ANDREA BOGOSLAVSKY LEVY MENDES

**Efeitos da deficiência estrogênica e da atividade física sobre a
cartilagem articular da cabeça do fêmur de ratas Wistar**

São Paulo

2011

ANDREA BOGOSLAVSKY LEVY MENDES

**Efeitos da deficiência estrogênica e da atividade física sobre a
cartilagem articular da cabeça do fêmur de ratas Wistar**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Romeu Rodrigues de Souza

São Paulo

2011

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2411
FMVZ

Mendes, Andrea Bogoslavsky Levy
Efeitos da deficiência estrogênica e da atividade física sobre a
cartilagem articular da cabeça do fêmur de ratas Wistar / Andrea
Bogoslavsky Levy Mendes. -- 2011.
99 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2011.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e
Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Romeu Rodrigues de Souza.

1. Cartilagem articular. 2. Estrógeno. 3. Ovariectomia. 4. Ratas Wistar.
5. Estereologia. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeitos da deficiência estrogênica e da atividade física sobre a cartilagem da cabeça do fêmur de ratas wistar", protocolado sob o nº1389/2008, utilizando 12 (doze) ratos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Romeu Rodrigues de Souza (ICB), está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Effects of estrogen deficiency and physical activity on the cartilage of the femoral head of wistar rats", protocol number 1389/2008, utilizing 12 (twelve) rats, under the responsibility Prof. Dr. Romeu Rodrigues de Souza, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum" meeting).

São Paulo, 27 de maio de 2008

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: LEVY MENDES, *Andrea Bogoslavsky*

Título: Efeitos da deficiência estrogênica e da atividade física sobre a cartilagem articular da cabeça do fêmur de ratas Wistar

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

*"Meu próximo projeto é sempre viver o
amanhã"*
(Oscar Niemeyer)

*"A vida é o que acontece conosco
enquanto fazemos outros planos"*
(Ben Bagley)

*"Cada minuto que passa pode ser tudo o que
me resta a viver, mas eu desperdiço o tempo
como se ele fosse infinito"*
(Elizabeth Jhin)

"Para compreender os pais é preciso ter filhos."

(Sofocleto)

"Os nossos pais amam-nos porque somos seus filhos, é um fato inalterável. Nos momentos de sucesso, isso pode parecer irrelevante, mas nas ocasiões de fracasso, oferecem um consolo e uma segurança que não se encontram em qualquer outro lugar."

(Bertrand Russell)

Dedico este trabalho a minha mãe, **Rachel Simhon Bogoslavsky** e ao meu pai, **Jorge Ignácio Bogoslavsky**.

Mais uma vez **OBRIGADO** por todo amor e dedicação!

Amo vocês!

"Amar é ultrapassarmo-nos."

(Oscar Wilde)

"Amor não é se envolver com a pessoa perfeita, aquela dos nossos sonhos. Não existem príncipes nem princesas. Encare a outra pessoa de forma sincera e real, exaltando suas qualidades, mas sabendo também de seus defeitos. O amor só é lindo, quando encontramos alguém que nos transforme no melhor que podemos ser"

(Desconhecido)

Dedico a meu grande amigo, parceiro, companheiro e marido **George Luis Levy Mendes**.

Incrível como são as coisas da vida... Durante esta jornada, pra ser mais exata, desde o primeiro dia desta jornada nossas vidas se transformaram de maneira surpreendente!

Te conheci, me apaixonei, namorei, casei, amei, e ganhei o maior dos presentes que poderia... A família mais linda do mundo! **A NOSSA FAMÍLIA!**

OBRIGADO POR TUDO! Te amo!

"O amor de mãe por seu filho é diferente de qualquer outra coisa no mundo. Ele não obedece lei ou piedade, ele ousa todas as coisas e extermina sem remorso tudo o que ficar em seu caminho."

(Agatha Christie)

Antes de mim você não era você; antes de você eu não era eu; antes de ser nós dois não havia nenhum dos dois. Antes de ser parte de mim, antes de vir a te conhecer, eu não era você e eu não era eu. Parece que foi entes de ontem... Antes de mais nada eu quero esclarecer que não é que eu estava mal antes; tampouco estava mal antes... Mas algo de mim, que eu não soube ver até que você me mostrou algo de ti, que quero crer que não viu ninguém antes de mim, que ninguém viu antes de mim. Depois de tudo o que quero é dizer que não entendo como podia viver antes, não entendo como podia viver antes, não entendo como podia viver... Antes de ir, eu devo dizer: eu também pensava que era feliz... Antes... (mas) Não entendo como podia viver antes.

(Adaptado de Jorge Dexler - Antes)

Dedico ao meu filho **Pedro Bogoslavsky Levy Mendes**, amor desta e de outras vidas...
SEMPRE!

AGRADECIMENTOS

À **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, por proporcionar a oportunidade de cursar um curso de pós-graduação.

À **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP**, processo nº.09/50777-6, pelo apoio financeiro concedido para a realização desta pesquisa.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Romeu Rodrigues** de Souza.

À **Prof. Dra. Maria Angélica Miglino**, pela amizade, ensinamentos e apoio para trilhar este difícil caminho da pós-graduação.

Ao **Prof. Dr. Luis Mochizuki**, pelos ensinamentos durante todo o ano de Programa de Aperfeiçoamento de Ensino.

A **Prof. Dra. Rose Eli Grassi Rici** pelo apoio durante a execução pesquisa em Microscopia Eletrônica de Transmissão.

Aos técnicos **Edinaldo Ribas Farias (“Índio”)**, **Diogo Palermo** e **Ronaldo Agostinho da Silva**, por serem mais do que técnicos e amigos, serem pessoas maravilhosas!

Aos funcionários do Departamento de Anatomia da FMVZ-USP **Jaqueline Martins de Santana**, **Maicon Barbosa da Silva**, pela ajuda durante o curso de pós-graduação.

Às **funcionárias da comissão de pós-graduação** da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de São Paulo, pela colaboração desde o início de meu processo até a defesa da tese.

Aos **funcionários da biblioteca** da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de São Paulo, pelos serviços do COMUT e pela correção desta dissertação.

A querida **Sara Fanny Levy**, amiga, parceira e mãe postiça. Obrigado!

À minha grande amiga-irmã **Gabriela Correia de Almeida e Silva**. Obrigado!

Ao querido **João Carlos Mendes** pelas grandes lições de vida! Obrigado!

Ao querido **João Carlos Diaz** por me ensinar a superar meus próprios limites!
Obrigado!

Aos meus amigos **Silvio Pires Gomes e Valquíria Mariotti** mesmo não trabalhando mais juntos, sempre pacientes e presentes. ,Obrigado!

A minha amiga **Vanessa Russell** pela amizade e apoio durante o programa PAE.
Obrigado!

As minhas amigas **Débora Hochberg, Andrea Terni**, pelo apoio e amizade.
Obrigado!

A todos meus **amigos** que estiveram ao meu lado durante este processo. Obrigado!

Aos meus **colegas de pós graduação** pela amizade.

RESUMO

LEVY MENDES, A. B. **Efeitos da deficiência estrogênica e da atividade física sobre a cartilagem articular da cabeça do fêmur de ratas Wistar.** [Effects of estrogenic deficiency and physical activity on the articular cartilage of the femoral head of Wistar rats]. 2011. 99 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Vários estudos demonstraram que o estrógeno exerce um papel fundamental na manutenção da estrutura da cartilagem articular, e que a deficiência em mulheres podem causar um aumento na incidência de degeneração articular. Sabe-se também que a atividade física é capaz de trazer benefícios para este tipo de tecido, reduzindo os riscos de lesão articular. Contudo, existem poucos os trabalhos que relacionam estes dois fatores: deficiência estrogênica e atividade física regular. O objetivo deste trabalho é verificar os efeitos da deficiência estrogênica sobre a cartilagem articular, suas implicações, e se a atividade física regular e moderada é capaz de reverter este processo natural de degeneração articular. Foram utilizadas 12 ratas Wistar adultas, divididas em quatro grupos de três animais, de modo aleatório e sistematizado, sendo eles: ratas controle sedentárias (RCS), ratas controle treinadas (RCT), ovariectomizadas sedentárias (ROS) e ovariectomizadas treinadas (ROT). Cada grupo foi analisado pelas técnicas de microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão. Os resultados foram obtidos a partir do método estereológico. Os valores foram estatisticamente significantes em relação a deficiência estrogênica para os parâmetros: peso, condicionamento físico, densidade numérica de condrócitos, número total de condrócitos, densidade de volume dos condrócitos, densidade de volume da matriz extracelular, volume total de matriz extracelular e densidade de volume de colágeno. Em relação aos efeitos concomitantes da atividade física e da deficiência estrogênica, os resultados foram significativamente diferentes em relação a

densidade numérica, volume total da cartilagem, volume médio dos condrócitos e densidade de volume de colágeno. Estes dados nos levam a concluir que a diminuição dos níveis de estrógeno afeta profundamente a cartilagem articular da cabeça do fêmur, enquanto a atividade física contínua é benéfica para esta cartilagem, inclusive quando há deficiência estrogênica.

Palavras-Chave: Cartilagem articular. Estrógeno. Ovariectomia. Ratas Wistar. Estereologia.

ABSTRACT

LEVY MENDES, A. B. **Effects of estrogenic deficiency and physical activity on the articular cartilage of the femoral head of Wistar rats.** [Efeitos da deficiência estrogênica e da atividade física sobre a cartilagem articular da cabeça do fêmur de ratas Wistar]. 2011. 99 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Several studies show that estrogen has an important function in maintaining the structure of articular cartilage and that deficiency in women can cause an increase in the incidence of joint degeneration. It is also known that physical activity can bring benefits to this type of tissue, reducing the risk of joint damage. However, there are few works that relate these two factors: continuous physical activity and estrogen deficiency. The aim of this study is to verify the effects of estrogen deficiency on joint cartilage, its implications, and if frequent and moderate physical activity is able to reverse the natural process of joint degeneration. A total of 12 adult female rats were divided into four groups of three animals in a random and systematic way, as follows: sedentary control rats (RCS), trained control rats (RCT), ovariectomized sedentary rats (ROS) and trained ovariectomized rats (ROT). Each group was analyzed by light microscopy and transmission electron microscopy. Results were obtained from the stereological method. The values were statistically significant in relation to estrogen deficiency for the parameters: weight, physical condition, numerical density of chondrocytes, total number of chondrocytes, chondrocyte volume density, volume density of extracellular matrix, the total volume of the extracellular matrix and volume density of collagen. Regarding the concomitant effects of physical activity and estrogen deficiency, the results were significantly different in numerical density, total volume of cartilage, mean volume of chondrocytes and volume density of collagen. These data take us to conclude that the decrease in estrogen levels profoundly affects the articular cartilage of the femoral head, while the

continuous physical activity is beneficial to this cartilage, also in estrogen deficiency.

Key words: Articular cartilage. Estrogen. Ovariectomy. Wistar rats. Stereology

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Teste de esforço máximo (TEM) realizado com todas as ratas participantes da pesquisa.	42
Tabela 2 –	Tempo de atividade física realizado por semana para cada grupo	42
Tabela 3 –	Níveis de estradiol (pg/ml) dos grupos ROS e ROT.	56
Tabela 4 –	Pesos corpóreos dos animais (g) apresentador por médias, desvio padrão e significância estatística	58
Tabela 5 –	Valores das velocidades médias (m/s), desvio padrão por testes de esforço máximo (TEM) e significancia estatística.	59
Tabela 6 –	Resultados das variáveis quantidade de disectors (Q^+), densidade celular (N_v), volume total da cartilagem (V_{ref}), coeficiente de erro para Cavalieri ($CE_{(V_{ref})}$), número total de condrócitos (N), coeficiente de erro celular ($CE_{(N)}$), densidade de volume celular ($V_{v (cond)}$) e densidade de volume da matriz ($V_{v (mat)}$), volume de matriz (V_{mat}), volume médio dos condrócitos ($\bar{V}_N$) e a densidade de volume de colágeno ($V_{v (col)}$), nas cartilagens da cabeça femoral de ratos nos diferentes grupos	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Imagem ilustrativa da caixa de polipropileno autoclavavel.....	39
Figura 2 –	Atividade física de corrida em esteira realizada pelos grupos RCT e ROT.	41
Figura 3 –	Mensuração dos núcleos de condrócitos.....	44
Figura 4 (A-C) –	(A) Fotomicrografia de corte histológico da cabeça do fêmur de rata, microscopia de luz; fotomicrografia mostrando a cartilagem da cabeça do fêmur, com condrócitos (seta preta) e matriz extracelular (seta branca), em microscopia de luz; fotomicrografia em microscopia eletrônica de transmissão, mostrando as fibras colágenas.....	45
Figura 5 –	Perfis celulares (Q^-)	47
Figura 6 –	Tabela de números randômicos	49
Figura 7 –	Estimativa do volume total da cartilagem.....	50
Figura 8 –	Estimativa da densidade de volume de condrócitos e de matriz extracelular ($V_{v(cond)}$ e $V_{v(mat)}$).....	52
Figura 9 –	Estimativa da densidade de volume de colágeno ($V_{v(col)}$).....	54

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1–	Médias obtidas nas diferentes pesagens antes de cada teste de esforço máximo e eutanásia	57
Gráfico 2 –	Velocidade máxima média obtida nos diferentes testes de esforço máximo nos grupos RCS, RCT, ROS e ROT.	59
Gráfico 3 (A - C) –	Densidade numérica (N_V); Volume total da cartilagem (V_{ref}); Número total de condrócitos (N) da cartilagem da cabeça femoral de ratas Wistar por grupo	65
Gráfico 4 (A - C) –	Densidade de volume de condrócitos ($V_{V (cond)}$); Densidade de volume de matriz extracelular ($V_{V(mat)}$) e Volume total da matriz extracelular da cartilagem da cabeça femoral de ratas Wistar por grupos	66
Gráfico 5 (A - B) –	Densidade de volume médio de condrócitos (); Densidade de volume de colágeno ($V_{V(col)}$) da cartilagem da cabeça femoral de ratas Wistar por grupos	67

SUMARIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	OBJETIVOS	26
3	REVISÃO DA LITERATURA	28
3.1	ESTRUTURA DA CARTILAGEM ARTICULAR	28
3.2	EFEITOS DA DEFICIÊNCIA ESTROGENICA SOBRE A CARTILAGEM ARTICULAR	31
3.3	EFEITOS DA ATIVIDADE FÍSICA SOBRE A CARTILAGEM ARTICULAR	34
4	MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1	PREPARAÇÃO DOS ANIMAIS PARA INICIO DO EXPERIMENTO	40
4.2	PROTOCOLO EXPERIMENTAL DE ATIVIDADE FÍSICA	41
4.3	PREPARAÇÃO DO MATERIAL	42
4.4	ANÁLISE ESTEREOLÓGICA	46
4.4.1	Densidade Numérica (N_v)	46
4.4.2	Volume Total da Cartilagem (V_{ref})	48
4.4.3	Número Total de Condrócitos (N)	51
4.4.4	Densidade de Volume dos Condrócitos ($V_V (cond)$) e Densidade de Volume da Matriz Extracelular ($V_V (mat)$)	51
4.4.5	Volume Total de Matriz Extracelular ($V_{mat.}$)	52
4.4.6	Volume Médio dos Condrócitos ($\bar{v}_N$)	53
4.4.7	Densidade de Volume de Colágeno ($V_{v(col)}$)	53
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
5	RESULTADOS	56
5.1	DOSAGEM DOS NÍVEIS DE ESTRADIOL	56
5.2	PESAGEM DOS ANIMAIS	56
5.3	DESEMPENHO FÍSICO	58
5.4	ANÁLISE ESTEREOLÓGICA	59

5.4.1	Densidade Numérica (N_v).....	60
5.4.2	Volume Total da Cartilagem (V_{ref}).....	60
5.4.3	Número Total de Condrócitos (N)	60
5.4.4	Densidade de Volume dos Condrócitos ($V_v (cond)$) e Densidade de Volume da Matriz Extracelular ($V_v (mat)$).....	61
5.4.5	Volume Total de Matriz Extracelular (V_{mat})	61
5.4.6	Volume Médio dos Condrócitos ($\bar{v}_N$)	62
5.4.7	Densidade de Volume de Colágeno ($V_{v(col)}$)	62
6	DISCUSSÃO.....	69
6.1	DOSAGEM DOS NÍVEIS DE ESTRADIOL.....	69
6.2	PESAGEM DOS ANIMAIS.....	69
6.3	DESEMPENHO FÍSICO	71
6.4	ANÁLISE ESTEREOLÓGICA.....	72
6.4.1	Densidade Numérica (N_v)	72
6.4.2	Volume Total da Cartilagem (V_{ref}).....	73
6.4.3	Número Total de Condrócitos (N)	74
6.4.4	Densidade de Volume de Condrócito ($V_v (cond)$) e Densidade de volume de Matriz Extracelular ($V_v (mat)$)	75
6.4.5	Volume Total de Matriz Extracelular (V_{mat})	77
6.4.6	Volume Médio de Condrócitos ($\bar{v}_N$)	78
6.4.7	Densidade de Volume de Colágeno ($V_{v (col)}$)	78
7	CONCLUSÃO.....	81
	REFERÊNCIAS.....	84

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios (PNAD), em 1999 a população idosa acima dos 70 anos somava 6,4 milhões de pessoas (3,9% da população total), enquanto em 2009 a população atinge a um efetivo de 9,7 milhões de idosos, correspondendo a 5,1%. A redução da população de crianças e jovens e o consequente aumento da população adulta e idosa estão associados à queda continuada dos níveis de fecundidade e ao aumento da esperança de vida (MPOG; IBGE, 2010).

A razão de sexo é um indicador que aponta o equilíbrio dos sexos numa população na medida em que há uma divisão proporcional entre homens e mulheres. Esta razão define o número de pessoas do sexo masculino para cada grupo de 100 pessoas do sexo feminino, e vem declinando ao longo do tempo em virtude da sobre mortalidade masculina. Em 2009, havia, para cada 100 mulheres, 94,8 homens. O aumento da esperança de vida ao nascer em combinação com a queda do nível geral da fecundidade resulta nos aumentos absoluto e relativo da população idosa. De fato, a esperança média de vida ao nascer no Brasil era, em 2009, de 73,1 anos de idade. A vida média ao nascer, de 1999 para 2009, obteve um incremento de 3,1 anos, com as mulheres em situação bem mais favorável que a dos homens (73,9 para 77,0 anos, no caso das mulheres, e 66,3 para 69,4 anos, para os homens) (MPOG; IBGE, 2010).

De acordo com estimativas do DATASUS, em 2007, a população feminina brasileira totaliza mais de 98 milhões de mulheres. Nesse universo, cerca de 30 milhões têm entre 35 e 65 anos, o que significa que 32% das mulheres no Brasil estão na faixa etária em que ocorre o climatério (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

O climatério é a fase de transição entre o período reprodutivo e o não reprodutivo da vida da mulher, estendendo-se até os 65 anos de idade. Menopausa é um marco dessa fase, correspondendo ao último período menstrual, somente reconhecida após passados 12 meses da sua ocorrência. A idade média de ocorrência da menopausa é 50 anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

O aumento da expectativa de vida e seu impacto sobre a saúde da população feminina tornam imperiosa a necessidade da adoção de medidas visando à obtenção de melhor qualidade de vida durante e após o climatério. Nesse sentido, o combate ao sedentarismo ocupa lugar de destaque por ser um fator facilitador de doenças crônico-degenerativas, de elevada morbidade. O combate ao sedentarismo melhora a aptidão física e favorece a disposição para viver.

O impacto social e econômico das doenças osteoarticulares é muito grande, uma vez que a osteoartrite é a maior causa de incapacidade e redução da qualidade de vida em pessoas idosas (CHRISTGAU et al., 2004).

Em estudos de Nahoum e Simões (1989) e Halbe et al. (1990) em que são descritos alguns sintomas mais freqüentes em mulheres na menopausa, encontram-se entre as doenças associadas, as doenças osteoarticulares, bem como relato de dores articulares.

A perda da qualidade óssea e a deteriorização da cartilagem articular é comumente visualizada após a menopausa (CHANG et al., 2010). Estudo de Høegh-Andersen et al., 2004, indicou que a ovariectomia pode acelerar a degeneração da cartilagem de ratas sedentárias em envelhecimento.

