

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO” (UNESP)
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA (FOA)
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS

FERNANDA FERNANDES BREITENBACH

**ANÁLISE DO FÊMUR DE RATAS TRATADAS COM OCITOCINA E SUBMETIDAS
AO TREINAMENTO DE FORÇA DURANTE A PERIESTROPAUSA**

ARAÇATUBA

2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO” (UNESP)
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA (FOA)
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS

**ANÁLISE DO FÊMUR DE RATAS TRATADAS COM OCITOCINA E SUBMETIDAS
AO TREINAMENTO DE FORÇA DURANTE A PERIESTROPAUSA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, para obtenção do título de “Doutora em Ciências Fisiológicas”.

Área de Concentração: Fisiologia

Orientada: Fernanda Fernandes Breitenbach

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

ARAÇATUBA

2021

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

F383a Fernandes-Breitenbach, Fernanda.
Análise do fêmur de ratas tratadas com ocitocina e submetidas ao treinamento de força durante a periostropausa / Fernanda Fernandes-Breitenbach. – Araçatuba, 2021
87 f. : il. ; tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Rita Cassia Menegati Dornelles

1. Envelhecimento 2. Osteoporose 3. Fêmur 4. Ocitocina
5. Treinamento de força I. T.

CDD 612

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

FOLHA DE APROVAÇÃO

Fernanda Fernandes Breitenbach

Análise do fêmur de ratas tratadas com ocitocina e submetidas ao treinamento de força durante a periostropausa

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, para obtenção do título de “Doutora em Ciências Fisiológicas”.

Área de Concentração: Fisiologia

Orientada: Fernanda Fernandes Breitenbach

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

Aprovada em: 16/12/2021

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dra. Rita Cássia Menegati Dornelles

Instituição: Faculdade de Odontologia de Araçatuba - FOA/UNESP

Prof^a Dra. Ana Cristina Rodrigues Lacerda

Instituição: Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - UFVJM

Prof. Dr. Antonio Hernandes Chaves Neto

Instituição: Faculdade de Odontologia de Araçatuba - FOA/UNESP

Prof. Dr. David Michel de Oliveira

Instituição: Universidade Federal de Jataí - UFJ

Prof. Dr. Ismael Forte Freitas Junior

Instituição: Faculdade de Ciências e Tecnologia - FCT/UNESP

DADOS CURRICULARES

Nascimento: 24.10.1991, Santo Antônio da Platina – PR.

Filiação: José Aparecido Fernandes

Maria Aparecida da Silva Fernandes

2009/2012: Curso de Graduação em Fisioterapia no Centro Universitário Católico Salesiano *Auxilium* de Araçatuba – UNISALESIANO – Araçatuba – SP.

2014/2016: Curso de Pós-Graduação *Stricto-Sensu* em Ciências Fisiológicas nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia do *Campus* de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP – FOA – Araçatuba – SP.

2016/2021: Curso de Pós-Graduação *Stricto-Sensu* em Ciências Fisiológicas nível de Doutorado, na Faculdade de Odontologia do *Campus* de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP – FOA – Araçatuba – SP.

DEDICATÓRIA

A todos que, ao longo da minha jornada, caminharam à minha frente semeando flores, pois embora os obstáculos sejam inevitáveis, mas necessários, pude trilhar caminhos coloridos e de perfume suave que trouxeram força, entusiasmo e alegria.

À Deus, fonte e constância de vida, amor inexaurível pela escuta, luz e fortaleza diárias. Sem dúvidas, a mágica da fé nos faz ir além em todos os aspectos de vida.

Aos meus pais, Maria e José, que não mediram esforços em suas batalhas diárias para garantia de oportunidades brilhantes. A vocês, que a luz divina, me ensinaram em detalhes, me estimularam diariamente e garantiram condições extraordinárias na minha construção pessoal e profissional. Meus pais são a minha especial inspiração de vida, minha maior gratidão e minha melhor tradução de amor incondicional.

Ao meu esposo, Deucyr, que ilumina meus dias desde o primeiro encontro ao pensar e cuidar de cada detalhe de nossa vida. Preciso dizer sobre a imensidão da felicidade por viver nosso amor com toda a essência dos nossos primeiros instantes. Você é meu alento, meu refúgio, meu impulso, calma e minha certeza... não há limite em seu apoio, confiança, alegria e entusiasmo ao longo da minha/nossa trajetória. Ter “NO AMOR” quem sonha e vive diariamente nossos sonhos, é inestimável. A sua força, dedicação, sua crença e batalha para a prosperidade de nosso futuro reforçam constantemente que estamos juntos, e assim seguiremos sempre. Eu amo você!

A minha irmã, Fabiana, meu primeiro presente da vida. Você é a parceria mais especial dos meus dias todos. Você me conhece nos detalhes, não mede esforços para me apoiar, incentivar e sonhar comigo. Ser sua irmã é implacável, mas ser sua amiga é minha predileção. Estamos e estaremos sempre juntas!

Aos meus “pequenos grandes” amores, presentes em meus dias: meu afilhado Miguel Antônio que, apesar da distância, é tão amoroso e carinhoso; minha sobrinha e afilhada Allana, tão sensível, tão pura, especial e grandiosa nos gestos; e a Antonella, tão esperta, comunicativa, expressiva, atenciosa e querida. Eu me renovo com vocês que são presentes em minha vida. Que o Papai do céu cuide sempre dos sonhos sonhados para vocês!

A toda minha família, de sangue e de coração, cujos laços são eternos. Em especial, a Dona Maria, responsável por cuidados diários repletos de amor, carinho e ensinamentos profundos que levarei para sempre comigo. A Tia Maria José, minha primeira professora que me acompanha, orgulhosamente, com entusiasmo e alegria. Aos meus sogros, Irene e Dirceu, por todo o afago incomensurável, aos meus cunhados, Thais e Maximiliano, que sempre me

acompanham e torcem por mim especialmente, e a minha amiga Gil, a qual os anos passam e sua magnanimidade permanece.

Eu os amo muito, profundamente! A vocês, todo meu amor, meu cuidado, minha atenção e gratidão. Que eu possa ser para vocês tudo aquilo que são e representam em meus dias.

AGRADECIMENTOS

À *Sociedade Brasileira de Fisiologia (SBFis)*, na pessoa da Professora Patrícia Rieken Macedo Rocco, presidente desta instituição, por atender seus objetivos ao promover o desenvolvimento da fisiologia, contribuindo para o progresso da ciência em geral e formando novos pesquisadores na área da fisiologia.

Ao *Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas (PPGMCF)*, coordenado pela Professora Rita Cássia Menegati Dornelles e pelo vice-coordenador Professor Alex Sander da Rosa Araujo, pela oportunidade e privilégio de realizar o doutorado e crescer profissionalmente diante da “mágica” conexão entre os PPGMCFs.

Ao *Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas (PPGMCF)* da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA/UNESP), coordenado pela Professora Sandra Helena Penha de Oliveira, pelo suporte e incentivo constante quanto às oportunidades da pós-graduação.

À *Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA/UNESP)*, representada pelo Diretor Professor Glauco Issamu Miyahara e Vice-Diretor Professor Alberto Carlos Botazzo Delbem, por proporcionar a estrutura necessária para o desenvolvimento do doutorado.

À *Diretoria Acadêmica* conduzida por Valéria de Queiroz Marcondes Zagato e Lilian Sayuri Mada Pinheiro (assessor administrativo), e à *Seção Técnica de Pós-Graduação* supervisionada por Cristiane Regina Lui Matos e Camila de Abreu Rodrigues Rosa (estagiária), pelo empenho em atender e auxiliar-me.

Ao *Departamento de Ciências Básicas (DCB)*, sob chefia da Professora Ana Cláudia de Melo Stevanato Nakamune e Edilson Ervolino (suplente), aos servidores técnicos administrativos Eliseide Maria Ferreira Silva Navega, André Luís Mattos Piedade e Arnaldo César dos Santos, pelo suporte contínuo quanto à adequação e manutenção das condições do espaço físico para o desenvolvimento da pesquisa.

Ao *Laboratório de Fisiologia Endócrina e Envelhecimento (LaFEE)*, na responsabilidade da Professora Rita Cássia Menegati Dornelles, no qual tive o privilégio de desenvolver minhas pesquisas durante a pós-graduação, tanto do doutorado quanto do mestrado, com suporte para estudos, discussões e experimentações.

À *Fundação para Desenvolvimento da Unesp (FUNDUNESP)* e a *Pró-Reitoria de Pós-Graduação da Unesp (PROPG-UNESP)* pelo auxílio financeiro para participação em congresso internacional (Montreal, Quebec, Canadá).

Ao serviço da *Biblioteca "Honório Monteiro"* da FOA/UNESP, na pessoa do Diretor Técnico Claudio Hideo Matsumoto e da Supervisora Técnica Ana Cláudia Martins Grieger Manzatti, pela disponibilidade de informação e apoio quanto as atividades de ensino, pesquisa e extensão.

Ao *Biotério Central*, na responsabilidade do senhor João Batista Alves Corrêa, por todo o suporte, manutenção e cuidado quanto à obtenção dos animais.

À *Seção Técnica de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão* (STAEPE), dirigida por André José Contel, por toda prontidão e suporte.

Ao *Laboratório Multiusuário de Biotecnologia e Bioengenharia* (MUBIO) (Convênio FINEP 01.12.0530.00 - PROINFRA 01/2011) da FOA/UNESP pela utilização do aparelho de microtomografia.

Aos serviços de *Limpeza, Manutenção e Portaria* por todo suporte, amparo e cuidado com as condições estruturais da FOA/UNESP e, em especial, ao DCB.

Ao apoio financeiro da *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, pela concessão da bolsa de doutorado, a qual contribuiu diretamente para o aprimoramento profissional durante o doutorado.

À *Representação Discente* do PPGMCF, Victor Gustavo Balera Brito (representação nacional) e Allice Santos Cruz Veras (representação local), por serem voz ativa de todos nós, alunos de pós-graduação deste programa.

Enfim, o agradecimento é imensurável pelas oportunidades, afinal, “os resultados são obtidos através da exploração de oportunidades, não pela solução de problemas”.

Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A concretização deste trabalho ocorreu, sem dúvidas, de forma mais suave pelas especiais parcerias ao longo do trajeto.

Com toda certeza, não poderia iniciar esta especial seção, se não pela minha orientadora e professora, Rita Cássia Menegati Dornelles. Toda minha gratidão, respeito e admiração ficam registrados aqui. Nossa trajetória unindo forças é longa, afinal, todo o espaço na minha jornada de pós-graduação *Stricto-Sensu* foi concedido junto aos teus cuidados e orientações. Sou grata pela oportunidade de conviver e crescer com alguém cujo caráter é inquestionável, cuja sensibilidade se externa nos momentos exatos. Quero exteriorizar meu carinho não somente a senhora, mas a toda sua família que, inevitavelmente, se envolve neste processo árduo, afinal, não faltaram finais de semana de atenção. Muito obrigada por todo cuidado, empenho e parceria. Em meu entendimento, isso pela vivência ao longo desses anos em sua companhia, o orientador é aquele que direciona, traz luz imediata e ampara os seus. É evidente que essa é, seguramente, a parceria principal neste processo. Como disse Isaac Newton, se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes.

A todos os Professores do DCB da FOA/UNESP e do PPGMCF, Ana Cláudia de Melo Stevanato Nakamune, Doris Hissako Sumida, Edilson Ervolino, Suely Regina Mogami Bomfim, João Carlos Callera e, em especial, a minha parecerista, Sandra Helena Penha Oliveira, que me acompanha desde o meu mestrado com olhar atento e cuidadoso, sou muito grata por ter você comigo, ao Antonio Hernandez Chaves Neto que sempre me acompanhou neste processo com tanto carinho e cuidado, sem medir esforços para me acompanhar e instruir em tantas etapas, a Cristina Antoniali Silva, pela sua atenção e empenho, e a Patrícia Monteiro Seraphim, pelo seu respeito, humildade e cordialidade.

Não deixaria de registrar aqui meu carinho e gratidão a dupla dinâmica formada pelo Professor Dr. Mário Jefferson Quirino Louzada e Pedro Luís Florindo (Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – UNESP) que sempre me acompanharam, apoiaram e incentivaram com muito carinho e alegria. Os dias são mais leves na companhia de vocês.

Aos Professores da Banca do Exame Geral de Qualificação (EGQ), Professora Dra. Sandra Helena Penha Oliveira (FOA/UNESP), Professor Dr. Edilson Ervolino (FOA/UNESP) e Professora Dra. Ana Cristina Rodrigues Lacerda (Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - UFVJM) pelas serenas e brilhantes contribuições a esta tese.

Gostaria de externar meus agradecimentos a minha Banca de Defesa, Professora Dra. Ana Cristina Rodrigues Lacerda (UFVJM), Professor Dr. Antonio Hernandez Chaves Neto

(FOA/UNESP), Professor Dr. David Michel de Oliveira (Universidade Federal de Jataí - UFJ), Professor Dr. Ismael Forte Freitas Junior (Faculdade de Ciências e Tecnologia - FCT/UNESP) e minha orientadora, Professora Dra. Rita Cássia Menegati Dornelles (FOA/UNESP). Este estudo tem muito de vocês que geriram os vossos preciosos tempos elevando os pensamentos em prol das preciosas contribuições para a finalização deste estudo.

Enfim, deixo aqui registrada a minha gratidão a todos os Professores que tive a honra de conviver ao longo destes anos, diariamente ou durante pequenos instantes em eventos científicos. A multiplicidade do olhar científico é, de fato, agregadora e enriquecedora.

A família LaFEE que cresceu tanto ao longo destes anos, pós-graduandos e alunos de iniciação científica que tive a honra de crescer em conjunto. Dedico a esta família, com muita gratidão e alegria, os próximos quatro parágrafos.

Quero externar especialmente meus agradecimentos a Melise Jacon Peres Ueno, companheira e amiga desta jornada. Compartilhamos os mais diversos momentos que não deixaria de enumerar alguns aqui – procedimentos experimentais na madrugada com chocolate e você com “barrigão”, o nascimento da Maria Clara e seu nascimento como mamãe, o nosso congresso internacional, afinal, meu primeiro voo, minha primeira viagem internacional e todo meu deslumbramento deste processo foram com você, que cuidou de mim e me ajudou em tantos detalhes, nossas reuniões presenciais e remotas, tantos momentos e sentimentos compartilhados. Meu agradecimento especial a sua mãe, Ana Clara Jacon, e a toda sua família. Obrigada por tudo e contem sempre comigo!

Aos alunos de iniciação científica que caminharam estreitamente comigo, Ana Beatriz Doná Fiorotto, Otávio Henrique Breyer, Thainá Daguane Esperança, Viviane Barros e, especialmente, Emmanuel Rodrigo Lulio, Ludimila de Araújo Pinheiro, Tainá Santos Pestana, que compartilharam de perto a execução deste trabalho, agradeço muito todos vocês por toda confiança depositada em mim e pelos laços que mantemos com tanto carinho. Sou feliz por ter vocês presentes em meus dias. Agradeço também a Luiza Tavares Moreira e ao Adailton José dos Santos Silva pelos momentos compartilhados com tanto carinho e docilidade. E aos iniciantes científicos atuais, Ana Carolina, Michele, Fernando, Bruna e Gabriel, por pouca, moderada ou muita convivência, sempre foram muito queridos comigo.

Ao casal encantador, Luís Fernando Gadioli dos Santos e Damáris Raissa dos Santos, amigos tão queridos e hoje afilhados, Débora Prazias Cavalcante e Luana Galante Douradinho, vocês são preciosas no trabalho árduo e nas alegrias ímpares, Rafael Augusto dos Santos Silva, Rafa, você é um menino especial, te admiro e gosto muito de você, conte sempre comigo, Beatriz Procópio Stringhetta que, apesar do pouco tempo de convívio, é sempre tão querida.

E aos egressos, Camila Tami Stringheta Garcia, minha amiga tão especial e imprescindível ao longo da minha formação pessoal e profissional, Samuel Rodrigues Lourenço de Moraes, eterno Samuca, que me incentivou com muita alegria ao longo deste processo, Angela Cristina de Nicola, nossa “mano” que sempre foi tão parceira nas dificuldades e me ajudou incansavelmente no desenvolvimento e compreensão de tantos raciocínios, te admiro muito e tenho carinho enorme por você, e Larissa Brazolotto Ferreira, compartilhamos muitos momentos nesta trajetória.

Aos companheiros do DCB e PPGMCF, em especial, Victor, sempre prestativo, parceiro e amigo, Sabrina, tão doce e amorosa, Jéssica e Murilo, dupla para lá de especial, Sara, Thais, Renato (jamais me esquecerei daquela trapalhada toda após imunoistoquímica) e Allice. As aventuras desta trajetória não teriam sido tão especiais e divertidas sem vocês.

Aos queridos da FOA/UNESP, dos quais ressalto, Márcia, a nossa querida Marcinha que nos cuida com tanto amor; Dora tão acolhedora e carinhosa; Célia tão querida; ao Seu Wilson, Seu Arnaldo, Seu João, Seu Pedro e Seu Paulo que transformam todos os momentos em sorrisos tão divertidos; Maurício por toda atenção, paciência e habilidade; Eliseide com sua delicadeza e cortesia; Ana Cláudia Martins Grieger Manzatti pela prontidão e atenção ímpares; aos meninos da limpeza, Everaldo e André, que são tão queridos e cheios de simpatia; enfim, estes representam todos aqueles que trabalham dia a dia a garantir que tudo caminhe bem nos mais diversos aspectos.

Externo meus agradecimentos aos novos companheiros que nasceram ao longo desta jornada – Rubens dos Santos Rosa e toda sua equipe do curso da Fisioterapia da Universidade Paulista (UNIP) por todo o incentivo e suporte, Robson Chacon Castoldi e Guilherme Akio Tamura Ozaki por toda a parceria, e Vinícius Moroni por todo o auxílio nesta jornada.

E, por fim, e não menos importante, registro aqui meu especial agradecimento aos animais que contribuíram, inevitavelmente, para este estudo.

A todos vocês, meu muito obrigada!

Não sois máquina! Homens é que sois! E com o amor da humanidade em vossas almas! Não odieis! Só odeiam os que não se fazem amar... os que não se fazem amar e os inumanos.

Soldados! Não batalheis pela escravidão! Lutai pela liberdade! No décimo sétimo capítulo de São Lucas é escrito que o Reino de Deus está dentro do homem - não de um só homem ou um grupo de homens, mas dos homens todos! Está em vós! Vós, o povo, tendes o poder - o poder de criar máquinas. O poder de criar felicidade! Vós, o povo, tendes o poder de tornar esta vida livre e bela... de fazê-la uma aventura maravilhosa. Portanto - em nome da democracia - usemos desse poder, unamo-nos todos nós. Lutemos por um mundo novo... um mundo bom que a todos assegure o ensejo de trabalho, que dê futuro à mocidade e segurança à velhice.

Trecho retirado de

O DISCURSO FINAL DE “O GRANDE DITADOR” DE CHARLES CHAPLIN

RESUMO

FERNANDES-BREITENBACH, F. **Análise do fêmur de ratas tratadas com ocitocina e submetidas ao treinamento de força durante a periostropausa.** 2021. 85 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2021.

A diminuição nas concentrações de estrógeno, como o que ocorre no período da perimenopausa e menopausa, contribui para o aumento do *turnover* ósseo, com taxa de reabsorção superior à de formação óssea que favorece a instalação da osteoporose, doença silenciosa que determina fragilidade óssea e maior probabilidade de fraturas. Entre as intervenções utilizadas para prevenção da osteoporose, destaca-se o treinamento de força (TF) e a ocitocina (OT), hormônio promissor com ação anabólica no osso. O objetivo deste estudo foi verificar a ação da associação da OT ao TF, em comparação às intervenções isoladas, no processo de remodelamento ósseo do colo do fêmur de ratas Wistar na periostropausa (18 a 21 meses). Quarenta ratas Wistar com ciclo estral irregular (18 meses) foram randomizadas nos grupos: 1-Veículo (Veh); 2-Ocitocina (Ot); 3-Treinamento de força (Tf); 4-Ot+Tf. Os animais do grupo 1 receberam salina (0,15 mol/L) e dos grupos 2 e 4 receberam OT (134 µg/kg), sendo duas injeções intraperitoneais com intervalo de 12 horas a cada 30 dias, totalizando 8 injeções ao final do período experimental. Os animais dos grupos 3 e 4 realizaram TF em escada 3 vezes por semana com realização mensal do teste de capacidade de carga máxima voluntária (CCMV). Após 120 dias, os animais foram eutanasiados, os fêmures foram coletados para análises de ensaio mecânico, densitometria, microtomografia óssea, espectroscopia de Raman e técnica de reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa em tempo real (qRT-PCR), e o sangue para análises de marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo, dano hepático e estresse oxidativo. A principal novidade deste estudo é a adição da OT ao TF, a qual apresentou, no ensaio de compressão, maior força máxima em relação ao Veh e menor elasticidade em relação ao Tf e, no ensaio de flexão de três pontos, maior rigidez em relação ao Veh e Ot, menor rigidez e menor elasticidade em relação ao Veh; maior espessura cortical (Ct.Th) em relação aos demais grupos, menor número de poros (Po.N) em relação ao Veh e Ot, e maior momento polar médio (*J*) em relação ao Tf. Houve também maior volume do osso trabecular (BV/TV) em relação ao Ot e maior espessura trabecular (Tb.Th) em relação aos demais grupos. A densidade mineral óssea areal (aDMO) do colo do fêmur foi maior que o Ot, e a DMO do fêmur total foi maior que os demais grupos. Quanto a expressão gênica, houve maior expressão do fator de transcrição relacionado ao Runt 2 (*Runx2*) em relação ao Veh, o fator de transcrição Osterix (*Osx/Sp7*) foi menor que o Ot e Tf. A proteína morfogenética óssea 2 (*Bmp2*) apresentou menor expressão em relação ao Veh, e a expressão da fosfatase alcalina óssea (Fal) foi maior que os demais grupos. A expressão do membro da família do fator de necrose tumoral 11b (*Opg*) e do ligante do fator de necrose tumoral (*Rankl*) foi maior que os outros grupos, a expressão do membro do fator de necrose tumoral 11a (Rank) e catepsina K (*Ctsk*) foi maior que Veh e Ot. Também foi observado menor atividade de fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) e capacidade antioxidante total (CAT) no ensaio bioquímico em relação aos demais grupos. Na intervenção com OT, houve maior elasticidade no ensaio de flexão de três pontos, e maior Ct.Th em relação ao Veh. A expressão gênica de *Runx2*, *Osx/Sp7* foi maior e *Bmp2* foi menor que o grupo Veh. No TF houve maior elasticidade que o Veh e Ot no ensaio de compressão, maior rigidez e elasticidade em relação ao Veh no ensaio de flexão de três pontos. Houve menor Ct.Th em relação ao Ot, maior DMO do fêmur total em relação ao Veh, e a taxa

de mineralização foi maior que o Veh e Ot. Na expressão gênica, *Runx2* e *Osx/Sp7* foram maiores que o Veh. A *Bmp2* e osteocalcina/proteína óssea gama-carboxiglutamato (*Ocn*) foram menores que o Veh, e a *Fal* foi menor que Ot. Em relação a *Rank* e *Ctsk*, estas foram maiores que Veh e Ot. Por fim, a atividade de aspartato aminotransferase (AST) foi menor que o Veh. Esses resultados mostraram que a associação de intervenções é estratégia anabólica promissora para a prevenção da osteoporose no período da periostropausa, destacando-se dos efeitos das intervenções isoladas, ao preservar aspectos mecânicos, estruturais e gênicos do osso, além de parecer controlar fatores relacionados ao *cross-talk* entre tecido ósseo e tecido adiposo a favor da homeostase oxidativa e de fatores relacionados a atividade de marcadores ósseos.

Palavras-chave: envelhecimento, osteoporose, fêmur, ocitocina, treinamento de força.

