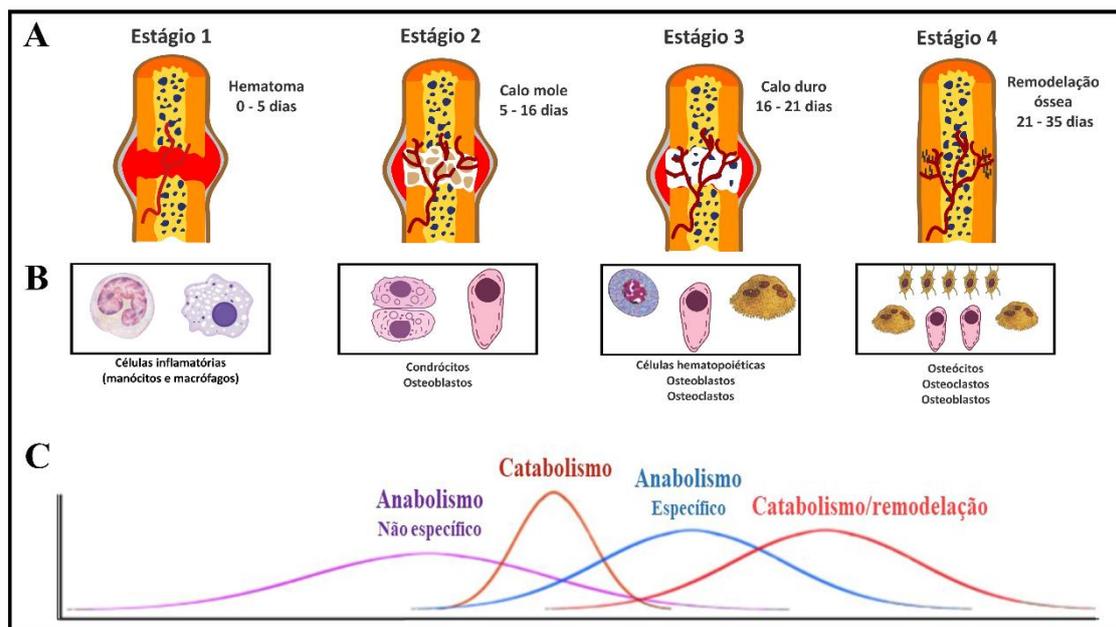
A cicatrização de fraturas é processo complexo, influenciado por fatores fisiológicos, farmacológicos, celulares e genéticos, além de que, para o processo de reparo completo e eficiente, é essencial a remodelação do calo ósseo (Fig.1) (35). Durante o processo inflamatório (estágio 1, Fig. 1A), macrófagos e outras células inflamatórias (granulócitos, linfócitos e monócitos) se infiltram no hematoma entre os fragmentos fraturados e combatem a infecção (Fig.1B), secretam citocinas e fatores de crescimento que facilitam a migração e a invasão de células-tronco mesenquimais multipotentes (36), que são primordiais para a ossificação endocondral, ou seja, formação do calo mole (estágio 2. Fig. 1A), cuja composição é cartilaginosa. O estágio do calo mole é dominado por condrócitos e fibroblastos, além de osteoblastos (Fig. 1B), embora as proporções relativas dos diferentes tipos de células possam variar entre as fraturas. Essas células produzem o calo mole semi-rígido que é capaz de fornecer suporte mecânico à fratura, além de atuar como modelo para o calo ósseo que mais tarde o substituirá. Condrócitos derivados de progenitores mesenquimais proliferam e sintetizam matriz cartilaginosa até que todas as fibras de granulação, formadas no estágio anterior, sejam substituídas por cartilagem, e, onde a produção é deficiente, os fibroblastos substituem a região por tecido fibroso. Nos estágios finais da produção de calo mole, os condrócitos sofrem hipertrofia e mineralizam a matriz cartilaginosa antes de sofrer apoptose, fase que precede a formação do calo duro (estágio 3) (35). A

remodelação do calo mole ocorre entre os estágios 2 e 3, que envolve a remoção gradual da cartilagem / fibrocartilagem do calo mole pelos osteoclastos e condroclastos (37, 38).

A formação do calo duro é também conhecida como formação óssea primária (39), estágio mais ativo da osteogênese, caracterizada por altos níveis da atividade osteoblástica e formação de matriz mineralizada, que surge diretamente no calo periférico em áreas de estabilidade. O estágio final do reparo da fratura abrange a remodelação do calo duro em tecido cortical original e / ou configuração óssea trabecular (estágio 4), fase que também pode ser referida como formação óssea secundária (39). O processo de remodelação é conduzido por processo combinado de reabsorção óssea seguido pela formação do osso lamelar, e apesar dos osteoclastos serem importantes, mas não essenciais nos estágios iniciais do reparo ósseo endocondral, a remodelação do calo duro é processo dependente de osteoclastos, portanto, primordiais para a remodelação óssea completa. Isso é claramente visto em estudos onde a atividade dos osteoclastos é abolida após o tratamento com bisfosfonato (40, 41), portanto, a remodelação do calo duro é processo catabólico (Fig. 1C) dependente de osteoclastos ativos (35). Assim, se os osteoclastos são realmente críticos para a cura da fratura, agentes anti-osteoclásticos, como Ral, poderiam interferir nesse processo e possivelmente atrasar o reparo da fratura, o que traria preocupação clínica considerável.

Portanto, considerando a ação fundamental da osteoclastogênese no remodelamento da cicatrização óssea (42), nos questionamos se os benefícios esqueléticos do treinamento de força ou do tratamento com raloxifeno durante o período da periostropausa persistiriam após a fratura. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a qualidade da cicatrização óssea após osteotomia tibial unilateral em

ratas Wistar que foram submetidas anteriormente ao tratamento com TF, Ral ou a combinação das terapias durante o período da periostropausa.



**Figura 1.** Estágios da cicatrização óssea. As fases da cicatrização das fraturas são apresentadas no contexto de quatro principais estágios biológicos: Estágio 1 – hematoma; Estágio 2 - formação do calo mole; Estágio 3 - formação do calo duro e Estágio 4 - remodelação óssea. O período de tempo de sua prevalência em cada estágio é indicado (A). Os tipos primários de células encontrados em cada estágio contribuindo para os processos de reparo de fraturas estão mostrados respectivamente (B). Modelo anabólico / catabólico de reparo de fraturas (C). A escala de tempo de cicatrização é equivalente a fratura em roedores.



# Hipótese

## 2. Hipótese

Nossa hipótese é que os osteoclastos sejam essenciais em todo processo de cicatrização óssea, e, portanto, a administração do raloxifeno, um anti-reabsortivo, poderá interferir no processo de cicatrização óssea, piorando a qualidade do tecido e atrasando a consolidação óssea. Por outro lado, o treinamento de força promoverá melhor qualidade do tecido durante a cicatrização óssea e, devido aos nossos estudos anteriores, a associação das terapias não promoverá efeitos adicionais.



# OBJETIVOS

## 3. Objetivos

### *Objetivo Geral:*

Avaliação dos efeitos do pré-tratamento com raloxifeno e treinamento de força na cicatrização óssea após osteotomia unilateral total em ratas durante o período da periostropausa.

### *Objetivos Específicos:*

Para elucidar nosso questionamento e cumprir o objetivo geral, foram propostas as seguintes estratégias:

- Avaliação das consequências do tratamento prévio com raloxifeno, treinamento de força e da associação destes por 120 dias, sobre os marcadores bioquímicos para o metabolismo ósseo e do perfil oxidativo de ratas Wistar senescentes após 1 semana (com 21 meses) e 8 semanas (com 23 meses) de osteotomia tibial.

- Avaliação das consequências do tratamento prévio com raloxifeno, treinamento de força e da associação destes por 120 dias, sobre a expressão gênica dos marcadores para formação, reabsorção e remodelação óssea através de PCR em tempo real do calo ósseo tibial em ratas Wistar senescentes após 1 semana (com 21 meses) e 8 semanas (com 23 meses) de osteotomia tibial.

- Realização da análise histopatológica para avaliar as consequências do tratamento prévio com raloxifeno, treinamento de força e da associação destes por 120 dias, sobre a consolidação óssea em ratas Wistar senescentes após 1 semana (com 21 meses) e 8 semanas (com 23 meses) de osteotomia tibial.

- Avaliação das propriedades físico-químicas por meio da microespectroscopia de Raman obtida do calo ósseo tibial;

- Avaliação das consequências do tratamento prévio com raloxifeno, treinamento de força e da associação destes por 120 dias, na microarquitetura óssea do calo mole, duro e do tecido cortical, além da densidade mineral óssea areal (DMOa) em ratas Wistar senescentes após 8 semanas (com 23 meses) de osteotomia tibial por microtomografia computadorizada

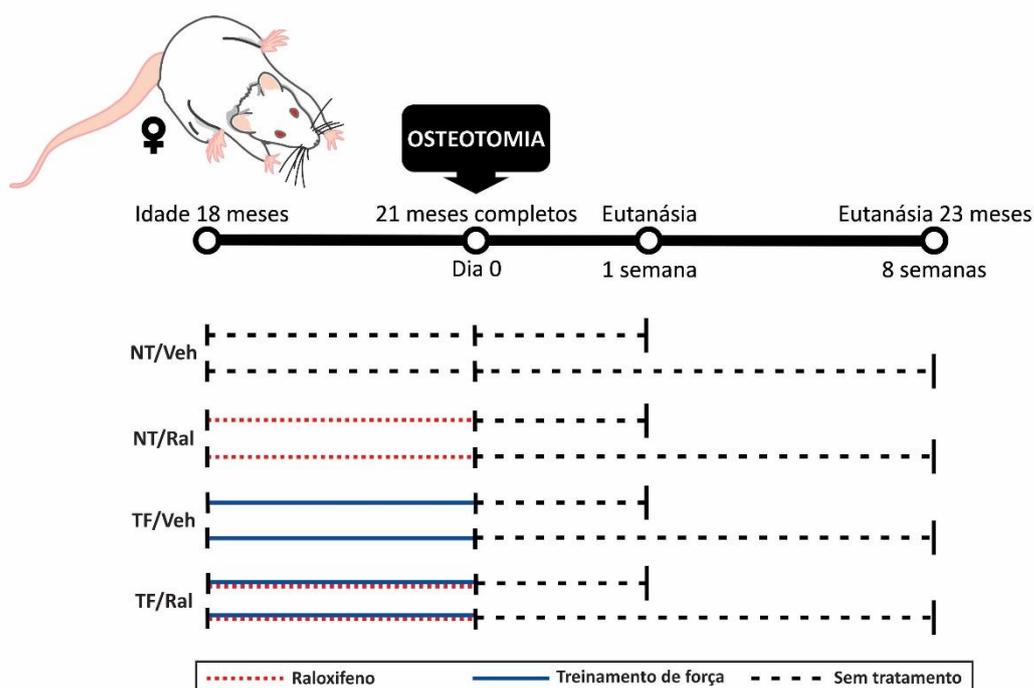


# METODOLOGIA

## 4. Metodologia

### 4.1 Desenho do estudo

Ratas Wistar na periostropausa, com idades entre 18 e 21 meses, realizaram TF em escada três vezes por semana e Ral foi administrado via gavagem (2,3 mg / kg, 3x / semana) por 120 dias (Fig. 2). Vinte e quatro horas após esse período, todos os animais foram submetidos à osteotomia da tíbia esquerda. Nas semanas seguintes, os animais permaneceram nas gaiolas, sem qualquer tipo de tratamento e foram eutanasiados 1 e 8 semanas após a osteotomia.



**Figura 2.** Linha do tempo. Ratas Wistar com 18 meses de idade foram distribuídas nos grupos: não treinado mais veículo (NT/Veh, n = 30); não treinado mais raloxifeno (NT/Ral, n = 30); treinamento de força mais veículo (TF/Veh, n = 30) e treinamento de força mais raloxifeno (TF/Ral, n = 30). O período experimental foi de 120 dias. Todos os animais com 21 meses completos foram submetidos a osteotomia unilateral da tíbia. Doze (12) animais de cada grupo foram eutanasiados 1 semana após a osteotomia e dezoito (18) animais de cada grupo foram eutanasiados 8 semanas após a osteotomia, com 23 meses de idade. Linha tracejada: sem tratamento; linha vermelha pontilhada: Ral; linha azul contínua: TF.

## 4.2 Animais

Os procedimentos experimentais com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia de Araçatuba (processo número 00528-2016) e cumpriram o Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório. Os animais da criação central de animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, foram alojados em gaiolas comuns em sala com ciclo claro-escuro de 12:12 horas, a 22 ° C ( $\pm 2$  ° C), mantidos com dieta da mesma qualidade e fabricante (Presence®-Ratos e Camundongos, Paulínia, SP, Brasil / 12-13g / kg de cálcio) e água *ad libitum*.

Todas as ratas foram multíparas, pois este foi critério de inclusão. A saúde geral das ratas foi monitorada diariamente e o ciclo estral foi verificado durante o 17º mês, para determinar a irregularidade do ciclo. A periostropausa, período semelhante à perimenopausa em mulheres, é observada em ratas senescentes wistar e é caracterizada pela diminuição das concentrações plasmáticas de estrógeno (43). Portanto, os animais experimentais tiveram seu ciclo estral monitorado diariamente e, após confirmação da irregularidade do ciclo estral, as ratas foram distribuídas aleatoriamente em quatro grupos: 1: não treinado mais veículo (NT/Veh, n = 30); 2: não treinado mais raloxifeno (NT/Ral, n = 30); 3: treinamento de força mais veículo (TF/Veh, n = 30); ou 4: treinamento de força mais raloxifeno (TF/Ral, n = 30).

#### 4.3 Raloxifeno e administração de veículos

No início do 18º mês, os animais dos grupos NT/Ral e TF/Ral receberam 2,3 mg / kg de Ral (Sigma Aldrich, Munique, Alemanha) em 0,3 mL de solução salina fisiológica administrada 3x / semana por gavagem por 120 dias (Fig. 3), protocolo adaptado de Stringhetta-Garcia e colaboradores (31, 32). Os animais dos outros grupos de tratamento receberam solução salina fisiológica (0,3 mL) por gavagem durante o mesmo período de tempo.

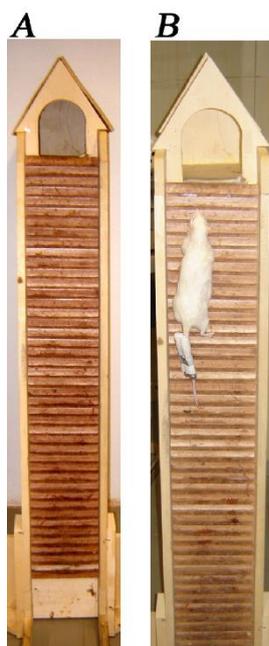


**Figura 3.** Animal recebendo via gavagem o cloridrato de Raloxifeno.

#### 4.4 Capacidade de carga máxima voluntária (CCMV) e treinamento de força

Os grupos TF/Veh e TF/Ral realizaram TF com escada ( $1,13 \times 0,18$  m; grade de 2 cm; ângulo de  $80^\circ$ ), com área de descanso no topo [ $20 \times 20 \times 20$  cm de diâmetro], três vezes por semana por 120 dias (Fig.4) (32). Os animais foram submetidos a uma semana de aclimação no início do 18º mês e todos aderiram ao exercício. O período de adaptação consistiu em 3 sessões, em dias não consecutivos, sem carga. Posteriormente, o CCMV de cada o animal foi avaliado com o uso de um ou dois tubos (tubo plástico,

BD Falcon 50 mL tubo cônico, BD Biosciences®, Bedford, MA, EUA) contendo esferas de aço (Esferas de aço, Cabana S / A, SP, Brasil) anexadas. Na avaliação da CCMV, a carga inicial era de 75% do peso corporal do animal e, em seguida, foram adicionados 30 g de carga ao aparelho de carga, e a repetição foi realizada até a falha na subida. A escalada anterior da falha foi considerada a CCMV e foi usada como base para o cálculo da sobrecarga a ser aplicada durante o período de treinamento, que iniciou quarenta e oito horas após a conclusão do teste. Durante 120 dias, os animais realizaram três sessões semanais de TF em dias alternados, sendo cada sessão composta por seis séries e intervalos de dois minutos entre cada série. Durante a primeira semana, os animais foram submetidos ao treinamento com sobrecarga correspondente a 60% da CCMV, que aumentou para 70% da CCMV na segunda semana e 80% na terceira semana. A partir da 4ª semana até o final do período proposto, os animais foram submetidos a sobrecarga de TF a 80% da CCMV. A cada mês, novo teste de CCMV era realizado para obter e manter a capacidade máxima da força dos animais. Nenhum animal foi excluído devido a lesões físicas. Os animais treinados que foram eutanasiados 1 semana após a osteotomia realizaram o total de cinco testes de CCMV (1 à pré-osteotomia); no entanto, os animais eutanasiados 8 semanas após a osteotomia realizaram um (01) teste adicional 24 horas antes da eutanásia para avaliar o efeito da cirurgia e o tempo de destreino na carga máxima.

