

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO”**

Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas

Faculdade de Odontologia de Araçatuba

CAMILA TAMI STRINGHETTA-GARCIA

**INFLUÊNCIA DO TREINAMENTO DE FORÇA ASSOCIADO OU NÃO
AO RALOXIFENO SOBRE O PERFIL TRANSCRICIONAL E
MICROESTRUTURAL ÓSSEO DE RATAS WISTAR
NATURALMENTE ENVELHECIDAS**

ARAÇATUBA-SP

2017

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO”**

Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas

Faculdade de Odontologia de Araçatuba

CAMILA TAMI STRINGHETTA-GARCIA

**INFLUÊNCIA DO TREINAMENTO DE FORÇA ASSOCIADO OU NÃO
AO RALOXIFENO SOBRE O PERFIL TRANSCRICIONAL E
MICROESTRUTURAL ÓSSEO DE RATAS WISTAR
NATURALMENTE ENVELHECIDAS**

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

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

ARAÇATUBA-SP

2017

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

P863e Garcia, Camila Tami Stringhetta.
Influência do treinamento de força associado ou não ao raloxifeno sobre o perfil transcricional e microestrutural ósseo de ratas wistar naturalmente envelhecidas / Camila Tami Stringhetta Garcia.– Araçatuba, 2017
93f. : il.; tab.

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

1. Envelhecimento 2. Osteoporose 3. Cloridrato de raloxifeno 4. Exercício 5. Osso e ossos I. T.

CDD 612

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Rita Cássia Menegati Dornelles
UNESP/FOA
(Presidente e Orientadora)

Prof. Dr. Sérgio Eduardo Andrade Perez
Universidade Federal de São Carlos
(Membro Titular)

Prof. Dr. Gilberto Eiji Shiguemoto
Universidade Federal de São Carlos
(Membro Titular)

Prof. Dr. Edilson Ervolino
UNESP/FOA
(Membro Titular)

Prof. Dr. Valdeci Carlos Dionísio
Universidade Federal de Uberlândia
(Membro Titular)

Prof. Dr. Márcio Mateus Beloti
FORP/USP
(Membro Suplente)

Prof. Dr. Ismael Fortes Freita Júnior
UNESP/PP
(Membro Suplente)

Prof. Dr. Willian Dias Belangero
UNESP/Botucatu
(Membro Suplente)

DEDICATÓRIA

Dedico essa tese à minha família.

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram
no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino”.

Leonardo da Vinci

AGRADECIMENTOS

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

Ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas pela oportunidade de fazer parte de um programa inovador e interessante, no qual somos colocados em contato com diferentes professores, pesquisadores e isso nos dá uma visão muito ampla e nos faz crescer.

À Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho pela oportunidade de realizar a maior parte deste trabalho.

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA-UNESP) por toda a infra-estrutura e possibilidades durante estes anos.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao professor Mário Jefferson Quirino Louzada por ter me apresentado a professora Rita e por toda assistência durante a realização dos ensaios mecânicos e densitometria óssea.

Ao professor Edilson Ervolino por todos os anos de parceria, pelas incansáveis vezes que nos atende em sua sala e em seu laboratório mesmo estando ocupado com seus orientados. Por todo o material que disponibilizou para a execução deste e de outros trabalhos, pela boa vontade em ajudar, pelas análises e foto documentações sempre impecáveis. Muito obrigada professor, sem sua valiosa ajuda certamente este trabalho não teria o mesmo sucesso.

Ao professor Márcio Mateus Beloti e a técnica Fabíola Singareti de Oliveira, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP-USP) pela brilhante parceria, muito obrigada por cederem infra-estrutura e todo o material necessário para realização da técnica de PCR, mas acima de tudo, muito obrigada por acreditarem neste trabalho e por serem sempre tão educados, atenciosos e profissionais exemplares.

À professora Andreia Machado Leopoldino e sua aluna e minha irmã Karina Stringhetta Padovani, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP – USP) pela possibilidade de realização da técnica de Western Blot, muito obrigada pela dedicação, empenho e preocupação em cada etapa.

Ao professor Heitor Marques Honório, da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB-USP) pelo auxílio na condução da análise estatística, obrigada por ter sido tão prestativo no momento de responder aos referis da revista. A ajuda do senhor foi breve, mas realmente importante.

Ao professor João César Bedran de Castro pela convivência enriquecedora e pelos pareceres deste trabalho. Conversar com o senhor é sempre um aprendizado.

À professora Sandra Helena Penha de Oliveira pela coordenação do Programa de Pós Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas.

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

Aos professores da banca examinadora, Sérgio Eduardo Andrade Perez, Gilberto Eiji Shiguemoto, Valdeci Carlos Dionísio e Edilson Ervolino por deixarem seus afazeres e me honrarem com suas valiosas sugestões.

Às funcionárias da sessão de pós-graduação por serem sempre atenciosas e prestativas.

A todos os funcionários da FOA pela boa vontade e boa convivência durante todos estes anos. Em especial ao senhor Camilo e senhor João Batista do biotério central por sempre se preocuparem e guardarem nossas ratas “velhinhas”.

Aos funcionários da limpeza, em especial à Márcia, por sempre se preocuparem em tornar nosso ambiente de trabalho mais agradável o mais cedo possível.

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

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus que sempre me guia pelos caminhos do bem, me faz perseverar, acreditar nos meus sonhos e objetivos e principalmente por sempre colocar em minha caminhada pessoas de caráter, de bem e abertas ao crescimento coletivo.

Aos meus pais Sandra e Claudemiro primeiramente pela vida e pelo apoio incondicional, pelas demonstrações de encorajamento, amor, amizade. Por todas as vezes que se deslocaram até Araçatuba para que eu pudesse realizar meu trabalho com calma e paciência enquanto cuidavam da nossa Helena. Pelos ensinamentos mais importantes da minha vida, aos quais me amparo todos os dias, de caráter, gratidão, compaixão, companheirismo e amor.

À minha irmã Karina por todo o apoio, palavras amigas e honestas, por ser tão especial tão amorosa. Por sempre estar pronta para me ajudar, por dedicar seu tempo ao meu trabalho enquanto o seu também precisava de atenção. Certamente este trabalho não teria o sucesso que teve sem sua preciosa ajuda. Somos uma dupla muito boa.

Ao meu marido Gabriel, pelo incentivo, pelo amor e carinho, com certeza eu não estaria aqui agora pensando em o que dizer a você se não tivesse me incentivado tanto a continuar. Muito obrigada por segurar a barra enquanto eu me dividia entre tantos papéis. Com certeza nossa parceria só nos faz crescer.

À minha pequena Helena, por ser tão doce, tão meiga, por ter me ensinado tanto nos últimos anos, por ter me mostrado que a vida é tão linda, que é tão gostoso passear na rua calmamente, mesmo quando a pressa te consome, por me lembrar que as árvores dão flores maravilhosas, mesmo que seja a flor mais comum no mundo. Obrigada por me acalmar com seu abraço sempre que eu abro a porta, você me renova a cada dia. Obrigada pela sua

paciência nas incansáveis horas que você queria minha companhia e eu precisava trabalhar.
Eu amo você !!!

À minha tia Solange e avó Alice pela prontidão em ajudar nas horas de aperto, pela torcida e palavras amigas.

A toda minha família por sempre torcerem e comemorarem meu sucesso.

À minha orientadora professora Rita, por toda a dedicação e envolvimento, pela torcida incansável, pelos ensinamentos, por sempre se preocupar com a formação de seus alunos, por nos deixar conduzir os trabalhos de forma leve, mas na certeza de que se precisarmos nos atenderá a qualquer momento, dia ou noite. Obrigada pelas palavras amigas, pelo companheirismo, por nunca colocar-se acima e sim ao nosso lado. Você é uma profissional incrível. Foram anos brilhantes com certeza.

Aos meus colegas de departamento pela convivência e disposição em ajudar durante todos estes anos.

Aos meus colegas de laboratório que se tornaram amigos queridos, espero ver vocês sempre, vou sentir muita falta de todos. Agradeço cada aluno que tive contato e que me ensinou algo precioso. Aos alunos de iniciação científica Marcelo Wayama, Gustavo Momesso, Eliana Caliente, Flávia Piazza, Camila Branco, Alexandre Goya, Laís Neves, Fabiana Fernandes, Mayumi, Luiza Tavares agradeço por serem tão comprometidos, por mesmo tão jovens preocuparem-se com sua formação e serem tão maduros em suas escolhas, vocês são uma inspiração para mim. Aos alunos de pós-graduação: Ângela, também minha comadre, pela amizade desses anos todos, por sempre se mostrar disposta em ajudar, principalmente nas análises estatísticas, por ser um exemplo de critério e profissionalismo. Fernanda Fernandes, Fer não tenho nem o que dizer de você, só posso agradecer por ter te conhecido, por ter me ajudado tantas vezes em que eu estava em aflição, passamos algumas

batalhas pessoais durante estes anos, mas isso só nos fez crescer. Ter uma amiga como você é uma benção. Melise agradeço pela amizade, companheirismo e discussões sempre produtivas, também por sempre estar disposta em ajudar. Aos amigos que já buscam novas conquistas Samuel Rodrigues pela parceria durante todos estes anos, Larissa Brazolotto você faz falta com suas colocações sinceras, obrigada pelos anos de convivência. Ricardo de Paula de Almeida pela convivência saudável, pelos cafês na Dora e por ser um exemplo de perseverança e dedicação. Tenho certeza que nós vamos longe pessoal, muito obrigada mesmo, vocês são fantásticos.

Sumário

LISTA DE FIGURAS.....	14
LISTA DE TABELAS.....	20
LISTA DE ABREVIACÕES.....	21
LISTA DE SÍMBOLOS.....	23
RESUMO.....	24
ABSTRACT.....	26
REVISÃO DE LITERATURA.....	28
HIPÓTESE.....	42
JUSTIFICATIVA.....	43
OBJETIVOS.....	44
MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
Animais.....	45
Administração de raloxifeno e veículo.....	46
Capacidade de carga máxima voluntária (CCMV) e treinamento de força.....	46
Mensuração de peso corporal e uterino.....	47
Mensuração da concentração plasmática de estradiol.....	48
Microtomografia óssea.....	48
Densidade mineral óssea areal.....	50
Ensaio biomecânico de compressão do colo do fêmur.....	50
Imunoistoquímica do colo do fêmur.....	51
Reação em cadeia polimerase (PCR) em tempo real diretamente do tecido ósseo do fêmur.....	53
Western Blot diretamente do tecido ósseo do fêmur.....	57
Análise estatística.....	58
DESCRIÇÃO DOS RESULTADOS.....	59
Parâmetros fisiológicos.....	59
Capacidade de carga máxima voluntária (CCMV).....	59
Microarquitetura óssea do colo do fêmur após tratamento com Ral e/ou TF.....	61
Força máxima e massa óssea do colo do fêmur após tratamento com Ral e/ou TF.....	65
Biomarcadores ósseos do colo do fêmur após tratamento com Ral e/ou TF.....	67
Superfície de osteoclastos do colo do fêmur após tratamento com Ral e/ou TF.....	69
Expressão relativa de RNAm ósseos do fêmur após tratamento com Ral e/ou TF.....	69
Western Blot de p-ER α e TRAP do fêmur após tratamento com Ral e/ou TF.....	73
DISCUSSÃO.....	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática das células que compõem as unidades básicas multicelulares, responsáveis pelo ciclo de remodelamento ósseo. 30

Figura 2: Representação esquemática da osteoclastogênese (esquerda) e osteoblastogênese (direita). CTH = célula tronco hematopoiética, CMN = célula mononucleada, Pré OC = pré osteoclasto. M-CSF = fator estimulador da colônia de macrófagos, RANK = receptor ativador do fator nuclear Kappa β , CTM = célula tronco mesenquimal, pré OB = pré osteoblasto, RUNX2 = fator de transcrição relacionado ao Rant 2. 31

Figura 3: Representação esquemática da regulação RANK/RANKL/OPG. CTH = célula tronco hematopoiética, CMN = célula mononucleada, Pré OC = pré osteoclasto. M-CSF = fator estimulador da colônia de macrófagos, RANK = receptor ativador do fator nuclear Kappa β , RANKL = ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa β , OPG = osteoprotegerina. 32

Figura 4: Representação esquemática da atuação do estrógeno nas células e proteínas ósseas, onde  representa modulação negativa e  positiva. E₂ = estrógeno, CTH = célula tronco mesenquimal, CMN = célula mononucleada, Pré OC = pré osteoclasto. M-CSF = fator estimulador da colônia de macrófagos, RANK = receptor ativador do fator nuclear Kappa β , CTM = célula tronco mesenquimal, pré OB = pré osteoblasto, RUNX2 = fator de transcrição relacionado ao Rant 2. 34

Figura 5: Representação esquemática da atuação do raloxifeno (Ral) nas células e proteínas ósseas, onde  representa modulação negativa e  positiva. Ral = raloxifeno, CTH = célula tronco hematopoiética, CMN = célula mononucleada, Pré OC = pré osteoclasto. M-CSF = fator estimulador da colônia de macrófagos, RANK = receptor ativador do fator nuclear Kappa β , TRAP = fosfatase ácida resistente ao tartarato, CTM = célula tronco mesenquimal, pré OB = pré osteoblasto, RUNX2 = fator de transcrição relacionado ao Rant 2, OCN = osteocalcina, OPG = osteoprotegerina. 38

Figura 6: Representação esquemática da atuação de SOST e esclerostina na via Wnt- β catenina. Na presença da ligação com Wnt, forma-se complexo entre os receptores Frizzled e LRP5/ 6, permitindo que a β -catenina se acumule no núcleo, onde irá desempenhar função decoativador para TCF e ativar genes responsivos a Wnt. Na presença da proteína ESC, β -catenina é degradada, não se acumula no núcleo e desta forma não há a ativação de TCF para que ocorra a transcrição gênica. SOST = gene SOST, ESC = esclerostina, Frizzled = receptor frizzled acoplado à proteína G, LPR5/6 = Receptor de lipoproteína de baixa densidade 5/6, TCF = fator celular T, * = degradação da β -catenina. 41

Figura 7: Escada utilizada para o treinamento de força, mostrando o animal realizando TF com carga acoplada a cauda. 47

Figura 8: Epífises proximais dos fêmures emblocadas em parafina..... 51

Figura 9: Lâminas histológicas com as amostras de todos os grupos experimentais submetidas à técnica de imunoperoxidase indireta..... 52

Figura 10: Aparelho GeneQuant 1300 utilizado para quantificar a concentração e pureza do RNA. 54

Figura 11: Eletroforese para determinar a qualidade das amostras utilizando o dispositivo microfluídico 2100 AgilentBioanalyzer e o RNA 6000 Nano Chips. 55

Figura 12: Detecção dos RINS das amostras experimentais, amostras de tecido com RIN acima de 7 são consideradas satisfatórias para análise de PCR em tempo real. 55

Figura 13: A - Tecido ósseo macerado com nitrogênio líquido e adicionado tampão de lise submetido ao TissueRuptor para melhor maceração. B – Antes e após a submissão do tecido ao TissueRuptor..... 57

Figura 14: Capacidade de Carga Máxima Voluntária (CCMV) de ratas Wistar na periostropausa que realizaram ou não treinamento de força, tratadas durante 16 semanas com NaCl ou Ral. Os valores representam a média $\pm$ EPM. NT-NaCl = não treinadas e tratadas com veículo; NT-Ral = não treinadas e tratadas com raloxifeno; TF-NaCl = treinadas e tratadas com veículo; TF-Ral = treinadas e tratadas com raloxifeno. # $p < 0.05$ vs mesmo grupo aos 17 meses; * $p < 0.05$ vs TF-Ral 18 meses, + $p < 0.05$ vs NT-NaCl no mesmo mês, ° $p < 0.05$ vs NT-Ral no mesmo mês. 60

Figura 15: Representação em 3D do colo do fêmur de ratas Wistar no período do envelhecimento. (A) Região de interesse na região trabecular rachurada em azul e cortical representada com *. (B e F) região trabecular e cortical do colo do fêmur de animais que não receberam tratamento nem treinamento. (C e G) região trabecular e cortical do colo do fêmur após o tratamento com Ral. (D e H) região trabecular e cortical do colo do fêmur após realização de TF. (E e I) região trabecular e cortical do colo do fêmur após o tratamento com Ral associado a TF. 61

Figura 16: Microarquitetura óssea trabecular do colo do fêmur de ratas Wistar na periostropausa que realizaram TF ou não, tratadas durante 16 semanas com NaCl ou Ral. (A) BV/TV, (B) Tb.Th, (C) Tb.N, (D) Conn.Dn, (E) Tb.Sp, (F) SMI. Cada coluna representa média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Análise estatística ANOVA de duas vias, seguida pelo pós teste de Tukey ($p < 0.05$) para avaliar os efeitos do TF e Ral, ou interações dos tratamentos (TF*Ral). Abreviações e símbolos: + efeitos isolados de Ral, # efeitos isolados de TF, * interação de TF*Ral, avs NT-NaCl; bvs NT-Ral; cvs TF-NaCl. TF = treinamento de força; Ral = raloxifeno; TF*Ral = interação de TF e Ral; NT-NaCl = não treinadas e tratadas com veículo; NT-Ral = não treinadas e tratadas com Ral; TF-NaCl = treinadas e tratadas com veículo; TF-Ral = treinadas e tratadas com Ral; BV/TV = fração de volume ósseo; Tb.Th = espessura trabecular; Tb.N = número de trabéculas; Conn.Dn = densidade de conexões; Tb.Sp = separação trabecular; SMI = índice de modelo estrutural. 63

Figura 17: Microarquitetura óssea cortical do colo do fêmur de ratas Wistar na periostropausa que realizaram TF ou não, tratadas durante 16 semanas com NaCl ou Ral. (A) Ct.Ar, (B) Ct.Th, (C) *Imax*, (D) *Imin*, (E) *J*. Cada coluna representa média $\pm$ erro padrão da média

(EPM). Análise estatística ANOVA de duas vias, seguida pelo pós teste de Tukey ($p < 0.05$) para avaliar os efeitos do TF e Ral, ou interações dos tratamentos (TF*Ral). Abreviações e símbolos: + efeitos isolados de Ral, # efeitos isolados de TF, * interação de TF*Ral; TF = treinamento de força; Ral = raloxifeno; TF*Ral = interação de TF e Ral; NT-NaCl = não treinadas e tratadas com veículo; NT-Ral= não treinadas e tratadas com Ral; TF-NaCl = treinadas e tratadas com veículo; TF-Ral = treinadas e tratadas com Ral; Ct.Ar = área cortical; Ct.Th = espessura cortical; *I_{max}* = média do momento de inércia máximo principal (max); *I_{min}* = média do momento de inércia mínimo principal (mix); *J* = momento polar de inércia médio..... 64

Figura 18: Densidade Mineral óssea areal (DMOa) e força máxima do colo do fêmur de ratas Wistar na periostropausa que realizaram TF ou não, tratadas durante 16 semanas com NaCl ou Ral. (A) DMOa analisada por densitometria óssea e (B) Força Máxima analisada por ensaio biomecânico de compressão. Cada coluna representa media $\pm$ erro padrão da média (EPM). Análise estatística ANOVA de duas vias, seguida pelo pós teste de Tukey ($p < 0.05$) para avaliar os efeitos do TF e Ral, ou interações dos tratamentos (TF*Ral). Abreviações e símbolos: + efeitos isolados de Ral, # efeitos isolados de TF, * interação de TF*Ral, ^avs NT-NaCl. TF = treinamento de força; Ral = raloxifeno; TF*Ral = interação de TF e Ral; NT-NaCl = não treinadas e tratadas com veículo; NT-Ral= não treinadas e tratadas com Ral; TF-NaCl = treinadas e tratadas com veículo; TF-Ral = treinadas e tratadas com Ral. 66

Figura 19: Imunoistoquímica para OCN, TRAP e SOST. A-D: Fotomicrografias mostrando osteoblastos OCN-positivos (A), osteoclastos TRAP-positivos (B), osteócitos SOST-positivos (C) e osteoclastos SOST-positivos. E-J: Gráficos demonstrando a distribuição dos escores para OCN (E e H), TRAP (F e I) e SOST (G e J) na região óssea cortical e trabecular do colo do fêmur nos diferentes grupos experimentais. Cada coluna representa mediana, primeiro e terceiro quartil. Análise estatística ANOVA de duas vias, seguida pelo pós teste de Tukey ($p < 0.05$) para avaliar os efeitos do TF e Ral, ou interações dos tratamentos (TF*Ral). Abreviações e símbolos: + efeitos isolados de Ral, # efeitos isolados de TF, * interação de TF*Ral, ^avs NT-NaCl. TF = treinamento de força; Ral = raloxifeno; TF*Ral = interação de TF e Ral; OCN = osteoclastina; TRAP = fosfatase ácida resistente ao tartarato; NT-NaCl = não treinadas e tratadas com veículo; NT-Ral= não treinadas e tratadas com Ral; TF-NaCl = treinadas e tratadas com veículo; TF-Ral = treinadas e tratadas com Ral. 68

Figura 20: Perímetro de osteoclastos / perímetro trabecular (Oc.Pm/Tb.Pm) do colo do fêmur de ratas Wistar na periostropausa que realizaram TF ou não, tratadas durante 16 semanas com NaCl ou Ral avaliado através de células TRAP-positivas na técnica imunoistoquímica analisadas pelo software *Imaje J*. Cada coluna representa media $\pm$ erro padrão da média (EPM). Análise estatística ANOVA de duas vias, seguida pelo pós teste de Tukey ($p < 0.05$) para avaliar os efeitos do TF e Ral, ou interações dos tratamentos (TF*Ral). Abreviações e símbolos: + efeitos isolados de Ral, # efeitos isolados de TF, * interação de TF*Ral; TF = treinamento de força; Ral = raloxifeno; TF*Ral = interação de TF e Ral; NT-NaCl = não treinadas e tratadas com veículo; NT-Ral= não treinadas e tratadas com Ral; TF-NaCl = treinadas e tratadas com veículo; TF-Ral = treinadas e tratadas com Ral. 69