ABSTRACT

FERNANDES-BREITENBACH, F. **Analysis of the femur of rats treated with oxytocin and submitted to strength training during periostropause.** 2021. 85 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2021.

The decrease in estrogen concentrations, such as that which occurs during perimenopause and menopause, contributes to an increase in bone turnover, with a rate of resorption higher than that of bone formation, which favors the installation of osteoporosis, a silent disease that determines bone fragility and greater probability of fractures. Among the interventions used to prevent osteoporosis, strength training (ST) and oxytocin (OT), a promising hormone with anabolic action on bone, stand out. The objective of this study was to verify the action of the association of OT and ST, compared to isolated interventions, in the process of bone remodeling of the femoral neck of Wistar rats in periostropause (18 to 21 months). Forty Wistar rats with irregular estrous cycle (18 months) were randomized into groups: 1-Vehicle (Veh); 2-Oxytocin (Ot); 3-Strength training (St); 4-Ot+St. The animals in group 1 received saline (0.15 mol/L) and in groups 2 and 4 received OT (134 µg/kg), with two intraperitoneal injections with an interval of 12 hours every 30 days, totaling 8 injections at the end of the period. trial period. The animals in groups 3 and 4 performed ST on a ladder 3 times a week with monthly performance of the maximum voluntary carrying capacity test (MVCC). After 120 days, the animals were euthanized, the femurs were collected for mechanical assay analysis, densitometry, bone microtomography, Raman spectroscopy and real-time reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) technique, and blood for analysis of biochemical markers of bone metabolism, liver damage and oxidative stress. The main novelty of this study is the addition of OT to ST, which presented, in the compression test, greater maximum force in relation to Veh and less elasticity in relation to St and, in the three-point bending test, greater stiffness in relation to Veh and Ot, less rigidity and less elasticity in relation to Veh; greater cortical thickness (Ct.Th) in relation to the other groups, smaller number of pores (Po.N) in relation to Veh and Ot, and greater mean polar moment (*J*) in relation to St. There was also greater trabecular bone volume (BV/TV) in relation to Ot and greater trabecular thickness (Tb.Th) in relation to the other groups. The areal bone mineral density (aBMD) of the femoral neck was higher than the Ot, and the BMD of the total femur was higher than the other groups. As for gene expression, there was greater expression of the transcription factor related to Runt 2 (*Runx2*) in relation to Veh, the transcription factor Osterix (*Osx/Sp7*) was lower than Ot and St. Bone morphogenetic protein 2 (*Bmp2*) showed lower expression compared to Veh, and bone alkaline phosphatase (*Alp*) expression was higher than the other groups. The expression of tumor necrosis factor 11b family member (*Opg*) and tumor necrosis factor ligand (*Rankl*) was higher than the other groups, tumor necrosis factor 11a member (*Rank*) and cathepsin K (*Ctsk*) was greater than Veh and Ot. It was also observed lower activity of tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) and total antioxidant capacity (CAT) in the biochemical assay in relation to the other groups. In the intervention with OT, there was greater elasticity in the three-point bending test, and greater Ct.Th in relation to Veh. The gene expression of *Runx2*, *Osx/Sp7* was higher and *Bmp2* was lower than the Veh group. In ST intervention there was greater elasticity than Veh and Ot in the compression test, greater stiffness and elasticity in relation to Veh in the three-point bending test. There was lower Ct.Th in relation to Ot, higher BMD of the total femur in relation to Veh, and the mineralization rate was higher than Veh and Ot. In gene expression, *Runx2* and *Osx/Sp7* were higher than Veh. *Bmp2* and osteocalcin/bone protein gamma-carboxyglutamate (*Ocn*) were lower than Veh, and *Fal* was higher than Ot. In relation to *Rank*

and *Ctsk*, these were higher than Veh and Ot. Finally, aspartate aminotransferase (AST) activity was lower than Veh. These results showed that the association of interventions is a promising anabolic strategy for the prevention of osteoporosis in the periostropause period, standing out from the effects of isolated interventions, by preserving mechanical, structural and genetic aspects of the bone, in addition to seeming to control factors related to the cross-talk between bone tissue and adipose tissue in favor of oxidative homeostasis and factors related to the activity of bone markers.

Keywords: aging, osteoporosis, femur, oxytocin, strength training.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ciclo reprodutivo feminino. Menarca, primeira menstruação e início do período reprodutivo. Climatério, período que marca a transição da fase reprodutiva para a não reprodutiva, englobando as fases de pré, peri e pós-menopausa. Menopausa, marco do envelhecimento reprodutivo, que ocorre em torno dos 51 anos. Senectude, período do envelhecimento. *Fonte:* Autor. 33
- Figura 2.** Ação da ocitocina (OT) nas células osteoblásticas e osteoclásticas. *Fonte:* Adaptado de TAMMA *et al.*, 2009. 34
- Figura 3.** Regulação e síntese de OT e seu receptor (Oxtr) mediada pela ação estrogênica genômica e não genômica. *Fonte:* Adaptado de COLAIANNI *et al.*, 2014. 35
- Figura 4.** Critérios de inclusão e exclusão. Critérios de inclusão: ratas multíparas, com ciclo estral irregular e aderentes ao exercício físico. Critérios de exclusão: ratas nulíparas, com ciclo estral regular e não aderentes ao exercício físico. *Fonte:* Autor. 42
- Figura 5.** Administração de ocitocina ou solução salina. No início dos 18^o, 19^o, 20^o e 21^o meses, os animais receberam duas injeções intraperitoneais de solução salina (grupo Veh) ou OT (grupo Ot e Ot+Tf) com intervalo de 12 horas (7h e 19h), totalizando 8 injeções. Após 30 dias da administração da última dose, totalizando 120 dias de período experimental, os animais foram eutanasiados. Grupos: Veh = administração de NaCl; Ot = administração de OT; Ot+Tf = administração de OT e realização de treinamento de força (n = 10 animais por grupo experimental). *Fonte:* Autor. 44
- Figura 6.** Escada de treinamento de força do Laboratório de Fisiologia Endócrina e Envelhecimento (LaFEE) – UNESP Araçatuba. Especificações: A) Animal durante o TF, 1,13 m de altura, 0,18 m de largura, distância entre degraus de 2 cm, B) 80^o de inclinação e descanso no topo de 20x20x20 cm. *Fonte:* Autor. 45
- Figura 7.** Realização de treinamento de força. Nos últimos 15 dias do 17^o mês, foi realizada a adaptação dos animais dos grupos Tf e Ot+Tf durante uma semana (1s). Quarenta e oito horas antes de iniciar o TF os animais realizaram o teste de capacidade máxima de carga voluntária (CCMV) com 75 % da massa corporal (mc) para adequação da carga. Na primeira semana os animais treinaram com 60 % do teste de CCMV, na segunda com 70 %, e na terceira até o final do período experimental com 80 % do teste de CCMV. O treinamento foi realizado 3 vezes por semana. Após 48 horas da realização do último treino, totalizando 120 dias de período experimental, os animais foram eutanasiados. Grupos: Tf = realização de treinamento de força; Ot+Tf = administração de OT e realização de treinamento de força (n = 10 animais por grupo experimental). *Fonte:* Autor. 46
- Figura 8.** Desenho experimental. Durante os primeiros 15 dias do 17^o mês, foi analisado o ciclo estral de todos os animais. Nos últimos 15 dias do 17^o mês, foi realizada a adaptação nos animais dos grupos Tf e Ot+Tf e o teste de capacidade máxima de carga voluntária (CCMV) com 75 % da massa corporal (mc) para adequação da carga. No início dos 18^o, 19^o, 20^o e 21^o meses, os animais receberam duas injeções intraperitoneais de solução salina (grupo Veh) ou OT (grupo Ot e Ot+Tf) com intervalo de 12 horas (7h e 19h), totalizando 8 injeções. Os animais do grupo Tf e Ot+Tf realizaram TF na escada 3 vezes por semana durante 120 dias com a realização do

teste de CCMV mensal. Após 120 dias do período experimental, os animais foram submetidos à eutanásia e realizada coleta sanguínea e óssea para posteriores análises. Grupos: Veh = administração de NaCl; Ot = administração de OT; Tf = realização de treinamento de força; Ot+Tf = administração de OT e realização de treinamento de força (n = 10 animais por grupo experimental). *Fonte:* Autor. 47

Figura 9. Esquema simplificado do ensaio mecânico de compressão e flexão de três pontos realizado nos fêmures dos animais experimentais. *Fonte:* Autor. 48

Figura 10. Esquema simplificado da espectroscopia de Raman. O foco de luz do laser é incidido sobre três pontos da região de interesse: o colo do fêmur de cada amostra. *Fonte:* Autor. 51

Figura 11. Representação da análise estatística dos dados intragrupo e intergrupo. Siglas: EPM = erro padrão da média; p = probabilidade de significância, utilizado como ferramenta estatística para descartar a hipótese nula – que os dois grupos estudados não sejam iguais quanto menor o seu valor, menos provável é que os valores observados tenham ocorrido ao acaso. *Fonte:* Autor. 54

Figura 12. Ensaio mecânico. Teste de compressão do fêmur de ratas Wistar na periostropausa. (A) Força máxima (N), (B) Rigidez ($\times 10^3$ N/m) e (C) Elasticidade (mJ). Os grupos experimentais foram compostos por dez animais cada, os dados foram examinados por meio da Análise de Variância (ANOVA) *Two-Way* seguida pelo pós-teste de *Tukey*, e os valores apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Significância = ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Sigla: ∞ interação. Grupos: Veh = administração de NaCl; Ot = administração de OT; Tf = realização de treinamento de força; Ot+Tf = administração de OT e realização de treinamento de força. 58

Figura 13. Ensaio mecânico. Teste de flexão de três pontos do fêmur de ratas Wistar na periostropausa. (A) Força máxima (N), (B) Rigidez ($\times 10^3$ N/m) e (C) Elasticidade (mJ). Os grupos experimentais foram compostos por dez animais cada, os dados foram examinados por meio da Análise de Variância (ANOVA) *Two-Way* seguida pelo pós-teste de *Tukey*, e os valores apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Significância = * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Sigla: ∞ interação. Grupos: Veh = administração de NaCl; Ot = administração de OT; Tf = realização de treinamento de força; Ot+Tf = administração de OT e realização de treinamento de força. 59

Figura 14. Densidade mineral óssea areal (DMOa) avaliada por DXA de ratas Wistar na periostropausa. (A) DMOa do colo do fêmur (g/cm^2) e (B) DMOa do fêmur total (g/cm^2). Os grupos experimentais foram compostos por dez animais cada, os dados foram examinados por meio da Análise de Variância (ANOVA) *Two-Way* seguida pelo pós-teste de *Tukey*, e os valores apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Significância = * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$. Sigla: ∞ interação. Grupos: Veh = administração de NaCl; Ot = administração de OT; Tf = realização de treinamento de força; Ot+Tf = administração de OT e realização de treinamento de força. 59

Figura 15. Microtomografia do osso cortical de ratas Wistar na periostropausa. (A) área óssea cortical (Ct.Ar; mm^2), (B) espessura cortical média (Ct.Th; mm), (C) número de poros (Po.N; n), (D) momento polar de inércia (MMI polar; mm^4). (E) reconstrução 3D (software CTVox) com espécimes representativos da microtomografia óssea cortical. Os grupos experimentais

foram compostos por dez animais cada, os dados foram examinados por meio da Análise de Variância (ANOVA) *Two-Way* seguida pelo pós-teste de *Tukey*, e os valores apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Significância = * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Sigla: ∞ interação. Grupos: Veh = administração de NaCl; Ot = administração de OT; Tf = realização de treinamento de força; Ot+Tf = administração de OT e realização de treinamento de força. 60

Figura 16. Microtomografia do osso trabecular de ratas Wistar na periostropausa. (A) porcentagem do volume ósseo (BV/TV; %), (B) espessura das trabéculas (Tb.Th; mm), (C) número de trabéculas (Tb.N; 1/mm), (D) separação das trabéculas (Tb.Sp; mm), (E) conectividade das trabéculas (Con.Dn; 1/mm³). (F) reconstrução 3D (software CTVOx) com espécimes representativos da microtomografia óssea trabecular. Os grupos experimentais foram compostos por dez animais cada, os dados foram examinados por meio da Análise de Variância (ANOVA) *Two-Way* seguida pelo pós-teste de *Tukey*, e os valores apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Significância = ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Sigla: ∞ interação. Grupos: Veh = administração de NaCl; Ot = administração de OT; Tf = realização de treinamento de força; Ot+Tf = administração de OT e realização de treinamento de força 61

Figura 17. Espectroscopia de Raman do fêmur de ratas Wistar na periostropausa. (A) Taxa de mineralização ($\nu_1\text{PO}_4$ /Prolina), (B) Substituição do carbonato tipo β ($\text{CO}_3/\nu_1\text{PO}_4$) e (C) Cristalinidade (1/largura de $\nu_1\text{PO}_4$). Os grupos experimentais foram compostos por dez animais cada, os dados foram examinados por meio da Análise de Variância (ANOVA) *Two-Way* seguida pelo pós-teste de *Tukey*, e os valores apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Significância = * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Sigla: ∞ interação. Grupos: Veh = administração de NaCl; Ot = administração de OT; Tf = realização de treinamento de força; Ot+Tf = administração de OT e realização de treinamento de força. 62

Figura 18. Expressão gênica. Fatores de transcrição: (A) *Runx2*, (B) *Osx/Sp7*. (C) Esquema da ação dos fatores de transcrição óssea. Os grupos experimentais foram compostos por dez animais cada, os dados foram examinados por meio da Análise de Variância (ANOVA) *Two-Way* seguida pelo pós-teste de *Tukey*, e os valores apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Significância = * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Sigla: ∞ interação. Grupos: Veh = administração de NaCl; Ot = administração de OT; Tf = realização de treinamento de força; Ot+Tf = administração de OT e realização de treinamento de força. 63

Figura 19. Expressão gênica. Marcadores de formação óssea: (A) *Bmp2*, (B) *Fal*, (C) *Opn/Spp1*, (D) *Ocn/Bglap*. (E) Esquema da ação dos marcadores de formação óssea. Os grupos experimentais foram compostos por dez animais cada, os dados foram examinados por meio da Análise de Variância (ANOVA) *Two-Way* seguida pelo pós-teste de *Tukey*, e os valores apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Significância = * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Sigla: ∞ interação. Grupos: Veh = administração de NaCl; Ot = administração de OT; Tf = realização de treinamento de força; Ot+Tf = administração de OT e realização de treinamento de força. 64

Figura 20. Expressão gênica. Marcadores de remodelação óssea: (A) *Opg*, (B) *Rank*, (C) *Rankl*, (D) *Trap/Acp5*, (E) *Ctsk*. (F) Esquema da ação dos marcadores de formação e remodelação óssea. Os grupos experimentais foram compostos por dez animais cada, os dados foram examinados por meio da Análise de Variância (ANOVA) *Two-Way* seguida pelo pós-teste de *Tukey*, e os valores apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Significância = * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Sigla: ∞ interação. Grupos: Veh =

administração de NaCl; Ot = administração de OT; Tf = realização de treinamento de força; Ot+Tf = administração de OT e realização de treinamento de força. 65

Figura 21. Marcadores bioquímicos plasmáticos do metabolismo ósseo de ratas Wistar na periostropausa. (A) TRAP (U/L) e (B) FAL (U/L). Os grupos experimentais foram compostos por dez animais cada, os dados foram examinados por meio da Análise de Variância (ANOVA) *Two-Way* seguida pelo pós-teste de *Tukey*, e os valores apresentados como média ± erro padrão da média (EPM). Significância = * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. Grupos: Veh = administração de NaCl; Ot = administração de OT; Tf = realização de treinamento de força; Ot+Tf = administração de OT e realização de treinamento de força. 66

Figura 22. Marcadores bioquímicos plasmáticos do dano hepático de ratas Wistar na periostropausa. (A) AST (U/L) e (B) ALT (U/L). Os grupos experimentais foram compostos por dez animais cada, os dados foram examinados por meio da Análise de Variância (ANOVA) *Two-Way* seguida pelo pós-teste de *Tukey*, e os valores apresentados como média ± erro padrão da média (EPM). Significância = ** $p < 0,01$. Sigla: ∞ interação. Grupos: Veh = administração de NaCl; Ot = administração de OT; Tf = realização de treinamento de força; Ot+Tf = administração de OT e realização de treinamento de força. 67

Figura 23. Marcadores bioquímicos plasmáticos do estresse oxidativo de ratas Wistar na periostropausa. (A) Capacidade Antioxidante Total (CAT) pelo método do Poder Antioxidante Redutor Férrico (FRAP; Fe^{2+} $\mu\text{mol/L}$) e (B) peroxidação lipídica pela dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs; $\mu\text{mol/L}$). Os grupos experimentais foram compostos por dez animais cada, os dados foram examinados por meio da Análise de Variância (ANOVA) *Two-Way* seguida pelo pós-teste de *Tukey*, e os valores apresentados como média ± erro padrão da média (EPM). Significância = * $p < 0,05$. Sigla: ∞ interação. Grupos: Veh = administração de NaCl; Ot = administração de OT; Tf = realização de treinamento de força; Ot+Tf = administração de OT e realização de treinamento de força. 67

Figura 24. Síntese dos principais resultados de massa corporal, das análises da estrutura óssea (ensaio mecânico, densitometria óssea e microtomografia óssea), expressão gênica (fatores de transcrição, marcadores de formação e remodelação óssea) e marcadores sanguíneos (metabolismo ósseo e estresse oxidativo) das ratas Wistar na periostropausa do grupo associação. Ot+Tf = administração de OT e realização de treinamento de força (n = 10 animais). *Fonte:* Autor. 68

Figura 25. Síntese dos principais resultados de massa corporal, das análises da estrutura óssea (ensaio mecânico, densitometria óssea, microtomografia óssea e espectroscopia de Raman), expressão gênica (fatores de transcrição, marcadores de formação óssea e marcadores de remodelação óssea) e marcadores sanguíneos (marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo, dano hepático e estresse oxidativo) de 40 ratas Wistar na periostropausa submetidas a diferentes intervenções de acordo com as distribuições nos grupos Veh, Ot, Tf e Ot+Tf. Grupos: Veh = administração de NaCl; Ot = administração de OT; Tf = realização de treinamento de força; Ot+Tf = administração de OT e realização de treinamento de força (n = 10 animais por grupo experimental). *Fonte:* Autor. 69

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Distribuição dos grupos experimentais. Grupos: Veh = administração de NaCl; Ot = administração de OT; Tf = realização de treinamento de força; Ot+Tf = administração de OT e realização de treinamento de força (n = 10 animais por grupo experimental). 42
- Tabela 2.** Intervenções dos grupos experimentais. Grupos: Veh = administração de NaCl; Ot = administração de OT; Tf = realização de treinamento de força; Ot+Tf = administração de OT e realização de treinamento de força (n = 10 animais por grupo experimental). 43
- Tabela 3.** Protocolo para Treinamento de Força (TF). Após a realização do teste de capacidade de carga máxima voluntária (CCMV), os animais realizaram o TF com 60 % (primeira semana), 70 % (segunda semana) e 80 % (terceira semana até a décima sexta semana) da sobrecarga correspondente ao CCMV. 46
- Tabela 4.** Parâmetros para escaneamento e reconstrução do fêmur. 49
- Tabela 5.** Lista dos genes analisados. 52
- Tabela 6.** Massa corporal (mc; g) inicial (18 meses) e final (21 meses), massa uterina (mu; g) e massa ovariana (mo; g) de ratas Wistar (21 meses) na periostropausa. Os grupos experimentais foram compostos por dez animais cada, os dados de mc inicial vs final foram examinados por meio do teste *t* de *Student* pareado (Veh e Ot+Tf) ou teste de Wilcoxon (Ot e Tf); os dados de mu e mo foram examinados por meio da Análise de Variância (ANOVA) *Two-Way* seguida pelo pós-teste de *Tukey*. Todos os valores foram apresentados como média ± erro padrão da média (EPM). Significância e comparação= * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs inicial. Grupos: Veh = administração de NaCl; Ot = administração de OT; Tf = realização de treinamento de força; Ot+Tf = administração de OT e realização de treinamento de força. 56
- Tabela 7.** Massa corporal inicial e final (mc; g), capacidade de carga máxima voluntária (CCMV; g) de ratas Wistar na periostropausa dos grupos Tf e Ot+Tf. A massa corporal (mc/g) e CCMV inicial foram medidos antes do procedimento experimental (aos 18 meses de idade). A massa corporal e o CCMV final foram medidos após 120 dias (aos 21 meses de idade). A porcentagem de ganho de carga (%) foi calculada pela relação $\text{CCMV inicial} \cdot 100 / \text{mc inicial}$ e $\text{CCMV final} \cdot 100 / \text{mc final}$. O CCMV se refere à capacidade máxima de força para realizar a escalada em escada com sobrecarga. Os grupos experimentais foram compostos por dez animais cada, e os valores apresentados como média ± erro padrão da média (EPM). Significância e comparação = * $p < 0,05$ vs. inicial; *** $p < 0,001$ vs. inicial; **** $p < 0,0001$ vs. inicial. Grupos: Tf = realização de treinamento de força; Ot+Tf = administração de OT e realização de treinamento de força. 57

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

- *: significância $p < 0,05$
- **: significância $p < 0,01$
- ***: significância $p < 0,001$
- ****: significância $p < 0,0001$
- ∞ : interação
- %: porcentagem
- °: grau
- °C: graus Celsius
- μ CT: microtomografia óssea
- μ g: micrograma
- μ m: micrômetros
- μ m²: micrômetros quadrado
- μ mol: micromol
- μ W: microwatt
- v_1 PO₄/prolina: taxa de mineralização
- 1/largura de v_1 PO₄: cristalinidade
- *Actb*: β -actina
- ALT: alanina aminotransferase
- ANOVA: análise de Variância
- AST: asparato amiotransferase
- ATF-4: *Activating transcription factor 4*
- BMPs: proteínas morfogênicas ósseas
- BMP-2: proteína morfogênica óssea 2
- *Bmp2*: gene proteína morfogênica óssea 2
- *Bmp6*: gene proteína morfogênica óssea 6
- BV/TV: razão entre o volume ósseo da amostra e o volume da amostra
- Ca²⁺: cálcio
- CAT: capacidade antioxidante total
- CCMV: teste de capacidade de carga máxima voluntária
- cDNA: DNA complementar

- CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais
- cm: centímetros
- cm²: centímetros quadrado
- CMO: conteúdo mineral ósseo
- Conn.Dn: conectividade das trabéculas
- CO₃/v1PO₄: taxa de substituição do carbonato tipo β
- Ct.Ar: área cortical
- CTMs: células tronco mesenquimais
- *Ctsk*: gene catepsina K
- Ct.Th: espessura cortical
- DEXA: absorptometria de raio-X de dupla energia (*dual-energy x-ray absorptiometry*)
- DMOa: densidade mineral óssea areal
- E₂: estrógeno
- EPM: erro padrão da média
- FAL: enzima fosfatase alcalina
- *Fal*: gene fosfatase alcalina
- FeSO₄: sulfato de ferro
- FRAP: poder antioxidante redutor férrico
- g: gramas
- g/cm²: grama por centímetro quadrado
- h: hora
- IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- IL-1: interleucina tipo 1
- IL-6: interleucina tipo 6
- IMS: Sociedade Internacional de Menopausa (*International Menopause Society*)
- IOF: Fundação Internacional de Osteoporose (*International Osteoporosis Foundation*)
- IP: intraperitoneal
- J: joule
- LaFEE: Laboratório de Fisiologia Endócrina e Envelhecimento
- m: metros
- M: molar
- M-CSF: fator estimulante da colônia de monócitos