Em muitos modelos animais, a ovariectomia leva a mudanças osteoartíticas na cartilagem (SNIEKERS et al., 2008), e a terapia de reposição hormonal (TRH) reduz a degradação da cartilagem (HAM et al., 2002; HØEGH-ANDERSEN et al., 2004)

Em 1966, o Dr. Robert Wilson lançou o livro *"Feminine Forever"*, em que valorizava os benefícios da TRH para "salvar as mulheres da tragédia da menopausa". Para o autor, o estrogênio na terapia de reposição hormonal agiria como um elixir da juventude, que retardaria o envelhecimento, popularizando o conceito de que menopausa é uma doença de deficiência hormonal. Após esta publicação popularidade do estrógeno aumentou significativamente, então em 1975 novos estudos demonstraram os efeitos deletérios da utilização da TRH a longo prazo. Pesquisadores descobriram uma associação entre a terapia com estrógenos pós menopausa e o câncer de endométrio, sendo que em alguns estudos a taxa desta patologia foi quatorze vezes maior em pacientes que utilizaram o estrógeno

conjugado por um período de sete anos ou mais do que nas mulheres que nunca realizaram a reposição hormonal (HOUCK, 2003).

Em 2001, a Associação Médica Brasileira e o Conselho Federal de Medicina elaboraram o Projeto Diretrizes, que consiste em atenção primária e terapia de reposição hormonal (TRH) no climatério, onde são citados os benefícios e riscos associados à TRH. Dentre os benefícios pode-se destacar a redução do risco para a ocorrência de infarto agudo do miocárdio, da osteoporose e da doença de Alzheimer; e dentre os riscos estão aumento da incidência do câncer de endométrio e de mama, e de trombose venosa e embolia pulmonar.

Tendo conhecimento dos benefícios e riscos da TRH, cabe a mulher que se encontra no período do climatério decidir se compensa ou não realizar o tratamento. Neste enfoque, é importante que hajam medidas alternativas a TRH. Estas medidas incluem dieta, atividade física, mudanças de hábitos de vida e mesmo medicação não hormonal.

Cabe lembrar que após a menopausa as mulheres dispõem de cerca de 1/3 de suas vidas, que podem e devem ser vividos de forma saudável, lúcida, com prazer, atividade e produtividade (NAMS, 2007; PAOLETTI; WENGER, 2007; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). Após a menopausa, a mulher pode desencadear alterações de humor, depressões, disfunções sexuais, osteoporose, redução da flexibilidade articular e doenças osteoarticulares, o que repercute no desempenho físico, mental e social da mesma.

A prática atividade física promove benefícios imediatos (regularização dos níveis de glicose sanguínea, de adrenalina e noradrenalina, assim como da quantidade e qualidade do sono) e de longo prazo (melhora do condicionamento cardiovascular, flexibilidade, resistência, potencia e força muscular, equilíbrio, coordenação e velocidade de movimento) (CARVALHO et al., 1995; GOBBI, 1997).

A atividade física nestes casos pode ser essencial, pois além de prevenir fraturas, e melhorar a condição fisiológica de quem pratica, também ajuda na recuperação da auto-estima, e como fator de integração social.

O sedentarismo, associado a uma alimentação não balanceada, é apontado como a principal causa de ganho de peso. O exercício combinado à restrição energética promove redução no peso corporal, maximizando a perda de gordura e

minimizando a perda de massa magra. A prática regular de exercício físico resulta em muitos benefícios para o organismo, melhorando a capacidade cardiovascular e respiratória, promovendo o ganho de massa óssea, a diminuição da pressão arterial em hipertensas, a melhora na tolerância à glicose e na ação da insulina. Portanto, as mulheres devem ser encorajadas a realizar atividade física regularmente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

Assim sendo, a realização de trabalhos que demonstrem os efeitos do exercício físico em mulheres com deficiência estrogênica, seja ela caracterizada por menopausa, menopausa precoce ou ovariectomia, é importante para compreender as respostas dos tecidos orgânicos a este fator.

A utilização de modelos animais para estudos deste tipo esta consagrada na literatura. Ratas ovariectomizadas são o modelo animal mais comumente utilizado para estudar os efeitos da menopausa, pois dividem muitas características clínicas com o modelo humano de pós menopausa (KALU, 1991; THORNDIKE; TURNER, 1998; CHANG et al., 2010)

O objetivo central do presente estudo é verificar a influencia da atividade física sobre a cartilagem articular da cabeça do fêmur de ratas ovariectomizadas. Para tanto, foram utilizadas ratas Wistar, foram submetidas à ovariectomia aos 6 meses de idade, ou seja, um modelo experimental deficiente em estrógeno; e a atividade física de corrida em esteira durante três meses (dos 6 aos 9 meses).

2 OBJETIVOS

O presente estudo visa analisar os seguintes aspectos da cartilagem hialina da cabeça do fêmur de ratas Wistar:

- ❖ Efeitos da deficiência de estrógenos sobre a cartilagem articular;
- ❖ Efeitos do exercício físico de corrida sobre a cartilagem articular normal;
- ❖ Efeitos do exercício físico de corrida sobre a cartilagem articular na vigência de deficiência estrogênica.

REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

Neste capítulo será realizada uma breve revisão da literatura, a fim de mencionar aspectos de relevância para a compreensão deste estudo. Desta maneira serão abordados os seguintes temas: estrutura da cartilagem articular, efeitos da deficiência estrogênica sobre a cartilagem articular e efeitos da atividade física sobre a cartilagem articular.

3.1 ESTRUTURA DA CARTILAGEM ARTICULAR

A cartilagem articular, que é hialina, é um tipo de tecido conjuntivo altamente especializado que reveste as superfícies das articulações e tem funções biomecânicas de absorção de choques e distribuição de peso, proporcionando um baixo coeficiente de atrito (LEVANON; STEIN, 1991; RASCH, 1991; HARDINGHAM et al., 1992; HEISE; TOLEDO, 1993; TRATTNIG, 1997; ALBERTS et al., 1999; HUBER et al., 2000). É constituída por células (condroblastos e condrócitos) e matriz extracelular (BURSTEIN et al., 2000).

Na cartilagem articular distinguem-se cinco zonas: zona de repouso, onde existe cartilagem hialina sem qualquer alteração morfológica; zona de proliferação, onde os condrócitos se dividem, formando fileiras paralelas de células achatadas; zona de cartilagem hipertrófica, com condrócitos muito volumosos, onde a matriz fica reduzida a tabiques delgados, entre as células hipertróficas, e onde os condrócitos entram em apoptose; zona de cartilagem calcificada, onde ocorre a calcificação dos delgados tabiques de matriz cartilaginosa e termina a apoptose dos condrócitos; e por fim, a zona de calcificação, onde aparece o tecido ósseo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Os condrócitos têm um papel importante na adaptação e regulação do tecido

cartilágneo (WU; HERZOG, 2002). São células responsáveis pelo controle do equilíbrio da síntese e degradação induzidas pelo estresse de proteoglicanas (PGs) e fibrilas colágenas na matriz extracelular, controladas pelas citocinas e fatores de crescimento (MAROUDAS, 1976; MC DEVITT; MUIR, 1976; KARVONEN et al., 1994; HANDA et al., 1997; WALDSCHMIDT et al., 1997; SMITH et al., 2000; MATYAS et al., 2002; BURDAN et al., 2009). Também podem alterar a organização do tecido pela mudança de forma e alinhamento das moléculas da matriz (LANE; BUCKWALTER, 1993; SMITH et al., 2000). A resposta celular varia com a duração e a intensidade do estímulo (SMITH et al., 2000).

Os condrócitos respondem às mudanças na composição da matriz extracelular através de sinais mecânicos, elétricos e físico-químicos, regulando o equilíbrio entre anabolismo e catabolismo e a remodelação interna da matriz (HARDINGHAM et al., 1992; MOW et al., 1992; KARVONEN et al., 1994; TRATTNIG, 1997; HUBER et al., 2000; POOLE et al., 2001). Estudos realizados por Loening et al. (2000) sugerem que a apoptose dos condrócitos pode preceder os danos na matriz extracelular.

A matriz extracelular cartilágnea por sua vez é formada por rede de fibrilas de colágeno tipo II, VI, IX, X e XI, e substância fundamental amorfa (composta de água, solutos orgânicos e inorgânicos, e PGs) (HARDINGHAM et al., 1992; VOGEL, 1994; TRATTNIG, 1997; HUBER et al., 2000; BURDAN et al., 2009). É um meio de transporte para moléculas hidrossolúveis e íons, funcionando como barreira para microorganismos, além de ser altamente hidrofílica (MC DEVITT; MUIR, 1976; GRODZINSKY, 1983; MUIR, 1983; KJELLÉN; LINDAHL, 1991; HARDINGHAM et al., 1992; GRECA, 1996; STEVENS; LOWE, 1997; HUBER et al., 2000).

A proporção entre os principais componentes da matriz determina as propriedades biológicas e mecânicas de resistência, compressão, extensibilidade e torção do tecido (ALBERTS et al., 1999; CULAV et al., 1999; HUBER et al., 2000). De maneira que para que a cartilagem articular exerça tais propriedades efetivamente é necessária a integridade dos seus componentes extracelulares (LEVANON; STEIN, 1991; HARDINGHAM et al., 1992) e da interação célula-matriz extracelular (HUBER et al., 2000).

Os PGs são macromoléculas complexas constituídas por um esqueleto protéico, ligado covalentemente a uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanas

(GAGs) (HASCALL; HASCALL, 1981; HASCALL; KIMURA, 1982; VAN KUPPEVELT et al., 1984; RUOSLAHTI; YAMAGUCHI, 1991; WIGHT et al., 1991; YANAGISHITA, 1993; BRANDAN, 1994; MICHELLACCI, 1996; NISHIMURA et al., 1996; HUBER et al., 2000; GOMES, 2001). Estas macromoléculas são importantes na hidratação da matriz e estabilização da rede colágena, que por sua vez influenciam na resistência a forças compressivas e atuam como filtro regulando a passagem de moléculas através do meio extracelular (MAROUDAS 1976; PALMOSKI; BRANDT 1981; MUIR, 1983; O'CONNOR et al., 1988; WIGHT et al., 1991; HARDINGHAM et al., 1992; SÄÄMÄMEN et al., 1994; ALBERTS et al., 1999; CULAV et al., 1999; HUBER et al., 2000).

O tipo principal de PG da cartilagem hialina localiza-se retido entre as fibras de colágeno da cartilagem formando a estrutura supramolecular da matriz extracelular responsável pela resistência, com mínima deformação, em articulações de descarga de peso (MALEMUD, 1991; YANAGISHITA, 1993; CHAMBERS et al., 2001).

A combinação dos PGs da matriz, a orientação das fibrilas colágenas e a forma dos condrócitos estão intimamente relacionados e adaptados para otimizar a estabilidade mecânica e a capacidade de suportar cargas (WU; HERZOG, 2002).

Variações na concentração de PGs e tipos de colágeno têm uma influência direta no comportamento mecânico da cartilagem articular (O'CONNOR et al., 1988) e a alteração e/ou remoção de qualquer um destes componentes pode levar à lesão da cartilagem (VASAN, 1983).

Desse modo, a cartilagem depende totalmente da integridade da rede macromolecular que forma a matriz extracelular, sendo o colágeno responsável pela resistência à deformação e os PGs atuando frente às forças de compressão (ROUGHLEY; WHITE, 1980; SCHMIDT et al., 1990).

As variações de síntese são programadas e são benéficas por natureza. Estas ocorrem para adaptar o tecido desde o período fetal até adulto para suportar mais carga, e para o caso de agressões mecânicas e químicas às quais o tecido estará exposto durante a vida (ROUGHLEY, 2001).

3.2 EFEITOS DA DEFICIÊNCIA ESTROGENICA SOBRE A CARTILAGEM ARTICULAR

O estrógeno é responsável pelo crescimento ósseo, maturação esquelética, e agregação mineral óssea (GRUMBACH, 2000), e ainda inibe a síntese de matriz na placa de crescimento (JANSSON et al., 1983; HUNZIKER et al., 1987; WEISE et al., 2001).

Os efeitos do estrógeno são mediados através de vários caminhos (TAKANO et al., 2007). Ele liga diretamente dois receptores intracelulares – estrógeno receptores alfa (ER- α) e beta (ER- β) – e então um complexo hormônio-receptor, assim como o ERK/MAPK e p38/MAPK, interagem com o DNA para regular a transcrição do gene (LINDBERG et al., 2001; EKSTEIN et al., 2005; NILSSON et al., 2005). Os receptores alfa e beta de estrógeno foram encontrados em diversos tecidos articulares, incluindo a cartilagem, osso, ligamentos e sinóvia (LIU et al., 1996; SCIORE et al., 1998; USHIYAMA et al., 1999; BRAIDMAN et al., 2001; DIETRICH et al., 2006) indicando a responsividade ao estrógeno. Na cartilagem da placa de crescimento, o ER- α e ER- β exercem efeitos opostos na regulação do crescimento longitudinal do osso: o primeiro acelera este processo e contribui para o esforço de crescimento durante a puberdade, e o segundo o reprime (LINDBERG et al., 2001; CHAGIN et al., 2004; NILSSON et al., 2005).

Atualmente, a maioria das evidências sugerem que a deficiência de estrógeno é desfavorável para a saúde da cartilagem (GOKHALE et al., 2004; SNIKERS et al., 2008; ROMAN-BLAS et al., 2009).

Os esteróides sexuais, como estrógeno e andrógeno, são reguladores importantes do hormônio do crescimento (GH), particularmente durante a puberdade (VAN DER EERDEN et al., 2003).

O estrógeno aumenta a secreção de GH pela glândula hipófise; e o GH e o subsequente aumento na produção local de IGF-1 atuam no crescimento ósseo (EASTELL, 2005; NILSSON; BARON, 2005). Isto também tem efeitos antiapoptóticos nos condrócitos, células osteoblásticas, e mioblastos (GRUBER et al., 2000; SEGARD et al., 2003).

De acordo com Rosner et al. (1986), a deficiência de estrógeno esta associada com a aceleração da perda de massa óssea em mulheres pós menopausa, mas o estrógeno também atua na maior parte da regulação do crescimento cartilaginoso, ou seja a cartilagem é um tecido hormônio sexual-sensível. Achados de Nasatzky et al. (1994) confirmam que na placa de crescimento de condrócitos, o 17β -estradiol inibe a proliferação celular e estimula a síntese de RNA, a incorporação de SO_4 , e a produção de colágeno, dependendo da concentração de 17β -estradiol e da amostra utilizada. Estes dados sugerem que a deficiência de estrógeno em fêmeas pode influenciar o metabolismo da cartilagem, indicando ainda uma conexão entre a osteoartrite e a função ovariana, tendo o estrógeno um efeito protetor contra a osteoartrite (TSAI; LIU, 1992).

A osteoartrite é um grupo heterogêneo de doenças sobrepostas da cartilagem com etiologias e caminhos patogênicos distintos no qual fatores biomecânicos sistêmicos e locais contribuem para seu desenvolvimento (POOLE et al., 2007; HERRERO-BEAMONT et al., 2009). Sabe-se que é uma degeneração articular, que resulta em mudanças estruturais dos tecidos articulares, como a cartilagem articular, o osso subcondral e a sinóvia. Ela pode levar a uma completa perda de superfície articular assim como à exposição do osso subcondral (SNIEKERS et al., 2008).

Apesar de estudos indicarem que a prevalência da osteoartrite é maior em homens após os cinquenta anos de idade (WILSON et al., 1990; PEYRON; ALTMAN, 1992), a maior incidência desta doença antes dos cinquenta anos ocorre em mulheres (PEYRON; ALTMAN, 1992; OLIVERIA et al., 1995; FELSON et al., 2000; WLUKA et al., 2000). Esta prevalência aumenta com a idade em ambos os sexos, mas em mulheres a prevalência de osteoartrite aumenta dramaticamente por volta dos cinquenta anos (LAWRENCE et al., 1966; HERNBORG; NILSSON, 1973; WILSON et al., 1990). Isto coincide com o início da menopausa.

A ovariectomia é um procedimento estabelecido na literatura que visa simular a condição hormonal de mulheres pós menopausa, e é usada como modelo para estudos de osteoporose e também das mudanças osteoartíticas após a ovariectomia (SNIEKERS et al., 2008).

Turner et al. (1997) estudaram as propriedades mecânicas da cartilagem após a ovariectomia em ovelhas. Eles constataram que apesar de ter aparência normal, a cartilagem articular dos animais ovariectomizados apresentavam

integridade estrutural inferior (menor módulo compressivo e menor módulo elástico) quando comparado com os animais controle, indicando uma piora das propriedades mecânicas. Ainda de acordo com este estudo, os animais ovariectomizados tratados com 17 β -estradiol (reposição hormonal) mantiveram a integridade estrutural, ou seja, as propriedades do material cartilaginoso nos animais tratados com estradiol mantiveram-se iguais as do grupo controle. Cake et al. (2005) verificaram mudanças na composição e histologia da cartilagem articular de ovelhas ovariectomizadas. Foram observadas a diminuição na espessura da cartilagem articular tíbio-femoral, o aumento da neovascularização da camada calcificada da cartilagem, e grande pontuação histopatológica, indicando um distúrbio no conteúdo e/ou organização estrutural de proteoglicanas e reunião macromolecular do colágeno.

De acordo com Claassen et al. (2002), que estudaram as mudanças na composição da matriz cartilágnea em quadris de mini porcos após a ovariectomia, a cartilagem continha mais glicosaminoglicanas sulfatadas (GAG's) – assim como observado com o aumento de idade, do que em animais controle. Verificaram também que o conteúdo de colágeno também foi afetado, sendo que nos animais operados houve importante diminuição deste componente quando comparado com os animais não operados.

Em estudo com coelhos, a ovariectomia aumentou as anormalidades osteoartríticas de joelhos não operados, e também intensificou os efeitos da patologia em joelhos onde a osteoartrite foi induzida experimentalmente por uma transecção do ligamento anterior (CALVO et al., 2007). Isto também pode ser observado em experimento semelhante realizado em ovelhas, onde a ovariectomia foi combinada com a retirada do menisco lateral, resultando na diminuição de proteoglicanas ainda mais do que apenas com a retirada do menisco lateral (PARKER et al., 2003).

O estudo de Takano et al. (2007) demonstrou que a deficiência de estrógeno também conduz a uma diminuição no número de condrócitos, que foi resultado de uma tendência para a apoptose e diminuição da proliferação celular. A função primária do estrógeno poderia ser a capacidade de proliferação celular na cinética celular (WEISE et al., 2001). A ovariectomia dos roedores deve reprimir as ações do estrógeno sobre todas as vias – ER- α , ER- β , e eixo GH-IGF-1 (TAKANO et al., 2007).

Foram identificados receptores de estrógeno em condrócitos articulares de vários animais e em humanos. Além de efeitos diretos, o estrógeno pode afetar também a homeostase da cartilagem articular modulando a expressão/ produção de moléculas diferentes, assim como vários fatores de crescimento, citocinas inflamatórias, matriz de metaloproteinases e espécies de reações oxidativas (TANKÓ et al., 2008).

Em trabalho avaliando os efeitos da idade e da menopausa sobre o peso do disco intervertebral, Gambacciani et al. (2007) concluíram que após a menopausa o espaço do disco intervertebral demonstra uma diminuição progressiva que, na maior parte das vezes, ocorre nos primeiros cinco a dez anos pós menopausa, sugerindo desta maneira que a diminuição de estrógeno pode mudar rapidamente o metabolismo do tecido conjuntivo nos discos intervertebrais.

Os efeitos diretos e indiretos do estrógeno na cartilagem articular confirmam a importância da terapia com estrógeno para a manutenção não apenas do osso mas também da saúde da cartilagem em mulheres na pós-menopausa (TANKÓ et al., 2008).

Portanto, o estrógeno é um fator que se presume afetar a regulação do *turnover* das cartilagens. Este suposto papel do estrógeno é acentuado pelo fato de a prevalência de osteoartrite em mulheres na menopausa ser maior que em homens (HØEGH-ANDERSEN et al., 2004).

3.3 EFEITOS DA ATIVIDADE FÍSICA SOBRE A CARTILAGEM ARTICULAR

As forças mecânicas tem sido consideradas há muito tempo como reguladoras de tecidos musculoesqueléticos, e podem ser o fator de desenvolvimento mais importante responsável pela homeostase da articulação. A transmissão de forças mecânicas requer a participação de múltiplos componentes articulares, incluindo osso, músculos, cartilagem articular e tendões e ligamentos (SUN, 2010).