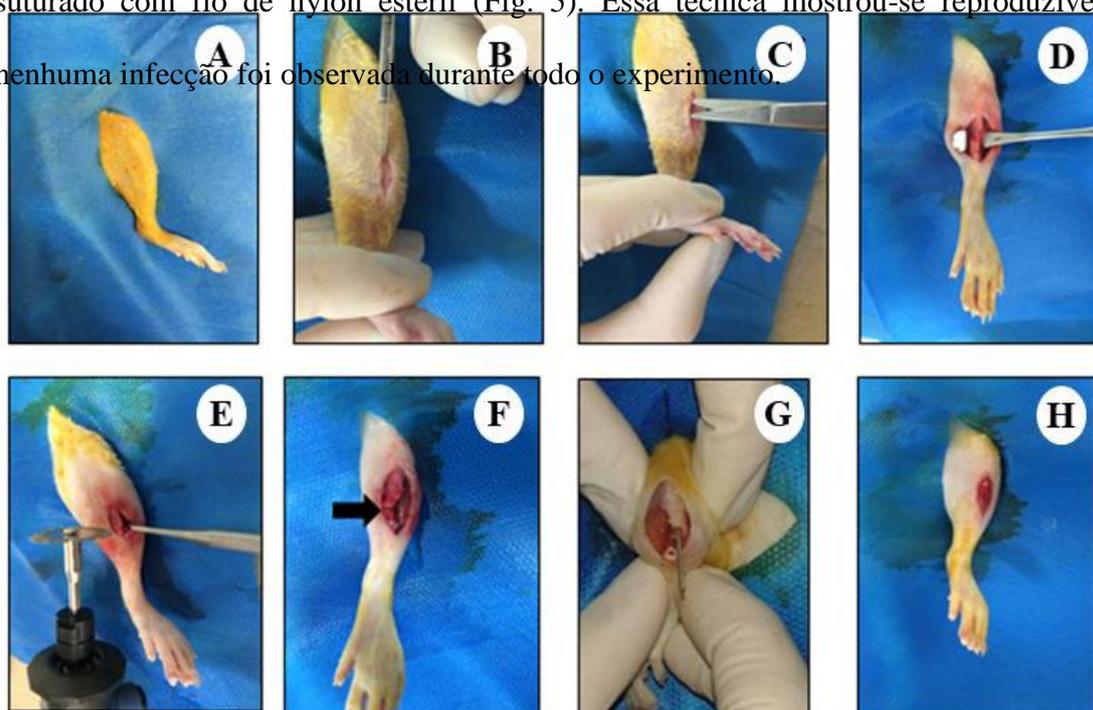


**Figura 4.** Escada utilizada para o treinamento de força (A), e animal realizando TF com carga acoplada a cauda (B).

#### 4.5 Osteotomia tibial unilateral

Finalizado os 120 dias do período de TF associado ou não ao Ral, e 24 horas após o último teste da CCMV, todos os animais foram pesados, anestesiados (cetamina 50 mg / kg foi associada a xilazina 25 mg / kg, intraperitoneal) realizado tricotomia no membro posterior esquerdo e assepsia com gaze estéril e iodopovidona. O animal estava em posição supina e o membro posterior esquerdo em rotação externa e abdução. Uma incisão de 1,5 cm foi realizada na pele através do acesso anteromedial, onde a pele e os músculos foram divulsionados para expor a região da diáfise tibial. Realizou-se osteotomia transversal (largura 0,1 mm) na diáfise tibial acima da junção tibiofibular com auxílio da micro retífica com disco de corte (Western®, 130W / 60HZ / 8.000RPM) com irrigação salina. A osteotomia foi então fixada com fio Kirshner de aço inoxidável de 1,0 mm de diâmetro (fio K) no canal medular e o local cirúrgico foi suturado com fio de nylon estéril (Fig. 5). Essa técnica mostrou-se reproduzível e

nenhuma infecção foi observada durante todo o experimento.

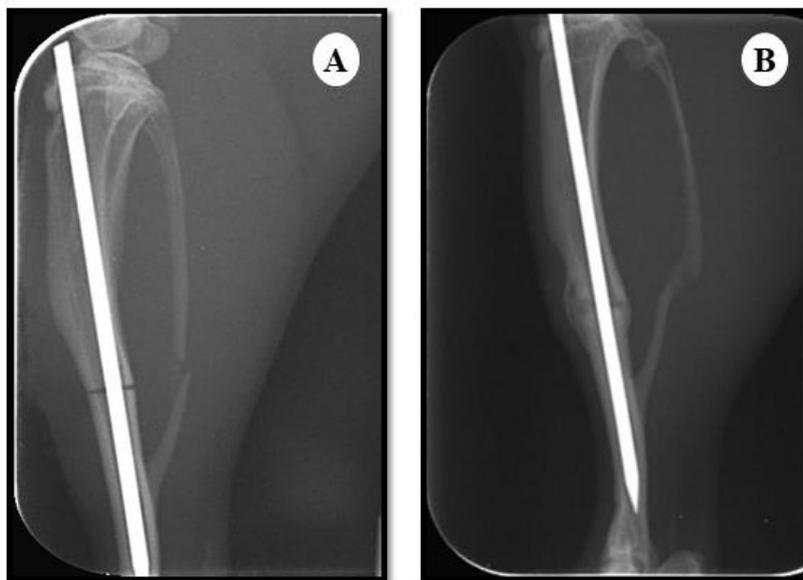


**Figura 5.** Preparação da tíbia para a osteotomia: (A) assepsia com gaze estéril e iodopovidona; (B) incisão da pele por acesso ântero-medial com bisturi; (C) divulsão da pele e dos músculos; (D e E) exposição da diáfise tibial para a osteotomia; (F) tíbia esquerda com osteotomia transversal; (G) fio de Kirschner sendo inserido no canal medular e (H) tíbia com fratura estabilizada.

Os animais foram submetidos à radiografia imediatamente após a osteotomia (Fig. 5). Para aliviar a dor pós-operatória, todas as ratas foram tratadas com tramadol (5 mg / kg / dia, i.m) três dias após a cirurgia. Os animais foram alojados individualmente até 24 horas após a cirurgia e a saúde das ratas foi monitorada diariamente.

#### 4.6 Radiologia

As radiografias foram obtidas digitalmente e anteroposteriormente com sistema de placa de fósforo - sistema PSP (placa fotoestimulável de fósforo) com animais anestesiados, imediatamente após a cirurgia e antes da eutanásia para verificar a correta reposição e estabilização da osteotomia (Fig.6). A unidade de raio-x da tíbia (GE-100, General Electric, Milwaukee, EUA) foi ajustada em 55 kVp, 10 mA, 12 pulsos, com uma distância de 30 cm do filme de foco.



**Figura 6.** Radiografia mostrando osteotomia tibial imediatamente no pós-operatório com estabilização do fio de Kirschner (A) e 8 semanas pós-operatório (B).

#### 4.7 Análise post-mortem

Após 24 horas do teste da CCMV, todos os animais foram pesados, anestesiados (cetamina 80 mg / kg foi associada a xilazina 10 mg / kg, por via intraperitoneal) e eutanasiados em 1 (n = 12 / por grupo) e 8 (n = 18 / por grupo) semanas após a osteotomia. As tíbias foram removidas para análise e o útero e os ovários foram pesados em balança de precisão para verificar possíveis efeitos do tratamento. As tíbias esquerdas foram colhidas e despidas de tecidos moles. As tíbias designadas para micro-CT e a análise histopatológica foram fixadas em paraformaldeído a 4% (PFA) à temperatura ambiente por 24 horas e após a varredura as amostras foram submetidas à desmineralização. As amostras de tíbias designadas para absorciometria de dupla energia por raios X (DXA) e a microespectroscopia de Raman foram armazenadas em soro fisiológico a -20 ° C até serem utilizadas para o teste. As tíbias designadas para análise por qRT-PCR foram rapidamente colhidas e um terço do comprimento da tíbia, centrado no local da osteotomia, foi coletado de maneira completamente estéril. Este continha o calo da osteotomia com osso cortical sem medula óssea, o qual foi lavado com solução salina. A amostra foi congelada em nitrogênio líquido, transferida para frasco de armazenamento e armazenada em freezer a -80°C até análise.

#### 4.8 Análise bioquímica

A coleta de sangue foi realizada por decapitação nos dias designados para a eutanásia. O sangue foi centrifugado (3.000 rpm; 15 minutos; 4 ° C) e o plasma e soro

foram fracionados e armazenados em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior análise bioquímica.

#### *4.8.1 Perfil bioquímico*

A atividade de cálcio (Ca) e fosfatase alcalina (Fal) plasmático foi realizada em duplicata em analisador bioquímico automatizado (BS-200 Chemistry Analyzer, Mindray Bio-Medical Electronics Co., Alemanha), previamente calibrado com calibrador comercial e controles de níveis I e II (BioSystems, Barcelona, Espanha). Utilizando conjunto de reagentes comerciais (BioSystems, Barcelona, Espanha), a concentração plasmática total de cálcio foi determinada pelo método colorimétrico da cresoltaleína complexona e fosfatase alcalina pelo método da dietanolamina. As reações foram processadas a  $37^{\circ}\text{C}$ , conforme indicado pelos fabricantes. A atividade total da fosfatase ácida resistente ao tartarato no soro (TRAP) foi determinada utilizando o ensaio colorimétrico baseado no protocolo descrito por Granjeiro et al. (44) e Janckila et al. (45).

As concentrações de estrógeno sérico (item 582251) e progesterona (item 582601) foram realizadas pelo Kit ELISA (Cayman Chemical, Michigan, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

#### *4.8.2 Avaliação do estresse oxidativo sistêmico*

A avaliação da atividade da catalase sérica (CAT) foi determinada seguindo o método Aebi (46), que é baseado no monitoramento da decomposição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por 3 minutos a 240 nm ( $\epsilon_{240} = 43,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). O meio de reação foi composto de 50 mmol / L de tampão fosfato pH 7,2 e amostra. A reação foi iniciada pela adição de 10 mmol / l de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Os valores foram expressos como nmol  $\text{H}_2\text{O}_2$  consumido / minuto /

mg de proteína total. A superóxido dismutase (SOD) foi determinada no soro pelo grau de inibição da auto-oxidação de 0,2 mmol / L de adrenalina em 50 mmol / L de tampão Glicina-NaOH a 50 mmol / L, pH 10,2, contendo 1 mmol / L de EDTA. Esta mistura de reação foi equilibrada com o ar. A oxidação da adrenalina foi monitorada a 560 nm (47) e os resultados são expressos em U / mL. O status antioxidante plasmático total (TAS) foi determinado pelo método de inibição da formação de cátions ABTS® (ácido 2,2'-azino dietil-bezotiazolina sulfônico) de acordo com Erel (2004) e pelo método Ferric Reducing Antioxidant Power (Potencial Antioxidante do Redutor Férrico) (FRAP), conforme descrito por Benzie e Strain (48). A peroxidação lipídica plasmática foi determinada a partir da quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico usando reagente comercial (TBARS Assay Kit, Zepto Metrix Corporation, EUA) e leitor (Readwell Touch, Robonik PVT LTD, Thane, Índia) a 545 nm, conforme recomendado pelo fabricante. O status oxidante total (TOS) no plasma foi determinado pelo método Xylenol Orange (49).

4.9 Análise da expressão gênica por reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa em tempo real (qRT-PCR)

#### *4.9.1 Extração e quantificação do RNA total*

As tíbias foram seccionadas ao meio, a medula óssea foi lavada e a porção medial contendo o calo foi usada. A extração de RNA total foi realizada com reagente Trizol LS (Invitrogen™), com protocolo adaptado a partir do recomendado pelo fabricante. As amostras de tecido foram pulverizadas com gral e pistilo, em nitrogênio líquido, posteriormente foi adicionado ao pó 3 mL do reagente Trizol LS, para homogeneização com o tecido. O homogenato foi transferido para tubo de 2 mL e

centrifugado para clarificação da amostra de partículas de osso não homogeneizadas (14000 RCF, 20 minutos; 4 °C). O volume de 1 mL do sobrenadante foi transferido para tubo limpo, ao qual foi adicionado 300 µL de clorofórmio, seguido de vigorosa homogeneização em agitador vórtex (2800 rpm; 20 segundos) e incubados por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas (13000 RCF; 15 minutos; 4 °C) e a fase aquosa foi coletada (400 µL) em tubos limpos. Aos tubos, foi adicionado mais 1 mL de Trizol LS e 300 µL de clorofórmio. Os tubos foram vigorosamente agitados e incubados em temperatura ambiente por 5 minutos. As amostras foram centrifugadas (13000 RCF; 15 minutos; 4 °C) e a fase aquosa foi novamente coletada (400 µL) em tubos limpos. Para precipitação do RNA foi adicionado 500 µL isopropanol, e as amostras foram mantidas a -20 °C por 2 horas. Os tubos foram então centrifugados (13000 RCF; 15 minutos; 4°C), o pellet foi lavado em etanol 75% e novamente centrifugado (10000 RCF; 10 minutos; 4°C), o sobrenadante foi descartado e o residual de solução foi evaporado com o tubo invertido. O precipitado foi diluído em 30 µL de água-DEPC e as amostras foram armazenadas a -80 °C, até os procedimentos seguintes. A quantificação do RNA total foi realizada por fluorometria com o QuantiT™ RiboGreen™ RNA Assay Kit (Invitrogen™) em equipamento Nanodrop 4000 (Thermo Fisher Scientific), seguindo as recomendações do fabricante. Além disso, a pureza das amostras foi avaliada por espectrofotometria com leituras nos comprimentos de onda de 260 nm (para ácidos nucleicos), 280 nm (para proteínas) e 230 nm (para fenol), considerando as razões 260/280 (satisfatória entre 1.8 - 2.0) e 260/230 (satisfatório entre 2.0 - 2.2). Posteriormente, com o propósito de eliminar possível contaminação por DNA genômico, anteriormente a transcrição reversa, as amostras foram tratadas com kit DNase I (SigmaAldrich), seguindo as recomendações do fabricante.

#### 4.9.2 Síntese do DNA complementar e reação em cadeia da polimerase em tempo real

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 2 µg de RNA total, por reação de transcrição reversa, utilizando o High Capacity Kit RNA-to-cDNA (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific), seguindo as recomendações do fabricante. A quantificação comparativa da expressão dos diferentes alvos foi realizada por reações em cadeia de polimerase em tempo real (qRT-PCR) aparelho StepOne™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific). Para as reações, foi utilizado o sistema TaqMan (TaqMan™ Gene Expression Assays, Applied Biosystems™), com sonda conjugada a fluoróforo FAM® e extintor MGB (FAM fluorophore reporter / non fluorescente quencher MGB), seguindo as instruções do fabricante, para os alvos descritos na Tabela 1.

**Tabela 1 - Lista de ensaios TaqMan™ usados**

<b>Fator de transcrição</b>		
<i>Catnb</i>	β-catenin/cadherin associated protein beta 1	<i>Rn00584431_g1</i>
<b>Marcadores de formação óssea</b>		
<i>Alp</i>	bone alkaline phosphatase	<i>Rn01516028_m1</i>
<i>Coll1a1</i>	collagen type I alpha 1	<i>Rn01463848_m1</i>
<i>Opn/Spp1</i>	osteopontin/secreted phosphoprotein 1	<i>Rn00681031_m1</i>
<i>Ocn/Bglap</i>	osteocalcin/bone gamma-carboxyglutamateprotein	<i>Rn00566386_g1</i>
<i>Bsp/Ibsp</i>	bone sialoprotein/integrin-binding sialoprotein	<i>Rn00561414_m1</i>
<i>Bmp2</i>	bone morphogenetic protein 2	<i>Rn00567818_m1</i>
<b>Marcadores de reabsorção óssea</b>		
<i>Opg</i>	tumor necrosis factor receptor superfamily member 11b	<i>Rn00563499_m1</i>
<i>Rankl</i>	tumor necrosis factor ligand superfamily member 11	<i>Rn00589289_m1</i>
<i>Rank</i>	tumor necrosis factor receptor superfamily member 11a	<i>Rn04340164_m1</i>
<i>Trap/Acp5</i>	acid phosphatase 5, tartrate resistant	<i>Rn00569608_m1</i>
<i>Ctsk</i>	cathepsina K	<i>Rn00580723_m1</i>
<b>Gene constitutivo (Housekeeping gene)</b>		
<i>Actb</i>	beta actin	<i>Rn00667869_m1</i>

Para eleição da diluição do cDNA melhor eficiência de reação, foram realizadas diluições seriadas de pool de cDNA das amostras (1:2, 1:4; 1:8; 1:16, e 1:32). Os ensaios foram então conduzidos com amostras nas diluições de 1:8 ou 1:4 com reagentes Taqman® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems™) e ensaio inventariado, seguindo as etapas de reação como determinado pelo fabricante (Passo 1: 2 minutos a 50 °C; Passo 2: 10 minutos a 95 °C; e Passo 3: 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 1 minutos e 60 °C). Uma reação negativa (água) foi feita para cada ensaio, como controle negativo.

#### *4.9.3 Análise dos dados de expressão gênica*

Os níveis de expressão dos genes alvo foi determinada por método de Ct comparativo, com a equação Quantificação Relativa (RQ) =  $2^{-(\Delta\Delta CT)}$  (50). De maneira breve, para o cálculo do RQ de cada amostra, foi utilizado o valor de Ct (cycle threshold ou ciclo limiar) do gene alvo e constitutivo (Actb). O valor do Ct do gene alvo foi subtraído do valor do Ct do gene constitutivo, resultando no valor de  $\Delta Ct$ ; que por sua vez foi subtraído do valor do  $\Delta Ct$  do calibrador (usando o grupo NT/Veh em 1 semana como calibrador), para resultar no valor de  $\Delta\Delta Ct$ . Este valor foi utilizado na fórmula do RQ, onde o número 2 representa a somatória da eficiência do gene alvo e do constitutivo (50).