Figura 21: Expressão relativa de RNAm por PCR em tempo real do fêmur de ratas Wistar na periostropausa que realizaram TF ou não, tratadas durante 16 semanas com NaCl ou Ral. (A) *Runx2*, (B) *Sp7*, (C) *Alp*, (D) *Bsp*, (E) *Ocn*, (F) *Rank*, (G) *Rankl*, (H) *Opg*, (I) *Trap*, (J) *Ctsk*. Os valores foram normalizados por β -actina. Cada coluna representa media $\pm$ erro padrão da média (EPM). Análise estatística ANOVA de duas vias, seguida pelo pós teste de Tukey ($p < 0.05$) para avaliar os efeitos do TF e Ral, ou interações dos tratamentos (TF*Ral). Abreviações e símbolos: + efeitos isolados de Ral, # efeitos isolados de TF, * interação de TF*Ral, ^avs NT-NaCl; ^bvs NT-Ral; ^cvs TF-NaCl. TF = treinamento de força; Ral = raloxifeno; TF*Ral = interação de TF e Ral; NT-NaCl = não treinadas e tratadas com veículo; NT-Ral= não treinadas e tratadas com Ral; TF-NaCl = treinadas e tratadas com veículo; TF-Ral = treinadas e tratadas com Ral; *Runx2* = runt-related transcription factor 2; *Sp7* = osterix; *Alp* = fosfatase alcalina; *Bsp* = sialoproteína óssea; *Ocn* = osteocalcina; *Rank* = receptor ativador do fator nuclear kappa- β ; *Rankl* = ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa- β ; *Opg* = osteoprotegerina; *Trap* = fosfatase ácida resistente ao tartarato; *Ctsk* = cathepsina K. 71

Figura 22: Western Blot de TRAP e p-ER α do fêmur de ratas Wistar na periostropausa que realizaram TF ou não, tratadas durante 16 semanas com NaCl ou Ral. Análises de proteínas por Western blot de p-ER α (A) e TRAP(B). Quantificação proteica de p-ER α (C) e TRAP (D) por densitometria utilizando *Imaje J*. Os valores foram normalizados por β -actina. Cada

coluna representa media $\pm$ erro padrão da média (EPM). Análise estatística ANOVA de duas vias, seguida pelo pós teste de Tukey ($p < 0.05$) para avaliar os efeitos do TF e Ral, ou interações os tratamentos (TF*Ral). Abreviações e símbolos: + efeitos isolados de Ral, # efeitos isolados de TF, * interação de TF*Ral, ^avs NT-NaCl; ^bvs NT-Ral; ^cvs TF-NaCl. TF = treinamento de força; Ral = raloxifeno; TF*Ral = interação de TF e Ral; NT-NaCl = não treinadas e tratadas com veículo; NT-Ral= não treinadas e tratadas com Ral; TF-NaCl = treinadas e tratadas com veículo; TF-Ral = treinadas e tratadas com Ra; p-ER α = receptor de estrógeno fosforilado; TRAP = fosfatase ácida resistente ao tartarato. 73

Figura 23: Resumo dos efeitos principais do tratamento com Ral (estímulo químico) e do TF (estímulo mecânico) sobre o tecido ósseo do colo do fêmur de ratas Wistar senis. 81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros utilizados para escaneamento dos fêmures na microtomografia óssea.....	49
Tabela 2: Parâmetros utilizados para reconstrução das imagens no software NRecon.....	49
Tabela 3: Concentrações de RNA (ng/uL) das amostras analisadas.....	54
Tabela 4: Peso corporal final, peso uterino/100 g de peso corporal e concentração plasmática de estradiol (pg/mL) de ratas Wistar fêmeas envelhecidas que realizaram ou não treinamento de força, tratados durante 16 semanas com NaCl ou Ral. Os valores representam a média ± EPM. NT-NaCl = não treinadas e tratadas com veículo; NT-Ral = não treinadas e tratadas com raloxifeno; TF-NaCl = treinadas e tratadas com veículo; TF-Ral = treinadas e tratadas com raloxifeno	59
Tabela 5: Resumo dos efeitos individuais de Ral, TF e interações TF*Ral pela análise de variância ANOVA de duas vias.....	74

LISTA DE ABREVIACÕES

ANOVA	Análise de Variância
BSP	Sialoproteína óssea
BMU	Unidades Básicas Multicelulares
BV/TV	Fração de Volume Ósseo
CCMV	Capacidade de Carga Máxima Voluntária
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementar
Conn.Dn.	Densidade de Conexões
Ct.Ar	Área Cortical
Ct.Th	Espessura Cortical
Ctsk	Catepsina K
DMO	Densidade Mineral Óssea
DMOa	Densidade Mineral Óssea areal
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ER	Receptor de estrógeno
ERR	Elemento Resposta ao Raloxifeno
EUA	Estados Unidos da América
FA	Fosfatase Alcalina
I máx	Momento Máximo de Inércia
I mín	Momento Mínimo de Inércia
IL-1	Interleucina 1
IOF	Fundação Internacional de Osteoporose
IR	Imunoreativas
J	Momento Polar de Inércia
Kg	Quilogramas
LH	Hormônio Luteinizante
M-CSF	Fator Estimulador da Colônia de Macrófagos
Micro-CT	Microtomografia óssea
N	Newtons
NaCl	Cloreto de Sódio
NT	Não treinadas
NT-NaCl	Não treinadas que receberam NaCl
NT-Ral	Não treinadas que receberam Ral
OCN	Osteocalcina
ONU	Organização das Nações Unidas
OPN	Osteopontina
OPG	Osteoprotegerina
OSTERIX (Sp7)	Osterix
OVX	Ovariectomia
p-ER α	Receptor de estrógeno α fosforilado
PCR	Reação em Cadeia Polimerase
PVDF	Membranas em Fluoreto Polivinidileno
Ral	Raloxifeno
RIN	Índice de Integridade da Amostra
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA _m	Ácido Ribonucleico mensageiro
RANK	Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa β

RANKL	Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa β
ROI	Região de Interesse
RUNX2	Fator de transcrição relacionado ao Rant 2
RX	Raio X
SERMs	Moduladores Seletivos do Receptor de Estrógeno
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de poliacrilamida com SDS
SMI	Índice de Modelo Estrutural
Tb.N	Número de Trabéculas
Tb.Sp	Separação Trabecular
Tb.Th	Espessura Trabecular
TF	Treinamento de Força
TF-NaCl	Treinadas que receberam NaCl
TF-Ral	Treinadas que receberam Ral
TF*Ral	Interação entre TF e Ral
TGF- β	Fator de transformação do crescimento β
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral α
TRAP	Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato
VOI	Volume de Interesse
WB	Western Blot
Wnt	Via de Sinalização Canônica

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
μg	Micrograma
μL	Microlitro
cm	Centímetros
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
ng	Nanogramas
rpm	Rotações por Minuto
%	Porcentagem

Stringhetta-Garcia, Camila Tami. **Influência do treinamento de força associado ou não ao raloxifeno sobre o perfil transcricional e microestrutural ósseo de ratas Wistar naturalmente envelhecidas**. 2017. 93f. Tese (doutorado). Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.

RESUMO

A ocorrência de doenças crônicas e degenerativas é significativamente maior nos organismos durante o envelhecimento, dentre elas, a osteoporose, que resulta em aumento no número de fraturas. As fraturas são as consequências mais dramáticas da osteoporose, sendo que do colo do fêmur é a mais severa, com maior incidência de morbidades e mortalidade. A menor concentração plasmática de estrogênio nas mulheres menopausadas, exerce ação primordial no desenvolvimento desta doença. Desta maneira, o objetivo deste estudo foi estudar a prevenção da osteoporose em decorrência do envelhecimento reprodutivo feminino, especificamente no período de peri menopausa, utilizando treinamento de força (TF), raloxifeno (Ral) ou combinação de TF e Ral. Durante 120 dias, ratas Wistar no período do envelhecimento (18 a 21 meses) realizaram TF em escada três vezes por semana, receberam Ral (1mg/Kg/dia) por gavagem, ou realizaram TF associado ao tratamento com Ral. Microarquitetura óssea cortical e trabecular, densidade mineral óssea areal (DMOa), força óssea, imunohistoquímica (OCN, TRAP e SOST) e superfície de osteoclastos do colo do fêmur foram avaliadas, além de PCR (*Runx2*, *Sp7*, *Alp*, *Bsp*, *Ocn*, *Rank*, *Rankl*, *Opg*, *Trap* e *Ctsk*) e Western Blot (p-ER α e TRAP) do tecido ósseo de todo o fêmur. Os resultados demonstram que os tratamentos modularam o ciclo de remodelamento ósseo de maneiras diferentes: TF estimulou RNAm de marcadores osteoblásticos e osteoclásticos, enquanto Ral diminuiu marcadores osteoclásticos e TF associado a Ral aumentou marcadores osteoblásticos e diminuiu osteoclásticos. Ambos tratamentos resultaram em melhora da microarquitetura trabecular do colo do fêmur de ratas na peri menopausa, todavia, apenas o TF foi capaz de

melhorar além da microarquitetura trabecular, a cortical e força óssea. Desta maneira, sugerimos que a realização de TF, utilização de Ral ou a associação de TF e Ral durante a perimenopausa são intervenções válidas na prevenção de osteoporose em decorrência do envelhecimento reprodutivo feminino, porém os efeitos do TF parecem ser superiores. Levando em consideração que a carga mecânica gerada pelo TF age também em tecidos não esqueléticos, concluímos que TF pode ser intervenção sistêmica para osteoporose. Esses resultados adicionam novas informações à literatura sobre terapêuticas preventivas para osteoporose e fornecem informações relevantes para estudos pré-clínicos.

Palavras-Chaves: envelhecimento, osteoporose, exercício, cloridrato de raloxifeno, osso e ossos.

Stringhetta-Garcia, Camila Tami. **Influence of strength training associated or not with raloxifene on transcriptional and microstructural bone profile of naturally aged female Wistar rats.** 2017. 93f. Tese (doutorado). Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.

ABSTRACT

The association of aging with osteoporosis results in an increased number of fractures. In these fractures, the femoral neck is involved in 75% of affected women and is one of the most dramatic possible consequences. The aim of this study was to prevent female osteoporosis using strength training (ST), raloxifene (Ral) or a combination of ST plus Ral during the natural female aging process, specifically in the periostropause period. For 120 total days, aging female Wistar rats at 18-21 months of age performed ST on three times per week, and Ral was administered daily by gavage (1mg/kg/day). Bone microarchitecture, areal bone mineral density (aBMD), bone strength of the femoral neck, immunohistochemistry, western blotting (p-ER α and TRAP) and RT-PCR were assessed. We found that the treatments modulate the bone remodeling cycle in different ways. Both ST and Ral treatment resulted in improved bone microarchitecture in the femoral neck of rats in late periostropause. However, only ST improved cortical microarchitecture and bone strength in the femoral neck. In addition, ST stimulated mRNA levels of osteoclastic and osteoblastic markers, while Ral decreased mRNA levels of osteoclastic markers. The combined ST plus Ral therapy increased osteoblastic markers and decreased osteoclast markers. In this way, we suggest that SF, the use of Ral or the association of ST and Ral during periostropause are valid interventions in the prevention of osteoporosis due to female reproductive aging, but the effects of ST seem to be superior, taking into account that the mechanical load generated by ST also acts on non-skeletal tissues, we conclude that ST can be a systemic intervention for osteoporosis. These

results add new information to the literature on preventive therapies for osteoporosis and provide relevant information for preclinical studies.

Keywords: aging, osteoporosis, exercise, raloxifene hydrochloride, bone and bones

REVISÃO DE LITERATURA

Alterações na maioria dos sistemas fisiológicos que incluem degeneração estrutural, perda da capacidade funcional e prejuízo na coordenação dentro e entre os sistemas caracterizam o envelhecimento (MILLER et al., 1998). O estudo do envelhecimento tem vários objetivos e um deles é o desenvolvimento de estratégias para prevenir ou minimizar seus efeitos.

A Organização das Nações Unidas (ONU) considera o período entre 1975 e 2025 como a era do envelhecimento. De acordo com a ONU em 2020, 80% das pessoas mais velhas do mundo viverão em países em desenvolvimento e a população com mais de sessenta anos de idade será maior do que a população com menos de cinco anos (BEARD et al., 2016). Este cenário leva a preocupações com estratégias para prevenir e gerenciar condições crônicas, além da responsabilidade pela melhoria da qualidade de vida dos idosos do mundo, que vai muito além do setor de saúde, envolve envelhecimento ativo e envelhecimento bem sucedido, que visam aumentar a expectativa de vida saudável e a qualidade de vida durante a velhice, além de baixa probabilidade de doenças e incapacidades associadas a elas, boa capacidade funcional (física e cognitiva) e participação ativa na comunidade.

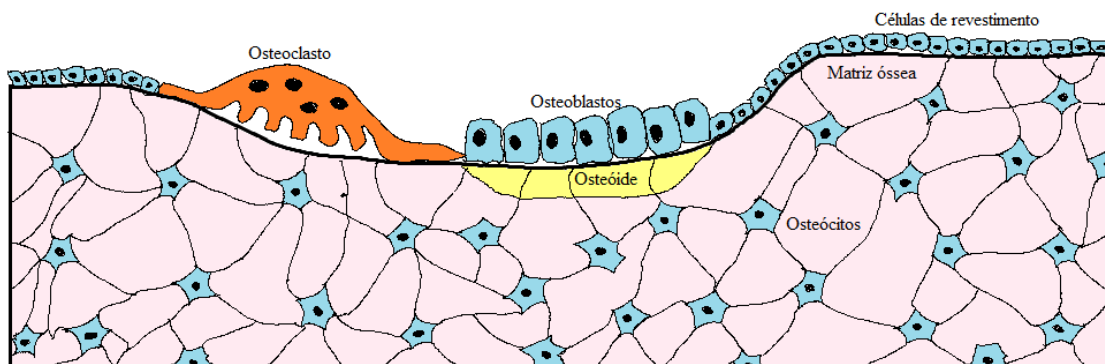
Uma das maiores implicações no envelhecimento envolve diminuição progressiva da produção e concentração plasmática dos esteróides gonadais bem como na quantidade de receptores de hormônios, que com o decorrer da idade sofrem diminuição e submete o organismo a estado de deficiência endócrina, levando ao comprometimento de várias funções fisiológicas (HERTOGHE, 2004). Em mulheres na pós-menopausa concentrações séricas de estrógeno diminuem para aproximadamente 10 a 15% do encontrado na pré-menopausa (KHOSLA et al., 1997). Esta redução no perfil hormonal que ocorre durante a senescência reprodutiva feminina está diretamente relacionada com a prevalência de osteoporose e baixa

massa óssea. Nos EUA, estima-se que 10,2 milhões de pessoas apresentam osteoporose e 4,2 milhões baixa massa óssea (WRIGHT et al., 2014).

Segundo WORLD HEALTH ORGANIZATION, a fratura de fêmur em decorrência da osteoporose é a mais grave, com incidência maior nas mulheres, índice alto de hospitalização e associada a morbidades. Números reduzidos de idosos que tiveram este tipo de fratura retomam sua mobilidade, sendo que 10% ficam dependentes em todas suas atividades diárias e 19% precisam de cuidados de enfermagem em casa por longo tempo(WHO, 2004).De acordo com JOHNELL E CANIS (2006), a cada 3 segundos uma pessoa fratura um osso em decorrência da osteoporose, gerando total de mais de 8,9 milhões de fraturas no mundo por ano. Mesmo com este cenário alarmante, apenas duas em cada dez pessoas com fraturas fazem acompanhamento ou tratamento para a osteoporose. O número de fraturas ósseas anuais decorrentes da osteoporose excede a incidência de ataque cardíaco, acidente vascular cerebral e câncer de mama somados (KANIS et al., 1997).

O osso é órgão que fornece rigidez, forma, proteção e suporte para estruturas corporais, auxiliam a locomoção, além de ser a fonte de cálcio. O tecido mais abundante no osso é o tecido ósseo, tecido conjuntivo especializado, mineralizado por cristais de fosfato de cálcio na forma de hidroxiapatita ($[Ca_3(PO_4)_2]Ca(OH)_2$) (DATTA et al., 2008).O tecido ósseo é metabolicamente ativo, capaz de adaptar-se a estímulos mecânicos e auto reparação de danos estruturais durante o processo de remodelação (BONEWALD e JOHNSON, 2008; DATTA et al., 2008). As células que o compõem, osteoclastos, osteoblastos, osteócitos, células osteoprogenitoras e células de revestimento ósseo são de origens distintas, se proliferam e diferenciam em resposta a diferentes estímulos. Essas células são responsáveis pelos ciclos de remodelamento ósseo e conjuntamente são chamadas de unidades básicas multicelulares - BMU (Figura 1).

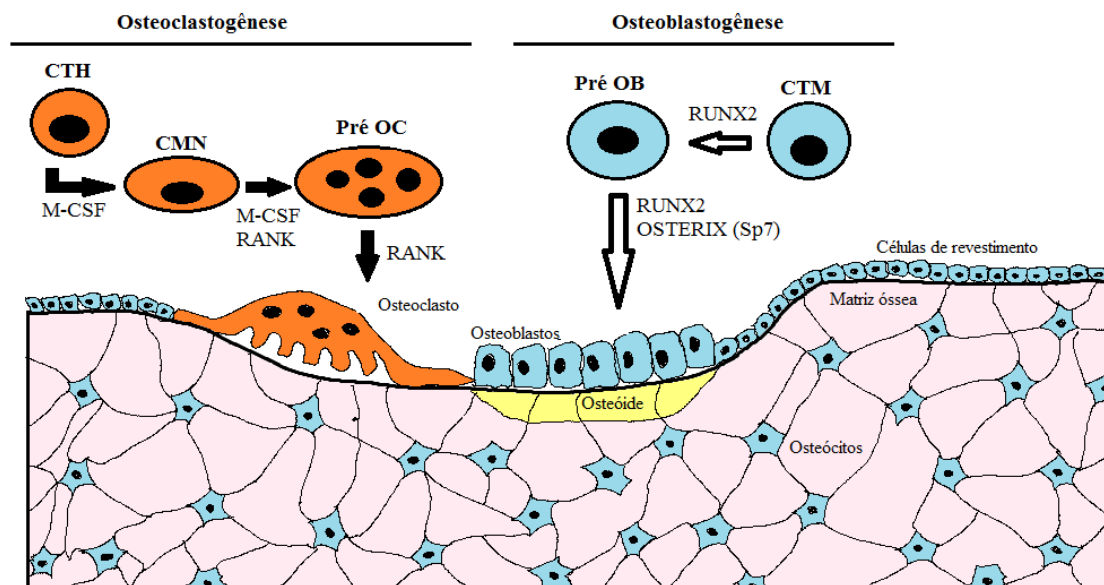
Figura 1: Representação esquemática das células que compõem as unidades básicas multicelulares, responsáveis pelo ciclo de remodelamento ósseo.



Fonte: Stringhetta-Garcia, CT; 2017.

Células da linhagem dos osteoblastos controlam a formação e regulam a reabsorção óssea através de sinalização que controla a atividade dos osteoclastos (DATTA et al., 2008). Para ocorrer o início da remodelação óssea, células tronco hematopoiéticas principalmente presentes na medula óssea e baço são estimuladas a gerar células mononucleadas, as quais se tornam pré osteoclastos e são introduzidas na corrente sanguínea. Para que este evento ocorra é necessária a expressão do fator estimulador da colônia de macrófagos (M-CSF) (ROBLING, CASTILLO E TURNER, 2006). Estas células concentram-se na superfície que será reabsorvida, fundem-se e transformam-se em osteoclastos multinucleados, que irão degradar tanto os componentes minerais quanto os orgânicos através da secreção de enzimas ácidas e hidrolíticas, liberando fragmentos minerais ósseos e colagenosos. Para que ocorra a fusão e diferenciação dos osteoclastos imaturos em osteoclastos ativos é necessária à presença de M-CSF e do receptor ativador do fator nuclear Kappa β (RANK - Figura 2, DATTA et al., 2008).

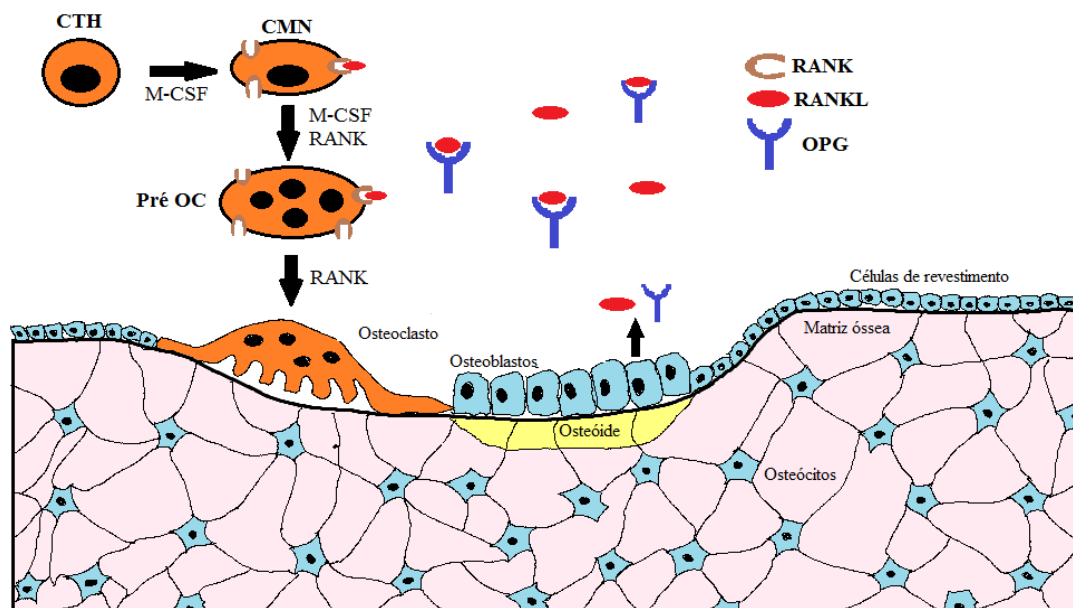
Figura 2: Representação esquemática da osteoclastogênese (esquerda) e osteoblastogênese (direita). CTH = célula tronco hematopoiética, CMN = célula mononucleada, Pré OC = pré osteoclasto. M-CSF = fator estimulador da colônia de macrófagos, RANK = receptor ativador do fator nuclear Kappa β , CTM = célula tronco mesenquimal, pré OB = pré osteoblasto, RUNX2 = fator de transcrição relacionado ao Rant 2.