A atividade física alonga a musculatura que envolve e suporta a articulação e assim reduz muito os riscos de lesão articular. Também previne a aderência da articulação, aumentando e mantendo a sua mobilidade; e ainda, a atividade física freqüente combate a obesidade, que é um fator de risco para o desenvolvimento de lesões articulares. Por fim, como as cartilagens não são irrigadas ou inervadas, as células da cartilagem são nutridas apenas pela difusão de substâncias do líquido sinovial através da matriz cartilagínea. A atividade física promove este processo (HALL et al., 1991).

A manutenção das propriedades biológicas, da estrutura e função da cartilagem articular dependem do movimento e da descarga de peso sobre ela (PALMOSKI et al., 1980; KIVIRANTA et al., 1987; AROKOSKI et al., 1993; VAN DEN HOOGEN et al., 1998; BEAUPRÉ et al., 2000). Alguns estudos mostram que em animais jovens a carga contribui para o desenvolvimento e em adultos para a conservação da matriz extracelular (SÄÄMÄNEN et al., 1994).

Pesquisas evidenciaram que os tecidos componentes da articulação (osso, músculo, cartilagem e ligamentos) são sensíveis a magnitude, duração e natureza do estímulo mecânico (SUN, 2010). Embora a articulação mantenha sua homeostase dentro da atividade fisiológica das cargas mecânicas, a baixa carga ou a sobrecarga apresentam efeitos catabólicos, particularmente para os componentes da cartilagem articular (ARENDT; DICK, 1995; LEVY et al., 1996; JONES et al., 2001).

Em geral, a redução do estresse e da tensão diminui a função de síntese celular e a organização da matriz cartilagínea, enquanto que o aumento destas forças leva ao aumento das suas funções. Se estas forças estiverem acima de níveis críticos podem levar a ruptura e degeneração do tecido (LANE; BUKWALTER, 1993; JORTIKKA et al., 1997; MATYAS et al., 2002).

Estudos mostraram que o estresse mecânico excessivo pode causar um dano direto a matriz extracelular da cartilagem articular e alterar o equilíbrio nos condrócitos favorecendo a atividade catabólica em detrimento do anabolismo (SUN, 2010).

Os exercícios forçados causam desagregação da cartilagem em animais adultos jovens e diminuição dos PGs (AROKOSKI et al., 1993). Ocorre um aumento

do fluxo de água levando à ruptura da matriz, diminuindo a integridade da cartilagem e aumentando a susceptibilidade às alterações degenerativas (SAH et al., 1992; BUCKWALTER, 1995; EGRI; BATTISTELLA; YOSHINARI, 1999). Estudos de Pap et al. (1998) demonstraram que o esforço excessivo leva ao aumento da produção e da atividade das enzimas que degradam os PGs ocorrendo degradação da matriz com diminuição dos componentes extracelulares (PGs e condroitina- 4 e 6 sulfato).

Da mesma maneira que o excesso de carga é prejudicial à cartilagem articular, a carga reduzida, que ocorre normalmente como resultado da imobilização causada por lesões medulares ou mesmo secundária ao tratamento de uma lesão musculoesquelética (MCCARTHY; OAKLEY, 2002; JONES; AMENDOLA, 2007) ou ainda resultado de uma doença articular como a artrite (FONTAINE; HEO; BATHON; 2004) também criam respostas catabólicas dentro da cartilagem articular.

A imobilização prolongada *in vivo* causa diminuição da espessura da cartilagem (JURVELIN et al., 1986; HAAPALA et al., 1999), amolecimento tecidual (JUVERLIN et al., 1986; HAAPALA et al., 2000) e reduz o conteúdo de PGs (HAAPALA et al., 1996; HAAPALA et al., 1999), levando a fribração, ulceração e erosão da matriz cartilagínea (EVANS et al., 1960; HAGIWARA et al., 2009).

Segundo Kiviranta et al. (1988), a realização de exercícios moderados melhora as propriedades biomecânicas e biológicas da cartilagem articular.

Vários experimentos descrevem que o exercício de carga moderada na cartilagem hialina de articulações de joelhos de cães, ratos e coelhos causa aumento da síntese e concentração de PGs e GAGs (PALMOSKI; BRANDT, 1981; KIVIRANTA et al., 1987; KIVIRANTA et al., 1988; SÄÄMÄNEN et al., 1988; LAMMI et al., 1993; VAN DEN HOOGEN et al., 1998), aumento do volume da cartilagem (JONES et al., 2000) e adaptação da mesma ao esforço (LAMMI et al., 1993), além de estimular o condrócito a produzir os elementos que compõem a matriz extracelular (BIHARI-VARGA et al., 1984; VISSER et al., 1994; EGRI; BATTISTELLA; YOSHINARI, 1999).

Segundo Otterness et al. (1998), o exercício moderado age como um condroprotetor, mantendo o conteúdo de PGs da matriz extracelular em animais jovens, e a falta do exercício pode levar a diminuição destes elementos. Cargas constantes são importantes para manutenção da saúde da cartilagem (SAH et al.,

1991; SAH et al., 1992; KIM et al., 1994; BUCKWALTER, 1995).

Em experimentos realizados com animais adultos jovens com sobrecarga progressiva observou-se adaptação da cartilagem articular a esta carga pelo aumento da concentração de PGs e da espessura da cartilagem sem alterações na sua integridade (KIVIRANTA et al., 1987; KIVIRANTA et al., 1992; AROKOSKI et al., 1993; LANE; BUCKWALTER, 1993; SÄÄMÄNEN et al., 1994; VISSER et al., 1998).

Experimento realizado por Espanha et al. (2001), com ratos adultos, demonstrou que o exercício moderado modifica levemente a cartilagem de ratos adultos. Uma reparação da matriz extracelular ocorreu nos estágios iniciais no grupo exercitado. Após longa duração (8 semanas) não houve uma diferença significativa entre este e o grupo controle.

A corrida causa estresse repetitivo nos membros inferiores, pois os pés sofrem um impacto de 600 a 1200 vezes o peso corporal, com uma força de reação ao solo de 2 a 4 vezes o peso do corpo humano. O impacto pode ser atenuado pelo calçado ou ser transmitido diretamente para os membros inferiores (DOWZER et al., 1998). A ação de correr é diferente da de caminhar, pelo fato de que possui um período de não contacto (ou fase de vôo) e uma fase de suporte onde apenas um dos pés está em contacto com o solo (LESS, 2001).

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização deste estudo foram utilizados 12 ratas (*Rattus norvegicus*), da linhagem Wistar com seis meses de idade provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP).

Os animais foram divididos em quatro grupos com três animais cada, de modo aleatório e sistematizado, sendo eles: ratas controle sedentárias (RCS), ratas controle treinadas (RCT), ovariectomizadas sedentárias (ROS) e ovariectomizadas treinadas (ROT). Cada grupo foi analisado pelas técnicas de microscopia de luz e microscopia eletrônica de /.

Os animais do grupo RCS e ROS não fizeram atividade física. Todos os animais foram sacrificados aos 9 meses de idade (ratas adultas).

Os animais permaneceram alojados em caixas de polipropileno autoclavável (303 x 193 x 126 mm) providas de bebedouro e comedouro (Figura 1), e mantidas em condições ambientais controladas de temperatura (22°C) e de iluminação (ciclo de 12 horas claro/12 horas escuro). Para todos os grupos foi fornecida ração comercial referência para ratos (Nuvital®) e água *ad libitum* (SHINODA et al., 2002).

Figura 1 – Imagem ilustrativa da caixa de polipropileno autoclavável com dimensões de 303 x 193 x 126 mm providas de bebedouro. Os animais alojados possuíam espaço para se locomover confortavelmente dentro das caixas

Os animais foram pesados mensalmente em balança digital (Marte®) antes de cada teste de esforço máximo (TEM) e no dia da eutanásia.

O protocolo experimental foi submetido e aprovado pela Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP.

4.1 PREPARAÇÃO DOS ANIMAIS PARA INICIO DO EXPERIMENTO

Os animais dos grupos ROS e ROT foram submetidos à cirurgia de ovariectomia bilateral realizada por médico veterinário, no Laboratório de Anatomia da FMVZ-USP, aos 6 meses de idade. Para tanto, as ratas foram pesadas e anestesiadas com injeção intraperitoneal de Cloridrato de Ketamina (75 mg/kg) e Diazepan (5 mg/kg) (WIXSON et al., 1987). Após a antissepsia da região ventral do abdômen, os animais foram posicionados em decúbito dorsal e uma pequena incisão foi realizada na região pré-umbilical de cada rata. As vísceras pélvicas e abdominais foram afastadas, os ovários e tubas uterinas foram tracionados e suturados. Por fim, foi realizada a remoção bilateral dos ovários e subsequente fechamento da parede abdominal (PATTULO, 2001; SHINODA et al., 2002). Durante a recuperação anestésica os animais foram mantidos aquecidos e em observação por cerca de quatro horas.

Para evitar qualquer tipo de inflamação e sofrimento destes animais no pós-operatório, foi administrado por via subcutânea o antiinflamatório e analgésico Flunixin-Meglumina (2,5 mg/kg), uma vez ao dia por 3 dias consecutivos (FLECKNELL, 1999).

As ratas ficaram alojadas conforme descrito anteriormente, em observação até a recuperação total, e após este período a atividade física foi iniciada (SAKAKURA et al., 2001, SHINODA et al., 2002).

Conforme observado na literatura, a duração do ciclo estrogênico de ratas ocorre em torno de quatro dias e é caracterizado por quatro fases (diestro, proestro, estro e metaestro) (MARCONDES et al., 2002; MARTINS et al., 2005). Por tanto, para a confirmação de êxito na castração das ratas dos grupos ROS e ROT, foi realizado exame de citologia vaginal (SHINODA et al., 2002). Para confirmação final dos níveis plasmáticos de estradiol, foi realizado exame laboratorial de dosagem do estradiol através do método de radioimunoensaio em laboratório especializado (Rhesus e Provet) para os animais dos grupos ovariectomizados.

4.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL DE ATIVIDADE FÍSICA

O programa de atividade física teve duração de 3 meses, e foi dividido em períodos de 4 semanas.

Um teste de esforço máximo (TEM) foi realizado no início do experimento em uma esteira elétrica (Inbrasport®) adaptada, onde foi sobreposta uma caixa de alumínio e tampa acrílica, subdividida em oito caixas menores (raias). Para facilitar o treinamento, a porção anterior de cada raia foi coberta com papel pardo, a fim de criar um ambiente escuro que atraísse os animais (Figura 2).

Figura 2 – Atividade física de corrida em esteira realizada pelos grupos RCT e ROT

A velocidade inicial da esteira foi de 0,08 m/s. A cada 4 minutos a velocidade da esteira foi aumentada na mesma proporção (0,08m/s) (Tabela 1). O valor do TEM máximo era obtido quando o animal demonstrava sinais de fadiga ou quando não conseguia mais realizar a atividade espontaneamente (SILVA et al., 1997). Os animais que não andavam ou não corriam foram excluídos da pesquisa. Por fim, os animais foram distribuídos aleatoriamente entre os grupos RCS, RCT (animais controle) e os grupos ROS e ROT (animais ovariectomizados).

Tabela 1 – Teste de esforço máximo (TEM) realizado com todas as ratas participantes da pesquisa – São Paulo – 2008

TESTE DE ESFORÇO MÁXIMO (TEM)								
Tempo (min.)	0-4	4-8	8-12	12-16	16-20	20-24	24-28	...
Velocidade (m/s)	0,08	0,16	0,24	0,32	0,40	0,48	0,56	...

Os TEMs foram realizados a cada 4 semanas em todos os grupos, com o objetivo de ajustar uma nova velocidade para o treinamento. Após o primeiro TEM, os animais dos grupos RCT e ROT foram submetidos a três meses de treinamento em esteira, 5 dias por semana, com carga progressiva até 60% daquela conseguida no teste de esforço. Na primeira semana após o teste, os animais correram por 30 minutos, aumentando este tempo em 10 minutos por semana até chegar a 60 minutos na quarta semana (Tabela 2), onde ao final da mesma, outro TEM foi realizado para ajustar a intensidade do exercício pelas próximas 4 semanas

Os animais dos grupos RCS e ROS foram submetidos à atividade física apenas uma vez por semana durante 10 minutos, durante as doze semanas do experimento, com velocidade de 30% de seu respectivo TEM. Esta é a menor velocidade capaz de proporcionar o mínimo de atividade física, apenas para não perderem sua capacidade de realizá-la (Tabela 2).

Tabela 2 – Tempo de atividade física realizado por semana para cada grupo – São Paulo - 2008

	GRUPO	SEMANA 1	SEMANA 2	SEMANA 3	SEMANA 4
TEMPO DE CORRIDA (MIN)	RCS	10	..	..	..
	RCT	30	40	50	60
	ROS	10	..	..	..
	ROT	30	40	50	60

Nota: .. não se aplica dado numérico

Terminado o período de treinamento, os animais foram eutanasiados e a cabeça do fêmur evidenciada e retirada. O protocolo de eutanásia dos animais foi submetido à Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

4.3 PREPARAÇÃO DO MATERIAL

Após a última sessão de corrida, os animais de todos os grupos foram pesados e anestesiados com injeção intraperitoneal de Cloridrato de Ketamina (75 mg/kg) e Diazepan (5 mg/kg) (WIXSON et al., 1987), e os corações evidenciados por meio de toracotomia. Foi então realizada a punção sanguínea do ventrículo esquerdo para posterior exame laboratorial dos níveis plasmáticos de estradiol.

O ventrículo esquerdo foi perfundido com solução salina tamponada fosfatada (PBS, Sigma[®], USA) a 0,1M e pH 7,4 e heparina a 2% (Roche[®], BRA) para a lavagem do sistema arterial e venoso. Posteriormente, foi realizada perfusão com solução fixadora (Karnovsky modificado - glutaraldeído a 3% [Merck[®]] e formaldeído a 1% [Sigma[®]] em tampão cacodilato de sódio [EMS[®]] à 0,125M e pH 7,4 à 10%).

Foram retiradas as articulações dos quadris esquerdos de todos os animais. Foram escolhidas para este estudo, as patas traseiras, pois, são as que mantêm a propulsão durante a marcha. Foi utilizada a cartilagem da região da cabeça do fêmur por ser um local comum de degeneração devido à relação com a descarga do peso corporal em várias espécies (ADAMS, 1989; KÄÄB et al., 1998). Os músculos das regiões anterior e posterior do quadril foram dissecados, expondo a articulação. A cápsula foi então aberta, o ligamento redondo da cabeça do fêmur seccionado, e esta separada e isolada por meio de uma secção ao nível da parte distal do colo do fêmur. As peças foram lavadas em Cacodilato, e processadas em Resina Araldite[®], formando pequenos blocos.

A fim de definir a espessura de corte seriada dos blocos obtidos, foram retiradas 5 secções seriadas de 2µm de espessura, de cada grupo. Os cortes foram coletados em lâminas histológicas (para exame à microscopia de luz) e corados com azul de toluidina, a fim de evidenciar a matriz extracelular e os condrócitos presentes na cartilagem hialina da cabeça do fêmur, e posteriormente cobertas com uma gota de araldite (502 Polyscience Inc[®]), montados sob lamínula e observadas ao microscópio Leica[®] DMR com câmera Leica[®] DC 300F, e software de análise Leica Qwin[®] (Leica Microsystem Imaging Solution Ltd, Cambridge, UK). Uma área foi escolhida sistemática, uniforme e aleatoriamente para promover a análise dos núcleos dos condrócitos. Esta foi delimitada por uma área teste (At) de aproximadamente 13.189 µm², constituída por linhas de inclusão e exclusão, sendo considerados apenas os perfis que estavam dentro da área teste e que não tocavam nas linhas de exclusão (GUNDERSEN, 1977).

Desta forma, o eixo maior do núcleo dos condrócitos “permitidos” (dentro da

área de inclusão) foi mensurado (Figura 3) com o auxílio do programa para processamento de imagens Leica Qwin®, devidamente calibrado com uma régua milimetrada. Foram mensurados em média 45 núcleos celulares, distribuídos em quatro quadrantes diferentes de cada secção, escolhidos sistematica, uniforme e aleatoriamente, por grupo.

Figura 3 – Mensuração dos núcleos de condrócitos. Fotomicrografia de um quadrante da secção da cabeça do fêmur, com sobreposição de um sistema teste com linhas de exclusão e inclusão (pontilhadas e contínuas respectivamente). Condrócitos dentro da área teste e que não tocavam a linha de exclusão, tiveram seus núcleos mensurados (traços vermelhos). Coloração: Azul de Toluidina. Aumento: 40X. Scale bar: 50 μ m

A mensuração dos diâmetros maiores dos núcleos dos condrócitos se fez necessária para a determinação da espessura de corte e número de secções desprezadas, sendo calculada a partir do valor de um terço da média obtida para cada grupo (de 1,3 a 1,9 μ m).

Após esta etapa, foram obtidos cortes seqüenciais e paralelos ao eixo longo da cabeça femoral (BADDELEY; GUNDERSEN; CRUZ OLIRIVE, 1986) com a utilização de ultra micrótomo Leica Ultracut UCT, com navalha de diamante, obtendo secções semi-finas e ultra finas (Figura 4 A-B). Para estudos à microscopia eletrônica de transmissão, os cortes ultrafinos coletados, também de maneira seqüencial e aleatória, foram acondicionados em pequenas telas e levados ao microscópio eletrônico de transmissão da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo onde foram analisados (Figura 4C).

Figura 4 (A-C) – (A) Fotomicrografia de corte histológico da cabeça do fêmur de rata, microscopia de luz: em (a) osso, em (b) cartilagem articular. Coloração: Azul de Toluidina. Aumento:10X. Scale bar: 500 µm. (B) Fotomicrografia mostrando a cartilagem da cabeça do fêmur, com condrócitos (seta preta) e matriz extracelular (seta branca), em microscopia de luz. Coloração: Azul de Toluidina. Aumento: 40X. Scale bar: 50 µm. (C) Fotomicrografia em microscopia eletrônica de transmissão, mostrando as fibras colágenas cortadas longitudinalmente (seta pontilhada) e transversalmente (seta tracejada). Aumento:11000X. Scale bar: 2 µm

4.4 ANÁLISE ESTEREOLÓGICA

A análise estereológica foi realizada em duas etapas: microscopia de luz - imagens digitalizadas, de maneira semi-automática, com programa de imagem onde foram estimados densidade numérica de condrócitos (N_v), volume total da cartilagem (V_{ref}), número total de condrócitos (N), densidade de volume de condrócitos ($V_{v(cond)}$) e densidade de volume da matriz ($V_{v(mat)}$), volume total de matriz ($V_{mat.}$) e volume médio dos condrócitos ($\bar{v}_N$) de todos os grupos; e microscopia eletrônica de transmissão – a partir de imagens capturadas foi analisada a densidade de volume de colágeno presentes em cada grupo.

4.4.1 Densidade Numérica (N_v)

Para a estimativa da densidade numérica, o método do disector físico foi empregado. O método consiste em amostrar dois cortes seqüenciais, chamados de referencia e “*look-up*”, e verificar os perfis presentes no primeiro e não no segundo, utilizando-se do mesmo sistema com linhas de inclusão e exclusão “*unbiased counting frame*” descrito por Gundersen (1977) (Figura 5). Neste estudo, foi realizado também o método “*two way*” disector, em que a “*look up*” vira referência e vice versa. Este método permite estimar a densidade numérica (N_v) de condrócitos dentro de um volume conhecido (STERIO, 1984; GUNDERSEN, 1988; MAYHEW; GUNDERSEN, 1996; HOWARD; REED, 2005).

Figura 5 – Perfis celulares (Q^{-}). Fotomicrografia da cartilagem da cabeça do fêmur de rata com a aplicação de um sistema teste, com o método de *disector* físico. Em A: secção referência, de células contidas dentro de um sistema teste, com linhas de inclusão (pontilhadas) e exclusão (contínuas), B: Secção “look up”, células contidas na mesma área da A. Na comparação de A e B (*disector*), é possível observar os núcleos celulares presentes em A e ausentes em B (setas pretas); e presentes em B e ausentes em A (setas brancas). Coloração: Azul de Toluidina. Aumento: 40X. Scale bar: 50μm

O calculo de N_v é feito pela soma de perfis celulares (ΣQ), dividido pela somatória dos volumes do disector ($V_{(dis)}$). O volume de cada disector representa a área teste ($A_t = 13188,9 \mu m^2$) pela altura do disector (t), $1,3 \mu m$, $1,8 \mu m$, $1,6$ e $1,9 \mu m$ para os grupos RCS, RCT, ROS e ROT respectivamente (Equações 1 e 2).

$$N_v = \Sigma Q / \Sigma V_{(dis)}$$

Equação 1

$$V_{(dis)} = t \times A_t$$

Equação 2

4.4.2 Volume Total da Cartilagem (V_{ref})

Para a quantificação do volume total da cartilagem, foi utilizado o principio de Cavalieri. Cavalieri (1598-1647) mostrou que o volume de qualquer objeto $V_{(obj)}$ pode ser estimado a partir de secções paralelas separadas por uma distancia conhecida (T), pela soma das áreas de todas as secções obtidas do objeto (Σa) multiplicada por T (Equação 3). Existe apenas uma condição que deve ser seguida, a de que a posição da primeira fatia deve ser aleatória no objeto.

$$V(obj) = T \times \Sigma a$$

Equação 3

T = distancia entre as secções

Σa = Somatória das áreas de todas as secções obtidas do objeto

Os eixos longos das cabeças femorais de todos os grupos foram mensuradas com paquímetro digital Digimess®. A primeira fatia foi obtida aleatoriamente, a partir de uma tabela de números aleatórios ou “*random numbers*” (Figura 6), dentro do intervalo 1-k.