#### 4.10 Análise histopatológica

As amostras foram submetidas à desmineralização em ácido etilenodiamina tetraacético a 10% (EDTA; Sigma-Aldrich) por 60 dias. Depois, essas amostras foram desidratadas em etanol, diafanizadas em xilol, impregnadas e embebidas em parafina histológica e finalmente seccionadas em micrótomo para cortes com 5  $\mu m$  de espessura.

A microtomia foi realizada seguindo o longo eixo do osso e as seções histológicas seriais da porção central do osso foram coletadas em lâminas de vidro e coradas com hematoxilina-eosina (HE).

A análise histopatológica foi realizada por histologista certificado e os seguintes parâmetros foram avaliados: presença ou ausência de infiltrado inflamatório; natureza do infiltrado inflamatório, se presente; extensão do infiltrado inflamatório, se presente; padrão de celularidade de tecidos moles; padrão de estruturação da matriz extracelular de tecidos moles; padrão de celularidade do tecido duro; padrão de estruturação da matriz extracelular de tecidos duros e estado da vasculatura.

#### 4.11 Microspectroscopia de Raman

Para determinar a composição e intensidades relativas do mineral e da matriz na porção central do calo, foi utilizada a microespectroscopia Raman “micro-Raman (Renishaw) no modelo Via-espalhamento Raman com aprimoramento de superfície”, com comprimento de onda do laser de 633 nm, microwatts de potência na ordem da amostra ( $\mu\text{W}$ ) e a grade com 1800 linhas por mm, como já descrito (51). O tempo de exposição foi definido em 10 segundos e o número de acumulação foi definido em cinco. A microscopia óptica foi realizada com microscópio óptico Leica (série DMLM), acoplado ao espectrógrafo e à objetiva 50x, capaz de fornecer resolução espacial da ordem de  $1,00 \mu\text{m}^2$ , detector Peltier CCD (resfriado a  $-70^\circ \text{C}$ ) e xyz motorizado estágio (motor de passo -  $0,10 \mu\text{m}$ ), no qual as amostras foram colocadas. Três espectros foram coletados de cada amostra. As razões de intensidades de pico foram usadas para calcular a razão mineral / colágeno ( $\nu\text{1PO}_4$  / Amida III) e a substituição do carbonato Tipo  $\beta$  ( $\text{CO}_3$  /  $\nu\text{1PO}_4$ ), na qual  $\nu\text{1PO}_4$ , Amida III e  $\text{CO}_3$  ocorreram de  $959$  a  $960 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1243$ – $1320 \text{ cm}^{-1}$  e  $1070$ – $1077 \text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. A cristalinidade foi determinada como o inverso da largura total na metade do máximo, em que o máximo foi a

intensidade do pico normalizada (uma) em relação à linha de base (zero) do pico do  $v\text{IPO}_4$  (52).

#### 4.12 Microtomografia computadorizada (Micro-CT)

As hastes intramedulares foram removidas e as tíbias foram escaneadas pelo micro-CT Skyscan 1272 (Skyscan, Aartselaar, Bélgica) e conduzidas com filtro de alumínio de 0,5 mm, rotação de 180 °, passo de 0,5 °, 70kV e 142 mA de configuração. Os calos foram digitalizados com resolução de 6  $\mu\text{m}$  pixel, resultando em fatias de 600  $\mu\text{CT}$  por amostra. As imagens foram reconstruídas usando o software NRecon (SkyScan, Leuven, Bélgica) e o software CTAn (Bruker-microCT), versão 2.2.1, foi utilizado para a determinação do limiar ideal dos histogramas de imagem e foi definido para delimitar o osso com mineralização baixa ou calo mole (1-120) do tecido altamente mineralizado ou calo duro com osso cortical (121-255) para análise tridimensional (3D). O mesmo limiar foi utilizado em todas as amostras.

Os parâmetros analisados para calo ósseo mole e duro: fração de volume ósseo (BV / TV;%), espessura trabecular (Tb.Th; mm), número trabecular (Tb.N; 1 / mm), momento máximo de inércia ( $I_{\text{max}}$ ;  $\text{mm}^4$ ), momento mínimo de inércia ( $I_{\text{min}}$ ;  $\text{mm}^4$ ) e momento polar de inércia ( $J$ ;  $\text{mm}^4$ ). Todas as medidas morfométricas e nomenclaturas ósseas estão de acordo com as recomendações da ASBMR (53).

#### 4.13 Absorciometria de raios X de dupla energia (DXA)

Para a densidade mineral óssea areal (DMOa), as tíbias foram descongeladas e posicionadas no plano frontal e vista anteroposterior na mesa do scanner, todas orientadas da mesma maneira, totalmente digitalizadas em recipiente com 2 cm de água, de acordo com as instruções do fabricante. A DMOa das tíbias foi avaliada por

absorciometria de dupla energia por raios X (Lunar DPX Alpha, WI, EUA) e software para medir a DMOa em pequenos animais. O equipamento foi calibrado de acordo com as instruções do fabricante. O mesmo investigador analisou todas as varreduras. Para análise do calo ósseo, a região de interesse (ROI) foi identificada usando quadrado com área conhecida ( $0,110 \text{ mm}^2$ ), localizada na região da diáfise tibial de todas as amostras. Para avaliar a DMOa de todo o osso tibial, delimitamos e interpolamos manualmente todo o osso, mantendo o calo.

#### 4.14 Análise estatística

Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). A normalidade dos dados foi analisada com o teste de normalidade Shapiro-Wilk. A análise estatística foi realizada usando ANOVA de duas vias para observar o efeito principal do tratamento de Ral (#), TF (+) e a interação de TF e Ral (§). O teste post-hoc de tukey foi realizado para análises entre grupos nos quais nenhuma interação foi observada. Além disso, comparações entre 1 x 8 semanas (°) foram realizadas quando apropriado. Para comparar a sobrecarga entre os grupos treinados, os dados foram submetidos ao teste *t* não pareado para comparação entre os grupos e ANOVA de uma via para comparação intra-grupo. O nível de significância foi de 5% para todas as análises e as análises estatísticas foram realizadas usando o GraphPad Prism (versão 6.01; GraphPad Software, Inc.).



# Resultados

## 5. Resultados

### 5.1 Condições gerais

A análise do ciclo estral das ratas Wistar, com 17 meses de idade, mostrou irregularidade do ciclo, com diestro persistente (45% no diestro, 37% no metaestro, 18% no estro e 0% no estro), alteração que caracteriza o período da periostropausa.

Perdemos 10 animais durante o período experimental que foram substituídos para manter o número da amostra (NT/Veh: 3, NT/Ral: 1, TF/Veh: 2 e TF/Ral: 4 mortes). Metade dos animais apresentava tumor no ovário ou na mama e a outra metade morreu após anestesia antes da osteotomia. A cura foi geralmente sem intercorrências para a maioria dos animais até o final do estudo.

A massa corporal inicial de todos os grupos foi equilibrada (tabela 2). No entanto, após intervenção de 120 dias, pré-osteotomia, a análise *post hoc* mostrou que os animais treinados e tratados com raloxifeno (TF/Ral) apresentaram aproximadamente 20% menor massa corporal em comparação com o grupo NT/Veh ( $p < 0,0001$ ). Essa

diferença permaneceu 1 semana após a osteotomia ( $p = 0,001$ ), no entanto não foi observada 8 semanas após.

Neste estudo, observou-se que 1 semana após o término do tratamento com Ral e osteotomia, os animais apresentaram menor massa uterina em relação aos demais grupos ( $p = 0,010$ ). Na massa ovariana, os grupos treinados apresentaram menor massa em relação aos demais ( $p = 0,005$ ). Em 8 semanas após a osteotomia, em ratas com 23 meses de idade, não foi observada diferença significativa após TF e Ral ou interação (TF§Ral) na massa corporal, uterina e ovariana.

**Tabela 2** - Massa corporal inicial (18 meses), pré-osteotomia (21 meses) e pós-osteotomia (21 e 23 meses); massa uterina e ovariana em ratas Wistar senescentes com 1 e 8 semanas pós-osteotomia, que foram previamente treinadas ou não, tratadas com Veh ou Ral.

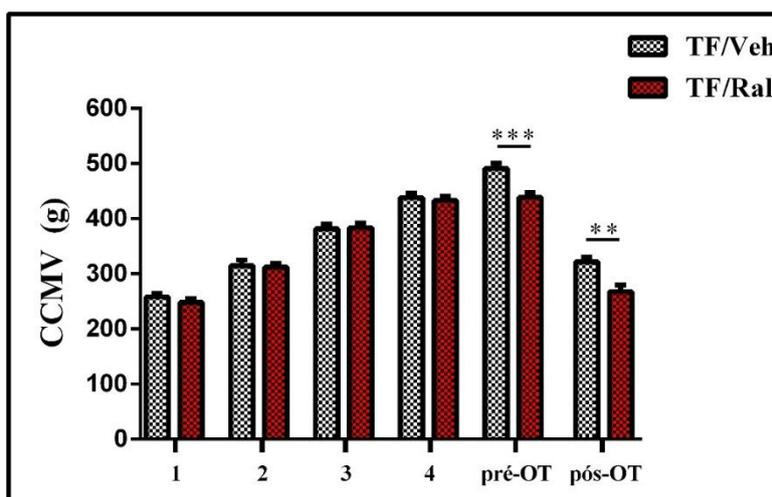
Grupos	Massa corporal (g)			Massa (g)	
	Inicial 18 meses	Pré	Pós	Uterina	Ovariana
		osteotomia 21 meses	osteotomia 21m+1sem		
NT/Veh	402,1 ± 23,4	414,6 ± 14,4	403,2 ± 12,6	0,80 ± 0,05	0,28 ± 0,02
NT/Ral	367,0 ± 12,7	373,9 ± 20,6	365,7 ± 21,7	0,60 ± 0,06 <sup>#</sup>	0,24 ± 0,07
TF/Veh	384,4 ± 12,7	375,5 ± 10,4	365,0 ± 8,4	0,81 ± 0,06	0,13 ± 0,01 <sup>+</sup>
TF/Ral	369,4 ± 8,4	330,0 ± 9,3 <sup>a</sup>	333,6 ± 8,9 <sup>a</sup>	0,60 ± 0,04	0,13 ± 0,006
			<b>21m+8sem</b>		
NT/Veh	421,4 ± 20,1	413,1 ± 12,7	389,7 ± 10,4	0,71 ± 0,05	0,17 ± 0,01
NT/Ral	400,0 ± 15,8	364,1 ± 9,6	367,9 ± 18,4	0,78 ± 0,08	0,17 ± 0,01
TF/Veh	387,3 ± 12,1	371,7 ± 15,0	379,7 ± 13,6	0,86 ± 0,08	0,18 ± 0,01
TF/Ral	394,7 ± 12,8	348,7 ± 12,8 <sup>a</sup>	370,3 ± 20,6	0,67 ± 0,05	0,16 ± 0,01

A análise estatística foi realizada com ANOVA de duas vias, seguida pelo teste *post hoc* de Tukey ( $p < 0,05$ ) para analisar o efeito do tratamento com treinamento de força (TF) e raloxifeno (Ral) e quaisquer interações (TF§Ral). Abreviações e símbolos: <sup>#</sup> efeito principal de Ral, <sup>+</sup> efeito principal de TF, <sup>§</sup> interação de TF mais Ral. <sup>a</sup> vs NT/Veh; <sup>b</sup> vs NT/Ral; <sup>c</sup> vs TF/Veh. <sup>o</sup> para comparação entre 1 e 8 semanas. NT/Veh = não treinado e tratado com veículo; NT/Ral = não treinado e tratado com raloxifeno; TF/Veh = treinamento de força e tratado com veículo e TF/Ral = treinamento de força e tratado com raloxifeno.

## 5.2 Capacidade de carga máxima voluntária (CCMV) e treinamento de força

Para verificar se o protocolo de TF utilizado no presente estudo foi eficaz, avaliamos a CCMV de cada animal. Como mostrado na Fig. 7, a CCMV foi semelhante no início do protocolo de TF entre os grupos. No entanto, nos animais que realizaram apenas TF, o teste mostrou maior sobrecarga antes e após a osteotomia ( $p < 0,001$  e  $p = 0,001$ , respectivamente) em comparação aos animais que também receberam raloxifeno.

Os animais que realizaram TF apresentaram aumento progressivo da CCMV durante o protocolo experimental. Em 8 semanas pós-osteotomia, os mesmos animais realizaram novo teste, e como esperado, apresentaram diminuição significativa da sobrecarga ( $321,8 \pm 8,67$ ), aproximadamente 34% em comparação ao último teste realizado, com sobrecarga semelhante ao 2º teste de capacidade máxima ( $314,8 \pm 10,31$ ). Os animais do grupo TF/Ral também tiveram aumento significativo da sobrecarga durante o TF. Da mesma forma, o último teste apresentou diminuição significativa da sobrecarga ( $267,94 \pm 11,74$ ), aproximadamente 38% em relação ao último teste realizado, porém com sobrecarga semelhante ao 1º teste de capacidade máxima ( $248,5 \pm 6,07g$ ).



**Figura 7.** Comparação dos testes de CCMV progressivos realizados durante 120 dias de treinamento de força (TF) dos grupos TF/Veh e TF/Ral. Os testes de CCMV foram realizados: 1 (primeiro teste - após adaptação ao exercício), 2 (após 30 dias), 3 (após 60 dias), 4 (após 90 dias), pré-OT (pré-osteotomia, após 120 dias de intervenção) e pós-OT (pós-osteotomia, 8

semanas após a osteotomia). Abreviações: TF/Veh = treinamento de força e tratado com veículo e TF/Ral = treinamento de força e tratado com raloxifeno. Os valores são apresentados como média  $\pm$  SEM. \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  usando o teste  $t$  não pareado para comparação entre os grupos.

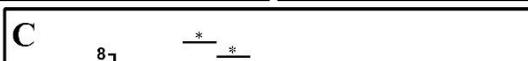
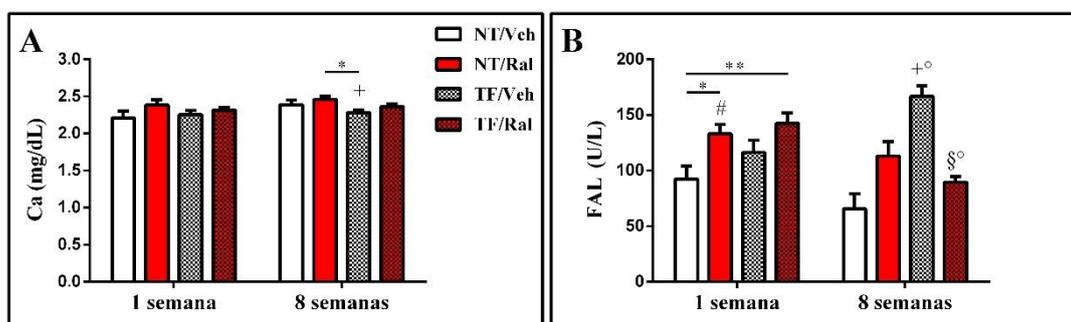
### 5.3 Análise bioquímica

#### 5.3.1 Perfil bioquímico

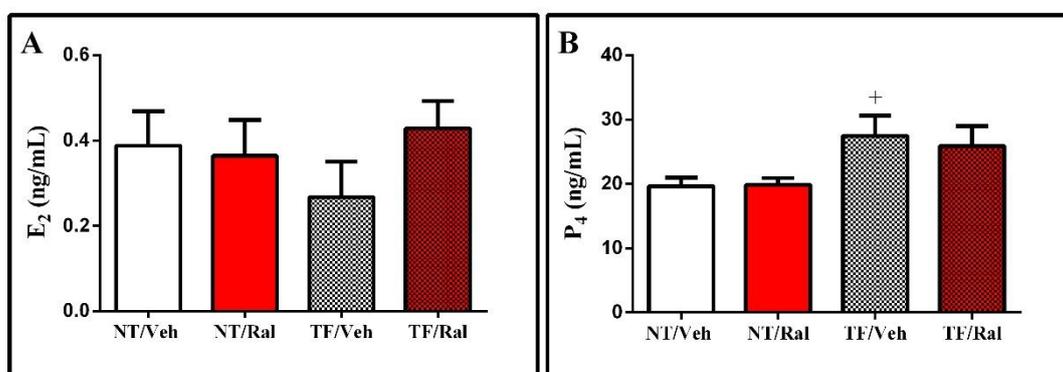
Os níveis de biomarcadores ósseos plasmáticos de cada grupo de tratamento estão mostrados na Fig. 8 e as concentrações séricas hormonais na Fig. 9.

Após 1 semana de osteotomia, os grupos tratados com Ral apresentaram maior atividade de FAL ( $p = 0,003$ ) e menor atividade de TRAP ( $p < 0,001$ ) em comparação com os outros grupos. A análise *post hoc* mostrou que o grupo TF/Veh apresentou maior atividade TRAP em comparação aos grupos NT/Ral e TF/Ral ( $p = 0,025$  e  $p = 0,035$ , respectivamente).