Fonte: Stringhetta-Garcia, CT; 2017.

RANK é proteína que se localiza na superfície de precursores de osteoclastos e de osteoclastos maduros e a ligação RANK-RANKL causa a inibição do apoptose dos osteoclastos bem como estimula a diferenciação e ativação dos osteoclastos, o que causará reabsorção (KOSLA, 2001). A osteoprotegerina (OPG), liberada pelos osteoblastos, tem ação contrária, isto é, liga-se a RANKL inibindo sua ligação com RANK, e assim, a diferenciação e ativação osteoclástica (BURGESS et al., 1999; NAKAMURA et al., 2002; SCHOPPET, PREISSNER e HOFBAUER, 2002; GRIMAUD et al., 2003; KEARNS, KHOSLA e KOSTENUIK, 2008). Portanto, o equilíbrio entre RANKL/OPG (Figura 3) é essencial para a manutenção da homeostase óssea (BURGESS et al., 1999).

Figura 3: Representação esquemática da regulação RANK/RANKL/OPG. CTH = célula tronco hematopoietica, CMN = célula mononucleada, Pré OC = pré osteoclasto. M-CSF = fator estimulador da colônia de macrófagos, RANK = receptor ativador do fator nuclear Kappa β , RANKL = ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa β , OPG = osteoprotegerina.



Fonte: Stringhetta-Garcia, CT; 2017.

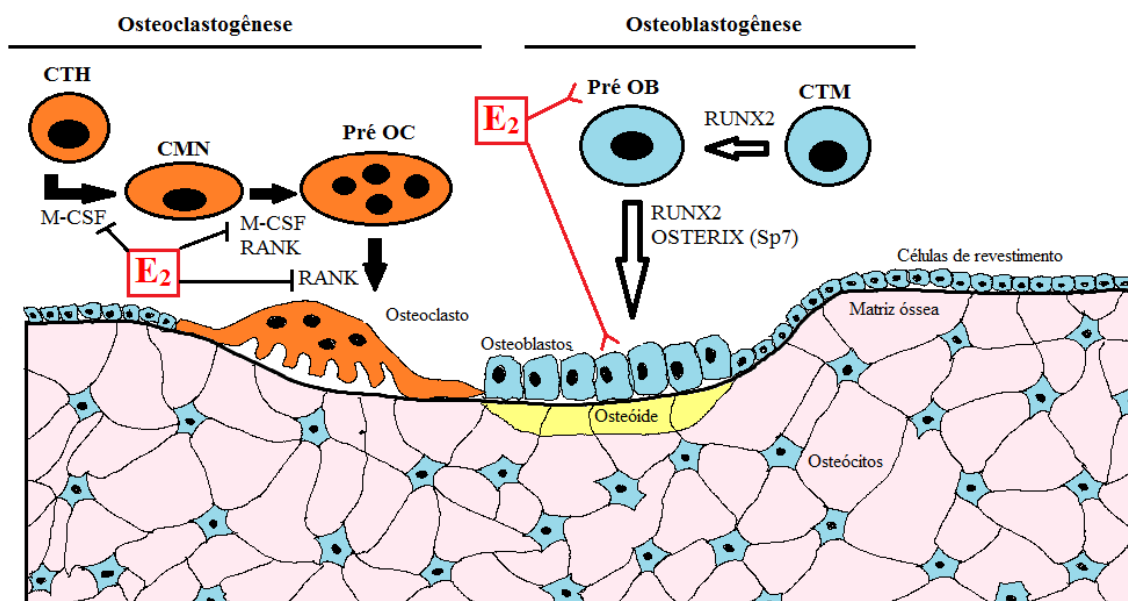
Na sequência do ciclo de remodelamento ósseo, células mononucleadas da linhagem de macrófagos e monócitos preparam a superfície aonde os osteoblastos irão se aderir e iniciar sua função, caracterizando a fase de reversão. A gênese dos osteoblastos (Figura 2) inicia-se com proliferação de células tronco mesenquimais da medula óssea e periósteo. A expressão de RUNX2 é primordial para que as células precursoras se tornem comprometidas com a linhagem osteoblásticas (ERIKSEN, 2010) e não com a linhagem de outras células também derivadas das células tronco mesenquimais. Para que os pré osteoblastos tornem-se osteoblastos maduros é necessária a expressão de RUNX2, Osterix (OSX) e outros componentes da via de sinalização Wnt (GLASS et al., 2005; HU et al., 2005). Os

osteoblastos maduros expressam colágeno tipo I, fosfatase alcalina (FA), osteopontina (OPN), sialoproteína óssea e osteocalcina (OCN) enzima chave no processo de mineralização. Os osteoblastos ativos secretam matriz não mineralizada, o osteóide, e vão se deslocando para longe da superfície óssea, começam a desenvolver prolongamentos citoplasmáticos para manter comunicação com as células vizinhas. Nesta etapa, estas células são consideradas osteócitos imaturos, com a mineralização da matriz óssea, os osteócitos ficam aprisionados na matriz óssea, tornam-se maduros e passam a expressar novos genes, como SOST (ROBLING, CASTILLO e TURNER, 2006). Os osteócitos são células sensíveis à tensão e atuam como receptores mecânicos do estresse aplicado que enviam sinais para recrutar osteoblastos e osteoclastos, resultando em ganho ou perda óssea (MULLENDER et al., 1996; ANDREOLI et al., 2001; AGUIRRE et al., 2006; NOBLE, 2008; PAJEVIC, 2009). O ciclo de remodelamento ósseo se completa quando o osso reabsorvido foi totalmente substituído e, portanto, a quiescência reestabelecida.

A diminuição fisiológica de massa óssea que acompanha o envelhecimento é denominada osteopenia, porém, na situação em que a reabsorção excede a formação óssea, instala-se a osteoporose, doença que afeta milhões de pessoas ao redor do mundo. É caracterizada por perda de massa óssea e deterioração da microarquitetura do tecido ósseo, levando a fragilidade óssea e consequente aumento do risco de fraturas.

O estrógeno tem ação fundamental no tecido ósseo, pois estimula fatores relacionados à diminuição da diferenciação e sobrevivência de osteoclastos ao mesmo tempo em que estimula fatores relacionados com a diferenciação e ativação de osteoblastos (RIGGS, 2000; MCCARTHY, 2003), como demonstrado na figura 4.

Figura 4: Representação esquemática da atuação do estrógeno nas células e proteínas ósseas (—| representa modulação negativa e —> positiva). E₂ = estrógeno, CTH = célula tronco hematopoiética, CMN = célula mononucleada, Pré OC = pré osteoclasto. M-CSF = fator estimulador da colônia de macrófagos, RANK = receptor ativador do fator nuclear Kappa β , CTM = célula tronco mesenquimal, pré OB = pré osteoblasto, RUNX2 = fator de transcrição relacionado ao Rant 2.



Fonte: Stringhetta-Garcia, CT; 2017.

A diminuição de estrogênio presente durante o envelhecimento reprodutivo feminino está associada a aumento na frequência de ativação e intensidade da remodelação óssea, existem muito mais focos de remodelamento ósseo nas superfícies endosteais na situação de deficiência de estrógeno, resultando em perda de massa óssea em decorrência do balanço negativo nas BMUs (SEEMAN, 2002) e assim, parece ser o fator mais importante na patogênese da fragilidade óssea (RIGGS et al., 1998).

A fase inicial de acelerada perda de massa óssea é caracterizada por rápida diminuição de massa mineral óssea produzida pelo aumento das BMUs, e culmina em aumento da porosidade óssea refletida pelo fato do remodelamento decorrer de taxa menos para mais

elevada (PARFFIT, 1980). Uma vez que há o balanço negativo entre reabsorção e formação óssea, quanto mais osso é perdido, mais se agrava a osteoporose porque o desequilíbrio torna-se cada vez mais negativo (SEEMAN, 2002).

Observações que células hematopoiéticas quando tratadas com M-CSF e RANKL se diferenciam em osteoclastos, sem a presença de osteoblastos (SUDA et al., 1999), evidenciando a função dos osteoblastos na osteoclastogênese, as informações de que ablação genética de RANK (LI et al., 2000) e RANKL (KONG et al., 1999) causam osteopetrose e de OPG causa osteoporose (BUCAY et al., 1998), além da descoberta da importância do estrógeno na diferenciação de osteoblastos (MANOLAGAS, 2000; MCCARTHY et al., 2003) demonstram a importância do funcionamento sincrônico das células ósseas, além de deixarem evidente a dificuldade de terapêuticas que possam influenciar os diversos tipos celulares de maneira coordenada e organizada.

A associação de menopausa e osteoporose tem levado à investigação da função do receptor de estrógeno (THOMPSON, RUBIN e RUBIN, 2012). A isoforma α do receptor de estrógeno (ER), além de suas ações genômicas em prol da osteogênese, está envolvida na resposta adaptativa à tensão mecânica desempenhando função mecanotransdutora nas células ósseas não exigindo a presença de E_2 , embora o mesmo atue na regulação do número de ER (ZAMAN et al., 2006; SAXON et al., 2012). Já é bem estabelecido que no período menopausal há redução da atividade dos ER α nas células ósseas com consecutivo declínio da capacidade de resposta do tecido ósseo à carga mecânica, o que determina maior agravamento da qualidade óssea (RIGGS, KHOSLA e MELTON, 2002; SAXON et al., 2012) e explica o porquê algumas mulheres na menopausa desenvolvem diminuição de massa óssea semelhante a que é observada no desuso (LEE et al., 2003). Como mecanismo compensatório da diminuição da concentração de estrógeno, há aumento dos níveis de expressão de RNAm de ER α (RIGGS, KHOSLA e MELTON, 2002; KÓSA et al., 2009; ZAMAN et al., 2010).

Assim, a ação da tensão mecânica sob os osteócitos parece influenciar na modulação dos níveis de RNAm de ER α para a transcrição do ER e na migração dos mesmos tanto para o núcleo e para a membrana celular, tornando-os aptos para recepção dos estímulos (ZAMAN et al., 2006; ZAMAN et al., 2010; WINDAHL et al., 2013). Desta forma, o ER modula as vias de sinalização ativadas mecanicamente (THOMPSON, RUBIN E RUBIN, 2012).

Diversos são os fármacos indicados para tratamento da osteoporose. A reposição hormonal é bem estabelecida, uma vez que o estrógeno atua sobre os monócitos promovendo redução plasmática de IL-1 e TNF- α (PACIFICI et al., 1989; PACIFICI, 1996). Estas substâncias estimulam a produção de citocinas como IL-6 e M-CSF, as quais regulam a fusão e a diferenciação de células precursoras de osteoclastos. Consequentemente, em organismos estrogenizados, há diminuição na formação de osteoclastos (PACIFICI, 1996). Além de atuar sobre os osteoblastos, via receptores α (BONNELYE e AUBIN, 2002), induzindo a síntese de matriz óssea (CHOW, LEAN e CHAMBERS, 1992), o estrógeno também promove a liberação de fatores, como TGF- β , que atuam sobre os osteoclastos (OURSLETER et al., 1991), inibindo a reabsorção óssea e estimulando a morte dos osteoclastos (HUGHES et al., 1996). Além disso, através da experimentação *in vitro* (KAMEDA et al., 1997), foi observado a apoptose de osteoclastos tratados com 17 β -estradiol, sugerindo ação direta sobre essas células, nas quais a presença de receptores α (BONNELYE et al., 2002) e β específicos para o estrógeno foi demonstrada. Contudo, efeitos colaterais como ganho de peso e risco de carcinoma de mama e de endométrio são preocupantes (GIACOMINI e MELLA, 2006).

Visando alternativas para ação agonista do estrógeno, a indústria farmacêutica desenvolveu os moduladores seletivos do receptor de estrógeno (SERMs). Estes fármacos constituem classe de moléculas não hormonais com alta afinidade de ligação aos receptores de estrógeno e podem funcionar como agonistas (ossos) ou antagonistas (mama e endométrio) do estrógeno na dependência do tecido-alvo. O mecanismo de ação molecular deste SERM

envolve afinidade alta de ligação ao ER (semelhante ao estradiol), que previne o acesso do estradiol ao ER e promove alteração espacial do mesmo, o que dificulta a sua ativação e ligação do elemento resposta ao estrogênio. Essa condição fica evidente no trabalho de CONDI e cols. (2012) onde o uso de estradiol associado ao raloxifeno (Ral) não trouxe benefícios aditivos na qualidade óssea de ratas ovariectomizadas. No tecido ósseo, assim como em outros tecidos não reprodutivos, o Ral liga-se ao ER e na presença de proteínas auxiliares pode ativar sequência específica do DNA, conhecida como Elemento Resposta ao Raloxifeno (ERR), assim, grupo de genes responsáveis pela ação agonista do estradiol são ativados e isso pode explicar como o Ral exerce o efeito agonista do estrógeno (RIGGS e PARFITT, 2005; REY et al., 2009).

O Ral apresenta outras ações diretas no tecido ósseo, desencadeando diminuição de IL-6, TNF- α o que causa decréscimo no número e a atividade dos osteoclastos (REY et al., 2009) além de atuar diminuindo a expressão de RNAm para RANKL (SLIWINSKI et al., 2009) e aumento de colágeno tipo I na matriz óssea (VIGUET-CARRIN, GARNERO e DELMAS, 2006). Dados de nosso laboratório evidenciam que o Ral é capaz de prevenir a osteopenia induzida pelo hipoestrogenismo, através do aumento dos fatores de transcrição RUNX2 e Osterix, assim como das proteínas OCN e OPG, além de regular negativamente TRAP e RANKL, favorecendo a osteogênese (Figura 5, STRINGHETTA-GARCIA et al., 2016).

manutenção da DMO (Menkes et al., 1993). Existem muitos pontos de discussão sobre qual melhor método de TF, levando em consideração tipo de exercícios, a intensidade e o período necessário para se obter a resposta óssea, além das considerações individuais dos praticantes (CADORE, BRENTANO e KRUEL, 2005).

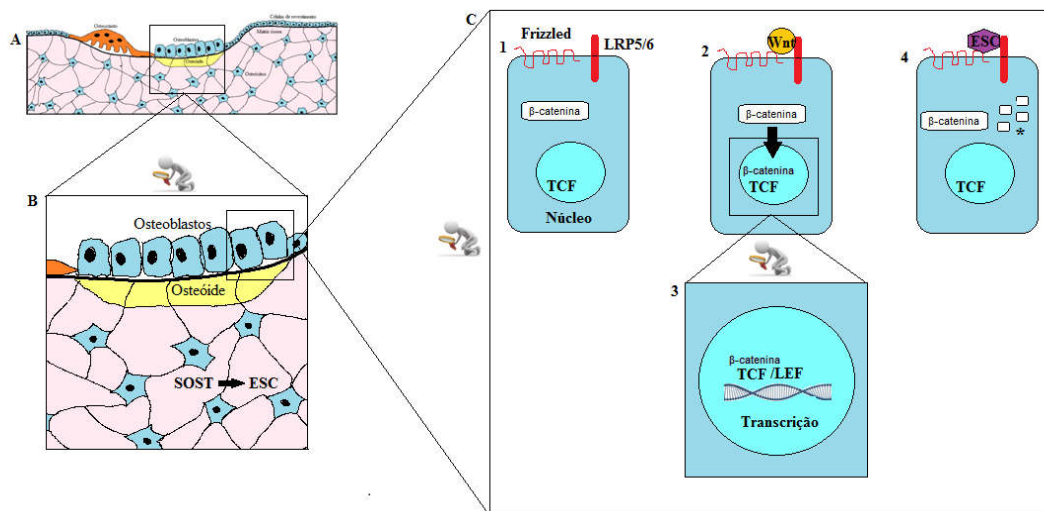
A realização de TF, que exige geração de força muscular significativa, parece ser modalidade que mais causa estímulos osteogênicos. STENGEL e colaboradores (2005) demonstraram que mulheres nos pós menopausa que realizaram exercícios que envolvem a geração de grande força muscular apresentam melhor DMO do que as que não realizaram ou as que realizaram exercícios com menor impacto. BAILEY e BROOKE-WAVELL (2010) mostram em seu estudo, que exercícios de alto impacto realizados diariamente tem melhor resposta no aumento da densidade mineral óssea do que nos indivíduos controle ou nos que realizavam exercícios 2 vezes por semana. Diversas pesquisas animais demonstram ação favorável dos treinamentos físicos sobre o tecido ósseo. SUN e colaboradores (2015) demonstraram que em ratas de 3 meses OVX, a realização de treinamento em esteira melhorou a microarquitetura óssea trabecular (BV/TV, Tb.Th e Tb.N) da epífise distal do fêmur; assim como BONNET e colaboradores (2007) que avaliaram o osso trabecular de tíbias de OVX com 8 meses que realizaram exercício em esteira e demonstraram aumento de BV/TV, Tb.Th, Tb.N, além de diminuição de Tb.Sp e SMI.

Desta maneira, a ação anabólica óssea (OZCIVICI et al., 2013), associada às atuações não esqueléticas do TF, como prevenção da sarcopenia do envelhecimento, diminuição da gordura corporal e marcadores sistêmicos de inflamação em mulheres idosas pós-menopáusicas que realizaram treinamento resistido (BOTERO et al., 2013), em conjunto com informações que durante o processo de envelhecimento há deterioração dos sinais mecânicos regulatórios, surge a viabilidade de substituir esta perda fisiológica de resposta sinais mecânicos por estimulação mecânica exógena (OZCIVICI, 2013) e salientamos a necessidade

de pesquisas para potencial estratégia mecânica para prevenção e manejo de diversas alterações crônicas que cercam o envelhecimento.

Apesar dos avanços na pesquisa óssea e mineral, os mecanismos pelos quais os exercícios de força resultam em melhora óssea não são totalmente esclarecidos, em especial durante o processo de envelhecimento. Os osteócitos representam mais de 95% das células ósseas do esqueleto adulto (COWIN et al., 1998), mantêm densa rede de conectividade com outros osteócitos e células de revestimento ósseo através de prolongamentos citoplasmáticos que irradiam para fora do canal vascular central dentro dos canaliculos, o que pode permitir a comunicação fluida química, elétrica e de estresse gerada através da matriz óssea (WANG et al., 1999) e desta forma fornecem meio de amplificação de sinais pela própria natureza de sua arquitetura celular (HAN et al., 2004). Desta forma, os osteócitos compõem as principais células mecanossensoras do osso. A chave da ação da carga mecânica sobre os osteócitos parece ocorrer através da proteína esclerostina, secreta pelos osteócitos e codificada pelo gene SOST. A esclerostina liga-se aos receptores LPR5/6 e antagonizam a via de sinalização canônica Wnt (LI et al., 2005). A carga mecânica reduz a esclerostina no osso, e assim, melhora a formação óssea, sugerindo que a regulação da massa óssea pelo estresse mecânico se dê pela diminuição desta proteína inibidora (Figura 6, ROBLING et al., 2008).

Figura 6: Representação esquemática da atuação de SOST e esclerostina na via Wnt- β catenina. Na presença da ligação com Wnt, forma-se um complexo entre os receptores Frizzled e LRP5/6, permitindo que a β -catenina se acumule no núcleo, onde irá desempenhar função de coativador para TCF e ativar genes responsivos a Wnt. Na presença da proteína ESC, β -catenina é degradada, não se acumula no núcleo e desta forma não há a ativação de TCF para que ocorra a transcrição gênica. SOST = gene SOST, ESC = esclerostina, Frizzled = receptor frizzled acoplado à proteína G, LRP5/6 = Receptor de lipoproteína de baixa densidade 5/6, TCF = fator celular T, * = degradação da β -catenina.



Fonte: Stringhetti-Garcia, CT; 2017.

Estudo prévio de nosso grupo realizado com ratas na peri menopausa inicial (14 a 18 meses), onde a concentração de estrógeno foi abruptamente diminuída através da realização de OVX, demonstrou que após 120 dias de tratamento com Ral (1mg/Kg/dia) ou TF o benefício na prevenção de perda de massa óssea, deterioração da microarquitetura óssea, assim como modulação do ciclo de remodelamento ósseo eram similares e que a combinação de TF associado ao uso de Ral não desencadeava benefícios aditivos (STRINGHETTA-GARCIA et al., 2016). O presente estudo visa investigar os efeitos do treinamento de força associado ou não ao tratamento com Ral durante o envelhecimento reprodutivo de fêmeas durante a peri menopausa tardia (18 a 21 meses), onde ocorre diminuição gradual da concentração de estrógeno.

HIPÓTESE

A hipótese do presente estudo é que o dano ao tecido ósseo, frequente durante o processo de envelhecimento de ratas Wistar, seja prevenido com a realização de treinamento de força e potencializado com a associação de raloxifeno.