You are looking for a random number R fulfilling $1 \leq R \leq 57$.

1: Take the first unused digit in the first (unnumbered) blocks- and cross it out! (= 9)

2: In the block with that number read the unused digits in pairs until a pair fulfill the criterion. (= 26)
Cross out all read pairs. If the upper limit of the number you are looking for is => 100 you deal with triplets in stead, etc.

Random Numbers

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0000	0001	0002	0003	0004	0005	0006	0007	0008	0009
0010	0011	0012	0013	0014	0015	0016	0017	0018	0019
0020	0021	0022	0023	0024	0025	0026	0027	0028	0029
0030	0031	0032	0033	0034	0035	0036	0037	0038	0039
0040	0041	0042	0043	0044	0045	0046	0047	0048	0049
0050	0051	0052	0053	0054	0055	0056	0057	0058	0059
0060	0061	0062	0063	0064	0065	0066	0067	0068	0069
0070	0071	0072	0073	0074	0075	0076	0077	0078	0079
0080	0081	0082	0083	0084	0085	0086	0087	0088	0089
0090	0091	0092	0093	0094	0095	0096	0097	0098	0099
0100	0101	0102	0103	0104	0105	0106	0107	0108	0109
0110	0111	0112	0113	0114	0115	0116	0117	0118	0119
0120	0121	0122	0123	0124	0125	0126	0127	0128	0129
0130	0131	0132	0133	0134	0135	0136	0137	0138	0139
0140	0141	0142	0143	0144	0145	0146	0147	0148	0149
0150	0151	0152	0153	0154	0155	0156	0157	0158	0159
0160	0161	0162	0163	0164	0165	0166	0167	0168	0169
0170	0171	0172	0173	0174	0175	0176	0177	0178	0179
0180	0181	0182	0183	0184	0185	0186	0187	0188	0189
0190	0191	0192	0193	0194	0195	0196	0197	0198	0199
0200	0201	0202	0203	0204	0205	0206	0207	0208	0209
0210	0211	0212	0213	0214	0215	0216	0217	0218	0219
0220	0221	0222	0223	0224	0225	0226	0227	0228	0229
0230	0231	0232	0233	0234	0235	0236	0237	0238	0239
0240	0241	0242	0243	0244	0245	0246	0247	0248	0249
0250	0251	0252	0253	0254	0255	0256	0257	0258	0259
0260	0261	0262	0263	0264	0265	0266	0267	0268	0269
0270	0271	0272	0273	0274	0275	0276	0277	0278	0279
0280	0281	0282	0283	0284	0285	0286	0287	0288	0289
0290	0291	0292	0293	0294	0295	0296	0297	0298	0299
0300	0301	0302	0303	0304	0305	0306	0307	0308	0309
0310	0311	0312	0313	0314	0315	0316	0317	0318	0319
0320	0321	0322	0323	0324	0325	0326	0327	0328	0329
0330	0331	0332	0333	0334	0335	0336	0337	0338	0339
0340	0341	0342	0343	0344	0345	0346	0347	0348	0349
0350	0351	0352	0353	0354	0355	0356	0357	0358	0359
0360	0361	0362	0363	0364	0365	0366	0367	0368	0369
0370	0371	0372	0373	0374	0375	0376	0377	0378	0379
0380	0381	0382	0383	0384	0385	0386	0387	0388	0389
0390	0391	0392	0393	0394	0395	0396	0397	0398	0399
0400	0401	0402	0403	0404	0405	0406	0407	0408	0409
0410	0411	0412	0413	0414	0415	0416	0417	0418	0419
0420	0421	0422	0423	0424	0425	0426	0427	0428	0429
0430	0431	0432	0433	0434	0435	0436	0437	0438	0439
0440	0441	0442	0443	0444	0445	0446	0447	0448	0449
0450	0451	0452	0453	0454	0455	0456	0457	0458	0459
0460	0461	0462	0463	0464	0465	0466	0467	0468	0469
0470	0471	0472	0473	0474	0475	0476	0477	0478	0479
0480	0481	0482	0483	0484	0485	0486	0487	0488	0489
0490	0491	0492	0493	0494	0495	0496	0497	0498	0499
0500	0501	0502	0503	0504	0505	0506	0507	0508	0509
0510	0511	0512	0513	0514	0515	0516	0517	0518	0519
0520	0521	0522	0523	0524	0525	0526	0527	0528	0529
0530	0531	0532	0533	0534	0535	0536	0537	0538	0539
0540	0541	0542	0543	0544	0545	0546	0547	0548	0549
0550	0551	0552	0553	0554	0555	0556	0557	0558	0559
0560	0561	0562	0563	0564	0565	0566	0567	0568	0569
0570	0571	0572	0573	0574	0575	0576	0577	0578	0579
0580	0581	0582	0583	0584	0585	0586	0587	0588	0589
0590	0591	0592	0593	0594	0595	0596	0597	0598	0599
0600	0601	0602	0603	0604	0605	0606	0607	0608	0609
0610	0611	0612	0613	0614	0615	0616	0617	0618	0619
0620	0621	0622	0623	0624	0625	0626	0627	0628	0629
0630	0631	0632	0633	0634	0635	0636	0637	0638	0639
0640	0641	0642	0643	0644	0645	0646	0647	0648	0649
0650	0651	0652	0653	0654	0655	0656	0657	0658	0659
0660	0661	0662	0663	0664	0665	0666	0667	0668	0669
0670	0671	0672	0673	0674	0675	0676	0677	0678	0679
0680	0681	0682	0683	0684	0685	0686	0687	0688	0689
0690	0691	0692	0693	0694	0695	0696	0697	0698	0699
0700	0701	0702	0703	0704	0705	0706	0707	0708	0709
0710	0711	0712	0713	0714	0715	0716	0717	0718	0719
0720	0721	0722	0723	0724	0725	0726	0727	0728	0729
0730	0731	0732	0733	0734	0735	0736	0737	0738	0739
0740	0741	0742	0743	0744	0745	0746	0747	0748	0749
0750	0751	0752	0753	0754	0755	0756	0757	0758	0759
0760	0761	0762	0763	0764	0765	0766	0767	0768	0769
0770	0771	0772	0773	0774	0775	0776	0777	0778	0779
0780	0781	0782	0783	0784	0785	0786	0787	0788	0789
0790	0791	0792	0793	0794	0795	0796	0797	0798	0799
0800	0801	0802	0803	0804	0805	0806	0807	0808	0809
0810	0811	0812	0813	0814	0815	0816	0817	0818	0819
0820	0821	0822	0823	0824	0825	0826	0827	0828	0829
0830	0831	0832	0833	0834	0835	0836	0837	0838	0839
0840	0841	0842	0843	0844	0845	0846	0847	0848	0849
0850	0851	0852	0853	0854	0855	0856	0857	0858	0859
0860	0861	0862	0863	0864	0865	0866	0867	0868	0869
0870	0871	0872	0873	0874	0875	0876	0877	0878	0879
0880	0881	0882	0883	0884	0885	0886	0887	0888	0889
0890	0891	0892	0893	0894	0895	0896	0897	0898	0899
0900	0901	0902	0903	0904	0905	0906	0907	0908	0909
0910	0911	0912	0913	0914	0915	0916	0917	0918	0919
0920	0921	0922	0923	0924	0925	0926	0927	0928	0929
0930	0931	0932	0933	0934	0935	0936	0937	0938	0939
0940	0941	0942	0943	0944	0945	0946	0947	0948	0949
0950	0951	0952	0953	0954	0955	0956	0957	0958	0959
0960	0961	0962	0963	0964	0965	0966	0967	0968	0969
0970	0971	0972	0973	0974	0975	0976	0977	0978	0979
0980	0981	0982	0983	0984	0985	0986	0987	0988	0989
0990	0991	0992	0993	0994	0995	0996	0997	0998	0999

Figura 6 – Tabela de números randômicos. Fonte: 1stt ISS Brazilian Stereology Course – São Paulo – 2005

As seções obtidas foram montadas sob lâminas, coradas com solução de azul de toluidina, cobertas com uma gota de araldite (502 Polyscience Inc.®) e montadas sob laminulas, como descrito anteriormente.

As seções observadas a microscópio óptico foram fotografadas, com aumento de 10X, sendo este o maior aumento para que fosse possível observar todo o corte.

Com um sistema teste específico colocado sobre a fotomicrografia, foi contado o número de pontos que tocavam apenas a área desejada (Figura 7), e em seguida estimado o volume pelo princípio de Cavalieri, que leva em conta a área por pontos ($a/p = 142.618 \mu\text{m}^2$) utilizada para a estimativa de cada slab e a distancia T dos cortes, obtida pelo produto de t por k (Equação 4).

$$V_{(\text{ref})} = \Sigma a_{(\text{prof})} \times (a/p) \times t \times k$$

Equação 4

Figura 7 – Estimativa do volume total da cartilagem. Fotomicrografia do fêmur, com sobreposição de um sistema teste composto por pontos equidistantes entre si. Em A: cartilagem; B: osso. Neste exemplo, apenas 5 pontos que tocam a cartilagem. Coloração: Azul de Toluidina. Aumento: 10X. Scale bar: 100μm

O coeficiente de erro ($CE_{(V_{ref})}$) para Cavalieri foi estimado a partir do “noise effect”, “variance SURS”, e “total variance of ΣP ” (Equação 5, 6, 7 e 8) (GUNDERSEN, 1999; NYENGAARD, 1999).

$$\text{Noise} = (0,0724 \times (b/\sqrt{a}) \times \sqrt{n \times \Sigma P})$$

Equação 5

$(b/\sqrt{a})$ = estimativa do formato da estrutura

n = número de secções

ΣP = somatória de pontos

$$\text{Var}_{\text{surs}}(\Sigma a) = (3 \times (A - \text{Noise}) - 4B + C) / 240$$

Equação 6

A = Somatória de pontos de $A \times A$

B = Somatória de pontos de $A \times (A + 1)$

C = Somatória de pontos de $A \times (A + 2)$

$$\text{Total Variance } \Sigma P = \text{Noise} + \text{Var}_{\text{surs}}(\Sigma a)$$

Equação 7

$$CE_{(V_{ref})} = \sqrt{\text{Total Variance}/\Sigma P}$$

Equação 8

4.4.3 Número Total de Condrócitos (N)

A estimativa do número total de condrócitos foi feita a partir do produto da densidade numérica (N_v) – estimado pelo disector físico, pelo volume total da cartilagem (V_{ref}) – estimado pelo princípio de Cavalieri (GUNDERSEN, 1986) (Equação 9), e o coeficiente de erro ($CE_{(N)}$) (Equação 10) deve ser entre 5-10% (PAKKENBERG; GUNDERSEN, 1989; BRAENDGAARD et al., 1990; MAYHEW; OLSEN, 1991; STERIO, 1894; RIBEIRO, DAVIS; GABELLA, 2004; GAGLIARDO et al., 2005).

$$N = N_v \times V_{(ref)}$$

Equação 9

$$CE_{(N)} = 1/\sqrt{\Sigma Q}$$

Equação 10

4.4.4 Densidade de Volume dos Condrócitos ($V_{V (cond)}$) e Densidade de Volume da Matriz Extracelular ($V_{V (mat)}$).

Densidade de volume é a fração do volume total ocupado pelos condrócitos e/ou pela matriz extracelular e do volume total da referência (RIBEIRO, 2006). A fim de estimar V_v , um sistema teste de pontos eqüidistantes, foi colocado aleatoriamente sobre a fotomicrografia das secções de referência utilizadas para a estimativa da densidade numérica, e em seguida, o número total dos pontos que tocaram o espaço referência – cartilagem ($P_{(rs)}$), foi contado, assim como o número total dos pontos que tocaram os condrócitos ($P_{(cond)}$) e a matriz extracelular ($P_{(mat)}$) (Equações 11 e 12) (Figura 8). A estimativa da densidade de volume vai de 0 a 1,

porém é expressa geralmente em porcentagem (HOWARD; REED, 2005; RIBEIRO; 2006).

$$V_{v(\text{cond}, \text{rs})} = \Sigma P_{(\text{cond})} / \Sigma P_{(\text{rs})}$$

Equação 11

$$V_{v(\text{mat}, \text{rs})} = \Sigma P_{(\text{mat})} / \Sigma P_{(\text{rs})}$$

Equação 12

Figura 8 – Estimativa da densidade de volume de condrócitos e de matriz extracelular ($V_{v(\text{cond})}$) e $V_{v(\text{mat})}$). Quadrante da cabeça femoral com sobreposição de um sistema teste composto por pontos eqüidistantes entre si. Em A: cartilagem; B: osso. Neste exemplo os pontos que tocam a cartilagem ($\Sigma P_{(\text{rs})}$) somam 60; pontos que caem sobre condrócitos ($\Sigma P_{(\text{cond})}$) somam 6, pontos que tocam a matriz ($\Sigma P_{(\text{mat})}$), somam 54. Pontos sobre o osso e fora da amostra foram desconsiderados. Aumento: 40X

4.4.5 Volume Total de Matriz Extracelular ($V_{\text{mat.}}$)

Uma vez conhecida a densidade de volume da matriz extracelular e o volume referência, e sabendo-se que a cartilagem é composta de condrócitos e matriz, foi possível estimar o volume total da matriz extracelular (Equação 13).

$$V_{\text{mat}} = V_{v(\text{mat})} \times V_{(\text{ref})}$$

Equação 13

4.4.6 Volume Médio dos Condrócitos ($\bar{v}_N$)

O volume médio dos condrocitos foi estimado indiretamente através da relação entre densidade de volume e da densidade numérica (Equação 14) (HOWARD; REED, 2005).

$$\bar{v}_N = V_{v(\text{cond})} / N_v$$

Equação 14

4.4.7 Densidade de Volume de Colágeno ($V_{v(\text{col})}$)

Das mesmas amostras foram retirados cortes ultra finos para análise em microscópio de transmissão. Nestes cortes foi avaliada a densidade de volume de colágeno existente na cartilagem, utilizando um sistema teste de pontos eqüidistantes, colocado sobre a fotomicrografia de transmissão, e em seguida o número total de pontos que tocaram o espaço referência – total ($P_{(\text{tot})}$), foi contado, assim como o número total dos pontos que tocaram as fibras colágenas ($P_{(\text{col})}$) (Equação 15) (Figura 9).

$$V_{v(\text{col})} = \Sigma P_{(\text{col})} / \Sigma P_{(\text{tot})}$$

Equação 15

Figura 9 – Estimativa da densidade de volume de colágeno ($V_{v(col)}$). Fotomicrografia eletrônica de Transmissão de região aleatória da cartilagem da cabeça femoral de rata, com sobreposição de sistema teste de pontos eqüidistantes. Foram considerados os pontos que tocaram nas fibras colágenas (setas pretas). Scale bar: 2μ

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises foram feitas por meio do programa Minitab® Release 16.1, Academic Version (MINITAB, 2010).

Para a análise de peso corpóreo e desempenho físico, foi utilizado o procedimento de análise de variância. A distribuição de frequência dos parâmetros estereológicos investigados foi analisada pelo “one-way” ANOVA. Quando diferenças significativas entre grupos foram encontradas, realizou-se o teste de Tukey de comparações múltiplas. O nível de confiança estipulado pelos testes foram de 95% ($P < 0,05$).

Os resultados são expressos como média (CV), sendo $CV = Sd/média$.

5 RESULTADOS

Neste capítulo, os resultados serão expostos subdivididos em quatro itens: dosagem dos níveis de estradiol; pesagem dos animais; desempenho físico e análise estereológica.

5.1 DOSAGEM DOS NÍVEIS DE ESTRADIOL

Para confirmação final dos níveis plasmáticos de estradiol das ratas ovariectomizadas (ROS e ROT), foi realizado exame laboratorial de dosagem do estradiol através do Método de Radioimunoensaio (Tabela 3) em laboratório especializado (Rhesus e Provet).

Tabela 3 – Níveis de estradiol (pg/ml) dos grupos ROS e ROT - São Paulo – 2009

GRUPO	DOSAGEM DOS NÍVEIS DE ESTRADIOL		
	1	2	3
ROS	21,39	13,35	16,37
ROT	20,35	19,35	10,15

Valores de referência (pg/ml) em ratos: proestro – superior a 15; proestro/estro – de 25 a 100; gestação – inferior a 50; fêmea castrada – inferior a 50; macho – inferior a 18.

O valor de referencia adotado foi o para fêmea castrada, inferior a 50 pg/ml, por tanto houve a confirmação de sucesso na cirurgia de ovariectomia realizada para estes animais.

5.2 PESAGEM DOS ANIMAIS

As médias dos pesos corpóreos dos animais foram calculadas para os grupos RCS (ratas controle sedentárias), RCT (ratas controle treinadas), ROS (ratas ovariectomizadas sedentárias) e ROT (ratas ovariectomizadas Treinadas), em um

total de quatro medições – antes de cada TEM (teste de esforço máximo, em um total de três) e pré eutanásia (Gráfico 1).

Gráfico 1– Médias obtidas nas diferentes pesagens antes de cada teste de esforço máximo e eutanásia

O grupo RCS obteve média de 239,6g (8,17) no peso corpóreo no primeiro teste; 235,6g (10,52) no segundo teste; 241,6g (15,9) no terceiro teste e 243,6g (17,74) no dia da eutanásia.

O grupo RCT obteve média de 257,4g (15,75) no peso corpóreo no primeiro teste; 254,4g (19,62) no segundo teste; 241,2g (19,91) no terceiro teste e 257,2g (14,08) no dia da eutanásia.

O grupo ROS obteve média de 240,2g (26,19) no primeiro teste; 257,6g (39,78) no segundo teste; 276,2g (47,25) no terceiro teste e 278,4g (50,54) no dia da eutanásia.

O grupo ROT obteve média de 250,4g (29,57) no primeiro teste; 257,6g (20,51) no segundo teste; 262,4g (24,63) no terceiro teste e 271,6g (26,66) no dia da eutanásia.

A comparação entre os grupos sedentários (RCS e ROS) e os grupos treinados (RCT X ROT) não apresentou significância estatística em relação ao peso corpóreo ao longo do experimento, ou seja, a atividade física não alterou significativamente o peso corpóreo dos animais. Já entre os grupos controle (RCS e RCT) e grupos ovariectomizados (ROS e ROT) houve significância estatística ($P < 0,05$), sendo o peso corpóreo médio dos animais dos grupos ovariectomizados

maior que o dos grupos controle, isto é, a ovariectomia se apresentou como um fator que altera significativamente o peso corpóreo (Tabela 4).

Tabela 4 – Pesos corpóreos dos animais (g) apresentador por médias $\pm$ desvio padrão e significância estatística (*) - São Paulo – 2009

GRUPOS	PESAGEM			
	1	2	3	4
RCS	239,6 $\pm$ 8,17	235,6 $\pm$ 10,52	241,6 $\pm$ 15,19	243,6 $\pm$ 17,74
RCT	257,4 $\pm$ 15,75	254,4 $\pm$ 19,62	241,2 $\pm$ 19,91	257,2 $\pm$ 14,80
ROS	240,0 $\pm$ 26,19*	257,6 $\pm$ 39,78	276,2 $\pm$ 47,25	278,4 $\pm$ 50,54*
ROT	250,4 $\pm$ 29,57*	257,6 $\pm$ 20,51	262,4 $\pm$ 24,63	271,6 $\pm$ 26,66*

Médias seguidas por (*) na mesma linha diferem significativamente ($P < 0,05$)

5.3 DESEMPENHO FÍSICO

A partir dos TEM, puderam ser calculadas as médias das velocidades máximas alcançadas nos grupos RCS (ratas controle sedentárias), RCT (ratas controle treinadas), ROS (ratas ovariectomizadas sedentárias) e ROT (ratas ovariectomizadas treinadas).