Em 8 semanas após a osteotomia, a concentração plasmática de cálcio foi menor após a realização do TF ( $p = 0,039$ ). A análise *post hoc* mostrou que o grupo TF/Veh apresentou menor concentração plasmática de cálcio que NT/Ral ( $p = 0,042$ ). O TF desempenhou ação importante na atividade da Fal ( $p = 0,002$ ), onde o grupo treinado teve 155% a mais de atividade da FAL em comparação ao grupo NT/Veh, no entanto, no grupo que associou as terapias, observou-se interação (TF§Ral) ( $F(1, 20) = 31,98$ ,  $p < 0,0001$ ) que diminuiu a atividade da FAL. Não foram observadas alterações na atividade da TRAP e na concentração sérica de  $E_2$  (Fig. 9) entre os animais experimentais em 8 semanas. No entanto, a concentração sérica de progesterona ( $P_4$ ) nos grupos treinados apresentou média de concentração 26% maior em comparação aos grupos que não realizaram o TF ( $p = 0,003$ ).



**Figura 8.** Concentrações plasmáticas de cálcio, fosfatase alcalina e TRAP em ratas wistar senescentes com 1 (21 meses) e 8 semanas (23 meses) após osteotomia tibial. (A) Ca, (B) FAL e (C) TRAP. Os gráficos representam a média  $\pm$  erro padrão da média ( $n = 6$ ). A análise estatística foi realizada com ANOVA de duas vias, seguida pelo teste *post hoc* de Tukey ( $p < 0,05$ ) para analisar o efeito do tratamento com treinamento de força (TF) e raloxifeno (Ral) e quaisquer interações (TF§Ral). Abreviações e símbolos: # efeito principal de Ral, + efeito principal de TF, § interação de TF e Ral, ° para diferença significativa entre os grupos na 1 ou 8 semanas, \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$ , ° para comparação entre 1 e 8 semanas. NT/Veh = não treinado e tratado com veículo; NT/Ral = não treinado e tratado com raloxifeno; TF/Veh = treinamento de força e tratado com veículo; TF/Ral = treinamento de força e tratado com raloxifeno.



**Figura 9.** Concentrações séricas de estrogênio e progesterona em ratas wistar senescentes (23 meses). (A) estradiol (E<sub>2</sub>) e (B) progesterona (P<sub>4</sub>). Os gráficos representam a média  $\pm$  erro padrão da média ( $n = 6$ ). A análise estatística foi realizada com ANOVA de duas vias, seguida pelo teste *post hoc* de Tukey ( $p < 0,05$ ) para analisar o efeito do tratamento com treinamento de força (TF) e raloxifeno (Ral) e quaisquer interações (TF§Ral). Abreviações e símbolos: + efeito principal de TF. NT/Veh = não treinado e tratado com veículo; NT/Ral = não treinado e tratado com raloxifeno; TF/Veh = treinamento de força e tratado com veículo; TF/Ral = treinamento de força e tratado com raloxifeno.

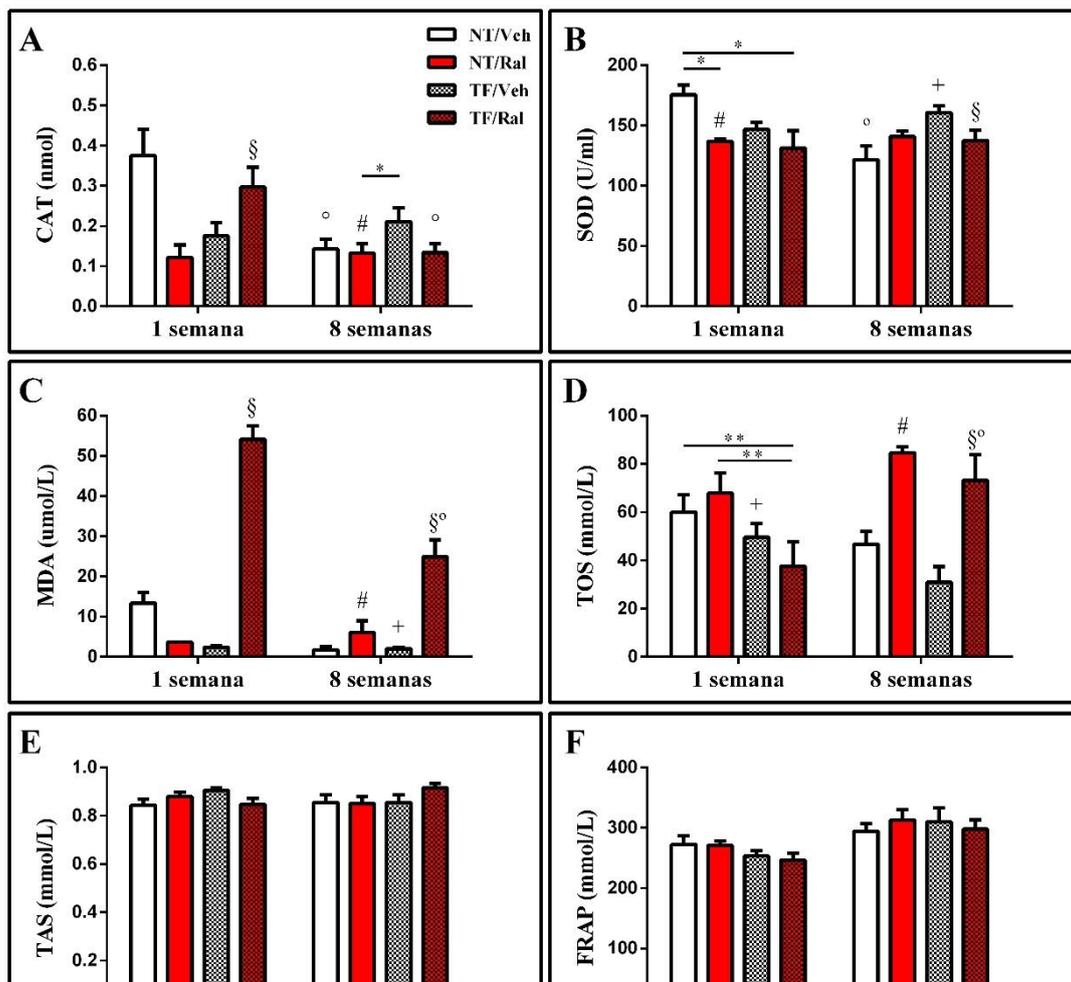
### 5.3.2 Perfil oxidativo

Em resumo, marcadores de estresse oxidativo após 1 e 8 semanas de osteotomia tibial de ratas Wistar senescentes que realizaram anteriormente tratamento com TF, Ral ou associação de TF e Ral estão demonstrados na Figura 10.

Uma semana após a osteotomia, o tratamento com Ral modulou o resultado da SOD ( $p = 0,004$ ). A análise *post hoc* mostrou que os grupos NT/Ral e TF/Ral apresentaram menor concentração sérica da SOD em comparação com NT/Veh ( $p = 0,020$  e  $p = 0,012$ , respectivamente). A associação de tratamentos (TF§Ral) mostrou efeito adicional na atividade da CAT ( $F(1, 14) = 30,44$ ,  $p < 0,0001$ ) e MDA ( $F(1, 14) = 30,44$ ,  $p < 0,0001$ ).

Em 8 semanas, Ral mostrou efeito significativo que levou a menor atividade de CAT ( $p = 0,015$ ), bem como maior MDA ( $p = 0,001$ ) e TOS ( $p < 0,0001$ ) nos grupos tratados com o fármaco. Por outro lado, o TF apresentou efeitos opostos, levando a maior atividade da SOD ( $p = 0,002$ ) e menor MDA ( $p = 0,002$ ). Os efeitos benéficos do TF não se perpetuaram no grupo que associou as terapias, que apresentaram interação (TF§Ral) para menor atividade da SOD ( $F(1, 26) = 7,609$ ,  $p = 0,010$ ) e aumento do MDA ( $F(1, 17) = 13,25$ ,  $p = 0,002$ ).

No presente estudo, os tratamentos propostos não tiveram efeito sobre a capacidade de redução férrica do plasma (FRAP) e *status* antioxidante total (TAS), independentemente do tempo após a osteotomia.

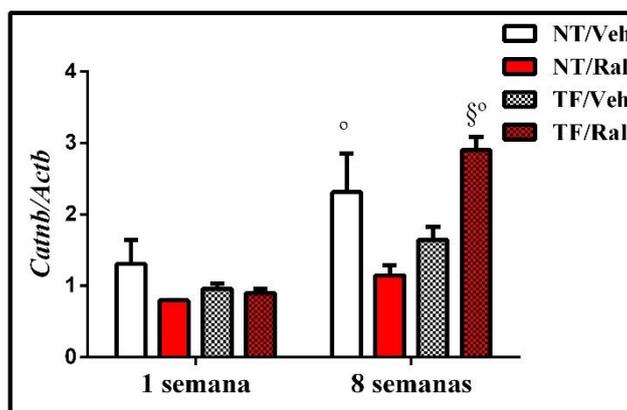


**Figura 10.** Efeito do pré-tratamento do treinamento de força e do raloxifeno em ratas wistar senescentes com 1 (21 meses) e 8 semanas (23 meses) após osteotomia tibial nos marcadores de estresse oxidativo. (A) CAT, (B) SOD, (C) MDA, (D) TOS, (E) TAS e (F) FRAP. Os gráficos representam a média  $\pm$  erro padrão da média ( $n = 12$ ). A análise estatística foi realizada com ANOVA de duas vias, seguida de teste post hoc de Tukey para analisar o efeito do tratamento com treinamento de força (TF) e raloxifeno (Ral) e quaisquer interações (TF§Ral). Abreviações e símbolos: # efeito principal de Ral, + efeito principal de TF, § interação de TF e Ral, — para diferença significativa entre os grupos na 1 ou 8 semanas, \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$ , ° para comparação entre 1 e 8 semanas. NT/Veh = não treinado e tratado com veículo; NT/Ral = não treinado e tratado com raloxifeno; TF/Veh = treinamento de força e tratado com veículo; TF/Ral = treinamento de força e tratado com raloxifeno; CAT = catalase; SOD = superóxido dismutase; MDA = malondialdeído; FRAP = poder antioxidante do redutor férrico; TOS = status oxidante total e TAS = status antioxidante total.

## 5.4 PCR

### 5.4.1 Efeito dos tratamentos prévios sobre fator de transcrição associado à osteoblastogênese

Não foi observada alteração na expressão gênica de *Catnb* 1 semana após a osteotomia (Fig.11), no entanto, o marcador para fator de transcrição associado à osteoblastogênese foi afetado pela associação das terapias (TF§Ral), 8 semanas após a osteotomia, mostrando interação com aumento significativo frente aos grupos tratados isoladamente ( $F(1, 23) = 17,67$ ,  $p = 0,0003$ ).



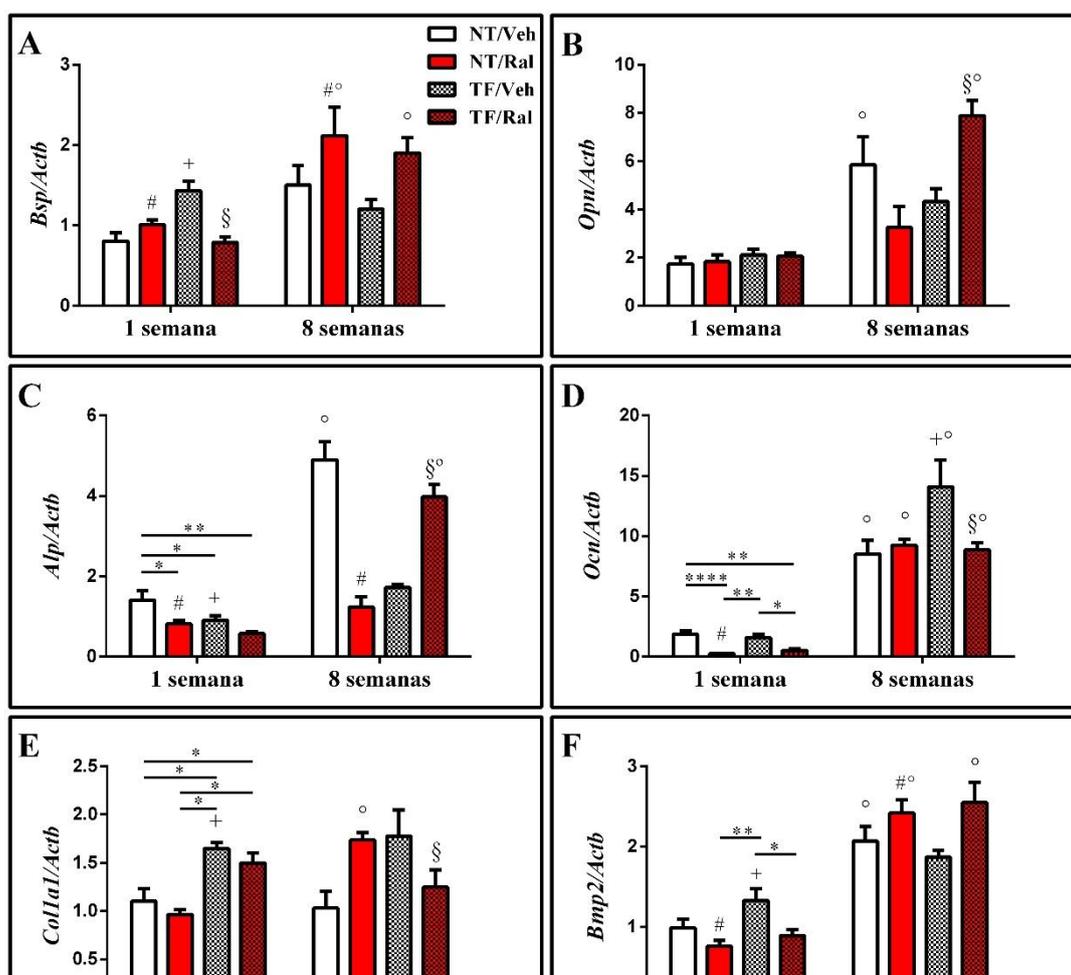
**Figura 11.** Expressão gênica do fator de transcrição *Catnb* em ratas Wistar senescentes após realização de TF, tratamento com Ral ou associação de TF e Ral por 120 dias, após 1 semana (com 21 meses) e 8 semanas (com 23 meses) de osteotomia tibial. Os gráficos representam a média  $\pm$  erro padrão da média (n = 5). A análise estatística foi realizada com ANOVA de duas vias, seguida pelo teste *post hoc* de Tukey para analisar o efeito do tratamento com treinamento de força (TF) e raloxifeno (Ral) e quaisquer interações (TF  $\times$  Ral). Abreviações e símbolos:  $\text{§}$  interação de TF e Ral,  $^{\circ}$  para comparação entre 1 e 8 semanas. NT/Veh = não treinado e tratado com veículo; NT/Ral = não treinado e tratado com raloxifeno; TF/Veh = treinamento de força e tratado com veículo e TF/Ral = treinamento de força e tratado com raloxifeno.

#### 5.4.2 Efeito dos tratamentos prévios sobre os marcadores de formação óssea

A expressão gênica dos marcadores de formação óssea 1 semana após a osteotomia foi modulada com os tratamentos (Fig.12). O tratamento com Ral aumentou a expressão de *Bsp* ( $p = 0,031$ ) e modulou negativamente a expressão de *Alp* ( $p = 0,011$ ), *Ocn* ( $p < 0,0001$ ) e *Bmp2* ( $p = 0,003$ ). O TF também foi capaz de modular positivamente a expressão de *Bsp* ( $p = 0,046$ ), embora o grupo TF/Veh tenha mostrado 44% mais expressão do que o grupo NT/Ral. Além disso, o TF realizado previamente modulou negativamente a expressão de *Alp* ( $p = 0,011$ ), mas teve efeito principal na modulação positiva de *Colla1* ( $p < 0,001$ ), onde é possível observar que os grupos treinados apresentaram em média 35% a mais de expressão em relação aos demais grupos e *Bmp2* ( $p = 0,032$ ), com expressão 40% maior. A associação dos tratamentos (TF $\times$ Ral) mostrou interação na expressão de *Bsp*, onde é possível observar diminuição significativa ( $F(1, 29) = 18,63$ ,  $p = 0,0002$ ).

Em 8 semanas após a osteotomia, houve efeito principal de Ral, modulando positivamente a expressão de *Bsp* ( $p = 0,024$ ) e *Bmp2* ( $p = 0,010$ ) nos grupos tratados com o fármaco. Por outro lado, a expressão de *Alp* foi modulada negativamente após o

tratamento com Ral antes da osteotomia ( $p = 0,032$ ). O principal efeito do TF foi observado com maior expressão de *Ocn* em comparação aos outros grupos ( $p = 0,036$ ). Por outro lado, o efeito do TF não foi suficiente para aumentar a expressão de *Ocn* do grupo que associou as terapias; pelo contrário, houve interação negativa entre os tratamentos (TF&Ral) ( $F(1, 27) = 6,308$ ,  $p = 0,018$ ), o mesmo ocorreu na expressão de *Colla1*, ( $F(1,26) = 11,66$ ,  $p = 0,002$ ) mostrando expressão 30% menor em comparação aos grupos tratados isoladamente. Os grupos que associaram as terapias interagiram (TF&Ral) com efeitos adicionais na expressão de *Opn* ( $F(1, 24) = 12,98$ ,  $p = 0,001$ ), que mostraram em média 50% mais expressão em comparação aos grupos com tratamentos isolados e *Alp* ( $F(1, 23) = 92,00$ ,  $p < 0,0001$ ).