JUSTIFICATIVA

Apesar dos avanços da pesquisa no campo de metabolismo ósseo, os mecanismos mecanossensores e os componentes celulares que envolvem o tecido ósseo não são totalmente entendidos, principalmente durante a senescência reprodutiva feminina. Estudos que avaliam o ciclo de remodelamento ósseo, evento que envolve a atuação dos tipos celulares presentes no tecido ósseo, assim como a interação das células e com seus precursores que servem como elementos reguladores críticos no recrutamento, proliferação e diferenciação de osteoblastos e osteoclastos (THOMPSON, RUBIN e RUBIN, 2012) necessitam ser investigados na tentativa de compreender melhor a natureza multifatorial da osteoporose. Além disso, a validação de métodos preventivos vistos os exagerados gastos públicos no manejo de fraturas osteoporóticas, em especial a de colo de fêmur, são de extrema urgência e necessidade.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Com base no exposto, o presente estudo teve por objetivo avaliar o colo do fêmur de ratas Wistar senescentes (21 meses) após quatro meses de realização de Treinamento de Força (TF), administração de Raloxifeno (Ral) ou associação de TF e Ral.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar microarquitetura óssea trabecular e cortical, densidade mineral óssea areal (DMOa) e força óssea do colo do fêmur de ratas Wistar de 21 meses após a realização de TF, Ral ou TF/Ral.
- Avaliar fatores relacionados à mineralização da matriz óssea, através de imunomarcção de OCN no colo do fêmur de ratas Wistar de 21 meses após a realização de TF, Ral ou TF/Ral.
- Avaliar a atividade de osteoclastos através de imunomarcção de TRAP do colo do fêmur de ratas Wistar de 21 meses após a realização de TF, Ral ou TF/Ral.
- Avaliar a imunomarcção de SOST do colo do fêmur de ratas Wistar de 21 meses após a realização de TF, Ral ou TF/Ral.
- Avaliar o remodelamento ósseo através de PCR em tempo real para os alvos: *Runx2*, *Sp7*, *Alp*, *Bsp*, *Ocn*, *Rank*, *Rankl*, *Opg*, *Trap* e *Ctsk* do fêmur de ratas Wistar de 21 meses após a realização de TF, Ral ou TF/Ral.
- Avaliar a reabsorção óssea através de Western Blotting para TRAP do fêmur de ratas Wistar de 21 meses após a realização de TF, Ral ou TF/Ral.
- Avaliar a fosforilação do ER α através de Western Blotting para p-ER α do fêmur de ratas Wistar de 21 meses após a realização de TF, Ral ou TF/Ral.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Todos os procedimentos animais foram aprovados (Protocolo número 2014-00267) pelo Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Araçatuba, SP, Brasil), e estão de acordo com o guia de cuidados para uso de animais de laboratório.

Quarenta ratas da linhagem Wistar do biotério de criação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, de idade 17 a 21 meses foram mantidas em gaiolas coletivas (4 animais por caixa) em sala controlada (temperatura/umidade) em ciclo claro/escuro de 12:12 horas. Os animais tiveram livre acesso a água e ração (Presence® Ratos e Camundongos, Paulínia, SP, Brasil). Todas as ratas eram multíparas, procriaram de 3 a 4 vezes dos 2 aos 8 meses de idade, sendo este um critério de inclusão.

As características gerais de saúde dos animais foram monitoradas diariamente e o ciclo estral (LONG e EVANS, 1922) de todas as ratas experimentais foi acompanhado durante o 17º mês, para confirmar a aciclicidade. Dados de nosso laboratório demonstraram que ratas Wistar de 18 meses apresentam concentrações de estrógeno diminuídas e de hormônio luteinizante (LH) aumentadas quando comparadas com ratas de 4 meses, caracterizando a periostropausa (FERREIRA et al., 2016), período similar a perimenopausa em mulheres.

Após o período de determinação de aciclicidade estral (17º mês), as ratas foram aleatoriamente distribuídas nos seguintes grupos experimentais: 1: Não treinadas que receberam veículo (NaCl; grupo NT-NaCl), 2: Não treinadas que receberam Raloxifeno (NT-Ral), 3: Submetidas a treinamento de força que receberam veículo (TF-NaCl) e 4: Submetidas a treinamento de força que receberam Raloxifeno (TF-Ral). Os grupos foram compostos com

10 animais cada. Após 120 dias do início dos tratamentos, os animais foram anestesiados, mortos por decapitação e o material coletado para análises posteriores.

Administração de raloxifeno e veículo

No início do 18º mês, os animais dos grupos NT-Ral e TF-Ral receberam diariamente 1mg/Kg/dia de Ral (STRINGHETTA-GARCIA et al., 2016) em 0,3mL de solução fisiológica, por gavagem durante 120 dias. Os animais dos grupos NT-NaCl e TF-NaCl receberam 0,3 mL de veículo (NaCl) por gavagem pelo mesmo período de tempo.

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

Os animais dos grupos TF-NaCl e TF-Ral realizaram TF em escada [1.13 x 0.18m, 2cm, com angulação de 80°, área de descanso no topo (20 x 20 x 20 cm de diâmetro)] (HORNEMBERG e FARRAR, 2004; STRINGHETTA-GARCIA et al., 2016; SINGULANI et al., 2017), três vezes por semana durante 120 dias. Na primeira semana do 18º mês, os animais foram adaptados à escada. No primeiro dia da segunda semana a CCMV de cada animal foi avaliada com uso de tubos e esferas de aço acoplados à cauda do animal. Para avaliar a CCMV, o peso inicial da carga foi correspondente a 75% do peso corporal do animal, e a cada nova subida (a cada subida o animal tinha 2 minutos de descanso) eram acrescidas 30 gramas de peso. Este procedimento foi realizado até que o animal não completasse a subida e assim, o peso obtido na subida completa anterior era considerado a CCMV, e base para cálculo da força máxima utilizada durante o período de treino. Após 48 horas da realização do teste de CCMV, os animais realizavam TF.

Durante 120 dias, os animais realizaram três vezes por semana TF, em dias alternados, e cada sessão de treino consistia em seis séries e 2 minutos de intervalo entre as séries.

Durante a primeira semana foi utilizada como carga de treino 60% da carga obtida na CCMV, aumentada para 70% na segunda semana e 80% na terceira semana. A partir da quarta semana de treino até o final do período experimental foi utilizada a carga de treino de 80% da CCMV, sendo que esta era reavaliada mensalmente para readequação da CCMV. A figura 7 demonstra a escala utilizada durante os treinamentos de força e o animal realizando teste de CCMV.

Figura 7: Escada utilizada para o treinamento de força, mostrando o animal realizando TF com carga acoplada a cauda.



Fonte: Laboratório de Endocrinologia e Envelhecimento – UNESP Araçatuba.

Mensuração de peso corporal e uterino

Após 120 dias da realização dos tratamentos, os animais foram anestesiados (quetamina 80mg/Kg associada à xilazina 10mg/Kg), pesados e mortos por decapitação.

Imediatamente após a decapitação e realizado coleta do sangue e dos fêmures, o útero foi removido e pesado em balança de precisão para determinar possíveis alterações.

Mensuração da concentração plasmática de estradiol

O sangue dos animais experimentais foi coletado, imediatamente centrifugado (3000 rpm, 4° C por 15 minutos) e o plasma obtido foi estocado em tubos em freezer -20° C. A concentração plasmática de estradiol foi mensurada por ensaio de ELISA (ELISA, IBL international GMBH, Hamburg, Germany) de acordo com instruções do fabricante. Todas as duplicatas das amostras foram inseridas no mesmo ensaio para evitar erros intra-ensaios. A concentração mínima de estradiol detectável foi de 0,28ng/mL.

Microtomografia óssea

Imediatamente após a morte dos animais, os fêmures (direitos) dos animais experimentais foram removidos, limpos com tecido macio, imediatamente armazenados em tubos criogênicos com solução fisiológica e congelados em freezer -20°C para realização da análise em 3D não destrutiva da microarquitetura óssea (micro-CT), ensaio mecânico e teste mecânico.

Vinte e quatro horas antes da realização da microtomografia óssea, os criotubos com os fêmures foram retirados do freezer -20°C e armazenados em refrigerador (4°C) para o descongelamento gradual.

A micro-CT foi realizada utilizando microtomógrafo SkyScan 1272 (SkyScan, Belgium). Os fêmures foram posicionados na direção crânio caudal, com auxílio de cera ortodôntica para aquisição dos slices. Os parâmetros utilizados para o escaneamento estão demonstrados na tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros utilizados para escaneamento dos fêmures na microtomografia óssea.

Voltagem do raio X	70kV
Corrente	143mA
Filtro de alumínio	0.5mm
Resolução de pixels	10um
Resolução da câmera	2016 X 1344
Parada de rotação (<i>rotation step</i>)	0.4°C
Média de RX (<i>frame average</i>)	3
Duração do escaneamento	55min

As imagens foram importadas para o software NRecon (SkyScan, Leuven, Belgium) e para a reconstrução das imagens foram utilizados os parâmetros descritos na tabela 2.

Tabela 2: Parâmetros utilizados para reconstrução das imagens no software NRecon.

Smoothing	2
Ring artefacts reduction	6
Beam-hardening correction	40%
Histogram output	0,01 – 0,07

Para obtenção dos parâmetros do osso cortical e trabecular do colo do fêmur, foi quantificado o volume de interesse (VOI) na estrutura tridimensional e extraídos os parâmetros do software CT-Analyser (SkyScan, Leuven, Belgium). A região trabecular e cortical do colo do fêmur foram definidas utilizando-se a ferramenta de interpolação dinâmica para selecionar a região de interesse. O osso trabecular e cortical foram interpolados e analisados separadamente.

Para a imagem representativa em 3D do colo do fêmur dos animais experimentais foi utilizado o software CT-Vox (SkyScan, Leuven, Belgium).

As abreviações utilizadas para os parâmetros de micro-CT para osso trabecular e cortical foram: fração de volume ósseo (BV/TV - %), espessura trabecular (Tb.Th; mm), número de trabéculas (Tb.N; 1/mm), separação trabecular (Tb.Sp; mm), índice de modelo estrutural (SMI), densidade de conexões (Conn.Dn; 1/mm³), área óssea cortical (Ct.Ar; mm²), espessura cortical (Ct.Th; mm), momento máximo de inércia (I_{max} ; mm⁴), momento mínimo de inércia (I_{min} ; mm⁴) e momento polar de inércia (J ; mm⁴) (BOUXSEIN et al., 2010).

Densidade mineral óssea areal

Para análise da densidade mineral óssea areal (DMOa), os fêmures foram descongelados e posicionados no plano frontal e na vista anterior na mesa do scanner, todos orientados da mesma forma em recipiente com 2 cm de água, de acordo com as instruções do fabricante.

A DMOa dos fêmures foi avaliada utilizando raio-X de dupla energia (Lunar DPX Alpha, WI, EUA) e as análises foram realizadas com software adaptado para pequenos animais. O equipamento foi calibrado de acordo com as instruções do fabricante. O mesmo investigador analisou todos os exames. Para a análise do colo do fêmur, identificou-se região de interesse (ROI) utilizando quadrado com área conhecida (0,72 mm²), localizada na região do colo do fêmur de todos os espécimes (STRINGHETTA-GARCIA et al., 2016).

Ensaio biomecânico de compressão do colo do fêmur

As propriedades biomecânicas do fêmur foram analisadas através do teste de compressão utilizando a máquina Universal Testing Machine (DL 3000, EMIC®, São José dos Pinhais, PR, Brasil). Cada fêmur foi posicionado em aparato metálico e fixado na posição vertical (eixo longo). A carga foi aplicada à área da cabeça femoral cuja linha de força de ação do vetor era paralela ao eixo longo do fêmur, causando movimento de flexão na região

do colo do fêmur. A taxa de deformação foi de 5 mm / min com parâmetros padronizados de células carregadas ajustadas para 2000 N de capacidade (TURNER e BURR, 1997). O carregamento foi aplicado até o osso fraturado. A carga e o deslocamento da barra transversal da máquina foram monitorados e registrados usando o software do dispositivo.

Imunoistoquímica do colo do fêmur

Para a realização da técnica de imunoistoquímica, após a morte dos animais, os fêmures foram retirados, limpos com tecido macio, fixados em formalina tamponada 4% por 24 horas a temperatura ambiente, lavados em água corrente por 12 horas e descalcificados em EDTA 10% (trocado semanalmente) por oito semanas. Após o período de descalcificação, as amostras foram processadas de maneira convencional, emblocadas em parafina (Figura 8) de baixa fusão e submetidas à microtomia (3 µm de espessura), as secções foram realizadas no plano coronal da epífise proximal do fêmur.

Figura 8: Epífises proximais dos fêmures emblocadas em parafina.



Fonte: Laboratório de Endocrinologia e Envelhecimento – UNESP Araçatuba.

As lâminas histológicas com as amostras de todos os grupos experimentais foram submetidas à técnica de imunoperoxidase indireta (Figura 9) para os anticorpos primários: anti-OCN (SC 30044; 1:100; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA),

anti-TRAP (SC 30833; 1:200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) e anti-SOST (obb 100911; 1:500; Biorbyt, São Francisco, CA, USA).

Figura 9: Lâminas histológicas com as amostras de todos os grupos experimentais submetidas à técnica de imunoperoxidase indireta.



Fonte: Laboratório de Endocrinologia e Envelhecimento (procedimento realizado no laboratório de histologia e morfologia) – UNESP Araçatuba.

A diluição dos anticorpos primários foi fundamentada em teste de titulação. O processamento imunoistoquímico foi realizado segundo protocolo descrito por STRINGHETTA-GARCIA et al., 2012.

As secções histológicas do colo do fêmur (osso trabecular e cortical) foram examinadas em microscópio de campo claro (Optiphot-2, Nikon, Japan) por investigador que desconhecia os grupos experimentais. Para análise da imunomarcacão atribuiu-se escores à cada amostra, sendo o padrão de imunomarcacão para TRAP descrito segundo protocolo de STRINGHETTA-GARCIA e colaboradores (2016), onde: escore 3 indica alto padrão, mais de 8 células imunorreativas (IR) por área; escore 2 indica padrão moderado, 3 a 7 células (IR) por área; escore 1 indica baixo padrão, menos de 3 células IR por área e escore 0 indica ausência de imunomarcacão.

Os escores de padrão de imunomarcação para OCN e SOST foram adaptados de STRINGHETTA-GARCIA e colaboradores (2016): escore 3, alto padrão, aproximadamente 75% de células IR por área; escore 2, padrão moderado, aproximadamente 50% de células IR por área; escore 1, baixo padrão, aproximadamente 25% de células IR por área; e escore 0, ausência de imunomarcação. Os escores das imunomarcações foram comparados entre os grupos experimentais.

Reação em cadeia polimerase (PCR) em tempo real diretamente do tecido ósseo do fêmur

As amostras foram maceradas em cadinhos com nitrogênio líquido previamente esterilizados em forno seco. O RNA total foi extraído utilizando o reagente Trizol® (Invitrogen Corporation Attn: EvoQuest™ Laboratório de Serviços 5791 Van Allen Way, CA 92008 EUA) e kit de isolamento de RNA Total SV (Promega, Madison, Wisconsin, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A concentração e a pureza do RNA total foram avaliadas por espectrofotometria com o aparelho GeneQuant 1300 (GE Healthcare, Uppsala, Uppsala County, Suécia – Figura 10). A leitura foi realizada em comprimentos de onda de 260 nm, 280 nm e 230 nm, para obter a concentração de RNA/ μ L, contaminação por proteínas e contaminação por fenol, respectivamente. A tabela 3 demonstra a concentração de RNA (ng/ μ L) das amostras analisadas.

Figura 10: Aparelho GeneQuant 1300 utilizado para quantificar a concentração e pureza do RNA.



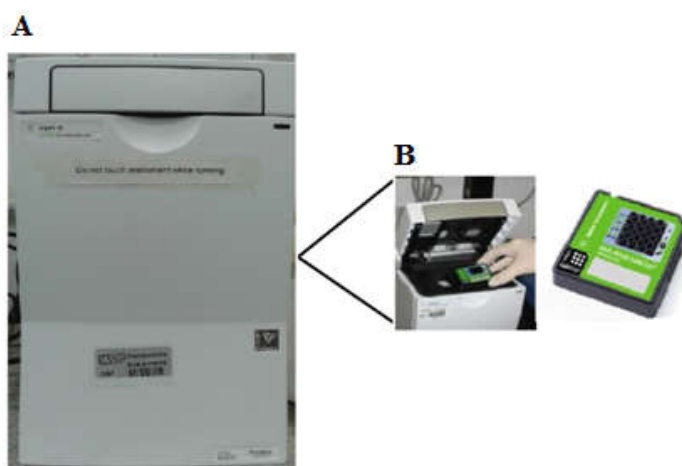
Fonte: domínio público.

Tabela 3: Concentrações de RNA (ng/μL) das amostras analisadas.

Amostra	Concentração de RNAm (ng/μL)
1. Controle	1506
2. Controle	1847
3. Controle	1946
4. Treinamento de Força	2143
5. Treinamento de Força	1900
6. Treinamento de Força	1916
7. Raloxifeno	1640
8. Raloxifeno	1678
9. Raloxifeno	2637
10. Ral + TF	635.6
11. Ral+ TF	1848
12. Ral + TF	2596

A qualidade das amostras de RNA total foi determinada por eletroforese utilizando o dispositivo microfluídico 2100 Agilent Bioanalyzer e o RNA 6000 Nano Chips (Figura 11 - Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). Os resultados foram obtidos com a ajuda do Agilent 2100 Expert Software.

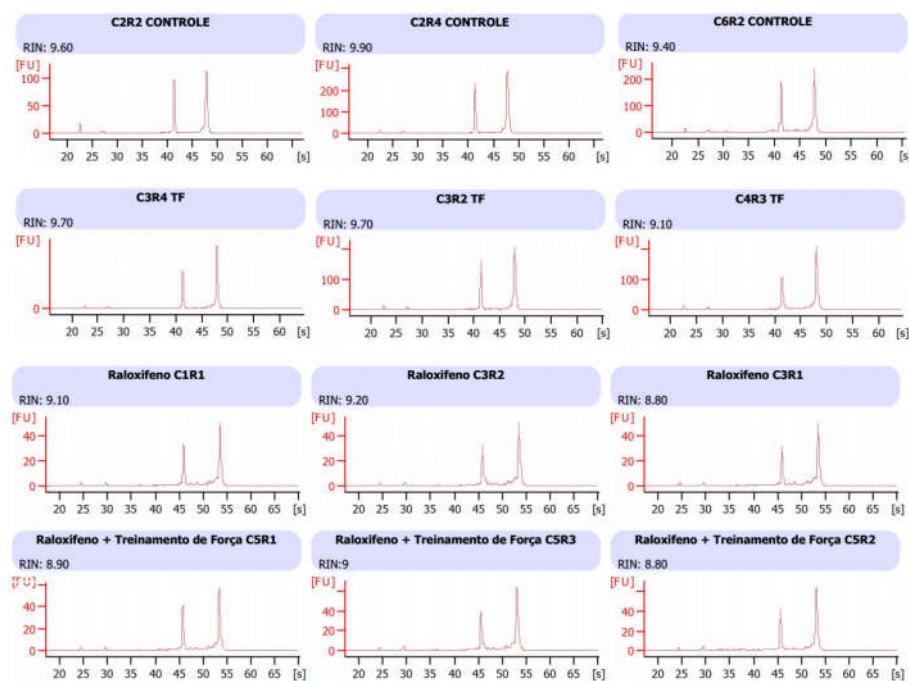
Figura 11: Eletroforese para determinar a qualidade das amostras utilizando o dispositivo microfluídico 2100 Agilent Bioanalyzer (A) e o RNA 6000 Nano Chips (B).



Fonte: (A) Laboratório de Endocrinologia e Envelhecimento – UNESP Araçatuba (procedimento realizado no departamento de morfologia, fisiologia e patologia básica da FORP-USP). (B) Domínio público.

As amostras com Índice de Integridade de Amostra (RIN) acima de 7 (Figura 12) foram consideradas para análise de PCR em tempo real.

Figura 12: Detecção dos RINS das amostras experimentais, amostras de tecido com RIN acima de sete foram consideradas satisfatórias para análise de PCR em tempo real.



Fonte: Stringhetta-Garcia, CT; 2017.

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA total por reação de transcriptase reversa utilizando o Kit de Transcrição Reversa de cDNA de Alta Capacidade (AppliedBiosystems, Foster City, Califórnia, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

As amostras foram então incubadas em termociclador (Eppendorf AG) nas seguintes condições: 25° C/10 min, 37°C/120 min, 85°C/5 min, seguido por resfriamento a 4°C. Após a reação de transcriptase reversa ser completada, as amostras de cDNA foram armazenadas em freezer -20°C.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando o sistema TaqMan (Invitrogen) no aparelho StepOne Plus (Life Technologies, EUA). As reações de PCR em tempo real foram realizadas em triplicata com volume final de 10 µL. A reação de amplificação foi composta por: a) 50°C/2 min, b) 95°C/10 min e c) 40 ciclos a 95° C/15 seg e 60°C/1 min (desnaturação e extensão).

Os resultados foram analisados com base no valor de Ct, que é o ponto correspondente ao número de ciclos em que a amplificação de amostras atinge determinado limiar (medido entre o nível de fluorescência do controle negativo ea fase de amplificação exponencial das amostras), que permitiu a análise quantitativa da expressão do gene relatado. Como controle endógeno, avaliamos a expressão do gene β-actina.

A expressão de controle endógeno foi utilizada para padronizar os níveis de expressão do gene alvo. Uma amostra negativa (água) foi sujeita a reação com cada sonda utilizada. Utilizou-se o método de 2-ΔΔCT (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001) para determinar as sondas TaqMan: fator de transcrição relacionado com runt 2 (*Runx2*), Osterix (*Sp7*), osteocalcina (*Bglap2-Ocn*), fosfatase alcalina (*Alp*), sialoproteína óssea (*Bsp*), fator ativador do receptor NFκappaβ (Tnfrsf11a - *Rank*), ligante do fator ativador do receptor de

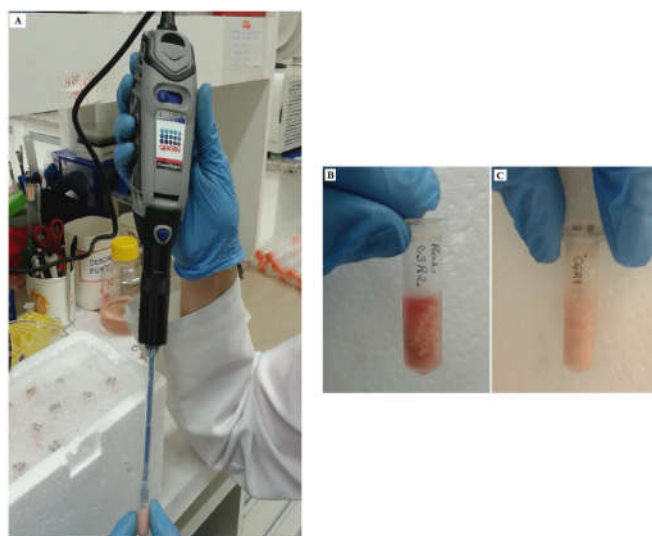
NFkappa β (Tnfsf11 - *Rankl*), Osteoprotegerina (Tnfrsf11b - *Opg*), fosfatase ácida resistente ao tartarato (*Trap*) e Cathepsin K (*Ctsk*).