O grupo RCS apresentou velocidade média de 0,28m/s (0,07) no primeiro TEM, 0,26 m/s (0,03) no segundo TEM e 0,23 m/s (0,07) no terceiro TEM.

O grupo RCT apresentou velocidade média de 0,19m/s (0,04) no primeiro TEM, 0,28m/s (0,07) no segundo TEM e 0,33m/s (0,08) no terceiro TEM.

O grupo ROS apresentou velocidade média de 0,19m/s (0,07) no primeiro TEM, 0,23m/s (0,07) no segundo TEM e 0,23m/s (0,07) no terceiro TEM.

O grupo ROT apresentou velocidade média de 0,19m/s (0,04) no primeiro TEM, 0,34m/s (0,08) no segundo TEM e 0,26m/s (0,03) no terceiro TEM.

O grupo RCS apresentou queda em seu desempenho físico ao longo do experimento. O grupo RCT apresentou melhora significativa do primeiro para o segundo TEM e do primeiro para o terceiro TEM. O grupo ROS não apresentou melhora significativa, enquanto o ROT apresentou melhora significativa entre o primeiro e o segundo TEM, tendo uma queda de desempenho no ultimo TEM (Gráfico 2).

Gráfico 2 – Velocidade máxima média obtida nos diferentes testes de esforço máximo nos grupos RCS, RCT, ROS e ROT.

A comparação entre os grupos sedentários (RCS X ROS) e os grupos treinados (RCT X ROT) não apresentou significância estatística em relação ao peso corpóreo ao longo do experimento, ou seja, a atividade física não alterou significativamente o peso corpóreo dos animais. Já entre os grupos controle (RCS e RCT) e grupos ovariectomizados (ROS e ROT) houve significância estatística ($P < 0,05$), sendo o peso corpóreo médio dos animais dos grupos ovariectomizados maior que o dos grupos controle, isto é, a ovariectomia se apresentou como um fator que altera significativamente o peso corpóreo (Tabela 5).

Tabela 5 – Valores das velocidades médias (m/s) $\pm$ desvio padrão por testes de esforço máximo (TEM) e significância estatística – São Paulo – 2008.

GRUPOS	TEM		
	1°	2°	3°
RCS	0,28 $\pm$ 0,07	0,26 $\pm$ 0,03	0,23 $\pm$ 0,07
RCT	0,19 $\pm$ 0,04	0,28 $\pm$ 0,07	0,33 $\pm$ 0,08
ROS	0,19 $\pm$ 0,07*/**	0,23 $\pm$ 0,07*	0,23 $\pm$ 0,07**
ROT	0,19 $\pm$ 0,04***	0,34 $\pm$ 0,08***	0,26 $\pm$ 0,03

Médias seguidas por (*), (**) e (***) na mesma linha diferem significativamente ($P < 0,05$)

5.4 ANÁLISE ESTEREOLOGICA

Neste item foram considerados densidade celular (N_v), volume total da cartilagem (V_{ref}), número total de condrócitos (N), densidade de volume celular ($V_{cond.}$) e densidade de volume da matriz ($V_{v\ mat.}$), volume celular indireto dos condrócitos ($\bar{v}_N$), volume de matriz ($V_{mat.}$) e densidade de volume de colágeno ($V_{v(col)}$), e foram apresentados em subitens, para melhor compreensão. Ao final, os resultados encontram-se apresentados sistematicamente na tabela 6.

5.4.1 Densidade Numérica (N_v)

A densidade numérica de células cartilagíneas (N_v) obtida em mm^{-3} , no grupo RCS foi de $194.026,95 \text{ mm}^{-3}$ (0,04), no grupo RCT de $118.713,98 \text{ mm}^{-3}$ (0,11), no grupo ROS de $122.889,60 \text{ mm}^{-3}$ (0,03) e no grupo ROT de $117.747,12 \text{ mm}^{-3}$ (0,01). Os valores para os animais do grupo RCS foram altamente significantes em relação aos demais grupos (RCT, ROS e ROT) ($P < 0,000$). Os animais dos grupos RCT, ROS e ROT não diferiram significativamente quando comparados (Gráfico 3 – A).

5.4.2 Volume Total da Cartilagem (V_{ref})

O volume total da cartilagem no grupo RCS foi $2,92 \text{ mm}^3$ (0,03), no grupo RCT de $3,71 \text{ mm}^3$ (0,06), no grupo ROS de $3,37 \text{ mm}^3$ (0,05), e no grupo ROT de $3,56 \text{ mm}^3$ (0,14). O coeficiente de erro ($CE_{(V_{ref})}$) para a quantificação do volume total foi de 4,8% (RCS), 4,0% (grupo RCT), 4,1% (grupo ROS) e 4,1% (ROT).

O grupo RCT apresentou volume total significativamente maior que o grupo RCS ($P < 0,05$). Os grupos ovariectomizados (ROS e ROT) não apresentaram significância estatística quando comparados entre si ou com os demais grupos (RCS e RCT) (Gráfico 3 – B).

5.4.3 Número Total de Condórcitos (N)

O número total de condórcitos do grupo RCS foi de 589.242 (0,04), no grupo

RCT de 420.377 (0,11), no grupo ROS de 422.328 (0,07) e no grupo ROT de 486.445 (0,01). O coeficiente de erro ($CE_{(N)}$) foi de 4,7%, 5,4% e 5,5% e 5,1% respectivamente para os grupos RCS, RCT, ROS e ROT.

Os valores para os animais do grupo RCS foram altamente significantes em relação aos demais grupos (RCT, ROS e ROT) ($P < 0,001$). Os animais dos grupos RCT, ROS e ROT não diferiram significativamente quando comparados (Gráfico 3 – C).

5.4.4 Densidade de Volume dos Condrócitos ($V_{V\ (cond)}$) e Densidade de Volume da Matriz Extracelular ($V_{V\ (mat)}$).

A densidade de volume condrócitos ($V_{V\ (cond)}$) foi de 18,1% (0,27) no grupo RCS, de 15,2% (0,03) no grupo RCT, 9,2% (0,04) no grupo ROS e 10,8% (0,05) no grupo ROT. O grupo RCS apresentou densidade de volume de condrócitos altamente maior que os grupos ROS e ROT nas comparações dois a dois ($P < 0,008$). Já os grupos ROS e ROT não diferiram significativamente entre si. Por fim, o grupo RCT não diferiu significativamente em relação aos outros grupos (Gráfico 4 – A).

A densidade de volume de matriz extracelular ($V_{V\ (mat)}$) foi de 81,9% (0,06) no grupo RCS, de 84,8% (0,005) no grupo RCT, 90,8% (0,004) no grupo ROS e 89,2% (0,06) no grupo ROT. O grupo RCS foi significativamente menor quando comparado com os grupos ROS e ROT na comparação dois a dois ($P < 0,008$). Já o grupo RCT não apresentou significância estatística em relação aos grupos RCS, ROS e ROT (Gráfico 4 – B).

5.4.5 Volume Total de Matriz Extracelular (V_{mat})

O volume de matriz extracelular foi de 2,44mm³ (0,08) no grupo RCS, de 3 mm³ (0,005) no grupo RCT, 3,12 mm³ (0,05) no grupo ROS e 3,68 mm³ (0,01) no grupo ROT. O grupo RCS apresentou o volume de matriz extracelular menor que os demais grupos, sendo esta diferença altamente significativa ($P < 0,000$). Já o grupo

ROT apresentou volume de matriz maior que os grupos RCS, RCT e ROS, sendo esta diferença altamente significativa ($P < 0,000$). Os grupos RCT e ROS não apresentaram diferença estatística entre si (Gráfico 4 – C).

5.4.6 Volume Médio dos Condrócitos ($\bar{v}_N$)

O volume celular médio de condrocitos no grupo RCS foi de $927 \mu\text{m}^3$ (0,23), no grupo RCT de $1.288,41 \mu\text{m}^3$ (0,1), no grupo ROS de $745,77 \mu\text{m}^3$ (0,05) e no grupo ROT de $913,22 \mu\text{m}^3$ (0,04). Na comparação entre os grupos, o grupo RCT foi significativamente maior que os grupos RCS, ROS e ROT na comparação de pares ($P < 0,005$). Os grupos RCS, ROS e ROT não foram significativamente diferentes (Gráfico 5 – A).

5.4.7 Densidade de Volume de Colágeno ($V_{v(\text{col})}$)

A média da densidade de volume de colágeno do grupo RCS foi de 77% (0,02), no grupo RCT foi de 69,13 (0,01), do grupo ROS foi de 89,4% (0,01) e do grupo ROT foi de 65,47% (0,01). Todos os grupos apresentaram alta diferença estatística entre si ($P < 0,000$) na comparação dois a dois, sendo que a maior densidade de volume de colágeno foi encontrada no grupo ROS, seguida decrescentemente pelos grupos RCS, RCT e ROT (Gráfico 5 – B).

Tabela 6 – Resultados das variáveis: quantidade de disectors (Q^+), densidade celular (N_V), volumetotal da cartilagem (V_{ref}), coeficiente de erro para Cavalieri ($CE_{(V_{ref})}$), número total de condrócitos (N), coeficiente de erro celular ($CE_{(N)}$), densidade de volume celular ($V_{V\ cond}$) e densidade de volume da matriz ($V_{V\ (mat)}$), volume de matriz (V_{mat}), volume celular médio indireto dos condrócitos ($\bar{V}_N$) e densidade de volume de colágeno ($V_{V\ (col)}$) nas cartilagens da cabeça femoral de ratos nos diferentes grupos. (*) representam significância estatística

Grupo	Q^+	$N_V(mm^{-3})$	$V_{ref}(mm^3)$	$CE_{(V_{ref})}(\%)$	N	$CE_{(N)}(\%)$	$V_{V\ cond}(\%)$	$V_{V\ mat}(\%)$	$V_{mat}(mm^3)$	$c(\mu m^3)$	$V_{V\ col}(\%)$
RCS	442	184137,5	3,04	4,7	559209	4,8	12,5	87,5	2,66	677,45	77,2
(Controle Sedentário)	448	200993,8	2,89	4,8	610400	4,7	21,3	78,7	2,27	1059,75	78,6
	446	196949,5	2,85	4,7	598117	4,6	20,6	79,4	2,41	1043,81	75,2
Média	452	194026,96*	2,92	4,8	589242*	4,7	18,1*	81,9*	2,45*	927	77*
Desvio Padrão	12,49	8799,99	0,10	..	26724,75	..	0,05	0,05	0,20	216,27	1,71
Coeficiente de Variação	0,03	0,05	0,03	..	0,05	..	0,27	0,06	0,08	0,23	0,02
RCT	341	132999,36	3,54	4,2	470963	5,4	15,3	84,7	3	1151,93	69,3
(Controle Treinado)	332	105945,64	3,99	3,8	375163	5,5	14,7	85,3	3,02	1390,73	68,3
	345	117196,96	3,63	3,9	415005	5,4	15,5	84,5	2,99	1322,58	69,8
Média	339	118713,98	3,72*	4	420377	5,4	15,1	84,8	3	1288,41*	69,13**
Desvio Padrão	6,66	13590,51	0,24	..	48125,23	..	0,004	0,004	0,01	123,01	0,76
Coeficiente de Variação	0,02	0,11	0,06	..	0,11	..	0,03	0,005	0,005	0,1	0,01

Nota: .. não se aplica dado numérico

Tabela 6 – Resultados das variáveis: quantidade de disectors (Q^+), densidade celular (N_V), volume total da cartilagem (V_{ref}), coeficiente de erro para Cavalieri ($CE_{(V_{ref})}$), número total de condrócitos (N), coeficiente de erro celular ($CE_{(N)}$), densidade de volume celular ($V_{V(cond)}$) e densidade de volume de matriz ($V_{V(mat)}$), volume de matriz (V_{mat}), volume celular médio indireto dos condrócitos ($\bar{v}_N$) e densidade de volume de colágeno ($V_{V(col)}$) nas cartilagens da cabeça femoral de ratos nos diferentes grupos. (*) representam significância estatística

Grupo	Q^+	$N_V(mm^{-3})$	$V_{ref}(mm^3)$	$CE_{(V_{ref})}(\%)$	N	$CE_{(N)}(\%)$	$V_{V(cond)}(\%)$	$V_{V(mat)}(\%)$	$V_{mat}(mm^3)$	$\bar{v}_N(\mu m^3)$	$V_{V(col)}(\%)$
ROS (Ooforectomizado Sedentário)	330	122173,05	3,23	4,1	394119	5,5	8,8	91,2	2,94	719,1	88,2
	335	118470,84	3,30	4,2	419516	5,5	9,4	90,6	3,21	789,58	89,9
	335	128024,93	3,61	4,1	453348	5,5	9,3	90,7	3,21	728,62	90,1
Média	333	122889,61	3,38	4,1	422328	5,5	9,2	90,8	3,12	745,77	89,4***
Desvio Padrão	2,89	4817,19	0,20	..	29714,56	..	0,003	0,003	0,15	38,25	1,04
Coeficiente de Variação	0,01	0,04	0,06	..	0,07	..	0,04	0,004	0,05	0,05	0,01
ROT (Ooforectomizado Treinado)	398	116783,63	4,13	3,7	482465	5	10,2	89,8	3,71	870,65	66,3
	392	116739,84	3,40	4,2	482284	5,1	11,1	88,9	3,67	954,19	64,9
	378	119717,90	3,16	4,4	494587	5,1	11	89	3,68	914,81	65,2
Média	389	117747,12	3,56	4,1	486445	5,1	10,8	89,25	3,69**	913,22	65,47****
Desvio Padrão	10,26	1706,88	0,51	..	7051,59	..	0,01	0,01	0,02	41,79	0,74
Coeficiente de Variação	0,03	0,01	0,14	..	0,01	..	0,05	0,01	0,01	0,05	0,01

Nota: .. não se aplica dado numérico

Gráfico 3 (A - C) – (A) Densidade numérica de condrócitos (N_v) da cartilagem articular da cabeça femoral de três animais de cada um dos grupos (RCS, RCT, ROS e ROT). Significativo para o grupo RCS em relação aos demais ($P < 0,000$), não significativo para os grupos RCT, ROS, ROT. (B) Volume total da cartilagem (V_{ref}) para os mesmos três animais de cada grupo. Presença de significância estatística para o grupo RCT quando comparado ao grupo RCS ($P < 0,05$). Não houve significância estatística na comparação entre os grupos ovariectomizados (ROS e ROT) entre si e entre os outros grupos (RCS e RCT). (C) Número total de condrócitos (N) para os mesmos três animais de cada grupo. Significância estatística para o grupo RCS em relação aos demais grupos ($P < 0,001$). Demais grupos não apresentaram significância estatística. As barras horizontais indicam as médias entre os grupos e os pontos indicam os valores individuais dentro de cada grupo

Gráfico 4 (A - C) – (A) Densidade de volume de condrócitos ($V_{V(\text{cond})}$) da cartilagem da cabeça femoral de três animais de cada um dos grupos (RCS, RCT, ROS e ROT). Significativo para o grupo RCS em relação aos grupos ovariectomizados (ROS e ROT) ($P < 0,008$), e não significativo quando comparado com o grupo RCT. Demais comparações não apresentaram diferença significativa. (B) Densidade de volume de matriz extracelular ($V_{V(\text{mat})}$) para os mesmos três animais de cada grupo. Presença de significância estatística para o grupo RCS em relação aos grupos ovariectomizados (ROS e ROT) ($P < 0,008$), e não significativo quando comparado com o grupo RCT. Demais comparações não apresentaram diferença significativa. (C) Volume total de matriz extracelular (V_{mat}) para os mesmos três animais de cada grupo. Significância estatística presente nos grupos RCS e ROT na comparação entre grupos ($P < 0,000$). Os grupos RCT e ROS não apresentam diferença entre si. As barras horizontais indicam as médias entre os grupos e os pontos indicam os valores individuais dentro de cada grupo

Gráfico 5 (A-B) – (A) Volume médio de condrócitos ($\bar{v}_N$) da cartilagem da cabeça femoral de três animais de cada um dos grupos (RCS, RCT, ROS e ROT). O grupo RCT significativamente maior na comparação de pares ($P < 0,005$). Demais grupos não apresentam significância estatística entre si. (B) Densidade de volume de colágeno ($V_{v(col)}$) para os mesmos três animais de cada grupo. Todos os animais diferiram significativamente entre si ($P < 0,000$).

6 DISCUSSÃO

A discussão dos dados encontrados nesta pesquisa será realizada em subtópicos, apresentados na mesma ordem em que aparecem no capítulo resultados: dosagem dos níveis de estradiol; pesagem dos animais; desempenho físico e análise estereológica.

6.1 DOSAGEM DOS NÍVEIS DE ESTRADIOL

Fez-se necessária a dosagem dos níveis de estradiol nesta pesquisa a fim de confirmar que a ovariectomia realizada nas ratas dos grupos ROS e ROT foi bem sucedida, atendendo aos propósitos de depreciação estrogênica objetivados neste estudo.

Observando os valores de referencia sugeridos para fêmeas castradas (inferior a 50 pg/ml) e os valores obtidos no exame de cada animal dos grupos ROS e ROT, pode-se admitir que os animais utilizados neste estudo estavam de acordo com a proposta da pesquisa.

6.2 PESAGEM DOS ANIMAIS

Os valores obtidos referem-se a variação do peso corpóreo ao longo de 12 semanas. Nota-se que os grupos RCS e RCT perderam peso entre a primeira e a segunda pesagem (1,6% e 1,1% respectivamente), já os animais do grupo ROS e ROT ganharam peso no mesmo período (7,3% e 2,8% pela ordem). Entre a segunda e a terceira pesagem, apenas o grupo RCT perdeu peso (5,1%), enquanto os grupos RCS, ROS e ROT ganharam respectivamente 2,5%, 7,2% e 1,8%. Na última pesagem, pode-se observar que todos os grupos ganharam peso na ordem de 0,8%, 6,6%, 0,7% e 3,5% por grupo (RCS, RCT, ROS e ROT).

É importante observar que comparando os valores obtidos para este parâmetro no início e o fim do experimento, os grupos RCS, ROS e ROT ganharam peso no percentil de 1,6%, 16% e 8,4%, respectivamente, enquanto o grupo RTC perdeu quase 1% de seu peso corpóreo. Deste modo, o grupo ROS foi o que ganhou mais peso ao longo do experimento. Em geral, é sabido que os hormônios esteróides têm um enorme impacto sobre o desenvolvimento da síndrome metabólica (aumento de massa corporal, de fatores inflamatórios, pró-coagulantes e obesidade) (PASQUALI; VICENNATI, 2008). Vários estudos documentaram que a ovariectomia de ratas conduz a um aumento no consumo de comida e ganho de peso, enquanto o tratamento com estradiol elimina estes efeitos (LANDAU; ZUCKER, 1976; LAUDENSLAGER et al., 1980; WADE et al., 1985; RICHARD et al., 1987; SHINODA et al., 2002). Wade et al. (1985) e Richard et al. (1987) observaram que a deposição de gordura aumentou após a remoção do estrógeno circulante em fêmeas ovariectomizadas, enquanto o tratamento com estradiol reduziu este acúmulo.

Sabe-se ainda que a deficiência de estrogênio desempenha um papel no controle da homeostase energética no sexo feminino (SIMPSON et al., 2005) estando envolvido nas alterações da distribuição da gordura corporal, a mobilização de ácidos graxos e a capacidade de absorção de glicose nos diferentes tecidos (TOTH et al., 2000; JONES et al., 2007). Segundo Picard et al. (2000), o ganho de peso induzido pela ovariectomia é atribuído a um maior conteúdo corporal de gordura visceral nestas ratas.

Alguns estudos também observaram que a ovariectomia causa uma resistência global a insulina (BAILEY; AHMED-SOROUR, 1980) e que o treinamento diminui a deposição de gordura e aumenta a sensibilidade a insulina (JAMES et al., 1984; SAENGSIKISUWAN et al., 2008). Segundo Latour et al. (2001) o treinamento físico melhora a resposta à insulina estimulada pela glicose e aumentou a concentração do transporte de glicose no músculo esquelético em ratas ovariectomizadas.