- MAPK: *Mitogen Activated Protein Kinases*
- mc: massa corporal
- mg/cm²: miligramas por centímetros quadrado
- MgCl₂: cloreto de magnésio
- min: minutos
- mJ: milijoule
- mm: milímetros
- mm/min: milímetros por minuto
- mm²: milímetros quadrado
- mm⁴: milímetros biquadrado
- mmol/L: milimoles por litro
- mo: massa ovariana
- mu: massa uterina
- N: Newtons
- NaCl: solução fisiológica de cloreto sódio a 0,9%
- NF-kB: fator nuclear kappa B
- NO: óxido nítrico (*nitric oxide*)
- nm: nanômetros
- *Ocn/Bglap*: gene da osteocalcina
- *Opg*: gene da osteoprotegerina
- *Opn/Spp1*: gene da osteopontina
- OSX: fator de transcrição osterix
- *Osx/Sp7*: gene do fator de transcrição osterix
- OT: ocitocina
- Ot: grupo ocitocina
- Ot+Tf: grupo ocitocina e treinamento de força
- *p*: probabilidade de significância
- PBS: tampão fosfato salina
- PGE₂: prostaglandina E₂
- pH: potencial de hidrogênio
- *pHMB*: *p*-hidroxi benzoato de mercúrio
- *pNP*: *p*-nitrofenilo

- *p*NPP: fosfato de *p*-nitrofenilo
- Po.N: número de poros
- PTH: paratormônio
- qRT-PCR: técnica de reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa em tempo real
- RANK: membro 11 da superfamília do receptor do fator de necrose tumoral
- *Rank*: gene do membro 11 da superfamília do receptor do fator de necrose tumoral
- RANKL: membro 11 da superfamília do ligante do fator de necrose tumoral
- *Rankl*: gene do membro 11 da superfamília do ligante do fator de necrose tumoral
- RNA: ácido ribonucleico
- RPM: rotações por minuto
- *Runx2*: gene do fator de transcrição relacionado com o runt 2
- SERMs: moduladores seletivos do receptor de estrógeno
- TBARs: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
- Tb.N: número de trabéculas
- Tb.Sp: separação trabecular
- Tb.Th: espessura trabecular
- TF: treinamento de força
- Tf: grupo treinamento de força
- TGF- β : fator de crescimento transformante β
- TNF- α : fator de necrose tumoral α
- TRAP: enzima fosfatase ácida resistente ao tartarato
- *Trap/Ac5*: gene da fosfatase ácida resistente ao tartarato
- TRH: terapia de reposição hormonal
- U/L: unidades por litro
- Veh: grupo veículo
- vs: *versus*

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	31
2.	PERGUNTA, HIPÓTESE E OBJETIVOS	39
	■ Pergunta	39
	■ Hipótese	39
	■ Objetivos	39
3.	MATERIAL E MÉTODO	41
	■ Animais	41
	■ Administração de solução salina e ocitocina	43
	■ Treinamento de força	44
	■ Coleta de materiais	47
	■ Ensaio mecânico	48
	■ Densitometria óssea	48
	■ Microtomografia óssea	49
	■ Espectroscopia de Raman	50
	■ Análise de expressão gênica por reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa em tempo real (qRT-PCR)	51
	■ Marcadores bioquímicos plasmáticos do metabolismo ósseo	52
	■ Marcadores bioquímicos plasmáticos do dano hepático	53
	■ Marcadores bioquímicos plasmáticos do estresse oxidativo	53
	■ Análise Estatística	53
4.	RESULTADOS	56
	4.1. PARÂMETROS GERAIS	56
	■ Ciclo estral	56
	■ Massa corporal, uterina e ovariana	56
	■ Evolução da carga	57
	4.2. PARÂMETROS PRIMÁRIOS	57
	■ Ensaio mecânico	57
	■ Densitometria óssea	59
	■ Microtomografia óssea	60
	■ Espectroscopia de Raman	62

■	Análise de expressão gênica por reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa em tempo real (qRT-PCR)	62
	4.3. PARÂMETROS SECUNDÁRIOS	66
■	Marcadores bioquímicos plasmáticos do metabolismo ósseo	66
■	Marcadores bioquímicos plasmáticos do dano hepático	66
■	Marcadores bioquímicos plasmáticos do estresse oxidativo	67
	4.4. SÍNTESE DOS PRINCIPAIS RESULTADOS	68
■	Grupo Ot+Tf	68
■	Grupos experimentais	68
5.	DISCUSSÃO	71
6.	CONCLUSÃO	78
7.	REFERÊNCIAS	80
8.	ANEXO	88

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Divulgações do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) ilustram modificações ocorridas no Brasil com projeções importantes no cenário de envelhecimento feminino para o ano de 2060, uma vez que o número de mulheres em período de transição para o envelhecimento será maior, em torno de 6 milhões, quando comparada a população masculina. Além da maior densidade populacional feminina, as projeções relacionadas a longevidade para o ano de 2060 também indicam média maior para esta população, sendo 84,23 anos *versus* 77,90 anos na população masculina (IBGE, 2022).

É de conhecimento que o envelhecimento reprodutivo feminino é marcado por diferentes fases que compõem o climatério e, segundo a Sociedade Internacional de Menopausa (IMS), a menopausa é o marco oficial que corresponde a cessação permanente da menstruação resultante da perda da atividade folicular ovariana, caracterizado pela diminuição na concentração de estrógeno (E_2), hormônio com ações protetoras ao organismo feminino em diferentes tecidos, a exemplo do tecido ósseo (NOIRRIT-ESCLASSAN *et al.*, 2021).

Sendo o E_2 descrito como hormônio osteoprotetor, a diminuição em suas concentrações contribui para o aumento do *turnover* ósseo, com taxa de reabsorção superior à de formação óssea (PASCHALIS *et al.*, 2003). É um dos hormônios responsáveis por inibir formação de citocinas pró-reabsorção como interleucina-1 e 6 (IL-1 e 6), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), fator estimulante da colônia de monócitos (M-CSF) e prostaglandina E_2 (PGE_2), e aumentar produção de fatores antirreabsorptivos, como o fator de crescimento transformante beta (TGF- β), o que predispõe a instalação da osteoporose (RIGGS, 2000; PINHEIRO *et al.*, 2009 e 2010; BAYLISS *et al.*, 2012).

Após atingir o pico de massa óssea, por volta dos 30 anos, os indivíduos iniciam perda que varia de 0,3% a 0,5% de sua massa óssea a cada ano e, na pós-menopausa, a diminuição da

massa óssea pode ser até 10 vezes maior que a observada no período de pré-menopausa. Nos primeiros 5 a 10 anos que seguem a última menstruação essa perda pode ser de 2% a 4% ao ano para osso trabecular e de 1% ao ano para osso cortical (RADOMINSKI, *et al.*, 2004). Cabe ressaltar que a diminuição da massa óssea que ocorre fisiologicamente durante o processo de envelhecimento é chamada de osteopenia, no entanto, quando há taxa de reabsorção maior que a de formação óssea, instala-se o quadro de osteoporose primária na mulher (PINHEIRO *et al.*, 2009; BAYLISS *et al.*, 2012).

Segundo a Fundação Internacional de Osteoporose (*IOF*), a osteoporose é doença caracterizada por diminuição de densidade e qualidade óssea na qual os ossos tornam-se frágeis e com maior probabilidade de fraturas, causando dor, incapacidade e limitação funcional. Frequentemente, a doença se desenvolve de forma imperceptível durante anos, sem sintomas ou dor, até a ocorrência de fratura. O quadril está entre os locais de fratura mais comum em que entre 20 a 24% dos pacientes morrem no primeiro ano pós fratura. Dos sobreviventes, 40% tornam-se incapazes de andar de forma independente, 60% necessitam de assistência um ano depois, 80% ficam restritos a outras atividades, e 33% totalmente dependentes. O que é válido ressaltar também é que quase 75% de todas as fraturas de quadril ocorrem em mulheres (*IOF*, 2022). Neste contexto, ressalta-se especial preocupação com a prevalência de mulheres osteoporóticas, cuja gravidade é relevante.

Assim sendo, cabe ressaltar especial a preocupação em estabelecer medidas preventivas e elencar o melhor momento para intervir. As diferentes fases que acompanham o envelhecimento feminino são marcadas por modificações importantes que destacam a perimenopausa, período imediatamente anterior à menopausa, como oportunidade para promover saúde e agir de forma preventiva frente à osteoporose (COOK, 1993; LANGE-COLLETT, 2002; BRINTON *et al.*, 2015) (**Figura 1**).

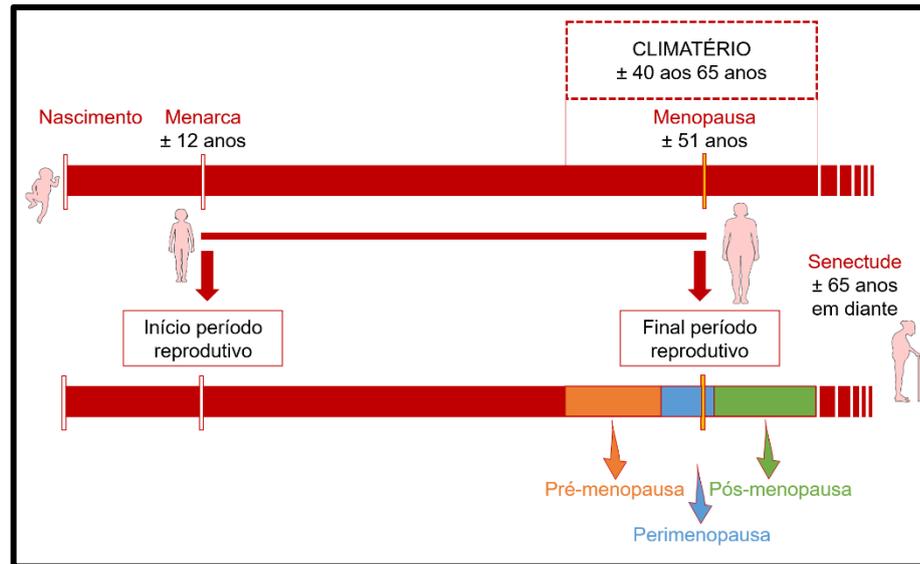


Figura 1. Ciclo reprodutivo feminino. Menarca, primeira menstruação e início do período reprodutivo. Climatério, período que marca a transição da fase reprodutiva para a não reprodutiva, englobando as fases de pré, peri e pós-menopausa. Menopausa, marco do envelhecimento reprodutivo, que ocorre em torno dos 51 anos. Senectude, período do envelhecimento. *Fonte:* Autor.

Entre as opções disponíveis para controle da doença estão: terapia de reposição hormonal (TRH), uma das mais bem estabelecidas, moduladores seletivos de receptores de estrógeno (SERMs), bifosfonatos, calcitonina, cálcio, vitamina D, fluoretos e paratormônio (PTH) (LEITE, 1999; LÓPEZ, 2000; RADOMINSKI *et al.*, 2004; GAMBACCIANI & VACCA, 2004 e 2014; QUIROS-GONZALEZ, 2014; COSMAN *et al.*, 2014). Nos últimos anos tem sido analisada a ação da ocitocina (OT) para controle da osteoporose. A OT é hormônio peptídico sintetizado em neurônios dos núcleos hipotalâmicos e armazenado em vesículas nas terminações dos neurônios magnocelulares na neurohipófise, classicamente envolvido com a gravidez (contração uterina) e lactação (ejeção do leite). Entretanto, receptores de OT também estão expressos em osteoblastos e osteoclastos humanos, estimulando diferenciação de um e controlando a função do outro, o que indica atuação da OT na remodelação e controle da homeostase óssea (COPLAND *et al.*, 1999; COLUCCI *et al.*, 2002; TAMMA *et al.*, 2009, COLAIANNI *et al.*, 2014a).

Em células osteoblásticas, a OT estimula a diferenciação para fenótipo mineralizante pela *up-regulation* de BMP-2 (proteína morfogenética óssea 2), que controla a expressão de

Schnurri-2 e 3, Osterix (OSX) e ATF-4 (*Activating transcription factor 4*). Em células osteoclásticas, porém, OT exerce efeito *dual*, ao passo que estimula formação de osteoclastos de forma direta pela estimulação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) e sinalização MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinases*) e, indiretamente, por *up-regulation* de RANK-L e *down-regulation* de OPG; por outro lado, a OT inibe a reabsorção óssea por osteoclastos maduros pelo aumento do Ca^{2+} citosólico e síntese de óxido nítrico (NO) (TAMMA *et al.*, 2009) (**Figura 2**).

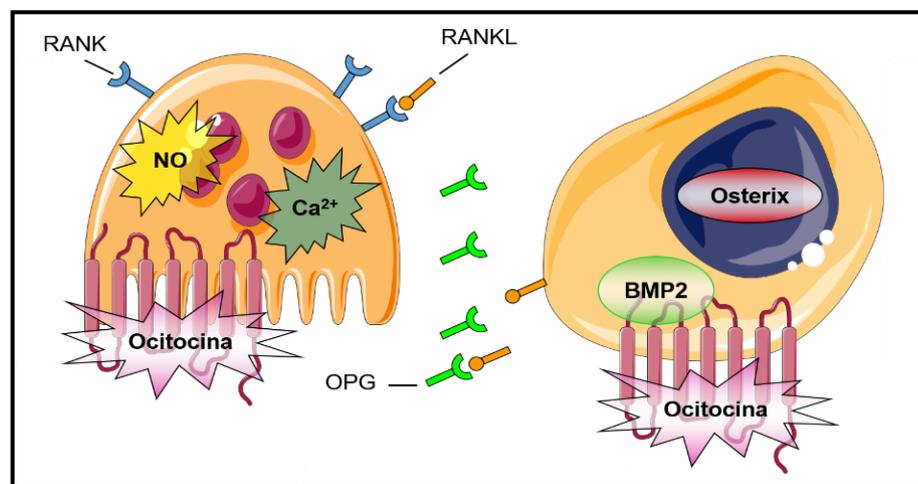


Figura 2. Ação da ocitocina (OT) nas células osteoblásticas e osteoclásticas. *Fonte:* Adaptado de TAMMA *et al.*, 2009.

Outro fato é que a regulação da síntese de OT e de seu receptor é mediada pela ação estrogênica e também de forma autócrina. O E_2 é hormônio que controla a atividade osteoblástica, cujas células são capazes de sintetizar OT. Desta forma, pesquisas tem demonstrado que o E_2 pode agir através de dois mecanismos distintos sobre a regulação da OT e seu receptor: via não-genômica, estimulando a transcrição e síntese de OT, e genômica, estimulando a transcrição e síntese do receptor de OT (**Figura 3**). Assim como o E_2 age mediando a síntese de OT e seu receptor, o inverso também parece acontecer. Estudos mostraram que em camundongos nulos para o receptor de OT, a ação do E_2 no metabolismo ósseo é atenuada, sugerindo que sua ação é, em partes, dependente do receptor de OT intacto (COLAIANNI *et al.*, 2011 e 2014b).

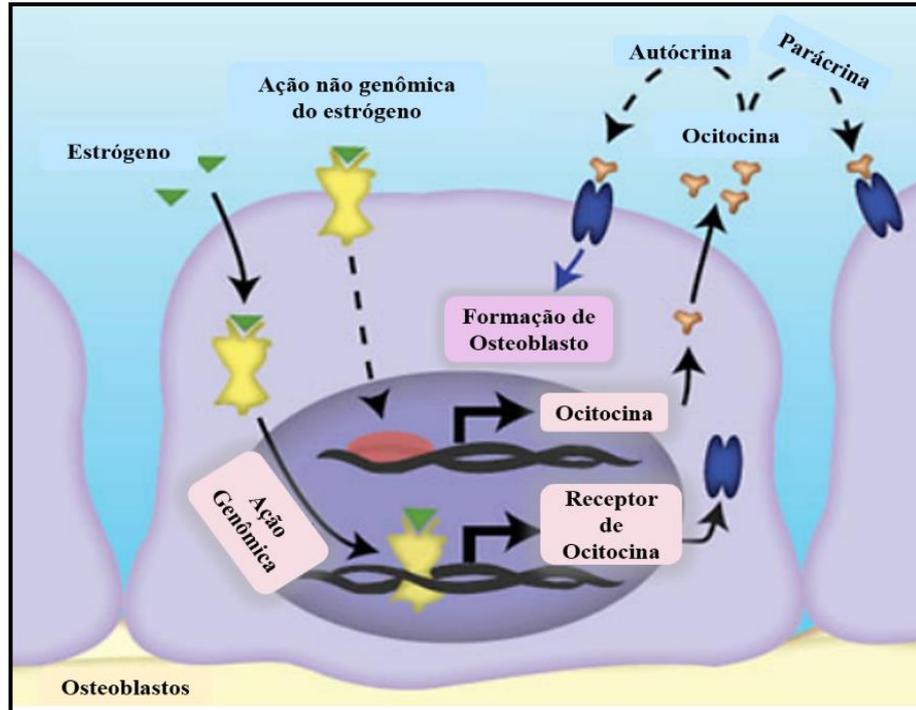


Figura 3. Regulação e síntese de OT e seu receptor (Oxtr) mediada pela ação estrogênica genômica e não genômica. *Fonte:* Adaptado de COLAIANNI *et al.*, 2014.

Estudo conduzido em nosso laboratório - Laboratório de Fisiologia Endócrina e Envelhecimento (LaFEE) - com ratas velhas (24 meses) tratadas com OT para análise da formação óssea após exodontia, demonstrou atuação estimuladora da OT com melhora nos parâmetros de formação e diminuição na reabsorção óssea durante o processo de reparação alveolar (COLLI *et al.*, 2012). Em outro estudo, verificamos que a OT induziu a diferenciação osteoblástica de células tronco mesenquimais (CTMs) de ratas velhas (SANTOS *et al.*, 2018). Já, em estudo mais recente, constatamos que a administração da OT em fêmeas Wistar durante o período de transição reprodutiva, periostropausa, melhora o metabolismo ósseo destes animais demonstrado pela diminuição na porcentagem de poros da região cortical do colo do fêmur, bem como por melhoria em parâmetros biomecânicos como força máxima e rigidez óssea (FERNANDES *et al.*, 2020).

Além da terapêutica com fármacos, a realização de exercício físico tem sido descrita como fonte segura de prevenção e tratamento da osteoporose, já que o desenvolvimento e a manutenção do esqueleto requerem estimulação mecânica, a qual resulta em mudanças

adaptativas que fortalecem a estrutura óssea, segundo a Lei de Wolff. A deformação na matriz óssea causada pelo estímulo mecânico é detectada por osteócitos, via mecanotransdução, caracterizada por reações bioquímicas que geram tensões mecânicas – mecanismo piezoelétrico, enviando sinais parácrinos às células osteoblásticas e osteoclásticas (KNOTHE, 2003; GUSMÃO E BELANGERO, 2009; ROBLING & TURNER, 2009).

Uma vez que existem diversos tipos de exercícios, é importante reconhecer qual melhor estimula e contribui para a qualidade óssea. Tanto os exercícios cíclicos quanto os de resistência progressiva fornecem estímulos benéficos ao tecido ósseo, porém, o último parece apresentar efeitos mais significantes que o primeiro no que se diz respeito a melhora da densidade mineral óssea (DMO) (LAYNE & NELSON, 1999; RUSSO, 2009). Estudos estabelecem que o osso responde à carga mecânica, enquanto que é insensível a cargas estáticas, além disto, os estímulos devem ser de alta magnitude e realizados em alta velocidade (RUBIN & LANYON, 1984 e 1985). Estudo mostra que o estímulo proveniente da prática de exercícios de força favorece a taxa de formação óssea ao promover diminuição na expressão do gene SOST e da proteína esclerostina, a qual limita a formação óssea por inibir parte da atividade osteoblástica (ROBLING *et al.*, 2008).

Conjunto de resultados obtidos nos estudos conduzidos no LaFEE, com ratas na periostropausa, evidenciou efeito benéfico do treinamento de força (TF) na qualidade óssea destes animais, destacando que a estratégia é válida para prevenir a osteoporose associada ao hipoestrogenismo e reduzir o risco de fratura durante a senescência ao melhorar parâmetros ósseos biomecânicos (SINGULANI *et al.*, 2017; STRINGHETTA-GARCIA *et al.*, 2016, 2017). Além do mais, outro estudo mostrou que o TF é excelente intervenção não farmacológica que, além de prevenir a osteoporose, pode aumentar a qualidade óssea no início do processo de cicatrização, melhorando a consolidação óssea (PERES-UENO *et al.*, 2020).

Considerando que há evidências de que as intervenções isoladas melhoram parâmetros relacionados com a preservação de parâmetros ósseos em ratas na periostropausa, permanece lacuna sobre o efeito combinado da OT e do TF na proteção da microestrutura óssea cuja ação é de importância crescente na fisiopatologia da osteoporose quando comparado as respectivas intervenções em fêmeas no período de transição natural da ciclicidade para a aciclicidade estral. Portanto, o estudo tem como objetivo verificar se a associação da OT ao TF, em comparação às intervenções isoladas, potencializa os benefícios sobre o remodelamento ósseo do fêmur de ratas Wistar na periostropausa. Hipotetizamos que a associação da OT ao TF potencializará os benefícios das intervenções isoladas em período de intensa alteração hormonal e determinação da senescência feminina.

PERGUNTA, HIPÓTESE E OBJETIVOS

2. PERGUNTA, HIPÓTESE E OBJETIVOS

■ Pergunta

A associação da OT ao TF potencializa os benefícios das intervenções isoladas no remodelamento ósseo do fêmur de ratas Wistar na periostropausa?

■ Hipótese

A associação da OT ao TF potencializa os benefícios das intervenções isoladas no remodelamento ósseo do fêmur de ratas Wistar na periostropausa.

■ Objetivos

Com base nas evidências obtidas, os objetivos deste estudo foram:

- **Geral:** Verificar se a associação da OT ao TF, em comparação às intervenções isoladas, potencializa os benefícios sobre o remodelamento ósseo do fêmur de ratas Wistar na periostropausa.
- **Específicos:** Investigar se a associação da OT ao TF, em comparação às intervenções isoladas, potencializa, no fêmur, o desempenho do osso corticoesponjoso, a densidade mineral óssea, a qualidade cortical e trabecular, a composição da matriz inorgânica e a expressão de genes presentes no ciclo de remodelamento ósseo, bem como a atividade de marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo, dano hepático e estresse oxidativo de ratas Wistar na periostropausa.

MATERIAL E MÉTODO

3. MATERIAL E MÉTODO

O presente estudo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia do *Campus* de Araçatuba (FOA-UNESP), em conformidade com o guia de cuidados para uso de animais de laboratório, processo número 2018-0347 (em anexo ao final deste documento).

■ Animais

Após a aprovação do protocolo experimental, 40 ratas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), com idade inicial de 17 meses, múltíparas (3 a 4 procriações dos 2 aos 10 meses de idade), provenientes do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA), foram incluídas neste estudo. As ratas foram mantidas em gaiolas coletivas (4 animais/caixa) em ambiente com controle de temperatura (22 ± 2 °C), ciclo de luz (12/12h - luzes acesas às 7h) e umidade (55 ± 10 %), com água e ração (Presence® ratos e camundongos) *ad libitum*.

A saúde geral dos animais foi monitorada diariamente durante todo o período experimental e, durante 2 semanas, sendo 15 dias consecutivos, aos 17 meses de idade, o ciclo estral foi verificado no período da manhã, em torno das 9h, para averiguar irregularidade do ciclo estral – periostropausa. Para tanto, o esfregaço vaginal foi analisado a fresco ao microscópio óptico, segundo a técnica de Long & Evans, 1922. Estudos conduzidos no LaFEE demonstraram que em ratas Wistar de 18 meses há menor concentração de estrógeno e maior concentração de hormônio folículo estimulante (FSH) quando comparadas a ratas mais jovens, o que caracteriza a periostropausa, período semelhante a perimenopausa na mulher (FERREIRA *et al.*, 2015; NICOLA *et al.*, 2016).