Western Blot diretamente do tecido ósseo do fêmur

Os fêmures esquerdos dos animais experimentais, imediatamente após serem mortos, foram removidos assepticamente, limpos com tecido macio e instrumentos estéreis. As epífises dos fêmures foram cortadas, a medula óssea lavada com PBS estéril e imediatamente todo o osso foi congelado em nitrogênio líquido em tubo Falcon RNase free em freezer -80°C para análise de Western Blotting (WB) e PCR em tempo real.

Para as análises de WB, foi utilizando protocolo adaptado de WU e colaboradores, 2003. Os fêmures foram macerados em nitrogênio líquido e após ser obtido pó bastante fino foi adicionado o tampão de lise CellLytic suplementado com inibidor de protease e fosfatase (1:1000, Sigma), para auxiliar na lise, o tecido foi submetido ao TissueRuptor (Qiagen – Figura 13) com as amostras em gelo e ao sonicador (3 ciclos, Amplitude 50, 10 segundos one 1 segundo off).

Figura 13: A - Tecido ósseo macerado com nitrogênio líquido e adicionado tampão de lise submetido ao TissueRuptor para melhor maceração. B – Antes e após a submissão do tecido ao TissueRuptor.



Fonte: Laboratório de Endocrinologia e Envelhecimento – UNESP Araçatuba (procedimento realizado no Laboratório de marcadores e sinalização celular no câncer – FCFRP-USP).

Foi realizada quantificação protéica pelo método de Bradford, utilizando o método de ensaio Bio-Rad. As amostras de proteína (80 – 150 µg) foram lavadas com SDS-PAGE e transferidas para membrana de PVDF (Bio-Rad), que foi bloqueada com 5% de leite sem gordura durante uma (01) hora à temperatura ambiente e depois incubadas durante a noite com anticorpo primário (diluição 1:1000) para anti-pER α (Santa Cruz, sc-12915), TRAP(Santa Cruz, sc-28204) e Anti- β -actin (Santa Cruz, sc-47778) como endógeno a 4°C, seguido por uma (01) hora de incubação com anticorpo secundário (diluído 1: 10.000) anti-cabra (KLC) anticorpos secundários conjugado a peroxidase de raiz forte. A detecção de quimioluminescentimunoblotting foi realizada utilizando substrato ECL e o sistema QuimDoc™ MP (BioRad). A quantificação de WB foi feita com o software ChemiDoc™ MP System (BioRad) (ImageLab versão 4.1), e foi normalizada com β -actina.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se ANOVA de duas vias. Pós teste de Tukey foi realizado para análises que não apresentaram interações significativas, $p < 0,05$ foram considerados como estatisticamente significativos. Os dados foram apresentados como média $\pm$ EPM, os grupos foram compostos de 10 animais ($n = 7$ para micro-CT, força óssea, densidade óssea, imunoistoquímica e superfície de osteoclastos; $n = 3$ para análises de expressão de genes e Western Blot). As análises estatísticas foram realizadas utilizando GraphPadPrism (versão 6.01, GraphPad Software, Inc).

DESCRIÇÃO DOS RESULTADOS

Parâmetros fisiológicos

A análise do ciclo estral de ratas Wistar de 17 meses demonstrou que as alterações iniciais foram marcadas por aumento na variabilidade na duração das fases do ciclo estral, com diestro de 10-12 dias. Este período é definido como diestro persistente, com recorrência dentro de 3 ou 4 ciclos com ciclo de comprimento variável, caracterizando o período de periestropausa nestes animais.

Após 120 dias de intervenção, não foram observados efeitos significantes do tratamento com Ral, da realização de TF ou interações de TF*Ral no peso corporal, peso uterino e concentração plasmática de estradiol ($p > 0,05$, Tabela 4).

Tabela 4: Peso corporal final, peso uterino/100 g de peso corporal e concentração plasmática de estradiol (pg/mL) de ratas Wistar fêmeas envelhecidas que realizaram ou não treinamento de força, tratados durante 120 dias com NaCl ou Ral. Os valores representam a média $\pm$ EPM. NT-NaCl = não treinadas e tratadas com veículo; NT-Ral = não treinadas e tratadas com raloxifeno; TF-NaCl = treinadas e tratadas com veículo; TF-Ral = treinadas e tratadas com raloxifeno.

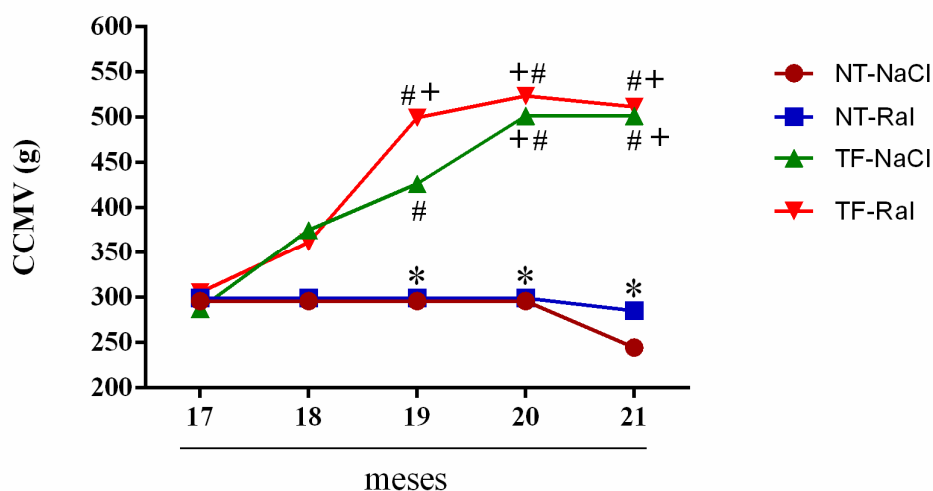
Grupo	Peso Corporal Final (g)	Peso Uterino (g)	Estradiol (pg/mL)
NT-NaCl	377,2 $\pm$ 19,93	0,1817 $\pm$ 0,005	32,28 $\pm$ 1,35
NT-Ral	376,0 $\pm$ 11,66	0,1910 $\pm$ 0,009	31,87 $\pm$ 2,29
TF-NaCl	371,3 $\pm$ 8,75	0,1550 $\pm$ 0,016	32,91 $\pm$ 1,15
TF-Ral	323,3 $\pm$ 14,59	0,1450 $\pm$ 0,009	33,25 $\pm$ 0,455

Capacidade de carga máxima voluntária (CCMV)

As CCMV realizadas mensalmente demonstraram que os animais treinados tiveram a força máxima aumentada desde o 19º mês, quando comparados com os animais que não

realizaram treinamento. Os animais treinados apresentaram maior força máxima aos 21 meses em relação aos 17 meses, comprovando a evolução de força no decorrer dos meses. O grupo TF-Ral apresentou força máxima estatisticamente aumentada aos 19 meses quando comparado aos 18 meses, o que não conferiu força máxima aumentada ao final do treinamento em relação aos demais grupos treinados. A figura 14 demonstra a evolução dos testes de força máxima dos animais experimentais.

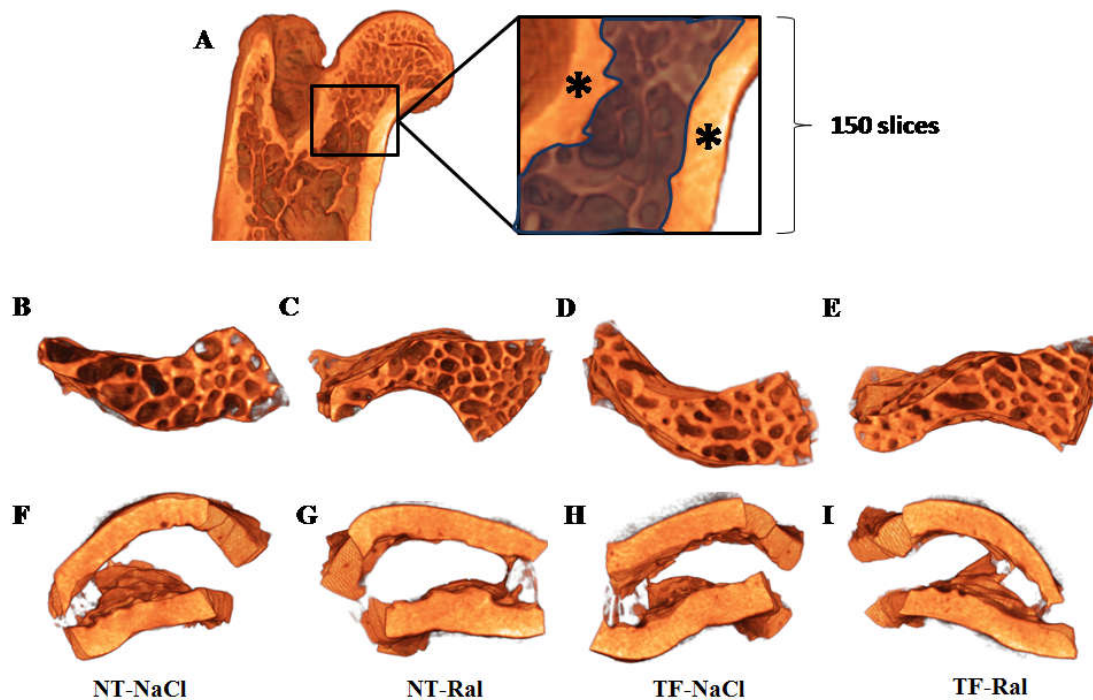
Figura 14: Capacidade de Carga Máxima Voluntária (CCMV) de ratas Wistar na periostropausa que realizaram ou não treinamento de força, tratadas durante 16 semanas com NaCl ou Ral. Os valores representam a média $\pm$ EPM. NT-NaCl = não treinadas e tratadas com veículo; NT-Ral = não treinadas e tratadas com raloxifeno; TF-NaCl = treinadas e tratadas com veículo; TF-Ral = treinadas e tratadas com raloxifeno; * $p < 0,05$ vs TF-NaCl e TF-Ral, # $p < 0,05$ vs 17 meses, + $p < 0,05$ vs 18 meses.



Microarquitetura óssea do colo do fêmur após tratamento com Ral e/ou TF

As imagens representativas trabecular e cortical em 3D do colo do fêmur de ratas Wistar após o tratamento com Ral, TF ou associação destes está demonstrada na figura 15 (A-I).

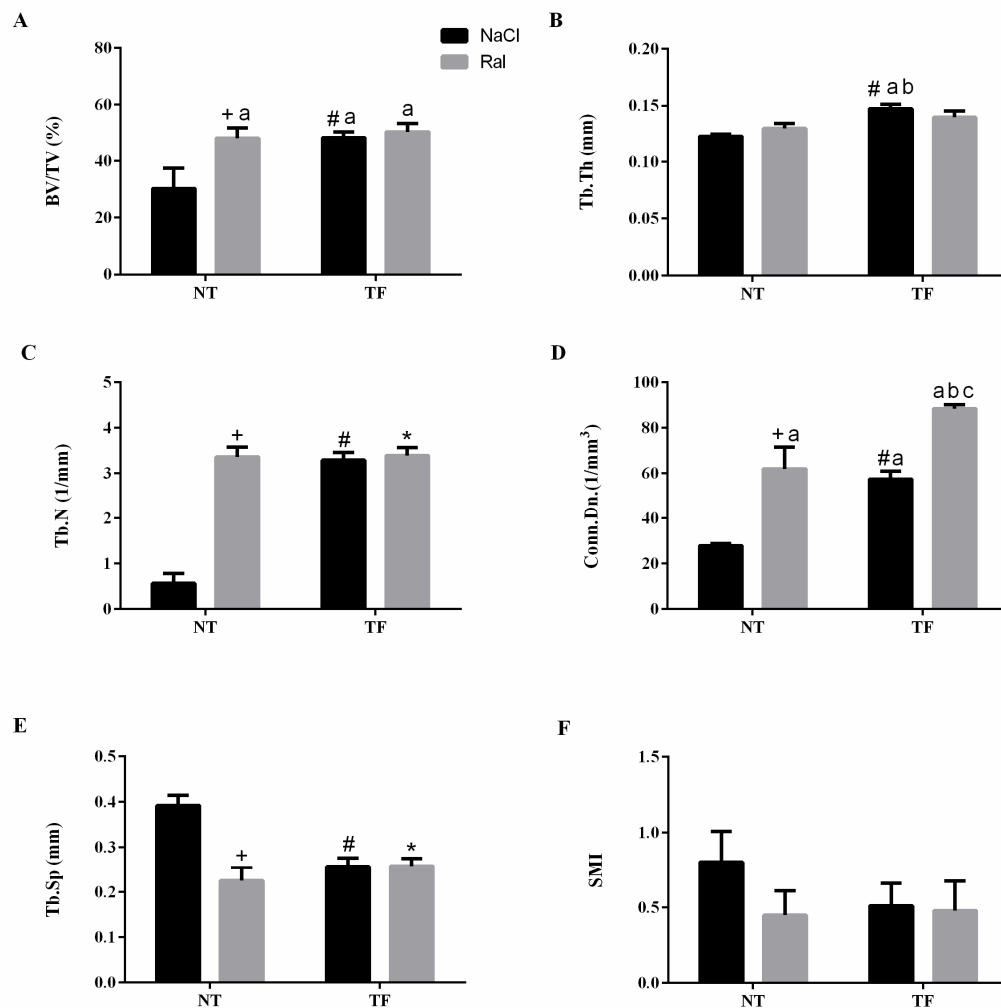
Figura 15: Representação em 3D do colo do fêmur de ratas Wistar no período do envelhecimento. (A) Região de interesse na região trabecular hachurada em azul e cortical representada com *. (B e F) região trabecular e cortical do colo do fêmur de animais que não receberam tratamento nem treinamento. (C e G) região trabecular e cortical do colo do fêmur após o tratamento com Ral. (D e H) região trabecular e cortical do colo do fêmur após realização de TF. (E e I) região trabecular e cortical do colo do fêmur após o tratamento com Ral associado a TF.



A análise da microarquitetura óssea trabecular do colo do fêmur de ratas Wistar após intervenção com Ral, TF ou associação destes está demonstrada na figura 16. A análise de BV/TV demonstrou efeitos do tratamento com Ral ($p = 0,0290$) e do TF ($p = 0,0266$), todavia não foi observada interação significativa de TF*Ral. A análise do pós teste de Tukey demonstrou que os animais dos grupos NT-Ral ($p = 0,0359$), TF ($p = 0,0338$) e TF-Ral ($p = 0,0243$) apresentaram maior BV/TV quando comparados ao grupo NT-NaCl.

Após 120 dias de TF, foi observado efeitos do TF na espessura trabecular (Tb.Th) do colo do fêmur dos animais do grupo TF-NaCl, todavia não foram observados efeitos do Ral ou da interação TF*Ral. Os animais do grupo TF-NaCl apresentaram aumento de Tb.Th em relação aos animais dos grupos NT-NaCl ($p = 0,0041$) e NT-Ral ($p = 0,0416$). A análise de Tb.N e Tb.Sp demonstraram efeitos de Ral ($p < 0,0001$ e $p = 0,0030$, respectivamente) e TF ($p < 0,0001$ e $p = 0,0447$, respectivamente), além de interação TF*Ral ($F_{(1,15)} = 42,92$, $p < 0,0001$; $F_{(1,12)} = 14,06$, $p = 0,0028$, respectivamente). A Conn.Dn foi afetada pelo tratamento com Ral ($p < 0,0001$), realização de TF ($p = 0,0003$), mas não pela interação das terapias. O pós teste estatístico demonstrou que a Conn.Dn foi maior no grupo NT-Ral ($p = 0,0039$), TF-NaCl ($p = 0,0238$) e TF-Ral ($p < 0,0001$) comparados ao grupo NT-NaCl. O índice de modelo estrutural (SMI) não foi afetado pelos tratamentos.

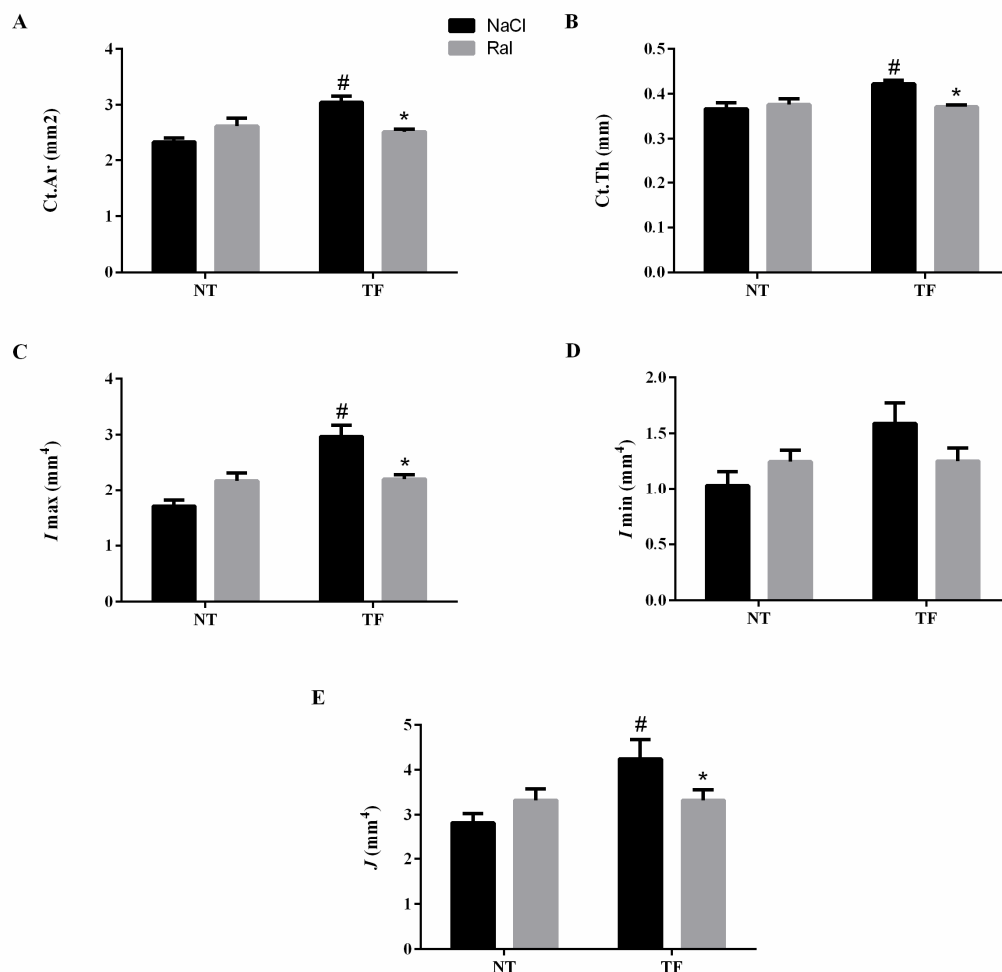
Figura 16: Microarquitetura óssea trabecular do colo do fêmur de ratas Wistar na periostropausa que realizaram TF ou não, tratadas durante 16 semanas com NaCl ou Ral. (A) BV/TV, (B) Tb.Th, (C) Tb.N, (D) Conn.Dn, (E) Tb.Sp, (F) SMI. Cada coluna representa média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Análise estatística ANOVA de duas vias, seguida pelo pós teste de Tukey ($p < 0,05$) para avaliar os efeitos do TF e Ral, ou interações dos tratamentos (TF*Ral). Abreviações e símbolos: + efeitos isolados de Ral, # efeitos isolados de TF, * interação de TF*Ral, ^avs NT-NaCl; ^bvs NT-Ral; ^cvs TF-NaCl. TF = treinamento de força; Ral = raloxifeno; TF*Ral = interação de TF e Ral; NT-NaCl = não treinadas e tratadas com veículo; NT-Ral = não treinadas e tratadas com Ral; TF-NaCl = treinadas e tratadas com veículo; TF-Ral = treinadas e tratadas com Ral; BV/TV = fração de volume ósseo; Tb.Th = espessura trabecular; Tb.N = número de trabéculas; Conn.Dn = densidade de conexões; Tb.Sp = separação trabecular; SMI = índice de modelo estrutural.



A ação do tratamento com Ral, realização de TF ou associação de TF*Ral por 120 dias na microarquitetura óssea cortical do colo do fêmur de ratas Wistar no período do envelhecimento (Figura 17) demonstrou que Ct.Ar e Ct.Th foram modulados pelo TF ($p = 0,115$ e $p = 0,0294$, respectivamente) e pela interação dos tratamentos ($F_{(1,15)} = 14,53$, $p = 0,0017$ e $F_{(1,11)} = 8,943$, $p = 0,0123$, respectivamente), enquanto não foram observados efeitos de Ral. O momento máximo de inércia (I_{max}) e momento polar de inércia (J) foram afetados pelo TF (TF-NaCl - $p = 0,0010$ e $p = 0,0311$, respectivamente) e pela interação dos tratamentos TF*Ral ($F_{(1,12)} = 16,95$, $p = 0,0014$ e $F_{(1,16)} = 5,683$, $p = 0,0299$, respectivamente), efeitos do Ral não foram observados. O I_{min} não foi modulado pelos tratamentos.

Figura 17: Microarquitetura óssea cortical do colo do fêmur de ratas Wistar na periostropausa que realizaram TF ou não, tratadas durante 16 semanas com NaCl ou Ral. (A) Ct.Ar, (B) Ct.Th, (C) I_{max} , (D) I_{min} , (E) J .

Cada coluna representa média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Análise estatística ANOVA de duas vias, seguida pelo pós teste de Tukey ($p < 0,05$) para avaliar os efeitos do TF e Ral, ou interações dos tratamentos (TF*Ral). Abreviações e símbolos: + efeitos isolados de Ral, # efeitos isolados de TF, * interação de TF*Ral; TF = treinamento de força; Ral = raloxifeno; TF*Ral = interação de TF e Ral; NT-NaCl = não treinadas e tratadas com veículo; NT-Ral= não treinadas e tratadas com Ral; TF-NaCl = treinadas e tratadas com veículo; TF-Ral = treinadas e tratadas com Ral; Ct.Ar = área cortical; Ct.Th = espessura cortical; I_{max} = média do momento de inércia máximo principal (max); I_{min} = média do momento de inércia mínimo principal (mix); J =momento polar de inércia médio.