Esta pesquisa também demonstrou que a falta de treinamento físico propiciou um ganho de peso maior nos animais do grupo ROS do que nos animais do grupo ROT. Estudos demonstraram que o treinamento em ratos (machos e fêmeas) diminui a deposição de gordura (OSCAI, 1973; MAZZEO; HORVATH, 1986; BOGOSLAVSKY, 2006). Segundo Oliveira; Fisberg (2003), animais sedentários

ganham mais peso por ingerirem uma quantidade de calorias maior que aquela que o corpo utiliza. Os exercícios físicos tem função de aumentar o gasto energético levando ao desequilíbrio calórico negativo ou a manutenção do metabolismo basal o que contribui para a perda de peso corporal (OPAS, 2003).

Em estudo de Zoth et al. (2010) com ratas ovariectomizadas que receberam tratamento com 17 β -Estradiol e realizaram treinamento físico de corrida em esteira, demonstrou que o treinamento físico por si só baixou conteúdo corporal de gordura visceral dos animais ovariectomizados em 18% e quando combinado com o 17 β -Estradiol foi de até 34%. Além disso, as ratas treinadas apresentaram praticamente o mesmo conteúdo corporal de gordura visceral comparado com as ratas sedentárias intactas. Isso indica que o treinamento físico tem uma forte influência na redução acúmulo de gordura corporal após uma diminuição nos níveis de estrogênio.

6.3 DESEMPENHO FÍSICO

Quando observamos, através da velocidade máxima em testes de esforço, o desempenho físico dos animais utilizados neste estudo, notamos que o grupo RCS manteve-se em queda do início ao fim do experimento, sendo que ao final seu desempenho foi 17,86% menor; enquanto o grupo RCT manteve-se em constante melhora da capacidade física (73,6% a mais do que no início). Já os grupos ROS e ROT apresentaram menor regularidade em seu desempenho. O grupo ROS apresentou-se 21% melhor no segundo teste comparado com o primeiro, e manteve este resultado até o final do experimento, por outro lado, o grupo ROT apresentou melhora de 78,9% entre o primeiro TEM e o segundo, diminuindo seu rendimento em 23% no terceiro TEM. Ainda assim, comparando o início e o fim do experimento, o rendimento deste grupo foi de 36,8%.

Estes dados sugerem que a falta de treinamento piora ou apenas mantém o condicionamento físico como visto nos grupos sedentários (RCS e ROS), enquanto o treinamento constante é capaz de promover bom condicionamento independente da condição hormonal, observado nos grupos treinados (RCT e ROT); e ainda, que

a deficiência de estrógeno prejudica o condicionamento físico mesmo em ratas treinadas, visto na comparação dos grupos RCT e ROT (MERCURO et al., 2006).

De acordo com Sowers e La Pietra (1995) a diminuição dos níveis de estrogênio, em conjunto com outras mudanças hormonais, afetam mulheres de muitas maneiras indesejadas, especialmente as sedentárias. Adicionada ao ganho de peso, a menopausa pode induzir a uma fase de rápida diminuição na densidade mineral óssea, condição aeróbica, força muscular e equilíbrio. Este declínio pode levar a incapacidade de estar em movimento e viver independentemente com a aproximação da velhice. A atividade física pode ajudar a mulher a fazer a transição para a menopausa mais facilmente e ajudá-las a preservar a boa habilidade funcional (ACSM, 1998).

6.4 ANÁLISE ESTEREOLÓGICA

A discussão da análise estereológica será realizada em subitens, seguindo a mesma ordem em que aparecem ao longo do texto.

6.4.1 Densidade Numérica (N_v)

A densidade numérica de condrócitos apresentada nos animais do grupo RCS foi significativamente maior do que nos grupos ROS, RCT e ROT (57,8%, 63,4 e 64,7). Estes dados sugerem que o treinamento e a carência de estrógeno diminuem a densidade numérica destes animais. Por outro lado, o volume da cartilagem das ratas do grupo RCS é significativamente menor do que o averiguado no grupo RCT, como será visto a seguir, o que pode levar a uma aparente impressão de maior densidade de condrócitos. Já em relação ao déficit de estrógeno, o volume da cartilagem quase não sofreu alteração, como será visto mais adiante, portanto o estrógeno desempenha um papel importante na celularidade da cartilagem.

Outro dado importante é que quando comparados, os grupos RCT e ROT, estes apresentaram diferença de apenas 1% no valor da densidade numérica, o que

pode ser considerado como manutenção deste parâmetro, ou seja, o estrógeno não influencia a densidade celular em ratas treinadas. Por fim, o treinamento físico em ratas com deficiência estrogênica (ROT x ROS) diminuiu a densidade de condrócitos em 4,3%.

6.4.2 Volume Total da Cartilagem (V_{ref})

Neste estudo foram observadas variações de volume da cartilagem articular entre os grupos analisados, sendo a diferença significativa entre o grupo RCT e RCS (27,1%), onde o grupo treinado apresentou maior volume em relação ao sedentário. Este dado sugere que o treinamento físico é benéfico para o aumento do volume da cartilagem. Corroborando com a suposição acerca dos benefícios da atividade física, o grupo ROT também parece ter se favorecido com o tratamento, uma vez que apresentou volume semelhante ao grupo controle treinado, e maior do que o do grupo sedentário com as mesmas condições de deficiência estrogênica (5,47%).

Em adultos com idades entre 26 e 61 anos que realizam treinamento físico, a força muscular de membros inferiores está positivamente associada a mudanças no volume total da cartilagem do joelho (FOLEY et al., 2007). A atividade física é benéfica para o aumento do volume da cartilagem e para a diminuição do aparecimento de lesões (URQUHART et al., 2010). Fatores que podem estar relacionados ao aumento de volume da cartilagem articular são: o aumento do conteúdo de glicosaminoglicanas (GAG's) em indivíduos tratados com treinamento físico (ROOS; DAHLBERG, 2005), e a co-ativação muscular como parâmetro mecânico (KERSTING et al., 2005).

Segundo Ding et al. (2003) os homens apresentam volume de cartilagem substancialmente maior do que as mulheres, sendo estas diferenças mais marcantes após os 50 anos de idade. Em mulheres a prevalência de osteoartrite aumenta dramaticamente por volta dos cinquenta anos (LAWRENCE et al., 1966; HERNBORG; NILSSON, 1973; WILSON et al., 1990). Ambos dados coincidem com o início da menopausa, ou seja, a diminuição de volume articular pode estar associado ao aparecimento de osteoartrite em mulheres pós-menopausa.

Entre tanto, outras pesquisas acerca do volume da cartilagem dos côndilos mandibulares de ratas adultas, utilizando cultura celular com e sem administração de 17 β -Estradiol, demonstraram que o estrógeno diminui a espessura da cartilagem pela inibição da proliferação de condrócitos, e aumenta a maturação destas células (TALWAR et al., 2006). Isto também pode ser observado quando comparados os grupos sedentários ovariectomizados e intactos, onde os primeiros apresentaram volume 15,52% maior.

Corroborando com estes dados, o trabalho de Yamashiro e Takano-Yamamoto (1998) demonstrou que a ovariectomia aumenta significativamente a espessura total da placa de crescimento da cartilagem distal do fêmur em ratas jovens e em envelhecimento, sendo que a deficiência de estrógeno quase dobrou a espessura camada proliferativa na epífise de crescimento da cartilagem femoral.

6.4.3 Número Total de Condrócitos (N)

Em estudo de Takano et al. (2008) com três grupos de coelhas (controle, ovariectomizadas e que recebera altas doses de estrógeno) demonstrou que tanto a deficiência estrogênica quanto as altas doses do hormônio fizeram o número de condrócitos diminuir, sendo este resultado mais expressivo nas fêmeas tratadas com o excesso de hormônio. Outro dado apresentado foi o de que as coelhas que receberam excesso de estrógeno tiveram uma diminuição em sua capacidade de proliferação celular e aumento da apoptose de condrócitos, enquanto a ovariectomia apenas diminuiu a capacidade de proliferação celular. Com tudo, o autor sugere que tanto a baixa quanto a alta concentração de estrogênio atuam diminuindo o número de condrócitos em comparação com o controle. Em outro estudo Takano et al. (2007) demonstrou que a deficiência de estrógeno também conduz a uma diminuição no número de condrócitos, que foi resultado de uma tendência para a apoptose e diminuição da proliferação celular. Em um sistema de cultura de células, o 17 β -estradiol diminuiu a proliferação de condrócitos durante o crescimento logarítmico e a confluência (TALWAR et al., 2006).

O presente estudo corrobora com os achados destes trabalhos, uma vez que o número celular do grupo RCS foi significativamente maior do que o apresentado pelo grupo ROS (39,5%), demonstrando que a deficiência estrogênica atua negativamente sobre os condrócitos.

Foi observado ainda que o treinamento atuou diminuindo o número total de condrócitos, uma vez que o grupo controle sedentário (RCS) apresentou diferença significativa de 40,1% a mais de células na cartilagem articular do que o grupo treinado (RCT). Esta diminuição celular poderia estar sendo causada pelo estresse da corrida (BOGOSLAVSKY, 2006); porém sem prejuízo para a cartilagem articular, pois o volume articular destes animais é maior do que do grupo sedentário (visto anteriormente), indicando que mesmo em menor número estas células atuam mais efetivamente do que as do grupo que não praticou atividade física.

Por outro lado, é importante observar que no presente estudo, a atividade física aliada à presença de estrógeno (grupo RCT) teve efeito mais deletério no quesito celularidade do que a deficiência estrogênica associada à atividade física (grupo ROT) – 15,7% maior do que no segundo, ou seja, apesar de a atividade física diminuir a quantidade de células da cartilagem, em ratas ovariectomizadas a atividade física promoveu certa manutenção destas células.

Com estes dois dados podemos sugerir que aparentemente o que diminui o número celular na cartilagem é a associação entre exercício e estrogênio, e não apenas a atividade física isoladamente.

Por fim, a atividade física em ratas com deficiência estrogênica é aparentemente favorável para a manutenção do número de condrócitos, 15,1% maior em ratas ativas. Indicando desta maneira que mulheres na pós-menopausa são beneficiadas ao realizar atividade física.

6.4.4 Densidade de Volume de Condrócito ($V_{v\text{ (cond)}}$) e Densidade de volume de Matriz Extracelular ($V_{v\text{ (mat)}}$)

A densidade de volume de condrócitos apresentou alta diferença significativa em relação à deficiência estrogênica. Pode-se observar que o grupo intacto (RCS)

mostrou uma densidade de volume celular 97,8% maior que o grupo ovariectomizado (ROS).

Esta diferença era esperada, uma vez que o volume referencia do grupo RCS foi menor do que o do grupo ROS.

Neste trabalho, o treinamento isoladamente (RCT) apontou uma diminuição de 19,2% na densidade de volume de condrócitos em ratos intactos (RCS). Possivelmente este fato ocorreu por causa do volume de matriz extracelular, que é 22,7% maior em ratas treinadas, implicando que a densidade de volume ocupada pelos condrócitos seja menor para este grupo.

O treinamento em ratas com deficiência estrogênica também mostrou resultado positivo. A diferença de 17,4% a mais no grupo ROT em relação ao grupo ROS. Esta diferença pode ter sido causada pelo fato deste grupo apresentar um maior número de células, como visto no tópico anterior, aumentando desta maneira a densidade de volume de condrócitos em relação ao de matriz.

Por fim, a ação do estrógeno em ratas treinadas pôde ser analisada. O grupo RCT apresentou 41,2% a mais de densidade de volume de condrócitos do que o grupo ROT. Em contrapartida, o número celular verificado foi maior no grupo ROT. Estes dados em conjunto sugerem que as células encontradas no grupo com deficiência estrogênica sejam muito menores do que as encontradas no grupo controle, pois mesmo em maior quantidade, apresentam porcentagem de volume menor. Seguindo esta linha de raciocínio, hipotrofia do condrócito representa uma diminuição do trabalho celular, o que faria com que o organismo se adequasse aumentando o número de células.

Ao final, é possível concluir que em relação à densidade de volume celular, a deficiência de estrógeno é prejudicial tanto para fêmeas que não fazem atividade física, quanto para as que fazem.

Com relação à densidade de volume de matriz extracelular, ocorre proporcionalmente o inverso, uma vez que a cartilagem é formada apenas por células e matriz (BURSTEIN et al., 2000). O grupo RCS apresentou 10,9% a menos densidade de volume de matriz em relação ao grupo ROS, e 3,5% a menos quando comparado ao grupo RCT. Já o grupo ROT apresentou 5,2% a mais de densidade de volume de matriz que o grupo RCT, e 1,78% a menos que o grupo ROS.

6.4.5 Volume Total de Matriz Extracelular (V_{mat})

Em estudo de Brisby et al. (2010) utilizando modelos de ratos corredores, verificou que a atividade física promoveu um aumento na quantidade de colágeno tipo II e de agregans na cartilagem de discos intervertebrais, sugerindo uma hipertrofia celular e aumento na produção de matriz.

Observamos neste trabalho que o volume de matriz em ratos controle treinados (RCT) foi 22,7% maior do que em ratos intactos sedentários (RCS). O mesmo observou-se em ratas ovariectomizadas, onde o grupo treinado apresentou 18,1% mais matriz que o não treinado.

De acordo com Classen et al. (2006), a cartilagem articular de joelhos de miniporcosp ovariectomizados sofreu diminuição de glicosaminoglicanas (GAG's – macromoléculas componentes da matriz extracelular responsáveis pela elasticidade da cartilagem articular). Por tanto, segundo os autores, a ovariectomia diminui o volume e matriz extracelular.

Este dado não coincide com os achados do atual estudo, uma vez que na comparação entre os grupos RCS e ROS, o volume de matriz foi 27,5% maior em ratas com deficiência estrogênica. Possivelmente isto ocorreu porque o número celular e a densidade numérica de condrócitos foi menor no grupo ovariectomizado e o volume total da cartilagem foi maior. Sendo assim, com menos células e mais volume, o espaço intersticial pode ser tomado por maior quantidade de matriz. Uma segunda explicação para este aumento é que a matriz extracelular é formada por outros componentes além das proteoglicanas e glicosaminoglicanas. Um componente importante é o colágeno. De fato, como será visto mais adiante, a quantidade de colágeno no grupo ROS foi maior do que no grupo RCS, justificando assim a maior quantidade de matriz.

Quando comparados os grupos treinados RCT e ROT, notamos que o valor encontrado para o segundo é 22,7% maior que para o primeiro. Neste caso, a deficiência estrogênica pode ter sido modulada pela atividade física fazendo com que o metabolismo dos condrócitos aumentasse, aumentando assim a produção de matriz, sendo desta forma um modo de adaptação do organismo deficiente ao estresse da atividade física.

6.4.6 Volume Médio de Condrócitos ($\bar{v}_N$)

O exercício físico aumenta o tamanho celular em todas as zonas de cartilagem não calcificada, sem mudança notável concomitante na densidade celular (PAUKKONEN et al., 1984). Este efeito foi observado na comparação entre os grupos RCT e RCS (38,9%); e os grupos ROT e ROS (22,4%). Este aumento de volume médio de condrócitos nos grupos que realizaram treinamento físico sugere uma adaptação fisiológica à diminuição da densidade celular. Uma segunda hipótese seria o aumento da atividade dos condrócitos dos grupos ativos devido ao contínuo estresse que a corrida causa na cartilagem articular, necessitando desta maneira estar em constante remodelação, atribuída aos condrócitos, causando hipertrofia dos mesmos.

Em relação ao déficit de estrógeno, a diferença foi 24,3% maior no grupo RCS comparado com o grupo ROS; e foi maior (41%) no grupo RCT comparado com o grupo ROT. Estes dados sugerem que a deficiência de estrógeno diminui o volume celular.

6.4.7 Densidade de Volume de Colágeno ($V_{v(col)}$)

A análise da densidade de volume de colágeno mostrou um maior volume no grupo ROS em relação ao grupo RCS, sendo a diferença de 16,1%. Estudos mostram que ratas ovariectomizadas que receberam tratamento com estrógeno demonstraram aceleração na degradação de colágeno tipo II (OESTERGAARD et al., 2006). A presença de estrógeno parece ser fundamental para o equilíbrio na produção de quantidades adequadas dos componentes da matriz extracelular. Portanto, quando há diminuição deste hormônio, ocorre maior produção de colágeno, o que torna a cartilagem mais endurecida e menos resistente mecanicamente (TESCHE; MIOSGE, 2005).

Não obstante, o aumento na densidade celular resulta em um aumento do conteúdo de colágeno e de glicosaminoglicanas-sulfatada (GAG) (WILLIAMS et al.,

2005). Este aumento na densidade de condrócitos também pode ser observada no grupo ROS em relação ao grupo RCS.

Em relação aos efeitos da atividade física, Saamamen et al.(1994) demonstraram uma diminuição da concentração de colágeno da cartilagem articular do côndilo lateral do fêmur de cães após 15 semanas de corrida diária, concluindo que a corrida com alta carga induz a mudanças locais semelhantes aos estágios iniciais de degeneração articular. Corroborando com esta informação, os animais do grupo RCS apresentaram 11,3% a mais de densidade de volume de colágeno do que o grupo RCT, ou seja, as propriedades físicas, bioquímicas, biomecânicas e fisiológicas do colágeno são modificadas pelo exercício (SOMMER, 1987).

Em relação às ratas ovariectomizadas, os resultados são positivos em relação à atividade física, uma vez que as ratas com deficiência hormonal tiveram a quantidade de colágeno diminuída em 36,5% em relação às ratas operadas sedentárias. Este dado sugere que ainda que a diminuição de estrógeno promova a produção de colágeno, a atividade física frequente é capaz de modulá-la.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Após a análise dos resultados e de acordo com os métodos empregados, pode-se concluir que:

- ❖ A deficiência estrogênica favorece o desenvolvimento da síndrome metabólica, acarretando o aumento de massa corporal.
- ❖ O sedentarismo agrava o ganho de peso em ratas com deficiência estrogênica.
- ❖ Um programa contínuo de exercício físico com intensidade submáxima de 60%, e duração de três meses, é benéfico para o condicionamento físico mesmo em baixos níveis de estrógeno.
- ❖ O estrógeno desempenha um papel importante na celularidade da cartilagem.
- ❖ A deficiência de estrógenos em conjunto com o treinamento físico diminui a densidade numérica de condrócitos.
- ❖ O volume da cartilagem articular aumenta com a prática de atividade física mesmo na deficiência hormonal.
- ❖ A deprivação de estrogênios diminui o número de condrócitos na cartilagem articular, porém quando associada a atividade física, esta perda é maior.
- ❖ A densidade de volume de matriz é inversamente proporcional a de condrócitos, uma vez que a cartilagem é formada apenas por estes dois componentes. O sedentarismo em níveis hormonais normais diminui esta densidade, e a deficiência hormonal nas mesmas condições a aumenta.
- ❖ A atividade física associada a deficiência estrogênica aumenta a densidade de volume de matriz extracelular, causando o efeito inverso na densidade de volume de condrócitos.

-
- ❖ A atividade física aumenta o volume total de matriz extracelular.
 - ❖ O exercício físico aumenta o tamanho das células da cartilagem como adaptação fisiológica a diminuição da densidade celular.
 - ❖ O treinamento causa hipertrofia celular, uma vez que a cartilagem está em constante remodelação.
 - ❖ A deprivação estrogênica diminui o volume médio dos condrócitos.
 - ❖ O estrógeno aumenta a produção de colágeno na cartilagem articular, tornando-a mais rígida e susceptível a lesões. Neste caso, a atividade física é benéfica para a diminuição desta produção.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ACSM. AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE. Position Stand. Exercise and physical activity for older adults. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 30, n. 6, p. 992-1008, 1998.
- ADAMS, M. E. Cartilage hypertrophy following canine anterior cruciate ligament transection differs among different areas of the joint. **The Journal of Rheumatology**, v. 16 p. 818-824, 1989.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; JOHNSON, A.; LEWIS L.; RALF M.; ROBERTS K.; WALTER, P. **Tecidos, fundamentos da biologia celular**. 2. ed. Porto Alegre : Artmed, 1999. cap. 19, p. 610-616.
- ARENDT, E.; DICK, R. Knee injury patterns among men and women in collegiate basketball and soccer. NCAA data and review of literature. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 23, n. 6, p. 694-701, 1995.
- BIHARI-VARGA, M.; FRAKAS, T.; BIRÓ, T. Changes in the cartilage proteoglycans in relation to age and osteoarthritis. **Acta Biologica Hungarica**, v. 35 n. 2-4 p. 325-331, 1984.
- AROKOSKI, J.; KIVIRANTA, I.; JURVELIN, J.; TAMMI, M. E.; HELMINEN, H. J. Long-distance running causes site-dependent decrease of cartilage glycosaminoglycan content in the knee joints of *beagles* dogs. **Arthritis and Rheumatism**, v. 36, n. 10, p. 1451-1459, 1993.
- ASSOCIAÇÃO MÉDICA BRASILEIRA E CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA. **Atenção primária e terapia de reposição hormonal no climatério**. 2001. Disponível em: <http://www.projetodiretrizes.org.br/projeto_diretrizes/034.pdf> acesso em 25.mar.2008.
- BADDELEY, A. J.; GUNDERSEN, H. J.; CRUZ-ORIVE, L. M. Estimation of surface area from vertical sections. **Journal of Microscopy**, v. 42, p. 259-276, 1986. Pt. 3.
- BAILEY, C. J.; AHMED-SOROUR, H. Role of ovarian hormones in the long-term control of glucose homeostasis. **Diabetologia**, v. 19, p. 475-481, 1980.
- BEAUPRÉ, G. S.; STEVENS, S. S.; CARTER, D. R. Mechanobiology in the development, maintenance, and degeneration of articular cartilage. **Journal of Rehabilitation Research and Development**, v. 37, n. 2, p. 145-151, 2000.
- BOGOSLAVSKY, A. **Alterações da cartilagem hialina da cabeça do fêmur de ratos Wistar corretores, em função do envelhecimento**. 2006. 96 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- BRAENDGAARD, H.; EVANS, S. M.; HOWARD, C. V.; GUNDERSEN, H. J. G. The total number of neurons in the human neocortex unbiasedly estimated using optical disectors. **Journal of Microscopy**, v. 157, p. 285-304, 1990, Pt. 3.