Após período de análise do ciclo estral (17^o mês), os animais foram submetidos ao teste de aderência ao exercício físico (18^o mês). Somente os animais com irregularidade estral (diestro persistente durante o período correspondente a três ciclos consecutivos), e aderentes ao exercício físico em escada foram incluídos neste estudo. A **Figura 4** ilustra os critérios de inclusão e exclusão adotados para seleção dos animais experimentais.

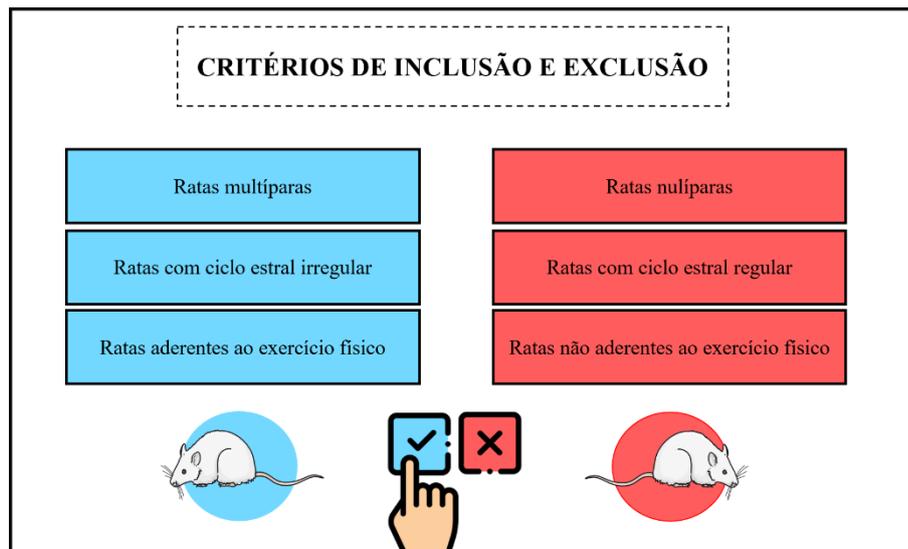


Figura 4. Critérios de inclusão e exclusão. Critérios de inclusão: ratas multíparas, com ciclo estral irregular e aderentes ao exercício físico. Critérios de exclusão: ratas nulíparas, com ciclo estral regular e não aderentes ao exercício físico. *Fonte:* Autor.

Após período de análise criteriosa da condição dos animais, os mesmos foram distribuídos aleatoriamente nos grupos que compõem este estudo, conforme descrito na **Tabela 1**. Posteriormente, em conformidade com os devidos protocolos, receberam as intervenções descritas na **Tabela 2**, durante 4 meses (120 dias).

Distribuição dos grupos experimentais		
GRUPOS	1	Veículo (Veh)
	2	Ocitocina (Ot)
	3	Treinamento de Força (Tf)
	4	Ocitocina e Treinamento de Força (Ot+Tf)

Tabela 1. Distribuição dos grupos experimentais. Grupos: Veh = administração de NaCl; Ot = administração de OT; Tf = realização de treinamento de força; Ot+Tf = administração de OT e realização de treinamento de força (n = 10 animais por grupo experimental).

Intervenções dos grupos experimentais		
GRUPOS	Veh	Solução salina/NaCl
	Ot	Ocitocina/OT
	Tf	Treinamento de Força/TF
	Ot+Tf	Ocitocina/OT + Treinamento de Força/TF

Tabela 2. Intervenções dos grupos experimentais. Grupos: Veh = administração de NaCl; Ot = administração de OT; Tf = realização de treinamento de força; Ot+Tf = administração de OT e realização de treinamento de força (n = 10 animais por grupo experimental).

Antes das intervenções, os animais tiveram as suas massas corporais (g) registradas para acompanhamento e adequação das intervenções – NaCl, OT e/ou TF.

■ Administração de solução salina e ocitocina

A OT foi adquirida da Sigma Aldrich (*Sigma Aldrich, Munique, Alemanha*), com pureza superior a 97 %, e dissolvida em solução salina 0,15 mol/L. Os animais dos grupos Ot e Ot+Tf receberam duas doses de OT (134 µg/Kg) – ou solução salina (0,15 mol/L) no grupo Veh – administradas intraperitonealmente, com intervalo de 12 horas, a cada 30 dias durante 120 dias, totalizando 8 injeções. Após 30 dias da administração da última dose, foi realizada a eutanásia. O protocolo de tratamento com OT foi adaptado de Tamma e colaboradores (2009) e Colli e colaboradores (2012). A **Figura 5** ilustra os procedimentos descritos.

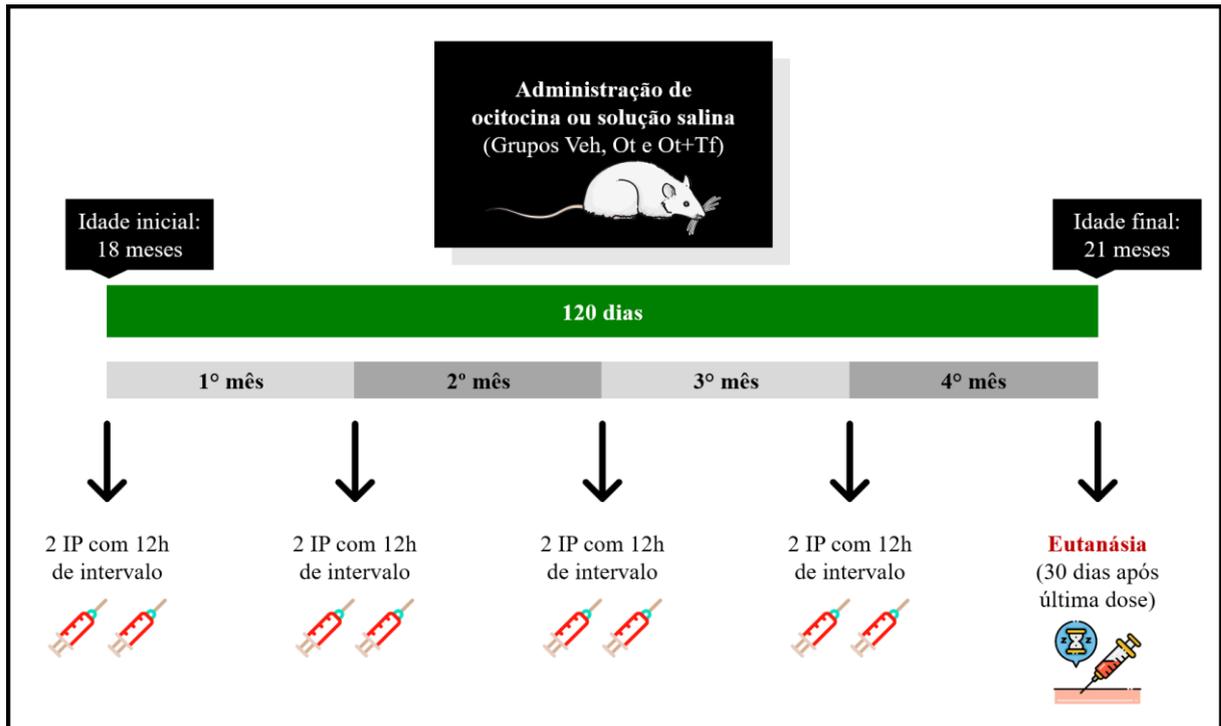


Figura 5. Administração de ocitocina ou solução salina. No início dos 18º, 19º, 20º e 21º meses, os animais receberam duas injeções intraperitoneais de solução salina (grupo Veh) ou OT (grupo Ot e Ot+Tf) com intervalo de 12 horas (7h e 19h), totalizando 8 injeções. Após 30 dias da administração da última dose, totalizando 120 dias de período experimental, os animais foram eutanasiados. Grupos: Veh = administração de NaCl; Ot = administração de OT; Ot+Tf = administração de OT e realização de treinamento de força (n = 10 animais por grupo experimental). *Fonte:* Autor.

■ Treinamento de força

Todos os animais deste estudo foram submetidos a verificação de aderência ao exercício físico pela realização da subida voluntária na escada de TF e, posteriormente, foram distribuídos aleatoriamente nos grupos experimentais.

Os animais dos grupos Tf e Ot+Tf realizaram TF com a carga acoplada à cauda, em escada (1.13 x 0.18 m; 2 cm entre os degraus) com 80° de inclinação e local para descanso no topo (diâmetro de 20 x 20 x 20 cm), conforme ilustrado na **Figura 6**. O protocolo de TF foi adaptado de Hornberger & Farrar (2004) e Stringhetta-Garcia e colaboradores (2016).

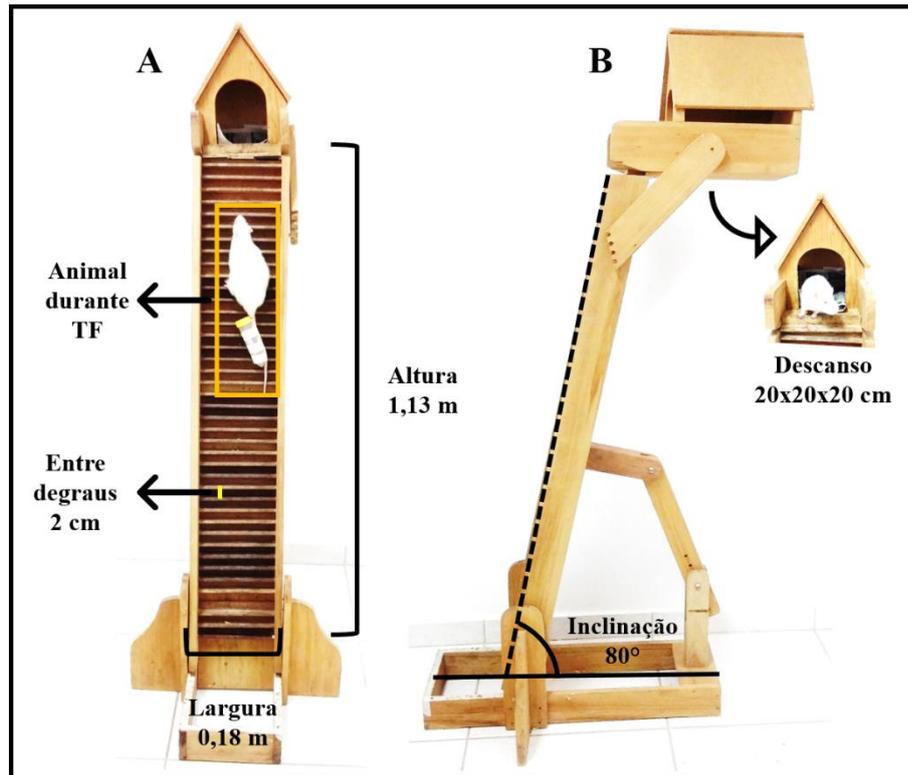


Figura 6. Escada de treinamento de força do Laboratório de Fisiologia Endócrina e Envelhecimento (LaFEE) – UNESP Araçatuba. Especificações: A) Animal durante o TF, 1,13 m de altura, 0,18 m de largura, distância entre degraus de 2 cm, B) 80° de inclinação e descanso no topo de 20x20x20 cm. *Fonte:* Autor.

Inicialmente, aos 17 meses de idade, os animais foram submetidos a período de adaptação à escada por 3 sessões (primeira semana) quando realizaram 2, 4 e 6 subidas em dias alternados e sem carga. Após período de adaptação, os animais foram submetidos ao teste de Capacidade de Carga Máxima Voluntária (CCMV), com uso de esferas de aço acoplados à cauda. Para o teste de CCMV, a carga inicial foi de 75 % da massa corporal do animal. Os animais tiveram dois minutos de descanso entre as subidas e a cada nova subida foram adicionadas 30 gramas de sobrecarga – procedimento realizado até a exaustão comportamental. A sobrecarga imposta na subida anterior a da falha do movimento foi considerada a carga máxima do animal, a qual serviu como base para os cálculos da sobrecarga a serem aplicadas durante o período de treinamento. Após 48 horas do término do teste de CCMV, o TF teve início, conforme informações descritas na **Tabela 3**.

Protocolo para Treinamento de Força		
SEMANAS	Após realização do teste de CCMV	
	1 ^a	60 % da sobrecarga correspondente ao CCMV
	2 ^a	70 % da sobrecarga correspondente ao CCMV
	3 ^a – 16 ^a	80 % da sobrecarga correspondente ao CCMV

Tabela 3. Protocolo para Treinamento de Força (TF). Após a realização do teste de capacidade de carga máxima voluntária (CCMV), os animais realizaram o TF com 60 % (primeira semana), 70 % (segunda semana) e 80 % (terceira semana até a décima sexta semana) da sobrecarga correspondente ao CCMV.

Durante 120 dias, os animais realizaram três sessões semanais de TF em dias alternados. Cada sessão foi constituída por seis subidas com intervalos de dois minutos entre cada subida. A cada 4 semanas (1 mês) foi realizado novo teste de CCMV para obtenção e manutenção da CCMV dos animais. Após 48 horas do último treino, foi realizada a eutanásia. A **Figura 7** ilustra o protocolo descrito.

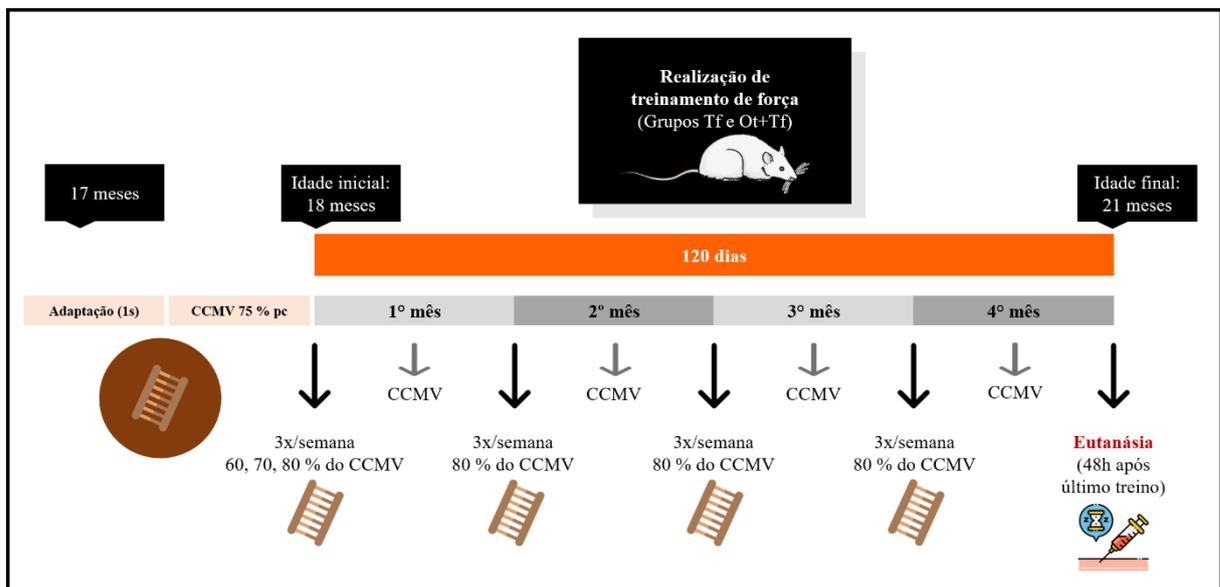


Figura 7. Realização de treinamento de força. Nos últimos 15 dias do 17º mês, foi realizada a adaptação dos animais dos grupos Tf e Ot+Tf durante uma semana (1s). Quarenta e oito horas antes de iniciar o TF os animais realizaram o teste de capacidade máxima de carga voluntária (CCMV) com 75 % da massa corporal (mc) para adequação da carga. Na primeira semana os animais treinaram com 60 % do teste de CCMV, na segunda com 70 %, e na terceira até o final do período experimental com 80 % do teste de CCMV. O treinamento foi realizado 3 vezes por semana. Após 48 horas da realização do último treino, totalizando 120 dias de período experimental, os animais foram eutanasiados. Grupos: Tf = realização de treinamento de força; Ot+Tf = administração de OT e realização de treinamento de força (n = 10 animais por grupo experimental). *Fonte:* Autor.

■ Coleta de materiais

Após período experimental, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina® (80 mg/kg) associado ao cloridrato de xilazina® (10 mg/kg) por via intraperitoneal. Posteriormente foi realizada a retirada asséptica dos fêmures. Os fêmures direitos foram armazenados em solução fisiológica - NaCl 0,9 % (m/v) e freezer -20 °C para análise de ensaio mecânico, densitometria, microtomografia óssea e espectroscopia de Raman. Os fêmures esquerdos foram imediatamente processados para análise de expressão gênica por reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa em tempo real (qRT-PCR), coletados em ambiente e com material estéril para isolamento da região proximal do fêmur, lavados em tampão fosfato-salino (PBS) estéril, congelados com nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80 °C. O sangue foi centrifugado (2500 RPM, 4 °C, 15 min - *Eppendorf® Centrifuge 5804R*) e armazenado para dosagem de marcadores da atividade celular do metabolismo ósseo, dano hepático e estresse oxidativo. Útero e ovário foram retirados, pesados, e a massa corporal final registrada.

A síntese do delineamento experimental desta pesquisa está retratada na **Figura 8**.

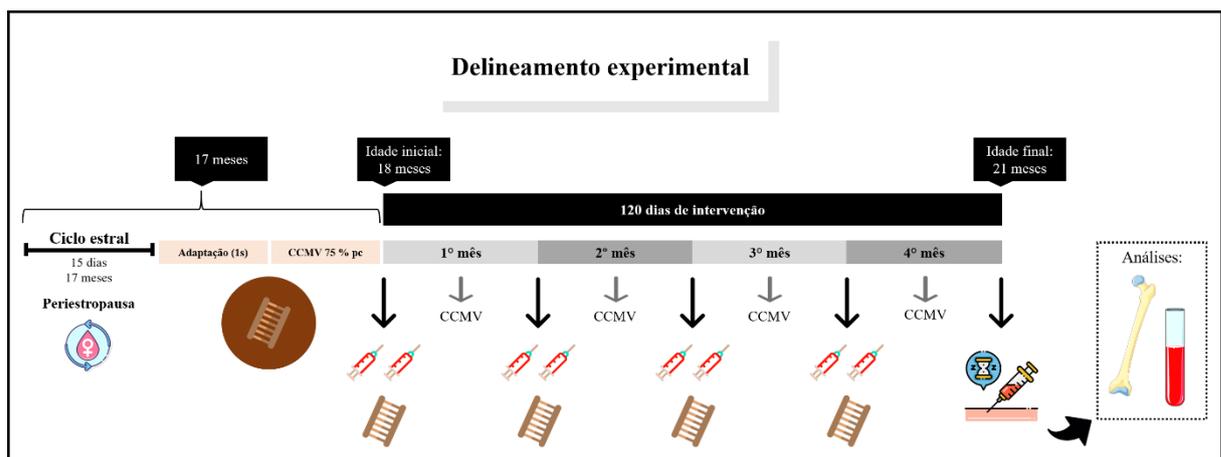


Figura 8. Desenho experimental. Durante os primeiros 15 dias do 17º mês, foi analisado o ciclo estral de todos os animais. Nos últimos 15 dias do 17º mês, foi realizada a adaptação nos animais dos grupos Tf e Ot+Tf e o teste de capacidade máxima de carga voluntária (CCMV) com 75 % da massa corporal (mc) para adequação da carga. No início dos 18º, 19º, 20º e 21º meses, os animais receberam duas injeções intraperitoneais de solução salina (grupo Veh) ou OT (grupo Ot e Ot+Tf) com intervalo de 12 horas (7h e 19h), totalizando 8 injeções. Os animais do grupo Tf e Ot+Tf realizaram TF na escada 3 vezes por semana durante 120 dias com a realização do teste de CCMV mensal. Após 120 dias do período experimental, os animais foram submetidos à eutanásia e realizada coleta sanguínea e óssea para posteriores análises. Grupos: Veh = administração de NaCl; Ot = administração de OT; Tf = realização de treinamento de força; Ot+Tf = administração de OT e realização de treinamento de força (n = 10 animais por grupo experimental). *Fonte:* Autor.

■ Ensaio mecânico

Algumas propriedades do tecido ósseo, como força máxima (N), rigidez ($\times 10^3 \text{N/m}$) e elasticidade (mJ) foram analisadas pelo teste biomecânico de compressão e flexão de três pontos, na Máquina de Ensaio Universal EMIC/Mod DL3000. O ensaio mecânico deste estudo foi realizado com distância entre apoio de 20 mm em superfície, célula de carga de 2000 N e com velocidade de aplicação da carga (força) de 0,25 mm/min. Os valores foram registrados em sistemas computacionais do próprio fabricante, que fornece diretamente os valores de força máxima admitidos pelo fêmur, avaliada por meio da curva de força X deslocamento (TURNER & BURR, 1993; SHIRAZI-FARD *et al.*, 2013). A **Figura 9** ilustra simplificada a realização desta análise.

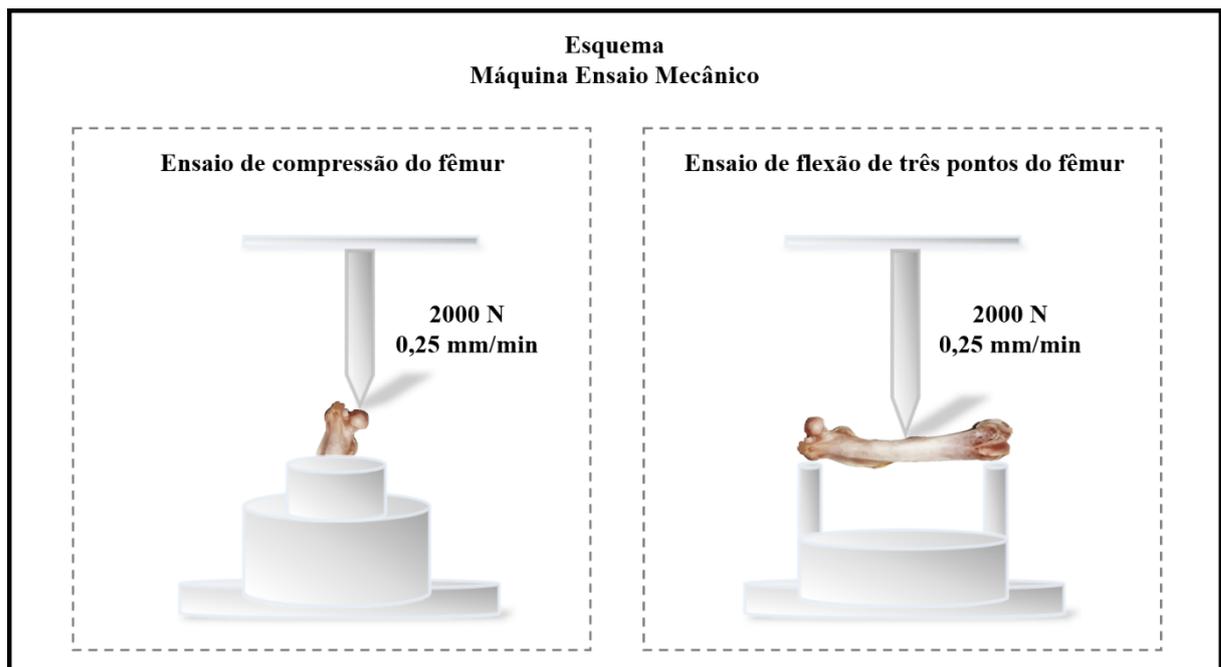


Figura 9. Esquema simplificado do ensaio mecânico de compressão e flexão de três pontos realizado nos fêmures dos animais experimentais. *Fonte:* Autor.

■ Densitometria óssea

O conteúdo mineral ósseo (CMO; g) e a área óssea (cm^2) foram analisados para a determinação da densidade mineral óssea areal (DMOa; g/cm^2) do colo do fêmur e DMO do fêmur total de todos os animais experimentais, conforme protocolo de Fernandes e

colaboradores (2020). Foi utilizado o DEXA (absortometria de raio-X de dupla energia), densitômetro modelo DPX-ALPHA, com software especial para pequenos animais pertencente ao Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal – FMVet/UNESP.