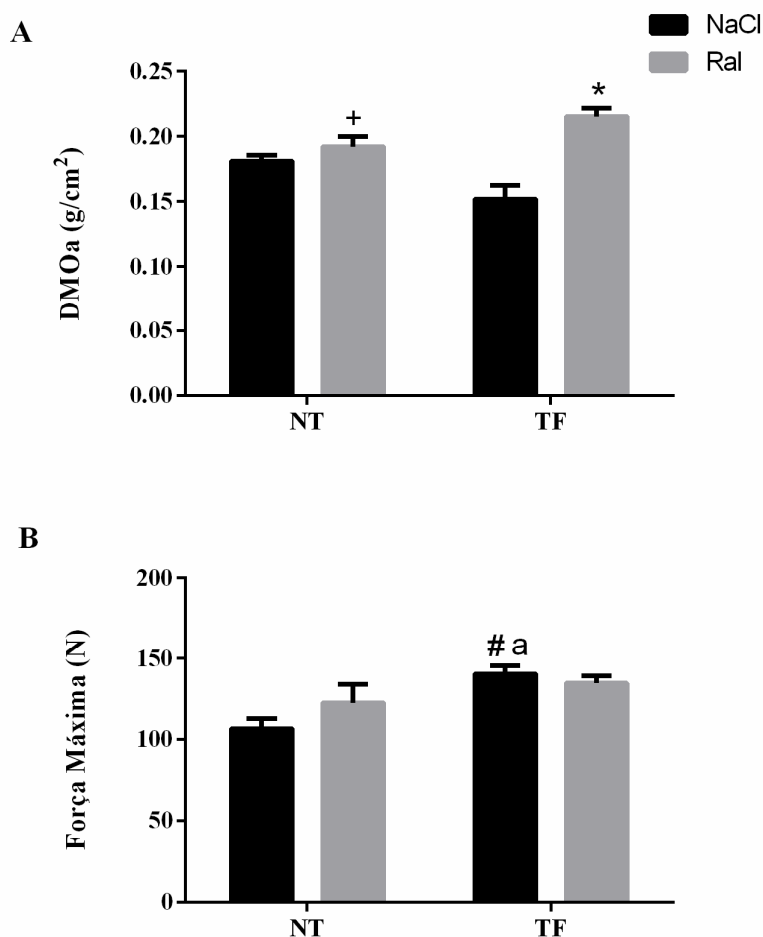


Força máxima e massa óssea do colo do fêmur após tratamento com Ral e/ou TF

A figura 18 demonstra força óssea e massa óssea do colo do fêmur de ratas Wistar após o tratamento com Ral, TF ou TF*Ral.

A massa óssea foi significativamente afetada pelo tratamento com Ral ($p < 0,0001$) e pela interação TF*Ral ($F_{(1,26)} = 10,46$, $p = 0,0033$), porém não foi afetada pelo TF. Todavia, a força máxima foi modulada apenas pelo TF ($p = 0,0078$), não foram observados efeitos significativos de Ral ou interação TF*Ral. O pós teste demonstrou que a força máxima nos animais TF-NaCl ($p = 0,0067$) foi significativamente maior que nos animais do grupo NT-NaCl.

Figura 18: Densidade Mineral óssea areal (DMOa) e força máxima do colo do fêmur de ratas Wistar na periostropausa que realizaram TF ou não, tratadas durante 16 semanas com NaCl ou Ral. (A) DMOa analisada por densitometria óssea e (B) Força Máxima analisada por ensaio biomecânico de compressão. Cada coluna representa média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Análise estatística ANOVA de duas vias, seguida pelo pós teste de Tukey ($p < 0,05$) para avaliar os efeitos do TF e Ral, ou interações dos tratamentos (TF*Ral). Abreviações e símbolos: + efeitos isolados de Ral, # efeitos isolados de TF, * interação de TF*Ral, ^avs NT-NaCl. TF = treinamento de força; Ral = raloxifeno; TF*Ral = interação de TF e Ral; NT-NaCl = não treinadas e tratadas com veículo; NT-Ral= não treinadas e tratadas com Ral; TF-NaCl = treinadas e tratadas com veículo; TF-Ral = treinadas e tratadas com Ral.



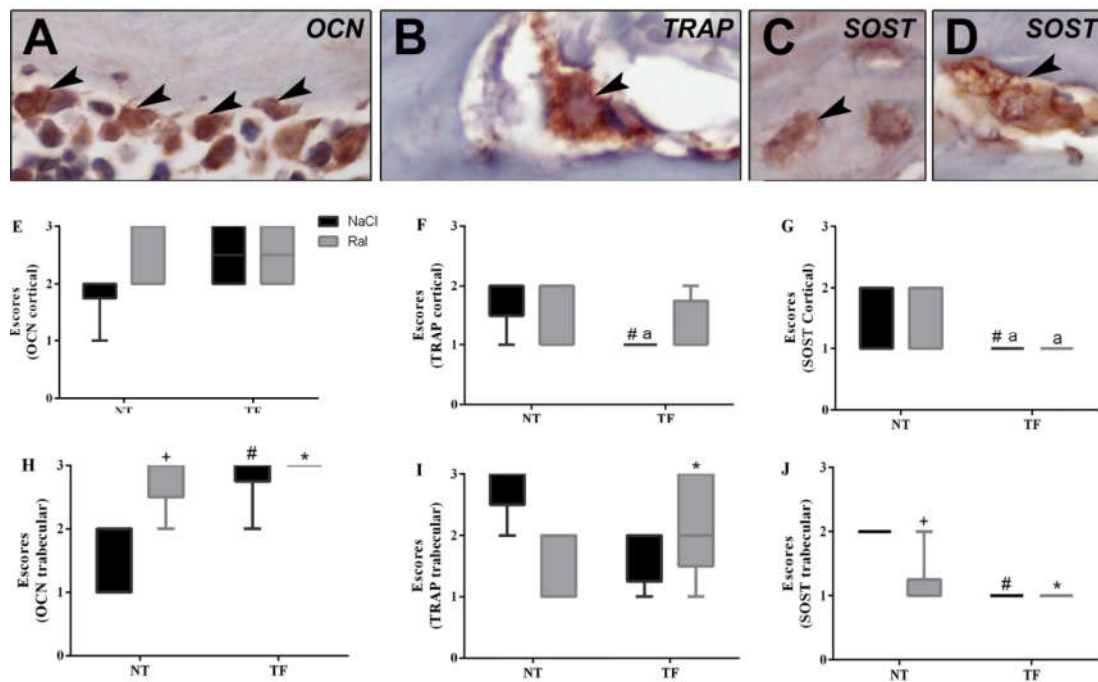
Biomarcadores ósseos do colo do fêmur após tratamento com Ral e/ou TF

O método imunoistoquímico utilizado para detectar OCN, TRAP e SOST mostraram alta especificidade para essas proteínas, o que foi confirmado pela completa ausência de imunomarcacão nos controles negativos. Imunomarcacão para OCN foi predominantemente expressa no citosol de osteoblastos, TRAP em osteoclastos multinucleados e SOST em osteócitos e alguns osteoclastos. O padrão de imunomarcacão e as análises imunoistoquímicas para todos os biomarcadores estão demonstrados na figura 19.

Na região cortical do colo do fêmur de ratas Wistar no período do envelhecimento após a realizacão de TF, Ral ou associacão destes, observamos modulacão na imunomarcacão de TRAP ($p = 0,0294$) e SOST ($p = 0,0048$) nos animais submetidos a TF, enquanto não foram observadas diferencas com o tratamento com Ral ou a interaçao dos tratamentos TF*Ral. A análise do pós teste demonstrou que a imunomarcacão para TRAP na região cortical foi diminuída no grupo TF-NaCl ($p = 0,0437$) comparado ao grupo NT-NaCl e a imunomarcacão de SOST foi diminuída nesta região no grupo TF-NaCl ($p = 0,0386$) e TF-Ral ($p = 0,0287$) em relaçao ao grupo NT-NaCl. A imunomarcacão para OCN na região cortical não foi afetada pelos tratamentos.

Na região trabecular do colo do fêmur, observamos interaçoes de TF*Ral na imunomarcacão de OCN ($F_{(1,19)} = 8,549$; $p = 0,0087$), TRAP ($F_{(1,15)} = 10,88$; $p = 0,0049$) e SOST ($F_{(1,19)} = 22,62$, $p = 0,0001$). Ral e TF isolados modularam a imunomarcacão de OCN ($p = 0,0009$; $p = 0,0006$) e SOST ($p = 0,0001$; $p < 0,0001$).

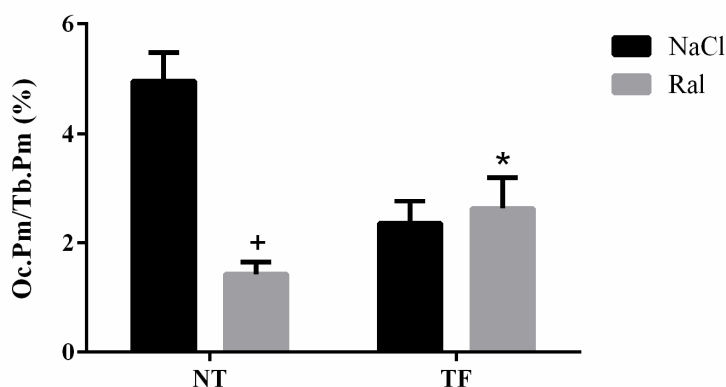
Figura 19: Imunoistoquímica para OCN, TRAP e SOST. A-D: Fotomicrografias mostrando osteoblastos OCN-positivos (A), osteoclastos TRAP-positivos (B), osteócitos SOST-positivos (C) e osteoclastos SOST-positivos. E-J: Gráficos demonstrando a distribuição dos escores para OCN (E e H), TRAP (F e I) e SOST (G e J) na região óssea cortical e trabecular do colo do fêmur nos diferentes grupos experimentais. Cada coluna representa mediana, primeiro e terceiro quartil. Análise estatística ANOVA de duas vias, seguida pelo pós teste de Tukey ($p < 0,05$) para avaliar os efeitos do TF e Ral, ou interações dos tratamentos (TF*Ral). Abreviações e símbolos: + efeitos isolados de Ral, # efeitos isolados de TF, * interação de TF*Ral, ^avs NT-NaCl. TF = treinamento de força; Ral = raloxifeno; TF*Ral = interação de TF e Ral; OCN = osteoclastina; TRAP = fosfatase ácida resistente ao tartarato; NT-NaCl = não treinadas e tratadas com veículo; NT-Ral = não treinadas e tratadas com Ral; TF-NaCl = treinadas e tratadas com veículo; TF-Ral = treinadas e tratadas com Ral.



Superfície de osteoclastos do colo do fêmur após tratamento com Ral e/ou TF

A análise da superfície de osteoclastos (Oc.Pm/Tb.Pm) no osso trabecular do colo do fêmur está demonstrado na figura 20. Foi observado efeito do Ral ($p = 0,0022$) e interação de TF*Ral ($F_{(1,12)} = 20,55$; $p = 0,0007$). Oc.Pm/Tb.Pm não foi afetada pelo TF.

Figura 20: Perímetro de osteoclastos / perímetro trabecular (Oc.Pm/Tb.Pm) do colo do fêmur de ratas Wistar na periostropausa que realizaram TF ou não, tratadas durante 16 semanas com NaCl ou Ral avaliado através de células TRAP-positivas na técnica imunoistoquímica analisadas pelo software *Image J*. Cada coluna representa média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Análise estatística ANOVA de duas vias, seguida pelo pós teste de Tukey ($p < 0,05$) para avaliar os efeitos do TF e Ral, ou interações dos tratamentos (TF*Ral). Abreviações e símbolos: + efeitos isolados de Ral, # efeitos isolados de TF, * interação de TF*Ral; TF = treinamento de força; Ral = raloxifeno; TF*Ral = interação de TF e Ral; NT-NaCl = não treinadas e tratadas com veículo; NT-Ral = não treinadas e tratadas com Ral; TF-NaCl = treinadas e tratadas com veículo; TF-Ral = treinadas e tratadas com Ral.



Expressão relativa de RNAm ósseos do fêmur após tratamento com Ral e/ou TF

A figura 21 demonstra a expressão relativa de RNAm do fêmur de ratas Wistar no período do envelhecimento após terapia com TF, Ral ou associação de TF e Ral. Verificamos que TF ($p = 0,0097$) e Ral ($p = 0,0003$) modularam a expressão de *Runx2*, fator de transcrição essencial para a diferenciação osteoblástica. A realização simultânea de TF e Ral não demonstrou nenhuma interação. A análise do pós teste demonstrou que a expressão de *Runx2* foi diminuída no grupo NT-Ral quando comparado com os grupos NT-NaCl ($p =$

0,0113) e TF-NaCl ($p = 0,0004$). O grupo TF-Ral demonstrou diminuição da expressão de *Runx2* comparado ao grupo TF-NaCl ($p = 0,0236$).

Sp7 (Osterix), outro fator de transcrição essencial para a osteoblastogênese demonstrou significantes efeitos na expressão após tratamento com Ral ($p = 0,0360$) e TF ($p = 0,0160$) assim como interação de TF*Ral ($F_{(1,12)} = 7,005$; $p = 0,0213$).

A análise de marcadores osteoblásticos demonstrou efeitos isolados de Ral, TF e interação de TF*Ral na expressão relativa de *Alp* ($p = 0,0396$; $p < 0,0001$ e $F_{(1,12)} = 23,47$, $p = 0,0004$, respectivamente), *Bsp* ($p = 0,0080$; $p < 0,0001$ e $F_{(1,12)} = 55,17$; $p < 0,0001$, respectivamente) e *Ocn* ($p < 0,0001$; $p < 0,0001$ e $F_{(1,12)} = 121,2$; $p < 0,0001$, respectivamente).

A análise de marcadores osteoclásticos, demonstrou que a expressão de *Rank* foi modulada pelo tratamento com Ral ($p < 0,0001$), TF ($p < 0,0001$) e interação de TF*Ral ($F_{(1,12)} = 27,75$, $p = 0,0002$). A expressão de *Rankl*, regulador osteoclastogênico, apresentou expressão modulada por Ral ($p < 0,0001$), TF ($p = 0,0137$) e interação TF*Ral ($F_{(1,12)} = 25,69$, $p = 0,0003$). Todavia, a expressão de *Opg*, fator isca para Rankl, foi afetado pelo tratamento com Ral ($p < 0,0001$) e TF ($p < 0,0001$), mas não foram observadas interações de TF*Ral. O pós teste demonstrou que a expressão de *Opg* no grupo NT-Ral foi diminuída em relação aos grupos NT-NaCl ($p < 0,0001$), TF-NaCl ($p < 0,0001$) e TF-Ral ($p = 0,0023$). A expressão relativa de *Opg* foi aumentada no grupo TF-NaCl comparado aos grupos NT-NaCl ($p < 0,0001$) e TF-Ral ($p < 0,0001$). O grupo TF-Ral apresentou expressão diminuída em relação ao grupo NT-NaCl ($p < 0,0001$).

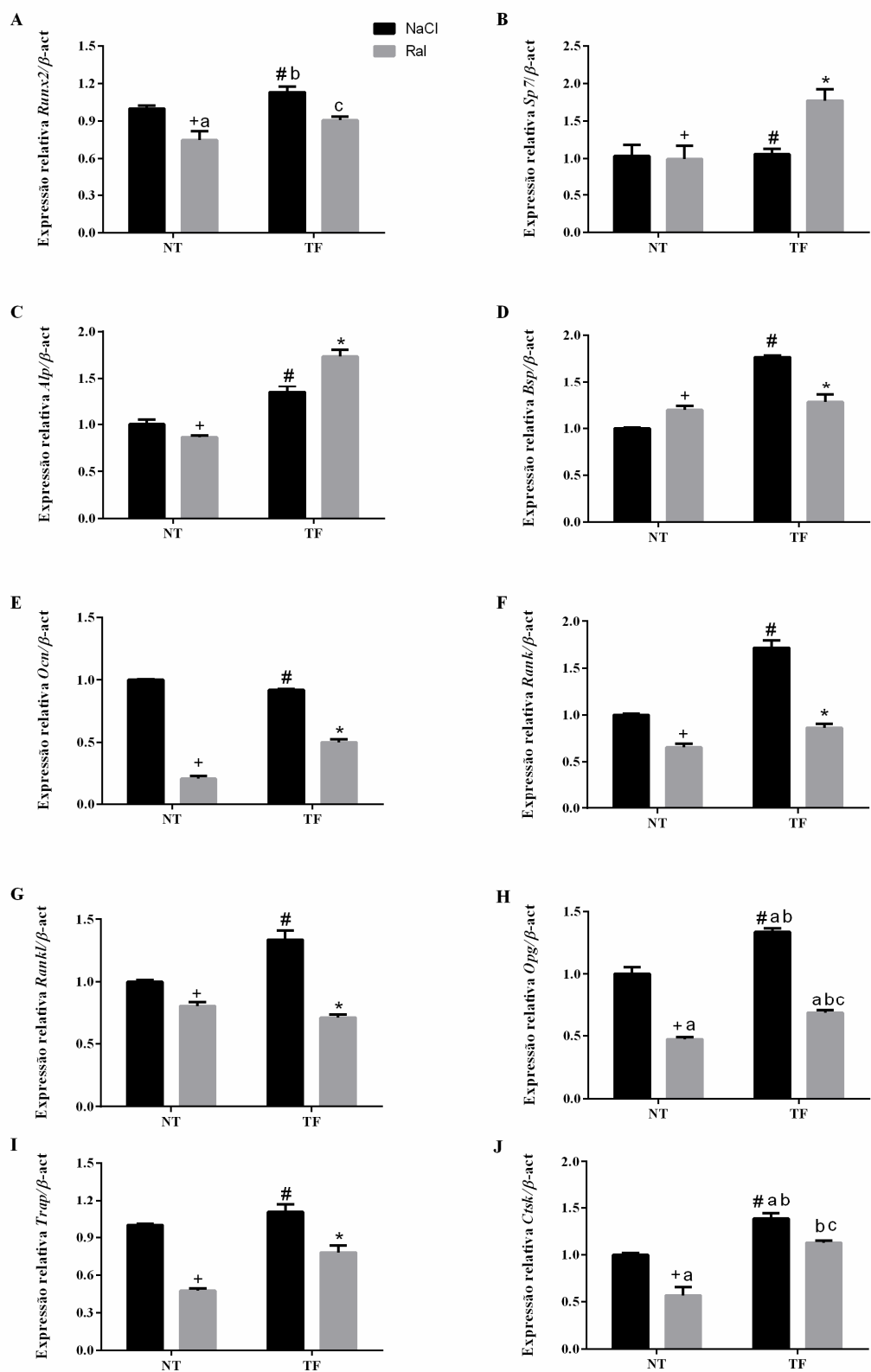
A expressão relativa de *Trap*, marcador osteoclástico, demonstrou modulação por Ral ($p < 0,0001$), TF ($p = 0,0004$) e interação de TF*Ral ($F_{(1,12)} = 5,644$; $p = 0,0350$). *Ctsk*, marcador osteoclástico, revelou modulação por Ral ($p < 0,0001$) e TF ($p < 0,0001$), mas interações de TF*Ral não foram observadas. A análise do pós teste demonstrou expressão de

Ctsk diminuída no grupo NT-Ral em relação aos grupos NT-NaCl ($p = 0,0006$), TF-NaCl ($p < 0,0001$) e TF-Ral ($p = 0,0013$). O grupo TF-NaCl demonstrou expressão aumentada em relação aos grupos NT-NaCl ($p = 0,0017$) e TF-Ral ($p = 0,0296$).

Figura 21: Expressão relativa de RNAm por PCR em tempo real do fêmur de ratas Wistar na periostropausa que realizaram TF ou não, tratadas durante 16 semanas com NaCl ou Ral. (A) *Runx2*, (B) *Sp7*, (C) *Alp*, (D) *Bsp*, (E) *Ocn*, (F) *Rank*, (G) *Rankl*, (H) *Opg*, (I) *Trap*, (J) *Ctsk*. Os valores foram normalizados por β -actina.

Cada coluna representa média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Análise estatística ANOVA de duas vias, seguida pelo pós teste de Tukey ($p < 0,05$) para avaliar os efeitos do TF e Ral, ou interações dos tratamentos

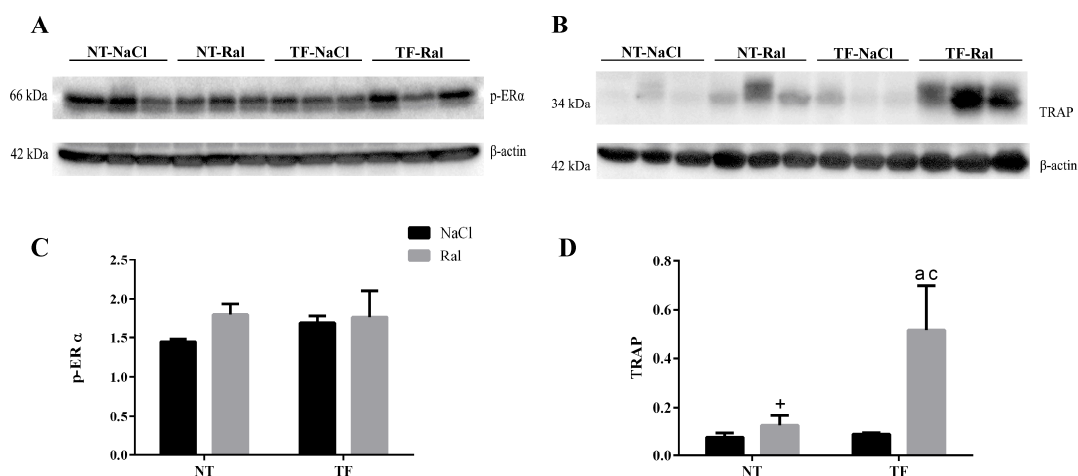
(TF*Ral). Abreviações e símbolos: + efeitos isolados de Ral, # efeitos isolados de TF, * interação de TF*Ral, ^avs NT-NaCl; ^bvs NT-Ral; ^cvs TF-NaCl. TF = treinamento de força; Ral = raloxifeno; TF*Ral = interação de TF e Ral; NT-NaCl = não treinadas e tratadas com veículo; NT-Ral = não treinadas e tratadas com Ral; TF-NaCl = treinadas e tratadas com veículo; TF-Ral = treinadas e tratadas com Ral; *Runx2* = runt-related transcription factor 2; *Sp7* = osterix; *Alp* = fosfatase alcalina; *Bsp* = sialoproteína óssea; *Ocn* = osteocalcina; *Rank* = receptor ativador do fator nuclear kappa- β ; *Rankl* = ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa- β ; *Opg* = osteoprotegerina; *Trap* = fosfatase ácida resistente ao tartarato; *Ctsk* = catepsina K.