- BRAIDMAN, I. P. ; HAINEY, L.; BATRA, G.; SELBY, P. L.; SAUNDERS, P. T.; HOYLAND, J. A. Localization of estrogen receptor beta protein expression in adult human bone. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 16, n. 2, p. 214-220, 2001.
- BRANDAN, E. Proteoglycans in skeletal muscle. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 27, p. 109-116, 1994.
- BRISBY, H.; WEI, A. Q.; MOLLOY, T.; CHUNG, S. A.; MURRELL, G. A.; DIWAN, A. D. The effect of running exercise on intervertebral disc extracellular matrix production in a rat model. **Spine**, v. 35, n. 15, p. 1429-1436, 2010.
- BUCKWALTER, J. A. Osteoarthritis and articular cartilage use, disuse, and abuse: experimental studies. **The Journal of Rheumatology**, v. 22, s.43, p. 13-15, 1995.
- BURDAN, F.; SZUMILO, J.; KOROBOWICZ, A.; FAROOQUEE, R.; PATEL, S.; PATEL, A.; DAVE, A.; SZUMILO, M.; SOLECKI, M.; KLEPACZ, R.; DUDKA, J. Morphology and physiology of the epiphyseal growth plate. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 47, n. 1, p. 5-16, 2009.
- BURSTEIN, D.; BASHIR, A. E.; GRAY, M. L. MRI techniques in early stages of cartilage disease. **Investigative Radiology**, v. 35 n. 10 p. 622-638, 2000.
- CAKE, M. A.; APPELYARD, R. C.; READ, R. A.; SMITH, M. M.; MURRELL, G. A.; GHOSH, P. Ovariectomy alters the structural and biomechanical properties of ovine femoro-tibial articular cartilage and increases cartilage iNOS. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 13, n. 12, p. 1066-1075, 2005.
- CALVO, E.; CASTAÑEDA, S.; LARGO, R.; FERNÁNDEZ-VALLE, M. E.; RODRÍGUEZ-SALVANÉS, F.; HERRERO-BEAUMONT, G. Osteoporosis increases the severity of cartilage damage in an experimental model of osteoarthritis in rabbits. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 15, n. 1, p. 69-77, 2007.
- CARVALHO, T.; SILVA, J. G. S.; GUEDES, D. P. **Atividade física e saúde: orientações básicas sobre atividade física e saúde para profissionais das áreas de educação e saúde**. 1. ed. Brasília, DF: Secretaria de Desportos/ Ministério da Educação, 1995.
- CHAGIN, A. S.; LINDBERG, M. K.; ANDERSSON, N. ; MOVERARE, S.; GUSTAFSSON, J. A.; SAVENDAHL, L.; OHLSSON, C. Estrogen receptor- β inhibits skeletal growth and has the capacity to mediate growth plate fusion in female mice. **Journal of Bone And Mineral Research**, v. 19, n. 1, p. 72-77, 2004.
- CHAMBERS, M. G.; COX, L.; CHONG, L.; SURI, N. ; COVER, P. ; BAYLISS, M. T.; MASON, R. M. Matrix metalloproteinases and aggrecanases cleave aggrecan in different zones of normal cartilage but colocalize in the development of osteoarthritic lesions in STR/ort mice. **Arthritis and Rheumatism**, v. 44, n. 6, p. 1455-1465, 2001.
- CHANG, T. K.; HUANG, C. H.; HUANG, C. H.; CHEN, H. C.; CHENG, C. K. The influence of long-term treadmill exercise on bone mass and articular cartilage in ovariectomized rats. **BMC Musculoskelet Disorders**, v. 11, n. 185, p. 01-07, 2010.
- CHRISTGAU, S.; TANKÓ, L. B.; CLOOS, P. A. C.; MOURITZEN, U.; CHRISTIANSEN, C.; DELAISSÉ, J.M.; HØEGH-ANDERSEN, P. Suppression of elevated cartilage turnover

in postmenopausal women and in ovariectomized rats by estrogen and a selective estrogen-receptor modulator (SERM). **Menopause**, v. 11, n. 5, p. 508-518, 2004.

CLAASSEN, H.; CELLARIUS, C.; SCHOLZ-AHRENS, K. E.; SCHREZENMEIR, J.; GLÜER, C. C.; SCHÜNKE, M.; KURZ, B. Extracellular matrix changes in knee joint cartilage following bone-active drug treatment. **Cell and Tissue Research**, v. 324, n. 2, p. 279-289, 2006.

CLAASSEN, H.; HORNBERGER, F.; SCHOLZ-AHRENS, K.; SCHÜNKE, M.; SCHREZENMEIR, J.; KURZ, B. The effect of estrogens and dietary calcium deficiency on the extracellular matrix of articular cartilage in Göttingen miniature pigs. **Annals of Anatomy**, v. 184, n. 2, p. 141-148, 2002.

CULAV, E.M.; CLARK, C.H.; MERRILEES, M. J. Connective Tissues: Matrix composition and its relevance to physical therapy. **Physical Therapy**, v. 79, n. 3, p. 308-319, 1999.

DIETRICH, W.; HAITEL, A.; HOLZER, G.; HUBER, J. C.; KOLBUS, A.; TSCHUGGUEL, W. Estrogen receptor-beta is the predominant estrogen receptor subtype in normal human synovia. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, v. 13, n. 7, p. 512-517, 2006.

DING, C.; CICUTTINI, F.; SCOTT, F.; GLISSON, M.; JONES, G. Sex differences in knee cartilage volume in adults: role of body and bone size, age and physical activity. **Rheumatology**, v. 42, n. 11, p. 1317-1323, 2003.

DOWZER, O. N.; REILLY, T. E.; CABLE, N. T. Effects of deep and shallow water running on spinal shrinkage. **British Journal Of Sports Medicine**, v. 32, n. 1, p. 44-48, 1998.

EASTELL, R. Role of oestrogen in the regulation of bone turnover at the menarche. **The Journal of Endocrinology**, v. 185, n. 2, p. 223-234, 2005.

EGRI, D.; BATTISTELLA, L. R.; YOSHINARI, N. H. A influência da prática de exercícios físicos sobre a cartilagem articular. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 39, n. 1, p. 41-44, 1999.

EVANS, E. B.; EGGERS, G. W. N.; BUTLER, J. K.; BLUMEL, J. Experimental immobilization and remobilization of rat knee joints. **The Journal of bone and joint surgery**, v. 42, p. 737-758, 1960.

EKSTEIN, J.; NASATZKY, E.; BOYAN, B. D.; ORNOY, A.; SCHWARTZ, Z. Growth-plate chondrocytes respond to 17 β -estradiol with sex-specific increases in IP3 and intracellular calcium ion signaling via a capacitative entry mechanism. **Steroids**, v. 70, n. 11, p. 775-786, 2005.

ESPANHA, M. M.; LAMMI, P. E.; HYTTINEN, M. M.; LAMMI, M. J.; HELMINEN, H. J. Extracellular matrix composition of full-thickness defect repair tissue is little influenced by exercise in rat articular cartilage. **Connective Tissue Research**, v. 42, n. 2, p. 97-109, 2001.

FELSON, D. T.; LAWRENCE, R. C.; DIEPPE, P. A.; HIRSCH, R.; HELMICK, C. G.; JORDAN, J. M.; KINGTON, R. S.; LANE, N. E.; NEVITT, M. C.; ZHANG, Y.; SOWERS, M.; MCALINDON, T.; SPECTOR, T. D.; POOLE, A. R.; YANOVSKI, S. Z.; ATESHIAN, G.; SHARMA, L.; BUCKWALTER, J. A.; BRANDT, K. D.; FRIES, J. F. Osteoarthritis: new

- insights. Part 1: the disease and its risk factors. **Annals of Internal Medicine**, v. 133, n. 8, p. 635-646, 2000.
- FOLEY, S.; DING, C.; CICUTTINI, F.; JONES, G. Physical activity and knee structural change: a longitudinal study using MRI. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 39, n. 3, p. 426-434, 2007.
- FONTAINE, K. R.; HEO, M.; BATHON, J. Are US adults with arthritis meeting public health recommendations for physical activity? **Arthritis and Rheumatism**, v. 50, n.2, p.624-628, 2004.
- FLECKNELL, P. Pain – assessment, alleviation and avoidance in laboratory animals. **ANZCCART News**, v. 12, n. 4, p. 1-10, 1999.
- GAGLIARDO, K. M.; DE CARVALHO BALIEIRO, J. C.; DE SOUZA, R. R.; RIBEIRO, A. A. C. M. Post natal-related changes in the size and total number of neurons in the caudal mesenteric ganglion of dogs: total number of neurons can be predicted from body weight and ganglion volume. **The Anatomical Record. Part A, Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology**, v. 286, n. 2, p. 917-929, 2005.
- GAMBACCIANI, M.; PEPE, A.; CAPPAGLI, B.; PALMIERI, E.; GENAZZANI, A. R. The relative contributions of menopause and aging to postmenopausal reduction in intervertebral disk height. **Climacteric : The Journal of the International Menopause Society**, v. 10, n. 4, p. 298-305, 2007.
- GOBBI, S. Atividade Física para pessoas idosas e recomendações da Organização Mundial de Saúde de 1996. **Revista Brasileira de Atividade Física e Saúde**, v. 2, n. 2, p. 41-49, 1997.
- GOKHALE, J. A.; FRENKEL, S. R.; DICESARE, P. E. Estrogen and osteoarthritis. **American Journal of Orthopedics**, v. 33, n. 2, p. 71-80, 2004.
- GOMES, L. Proteoglicanos. In: _____ CARVALHO, H. F.; RECCO-PIMENTEL, S. M. **A Célula**, São Paulo: Manole, 2001. p. 221-227.
- GRECA, C.L.S. **Estudo Citoquímico Ultraestrutural associado a tratamento enzimático da Matriz Extracelular Fundamental do Endométrio das Camundongas**. 1996. f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.
- GRODZINSKY, A. J. Eletromechanical and physiochemical properties of connective tissue. **CRC Critical Reviews in Biomedical Engineering**, v. 9, n. 2, p. 133-99, 1983.
- GRUBER, H. E.; NORTON, H. J.; HANLEY JR., E. N. Anti-apoptotic effects of IGF-1 and PDGF on human intervertebral disc cells in vitro. **Spine**, v. 25, n. 17, p. 2153–2157, 2000.
- GRUMBACH, M. M. Estrogen, bone, growth and sex: a sea change in conventional wisdom. **Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism**, v. 13, s. 6, p. 1439–1455, 2000.
- GUNDERSEN, H. J. G. Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: the edge effect. **Journal of Microscopy**, v. 111, p. 219-223, 1977

GUNDERSEN, H. J. G. Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones, in memory of William R. Thompson. **Journal of Microscopy**, v. 143, p. 3-45, 1986. Pt 1.

GUNDERSEN, H. J. The nucleator. **Journal of Microscopy**, v.151, p. 3-21, 1988. Pt. 1.

GUNDERSEN, H. J. G.; BENDTSEN, T. F.; KORBO, L.; MARCUSSEN, N. ; MOLLER, A.; NIELSEN, K.; NYENGAAD, J. R.; PAKKENBERG, B.; SORENSEN, F. B.; VESTERBY, A.; WEST, M. J. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. **Apms : Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, v. 96, n. 5, p. 379-394, 1988.

HAAPALA, J.; AROKOSKI, J. P.; HYTTINEN, M. M.; LAMMI, M.; TAMMI, M.; KOVANEN, V.; HELMINEN, H. J.; KIVIRANTA I. Remobilization does not fully restore immobilization induced articular cartilage atrophy. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v.362, p. 218-229, 1999.

HAAPALA, J.; AROKOSKI, J.; PIRTTIMÄKI, J.; LYYRA, T.; JURVELIN, J.; TAMMI, M.; HELMINEN, H.J.; KIVIRANTA, I. Incomplete restoration of immobilization induced softening of young beagle knee articular cartilage after 50-week remobilization. **International Journal of Sports Medicine**, v. 21, n. 1, p. 76-81, 2000.

HAAPALA, J.; LAMMI, M. J.; INKINEN, R.; PARKKINEN, J. J.; AGREN, U. M.; AROKOSKI, J.; KIVIRANTA, I.; HELMINEN, H. J.; TAMMI, M.I. Coordinated regulation of hyaluronan and aggrecan content in the articular cartilage of immobilized and exercised dogs. **The Journal of Rheumatology**, v. 23, n.9, p. 1586-1593, 1996.

HAGIWARA, Y.; ANDO, A.; CHIMOTO, E.; SAIJO, Y.; OHMORI-MATSUDA, K.; ITOI, E. Changes of articular cartilage after immobilization in a rat knee contracture model. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 27, n. 2, p. 236-242, 2009.

HALBE, H. W.; DA FONSECA, A. M.; ASSIS, J. S.; VITORIA, S. M; ARIE, M. H. A.; ELIAS, D. S.; MELO, N. R.; BAGNOLI, V. R. Aspectos epidemiológicos e clínicos em 1.319 pacientes climatericas. **Revista de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 1, n. 3, p. 182-194, 1990.

HALL, A. C.; URBAN, J. P. G.; GEHL, K. A. The effects of hydrostatic pressure on matrix synthesis in articular cartilage. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 1991.

HAM, K. D.; LOESER, R. F.; LINDGREN, B. R.; CARLSON, C. S. Effects of long-term estrogen replacement therapy on osteoarthritis severity in cynomolgus monkeys. **Arthritis and Rheumatism**, v. 46, n. 7, p. 1956-1964, 2002.

HANDA, T.; ISHIHARA, H.; OSHIMA, H.; OSADA, R.; TSUJI, H.; OBATA, K. Effects of hydrostatic pressure on matrix synthesis and matrix metalloproteinase production in the human lumbar intervertebral disc. **Spine**, v. 22, n. 10, p. 1085-1091, 1997.

HARDINGHAM, T. E.; FOSANG, A. J.; DUDHIA, J. Agrecan, the chondroitin sulfate/keratan sulfate proteoglycan from cartilage, In: _____ KUETTNER, K. E.; SCHLEYERBACH, R.; PEYRON, J. G.; HASCALL, V. C. **Art Oart Osteoarthritis**, New York: Raven Press, 1992. p. 5-7.

HASCALL, V. C.; HASCALL, G. K. Proteoglycans. In: _____ HAY, E.D. **Cell biology of extracellular matrix**. New York: Plenum Press, 1981. p. 39-60.

HASCALL, V. C.; KIMURA, J. H. Proteoglycans: isolation and characterization. **Methods in Enzymology**, v. 82, p. 769-800, 1982. Pt A.

HEISE, N.; TOLEDO, O. M. S. Age-related in glycosaminoglycan distribution in different anatomical sites on the surface of knee-joint articular cartilage in young rabbits. **Annals of Anatomy**, v. 175, n. 1, p. 35-40, 1993.

HERNBORG, J.; NILSSON, B. E. The relationship between osteophytes in the knee joint, osteoarthritis and aging. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, v. 44, n. 1, p. 69-74. 1973.

HERRERO-BEAUMONT, G.; ROMAN-BLAS, J. A.; CASTAÑEDA, S.; JIMENEZ, S. A. Primary osteoarthritis no longer primary: three subsets with distinct etiological, clinical, and therapeutic characteristics. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 39, n. 2, p. 71-80, 2009.

HØEGH-ANDERSEN, P. ; TANKÓ, L. B.; ANDERSEN, T. L.; LUNDBERG, C. V.; MO, J. A.; HEEGAARD, A. M.; DELAISSE, J. M.; CHRISTGAU, S. Ovariectomized rats as a model of postmenopausal osteoarthritis: validation and application. **Arthritis Research & Therapy**, v. 6, n. 2, p. 169-180, 2004.

HOUCK, J. K. "What do these women want?": feminist responses to feminine forever, 1963-1980. **Bulletin of the History of Medicine**, v. 77, n. 1, p. 103-132, 2003.

HOWARD, C. V.; REED, M. G. **Three-dimensional measurement in microscopy**. In: _____ Unbiased stereology. Oxford: Bios Scientific Publishers, 2005. 246 p.

HUBER, M.; TRATTNIG, S.; LINTNER, F. Anatomy, biochemistry and physiology of articular cartilage. **Investigative Radiology**, v. 35, n. 10, p. 573-580, 2000.

HUNZIKER, E. B.; SCHENK, R. K.; CRUZ-ORIVE, L. M. Quantitation of chondrocyte performance in growth-plate cartilage during longitudinal bone growth. **The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume**, v. 69, n. 2, p. 162-173, 1987.

JAMES, D. E.; KRAEGEN, E. W.; CHISHOLM, D. J. Effect of exercise training on whole-body insulin sensitivity and responsiveness. **Journal of Applied Physiology Respiratory Environmental and Exercise Physiology**, v. 56, n. 5, p. 1217-1222, 1984.

JANSSON, J. O.; EDEN, S.; ISAKSSON, O. Sites of action of testosterone and estradiol on longitudinal bone growth. **The American Journal of Physiology**, v. 244, n. 2, p. 135-140, 1983.

JONES, M.; MC INNES, K.J.; BOON, W.C.; SIMPSON, E. Estrogen and adiposity—Utilizing models of aromatase deficiency to explore the relationship. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 106, n. 1-5, p. 3-7, 2007.

- JONES, M. H.; AMENDOLA, A. S. Acute treatment of inversion ankle sprains: immobilization versus functional treatment. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 455, p. 169-172, 2007.
- JONES, O.; GLISSON, M.; HYNES, K.; CICUTTINI, F. Sex and site differences in cartilage development – a possible explanation for variations in knee osteoarthritis in later life. **Arthritis and Rheumatism**, v. 43, n. 11, p. 2543-2549, 2000.
- JONES, S. J.; LYONS, R. A.; SIBERT, J.; EVANS, R.; PALMER, S. R. Changes in sports injuries to children between 1983 and 1998: comparison of case series. **Journal of Public Health Medicine**, v. 23, n. 4, p. 268–271, 2001.
- JORTIKKA, M.; LNKINEN, R.; TAMMI, M. Immobilisation causes long lasting matrix changes both in the immobilised and contralateral joint cartilage. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 56, n. 4, p. 255-261, 1997.
- JUNQUEIRA, L. C; CARNEIRO, J. Histologia básica. In: _____ **Tecido cartilaginoso**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 146.
- JURVELIN, J.; KIVIRANTA, I.; TAMMI, M.; HELMINEN, J. H. Softening of canine articular cartilage after immobilization of the knee joint. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 207, p. 246-252, 1986.
- KÄÄB, M. J.; GWYN, I. A.; NÖTZLI, H. P. Collagen fibre arrangement in the tibial plateau articular cartilage of man and other mammalian species. **Journal of Anatomy**, v. 193, p. 23-34, 1998.
- KALU, D. N. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. **Bone and Mineral**, v. 15, n. 3, p. 175-191, 1991.
- KARVONEN, R. L.; NEGENDANK, W. G.; TEITGE, R. A.; REED, A. H.; MILLER, P. R.; FERNANDEZ-MADRID, F. Factors affecting articular cartilage thickness in osteoarthritis and aging. **The Journal of Rheumatology**, v. 21, n. 7, p. 1310-1318, 1994.
- KERSTING, U. G.; STUBENDORFF, J. J.; SCHMIDT, M. C.; BRÜGGEMANN, G. P. Changes in knee cartilage volume and serum COMP concentration after running exercise. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 13, n. 10, p. 925-934, 2005.
- KIM, Y. J.; SAH, R. L.; GRODZINSKY, A. J.; PLAAS, A. H. K.; SANDY, J. D. Mechanical regulation of cartilage biosynthetic behavior: Physical stimuli. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 311, n. 1, p. 1-12, 1994.
- KIVIRANTA, I.; JURVELIN, J.; TAMMI, M.; SÄÄMÄNEN, A. M.; HELMINEN, J. H. Weight bearing controls glycosaminoglycan concentration and articular cartilage thickness in the knee joints of young beagle dogs. **Arthritis and Rheumatism**, v. 7, n. 30, p. 801-809, 1987.
- KIVIRANTA, I.; TAMMI, M.; JURVELIN, J.; SÄÄMÄNEN, A. M.; HEIMINEN, J. H. Moderate running exercise augments glycosaminoglycans and thickness of articular cartilage in the joint of young beagle dogs. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 6, n. 2, p. 188-195, 1988.