■ Microtomografia óssea

A microtomografia óssea cortical e trabecular foi realizada com microtomógrafo computadorizado Skyscan 1272 (*Skyscan, Aartselaar, Bélgica*), utilizado para avaliação tridimensional não destrutiva da arquitetura óssea. O fêmur foi posicionado craniocaudalmente para obtenção de “slices” com resolução de 12x12x12 μm (TATSUMI *et al.*, 2008). Após posicionamento, os fêmures foram escaneados e, posteriormente, reconstruídos para análises conforme parâmetros descritos na **Tabela 4**.

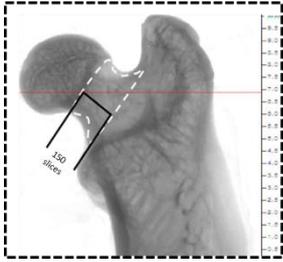
Parâmetros para escaneamento		Parâmetros para reconstrução	
Voltagem do raio-X	80 kV	<i>Smoothing</i>	6
Corrente	125 μA	<i>Ring artefacts reduction</i>	0
Filtro de alumínio	1 mm	<i>Beam-hardening correction</i>	50 %
Resolução em <i>pixels</i>	6 μm	<i>Histogram output</i>	0,015 – 0,0055
Resolução da câmera	2016 x 1344	 <p>Posicionamento craniocaudal do fêmur</p>	
<i>Rotation step</i>	0,6°		
<i>Frame average</i>	OFF		
<i>Random movement</i>	10		
<i>Flat field correction</i>	ON		
Duração do escaneamento	33 min		

Tabela 4. Parâmetros para escaneamento e reconstrução do fêmur.

Os parâmetros da região cortical e trabecular do colo do fêmur foram quantificados por meio do volume de interesse (VOI) de 150 slices com a ferramenta de interpolação dinâmica no software CT-Analyser (*SkyScan, Leuven, Belgium*). Quanto a construção da imagem

representativa dos grupos em modelo tridimensional (3D), foi utilizado o software CT-Vox (*SkyScan, Leuven, Belgium*).

Os parâmetros analisados no osso trabecular: porcentagem do volume ósseo (BV/TV; %), espessura das trabéculas (Tb.Th; mm), número de trabéculas (Tb.N; 1/mm), separação das trabéculas (Tb.Sp; mm), conectividade das trabéculas (Conn.Dn; 1/mm³). Na análise do osso cortical foi analisado: área óssea cortical (Ct.Ar; mm²), espessura cortical média (Ct.Th; mm), número de poros (Po.N) e momento polar de inércia (J ; mm⁴) (BOUXSEIN, 2010).

■ Espectroscopia de Raman

A estrutura óssea analisada foi a região do colo do fêmur e foi realizada com a utilização de microscópio Raman “espectrógrafo micro-Raman, marca Renishaw, modelo in-Via” *surface-enhanced Raman scattering*. Foram mensuradas as alterações nas bandas correspondentes aos seguintes compostos: Fosfato (Banda 959-960), Prolina (Banda 855) e Carbonato (Banda 1070-1077), segundo a padronização de Fernandes e colaboradores (2020), as quais foram utilizadas para cálculo da taxa de mineralização ($v_1\text{PO}_4/\text{prolina}$), taxa de substituição do carbonato tipo β ($\text{CO}_3/v_1\text{PO}_4$) e cristalinidade ($1/\text{largura de } v_1\text{PO}_4$).

O laser utilizado foi do comprimento de onda de 633 nm com potência na amostra da ordem de microwatt (μW) e a rede de difração foi de 1800 linhas por mm. O tempo de exposição adotado foi de 10 segundos e a quantidade de acumulações foi igual a cinco. A microscopia óptica foi obtida por microscópio óptico da marca Leica (série DMLM), acoplado ao espectrógrafo, cuja objetiva possui aumento de 50x fornecendo resolução espacial da ordem $1,00 \mu\text{m}^2$, detector CCD Peltier (resfriado a $-70 \text{ }^\circ\text{C}$) e plataforma motorizada XYZ (motor de passo – $0,10 \mu\text{m}$) no qual foram posicionadas as amostras, sendo três espectros coletados de cada amostra, totalizando nove espectros por grupo. A **Figura 10** ilustra simplificada a realização desta análise.

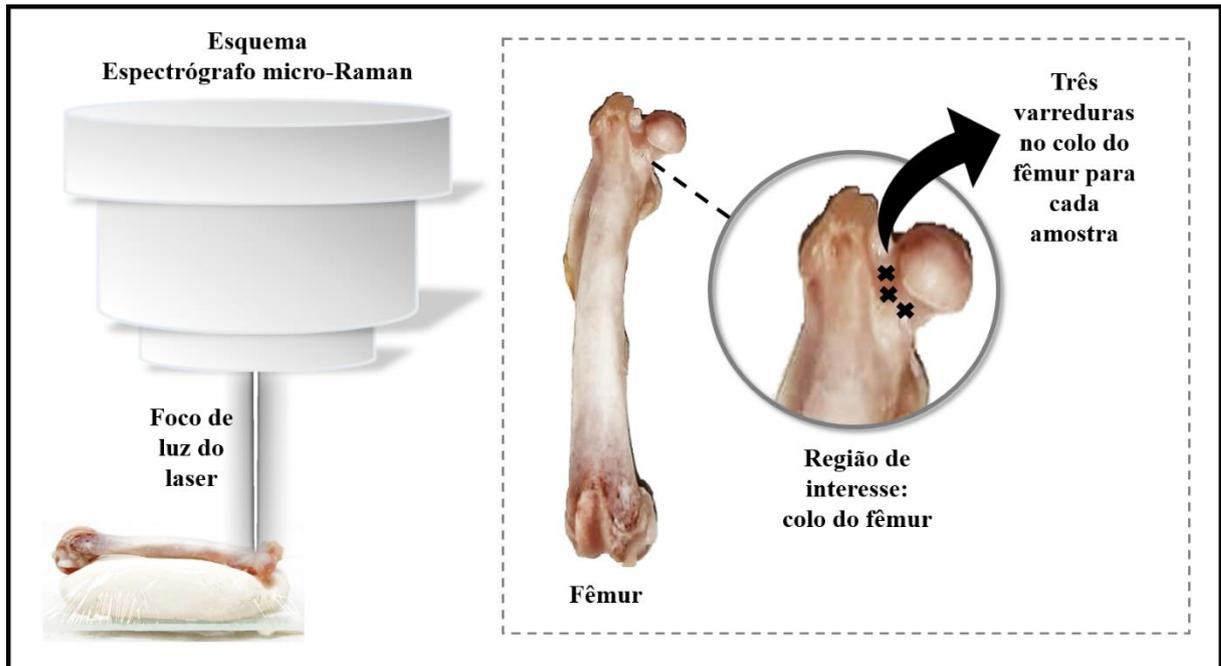


Figura 10. Esquema simplificado da espectroscopia de Raman. O foco de luz do laser é incidido sobre três pontos da região de interesse: o colo do fêmur de cada amostra. *Fonte:* Autor.

■ **Análise de expressão gênica por reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa em tempo real (qRT-PCR)**

Os fêmures foram pulverizados em nitrogênio líquido e o RNA total foi extraído com o reagente TRIzol (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific; Carlsbad, CA, EUA) seguindo as instruções do fabricante. A pureza do RNA foi avaliada pela razão de espectrofotometria 260/280 e 260/230 (satisfatória entre 1,8-2,0 e 2,0-2,2, respectivamente). As amostras foram tratadas com DNase I (Sigma-Aldrich), o RNA foi quantificado (Quant-iT RiboGreen RNA Assay Kit, Invitrogen) e 2 µg de RNA total foram transcritos reversamente para DNA complementar (High Capacity RNA-to-cDNA™ Kit; Aplicado Biosystems, ThermoFisher Scientific; Foster City, Califórnia, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

A análise da expressão gênica de marcadores ósseos foi realizada por qRT-PCR, em StepOne Plus™ Real-Time PCR Systems, com TaqMan™ Gene Expression Assays (FAM fluoróforo repórter / extintor não fluorescente MGB) (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific). A expressão dos alvos foi normalizada pela expressão de Actb, como gene de

manutenção, e a abundância relativa dos transcritos foi determinada pelo método 2 (-delta Ct), usando o grupo Veh como calibrador (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). Referências do ensaio estão listadas na **Tabela 5**.

Fatores de Transcrição		
<i>Runx2</i>	Fator de Transcrição Relacionado ao Runt-2	<i>Rn01512298_m1</i>
<i>Osx/Sp7</i>	Fator de Transcrição Osterix/Sp7	<i>Rn02769744_s1</i>
Marcadores de Formação Óssea		
<i>Fal</i>	Fosfatase Alcalina Óssea	<i>Rn01516028_m1</i>
<i>Opn/Spp1</i>	Osteopontina/ fosfoproteína 1 secretada	<i>Rn00681031_m1</i>
<i>Ocn/Bglap</i>	Osteocalcina /proteína gama-carboxiglutamato ósseo	<i>Rn00566386_g1</i>
<i>Bmp2</i>	Proteína morfogenética óssea 2	<i>Rn00567818_m1</i>
Marcadores de Remodelação Óssea		
<i>Opg</i>	Membro 11b da superfamília do receptor do fator de necrose tumoral	<i>Rn00563499_m1</i>
<i>Rankl</i>	Membro 11 da superfamília do ligante do fator de necrose tumoral	<i>Rn00589289_m1</i>
<i>Rank</i>	Membro 11 da superfamília do receptor do fator de necrose tumoral	<i>Rn04340164_m1</i>
<i>Trap/Acp5</i>	Fosfatase ácida 5, resistente ao tartarato	<i>Rn00569608_m1</i>
<i>Ctsk</i>	Catepsina K	<i>Rn00580723_m1</i>
Gene de manutenção		
<i>Actb</i>	β -actina	<i>Rn00667869_m1</i>

Tabela 5. Lista dos genes analisados.

■ Marcadores bioquímicos plasmáticos do metabolismo ósseo

A análise de fosfatase alcalina (FAL; U/L) e fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP; U/L) foi determinada por ensaio colorimétrico (PERES-UENO *et al.*, 2020). FAL foi analisada usando mistura de reação com 2,5 mmol/L de *p*-nitrofenil fosfato (*p*NPP), 2 mmol/L de cloreto de magnésio (MgCl₂) e tampão de glicina 25 mmol/L (pH 9,4). A atividade de TRAP foi determinada por ensaio colorimétrico usando mistura de reação que consiste em 10 mmol/L de

*p*NPP, 50 mmol/L de tartarato de sódio, 1 mmol/L de benzoato de *p*-hidroxi-mercúrio (*p*HMB) e 100 mmol/L de tampão de acetato sódio (pH 5,8). Para ambas as enzimas, uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1 μ mol de *p*NPP por minuto a 37 °C. Nessas análises, controles livres de enzimas foram utilizados em cada ensaio para ajustar a hidrólise não enzimática de *p*NPP (STRINGHETTA-GARCIA *et al.*, 2017).

■ Marcadores bioquímicos plasmáticos do dano hepático

A atividade da alanina aminotransferase e asparato amniotransferase (ALT e AST; U/L) foi analisada com kit comercial (Bioclin, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil), usando método de UV recomendado pela IFCC (KARMEN *et al.*, 1955; HENRY *et al.*, 1960).

■ Marcadores bioquímicos plasmáticos do estresse oxidativo

A capacidade antioxidante total (CAT) foi determinada por espectrofotometria pelo ensaio de Poder Antioxidante Redutor Férrico (FRAP; Fe^{2+} μ mol/L) (BENZIE & STRAIN; 1996). Os resultados foram calculados com curva padrão construída usando diferentes concentrações de soluções de sulfato de ferro (FeSO_4). A peroxidação lipídica foi realizada pela dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs; μ mol/L) (BUEGE & AUST, 1978), e a quantidade de aldeído formada foi calculada pelo seu coeficiente de extinção ($\epsilon_{532} = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

■ Análise Estatística

Os resultados foram analisados através do *GraphPad Prism* 6.0, submetidos ao teste de normalidade *Shapiro-Wilk*, expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e

considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$. A significância foi expressa da seguinte forma: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Os dados das análises intragrupo foram divididos em paramétricos, analisados pelo teste *t* de *Student*, e em não paramétricos, analisados pelo teste de *Wilcoxon*. Já os dados das análises intergrupo foram processados pela Análise de Variância (ANOVA) *Two-Way* seguida pelo *pós-teste* de *Tukey*, e a interação foi expressa pela seguinte sigla: ∞ . A descrição estatística está representada na **Figura 11**.

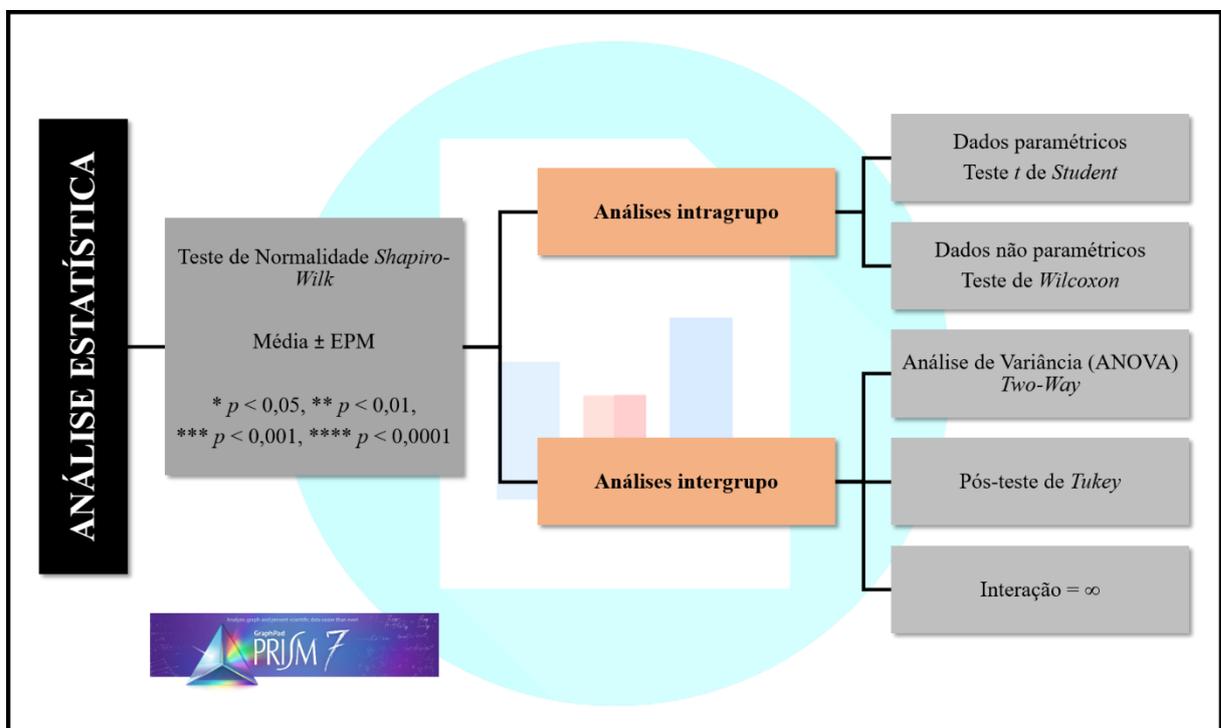


Figura 11. Representação da análise estatística dos dados intragrupo e intergrupo. Siglas: EPM = erro padrão da média; p = probabilidade de significância, utilizado como ferramenta estatística para descartar a hipótese nula – que os dois grupos estudados não sejam iguais quanto menor o seu valor, menos provável é que os valores observados tenham ocorrido ao acaso. *Fonte:* Autor.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. PARÂMETROS GERAIS

■ Ciclo estral

A análise do esfregaço vaginal das ratas Wistar evidenciou a irregularidade do ciclo estral, com citologia vaginal leucocitária caracterizando a ocorrência de diestro persistente nos animais aos 17 meses. O monitoramento do ciclo estral das ratas mostrou que os animais permaneceram em diestro/diestro II persistente por 53,67 % do período equivalente a três ciclos consecutivos (15 dias antes do início das intervenções). As demais fases do ciclo tiveram porcentagens de permanência menores, sendo proestro 11,82 %, estro 18,37 %, metaestro/diestro I 16,13 %, caracterizando período de periestro-pausa.

■ Massa corporal, uterina e ovariana

Após o período experimental, a massa corporal final foi superior ao inicial ($p = 0,0021$) no grupo Veh e houve diminuição da massa corporal no grupo Ot+Tf ($p = 0,0156$). Não houve diferença nos grupos Ot e Tf. Na massa uterina e ovariana não foram observadas diferenças estatisticamente significantes (**Tabela 6**).

Grupo	mc inicial (g)	mc final (g)	mu (g)	mo (g)
Veh	377±09,58	403±14,62**	0,92±0,07	0,25±0,01
Ot	366±06,92	367±07,00	0,72±0,04	0,26±0,02
Tf	374±08,13	336±13,65	0,97±0,05	0,27±0,01
Ot+Tf	404±11,00	362±06,35*	0,85±0,08	0,23±0,03

Tabela 6. Massa corporal (mc; g) inicial (18 meses) e final (21 meses), massa uterina (mu; g) e massa ovariana (mo; g) de ratas Wistar (21 meses) na periestro-pausa. Os grupos experimentais foram compostos por dez animais cada, os dados de mc inicial vs final foram examinados por meio do teste *t* de Student pareado (Veh e Ot+Tf) ou teste de Wilcoxon (Ot e Tf); os dados de mu e mo foram examinados por meio da Análise de Variância (ANOVA) *Two-Way* seguida pelo pós-teste de *Tukey*. Todos os valores foram apresentados como média ± erro padrão da média (EPM). Significância e comparação= * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs inicial. Grupos: Veh = administração de NaCl; Ot = administração de OT; Tf = realização de treinamento de força; Ot+Tf = administração de OT e realização de treinamento de força.

■ Evolução da carga

O teste de CCMV foi realizado nos dois grupos submetidos ao TF, grupo Tf e Ot+Tf. No grupo Tf, os animais não apresentaram diferença na massa corporal final, porém, a CCMV final foi maior que o inicial ($p < 0,0001$) e o percentual de ganho também apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$). No grupo Ot+Tf houve diminuição da massa corporal final dos animais ($p = 0,0205$), a CCMV final foi maior que o inicial ($p = 0,0005$) e o percentual de ganho também apresentou diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0005$). Esses resultados são mostrados na **Tabela 7**.

Parâmetros	Grupo Tf	Grupo Ot+Tf
mc inicial (g)	374,00±08,13	404,00±11,00
Teste CCMV inicial (g)	260,00±06,65	330,00±13,32
Teste CCMV/mc inicial (%)	69,51 ± 0,02	81,68 ± 0,03
mc final (g)	336,00±13,65	362,00±06,35*
Teste CCMV final (g)	467,00±11,37****	582,00±27,05***
Teste CCMV/mc final (%)	138,98± 0,07****	161,77± 0,09***

Tabela 7. Massa corporal inicial e final (mc; g), capacidade de carga máxima voluntária (CCMV; g) de ratos Wistar na periostropausa dos grupos Tf e Ot+Tf. A massa corporal (mc/g) e CCMV inicial foram medidos antes do procedimento experimental (aos 18 meses de idade). A massa corporal e o CCMV final foram medidos após 120 dias (aos 21 meses de idade). A porcentagem de ganho de carga (%) foi calculada pela relação $CCMV\ inicial * 100 / mc\ inicial$ e $CCMV\ final * 100 / mc\ final$. O CCMV se refere à capacidade máxima de força para realizar a escalada em escada com sobrecarga. Os grupos experimentais foram compostos por dez animais cada, e os valores apresentados como média ± erro padrão da média (EPM). Significância e comparação = * $p < 0,05$ vs. inicial; *** $p < 0,001$ vs. inicial; **** $p < 0,0001$ vs. inicial. Grupos: Tf = realização de treinamento de força; Ot+Tf = administração de OT e realização de treinamento de força.

4.2. PARÂMETROS PRIMÁRIOS

■ Ensaio mecânico

No ensaio de compressão biomecânica, a carga máxima foi maior no grupo Ot+Tf quando comparado ao grupo Veh ($p = 0,0096$) (**Figura 12 A**). Não houve diferenças na rigidez (**Figura 12 B**), no entanto, houve diferenças estatisticamente significante na elasticidade. O grupo Tf apresentou maior elasticidade quando comparado ao grupo Veh ($p < 0,0001$) e o grupo

Ot+Tf foi menor quando comparado ao Tf ($p < 0,0001$). Para este último parâmetro, houve interação para as intervenções ($p = 0,0002$) (**Figura 12 C**).

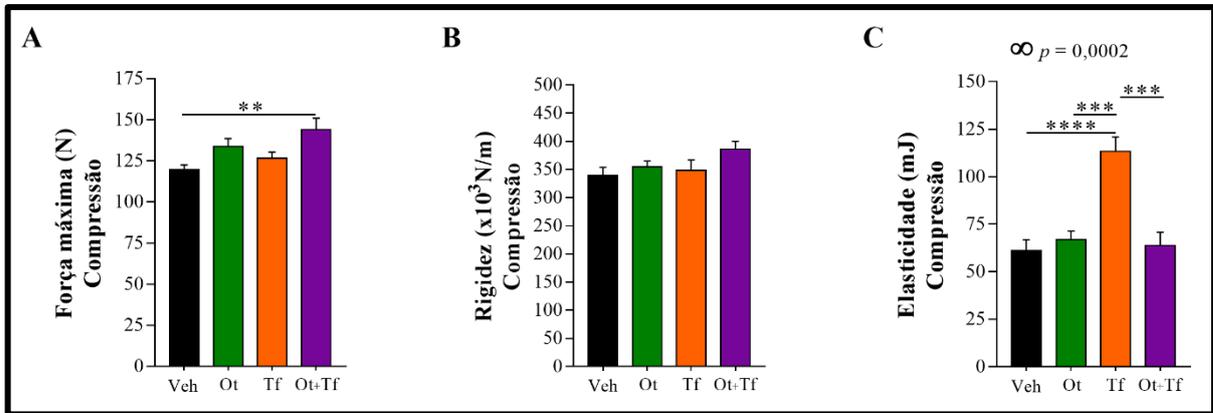


Figura 12. Ensaio mecânico. Teste de compressão do fêmur de ratas Wistar na periostropausa. (A) Força máxima (N), (B) Rigidez ($\times 10^3$ N/m) e (C) Elasticidade (mJ). Os grupos experimentais foram compostos por dez animais cada, os dados foram examinados por meio da Análise de Variância (ANOVA) *Two-Way* seguida pelo pós-teste de *Tukey*, e os valores apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Significância = ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Sigla: ∞ interação. Grupos: Veh = administração de NaCl; Ot = administração de OT; Tf = realização de treinamento de força; Ot+Tf = administração de OT e realização de treinamento de força.

Em relação ao teste biomecânico de flexão de três pontos, não houve diferenças estatisticamente significantes para a força máxima (**Figura 13 A**). Porém, no grupo Tf, maior rigidez foi observada quando comparado ao grupo Veh e Ot ($p < 0,0001$). No grupo Ot+Tf também foi maior a rigidez quando comparado aos grupos Veh e Ot ($p = 0,0417$ e $0,0050$) e menor quando comparado ao grupo Tf ($p < 0,0001$). Houve interação para as intervenções neste parâmetro ($p = 0,0004$) (**Figura 13 B**). Na análise da elasticidade, os grupos Ot e Tf foram maiores quando comparados ao grupo Veh ($p < 0,0001$ e $p = 0,0262$). O grupo Tf apresentou maior elasticidade quando comparado ao grupo Ot ($p = 0,0010$) e ao grupo Ot+Tf ($p < 0,0001$). Houve interação para as intervenções ($p < 0,0001$) (**Figura 13 C**).