Western Blot de p-ER α e TRAP do fêmur após tratamento com Ral e/ou TF

A análise de WB para p-ER α e TRAP do fêmur após tratamento com Ral, TF ou associação deles está demonstrado na figura 22. A quantificação proteica de TRAP foi modulada pelo tratamento com Ral ($p = 0,0355$), TF e a interação de TF*Ral não apresentaram diferenças estatísticas. A análise do pós teste demonstrou que a quantificação de TRAP foi maior no grupo TF-Ral quando comparado aos grupos NT-NaCl ($p = 0,0434$) e TF-NaCl ($p = 0,0499$). A quantificação de p-ER α não foi afetada pelos tratamentos.

Figura 22: Western Blot de TRAP e p-ER α do fêmur de ratas Wistar na peristropausa que realizaram TF ou não, tratadas durante 16 semanas com NaCl ou Ral. Análises de proteínas por Western blot de p-ER α (A) e TRAP (B). Quantificação proteica de p-ER α (C) e TRAP (D) por densitometria utilizando *ImageJ*. Os valores foram normalizados por β -actina. Cada coluna representa média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Análise estatística ANOVA de duas vias, seguida pelo pós teste de Tukey ($p < 0.05$) para avaliar os efeitos do TF e Ral, ou interações os tratamentos (TF*Ral). Abreviações e símbolos: + efeitos isolados de Ral, # efeitos isolados de TF, * interação de TF*Ral, ^avs NT-NaCl; ^bvs NT-Ral; ^cvs TF-NaCl. TF = treinamento de força; Ral = raloxifeno; TF*Ral = interação de TF e Ral; NT-NaCl = não treinadas e tratadas com veículo; NT-Ral= não treinadas e tratadas com Ral; TF-NaCl = treinadas e tratadas com veículo; TF-Ral = treinadas e tratadas com Ra; p-ER α = receptor de estrógeno fosforilado; TRAP = fosfatase ácida resistente ao tartarato.



A tabela 5 sumariza os efeitos individuais de Ral e TF, assim como das interações de TF*Ral, segundo a análise de variância ANOVA de duas vias.

Tabela 5: Resumo dos efeitos individuais de Ral, TF e interações de TF*Ral pela análise de variância ANOVA de duas vias.

		Efeitos Individuais		Interações
		Ral	TF	TF*Ral
Micro-CT Trabecular	BV/TV	0,0290	0,0266	0,0738
	Tb.Th	0,9164	0,0009	0,1003
	Tb.N	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
	Conn.Dn.	< 0,0001	0,0003	0,7930
	Tb.Sp	0,0030	0,0447	0,0028
	SMI	0,3119	0,4860	0,3976
Micro-CT Cortical	Ct.Ar	0,2782	0,0115	0,0017
	Ct.Th	0,0607	0,0294	0,0123
	Imáx	0,3579	0,0010	0,0014
	Imín	0,6515	0,0506	0,0546
	J	0,4923	0,0311	0,0299
DEXA	aBMD	< 0,0001	0,7072	0,0033
Ensaio mecânico	MaximumLoad	0,5209	0,0078	0,1722
Imunoistoquímica	Cortical:			
	OCN	0,091	0,2039	0,0091
	TRAP	0,7093	0,0294	0,1204
	SOST	0,3009	0,0048	0,3009
	Trabecular:			
	OCN	0,0009	0,0006	0,0087
Superfície de osteoclastos	TRAP	0,1109	0,6621	0,0049
	SOST	0,0001	< 0,0001	0,0001
	Oc.Pm/Tb.Pm	0,0022	0,1212	0,0007
PCR em tempo real	Runx2	0,0003	0,0097	0,7709
	Sp7	0,0360	0,0160	0,0213
	Alp	0,0396	< 0,0001	0,0004
	Bsp	0,0080	< 0,0001	< 0,0001
	Ocn	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
	Rank	< 0,0001	< 0,0001	0,0002
	Rankl	< 0,0001	0,0137	0,0003
	Opg	< 0,0001	< 0,0001	0,810
	Trap	< 0,0001	0,0004	0,0350
	Ctsk	< 0,0001	< 0,0001	0,1288
Western Blot	p-Erα	0,287	0,5829	0,4774
	TRAP	0,0355	0,0642	0,0798

DISCUSSÃO

O presente estudo foi desenvolvido para investigar se Ral, TF ou a associação destes, pode ser efetivo na prevenção da diminuição de massa óssea e deterioração da microarquitetura do tecido ósseo, ocorrências com incidência alta durante o envelhecimento fisiológico feminino. Os resultados obtidos neste estudo evidenciaram melhor microarquitetura óssea trabecular e cortical do colo do fêmur, aumento da força óssea bem como diminuição da imunomarcção de SOST e TRAP e aumento de OCN neste sítio de análise após quatro meses de TF. Estas adaptações do tecido ósseo relacionadas ao TF expressam ocorrência de reequilíbrio no ciclo de remodelamento ósseo, constatado pelo aumento da expressão gênica de marcadores relacionados à atividade de osteoblastos e a gênese de osteoclastos, todavia sem aumentar a expressão de TRAP, importante marcador de atividade de osteoclastos. Verificamos também que o tratamento com Ral proporcionou melhora da microarquitetura óssea trabecular do colo do fêmur com aumento da expressão de OCN e diminuição de SOST e TRAP. Todavia, a microarquitetura cortical e força óssea não foram afetadas pelo tratamento medicamentoso, assim como a imunomarcção cortical de OCN, TRAP e SOST. Entretanto, houve diminuição na expressão de genes relacionados com gênese e atividade de osteoclastos. A terapia com TF associado ao tratamento com Ral melhorou a microarquitetura trabecular e DMOa do colo do fêmur, diminuiu a imunomarcção para SOST na região cortical e trabecular, além de aumentar OCN, todavia a associação das terapias não afetou microarquitetura cortical e força óssea neste sítio de análise. Os marcadores gênicos relacionados à osteoblastogênese foram aumentados e os relacionados à osteoclastogênese diminuídos, além de aumento da quantificação protéica de TRAP.

A hipótese do estudo de que ratas no período do envelhecimento submetidas ao treinamento de força teriam melhor resposta osteogênica foi confirmada pelos resultados,

todavia a hipótese que a associação das terapias resultaria em resposta aditiva não foi confirmada, uma vez que não é aumentada pela administração de Ral associada ao TF.

Nossos resultados demonstram claramente que após os tratamentos houve alteração no ciclo de remodelamento ósseo, culminando em respostas diferentes de expressão gênica, imunomarcção, quantificação proteica, microarquitetura, força e densidade ósseas do fêmur de ratas Wistar de 21 meses. Portanto, configuram estratégias válidas para a prevenção ao dano ósseo em período tardio do desenvolvimento. Durante a periostropausa de ratas Wistar (21 meses), observamos no colo do fêmur deterioração óssea similar a encontrada em mulheres durante a menopausa (MANOLAGAS, 2000). Evidenciamos este evento com dados de nosso laboratório, onde demonstramos que ratas de 21 meses apresentam diminuição do tecido ósseo, trabéculas tornam-se mais separadas, concomitantemente ocorre diminuição do momento polar de inércia e menor força máxima do osso. Os dados tomados em conjunto confirmam a deterioração óssea no colo do fêmur de ratas no período do envelhecimento fisiológico.

Os resultados deste estudo fornecem informações relevantes para a literatura, uma vez que demonstra que a microarquitetura do tecido ósseo pode ser ferramenta de análise mais preditiva de força óssea do que densitometria óssea. Apesar de DMO avaliada através do DEXA ser ferramenta amplamente utilizada para avaliar risco de fratura, DEXA convencional mensura conteúdo ósseo integrado em área óssea pré estabelecida. DEXA não avalia diretamente outros elementos que podem contribuir para a força óssea, como tamanho, forma, geometria e quantidade de osso nos compartimentos cortical e trabecular. Devido ao fato de muitas fraturas ocorrer em locais que apresentam DMO normal, precisamos considerar que outros fatores podem determinar força óssea e assim, predizer risco de fraturas, além da DMO. Nesta perspectiva, QCT permite a reconstrução em 3D do osso do quadril e oferece alternativa promissora para avaliar mais precisamente aspectos da

estrutura óssea humana e mensurar separadamente a contribuição do osso cortical e trabecular ao risco de fratura do quadril (BLACK et al., 2008).

A osteoporose resulta da diminuição da formação óssea e consequente diminuição da substituição do fosfato ácido, que varia inversamente com a cristalinidade (tamanho e perfeição do cristal) e esta perda de heterogenicidade do material está associada ao aumento da fragilidade e do risco de fratura (BOSKEY, 2013). No presente estudo, o aumento de DMOa em animais do grupo NT-NaCl e NT-Ral pode ser atribuído à retenção de osso "antigo", com perda de heterogeneidade e aumento do tamanho dos cristais, o que reflete aumento de DMOa, mas não aumento de força óssea. Além disso, trabalho do nosso grupo demonstrou que TF estimula a diferenciação de células ósseas e a formação óssea, com o aumento da expressão de Runx2 e Osx, além de diminuição de Ppar γ , associada à expressão aumentada de Bmp2, Bsp e Ocn. Neste trabalho, mostramos que a microarquitetura trabecular e cortical aumentou após realização de TF, bem como a força óssea, apesar de não aumento de DMOa e atribuímos estes achados à heterogeneidade do osso de animais que praticam ST.

A capacidade de adaptação do tecido ósseo à carga mecânica pode ser claramente entendida pelas consequências da remoção de sinais físicos, que se reflete em rápido aparecimento da osteopenia (OZCIVICI et al., 2013) ou pela imposição de carga mecânica, que se reflete em reequilíbrio do turnover ósseo e consequentemente melhora da microarquitetura óssea, como demonstrado no presente estudo. Com a análise dos dados deste trabalho, observamos alteração relevante no turnover ósseo, com aumento de marcadores de osteoblastogênese e osteoclastogênese após realização de TF (TF-NaCl x NT-NaCl). Nossos resultados evidenciam aumento de expressão relativa de RNAm para *Alp*, *Bsp* e *Rankl*, e diminuição de *Ocn*, consistente com observações realizadas por outros autores (RAAB-CULLEN et al., 1994; KESAVAN et al., 2005). Demonstramos também

diminuição de imunomarcção de TRAP além de aumento de OCN no osso trabecular do colo do fêmur dos animais após a realização de TF, corroborando com estudos prévios (STRINGHETTA-GARCIA et al., 2016). Estes resultados demonstram que carga mecânica desempenha importante função na homeostasia óssea durante situação de diminuição progressiva das concentrações estrogênicas. Carga mecânica, com o protocolo descrito neste estudo, é capaz de suprimir a reabsorção óssea e estimular a formação óssea.

O delineamento deste trabalho nos permitiu avaliar o osso trabecular e cortical da mesma região do colo do fêmur, região que é muito vulnerável a fraturas osteoporóticas e assim demonstramos que o TF previne a deterioração óssea cortical e trabecular que ocorre neste sítio anatômico em decorrência do envelhecimento, culminando em aumento da força óssea, demonstrado pelo melhor desempenho no ensaio mecânico de compressão, além de melhora nos parâmetros momento polar máximo, mínimo e polar de inércia. Ressaltamos que o momento polar de inércia reflete rigidez torsional e a soma dos momentos de inércia da área analisada (MACIAS et al., 2012), sendo preditor da força máxima e rigidez extrínseca (BROWERS et al., 2009). Interessantemente, o grupo TF-NaCl foi o único grupo que quando comparado ao grupo NT-NaCl demonstrou melhora da microarquitetura cortical e força máxima, corroborando com os estudos citados que indicam parâmetros de momento polar de inércia como bons preditores de força óssea. Nossos resultados demonstram também diminuição da imunomarcção para SOST tanto no tecido ósseo cortical quanto trabecular do colo do fêmur dos animais após a realização de TF, corroborando com outros estudos que avaliaram a expressão de esclerostina, proteína codificada pelo gene SOST (MACIAS et al., 2012). Esses dados evidenciam a modulação de SOST pela imposição de carga mecânica e a resposta osteogênica em decorrência da expressão desta proteína e assim, atribuímos este evento, pelo menos em parte, ao fato de apenas os animais do grupo TF-NaCl apresentarem melhora da microarquitetura cortical e força óssea.

O conjunto de resultados obtidos mostra que a resposta óssea à carga mecânica aumentada proporciona reequilíbrio no turnover ósseo, favorece o anabolismo e aumenta a força do osso adicionando matriz para resistir a novos desafios de carga em organismos no período da senescência reprodutiva.

O tratamento com Ral por quatro meses foi benéfico em prevenir perda de massa óssea trabecular, porém não foi capaz de prevenir a perda de massa óssea cortical. Desta maneira, este tratamento modulou os efeitos negativos do envelhecimento reprodutivo feminino sobre a microarquitetura óssea com menor magnitude que o TF. Classicamente, Ral é droga antirreabsortiva responsável por diminuir o turnover ósseo. No presente estudo o tratamento com Ral no período de periostropausa tardia em ratas Wistar promoveu a diminuição do turnover ósseo, assinalado pela redução de marcadores como *Rank*, *Rankl*, *Opg*, *Trap* e *Ctsk*; diminuiu a imunomarcagem para TRAP, além de aumentar para OCN no colo do fêmur, corroborando com estudos de nosso laboratório (STRINGHETTA-GARCIA et al., 2016). Todavia, o tratamento com Ral nesta idade teve efeitos limitados no remodelamento da região cortical, uma vez que a droga não foi capaz de prevenir a diminuição de Ct.Th verificado em animais senis(dados de nosso laboratório não publicados). O osso cortical representa parcela substancial do total de massa óssea do esqueleto apendicular e a força óssea desta região é importante parâmetro para a prevenção de fraturas por fragilidade (ZEBAZE et al., 2010). No presente estudo, a ação não evidenciada no osso cortical do colo do fêmur dos animais após o tratamento com Ral pode ser atribuída à ausência de modulação na imunomarcagem de SOST da região cortical, resultando em não aumento da força óssea máxima.

Na literatura, autores têm investigado a ação do TF associado a drogas antirreabsortivas. Entre esses estudos, destacamos o realizado por MURAI e colaboradores (2015) onde demonstraram que a suplementação de creatinina associada a treinamento físico não resultou

em efeitos aditivos em força, massa ou histomorfometria ósseas em ratas jovens OVX. LESPESSAILLES e colaboradores (2009) estudaram a ação de ácido zoledrônico associado a corrida. Os resultados obtidos não evidenciaram efeitos benéficos adicionais ao fêmur. Todavia, outros estudos demonstram efeito aditivo entre terapias, como estudo realizado por YEH e colaboradores (1993). Estes autores avaliaram ratas Sprague-Dawley OVX com nove meses tratadas com reposição hormonal estrogênica associada a treinamento físico em esteira por seis meses e verificaram efeitos adicionais nas tíbias dos animais experimentais. Até o momento, em nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que avalia se tratamento com Ral associado a TF exerce efeitos aditivos na saúde óssea de ratas no período do envelhecimento fisiológico. A associação de Ral e TF desencadeou respostas de interação na expressão de *Sp7*, *Alp*, *Bsp*, *Ocn*, *Rank*, *Rankl*, *Opg*; de microarquitetura trabecular (Tb.N e Tb.Sp) e DMOa, demonstrando que a ação dos tratamentos para estes parâmetros não acontecem individualmente. Apesar de demonstrarmos a interação dos tratamentos nos parâmetros mencionados acima, e embora tenha ocorrido diminuição da imunomarcagem de SOST na região cortical do colo do fêmur dos animais após a realização de TF associado ao tratamento com Ral, não observamos melhora aditiva na microarquitetura cortical. Esta resposta pode ser atribuída ao aumento de TRAP no osso todo, demonstrado por WB e pela não diminuição de TRAP no colo do fêmur. Toda a dinâmica do processo de remodelamento ósseo propiciada pela associação das terapias não foi capaz de desencadear efeito positivo na microarquitetura cortical e força óssea. De fato, neste grupo (TF*Ral) observamos perda da resposta que o exercício foi capaz de desencadear de maneira isolada. Mediante estes resultados, sugerimos que a proliferação celular relacionada com a tensão mecânica é mediada por mecanorreceptor de estrogênio e não compete com o estrogênio, mas pode ser bloqueada por moduladores ER (DAMIEN et al., 2000).

Estudo prévio desenvolvido por nosso laboratório, com ratas na periostropausa inicial (14 a 18 meses), onde a maior fonte de estrogênio foi abruptamente retirada através de OVX, demonstrou que tratamento com Ral ou TF desempenham efeitos similares no colo do fêmur, mas que a combinação de TF e Ral não traz benefícios adicionais ao tecido ósseo (STRINGHETTA-GARCIA et al., 2016). Em contraste, o presente estudo investigou os efeitos das mesmas intervenções durante a periostropausa tardia, durante o envelhecimento reprodutivo fisiológico (18 a 21 meses) e encontrou que com a diminuição gradual nas concentrações plasmáticas de estrogênio, o TF pode ser usado para a prevenção da deterioração óssea que ocorre neste período; que o tratamento com Ral também é estratégia válida para esta prevenção, mas parece ser menos efetivo que a realização de TF e que a combinação das duas terapias desencadeia alguns efeitos aditivos, mas não levam a efeitos adicionais que justificam o uso da combinação. A figura 23 resume os principais efeitos do tratamento com Ral ou TF no colo do fêmur de ratas Wistar senis.

Figura 23: Resumo dos efeitos principais do tratamento com Ral (estímulo químico) e do TF (estímulo mecânico) sobre o tecido ósseo do colo do fêmur de ratas Wistar senis.



Com isso, podemos concluir que a ocorrência de deterioração óssea detectada na periostropausa tardia pode ser revertida com a utilização de TF, já que o TF teve maior efeito nos parâmetros avaliados. Levando em consideração que a carga mecânica gerada pelo TF afeta também tecidos não esqueléticos pode ser intervenção sistêmica para a prevenção de osteoporose. Todavia a prescrição de TF para a prevenção e tratamento da osteoporose deve ser criteriosa, uma vez que a frequência de exercícios e intensidade de carga são fatores essenciais para o sucesso da terapia. Esses resultados adicionam informações novas à literatura sobre terapêuticas preventivas para osteoporose e fornecem informações relevantes para estudos pré-clínicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIRRE, J. I.; PLOTKIN, L.I.; STEWART, S. A.; WEINSTEIN, A. M.; MANOLAGAS, S. C.; BELLIDO, T. Osteocyte apoptosis is induced by weightlessness in mice and precedes osteoclast recruitment and bone loss. **J. Bone Miner. Res.**, v. 21, n. 4, p. 605-15, 2006.

ANDREOLI, A.; MONTELEONE, M.; VAN LOAN, M.; PROMENZIO, L.; TARANTINO, U.; DE LORENZO, A. Effects of different sports on bone density and muscle mass in highly trained athletes. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 33, n. 4, p. 507-11, 2001.

BAILEY, C. A.; BROOKE-WAVELL, K. Optimum frequency of exercise for bone health: randomised controlled trial of a high-impact unilateral intervention. **Bone**, v. 46, n. 4, p. 1043-9, 2010.

BEARD, J. R.; OFFICER, A.; DE CARVALHO, I. A.; SADANA, R.; POT, A. M.; MICHEL, J. P.; LLOYD-SHERLOCK, P.; EPPING-JORDAN, J. E.; PEETERS, G. M.; MAHANANI, W. R.; THIYAGARAJAN, J. A.; CHATTERJI, S. The World report on ageing and health: a policy framework for healthy ageing. **Lancet**, v.387, n.10033, p.2145-2154, 2016.

BLACK, D.M.; BOUXSSEIN, M.L.; MARSHALL, L.M.; CUMMINGS, S.R.; LANG, T.F.; CAULEY, J.A.; ENSRUD, K.E.; NIELSON, C.M.; ORWOLL, E.S. Proximal Femoral Structure and the Prediction of Hip Fracture in Men: A Large Prospective Study Using QCT. **J. Bone Miner. Res.**, v.23, n. 8, p. 1326-1333, 2008.

BONEWALD, L. F.; JOHNSON, M. L. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. **Bone**, v. 42, n. 4, p. 606-15, 2008.

BONNELYE, E.; AUBIN, J. E. Differential expression of estrogen receptor-related receptor alpha and estrogen receptors alpha and beta in osteoblasts in vivo and in vitro. **J. Bone Miner. Res.**, v. 17, n. 8, p. 1392-400, 2002.

BONNELYE, E.; KUNG, V.; LAPLACE, C., GALSON, D. L., AUBIN, J. E. Estrogen receptor-related receptor alpha impinges on the estrogen axis in bone: potential function in osteoporosis. **Endocrinology**, v. 143, n. 9, p. 3658-70, 2002.

BONNET, N.; BEAUPIED, H.; VICO, L.; DOLLEANS, E.; LAROCHE, N.; COURTEIX, D.; BENHAMOU, C. L. Combined effects of exercise and propranolol on bone tissue in ovariectomized rats. **J. Bone Miner. Res.**, v.22, n.4, p.578-588, 2007.