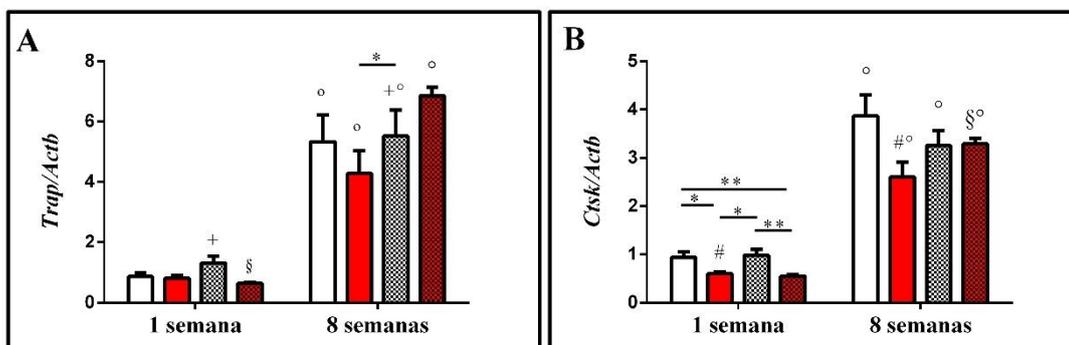
**Figura 12.** Expressão gênica dos marcadores de formação óssea, (A) *Bsp*, (C) *Opn*, (D) *Alp*, (E) *Ocn*, (F) *Coll1a1* e (G) *Bmp2*, em ratas Wistar senescentes após realização de TF, tratamento com Ral ou associação de TF e Ral por 120 dias, após 1 semana (com 21 meses) e 8 semanas (com 23 meses) de osteotomia tibial. Os gráficos representam a média  $\pm$  erro padrão da média (n = 5). A análise estatística foi realizada com ANOVA de duas vias, seguida pelo teste *post hoc* de Tukey para analisar o efeito do tratamento com treinamento de força (TF) e raloxifeno (Ral) e quaisquer interações (TF  $\times$  Ral). Abreviações e símbolos: # efeito principal de Ral, + efeito principal de TF, § interação de TF e Ral, ° para diferença de significância entre os grupos na 1 ou 8 semanas, \* p <0,05, \*\* p <0,01 e \*\*\*\* p <0,0001, ° para comparação entre 1 e 8 semanas. NT/Veh = não treinado e tratado com veículo; NT/Ral = não treinado e tratado com raloxifeno; TF/Veh = treinamento de força e tratado com veículo e TF/Ral = treinamento de força e tratado com raloxifeno.

#### 5.4.3 Efeito dos tratamentos prévios sobre os marcadores de reabsorção óssea

Os marcadores de reabsorção óssea em 1 semana foram afetados pelos tratamentos propostos, onde Ral modulou negativamente a expressão de *Ctsk* (p <0,0001). Por outro lado, o TF teve efeito principal na modulação positiva da expressão de *Trap* (p = 0,008), porém esse efeito não se reproduziu no grupo que associou as terapias, pois houve interação dos tratamentos (TF $\times$ Ral) (F (1, 33) = 5,657, p = 0,023), com menor expressão de *Trap*.

Em 8 semanas após a osteotomia, TF continuou modulando a expressão de *Trap* (p = 0,036), agora com os dois grupos treinados com aumento da expressão. A expressão relativa de *Ctsk* continuou a ser modulada negativamente pelo tratamento com Ral (p = 0,042), no entanto, a associação dos tratamentos mostrou interação

positiva (ST§Ral) na expressão de *Ctsk* ( $F(1, 26) = 5,158, p = 0,031$ ), 21% a mais que no grupo NT/Ral.



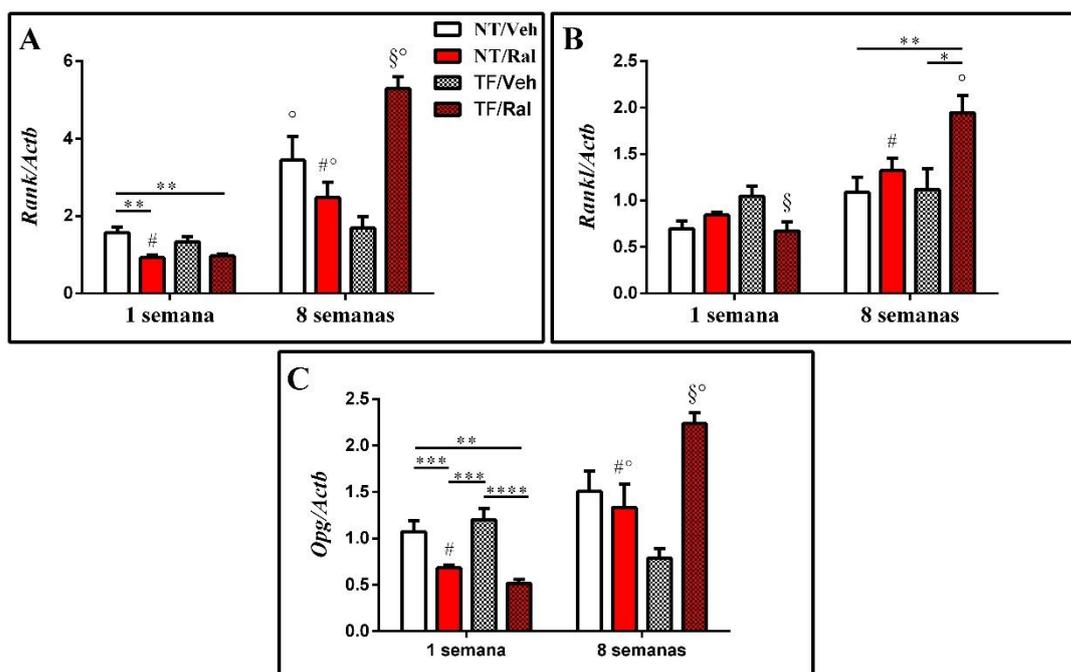
**Figura 13.** Expressão gênica dos marcadores de reabsorção óssea (A) *Trap* e (B) *Ctsk* em ratos Wistar senescentes após realização de TF, tratamento com Ral ou associação de TF e Ral por 120 dias, após 1 semana (com 21 meses) e 8 semanas (com 23 meses) de osteotomia tibial. Os gráficos representam a média  $\pm$  erro padrão da média ( $n = 5$ ). A análise estatística foi realizada com ANOVA de duas vias, seguida pelo teste post hoc de Tukey para analisar o efeito do tratamento com treinamento de força (TF) e raloxifeno (Ral) e quaisquer interações (TF  $\times$  Ral). Abreviações e símbolos: # efeito principal de Ral, + efeito principal de TF, § interação de TF e Ral, para diferença de significância entre os grupos na 1 ou 8 semanas, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , ° para comparação entre 1 e 8 semanas. NT/Veh = não treinado e tratado com veículo; NT/Ral = não treinado e tratado com raloxifeno; TF/Veh = treinamento de força e tratado com veículo e TF/Ral = treinamento de força e tratado com raloxifeno.

#### 5.4.3 Efeito dos tratamentos prévios sobre os marcadores de remodelamento ósseo

Marcadores de remodelação em 1 semana foram afetados pelos tratamentos propostos, onde Ral modulou negativamente a expressão de *Rank* ( $p < 0,001$ ) e *Opg* ( $p < 0,0001$ ). O grupo TF/Ral mostrou interação significativa na expressão relativa de *Rankl*, que foi modulada negativamente pela associação de tratamentos (ST§Ral) ( $F(1, 33) = 7,293, p = 0,010$ ).

A expressão relativa *Rank* e *Opg* foi modulada negativamente pelo tratamento com Ral em 8 semanas ( $p = 0,008$  e  $p = 0,006$ , respectivamente), no entanto, a expressão de *Rankl* foi modulada positivamente ( $p = 0,007$ ), onde os grupos tratados

com o fármaco tiveram maior expressão em comparação com os outros grupos. Além disso, podemos observar que a associação de tratamentos mostrou interação positiva (TF§Ral) na expressão de *Rank* ( $F(1,27) = 24,39, p < 0,0001$ ) e *Opg* ( $F(1, 26) = 14,10, p < 0,001$ ), com mais expressão em comparação aos grupos tratados isoladamente.



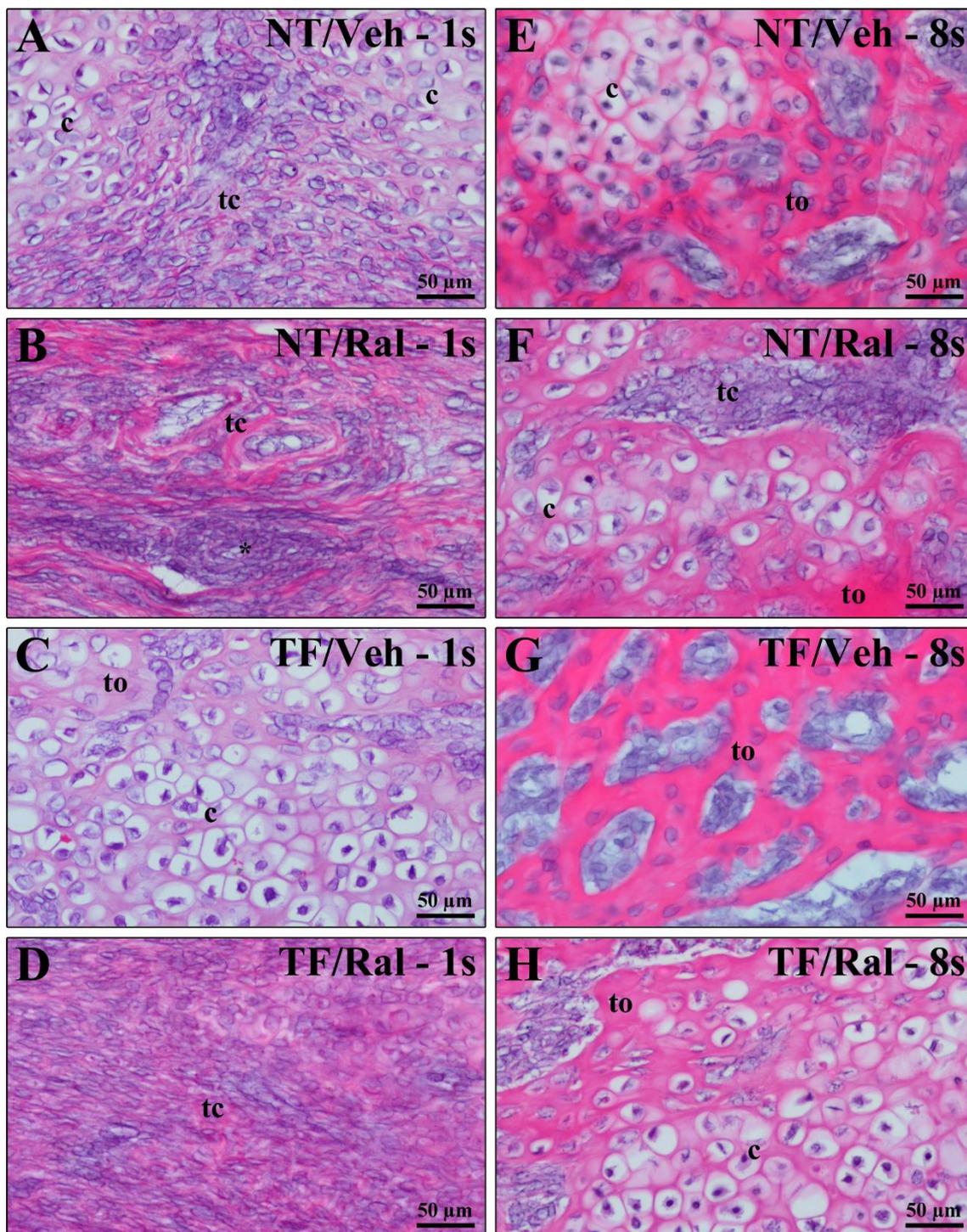
**Figura 14.** Expressão gênica de marcadores de remodelação óssea (A) *Rank*, (B) *Rankl* e (C) *Opg* em ratos Wistar senescentes após realização de TF, tratamento com Ral ou associação de TF e Ral por 120 dias, após 1 semana (com 21 meses) e 8 semanas (com 23 meses) de osteotomia tibial. Os gráficos representam a média  $\pm$  erro padrão da média ( $n = 5$ ). A análise estatística foi realizada com ANOVA de duas vias, seguida pelo teste *post hoc* de Tukey para analisar o efeito do tratamento com treinamento de força (TF) e raloxifeno (Ral) e quaisquer interações (TF  $\times$  Ral). Abreviações e símbolos: # efeito principal de Ral, + efeito principal de TF, § interação de TF e Ral, --- para diferença de significância entre os grupos na 1 ou 8 semanas, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , ° para comparação entre 1 e 8 semanas. NT/Veh = não treinado e tratado com veículo; NT/Ral = não treinado e tratado com raloxifeno; TF/Veh = treinamento de força e tratado com veículo e TF/Ral = treinamento de força e tratado com raloxifeno.

### 5.5 Análise histopatológica

Uma semana após a osteotomia, o grupo NT/Veh apresentou predominância de tecido conjuntivo muito celularizado e muito vascularizado na área fraturada e arredores, alguns focos de células inflamatórias, poucos focos de tecido cartilaginoso hialino e raros locais de ossificação. Em NT/Ral e TF/Ral, também havia predominância de tecido conjuntivo na área fraturada e nas áreas adjacentes; no entanto, os focos inflamatórios das células eram mais comuns do que nos outros grupos, raramente havia focos de tecido cartilaginoso hialino e de ossificação. Em TF/Veh houve predominância de tecido cartilaginoso, porém, como nos demais grupos, também foi observado tecido conjuntivo muito celularizado e rico em vasos sanguíneos, com células inflamatórias raras. Nesse grupo, em contraste com os demais, foram observados vários locais de ossificação, compostos por delicada rede de trabéculas ósseas constituída por tecido ósseo imaturo e distribuído difusamente na área fraturada e nas áreas adjacentes, o que denota claramente aceleração do processo de reparo ósseo (Fig. 15).

Em 8 semanas, no grupo NT/Veh, observou-se grande calo duro, predominantemente composto por tecido ósseo, constituído por trabéculas ósseas espessas, e áreas com tecido cartilaginoso hialino e tecido conjuntivo. Nos grupos

NT/Ral e TF/Ral, o calo duro era volumoso, predominando tecido ósseo imaturo, constituído por trabéculas ósseas extremamente finas e muito irregulares. Além disso, a persistência de locais com tecido cartilaginoso hialino e tecido conjuntivo estava presente e intercalada com o tecido ósseo. No grupo TF/Veh, o calo duro foi inteiramente constituído por trabéculas ósseas espessas e regulares, não foram observadas áreas de cartilagem hialina, indicando maior maturação do calo duro. Em todos os grupos experimentais foi encontrada reconstituição do perióstio na maioria das amostras (Fig. 15).



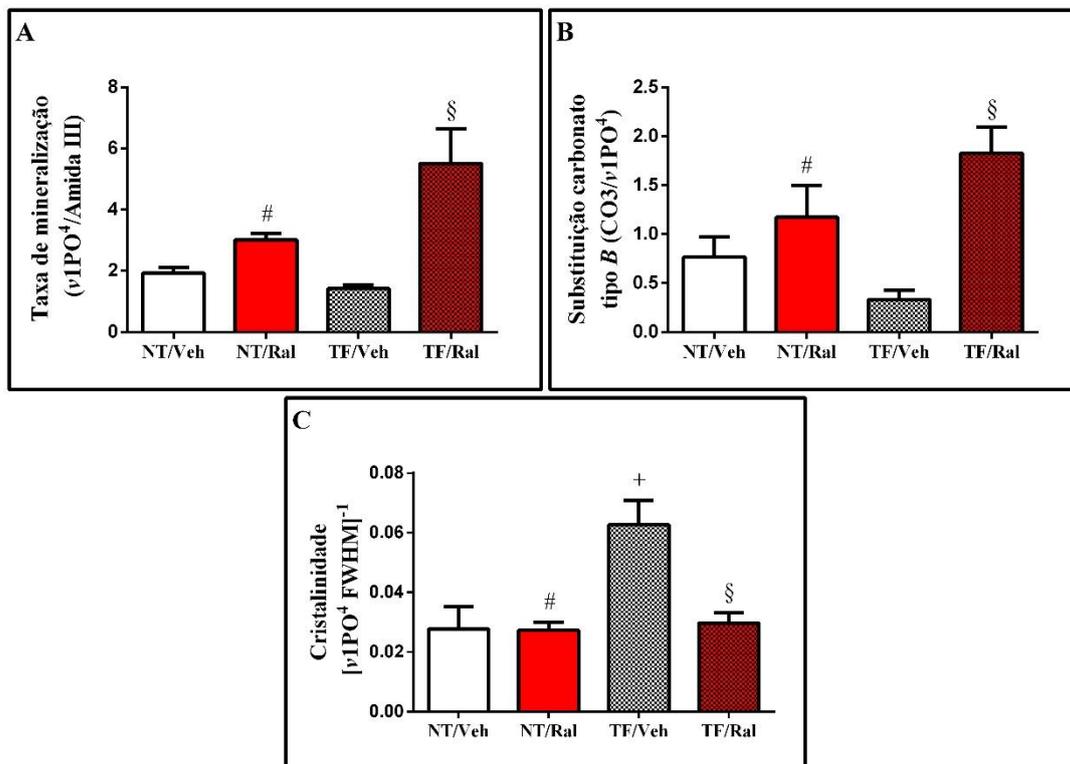
**Figura 15.** Aspecto histopatológico da área fraturada e circunferência nos grupos NT/Veh (A, E), NT/Ral (B, F), TF/Veh (C, G), TF/Ral (D, H) em 1 (A - D) e 8 semanas (E - H) após a osteotomia. Abreviações e símbolos: asteriscos, infiltrado inflamatório; tc, tecido conjuntivo; c, cartilagem; tecido ósseo. Coloração: HE. Barras de escala: 50 µm.