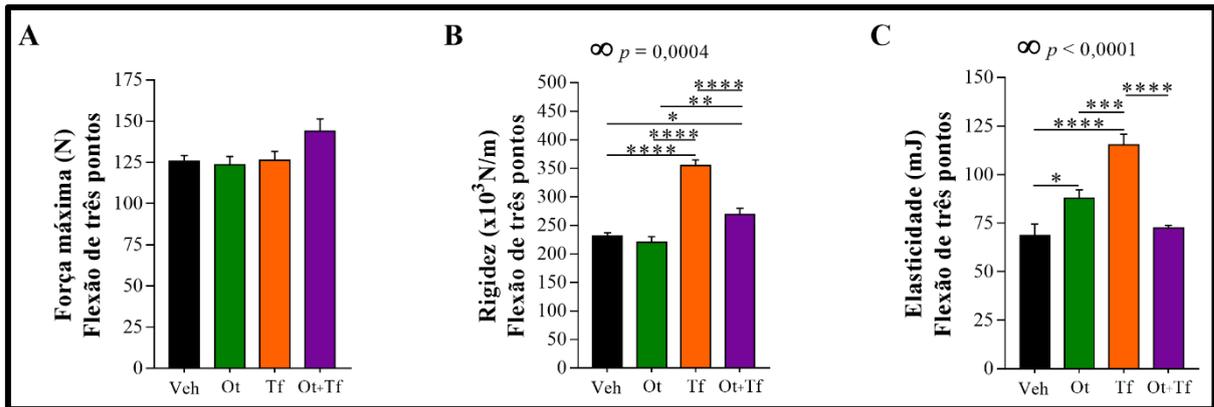


Figura 13. Ensaio mecânico. Teste de flexão de três pontos do fêmur de ratas Wistar na periostropausa. (A) Força máxima (N), (B) Rigidez ($\times 10^3 \text{N/m}$) e (C) Elasticidade (mJ). Os grupos experimentais foram compostos por dez animais cada, os dados foram examinados por meio da Análise de Variância (ANOVA) *Two-Way* seguida pelo pós-teste de *Tukey*, e os valores apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Significância = * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Sigla: ∞ interação. Grupos: Veh = administração de NaCl; Ot = administração de OT; Tf = realização de treinamento de força; Ot+Tf = administração de OT e realização de treinamento de força.

■ Densitometria óssea

Na análise do colo do fêmur foi possível observar maior DMOa no grupo Ot+Tf quando comparado ao Ot ($p = 0,0449$) (**Figura 14 A**). Na análise do fêmur total, houve maior DMO no grupo Tf quando comparado ao Veh ($p = 0,0374$), no Ot+Tf em relação aos demais grupos (todos $p < 0,0001$), e houve interação para as intervenções ($p = 0,0008$) (**Figura 14 B**).

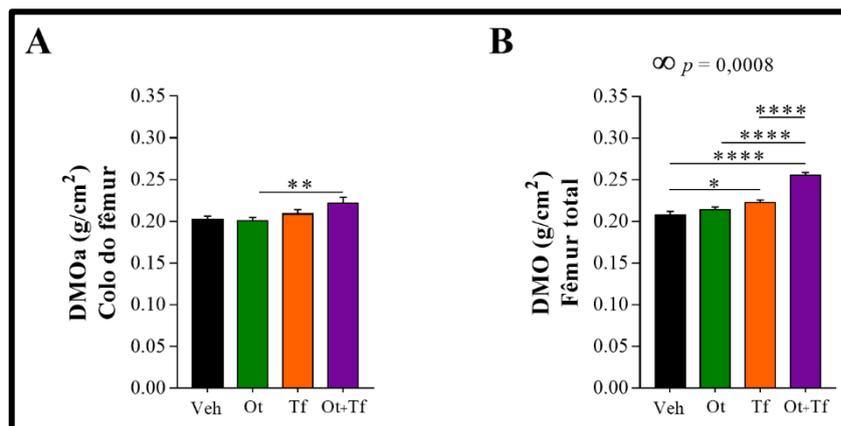


Figura 14. Densidade mineral óssea areal (DMOa) avaliada por DXA de ratas Wistar na periostropausa. (A) DMOa do colo do fêmur (g/cm^2) e (B) DMO do fêmur total (g/cm^2). Os grupos experimentais foram compostos por dez animais cada, os dados foram examinados por meio da Análise de Variância (ANOVA) *Two-Way* seguida pelo pós-teste de *Tukey*, e os valores apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Significância = * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$. Sigla: ∞ interação. Grupos: Veh = administração de NaCl; Ot = administração de OT; Tf = realização de treinamento de força; Ot+Tf = administração de OT e realização de treinamento de força.

■ Microtomografia óssea

Na análise da microtomografia do osso cortical, não foram observadas diferenças em relação ao parâmetro área cortical (Ct.Ar) (**Figura 15 A**). Em relação à espessura cortical (Ct.Th), o grupo Ot apresentou resultado superior quando comparado ao grupo Veh ($p = 0,0037$), o Tf foi menor que o Ot ($p = 0,0071$), o grupo Ot+Tf foi maior que os grupos Veh, Ot e Tf ($p < 0,0001$, $p = 0,0484$ e $p < 0,0001$), e houve interação para as intervenções ($p = 0,0310$) (**Figura 15 B**). Quanto ao número de poros (Po.N), apenas o grupo Ot+Tf foi menor quando comparado aos grupos Veh e Ot ($p = 0,0006$ e $0,0452$) (**Figura 15 C**). Quanto ao MMI polar, foi possível observar este parâmetro maior no grupo Ot+Tf quando comparado ao Tf ($p = 0,0162$), e houve interação para as intervenções ($p = 0,0196$) (**Figura 15 D**). A reconstrução 3D da análise cortical está representada na **Figura 15 E**.

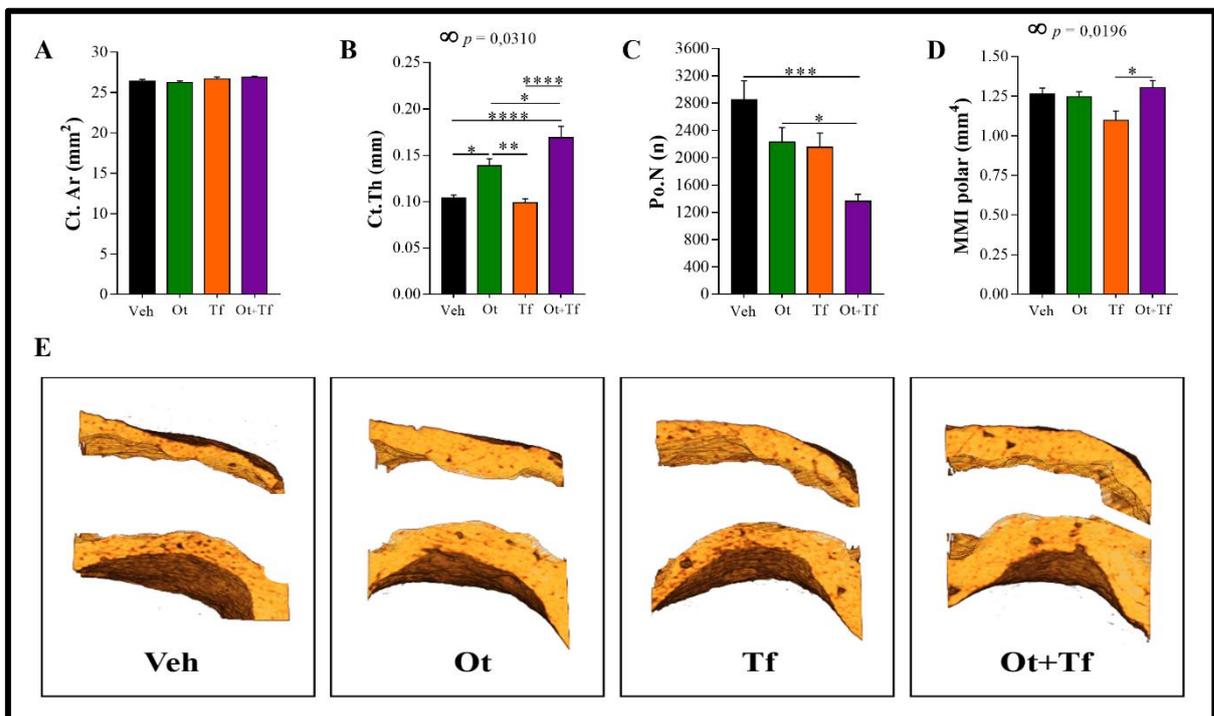


Figura 15. Microtomografia do osso cortical de ratas Wistar na peri menopausa. (A) área óssea cortical (Ct.Ar; mm²), (B) espessura cortical média (Ct.Th; mm), (C) número de poros (Po.N; n), (D) momento polar de inércia (MMI polar; mm⁴). (E) reconstrução 3D (software CTvox) com espécimes representativos da microtomografia óssea cortical. Os grupos experimentais foram compostos por dez animais cada, os dados foram examinados por meio da Análise de Variância (ANOVA) *Two-Way* seguida pelo pós-teste de *Tukey*, e os valores apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Significância = * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Sigla: ∞ interação. Grupos: Veh = administração de NaCl; Ot = administração de OT; Tf = realização de treinamento de força; Ot+Tf = administração de OT e realização de treinamento de força.

Quanto à análise do osso trabecular, no parâmetro BV/TV, apenas o grupo Ot+Tf foi maior que o grupo Veh ($p = 0,0117$) (**Figura 16 A**). Na análise de Tb.Th, o grupo Ot+Tf foi maior que todos os outros grupos ($p = 0,0002$, $0,0095$ e $0,0002$), e houve interação para esse parâmetro ($p = 0,0247$) (**Figura 16 B**). Os parâmetros Tb.N, Tb.Sp e Conn.Dn. não apresentou diferenças (**Figura 16 C, D, E**). A reconstrução 3D da análise trabecular está representada na **Figura 16 F**.

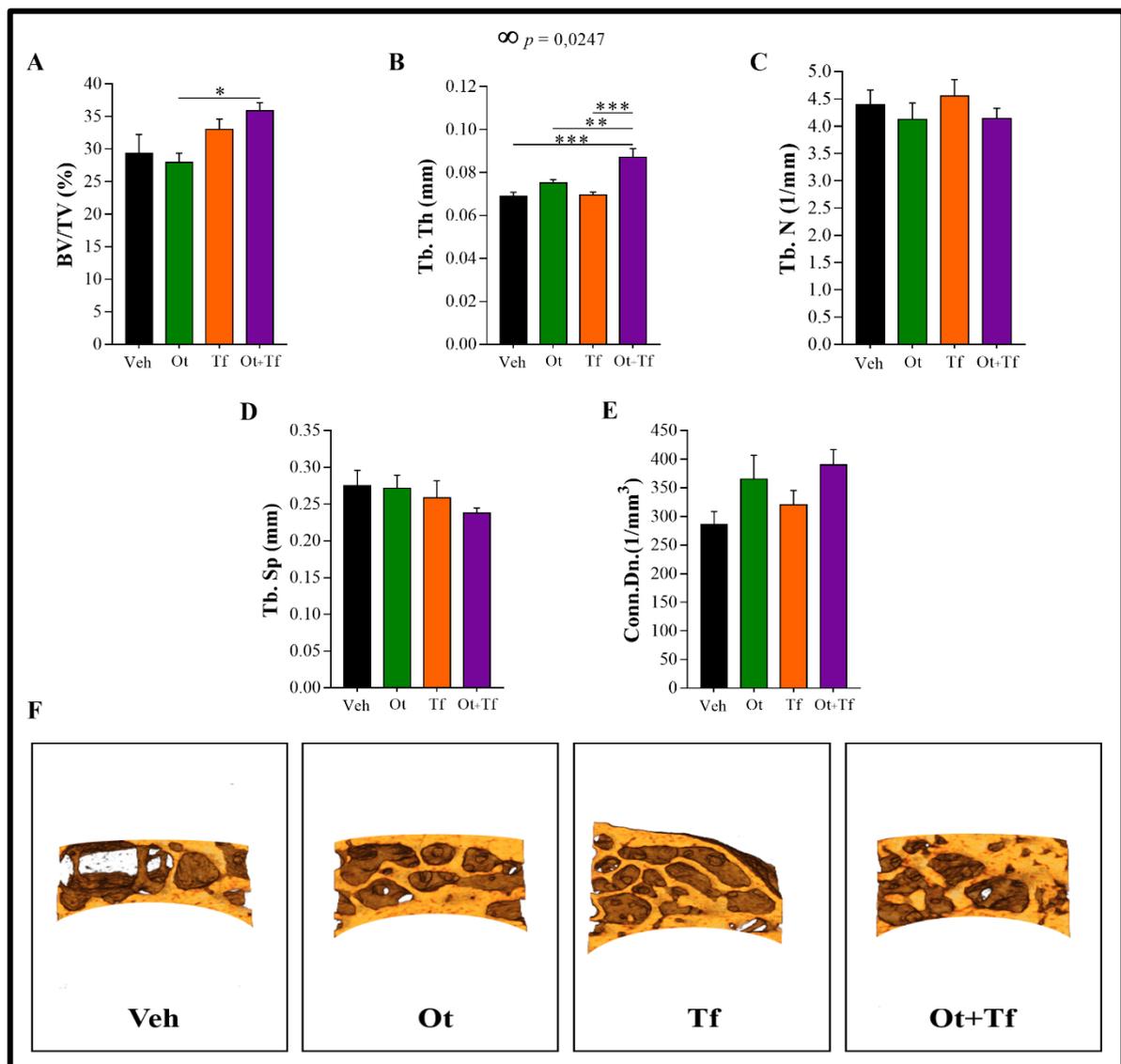


Figura 16. Microtomografia do osso trabecular de ratas Wistar na periostropausa. (A) porcentagem do volume ósseo (BV/TV; %), (B) espessura das trabéculas (Tb.Th; mm), (C) número de trabéculas (Tb.N; 1/mm), (D) separação das trabéculas (Tb.Sp; mm), (E) conectividade das trabéculas (Con.Dn; 1/mm³). (F) reconstrução 3D (software CTVox) com espécimes representativos da microtomografia óssea trabecular. Os grupos experimentais foram compostos por dez animais cada, os dados foram examinados por meio da Análise de Variância (ANOVA) *Two-Way* seguida pelo pós-teste de *Tukey*, e os valores apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Significância = ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Sigla: ∞ interação. Grupos: Veh = administração de NaCl; Ot = administração de OT; Tf = realização de treinamento de força; Ot+Tf = administração de OT e realização de treinamento de força.

■ Espectroscopia de Raman

Na análise de espectroscopia de Raman foi observado maior taxa de mineralização no grupo Tf quando comparado aos grupos Veh e Ot ($p = 0,0012$ e $0,0223$), e houve interação para este parâmetro ($p = 0,0144$) (**Figura 17 A**). Não houveram diferenças estatisticamente significantes para a substituição do carbonato tipo β e cristalinidade (**Figura 17 B, C**).

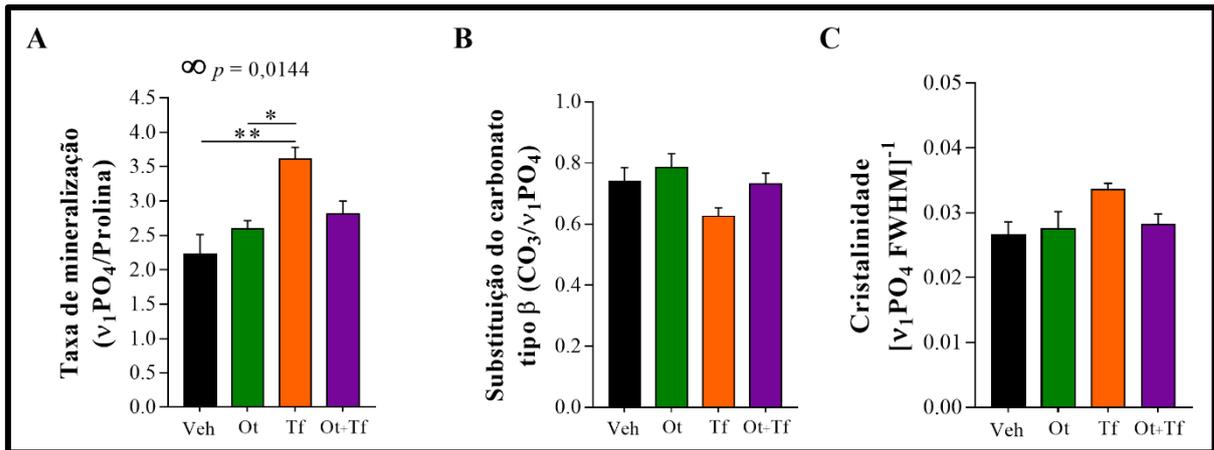


Figura 17. Espectroscopia de Raman do fêmur de ratas Wistar na periostropausa. (A) Taxa de mineralização (v₁PO₄/Prolina), (B) Substituição do carbonato tipo β (CO₃/v₁PO₄) e (C) Cristalinidade (1/largura de v₁PO₄). Os grupos experimentais foram compostos por dez animais cada, os dados foram examinados por meio da Análise de Variância (ANOVA) *Two-Way* seguida pelo pós-teste de *Tukey*, e os valores apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Significância = * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Sigla: ∞ interação. Grupos: Veh = administração de NaCl; Ot = administração de OT; Tf = realização de treinamento de força; Ot+Tf = administração de OT e realização de treinamento de força.

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

Na análise da expressão de genes relacionados ao processo de transcrição, observou-se maior expressão de *Runx2* nos grupos Ot, Tf e Ot+Tf quando comparados ao grupo Veh ($p = 0,0074$, $0,0011$ e $0,0156$), com interação para as intervenções em relação a este gene ($p = 0,0035$) (**Figura 18 A**). E, quanto a análise *Osx/Sp7*, houve maior expressão nos grupos Ot e Tf quando comparados ao grupo Veh ($p = 0,0259$ e $0,0026$), e menor expressão no grupo Ot+Tf quando comparado aos grupos Ot e Tf ($p = 0,0141$ e $0,0013$), com interação para as intervenções em relação a este o gene ($p < 0,0001$) (**Figura 18 B**). A ação destes fatores de transcrição está representada na **Figura 18 C**.

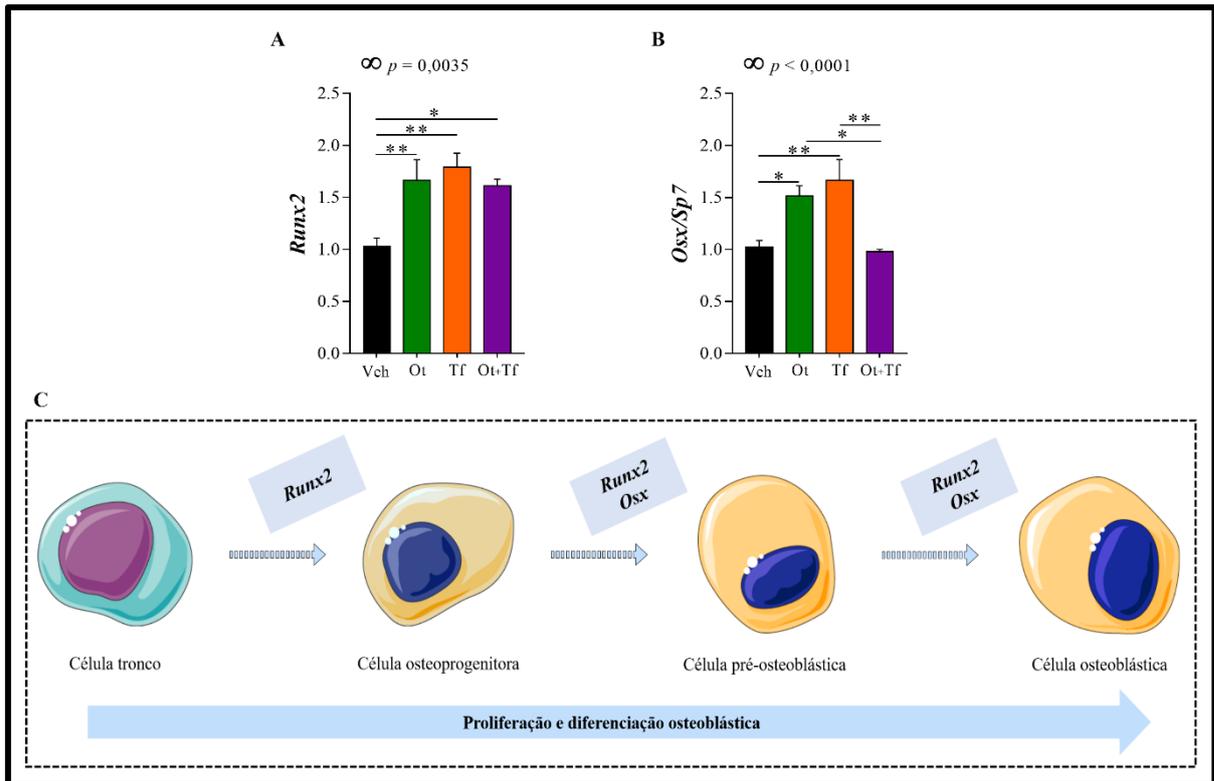


Figura 18. Expressão gênica. Fatores de transcrição: (A) *Runx2*, (B) *Osx/Sp7*. (C) Esquema da ação dos fatores de transcrição óssea. Os grupos experimentais foram compostos por dez animais cada, os dados foram examinados por meio da Análise de Variância (ANOVA) *Two-Way* seguida pelo pós-teste de *Tukey*, e os valores apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Significância = * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Sigla: ∞ interação. Grupos: Veh = administração de NaCl; Ot = administração de OT; Tf = realização de treinamento de força; Ot+Tf = administração de OT e realização de treinamento de força.

Quanto aos genes de formação óssea, foi observada menor expressão de *Bmp2* em todos os grupos (Ot, Tf e Ot+Tf) quando comparados ao grupo Veh ($p = 0,0024$, $p < 0,0001$ e $p = 0,0030$), com interação para este parâmetro ($p < 0,0001$) (**Figura 19 A**). Houve maior expressão de *Fal* no grupo Tf em relação ao grupo Ot ($p = 0,0482$), maior expressão no grupo Ot+Tf quando comparado aos grupos Veh, Ot e Tf ($p < 0,0001$, $p < 0,0001$ e $p = 0,0002$), e houve interação para as intervenções ($p = 0,0010$) (**Figura 19 B**). A expressão de *Opn/Spp1* não mostrou diferença estatística (**Figura 19 C**). Já a expressão de *Ocn/Bglap* foi menor no grupo Tf quando comparado ao grupo Veh ($p = 0,0205$) (**Figura 19 D**). A ação destes marcadores de formação óssea está representada na **Figura 19 E**.