BOTERO, J. P.; SHIGUEMOTO, G. E.; PRESTES, J.; MARIN, C. T.; DO PRADO, W. L.; PONTES, C. S.; GUERRA, R. L.; FERREIA, F. C.; BALDISSERA, V.; PEREZ, S. E. Effects of long-term periodized resistance training on body composition, leptin, resistin and muscle strength in elderly post-menopausal women. **J. Sports Med. Phys. Fitness**, v.53, n.3, p.289-294, 2013.

BOSKEY, A. L.; COLEMAN, R. Aging and bone. **J. Dent. Res.**, v. 89, n. 12, p. 1333-48, 2010.

BOSKEY, A.L. Bone composition: relationship to bone fragility and antiosteoporotic drug effects. **BoneKey Reports**. v. 447, p. 1-11, 2013.

BOUXSEIN, M.L.; BOYD, S. K.; CHRISTIANSEN, B. A.; GULDBERG, R. E.; JEPSEN, K. J., MULLER, R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using microcomputed tomography. **J. Bone Miner.Res.**, v.25, n.7, p.1468–1486, 2010.

BROWERS, J. E. M.; RIETBERGEN, B.; HUISKES, R.; ITO, K. Effects of PTH treatment on tibial bone of ovariectomized rats assessed by in vivo micro-CT. **Osteoporos. Int.**, v.20, p.1823–1835, 2009.

BUWAY, N.; SAROSI, I.; DUNSTAN, C. R.; MORONY, S.; TARPLEY, J.; CAPPARELLI, C.; SCULLY, S.; TAN, H. L.; XU, W.; LACEY, D. L.; BOYLE, W. J.; SIMONET, W. S. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. **Genes Dev.**, v.12, n. 9, p. 1260-1268, 1998.

BURGESS T. L.; QIAN, Y.; KAUFMAN, S.; RING, B. D.; VAN, G.; CAPPARELLI, C.; KELLEY, M.; HSU, H.; BOYLE, W. J.; DUNSTAN, C. R.; HU S.; LACEY, D. L. The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. **J. Cell Biol.**, v. 145, n. 3, p. 527-38, 1999.

CADORE, E. L.; BRENTANO, M. A.; KRUEL, L. M. Efeitos da atividade física na densidade mineral óssea e na remodelação do tecido ósseo. **Rev. Bras. Med. Esporte**, v. 11, n. 6, p. 373-379, 2005.

CHOW, J. W.; LEAN, J. M.; CHAMBERS, T. J. 17 beta-estradiol stimulates cancellous bone formation in female rats. **Endocrinology**, v. 130, n. 5, p. 3025-32, 1992.

CONDI, F. L.; SOARES, J. M JR.; TEODORO, W. R.; VELOSO, A. P.; PARRA, E. R.; DE JESUS SIMOES, M.; BARACAT, E. C. The effects of conjugated estrogen, raloxifene and soy extract on collagen in rat bones. **Climacteric**, v.15, n.5, p.441-448, 2012.

COWIN, S. C.; WEINBAUM, S. Strain amplification in the bone mechanosensory system. **Am. J. Med. Sci.**, v.316, n.3, p.184-188, 1998.

DATTA, H. K.; NG, W. F.; WALKER, J. A.; TUCK, S. P; VARANASI, S. S. The cell biology of bone metabolism. **J. Clin. Pathol.**, v. 61, n. 5, p. 577-87, 2008.

DAMIEN, E. et al. Mechanical strain stimulates osteoblast proliferation through the estrogen receptor in males as well as females. **J. Bone Miner.Res.**v.15, p.2169-2177, 2000.

ERIKSEN, E. F. Cellular mechanisms of bone remodeling. **Rev. Endocr. Metab. Disord.**, v. 11, n. 4, p. 219-27, 2010.

FERREIRA, L. B.; DE NICOLA, A. C.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; DORNELLES, R. C. Activity of neurons in the preoptic area and their participation in reproductive senescence: Preliminary findings. **Exp. Gerontol.**, v.72, p.157-161, 2015.

GIACOMINI, D. R.; MELLA, E. A. C. **Reposição Hormonal: vantagens e desvantagens. Semina Cienc. Biol. Saude**, v. 17, n. 1, p. 71-92, 2006.

GLASS, D. A.; BIALEK, P.; AHN, J. D.; STARBUCK, M.; PATEL, M. S.; CLEVERS, H.; TAKETO, M. M.; LONG, F.; MCMAHON, A. P.; LANG, R. A.; KARSENTLY, G. Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. **Dev. Cell.**, v. 8, n. 5, p. 751-64, 2005.

GRIMAUD, E.; SOUBIGOU, L.; COUILLAUD, S.; COIPEAU, P.; MOREAU, A.; PASUTTI, N.; GOUIN, F.; REDINI, F.; HEYMANN, D. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) ratio is increased in severe osteolysis. **Am. J. Pathol.**, v. 163, n. 5, p. 2021-31, 2003.

HAN, Y.; COWIN, S. C.; SCHAFFLER, M. B.; WEINBAUM, S. Mechanotransduction and strain amplification in osteocyte cell processes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.101, n.47, p.16689-16694, 2004.

HERTOGHE, T. The "Multiple Hormone Deficiency" Theory of Aging. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v.1057, p.448-465, 2004.

HORNBERGER, T.A.; FARRAR, R.P. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. **Can. J. Appl. Physiol.**, v.29, n.1, p.16-31, 2004.

HU, H.; HILTON, M. J.; TU, X.; YU, K.; ORNITZ, D. M.; LONG, F. Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development. **Development**, v. 132, n. 1, p. 49-60, 2005.

HUGHES, D. E.; DAI, A.; TIFFEE, J. C.; LI, H. H.; MUNDY, G. R.; BOYCE, B., F. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. **Nat. Med.**, v. 2, n. 10, p. 1132-6, 1996.

JOHNELL, O.; KANIS, J. A. An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. **Osteoporos. Int.**, v.17, p.1726, 2006.

KANIS, J. A.; DELMAS, P.; BURCKHARDT, P.; COOPER, C.; TORGERSON, D. Guidelines for diagnosis and management of osteoporosis. The European Foundation for Osteoporosis and Bone Disease. **Osteoporos. Int.**, v. 7, n. 4, p. 390-406, 1997.

KAMEDA, T.; MANO, H.; YUASA, T.; MORI, Y.; MIYAZAWA, K.; SHIOKAWA, M.; NAKAMARU, Y.; HIROI, E.; HIURA, K.; KAMEDA, A.; YANG, N. N.; HAKEDA, Y.; KUMEGAWA, M. Estrogen inhibits bone resorption by directly inducing apoptosis of the bone-resorbing osteoclasts. **J. Exp. Med.**, v. 186, n. 4, p. 489-95, 1997.

KEARNS, A. E.; KHOSLA, S.; KOSTENUICK, P. J. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. **Endocr. Rev.**, v. 29, n. 2, p. 155-92, 2008.

KESAVAN, C.; MOHAN, S.; OBERHOLTZER, S.; WERGEDAL, J. E.; BAYLINK, D. J. Mechanical loading-induced gene expression and BMD changes are different in two inbred mouse strains. **J. Appl. Physiol.**, v.99, p.1951–1957, 2005.

KHOSLA, S.; ATKINSON, E. J.; MELTON, L. J.; RIGGS, B. L. Effects of age and estrogen status on serum parathyroid hormone levels and biochemical markers of bone turnover in women: a population-based study. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 82, n. 5, p. 1522-7, 1997.

KHOSLA, S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. **Endocrinology**, v.142, n.12, p.5050-5055, 2001.

KONG, Y. Y.; YOSHIDA, H.; SAROSI, I.; TAN, H. L.; TIMMS, E.; CAPPARELLI, C.; MORONY, S.; OLIVEIRA-DOS-SANTOS, A. J.; VAN, G.; ITIE, A.; KHOO, W.; WAKEHAM, A.; DUNSTAN, C. R.; LACEY, D. L.; MAK, T. W.; BOYLE, W. J.; PENNINGER, J. M. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. **Nature**, v.397, n.6717, p. 315–23, 1999.

KÓSA, J.P.; BALLA, B.; SPEER, G.; KISS, J.; BORSY, A.; PODANI, J.; TAKÁCS, I.; LAZÁRY, A.; NAGY, Z.; BÁCSI, K.; OROSZ, L.; LAKATOS, P. Effect of menopause on gene expression pattern in bone tissue of nonosteoporotic women. **Menopause**, v. 16, n. 2, p. 367-77, 2009.

LEE, K.; JESSOP, H.; SUSWILLO, R.; ZAMAN, G.; LANYON, L. Endocrinology: bone adaptation requires oestrogen receptor-alpha. **Nature**, v. 424, n. 6947, p. 389, 2003.

LESPESSAILLES, E.; JAFFRÉ, C.; BEAUPIED, H.; NANYAN, P.; DOLLÉANS, E.; BENHAMOU, C. L.; COURTEIX, D. Does exercise modify the effects of zoledronic acid on bone mass, microarchitecture, biomechanics, and turnover in ovariectomized rats? **Calcif. Tissue Int.**, v. 85, p.146–157, 2009.

LI, J.; SAROSI, I.; YAN, X. Q.; MORONY, S.; CAPPARELLI, C.; TAN, H. LL; MCCABE, S.; ELLIOTT, R.; SCULLY, S.; VAN, G.; KAUFMAN, S.; JUAN, S. C.; SUN, Y.; TARPLEY, J.; MARTIN, L.; CHRISTENSEN, K.; MCCABE, J.; KOSTENUIK, P.; HSU, H.; FLETCHER, F.; DUNSTAN, C. R.; LACEY, D. L.; BOYLE, W. J. RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, n. 4, p. 1566-1571, 2000.

LI, X.; ZHANG, Y.; KANG, H.; LIU, W.; LIU, P.; ZHANG, J.; HARRIS, S. E.; WU, D. Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 20, p. 19883-19887, 2005.

LIVAK, K.J. & SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta DeltaC(T)) Method. **Methods**, v.25, n.4, p.402-408, 2001.

LONG, J. A.; EVANS, H. M. The oestrus cycle in the rat and its related phenomena. **Mem. Univer. Calif.**, v. 6, p. 1-148, 1922.

MACIAS, B. R.; SWIFT, J. M.; NILSSON, M. I.; HOGAN, H. A.; BOUSE, S. D.; BLOOMFIELD, S. A. Simulated resistance training, but not alendronate, increases cortical bone formation and suppresses sclerostin during disuse. **J. Appl. Physiol.**, v.112, p. 918–925, 2012.

MANOLAGAS, S.C. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. **Endocr. Rev.**, v.21, p.115-137, 2000.

McCARTHY, T.L.; CHANG, W. Z.; LIU, Y.; CENTRELLA, M. Runx2 Integrates Estrogen Activity in Osteoblasts. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 44, p. 43121–43129, 2003.

MENKES, A.; MAZEL, S.; REDMOND, R. A.; KOFFLER, K.; LIBANATI, C. R.; GUNDBERG, C. M.; ZIZIC, T. M.; HAGBERG, J. M.; PRATLEY, R. E.; HURLEY, B. F. Strength training increases regional bone mineral density and bone remodeling in middle-aged and older men. **J. Appl. Physiol.**, v. 74, n. 5, p. 2478-84, 1993.

MILLER, M. M.; BENNETT, H. P. J.; BILLIAR, R. B.; FRANKLIN, K. B. J.; JOSHI, D. Estrogen, the ovary, and neurotransmitters: factors associated with aging. **Exp. Gerontol.**, v. 33, n. 7-8, p. 729-57, 1998.

MULLENDER, M. G.; VAN DER MEER, D. D.; HUISKES, R.; LIPS, P. Osteocyte density changes in aging and osteoporosis. **Bone**, v. 18, n. 2, p. 109-13, 1996.

MURAI, I.H.; ROSCHEL, H.; PABIS, L. V. S.; TAKAYAMA, L.; DE OLIVEIRA, R. B.; SANTOS-PEREIRA, R. T.; DANTAS, W. S.; PEREIRA, R. M. R.; JORGETTI, V.; BALLESTER, R. Y.; GUALANO, B. Exercise training, creatine supplementation, and bone health in ovariectomized rats. **Osteoporos. Int.**, v. 26, p.1395-1404, 2015.

NAKAMURA, H.; TSUJI, T.; HIRATA, A.; YAMAMOTO, T. Localization of osteoprotegerin (OPG) on bone surfaces and cement lines in rat tibia. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 50, n. 7, p. 945-53, 2002.

NOBLE, B. S. The osteocyte lineage. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 473, n. 2, p. 106-11, 2008.

OURSLER, M. J.; CORTESE, C.; KEETING, P.; ANDERSON, M. A.; BONDE, S. K.; RIGGS, B. L.; SPELSBERG, T. C. Modulation of transforming growth factor-beta production in normal human osteoblast-like cells by 17 beta-estradiol and parathyroid hormone. **Endocrinology**, v. 129, n. 6, p. 3313-20, 1991.

OZCIVICI, E.; LUU, Y. K.; ADLER, B.; QIN, Y. X.; RUBIN, J.; JUDEX, S.; RUBIN, C. T. Mechanical signals as anabolic agents in bone. **Nat. Rev. Rheumatol.**, v.6, n.1, p.50-59, 2010.

PACIFICI, R. Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. **J. Bone Miner. Res.**, v. 11, n. 8, p. 1043-51, 1996.

PACIFICI, R.; RIFAS, L.; MCCracken, R.; VERED, I.; MCMURTRY, C.; AVIOLI, L. V.; PECK, W. A. Ovarian steroid treatment blocks a postmenopausal increase in blood monocyte interleukin 1 release. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 86, n. 7, p. 2398-402, 1989.

PAJEVIC, P. D. Regulation of bone resorption and mineral homeostasis by osteocytes. **IBMS BoneKey**, v. 6, n. 2, p. 63-70, 2009.

PARFITT, A. M. Morphological basis of bone mineral measurements: transient and steady state effects of treatment in osteoporosis. **Mineral Electrolyte Metab.**, v.4, p.273-287, 1980.

RAAB-CULLEN, D. M.; THIEDE, M. A.; PETERSEN, D. N.; KIMMEL, D. B.; RECKER, R. R. Mechanical loading stimulates rapid changes in periosteal gene expression. **Calcif. Tissue Int.**, v.55, n.6, p.473-478, 1994.

REY, J. R. C.; CERVINO, E. V.; RENTERO, M. L.; CRESPO, E. C.; ÁLVARO, A. O.; CASILLAS, M. Raloxifene: mechanism of action, effects on bone tissue, and applicability in clinical traumatology practice. **Open Orthop. J.**, v. 3, p. 14-21, 2009.

RIGGS, B. L.; KHOSLA, S.; MELTON L. J.; A unitary model for involutional osteoporosis: estrogen deficiency causes both type 1 and type 2 osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. **J. Bone Miner. Res.**, v.13, p.763-773, 1998.

RIGGS, B.L. The mechanisms of estrogen regulation of bone resorption. **The J. of Clin. Invest.**, v. 106, n.10, p.1203-1204, 2000.

RIGGS, B. L.; KHOSLA, S.; MELTON, L. J. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. **Endocr. Rev.**, v. 23, n. 3, p. 279-302, 2002.

RIGGS, B. L.; PARFITT, A. M. Drugs used to treat osteoporosis: the critical need for a uniform nomenclature based on their action on bone remodeling. **J. Bone Miner. Res.**, v. 20, n. 2, p. 177-84, 2005.

ROBLING, A. G.; CASTILLO, A. B.; TURNER, C. H. Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. **Annu Rev. Biomed. Eng.**, v. 8, p. 455-98, 2006.

ROBLING, A. G.; NIZIOLEK, P. J.; BALDRIDGE, L. A.; CONDON, K. W.; ALLEN, M. R.; ALAM, I.; MANTILA, S. M.; GLUHAK-HEINRICH, J.; BELLIDO, T. M.; HARRIS, S. E.; TURNER, C. H. Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin. **J. Biol. Chem.**, v. 283, n. 9, p. 5866-75, 2008.

SAXON, L. K.; GALEA, G.; MEAKIN, L.; PRICE, J.; LANYON, L. E. Estrogen receptors α and β have different gender-dependent effects on the adaptive responses to load bearing in cancellous and cortical bone. **Endocrinology**, v. 153, n. 5, p. 2254-66, 2012.

SCHOPPET, M.; PREISSNER, K. T.; HOFBAUER, L. C. RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 22, n. 4, p. 549-53, 2002.

SEEMAN, E. Pathogenesis of bone fragility in women and men. **The Lancet**, v.359, p. 1841-1850, 2002.

SINGULANI, M. P.; STRINGHETTA-GARCIA, C. T.; SANTOS, L. F.; MORAIS, R.S.; LOUZADA, M. J.; OLIVEIRA, S. H.; CHAVES-NETO, A. H.; DORNELLES, R.C. Effects of strength training on osteogenic differentiation and bone strength in aging female Wistar rats. **Sci. Rep.**, v.7, p. 1-22, 2017.

SLIWINSKI, L.; FOLWARCZNA, J.; NOWINSKA, B.; CEGIELA, U.; PYTLIK, M.; KACZMARCZYK-SEDLAK, I.; TRZECIAK, H.; TRZECIAK, H. I. A comparative study of the effects of genistein, estradiol and raloxifene on the murine skeletal system. **Acta Biochim. Pol.**, v. 56, n. 2, p. 261-70, 2009.

STENGEL, S. V.; KEMMLER, W.; PINTAG, R.; BEESKOW, C.; WEINECK, J.; LAUBER, D.; KALENDER, W. A.; ENGELKE, K. Power training is more effective than strength training for maintaining bone mineral density in postmenopausal women. **J. Appl. Physiol.**, v.99, n.1, p.181-188, 2005.

STRINGHETTA-GARCIA, C. T.; SINGULANI, M. P.; SANTOS, L. F.; LOUZADA, M. J.; NAKAMUNE, A. C.; CHAVES-NETO, A. H.; ROSSI, A. C.; ERVOLINO, E.; DORNELLES, R. C. The effects of strength training and raloxifene on bone health in aging ovariectomized rats. **Bone**, v.85, p. 45-54, 2016.

SUDA, T.; TAKAHASHI, N.; UDAGAWA, N.; JIMI, E.; GILLESPIE, M. T.; MARTIN, T. J. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor and ligand families. **Endocr. Rev.**, v.20, p. 345-357, 1999.

SUN, X.; FENGBO, L.; XINLONG, M.; JIANXIONG, M.; ZHAO, B.; ZHANG, Y.; YANJUN, LI.; JIANWEI, L. V.; MENG, X. The Effects of Combined Treatment with Naringin and Treadmill Exercise on Osteoporosis in Ovariectomized Rats. **Sci. Rep.**, v.5, p.13009, 2015.

THOMPSON, W. R.; RUBIN, C. T.; RUBIN, J. Mechanical regulation of signaling pathways in bone. **Gene**, v. 503, n. 2, p. 179-93, 2012.

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

VIGUET-CARRIN, S.; GARNERO, P.; DELMAS, P. D. The role of collagen in bone strength. **Osteoporos. Int.**, v. 17, n. 3, p. 319-36, 2006.

WANG, L.; FRITTON, S. P.; COWIN, S. C.; WEINBAUM, S. Fluid pressure relaxation depends upon osteonal microstructure: modeling an oscillatory bending experiment. **J. Biomech.**, v.32, n.7, p.663–672, 1999.

World Health Organization. Who scientific group on the assessment of osteoporosis at primary health care level. Belgium, **WHO**, 2004.

WINDAHL, S. H.; BÖRJESSON, A. E.; FARMAN, H. H.; ENGDAHL, C.; MOVÉRARE-SKRTIC, S.; SJÖGREN, K.; LAGERQUIST, M. K.; KINDBLOM, J. M.; KOSKELA, A.; TUUKKANEN, J.; DIVIETI PAJEVIC, P.; FENG, J. Q.; DAHLMAN-WRIGHT, K.; ANTONSON, P.; GUSTAFSSON, J. Å.; OHLSSON, C. Estrogen receptor- α in osteocytes is important for trabecular bone formation in male mice. **Proc. Natl. Acad. SciU. S. A.**, v. 110, n. 6, p. 2294-2299, 2013.

WRIGHT, N. C.; LOOKER, A. C.; SAAG, K. G.; CURTIS, J. R.; DELZELL, E. S.; RANDALL, S.; DAWSON-HUGHES, B. The recent prevalence of osteoporosis and low bone mass in the United States based on bone mineral density at the femoral neck or lumbar spine. **J. Bone Miner. Res.**, v.29, n.11, p.2520-2526, 2014.

WU, X. B.; LI, Y.; SCHNEIDER, A.; YU, W.; RAJENDREN, G.; IQBAL, J.; YAMAMOTO, M.; ALAM, M.; BRUNET, L. J.; BLAIR, H. C.; ZAIDI, M.; ABE, E. Impaired osteoblastic differentiation, reduced bone formation, and severe osteoporosis in noggin-overexpressing mice. **J. Clin. Invest.**, v.112, p.924–934, 2003.

YEH, J. K.; LIU, C. C.; ALOIA, J. F. Additive Effect of Treadmill Exercise and 17 β -Estradiol Replacement on Prevention of Tibial Bone Loss in Adult Ovariectomized Rat, **J. Bone Min. Res.**, v.8, p.677-683, 1993.

ZAMAN, G.; JESSOP, H. L.; MUZYLAŁ, M.; DE SOUZA, R. L.; PITSILLIDES, A. A.; PRICE, J. S.; LANYON, L. L. Osteocytes use estrogen receptor to respond to strain but their ER content is regulated by estrogen. **J. Bone Miner. Res.**, v. 21, n. 8, p. 1297-1306, 2006.

ZAMAN, G.; SAXON, L. K.; SUNTERS, A.; HILTON, H.; UNDERHILL, P.; WILLIAMS, D.; PRICE, J. S.; LANYON, L. E. Loading-related regulation of gene expression in bone in the contexts of estrogen deficiency, lack of estrogen receptor α and disuse. **Bone**, v.46, p. 628–642, 2010.

ZEBAZE, R. M.; GHASEM-ZADEH, A.; BOHTE, A.; IULIANO-BURNS, S.; MIRAMS, M.; PRICE, R. I.; MACKIE, E. J.; SEEMAN, E. Intracortical remodelling and porosity in the distal radius and post-mortem femurs of women: a crosssectional study. **Lancet**, v. 375, p. 1729–1736, 2010.