5.6 Análise das propriedades físico-químicas dos calos ósseos por microespectroscopia de Raman

Estudamos a matriz e os componentes minerais no calo ósseo após 8 semanas de osteotomia em ratas Wistar senescentes, previamente treinadas e tratadas com raloxifeno por microespectroscopia de Raman confocal a laser (Fig. 16).

O principal efeito de Ral ( $p < 0,001$ ) foi observado na análise da taxa mineral/matriz, onde os grupos tratados com o fármaco apresentaram menor taxa, com pior mineralização. No entanto, o grupo que associou as terapias mostrou efeito adicional, mostrando interação dos tratamentos (TF§Ral) após 8 semanas de osteotomia ( $F(1,22) = 5,676$ ,  $p = 0,026$ ). O mesmo resultado foi observado na análise da substituição de carbonato do tipo B ( $p < 0,001$  e  $F(1, 25) = 6,272$ ,  $p = 0,019$ , respectivamente).

Neste estudo, os grupos tratados com Ral apresentaram cristais mais recentes em relação aos outros grupos, mostrando efeito do fármaco sobre a cristalinidade ( $p = 0,007$ ). A cristalinidade foi maior após TF ( $p = 0,002$ ), mostrando cristais mais antigos, no entanto, esse resultado não foi observado no grupo que associou as terapias, onde a droga mostrou ter impacto maior que o fator mecânico, com interação dos tratamentos (TF§Ral) ( $F(1, 32) = 7,931$ ,  $p = 0,008$ ).



**Figura 16.** Efeito do pré-tratamento do treinamento de força e do raloxifeno em ratas Wistar senescentes, 8 semanas após osteotomia tibial, nos parâmetros de microespectroscopia de Raman obtidos no calo ósseo, (A) Razão mineral / colágeno (v1PO<sub>4</sub> / Amida III), (B) substituição de carbonato de tipo B (CO<sub>3</sub> / v1PO<sub>4</sub>) e (C) cristalinidade. Os gráficos representam a média ± erro padrão da média (n = 6). A análise estatística foi realizada com ANOVA de duas vias, seguida pelo teste *post hoc* de Tukey para analisar o efeito do tratamento com treinamento de força (TF) e raloxifeno (Ral) e quaisquer interações (TF § Ral). Abreviações e símbolos: # efeito principal de Ral, + efeito principal de TF e § interação de TF mais Ral. NT/Veh = não treinado e tratado com veículo; NT/Ral = não treinado e tratado com raloxifeno; TF/Veh = treinamento de força e tratado com veículo; TF/Ral = treinamento de força e tratado com raloxifeno.

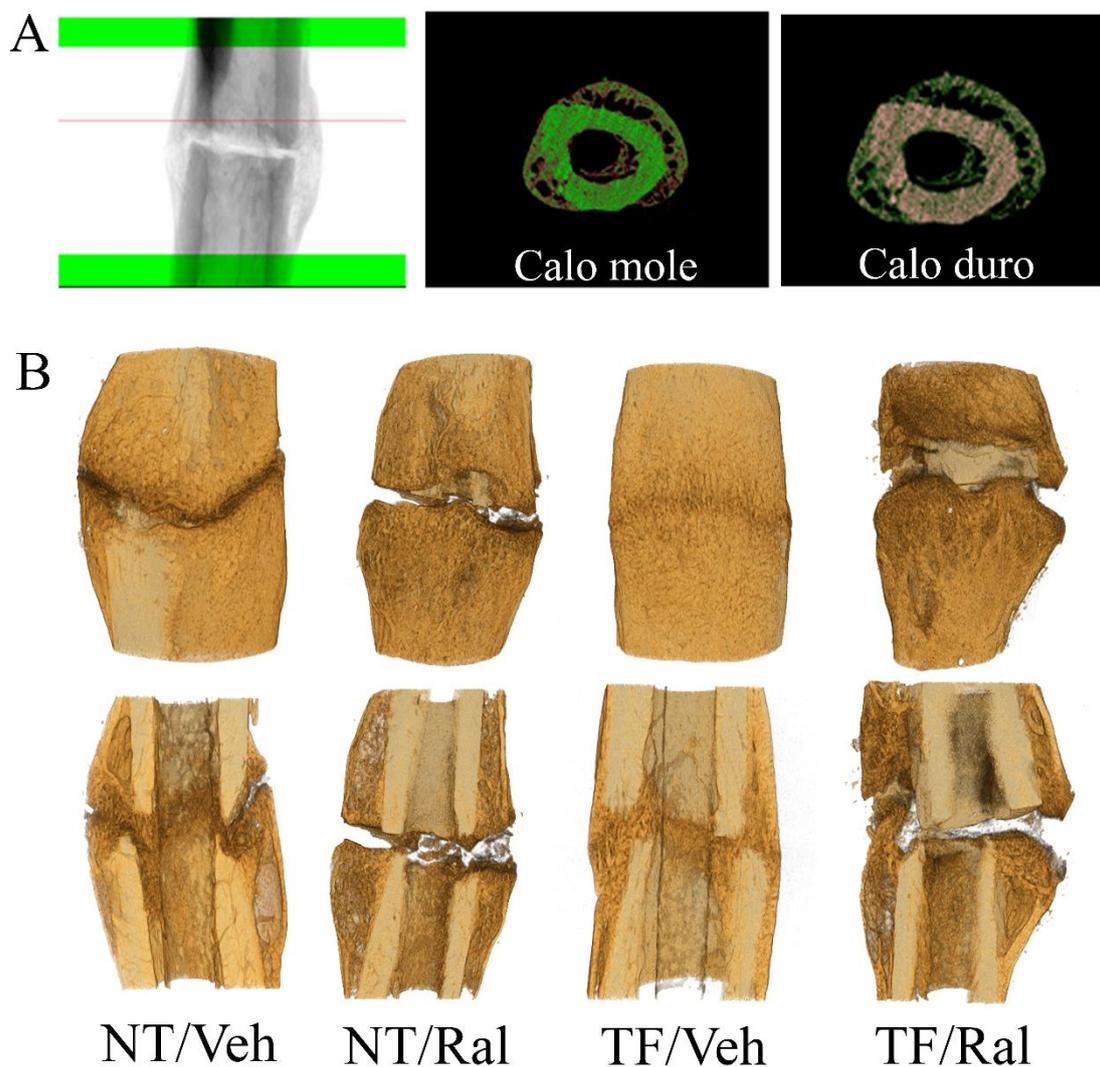
## 5.7 Microtomografia óssea

### 5.7.1 Análise da qualidade óssea

A partir da reconstrução tridimensional do calo ósseo tibial, oito semanas após a osteotomia, avaliamos qualitativamente as lacunas após a osteotomia (Fig. 17).

A lacuna da osteotomia do grupo TF/Veh se encontra mais consolidado e mais difícil de observar, enquanto nos demais grupos, especialmente nos grupos tratados com

Ral, pode ser visto com clareza, com grandes lacunas e, conseqüentemente, com consolidação óssea tardia.



**Figura 17.** Efeito do pré-tratamento do treinamento de força e do raloxifeno em ratas Wistar senescentes, 8 semanas após osteotomia tibial na microtomografia do calo ósseo. (A) Imagem digitalizada da tíbia, com dimensões da região de interesse da diáfise tibial (600 fatias) e a caracterização do calo ósseo mole (esquerda) e calo duro (direita) a partir do diagrama esquemático do limiar do micro-CT, onde os pontos cor de rosa são analisados pelo programa. (B) Reconstrução em 3D do calo ósseo na região da diáfise tibial, 8 semanas após a osteotomia, onde a média dos valores de volume total (VT) foi utilizada para selecionar as amostras representativas de cada grupo. Superior: imagens completas, inferior: seção coronal.

### 5.7.2 Microarquitetura dos calos ósseos moles e duros

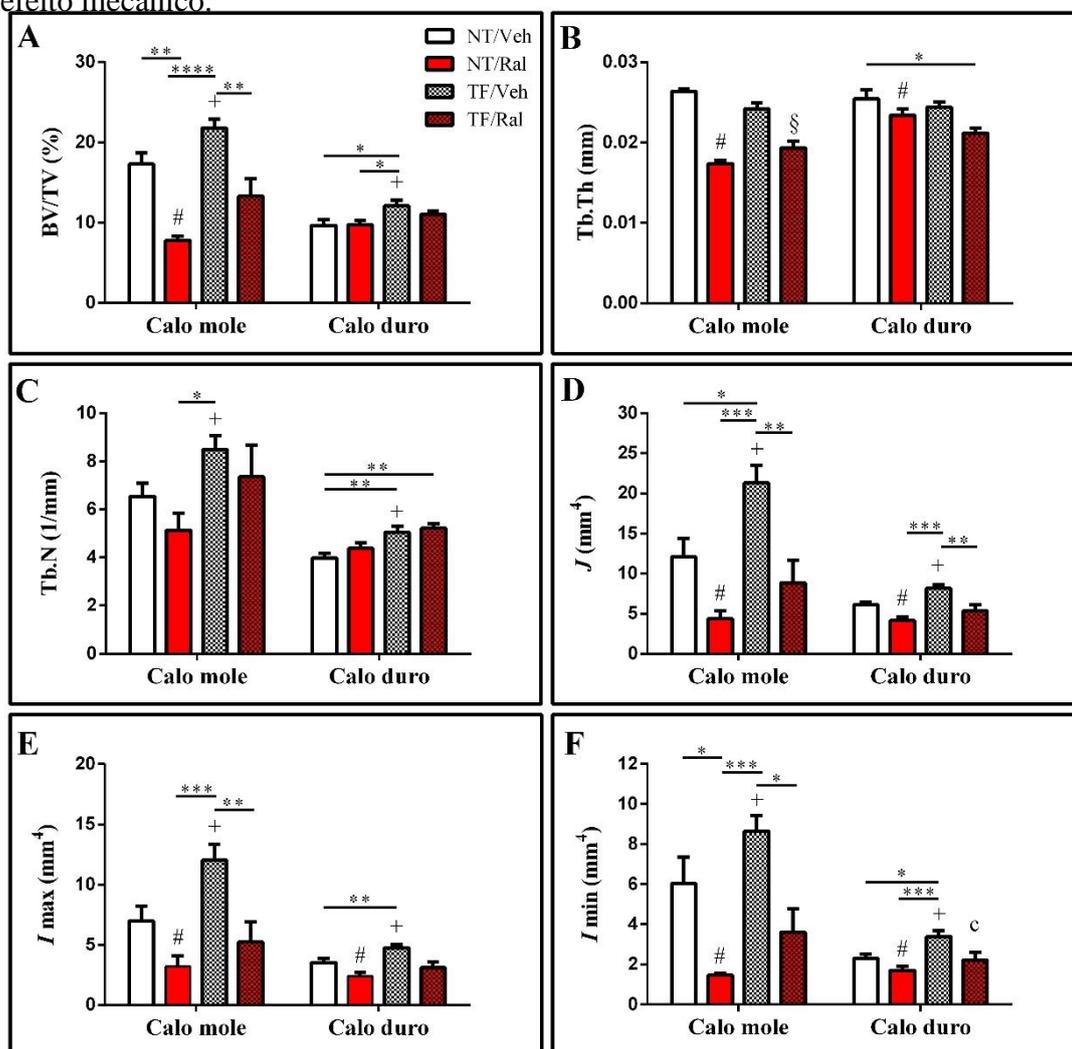
Quantitativamente avaliamos os calos moles e duros 8 semanas após a osteotomia (Fig. 18). O tratamento com Ral modulou significativamente a fração de volume ósseo

do calo mole (BV/TV) ( $p < 0,0001$ ), onde pode-se observar que os grupos tratados com o fármaco apresentaram menor BV/TV em comparação aos demais grupos. O grupo TF mostrou efeitos principais na fração de volume ósseo tanto no calo mole ( $p = 0,003$ ) quanto no duro ( $p = 0,003$ ). Em média, o grupo TF/Veh apresentou volume de calo mole 42% maior e volume de calo duro 20% maior em comparação aos outros grupos; no entanto, o efeito do TF não foi suficiente para aumentar a BV/TV no grupo que associou as terapias, mostrando novamente o maior impacto do fármaco frente ao componente mecânico.

Neste estudo, houve efeito principal de Ral na espessura trabecular (Tb.Th) tanto no calo mole quanto no duro ( $p < 0,0001$  e  $p = 0,033$ , respectivamente), onde os grupos tratados com Ral apresentaram menor Tb.Th comparados aos outros grupos. Apesar da interação (TF§Ral) ( $F(1, 17) = 14,02$ ,  $p = 0,001$ ) no calo mole, o grupo que associou os tratamentos ainda apresentou 22% de espessura inferior ao grupo que apenas treinou. Efeitos após TF foram observados no Tb.N no calo mole e duro ( $p = 0,004$  e  $p < 0,001$ , respectivamente), com maior número de trabéculas nos grupos treinados em comparação aos outros grupos.

Também estávamos interessados em analisar a resistência do calo à deformação torcional demonstrada pelos momentos polares de inércia. O momento polar de inércia ( $J$ ), o momento máximo de inércia ( $I_{max}$ ) e o momento mínimo de inércia ( $I_{min}$ ) tiveram seus resultados de calos moles ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,001$  e  $p = 0,002$ , respectivamente) e duros calos ( $p = 0,001$ ,  $p = 0,021$  e  $p = 0,004$ , respectivamente) afetados pelo tratamento de Ral, com diminuição da resistência nos grupos tratados com o fármaco. Por outro lado, o TF mostrou efeito positivo em todos os parâmetros analisados, tanto no calo mole ( $p = 0,005$ ,  $p = 0,013$  e  $p = 0,038$ , respectivamente) quanto no calo duro ( $p = 0,004$ ,  $p = 0,001$  e  $p = 0,007$ , respectivamente). No entanto,

esse efeito não foi suficiente para aumentar a resistência óssea dos grupos que associaram as terapias, que mais uma vez tiveram maior influência do fármaco do que a do efeito mecânico.

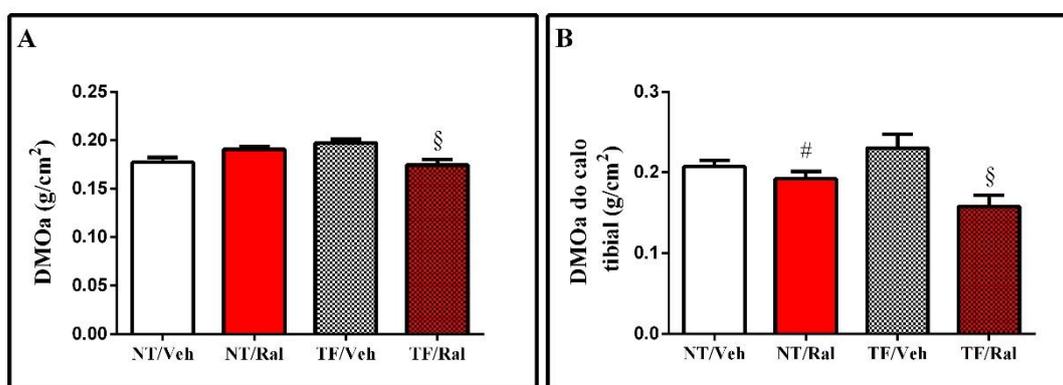


**Figura 18.** Efeito do pré-treato do treinamento de força e do raloxifeno em ratos Wistar senescentes, 8 semanas após osteotomia tibial sobre a microarquitetura do calo mole e duro. (A) BV/TV, (B) Tb.Th, (C) Tb.N, (D) J, (E) I max e (F) I min. Os gráficos representam a média ± erro padrão da média (n = 6). A análise estatística foi realizada com ANOVA de duas vias, seguida pelo teste post hoc de Tukey para analisar o efeito do tratamento com treinamento de força (TF) e raloxifeno (Ral) e quaisquer interações (TF § Ral). Abreviações e símbolos: # efeito principal de Ral, + efeito principal de TF e § interação de TF mais Ral, para diferença de significância entre os grupos no calo mole ou duro, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001 e \*\*\*\* p < 0,0001. NT/Veh = não treinado e tratado com veículo; NT/Ral = não treinado e tratado com raloxifeno; TF/Veh = treinamento de força e tratado com veículo; TF/Ral = treinamento de força e tratado com raloxifeno, BV / TV = fração do volume ósseo; Tb.Th = espessura trabecular; Tb.N = número trabecular; J = momento de inércia polar, I max = momento de inércia máximo e I min = momento de inércia mínimo.

### 5.8 Massa óssea

Para avaliar se TF, Ral ou TF§Ral podem influenciar a massa óssea após a osteotomia, avaliamos a densidade mineral óssea areal (DMOa) na tíbia total e no calo tibial por absorciometria de dupla energia de raios X (DXA) (Fig. 19). A análise da DMOa da tíbia total mostrou interação dos tratamentos (ST§Ral) após 8 semanas de osteotomia ( $F(1, 19) = 8,774$ ,  $p = 0,008$ ), onde foi observado que a associação de tratamentos diminuiu a DMOa total.