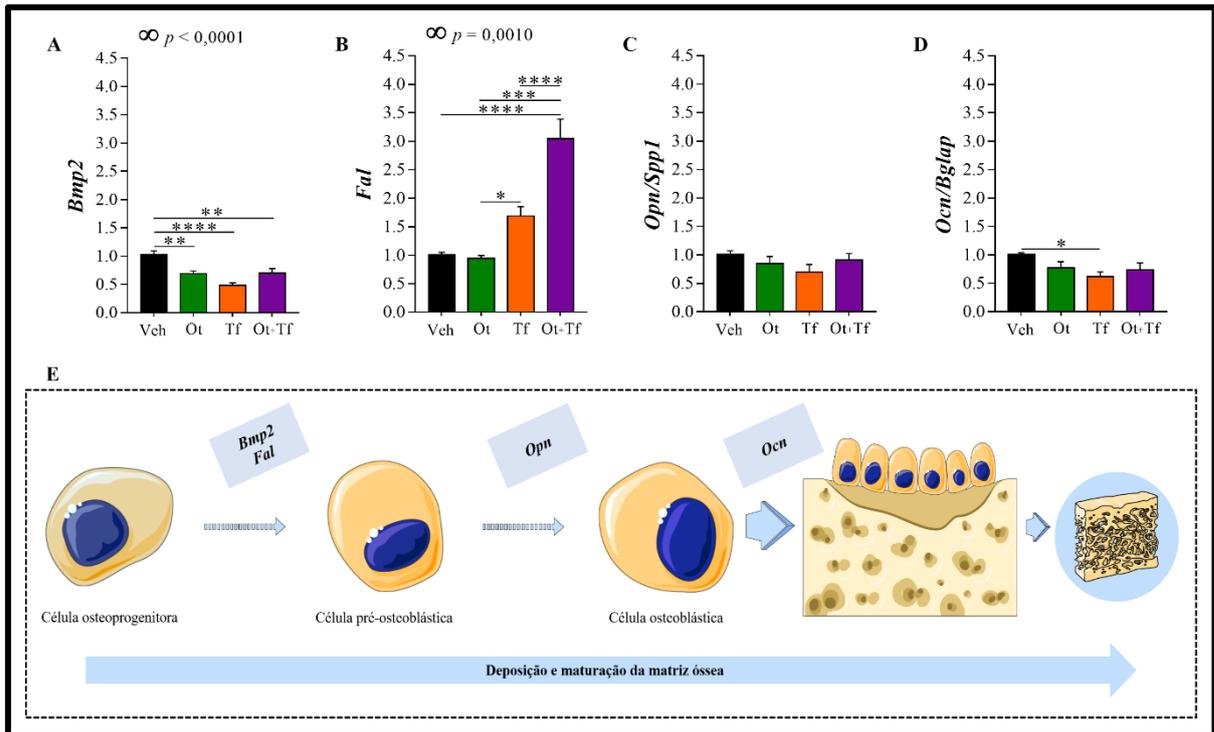


Figura 19. Expressão gênica. Marcadores de formação óssea: (A) *Bmp2*, (B) *Fal*, (C) *Opn/Spp1*, (D) *Ocn/Bglap*. (E) Esquema da ação dos marcadores de formação óssea. Os grupos experimentais foram compostos por dez animais cada, os dados foram examinados por meio da Análise de Variância (ANOVA) *Two-Way* seguida pelo pós-teste de *Tukey*, e os valores apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Significância = * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Sigla: ∞ interação. Grupos: Veh = administração de NaCl; Ot = administração de OT; Tf = realização de treinamento de força; Ot+Tf = administração de OT e realização de treinamento de força.

Em relação aos genes de remodelação óssea, houve maior expressão de *Opg* no grupo Ot+Tf quando comparado ao grupo Veh, Ot e Tf (todos $p < 0,0001$). Houve interação para intervenções neste parâmetro ($p < 0,0001$) (**Figura 20 A**). A análise de *Rank* mostrou que a expressão desse gene foi maior no grupo Tf quando comparado ao grupo Veh e Ot ($p = 0,0168$ e $0,0108$) e maior expressão no grupo Ot+Tf quando comparado aos grupos Veh e Ot ($p = 0,0404$ e $0,0269$) (**Figura 20 B**). Houve maior expressão de *Rankl* no grupo Ot+Tf quando comparado ao grupo Veh, Ot e Tf ($p < 0,0001$, $p = 0,0004$ e $0,0004$). Houve interação para intervenções neste parâmetro ($p = 0,0086$) (**Figura 20 C**). Na análise do *Trap/Acp5* não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes, porém, houve interação para este gene ($p = 0,0081$) (**Figura 20 D**). Por fim, na análise *Ctsk*, houve maior expressão desse gene no grupo Tf quando comparado ao grupo Veh e ao Ot ($p < 0,0001$ e $p = 0,0100$), e também maior

expressão no grupo Ot+Tf quando comparado aos grupos Veh e Ot (ambos $p < 0,0001$) (Figura 20 E). A ação destes marcadores de formação e remodelação óssea está representada na Figura 20 F.

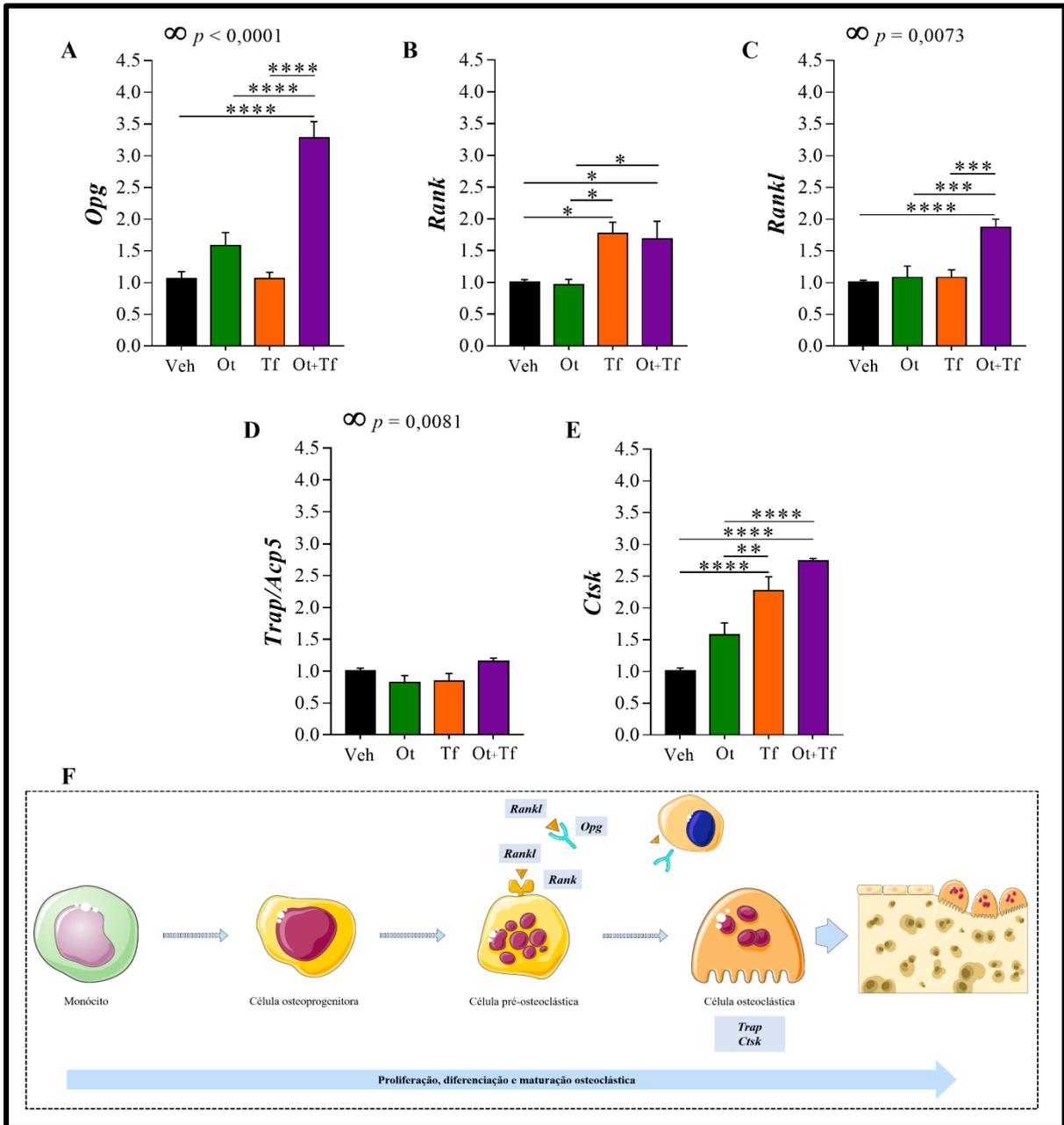


Figura 20. Expressão gênica. Marcadores de remodelação óssea: (A) *Opg*, (B) *Rank*, (C) *Rankl*, (D) *Trap/Acp5*, (E) *Ctsk*. (F) Esquema da ação dos marcadores de formação e remodelação óssea. Os grupos experimentais foram compostos por dez animais cada, os dados foram examinados por meio da Análise de Variância (ANOVA) *Two-Way* seguida pelo pós-teste de *Tukey*, e os valores apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Significância = * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Sigla: ∞ interação. Grupos: Veh = administração de NaCl; Ot = administração de OT; Tf = realização de treinamento de força; Ot+Tf = administração de OT e realização de treinamento de força.

4.3. PARÂMETROS SECUNDÁRIOS

■ Marcadores bioquímicos plasmáticos do metabolismo ósseo

Quanto aos marcadores do metabolismo ósseo, houve menor atividade da TRAP (U/L) no Ot+Tf comparado aos grupos Veh, Ot e Tf ($p = 0,0002$, $0,0064$ e $0,0032$) (**Figura 21 A**), e menor atividade da FAL no Ot+Tf comparado ao Veh ($p = 0,0431$) (**Figura 21 B**).

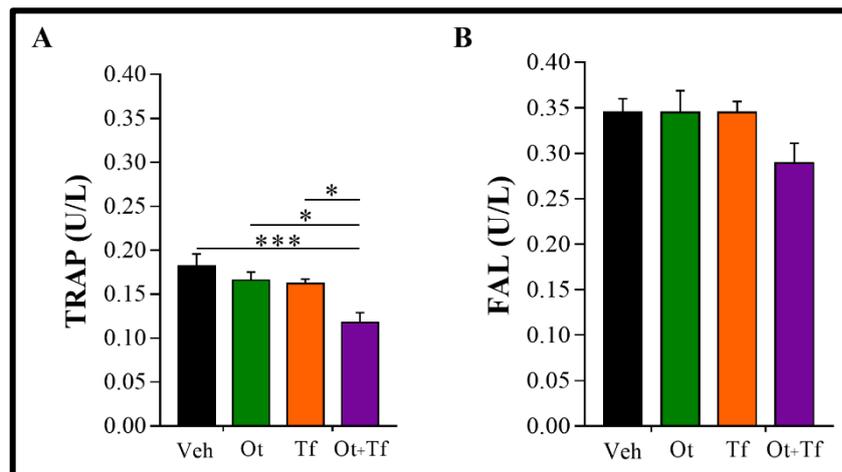


Figura 21. Marcadores bioquímicos plasmáticos do metabolismo ósseo de ratas Wistar na periostropausa. (A) TRAP (U/L) e (B) FAL (U/L). Os grupos experimentais foram compostos por dez animais cada, os dados foram examinados por meio da Análise de Variância (ANOVA) *Two-Way* seguida pelo pós-teste de *Tukey*, e os valores apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Significância = * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. Grupos: Veh = administração de NaCl; Ot = administração de OT; Tf = realização de treinamento de força; Ot+Tf = administração de OT e realização de treinamento de força.

■ Marcadores bioquímicos plasmáticos do dano hepático

Para verificar se as intervenções alterariam a função hepática, dois marcadores de lesão hepática foram analisados. Na análise da AST (U/L) (**Figura 22 A**) foi possível perceber que houve menor atividade dessa enzima no grupo que realizou Tf quando comparado ao grupo Veh ($p = 0,0073$), e houve interação para as intervenções para este parâmetro ($p = 0,0018$). Em ALT (U/L), no entanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas (**Figura 22 B**).

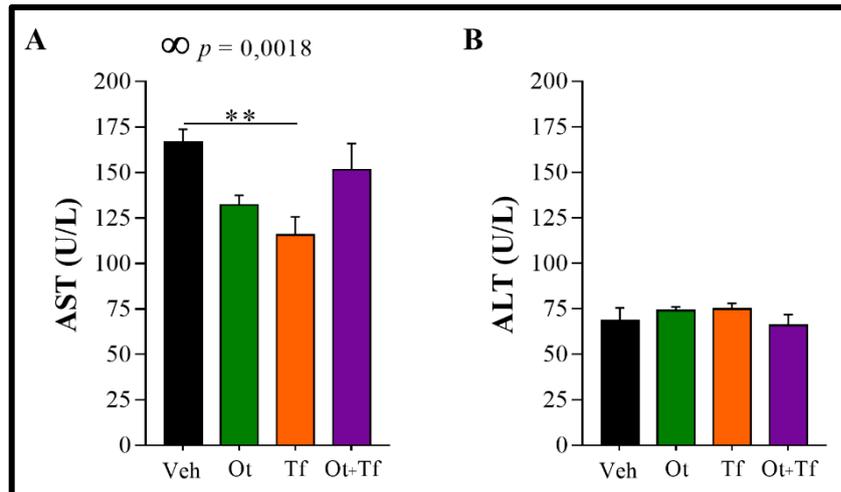


Figura 22. Marcadores bioquímicos plasmáticos do dano hepático de ratos Wistar na periostropausa. (A) AST (U/L) e (B) ALT (U/L). Os grupos experimentais foram compostos por dez animais cada, os dados foram examinados por meio da Análise de Variância (ANOVA) *Two-Way* seguida pelo pós-teste de *Tukey*, e os valores apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Significância = ** $p < 0,01$. Sigla: ∞ interação. Grupos: Veh = administração de NaCl; Ot = administração de OT; Tf = realização de treinamento de força; Ot+Tf = administração de OT e realização de treinamento de força.

■ Marcadores bioquímicos plasmáticos do estresse oxidativo

Foi observado menor Capacidade Antioxidante Total (CAT) no Ot+Tf comparada ao Veh, Ot e Tf ($p = 0,0385, 0,0214$ e $0,0190$), com interação ($p = 0,0242$) (Figura 23 A). Quanto a peroxidação lipídica, não houveram diferenças (Figura 23 B).

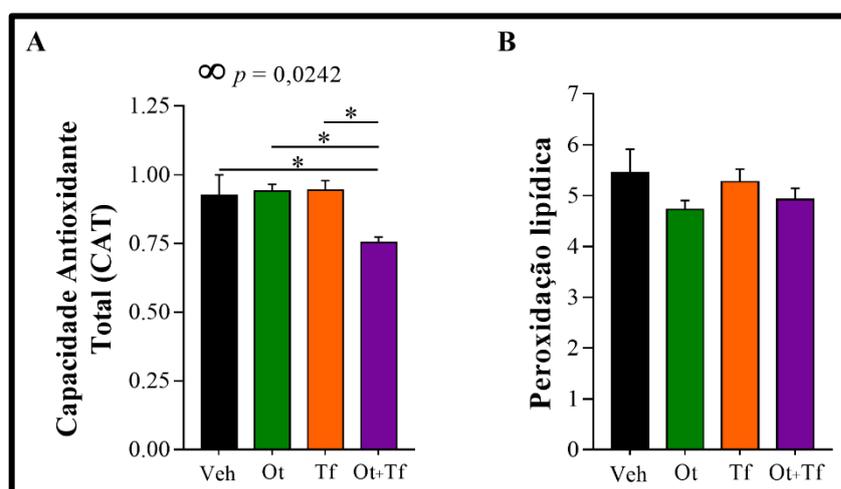


Figura 23. Marcadores bioquímicos plasmáticos do estresse oxidativo de ratos Wistar na periostropausa. (A) Capacidade Antioxidante Total (CAT) pelo método do Poder Antioxidante Redutor Férrico (FRAP; Fe^{2+} $\mu\text{mol/L}$) e (B) peroxidação lipídica pela dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs; $\mu\text{mol/L}$). Os grupos experimentais foram compostos por dez animais cada, os dados foram examinados por meio da Análise de Variância (ANOVA) *Two-Way* seguida pelo pós-teste de *Tukey*, e os valores apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Significância = * $p < 0,05$. Sigla: ∞ interação. Grupos: Veh = administração de NaCl; Ot = administração de OT; Tf = realização de treinamento de força; Ot+Tf = administração de OT e realização de treinamento de força.

4.4. SÍNTESE DOS PRINCIPAIS RESULTADOS

■ Grupo Ot+Tf

A **Figura 24** ilustra os principais resultados encontrados nas análises ósseas, gênicas e sanguíneas do grupo associação (Ot+Tf).

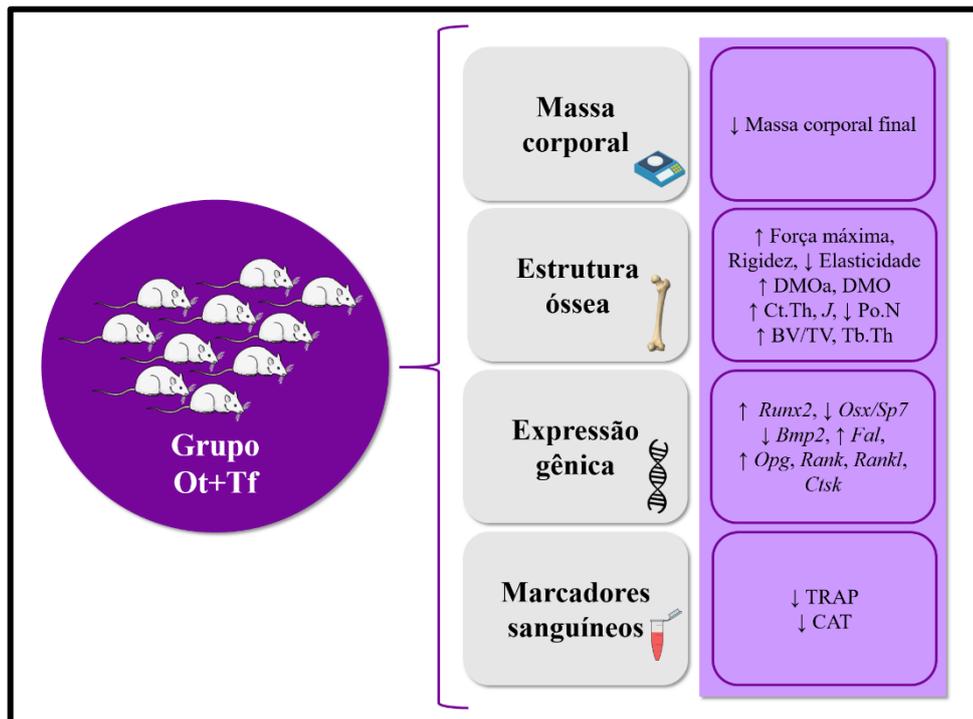


Figura 24. Síntese dos principais resultados de massa corporal, das análises da estrutura óssea (ensaio mecânico, densitometria óssea e microtomografia óssea), expressão gênica (fatores de transcrição, marcadores de formação e remodelação óssea) e marcadores sanguíneos (metabolismo ósseo e estresse oxidativo) das ratas Wistar na periostropausa do grupo associação. Ot+Tf = administração de OT e realização de treinamento de força (n = 10 animais). *Fonte:* Autor.

■ Grupos experimentais

A **Figura 25** ilustra os principais resultados encontrados nas análises ósseas, gênicas e sanguíneas de todos os grupos experimentais deste estudo.

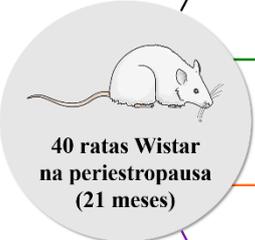
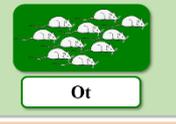
	GRUPOS	Massa corporal	Estrutura óssea	Expressão gênica	Marcadores sanguíneos
 <p>40 ratas Wistar na perimenopausa (21 meses)</p>	 Veh	↑ Massa corporal final	Grupo controle	Grupo controle	Grupo controle
	 Ot	Sem alterações	↑ Elasticidade ↑ Ct.Th	↑ <i>Runx2, Osx/Sp7</i> ↓ <i>Bmp2</i>	Sem alterações
	 Tf	Sem alterações	↑ Elasticidade ↑ Rigidez ↑ DMO ↑ v _i PO ₄ /Prolina	↑ <i>Runx2, Osx/Sp7</i> ↓ <i>Bmp2, ↑ Fal,</i> ↓ <i>Ocn/Bglap</i> ↑ <i>Rank, Ctsk</i>	↓ AST
	 Ot+Tf	↓ Massa corporal final	↑ Força máxima, Rigidez, ↓ Elasticidade ↑ DMOa, DMO ↑ Ct.Th, J, ↓ Po.N ↑ BV/TV, Tb.Th	↑ <i>Runx2, ↓ Osx/Sp7</i> ↓ <i>Bmp2, ↑ Fal</i> ↑ <i>Opg, Rank, Rankl,</i> <i>Ctsk</i>	↓ TRAP ↓ CAT

Figura 25. Síntese dos principais resultados de massa corporal, das análises da estrutura óssea (ensaio mecânico, densitometria óssea, microtomografia óssea e espectroscopia de Raman), expressão gênica (fatores de transcrição, marcadores de formação óssea e marcadores de remodelação óssea) e marcadores sanguíneos (marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo, dano hepático e estresse oxidativo) de 40 ratas Wistar na perimenopausa submetidas a diferentes intervenções de acordo com as distribuições nos grupos Veh, Ot, Tf e Ot+Tf. Grupos: Veh = administração de NaCl; Ot = administração de OT; Tf = realização de treinamento de força; Ot+Tf = administração de OT e realização de treinamento de força (n = 10 animais por grupo experimental). *Fonte:* Autor.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Este estudo verificou se a associação da OT ao TF, em comparação às intervenções isoladas, potencializa os benefícios sobre o remodelamento ósseo do fêmur de ratas Wistar na periostropausa. A principal novidade deste estudo é que a adição da ocitocina ao treino de força muscular destacou efeitos das intervenções isoladas preservando aspectos mecânicos e estruturais do osso, bem como estimulando fatores gênicos relacionados com proliferação, diferenciação e maturação osteoclástica.

Em geral, no grupo associação, além de ter havido aumento progressivo na CCMV e na porcentagem de ganho, a massa corporal dos animais foi menor. Houve maior força máxima no ensaio de compressão e maior rigidez no ensaio de flexão de três pontos, maior espessura e resistência cortical, bem como menor número de poros nesta região. A DMOa do colo do fêmur e DMO do fêmur total também foram maiores. No tecido trabecular, o grupo apresentou maior volume ósseo e espessura das trabéculas. Quanto aos genes ósseos, a associação OT+TF parece modular a atividade óssea pelas diferentes respostas em relação a expressão de genes de fatores de transcrição, de formação e remodelação óssea – com maior expressão de *Runx2*, *Fal*, *Rank*, *Rankl*, *Opg* e *Ctsk*. E em relação a análises sistêmicas, foi observado menor atividade da TRAP e CAT.

Quanto às intervenções isoladas, a administração da OT melhorou a elasticidade no ensaio de flexão de três pontos, a espessura cortical, e a expressão de genes relacionados ao metabolismo ósseo, como *Runx2* e *Osx/Sp7*. A realização do TF, embora tenha aumentado progressivamente a CCMV e a porcentagem de ganho, não alterou a massa corporal dos animais. A elasticidade no ensaio de compressão, e a rigidez e a elasticidade no ensaio de flexão de três pontos foram maiores, assim como DMO do fêmur total e a taxa de mineralização. Além disto, a expressão de genes relacionados ao metabolismo ósseo, como *Runx2*, *Osx/Sp7*, *Fal*,

Rank e *Ctsk*, também foram maiores. Quanto a atividade da AST, enzima relacionada ao dano hepático, esta foi menor.

É descrito que os mecanismos envolvidos com a senescência óssea são muito complexos e estão relacionados a fatores sistêmicos e locais (BOSKEY & COLEMAN, 2010). As modificações locais que o tecido ósseo apresenta em organismos mais velhos estão ligadas a diminuição da DMO total, trabecular e cortical, que é mais acentuada no organismo feminino (RUSSO *et al.*, 2003). Desta forma, analisar a resposta óssea nos animais do presente estudo em relação a estes parâmetros é de grande importância.