A análise da DMOa do calo tibial mostrou efeito após o tratamento com Ral ( $p = 0,013$ ) cuja densidade foi menor nos grupos tratados com o fármaco. Além disso, houve interação (ST§Ral), pois a associação diminuiu ainda mais a densidade óssea ( $F(1, 18) = 5,792$ ,  $p = 0,027$ ).



**Figura 19.** Efeito do pré-tratamento do treinamento de força e do raloxifeno em ratas Wistar senescentes, 8 semanas após osteotomia tibial, na densidade mineral óssea areal *ex vivo* (DMOa), (A) DMOa da tíbia total e (B) DMOa do calo ósseo. Os gráficos representam a média  $\pm$  erro padrão da média ( $n = 6$ ). A análise estatística foi realizada com ANOVA de duas vias, seguida pelo teste post hoc de Tukey para analisar o efeito do tratamento com treinamento de força (TF) e raloxifeno (Ral) e quaisquer interações (TF § Ral). Abreviações e símbolos: # efeito principal de Ral e § interação de TF mais Ral. NT/Veh = não treinado e tratado com veículo; NT/Ral = não treinado e tratado com raloxifeno; TF/Veh = treinamento de força e tratado com veículo; TF/Ral = treinamento de força e tratado com raloxifeno.

## **Discussão**

## 6. Discussão

Neste estudo foi investigada, pela primeira vez, a qualidade do tecido ósseo durante a cicatrização após osteotomia tibial unilateral em ratas Wistar senescentes que realizaram previamente treinamento de força, tratamento com raloxifeno ou combinação das terapias no período da periostropausa. Consistentes com nossa hipótese inicial, os resultados demonstram claramente que o TF realizado antes da osteotomia resultou em melhor qualidade do tecido durante a cicatrização óssea, melhorando o perfil bioquímico e oxidativo, alterando o perfil genético em favor da formação e reabsorção óssea, bem como as propriedades físico-químicas do calo, que culminaram em melhor microarquitetura e massa óssea, bem como ao aumento da resistência do calo à deformação torcional, confirmando seu efeito positivo sobre o reparo ósseo precoce. Por outro lado, a administração de Ral durante a periostropausa piorou o perfil bioquímico e oxidativo, diminuiu a expressão gênica de marcadores relacionados à reabsorção e remodelação óssea, que afetaram negativamente as propriedades físico-químicas, levando a alterações na microarquitetura e massa dos calos ósseos, bem como diminuição da resistência do calo à deformação torcional, culminando em atraso na cicatrização óssea. Além disso, como pensávamos, a combinação das terapias não mostrou efeito adicional, ao contrário, o efeito negativo do raloxifeno superou o efeito positivo do treinamento de força em várias variáveis que também culminaram em atraso na cicatrização óssea, mostrando que o fármaco exerceu maior impacto frente ao treinamento de força neste modelo.

Apesar dos benefícios proeminentes dos SERMS na prevenção e tratamento da osteoporose, sabe-se que o raloxifeno inibe a osteoclastogênese, diminuindo a atividade e a diferenciação dos osteoclastos, com diminuição do remodelamento ósseo na pré-menopausa (54) e em pacientes com osteoporose na pós-menopausa (55, 56). Já está

estabelecido em nossos estudos (31, 32) que, durante a periostropausa, o raloxifeno interfere na taxa de reabsorção e formação óssea, demonstrando o efeito anti-reabsortivo desse fármaco. No presente estudo, a ação anti-reabsortiva de Ral foi confirmada pela menor atividade sérica de TRAP, pela modulação negativa da expressão de *Ctsk*, *Rank* e *Opg*, 1 e 8 semanas após a osteotomia. A osteoclastogênese, por sua vez, desempenha ação fundamental no remodelamento da cicatrização óssea, pois acelera a reabsorção da cartilagem e promove a substituição do calo cartilaginoso pelo calo duro (35, 42). Estudos demonstraram que a inibição dos osteoclastos pode atrasar a remodelação secundária na cicatrização óssea (57, 58), e prejudicar a cicatrização de fraturas em ratos (42), corroborando com os nossos achados.

Além disso, sabe-se que a cicatrização de fraturas é processo integrado que envolve complexa interferência entre osteoblastos e osteoclastos, que desempenham ação insubstituível no processo de cicatrização de fraturas (59, 60). Estudo recente mostra a importância das duas vias de sinalização para o reparo ósseo, uma vez que houve aceleração na consolidação da fratura óssea em modelo de fratura da tíbia de ratos através da ativação simultânea da atividade osteoclástica e osteoblástica (61). Aqui, embora o tratamento com Ral tenha modulado positivamente a expressão de *Bsp*, o medicamento teve efeito importante na modulação negativa de *Alp*, *Ocn* e *Colla1*, marcadores associados à maturação da matriz (62), e *Bmp2*, marcador de condrócitos e osteoblastos que desempenham ação essencial na maturação da cartilagem no estágio inicial da cicatrização da fratura (63). Essas alterações genéticas podem ter comprometido as propriedades físico-químicas do calo ósseo, onde a matriz de colágeno era mais mineralizada representada pela relação entre o mineral e a intensidade do colágeno ( $v1PO4$  / amida III) e havia mais íons carbonatos ocupando os locais estequiométricos de fosfato comparado aos outros grupos. Essa fragilidade da

organização estrutural do calo das ratas senescentes tratadas com Ral é preocupante, pois é sabido que essas alterações podem causar danos às propriedades mecânicas (64-66) e foi exatamente isso que aconteceu, o tratamento prévio com Ral diminuiu o volume e a espessura do calo ósseo trabecular e resultou em menor resistência à deformação torcional do calo mole e duro. Além disso, embora o raloxifeno retenha o grupo hidroxila C3 ciclo-hexano, que possivelmente pode ter ação antioxidante, Ral modulou negativamente o estado redox. Estudos mostram aumento de radicais livres, especialmente MDA plasmático, em ratos Wistar após fratura da tíbia, especialmente durante o período inflamatório (67, 68), no entanto, o aumento exacerbado da ERO pode prejudicar a cicatrização da fratura (69). Nossos dados corroboram com esses achados, porque nos grupos NT/Ral e TF/Ral que apresentaram alterações importantes no estado redox apresentaram piores consolidações ósseas.

Estudos indicam que o ditado "use ou perca" pode não ser aplicável, pois já existem evidências de que a atividade física durante a juventude pode proporcionar saúde óssea ao longo da vida até a velhice (70, 71). Nossos conjuntos de dados mostram que o treinamento de força, quando realizado durante o período da periostropausa, mesmo seguido de período de destreino, culminou em ambiente ósseo propício para responder mais rapidamente aos danos ósseos. Descobrimos que o TF pode aumentar a atividade da fosfatase alcalina plasmática e a capacidade antioxidante, bem como diminuir espécies reativas de oxigênio como o MDA, corroborando com estudos anteriores (72, 73). Em 1 semana, destacamos a modulação positiva da expressão de *Bmp2* e *Trap*, mostrando seu efeito anabólico no reparo ósseo precoce. Meng Mi et al. (63) mostraram que em camundongos que não expressavam *Bmp2* em condrócitos, a cicatrização era mais lenta e a mineralização atrasada, levando a cicatrização óssea com força biomecânica significativamente menor; além disso, o *Bmp2* é considerado potente

agente ósseo anabólico e a modulação positiva do *Bmp2* no início do processo de reparo ósseo parece ser uma das chaves para o reparo bem-sucedido. Embora a atuação e a importância dos osteoclastos na fase de remodelação óssea sejam claros, no presente estudo, reafirmamos a importância da sua ativação na fase inicial da cicatrização, não para reabsorver o osso, mas para reajustar o sistema, juntamente com os osteoblastos, para manter e melhorar a força estrutural do tecido ósseo, como já descrito (37).

Já em 8 semanas, os efeitos do TF foram persistentes na modulação positiva da *Trap*, agora importante para o processo de remodelação óssea e o *Ocn*, continuando com seu efeito anabólico no reparo ósseo. Essas mudanças na expressão gênica podem ter levado ao reparo ósseo precoce, pois o grupo ST/Veh teve aumento expressivo na cristalinidade. E, embora alguns estudos mostrem que o aumento da cristalinidade resulta em diminuição na tensão e deformação na ruptura (74), a maior cristalinidade pode ser correlacionada com a rápida consolidação óssea, pois na fratura, a cristalinidade reflete a maturidade do colágeno (75, 76) e essa maturação culminou em melhor cicatrização óssea. Todas essas mudanças, se não refletidas em boa microarquitetura óssea, seriam inúteis, mas o que vemos é melhor volume ósseo, mais trabéculas e momentos polares de inércia aumentados de ambos os calos ósseos. Considerando que a carga máxima e a rigidez extrínseca estão associadas ao momento polar de inércia, é crucial o aumento desses parâmetros no calo de ratas senescentes após o TF.

Neste estudo, a concentração sérica de  $E_2$  permaneceu estável entre os animais experimentais durante o período da periostropausa. A concentração sérica de progesterona foi maior nos animais submetidos ao TF, no entanto, esse resultado deve ser interpretado com cautela, pois não podemos afirmar que a ação da  $P_4$  em animais treinados esteja associada a melhor cicatrização óssea. Sabe-se que estudos *in vitro*

documentam a capacidade da P<sub>4</sub> de aumentar o número de osteoblastos, bem como seus efeitos para promover a maturação e diferenciação dos osteoblastos (77, 78), no entanto, mais estudos devem ser conduzidos explorando os efeitos do treinamento de força na periostropausa ou na perimenopausa sobre as concentrações hormonais e o impacto na consolidação óssea para elucidar essas questões.

O treinamento de resistência progressiva de alta intensidade tem sido reconhecido como estratégia para estimular a resposta osteogênica e preservar a qualidade do tecido ósseo (79, 80). No presente estudo, a capacidade de carga máxima voluntária (CCMV) individualizada foi utilizada para que tivéssemos o controle sobre a carga e que fosse progressiva. Os dois grupos treinados tiveram sua carga aumentada e progressiva, mas mesmo antes da osteotomia, ficou claro que o treinamento de força isolado era superior ao grupo tratado com raloxifeno em relação à carga máxima suportada nos últimos testes.

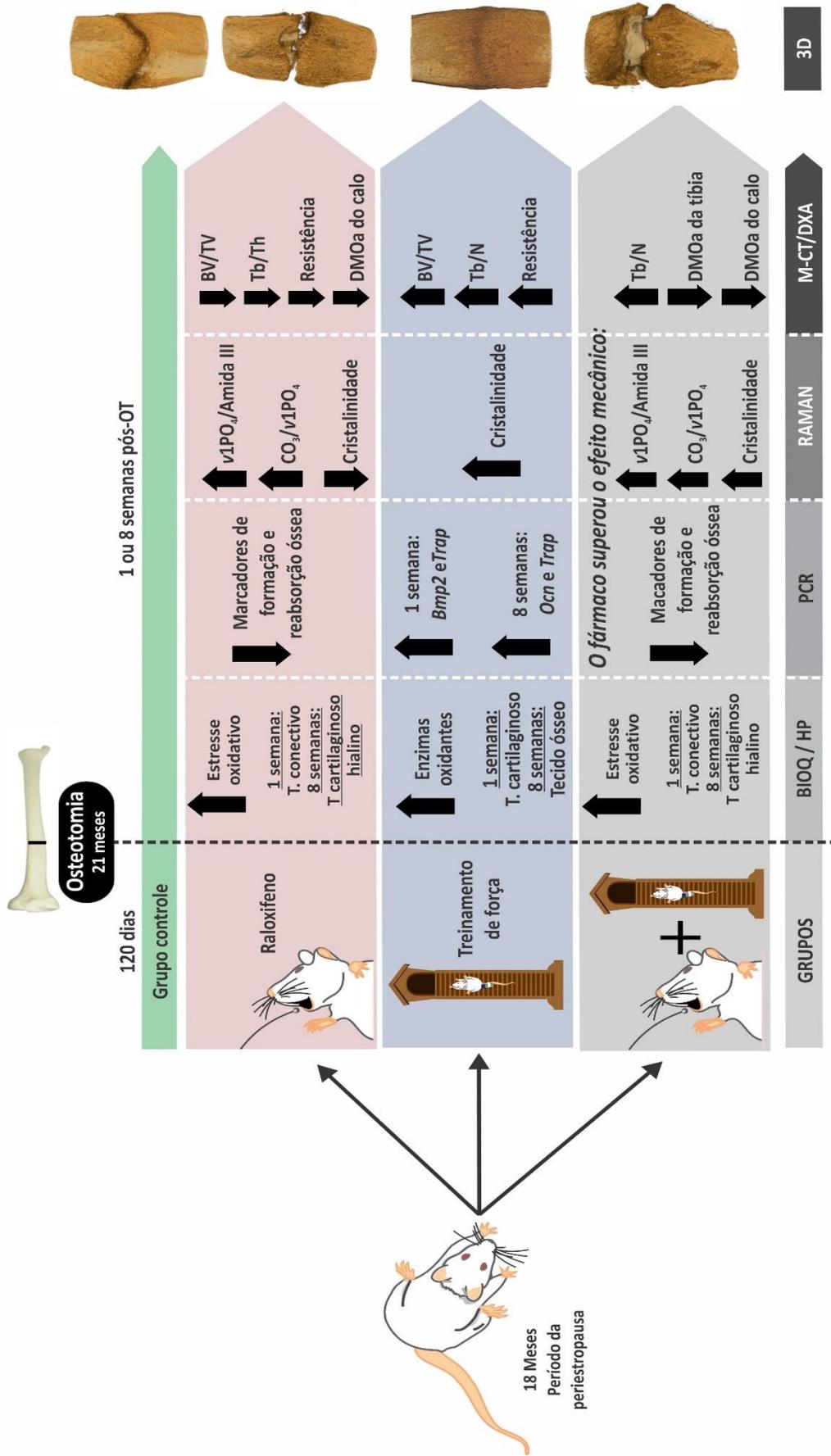
Para nosso conhecimento, o presente estudo foi o primeiro estudo a mostrar que o tratamento prévio de Ral associado ao TF proporciona efeitos interativos no tecido ósseo de ratas senescentes após osteotomia. A associação de TF e Ral desencadeou respostas de interação aumentando a atividade de CAT e MDA e diminuindo a expressão de *Bsp*, *Trap* e *Rankl*, 1 semana após a osteotomia, com respostas mais semelhantes ao grupo que tratou apenas com Ral. Já em 8 semanas (ST§Ral) aumentou o estresse oxidativo e as expressões de *Catnb*, *Opn*, *Alp*, *Ctsk*, *Rank*, *Opg*, além de diminuiu *Ocn* e *Colla1*, demonstrando que a ação dos tratamentos para esses parâmetros não ocorre individualmente. No entanto, toda a dinâmica do processo de formação e remodelação óssea proporcionada pela combinação de terapias observadas na expressão gênica 8 semanas após a osteotomia não foi capaz de desencadear efeito positivo na microarquitetura e na qualidade óssea, onde foi possível observar interação

negativa na razão mineral/colágeno, substituição do carbonato Tipo B, densidade mineral óssea areal da tíbia total e do calo. De fato, neste grupo (TF§Ral) o efeito do tratamento de Ral superou os efeitos mecânicos, pois observamos diminuição da resposta que o exercício foi capaz de desencadear isoladamente. Uma explicação para a afinidade pela resposta ao medicamento pode ser devida ao fato de que os SERMs via receptores de estrogênio (ERs) modulam a conformação do receptor ou a capacidade de formar complexos com co-reguladores, que por sua vez alteram sua atividade transcricional (81). Assim, a atividade do receptor de estrogênio nas células ósseas pode ser alterada com declínio concomitante da responsividade óssea à carga mecânica, dificultando a resposta à consolidação.

Existem algumas limitações no presente estudo. O modelo de fratura utilizado foi a osteotomia cirúrgica, que difere de uma fratura fechada, modelo semelhante ao quadro clínico comum das fraturas. No entanto, a osteotomia nos permitiu realizar uma linha de fratura reproduzível e consistente, crucial para a confiabilidade e avaliação precisa dos resultados. Além disso, o presente estudo não realizou testes biomecânicos, explorando apenas os dados obtidos pelo micro-CT. Portanto, são necessários mais estudos para confirmar com precisão as alterações nas propriedades biomecânicas. Também nos concentramos em apenas uma dose de tratamento com raloxifeno e intensidade de TF e não sabemos se esses efeitos persistiriam após doses e intensidades diferentes. Por fim, como em qualquer modelo animal, existem limitações quando comparadas às evidências clínicas humanas; no entanto, o modelo de rato se assemelha mais ao envelhecimento humano e pode simular as alterações do metabolismo ósseo, permitindo evitar análises mais invasivas.

Em suma, nossa pergunta inicial foi amplamente respondida com o conjunto de dados deste estudo. A figura 20 resume os principais efeitos do pré-tratamento com Ral

ou TF sobre a consolidação óssea. Os benefícios esqueléticos do tratamento de Ral durante a periestropausa não persistiram após a osteotomia; em contraste, o efeito anti-osteoclastogênico mostrado neste modelo atrasou o processo de reparo ósseo, trazendo considerável preocupação clínica. Além disso, olhando para o quadro geral, concordamos com Rebelo-Marques et al. (82) quando afirmam que, *embora muitas estradas levem a Roma*, a rota mais segura e mais triunfante deve depender muito do exercício físico, porque além de prevenir a osteoporose e reduzir o risco geral de quedas e fraturas, o treinamento de força realizado durante o período de envelhecimento pode gerar memória biológica, proporcionando melhor ambiente para a cicatrização óssea.