No que diz respeito a associação OT+TF, destaca-se as respostas em relação ao osso cortical – maior espessura, menor porosidade e maior resistência – uma vez que a literatura demonstra que, em mulheres com mais de 60 anos, a área desta região óssea é menor em aproximadamente 1% ao ano comparada ao organismo masculino (RUSSO *et al.*, 2003). O osso cortical possui grande relação com a determinação da resistência óssea, já que é mais rígido, suporta maior estresse e seu desequilíbrio está associado à porosidade cortical e perda de força (BALA *et al.*, 2015). As modificações relacionadas ao osso trabecular como o aumento do volume ósseo e espessura trabecular encontradas neste estudo, também são de importante destaque, já que a natureza porosa do tecido trabecular fornece maior elasticidade e maior resistência a deformação (HART *et al.*, 2017). Respostas do osso cortical e trabecular descritas podem estar relacionadas a maior DMOa encontrada no colo do fêmur e no fêmur total, bem como na maior força máxima encontrada no ensaio de compressão, uma vez que a DMO está intimamente ligada à mineralização e porosidade óssea que exemplificam o desempenho cortical e trabecular sob cargas mecânicas (HART *et al.*, 2017). Embora as intervenções isoladas de OT e TF expressem melhora como já demonstrado anteriormente (FERNANDES *et al.*, 2020; STRINGHETTA-GARCIA *et al.*, 2017; PERES-UENO *et al.*, 2020), as respostas neste estudo foram discretas quando comparadas a associação OT+TF.

Sabe-se também que as modificações no tecido ósseo que levam à osteoporose estão relacionadas a alterações que ocorrem nos níveis celulares, como alterações da atividade e diferenciação das células ósseas (KLANJC *et al.*, 2017; CORRADO *et al.*, 2020). Por isso, parte das investigações deste estudo foi direcionada para a análise da expressão de genes relacionados ao metabolismo ósseo e, mais uma vez, foi observada resposta mais proeminente na associação OT+TF, com maior expressão de *Runx2*, e menor expressão de *Osx/Sp7*, que são fatores de transcrição ósseos; modificação na expressão de marcadores de formação óssea – maior expressão de *Fal* e menor de *Bmp2*, bem como maior expressão nos marcadores de remodelação óssea – *Rank*, *Rankl*, *Opg* e *Ctsk*.

Na associação OT+TF as respostas foram intrigantes quanto à *Bmp2*. Sabe-se que as proteínas BMPs estão envolvidas no processo de anabolismo ósseo (ROSEN, 2009), tanto que em estudo realizado em camundongos nulos para *Bmp2* e *Bmp6*, a remoção combinada desses dois genes resultou na diminuição da formação óssea e do volume trabecular, porém, na remoção isolada não houve alteração do tecido ósseo (KUGIMIYA *et al.*, 2005). Este dado é importante, pois demonstra a possibilidade da ação compensatória das BMPs no presente estudo, uma vez que os animais apresentaram melhor DMOa do colo do fêmur e do fêmur total, melhor qualidade do osso cortical e trabecular, bem como melhor resposta biomecânica. Outra resposta interessante é o aumento da expressão de *Rank* e *Rankl*, pois há regulação da formação, ativação e sobrevivência das células osteoclásticas na sinalização de *Rank/Rankl*, e o aumento da expressão de *Ctsk* indica que há atividade reabsortiva dessas células (DAI *et al.*, 2020). Porém, a sinalização do *Opg* indica proteção do tecido ósseo da reabsorção excessiva que pode ocorrer pela ligação do *Rankl* ao *Rank* e, diante dos resultados encontrados em relação à qualidade óssea, podemos destacar o efeito protetor e de equilíbrio exercido pelo *Opg* no tecido ósseo (BOYCE & XING, 2008). Além disso, um estudo mostrou a importante ação do *Ctsk* na modulação da formação óssea, descrevendo-o como importante agente da homeostase óssea

(BONNET *et al.*, 2017). Portanto, a maior expressão de genes relacionados ao metabolismo ósseo está associada aos resultados reproduzidos em relação a qualidade óssea dos parâmetros da densitometria, microtomografia óssea e teste mecânico, que podem predizer que associação OT+TF potencializou as alterações ocorridas no tecido.

Quanto ao que ocorreu nas intervenções isoladas de OT e TF, a maior expressão de *Runx2* está relacionado ao comprometimento da linhagem de células-tronco mesenquimais com a formação óssea, destacando a influência da OT na osteoblastogênese (KOMORI, 2019), e a diminuição de *Bmp2* também se destaca pela possibilidade da ação compensatória, sendo comprovada pelas respostas ósseas positivas encontradas nestes grupos. No TF, associado a maior expressão de *Runx2* e *Osx*, destaca-se a maior expressão de *Fal*. Estudo mostra que um dos genes-alvo para o fator de transcrição *Runx2* é o *Fal* em osteoblastos imaturos, por ser importante preditor de mineralização óssea (JAVED *et al.*, 2010). A menor expressão gênica de *Ocn/Bglap* é também resultado muito interessante, pois, embora existam estudos que elucidem a ação dessa proteína na mineralização óssea por sua ligação ao cálcio e a consequente atração de cristais de hidroxiapatita para a matriz óssea (HAUSCHKA & WIANS JR, 1989), estudos mostram que camundongos nulos para receptores de *Ocn* no osso exibiram aumento na formação e massa óssea (ZOCH *et al.*, 2016). Além disso, pesquisa recente mostra a correlação de *Ocn* plasmática elevada em mulheres na pós-menopausa com menor DMO mandibular (THANAKUN *et al.*, 2019). É descrito o envolvimento da *Ocn* com a atividade de formação óssea, porém a literatura mostra que há grande liberação de *Ocn* após a atividade de reabsorção óssea, indicando esta proteína como possível marcador de remodelação óssea, e não de formação, como descrito anteriormente (IVASKA *et al.*, 2004). Nesse sentido, vale ressaltar que o TF parece favorecer o rearranjo no ciclo de remodelação óssea desses animais, uma vez que também apresentou maior expressão de *Rank* e *Ctsk*. A maior expressão de *Ctsk* é consistente com a manutenção da remodelação óssea, visto que a atividade das células

osteoclásticas é de grande importância para a homeostase do tecido ósseo. Além disso, estudo recente mostrou que não há correlação entre o aumento da *Ctsk* sérica e a DMO (GAO *et al.*, 2020). Isso está de acordo com nosso estudo, pois mesmo com o aumento da *Ctsk*, a DMOa dos animais foi maior.

Com base na complexidade sistêmica, a atividade de algumas enzimas plasmáticas foi analisada. A atividade enzimática relacionada ao metabolismo ósseo no plasma desses animais foi analisada pelas enzimas TRAP e FAL, marcadores de reabsorção e formação óssea (NAYLOR & EASTELL, 2012). E apenas na associação OT+TF foi possível notar menor atividade da TRAP, enzima relacionada à atividade de células reabsortivas. Outro estudo publicado por nosso grupo mostrou que a OT diminuiu a atividade da TRAP no processo de reparo alveolar de ratas idosas (COLLI *et al.*, 2012) e, portanto, destacamos esse efeito aqui, repetindo-se ao longo do ciclo de remodelação.

Ao investigar a ação de um hormônio e também de uma modalidade de exercício físico, ambas relacionadas à modificação da atividade hepática, foi realizada a análise de AST e ALT, que são marcadores de lesão hepatocelular (MAEJIMA *et al.*, 2011; AHMED *et al.*, 2018; KIM & HU, 2020). Em nenhuma das intervenções, mesmo quando associadas, houve aumento dessas enzimas, apenas o TF diminuiu a atividade da AST. Esse achado corrobora com estudo em que o exercício regular está associado à diminuição das enzimas hepáticas em indivíduos com doença hepática (BAE *et al.*, 2012).

Por fim, e no intuito de continuar investigando possíveis danos ao organismo destes animais, foi analisado o balanço redox pela análise da defesa antioxidante – capacidade antioxidante total (CAT), e dos produtos do dano oxidativo aos lipídios – degradação lipídica (GYURÁSZOVÁ *et al.*, 2018). Houve menor CAT na associação OT+TF, porém, devido aos resultados benéficos observados no tecido ósseo desses animais no que diz respeito a qualidade óssea, este achado não estaria associado a nenhum resultado negativo. Ao contrário, pode estar

associado a ação da OT e do TF sobre o tecido adiposo, uma vez que, em ratas velhas, foi observado maior expressão de fator de transcrição relacionado a adipogênese e, em ratas velhas que realizaram TF, houve diminuição na expressão deste fator (SINGULANI *et al.*, 2017). Quanto a OT, estudos evidenciam sua ação na regulação da adipogênese e da massa corporal (BLEVINS & HO, 2013; COLAIANI *et al.*, 2015). Além do mais, a OT tem ação anti-inflamatória no tecido adiposo (SZETO *et al.*, 2020). A combinação destes eventos, portanto, pode estar associada a ambiente com menor estresse oxidativo e, conseqüentemente, menor necessidade de ativação no sistema de CAT.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Apesar de haver respostas positivas quanto a administração isolada das intervenções – OT e TF, a associação da ocitocina ao treinamento de força – OT+TF – parece se destacar dos efeitos das intervenções isoladas ao preservar aspectos mecânicos e estruturais do osso, bem como ao estimular fatores gênicos relacionados a proliferação, diferenciação e maturação osteoclástica. Além disso, a associação das intervenções parece controlar fatores relacionados ao *cross-talk* entre tecido ósseo e tecido adiposo a favor da homeostase oxidativa e de fatores relacionados a atividade de marcadores ósseos.

Sendo assim, é possível concluir que a combinação de intervenções é estratégia anabólica promissora para a prevenção da osteoporose no período da perimenopausa, destacando-se dos efeitos de tratamentos isolados. Destacamos, ainda, a importância deste estudo para o direcionamento de pesquisas clínicas, uma vez que esta possa ser opção válida para a prevenção de alterações ósseas relacionadas ao período de transição para o envelhecimento feminino que podem resultar em osteoporose.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

- AHMED, Z. et al. Liver function tests in identifying patients with liver disease. *Clinical and Experimental Gastroenterology*, v. 11, p. 301, 2018.
- BAE, J. C. et al. Regular exercise is associated with a reduction in the risk of NAFLD and decreased liver enzymes in individuals with NAFLD independent of obesity in Korean adults. *PloS One*, 2012.
- BALA, Y.; ZEBAZE, R.; SEEMAN, E. Role of cortical bone in bone fragility. *Current Opinion in Rheumatology*, v. 27, n. 4, p. 406-413, 2015.
- BAYLISS, L.; MAHONEY, David J.; MONK, Paul. Normal bone physiology, remodelling and its hormonal regulation. *Surgery (Oxford)*, v. 30, n. 2, p. 47-53, 2012.
- BENZIE, F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Analytical Biochem*, v. 239, p. 7076, 1996.
- BLEVINS, J. E.; HO, Jacqueline M. Role of oxytocin signaling in the regulation of body weight. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, v. 14, n. 4, p. 311-329, 2013.
- BONNET, N. et al. Cathepsin K controls cortical bone formation by degrading periostin. *Journal of Bone and Mineral Research*, v. 32, n. 7, p. 1432-1441, 2017.
- BOSKEY, A. L.; COLEMAN, R. Aging and bone. *Journal of Dental Research*, v. 89, n. 12, p. 1333-1348, 2010.
- BOUXSEIN, M. L. et al. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *Journal of Bone and Mineral Research*, v. 25, n. 7, p. 1468-1486, 2010.
- BOYCE, B. F.; XING, L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 473, n. 2, p. 139-146, 2008.
- BRINTON, R. D. et al. Perimenopause as a neurological transition state. *Nature reviews endocrinology*, v. 11, n. 7, p. 393-405, 2015.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. Packer leds methods in enzymology, *Fleischer S.* 1978.

- COLAIANNI, G. et al. Oxytocin and bone. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 307, n. 8, p. R970-R977, 2014a.
- COLAIANNI, G. et al. Regulated production of the pituitary hormone oxytocin from murine and human osteoblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 411, n. 3, p. 512-515, 2011.
- COLAIANNI, G. et al. The “love hormone” oxytocin regulates the loss and gain of the fat–bone relationship. *Frontiers in Endocrinology*, v. 6, p. 79, 2015.
- COLAIANNI, G. et al. The oxytocin–bone axis. *Journal of Neuroendocrinology*, v. 26, n. 2, p. 53-57, 2014b.
- COLLI, V. C. et al. Oxytocin promotes bone formation during the alveolar healing process in old acyclic female rats. *Archives of Oral Biology*, v. 57, n. 9, p. 1290-1297, 2012.
- COLUCCI, S. et al. Human osteoclasts express oxytocin receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 297, n. 3, p. 442-445, 2002.
- COOK, M. J. Perimenopause: An opportunity for health promotion. *Journal of Obstetric, Gynecologic, & Neonatal Nursing*, v. 22, n. 3, p. 223-228, 1993.
- COPLAND, J. A. et al. Functional oxytocin receptors discovered in human osteoblasts. *Endocrinology*, v. 140, n. 9, p. 4371-4374, 1999.
- CORRADO, A. et al. Molecular basis of bone aging. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 10, p. 3679, 2020.
- COSMAN, F. et al. Clinician’s guide to prevention and treatment of osteoporosis. *Osteoporosis International*, v. 25, n. 10, p. 2359-2381, 2014.
- DAI, R. et al. Cathepsin K: The action in and beyond bone. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 8, p. 433, 2020.
- FERNANDES, F. et al. Oxytocin and bone quality in the femoral neck of rats in periostropause. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 1-14, 2020.

FERREIRA, L. B. et al. Activity of neurons in the preoptic area and their participation in reproductive senescence: Preliminary findings. *Experimental Gerontology*, v. 72, p. 157-161, 2015.

GAMBACCIANI, M.; VACCA, F. Postmenopausal osteoporosis and hormone replacement therapy. *Minerva medica*, v. 95, n. 6, p. 507-520, 2004.

GAO, L. et al. Associations of Serum Cathepsin K and Polymorphisms in CTSK Gene With Bone Mineral Density and Bone Metabolism Markers in Postmenopausal Chinese Women. *Frontiers in Endocrinology*, v. 11, p. 48, 2020.

GUSMÃO, C. V. B.; BELANGERO, W. D. Como a célula óssea reconhece o estímulo mecânico?. *Revista Brasileira de Ortopedia*, v. 44, p. 299-305, 2009.

GYURÁSZOVÁ, M. et al. Markers of oxidative stress and antioxidant status in the plasma, urine and saliva of healthy mice. *Physiological Research*, v. 67, n. 6, p. 921, 2018.

HART, N. H. et al. Mechanical basis of bone strength: influence of bone material, bone structure and muscle action. *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions*, v. 17, n. 3, p. 114, 2017.

HAUSCHKA, P. V.; WIANS JR, F. H. Osteocalcin-hydroxyapatite interaction in the extracellular organic matrix of bone. *The Anatomical Record*, v. 224, n. 2, p. 180-188, 1989.

HENRY, R. J. et al. Revised spectrophotometric methods for the determination of glutamic-oxalacetic transaminase, glutamic-pyruvic transaminase, and lactic acid dehydrogenase. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 34, n. 4-ts, p. 381-398, 1960.

HORNBERGER JR, T. A.; FARRAR, R. P. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. *Canadian Journal of Applied Physiology*, v. 29, n. 1, p. 16-31, 2004.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Projeção da população do Brasil e das Unidades da Federação. IBGE. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/apps/populacao/projecao/index.html>>. Acesso em: 18 jan. 2022.

International Osteoporosis Foundation (IOF). IOF. Disponível em: <<https://www.osteoporosis.foundation/>>. Acesso em: 19 jan. 2022.

IVASKA, K. K. et al. Release of intact and fragmented osteocalcin molecules from bone matrix during bone resorption in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 18, p. 18361-18369, 2004.

JAVED, A.; CHEN, H.; GHORI, F. Y. Genetic and transcriptional control of bone formation. *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics*, v. 22, n. 3, p. 283-293, 2010.

KARMEN, A.; WRÓBLEWSKI, F.; LADUE, J. S. Transaminase activity in human blood. Appendix: Karmen. A.: A note on the spectrophotometry assay of glutamic oxalacetic transaminase in human blood serum, *J. Clin. Investigation*, v. 34, p. 126-133, 1955.

KIM, J. V.; WU, George Y. Body Building and Aminotransferase Elevations: A Review. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, v. 8, n. 2, p. 161, 2020.

KNOTHE TATE, M. L. "Whither flows the fluid in bone?" An osteocyte's perspective. *J Biomech*, v. 36, p. 1409-1424, 2003.

KOMORI, T. Regulation of proliferation, differentiation and functions of osteoblasts by Runx2. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 7, p. 1694, 2019.

KRANJC, T.; OSTANEK, B.; MARC, J. Bone microRNAs and ageing. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, v. 18, n. 3, p. 210-220, 2017.

KUGIMIYA, F. et al. Involvement of endogenous bone morphogenetic protein (BMP) 2 and BMP6 in bone formation. *Journal of Biological Chemistry*, v. 280, n. 42, p. 35704-35712, 2005.

LANGE-COLLETT, J.; SCHUMANN, L. Promoting health among perimenopausal women through diet and exercise. *Journal of the American Academy of Nurse Practitioners*, v. 14, n. 4, p. 172-179, 2002.

LAYNE, J. E.; NELSON, M. E. The effects of progressive resistance training on bone density: a review. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, v. 31, n. 1, p. 25-30, 1999.

LEITE, M. O. R. Tratamento da osteoporose pós-menopausa. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 43, p. 442-445, 1999.

LLVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-MC (T)) Method. *Methods*, v. 25, p. 402-408, 2001.

- LONG, J. A.; EVANS, H. M. The oestrous cycle in the rat and its associated phenomena. *Memoirs of the University of California*. 1922.
- LÓPEZ, F. J. New approaches to the treatment of osteoporosis. *Current opinion in chemical biology*, v. 4, n. 4, p. 383-393, 2000.
- MAEJIMA, Y. et al. Peripheral oxytocin treatment ameliorates obesity by reducing food intake and visceral fat mass. *Aging (Albany NY)*, v. 3, n. 12, p. 1169, 2011.
- NAYLOR, K.; EASTELL,. Bone turnover markers: use in osteoporosis. *Nature Reviews Rheumatology*, v. 8, n. 7, p. 379-389, 2012.
- NICOLA, A. C. et al. The transition to reproductive senescence is characterized by increase in A6 and AVPV neuron activity with attenuation of noradrenaline content. *Experimental Gerontology*, v. 81, p. 19-27, 2016.
- NOIRRIT-ESCLASSAN, E. et al. Critical role of estrogens on bone homeostasis in both male and female: from physiology to medical implications. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 4, p. 1568, 2021.
- PASCHALIS, E. P. et al. Effect of hormone replacement therapy on bone quality in early postmenopausal women. *Journal of bone and mineral research*, v. 18, n. 6, p. 955-959, 2003.
- PERES-UENO, M. J. et al. Effect of pre-treatment of strength training and raloxifene in periostropause on bone healing. *Bone*, v. 134, p. 115285, 2020.
- PINHEIRO, M. M. et al. Clinical risk factors for osteoporotic fractures in Brazilian women and men: the Brazilian Osteoporosis Study (BRAZOS). *Osteoporosis international*, v. 20, n. 3, p. 399-408, 2009.
- PINHEIRO, M. M. et al. The burden of osteoporosis in Brazil: regional data from fractures in adult men and women-The Brazilian Osteoporosis Study (BRAZOS). *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 50, p. 113-120, 2010.
- QUIROS-GONZALEZ, Isabel; YADAV, Vijay K. Central genes, pathways and modules that regulate bone mass. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 561, p. 130-136, 2014.

- RADOMINSKI, S. C. et al. Osteoporose em mulheres na pós-menopausa. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 44, p. 426-434, 2004.
- RIGGS, B. L. et al. The mechanisms of estrogen regulation of bone resorption. *The Journal of clinical investigation*, v. 106, n. 10, p. 1203-1204, 2000.
- ROBLING, A. G. et al. Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin. *Journal of Biological Chemistry*, v. 283, n. 9, p. 5866-5875, 2008.
- ROBLING, A. G.; TURNER, C. H. Mechanical signaling for bone modeling and remodeling. *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression*, v. 19, n. 4, 2009.
- ROSEN, V. BMP2 signaling in bone development and repair. *Cytokine & growth factor reviews*, v. 20, n. 5-6, p. 475-480, 2009.
- RUBIN, C. T.; LANYON, L. E. Regulation of bone formation by applied dynamic loads. *J Bone Joint Surg Am*, v. 66, n. 3, p. 397-402, 1984.
- RUBIN, C. T.; LANYON, L. E. Regulation of bone mass by mechanical strain magnitude. *Calcified tissue international*, v. 37, n. 4, p. 411-417, 1985.
- RUSSO, C. R. et al. Aging bone in men and women: beyond changes in bone mineral density. *Osteoporosis International*, v. 14, n. 7, p. 531-538, 2003.
- RUSSO, C. R. The effects of exercise on bone. Basic concepts and implications for the prevention of fractures. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*, v. 6, n. 3, p. 223, 2009.
- SANTOS, L. F. et al. Oxytocin effects on osteoblastic differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells from adult and aging female Wistar rats. *Experimental Gerontology*, v. 113, p. 58-63, 2018.
- SHIRAZI-FARD, Y. et al. Discordant recovery of bone mass and mechanical properties during prolonged recovery from disuse. *Bone*, v. 52, n. 1, p. 433-443, 2013.
- SINGULANI, M. M. et al. Effects of strength training on osteogenic differentiation and bone strength in aging female Wistar rats. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2017.

STRINGHETTA-GARCIA, C. T. et al. Effects of strength training and raloxifene on femoral neck metabolism and microarchitecture of aging female Wistar rats. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2017.

STRINGHETTA-GARCIA, C. T. et al. The effects of strength training and raloxifene on bone health in aging ovariectomized rats. *Bone*, v. 85, p. 45-54, 2016.

SZETO, A. et al. Oxytocin reduces adipose tissue inflammation in obese mice. *Lipids in Health and Disease*, v. 19, n. 1, p. 1-11, 2020.

TAMMA, R. et al. Oxytocin is an anabolic bone hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 106, n. 17, p. 7149-7154, 2009.

TATSUMI, S. et al. Life-long caloric restriction reveals biphasic and dimorphic effects on bone metabolism in rodents. *Endocrinology*, v. 149, n. 2, p. 634-641, 2008.

THANAKUN, S. et al. Increased Plasma Osteocalcin, Oral Disease, and Altered Mandibular Bone Density in Postmenopausal Women. *International Journal of Dentistry*, v. 2019.

TURNER, C. H.; BURR, D. B. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone*, v. 14, n. 4, p. 595-608, 1993.

ZOCH, M. L.; CLEMENS, T. L.; RIDDLE, R. C. New insights into the biology of osteocalcin. *Bone*, v. 82, p. 42-49, 2016.

ANEXO

8. ANEXO

Parecer de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia do *Campus* de Araçatuba – UNESP.

	UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"	
CAMPUS ARAÇATUBA FACULDADE DE ODONTOLOGIA FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA		
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals		
CERTIFICADO		
<p>Certificamos que o Relatório Final do trabalho intitulado "Análise do colo do fêmur e da expressão de proteínas autofágicas em ratas senescentes tratadas com ocitocina e submetidas ao treinamento de força", Processo FOA nº 2018-0347, sob responsabilidade de Rita Cássia Menegati Dornelles e colaboração de Fernanda Fernandes, Melise Jacon Peres Ueno, Antônio Hernandez Chaves Neto e Edilson Ervolino foi aprovado pela CEUA em 27 de Maio de 2021.</p>		
CERTIFICATE		
<p>We certify that the study entitled "Analysis of the femoral neck and the autophagic proteins expression in senescent rats treated with oxytocin and submitted to the strenght training", Process FOA nº 2018-0347, under the supervision of Rita Cássia Menegati Dornelles and collaboration of Fernanda Fernandes, Melise Jacon Peres Ueno, Antônio Hernandez Chaves Neto and Edilson Ervolino had its the Final Report approved by the CEUA on May 27, 2021.</p>		
		
Prof. Associado João Carlos Callera Coordenador da CEUA CEUA Coordinator		