**Figura 20.** Resumo dos efeitos individuais de Ral, TF e interações TF§Ral pela análise de variância ANOVA de duas vias.

# Conclusão

## 7. Conclusão

A partir de nossos resultados, mostramos pela primeira vez que os tratamentos prévios durante a periostropausa podem influenciar na qualidade do tecido durante a cicatrização óssea após osteotomia tibial unilateral. O treinamento de força realizado no período da periostropausa melhorou a qualidade do tecido e acelerou o processo de reparo ósseo, enquanto a administração de raloxifeno, um anti-reabsortivo, atrasou o reparo ósseo e diminuiu a resistência à deformação torcional. Esses achados acrescentam novas informações à literatura sobre terapêuticas preventivas para osteoporose e o risco para o processo de reparo ósseo, fornecendo informações relevantes para estudos pré-clínicos.



# Referências bibliográficas

## 8. Referências bibliográficas

1. Baccaro LF, Conde DM, Costa-Paiva L, Pinto-Neto AM. The epidemiology and management of postmenopausal osteoporosis: a viewpoint from Brazil. *Clin Interv Aging*. 2015;10:583-91.
2. Estatística. IBdGe. **Brasil já tem mais de 180 milhões de habitantes.** <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/30082004projecao populacao.shtm>.
3. Schmidt MI, Duncan BB, Azevedo e Silva G, Menezes AM, Monteiro CA, Barreto SM, et al. Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges. *Lancet*. 2011;377(9781):1949-61.
4. Kanis JA. Diagnosis of osteoporosis and assessment of fracture risk. *Lancet*. 2002;359(9321):1929-36.
5. Keen RW. Burden of osteoporosis and fractures. *Curr Osteoporos Rep*. 2003;1(2):66-70.
6. Meyer RA, Tsahakis PJ, Martin DF, Banks DM, Harrow ME, Kiebzak GM. Age and ovariectomy impair both the normalization of mechanical properties and the accretion of mineral by the fracture callus in rats. *J Orthop Res*. 2001;19(3):428-35.
7. Elliot-Gibson V, Bogoch ER, Jamal SA, Beaton DE. Practice patterns in the diagnosis and treatment of osteoporosis after a fragility fracture: a systematic review. *Osteoporos Int*. 2004;15(10):767-78.
8. Dennison E, Mohamed MA, Cooper C. Epidemiology of osteoporosis. *Rheum Dis Clin North Am*. 2006;32(4):617-29.
9. Sheng ZF, Dai RC, Wu XP, Fang LN, Fan HJ, Liao EY. Regionally specific compensation for bone loss in the tibial trabeculae of estrogen-deficient rats. *Acta Radiol*. 2007;48(5):531-9.
10. Feng X, McDonald JM. Disorders of bone remodeling. *Annu Rev Pathol*. 2011;6:121-45.
11. Cardoso Neto C, Franco M, Cunha MSCA, Miyasaka CK. Efeitos da ovariectomia experimental no metabolismo ósseo de ratas wistaradultas: um modelo para estudo da osteoporose. *Rev Cienc Med Biol*. 2006;5(231):8.
12. Saika M, Inoue D, Kido S, Matsumoto T. 17beta-estradiol stimulates expression of osteoprotegerin by a mouse stromal cell line, ST-2, via estrogen receptor-alpha. *Endocrinology*. 2001;142(6):2205-12.
13. Shevde NK, Bendixen AC, Dienger KM, Pike JW. Estrogens suppress RANK ligand-induced osteoclast differentiation via a stromal cell independent mechanism involving c-Jun repression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(14):7829-34.
14. Pacifici R. Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res*. 1996;11(8):1043-51.
15. 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.
16. Hale GE, Burger HG. Hormonal changes and biomarkers in late reproductive age, menopausal transition and menopause. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2009;23(1):7-23.
17. Burger HG, Dudley EC, Robertson DM, Dennerstein L. Hormonal changes in the menopause transition. *Recent Prog Horm Res*. 2002;57:257-75.

18. Cook MJ. Perimenopause: an opportunity for health promotion. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs.* 1993;22(3):223-8.
19. Santos L, Elliott-Sale KJ, Sale C. Exercise and bone health across the lifespan. *Biogerontology.* 2017;18(6):931-46.
20. Frost HM. Bone "mass" and the "mechanostat": a proposal. *Anat Rec.* 1987;219(1):1-9.
21. Martyn-St James M, Carroll S. Effects of different impact exercise modalities on bone mineral density in premenopausal women: a meta-analysis. *J Bone Miner Metab.* 2010;28(3):251-67.
22. 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.
23. Pacifici R. Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 1996;11(8):1043-51.
24. Delmas PD, Bjarnason NH, Mitlak BH, Ravoux AC, Shah AS, Huster WJ, et al. Effects of raloxifene on bone mineral density, serum cholesterol concentrations, and uterine endometrium in postmenopausal women. *N Engl J Med.* 1997;337(23):1641-7.
25. Riggs BL, Parfitt AM. Drugs used to treat osteoporosis: the critical need for a uniform nomenclature based on their action on bone remodeling. *J Bone Miner Res.* 2005;20(2):177-84.
26. 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.
27. Sliwiński L, Folwarczna J, Nowińska B, Cegiela U, Pytlik M, Kaczmarczyk-Sedlak I, et al. A comparative study of the effects of genistein, estradiol and raloxifene on the murine skeletal system. *Acta Biochim Pol.* 2009;56(2):261-70.
28. Viguier-Carrin S, Garnero P, Delmas PD. The role of collagen in bone strength. *Osteoporos Int.* 2006;17(3):319-36.
29. Hadji P. The evolution of selective estrogen receptor modulators in osteoporosis therapy. *Climacteric.* 2012;15(6):513-23.
30. Messalli EM, Scaffa C. Long-term safety and efficacy of raloxifene in the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis: an update. *Int J Womens Health.* 2010;1:11-20.
31. Stringhetta-Garcia CT, Singulani MP, Santos LF, Louzada MJ, Nakamune AC, Chaves-Neto AH, et al. The effects of strength training and raloxifene on bone health in aging ovariectomized rats. *Bone.* 2016;85:45-54.
32. Stringhetta-Garcia CT, Morais SRL, Fernandes F, Perez-Ueno MJ, Almeida RP, Louzada MJQ, et al. Effects of strength training and raloxifene on femoral neck metabolism and microarchitecture of aging female Wistar rats. *Sci Rep.* 2017;7(1):14410.
33. Stuermer EK, Sehmisch S, Rack T, Wenda E, Seidlova-Wuttke D, Tezval M, et al. Estrogen and raloxifene improve metaphyseal fracture healing in the early phase of osteoporosis. A new fracture-healing model at the tibia in rat. *Langenbecks Arch Surg.* 2010;395(2):163-72.
34. Cao Y, Mori S, Mashiba T, Westmore MS, Ma L, Sato M, et al. Raloxifene, estrogen, and alendronate affect the processes of fracture repair differently in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res.* 2002;17(12):2237-46.
35. Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Semin Cell Dev Biol.* 2008;19(5):459-66.
36. Iwaki A, Jingushi S, Oda Y, Izumi T, Shida JI, Tsuneyoshi M, et al. Localization and quantification of proliferating cells during rat fracture repair: detection of proliferating cell nuclear antigen by immunohistochemistry. *J Bone Miner Res.* 1997;12(1):96-102.
37. Schell H, Lienau J, Epari DR, Seebeck P, Exner C, Muchow S, et al. Osteoclastic activity begins early and increases over the course of bone healing. *Bone.* 2006;38(4):547-54.
38. Einhorn TA. The science of fracture healing. *J Orthop Trauma.* 2005;19(10 Suppl):S4-6.

39. Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem.* 2003;88(5):873-84.
40. Lin HN, O'Connor JP. Osteoclast depletion with clodronate liposomes delays fracture healing in mice. *J Orthop Res.* 2017;35(8):1699-706.
41. Li J, Mori S, Kaji Y, Kawanishi J, Akiyama T, Norimatsu H. Concentration of bisphosphonate (incadronate) in callus area and its effects on fracture healing in rats. *J Bone Miner Res.* 2000;15(10):2042-51.
42. He LH, Liu M, He Y, Xiao E, Zhao L, Zhang T, et al. TRPV1 deletion impaired fracture healing and inhibited osteoclast and osteoblast differentiation. *Sci Rep.* 2017;7:42385.
43. Ferreira LB, de Nicola AC, Anselmo-Franci JA, Dornelles RC. Activity of neurons in the preoptic area and their participation in reproductive senescence: Preliminary findings. *Exp Gerontol.* 2015;72:157-61.
44. Granjeiro JM, Taga EM, Aoyama H. Purification and characterization of a low-molecular-weight bovine kidney acid phosphatase. *An Acad Bras Cienc.* 1997;69(4):451-60.
45. Janckila AJ, Parthasarathy RN, Parthasarathy LK, Seelan RS, Hsueh YC, Rissanen J, et al. Properties and expression of human tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5a by monocyte-derived cells. *J Leukoc Biol.* 2005;77(2):209-18.
46. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105:121-6.
47. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 1972;247(10):3170-5.
48. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem.* 1996;239(1):70-6.
49. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem.* 2005;38(12):1103-11.
50. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C(T)</sup> Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
51. Peres-Ueno MJ, Stringhetta-Garcia CT, Castoldi RC, Ozaki GAT, Chaves-Neto AH, Dornelles RCM, et al. Model of hindlimb unloading in adult female rats: Characterizing bone physicochemical, microstructural, and biomechanical properties. *PLoS One.* 2017;12(12):e0189121.
52. Akkus O, Adar F, Schaffler MB. Age-related changes in physicochemical properties of mineral crystals are related to impaired mechanical function of cortical bone. *Bone.* 2004;34(3):443-53.
53. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res.* 2010;25(7):1468-86.
54. Taranta A, Brama M, Teti A, De luca V, Scandurra R, Spera G, et al. The selective estrogen receptor modulator raloxifene regulates osteoclast and osteoblast activity in vitro. *Bone.* 2002;30(2):368-76.
55. Ettinger B, Black DM, Mitlak BH, Knickerbocker RK, Nickelsen T, Genant HK, et al. Reduction of vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis treated with raloxifene: results from a 3-year randomized clinical trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation (MORE) Investigators. *JAMA.* 1999;282(7):637-45.
56. Pinkerton JV, Thomas S. Use of SERMs for treatment in postmenopausal women. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2014;142:142-54.
57. Gentile MA, Soung dY, Horrell C, Samadfam R, Drissi H, Duong LT. Increased fracture callus mineralization and strength in cathepsin K knockout mice. *Bone.* 2014;66:72-81.
58. Xu L, Huang S, Hou Y, Liu Y, Ni M, Meng F, et al. Sox11-modified mesenchymal stem cells (MSCs) accelerate bone fracture healing: Sox11 regulates differentiation and migration of MSCs. *FASEB J.* 2015;29(4):1143-52.

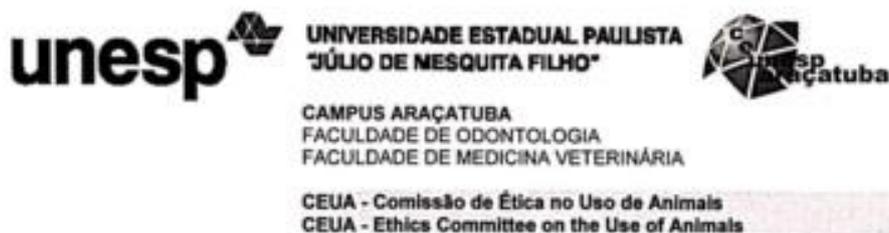
59. Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nat Rev Rheumatol*. 2015;11(1):45-54.
60. Pajarinen J, Lin T, Gibon E, Kohno Y, Maruyama M, Nathan K, et al. Mesenchymal stem cell-macrophage crosstalk and bone healing. *Biomaterials*. 2018.
61. Zhang T, Han W, Zhao K, Yang W, Lu X, Jia Y, et al. Psoralen accelerates bone fracture healing by activating both osteoclasts and osteoblasts. *FASEB J*. 2019:fj201801797R.
62. Corn DJ, Kim Y, Krebs MD, Mounts T, Molter J, Gerson S, et al. Imaging early stage osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 2013;31(6):871-9.
63. Mi M, Jin H, Wang B, Yukata K, Sheu TJ, Ke QH, et al. Chondrocyte BMP2 signaling plays an essential role in bone fracture healing. *Gene*. 2013;512(2):211-8.
64. Boskey AL. Bone composition: relationship to bone fragility and antiosteoporotic drug effects. *Bonekey Rep*. 2013;2:447.
65. Baig AA, Fox JL, Young RA, Wang Z, Hsu J, Higuchi WI, et al. Relationships among carbonated apatite solubility, crystallite size, and microstrain parameters. *Calcif Tissue Int*. 1999;64(5):437-49.
66. Handschin RG, Stern WB. Crystallographic lattice refinement of human bone. *Calcif Tissue Int*. 1992;51(2):111-20.
67. Turgut A, Göktürk E, Köse N, Kaçmaz M, Oztürk HS, Seber S, et al. Oxidant status increased during fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand*. 1999;70(5):487-90.
68. Yeler H, Tahtabas F, Candan F. Investigation of oxidative stress during fracture healing in the rats. *Cell Biochem Funct*. 2005;23(2):137-9.
69. Göktürk E, Turgut A, Bayçu C, Günel I, Seber S, Gülbas Z. Oxygen-free radicals impair fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand*. 1995;66(5):473-5.
70. Warden SJ, Mantila Roosa SM, Kersh ME, Hurd AL, Fleisig GS, Pandy MG, et al. Physical activity when young provides lifelong benefits to cortical bone size and strength in men. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(14):5337-42.
71. Rizzoli R, Bianchi ML, Garabédian M, McKay HA, Moreno LA. Maximizing bone mineral mass gain during growth for the prevention of fractures in the adolescents and the elderly. *Bone*. 2010;46(2):294-305.
72. Pingitore A, Lima GP, Mastorci F, Quinones A, Iervasi G, Vassalle C. Exercise and oxidative stress: potential effects of antioxidant dietary strategies in sports. *Nutrition*. 2015;31(7-8):916-22.
73. Oztasan N, Taysi S, Gumustekin K, Altinkaynak K, Aktas O, Timur H, et al. Endurance training attenuates exercise-induced oxidative stress in erythrocytes in rat. *Eur J Appl Physiol*. 2004;91(5-6):622-7.
74. Yerramshetty JS, Akkus O. The associations between mineral crystallinity and the mechanical properties of human cortical bone. *Bone*. 2008;42(3):476-82.
75. Yang X, Ricciardi BF, Hernandez-Soria A, Shi Y, Pleshko Camacho N, Bostrom MP. Callus mineralization and maturation are delayed during fracture healing in interleukin-6 knockout mice. *Bone*. 2007;41(6):928-36.
76. Gollwitzer H, Yang X, Spevak L, Lukashova L, Nocon A, Fields K, et al. Fourier Transform Infrared Spectroscopic Imaging of Fracture Healing in the Normal Mouse. *J Spectrosc (Hindawi)*. 2015;2015.
77. Tremollieres FA, Strong DD, Baylink DJ, Mohan S. Progesterone and promegestone stimulate human bone cell proliferation and insulin-like growth factor-2 production. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1992;126(4):329-37.
78. Scheven BA, Damen CA, Hamilton NJ, Verhaar HJ, Duursma SA. Stimulatory effects of estrogen and progesterone on proliferation and differentiation of normal human osteoblast-like cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992;186(1):54-60.
79. Beck BR, Daly RM, Singh MA, Taaffe DR. Exercise and Sports Science Australia (ESSA) position statement on exercise prescription for the prevention and management of osteoporosis. *J Sci Med Sport*. 2017;20(5):438-45.

80. Hong AR, Kim SW. Effects of Resistance Exercise on Bone Health. *Endocrinol Metab (Seoul)*. 2018;33(4):435-44.
81. Damien E, Price JS, Lanyon LE. Mechanical strain stimulates osteoblast proliferation through the estrogen receptor in males as well as females. *J Bone Miner Res*. 2000;15(11):2169-77.
82. Rebelo-Marques A, De Sousa Lages A, Andrade R, Ribeiro CF, Mota-Pinto A, Carrilho F, et al. Aging Hallmarks: The Benefits of Physical Exercise. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:258.



# Anexos

## ANEXO 1 - APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



### CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Influência do treinamento de força e raloxifeno sobre a periostina e consolidação óssea em ratas Wistar no período do envelhecimento após osteotomia tibial", Processo FOA nº 00528-2016, sob responsabilidade de Rita Cássia Menegati Dornelles apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 03 de Agosto de 2016.

**VALIDADE DESTE CERTIFICADO:** 03 de Setembro de 2017.

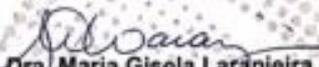
**DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL:** até 03 de Outubro de 2017.

### CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Influence of strength training and raloxifene on periostin and bone healing in Wistar female rats in the aging period after tibial osteotomy", Protocol FOA nº 00528-2016, under the supervision of Rita Cássia Menegati Dornelles presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on August 03, 2016.

**VALIDITY OF THIS CERTIFICATE:** September 03, 2017.

**DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT:** October 03, 2017.

  
 Profa. Ass. Dra. Maria Gisela Laranjeira  
 Coordenadora da CEUA  
 CEUA Coordinator