- KIVIRANTA, I.; TAMMI, M.; JURVELIN, J.; ARAKOSKI, J.; SÄÄMÄNEN, A. M.; HELMINEN, J. H. Articular cartilage thickness and glycosaminoglycan distribution in the canine knee joint after strenuous running exercise. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n. 283, p. 302-308, 1992.
- KJELLÉN, L.; LINDAHL, U. Proteoglycans: structures and interactions. **Annual Review of Biochemistry**, v. 60, p. 443-475, 1991.
- LAMMI, M.; HÄKKINEN, P. T.; PARKKINEN, J. J.; HYTTINEN, M. M.; JORTIKKA, M.; HELMINEN, J. H.; TAMMI, I. M. Adaptation of canine femoral head articular cartilage to long distance running exercise in young beagles. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 52, n. 5, p. 369-377, 1993.
- LANDAU, I. T.; ZUCKER, I. Estrogen regulation of body weight in the female rat. **Hormones and Behavior**, v. 7, n. 1, p. 29-39, 1976.
- LANE, N. E.; BUCKWALTER, J. A. Exercise: a cause of osteoarthritis? **Rheumatic Diseases Clinics of North America**, v. 9, n. 3, p. 617-633, 1993.
- LATOUR, M. G.; SHINODA, M.; LAVOIE, J. M. Metabolic effects of physical training in ovariectomized and hyperestrogenic rats. **Journal of Applied Physiology Respiratory Environmental and Exercise Physiology**, v. 90, p. 235-241, 2001.
- LAUDENSLAGER, M. L.; WILKINSON, C. W.; CARLISLE, H. J.; HAMMEL, H. T. Energy balance in ovariectomized rats with and without oestrogen replacement. **American Journal of Physiology**, v. 238, n. 5, p. 400-405, 1980.
- LAWRENCE, J. S.; BREMNER, J. M.; BIER, F. Osteo-arthritis. Prevalence in the population and relationship between symptoms and x-ray changes. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 25, n. 1, p. 1-24, 1966.
- LEES, A. Correr. In: _____ DURWARD, B. R.; BAER, G. D.; ROWE, P. J. **Movimento funcional humano**. São Paulo: Manole, 2001. p. 122-133.
- LEVANON, D.; STEIN, H. The articular cartilage of the rabbit knee: A scanning electron microscopy study. **Cells and Materials**, v. 1, p. 219-229, 1991.
- LEVY, A. S.; LOHNES, J.; SCULLEY, S.; LECROY, M.; GARRETT, W. Chondral delamination of the knee in soccer players. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 24, n. 5, p. 634-639, 1996.
- LINDBERG, M. K.; ALATALO, S. L.; HALLEEN, J. M.; MOHAN, S.; GUSTAFSSON, J. A.; OHLSSON, C. Estrogen receptor specificity in the regulation of the skeleton in female mice. **The Journal of Endocrinology**, v. 171, n. 2, p. 229-236, 2001.
- LIU, S. H.; AL-SHAikh, R.; PANOSSIAN, V. ; YANG, R. S.; NELSON, S. D.; SOLEIMAN, N. ; FINERMAN, G. A.; LANE, J. M. Primary immunolocalization of estrogen and progesterone target cells in the human anterior cruciate ligament. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 14, n. 4, p. 526-533, 1996.
- LOENING, A. M.; JAMES, I. E.; LEVENSTON, M. E.; BADGER, A. M.; FRANK, E. H.; KURZ, B.; NUTTALL, M. E.; HUNG, H. H.; BLAKE, S. M.; GRODZINSKY, A. J.; LARK,

- M. W. Injurious mechanical compression of bovine articular cartilage induces chondrocyte apoptosis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 381, n. 2, p. 205-212, 2000.
- MALEMUD, C. J. Changes in proteoglycans in osteoarthritis: Biochemistry, ultrastructure and biosynthetic. **The Journal of Rheumatology. Supplement**, v. 27, p. 60-62, 1991.
- MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, n. 4A, p. 609-614, 2002.
- MAROUDAS, A. Balance between swelling pressure and collagen tension in normal and degenerate cartilage. **Nature**, v. 260, n. 5554, p. 808-809, 1976.
- MARTINS, R. R.; PEREIRA, N. M.; SILVA, T. M. Liquid-base cytology: a new method for oestral cycle study in Wistar's rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 20, n.1, p. 78-81, 2005.
- MATYAS, J. R.; HUANG, D.; CHUNG, M.; ADAMS, M. E. Regional quantification of cartilage type II collagen and aggrecan messenger RNA in joints with early experimental osteoarthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 46, n. 6, p. 1536-1543, 2002.
- MAYHEW, T. M.; GUNDERSEN, H. J. G. "If you assume, you can make an ass out of u and me": a decade of the disector for stereological counting of particles in 3D space. **Journal of Anatomy**, v. 188, p. 1-15, 1996.
- MAYHEW, T. M.; OLSEN, D. R. Magnetic resonance imaging (MRI) and model-free estimates of brain volume determined using the Cavalieri principle. **Journal of Anatomy**, v. 178, p.133-144, 1991.
- MAZZEO, R. S.; HORVATH, S. M. Effects of training on weight, food intake, and body composition in aging rats. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 44, n. 6, p. 732-738, 1986.
- MCCARTHY, C.; OAKLEY, E. Management of suspected cervical spine injuries--the paediatric perspective. **Accident and Emergency Nursing**, v. 10, n. 3, p.163-169, 2002.
- MC DEVITT, C. A.; MUIR, H. Biochemical changes in the cartilage of the knee in experimental and natural osteoarthritis in the dog. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 58, n. 1, p. 94-101, 1976.
- MERCURO, G.; SAIU, F.; DEIDDA, M.; MERCURO, S.; VITALE, C.; ROSANO, G, M. Impairment of physical exercise capacity in healthy postmenopausal women. **American Heart Journal**, v. 151, n. 4, p. 923-927, 2006.
- MICHELLACCI, Y.M. **Glicosaminoglicanos, proteoglicanos e mucopolissacaridas bacterianas**.1996. f. Tese (Livro Docência) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 1996.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. DEPARTAMENTO DE AÇÕES PROGRAMÁTICAS ESTRATÉGICAS. **Manual de Atenção à Mulher no Climatério/Menopausa**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2008. 192 p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. DEPARTAMENTO DE AÇÕES PROGRAMÁTICAS ESTRATÉGICAS. **Política nacional de atenção integral à saúde da mulher : princípios e diretrizes**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2009. 82 p.

MINITAB. **Academic Version**. Disponível em: <www.minitab.com.br>, Acesso em: 19. nov. 2010.

MOW, V. C.; RACTLIFFE, A. E.; POOLE, A. R. Cartilage and diarthrodial joint as paradigms for hierarchical materials and structures. **Biomaterials**, v. 13, n. 2, p. 67-97, 1992.

MPOG; IBGE. MINISTÉRIO DO PLANEJAMENTO, ORÇAMENTO E GESTÃO; INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Síntese dos indicadores sociais: uma análise das condições de vida da população brasileira. 2010**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/indicadoresminimos/sinteseindicsoais2010/SIS_2010.pdf>. Acesso em: 24 nov. 2010.

MUIR, H. Proteoglycans as organizers of the intercellular matrix. **Biochemical Society Transactions**, v. 11, n. 6, p. 613-622, 1983.

NAHOUM, J. C.; SIMÕES, P. M. Climatério e senilidade. **Femina**, v. 17, n. 8, p. 672-688, 1989.

NAMS. NORTH AMERICAN MENOPAUSE SOCIETY. **Menopause practice: a clinician's guide**. 2007. Disponível em: <<http://menopause.org>>. Acesso em: 10 set. 2010.

NASATZKY, E.; SCHWARTZ, Z.; SOSKOLNE, W. A.; BROOKS, B. P. ; DEAN, D. D.; BOYAN, B. D.; ORNOY, A. Evidence for receptors specific for 17 beta-estradiol and testosterone in chondrocyte cultures. **Connective Tissue Research**, v. 30, n. 4, p. 277-294, 1994.

NILSSON, O.; BARON, J. Impact of growth plate senescence on catch-up growth and epiphyseal fusion. **Pediatric Nephrology**, v. 20, n. 3 p. 319-322, 2005.

NILSSON, O.; MARINO, R.; DE LUCA, F.; PHILLIP, M.; BARON, J. Endocrine regulation of the growth plate. **Hormone Research**, v. 64, n. 4, p. 157-165, 2005.

NISHIMURA, T.; HATTORI, A.; TAKAHASHI, K. Arrangement and identification of proteoglycans in basement membrane and intramuscular connective tissue of bovine semitendinosus muscle. **Acta anatomica**, v. 155, n. 4, p. 257-265, 1996.

O'CONNOR, P. ; ORFORD, C. E.; GARDNER, D. L. Differential response to compressive loads of zones of canine hyaline articular cartilage: micromechanical, light and electron microscopic studies. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 47, n. 5, p. 414-420, 1988.

OESTERGAARD, S.; SONDERGAARD, B. C.; HOEGH-ANDERSEN, P. ; HENRIKSEN, K.; QVIST, P. ; CHRISTIANSEN, C.; TANKÓ, L. B.; KARSDAL, M. A. Effects of ovariectomy and estrogen therapy on type II collagen degradation and structural integrity of articular cartilage in rats: implications of the time of initiation. **Arthritis and Rheumatism**, v. 54, n. 8, p. 2441-2451, 2006.

OLIVEIRA, C. L.; FISBERG, M. Obesidade na infância e adolescência uma verdadeira epidemia. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 47, n. 2, p. 107-108, 2003.

OLIVERIA, S. A.; FELSON, D. T.; REED, J. I.; CIRILLO, P. A.; WALKER, A. M. Incidence of symptomatic hand, hip, and knee osteoarthritis among patients in a health maintenance organization. **Arthritis and Rheumatism**, v. 38, n. 8, p. 1134-1141, 1995.

OPAS. ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAUDE. **Doenças crônico-degenerativas e obesidade: estratégia mundial sobre alimentação saudável, atividade física e saúde**. 2003. 61 p. Disponível em: http://www.opas.org.br/sistema/arquivos/d_cronic.pdf > . Acesso em 14. set. 2010.

OSCAI, L. B. The role of exercise in weight control. **Exercise and Sport Sciences Reviews**, v. 1, p. 103-123, 1973.

OTTERNESS, I. G.; ESKRA, J. D.; BLIVEN, M. L.; SHAY, A. K.; PELLETIER, J. P.; MILICI, A. J. Exercise protects against articular cartilage degeneration in the hamster. **Arthritis and Rheumatism**, v. 41, n. 11, p. 2068-2076, 1998.

PAKKENBERG, B.; GUNDERSEN, H. J. G. New stereological method for obtaining unbiased and efficient estimates of total nerve cell number in human brain areas. **Apmis : Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, v. 97, n. 8, p. 677-681, 1989.

PALMOSKI, M. J.; BRANDT, K. D. Running inhibits the reversal of atrophic changes in canine knee cartilage after removal of a leg cast. **Arthritis and Rheumatism**, v. 24, n. 11, p. 1329-37, 1981.

PALMOSKI, M. J.; COLYER, R. A.; BRANDT, K. D. Joint motion in the absence of normal loading does not maintain normal cartilage. **Arthritis and Rheumatism**, v. 23, n. 3, p. 325-334, 1980.

PAOLETTI, R.; WENGER, N. K. Review of the International Position Paper on Women's Health and Menopause: a comprehensive approach. **Circulation**, v. 107, n. 9, p. 1336-1339, 2003.

PAP, G.; EBERHARDT, R.; STÜRMER, I.; MACHNER, A.; SCHWARTZBERG, H.; ROESSNER, A.; NEUMANN, W. Development of osteoarthritis in the knee joints of Wistar rats after strenuous running exercise in a running wheel by intracranial self-stimulation. **Pathology, Research and Practice**, v. 194, n. 1, p. 41-47, 1998.

PARKER, D.; HWA, S. Y.; SAMBROOK, P. ; GHOSH, P. Estrogen replacement therapy mitigates the loss of joint cartilage proteoglycans and bone mineral density induced by ovariectomy and osteoarthritis. **Journal of Rheumatology**, v. 6, n.2, p. 116-127, 2003.

PASQUALI, R.; VICENNATI, V. Steroids and the metabolic syndrome. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 109 ,n. 3-5, p. 258-265, 2008.

PATULLO, I. M. F. **Análise comparativa entre o efeito da osteoporose experimental sobre o osso longo e o da articulação temporomandibular**. 2001. 60 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

PAUKKONEN, K.; HELMINEN, H.J.; TAMMI, M.; JURVELIN, J.; KIVIRANTA, I.; SÄÄMÄNEN, A. M. Quantitative morphological and biochemical investigations on the effects of physical exercise and immobilization on the articular cartilage of young rabbits. **Acta Biologica Hungarica**, v. 35, n. 2-4, p. 293-304, 1984.

PEYRON, J. G.; ALTMAN, R. D. The epidemiology of osteoarthritis. In: _____ MOSKOWITZ, R. W.; HOWELL, D. S.; GOLDBERG, V. M.; MANKIN, H. J. **Osteoarthritis: diagnosis and medical/surgical management**. 2. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1992. p. 23.

PICARD, F.; DESHAIES, Y.; LALONDE, J.; SAMSON, P. ; LABRIE, C.; BÉLANGER, A.; LABRIE, F.; RICHARD, D. Effects of the estrogen antagonist EM-652.HCl on energy balance and lipid metabolism in ovariectomized rats. **International Journal of Obesity**, v. 24, p. 830–840, 2000.

POOLE, A. P. ; GUILAK, F.; ABRAMSON, S. B. Etiopathogenesis of osteoarthritis. In: _____ MOSKOWITZ, R. W.; ALTMAN, R. D.; HOCHBERG, M. C. **Osteoarthritis**. 4. ed. Philadelphia: Lippincott, 2007. p. 27-49.

POOLE, R.; KOJIMA, T.; YASUDA, T.; MWALE, F.; KOBAYASHI, M.; AVERTY, S. Composition and structure of articular cartilage – a template for tissue repair. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 391, p. 26-33, 2001.

RASCH, P. J. Cinesiologia e anatomia aplicada. In: _____ RASCH, P. J. **Cinesiologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 12-21.

RIBEIRO, A. A. C. M. Size and number of binucleate and mononucleate superior cervical ganglion neurons in young capybaras. **Anatomy and Embryology**, v. 211, n. 6, p. 607-617, 2006.

RIBEIRO, A. A. C. M.; DAVIS, C.; GABELLA, G. Estimate of size and total number of neurons in superior cervical ganglion of rat, capybara and horse. **Anatomy and Embryology**, v. 208, n. 5, p. 367-380, 2004.

RICHARD, D.; ROCHON, L.; DESHAIES, Y. Effects of exercise training on energy balance of ovariectomized rats. **American Journal of Physiology**, v. 253, n. 5, p. 740-745, 1987. Pt.2.

ROMAN-BLAS, J. A.; CASTAÑEDA, S.; LARGO, R.; HERRERO-BEAUMONT, G. Osteoarthritis associated with estrogen deficiency. **Arthritis Research and Therapy**, v. 11, n. 5, p. 241, 2009.

ROOS, E. M.; DAHLBERG, L. Positive effects of moderate exercise on glycosaminoglycan content in knee cartilage: a four-month, randomized, controlled trial in patients at risk of osteoarthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 52, n. 11, p. 3507-3514, 2005.

ROSNER, I. A.; GOLDBERG, V. M.; MOSKOWITZ, R. W. Estrogens and osteoarthritis. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 213, p. 77-83, 1986.

ROUGHLEY, P. J. Age-associated changes in cartilage matrix – implications for tissue repair. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 391, p. 153-160, 2001.

- ROUGHLEY, P. J.; WHITE, R. J. Age-related in the structure of the proteoglycan subunits from human articular cartilage. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 255, n. 1, p. 217-224, 1980.
- RUOSLAHTI, E.; YAMAGUCHI, Y. C. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. **Cell**, v. 64, n. 5, p. 867-869, 1991.
- SÄÄMÄNEN, A.; KIVIRANTA, I.; JURVELIN, J.; HELMINEN, H. J.; TAMMI, M. Proteoglycan and collagen alterations in canine knee articular cartilage following 20 km daily running exercise for 15 weeks. **Connective Tissue Research**, v. 30, n. 3, p. 191-201, 1994.
- SÄÄMÄNEN, A.; TAMMI, M.; KIVIRANTA, I.; JURVELIN, J.; HELMINEN, H. J. Running exercises as a modulator of proteoglycan matrix in the articular cartilage of young rabbits. **International Journal of Sports Medicine**, v. 9, n. 2, p. 127-132, 1988.
- SAENGSIWISUWAN, V. ; PONGSEEDA, S.; PRASANNARONG, M.; VICHSIWONG, K.; TOSKULKAO, C. Modulation of insulin resistance in ovariectomized rats by endurance exercise training and estrogen replacement. **Metabolism**, v. 58, p. 38-47, 2008.
- SAH, R. L.; DOONG, J. Y.; GRODZINSKY, A. J.; PLAAS, A. H.; SANDY, J. D. Effects of compression on the loss of newly synthesized proteoglycans and proteins from cartilage explants. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 286, n. 1, p. 20-29, 1991.
- SAH, R. L.; GRODZINSKY, A. J.; PLAAS, A. H. K.; SANDY, J. D. Effects of static and dynamic compression on matrix metabolism in cartilage explants. In: _____KUETTNER, K. E.; SCHLEYERBACH, R.; PEYRON, J. G. **Articular cartilage and osteoarthritis**. New York: Raven Press, 1992. p. 373-391.
- SAKAKURA, Y.; SHIDE, N. ; TSURUGA, E.; IRIE, K.; YAJIMA, T. Effects of running exercise on the mandible and tibia of ovariectomized rats. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 19, n. 3, p. 159-167, 2001.
- SCHMIDT, M. B.; MOW, V. C.; CHUN, L. E.; EYRE, D. R. Effects of proteoglycan extraction on the tensile behavior of articular cartilage. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 8, n. 3, p. 353-363, 1990.
- SCIORE, P. ; FRANK, C. B.; HART, D. A. Identification of sex hormone receptors in human and rabbit ligaments of the knee by reverse transcription-polymerase chain reaction: evidence that receptors are present in tissue from both male and female subjects. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 16, n. 5, p. 604-610, 1998.
- SEGARD, H. B.; MOULIN, S.; BOUMARD, S.; AUGIER DE CREMIERS, C.; KELLY, P. A.; FINIDORI, J. Autocrine growth hormone production prevents apoptosis and inhibits differentiation in C2C12 myoblasts. **Cellular Signalling**, v. 15, n. 6, p. 615-623, 2003.
- SHINODA, M.; LATOUR, M. G.; LAVOIE, J. M. Effects of physical training on body composition and organ weights in ovariectomized and hyperestrogenic rats. **International Journal of obesity and Related Metabolic Disorders**, v. 26, n. 3, p. 335-343, 2002.
- SILVA, G. J. J.; BRUM, P.; NEGRÃO, C. E.; KRIEGER, E. M. Acute and chronic effects of exercise on baroreflexes in spontaneously hypertensive rat. **Hypertension**, v. 30, n. 3, p. 714-719, 1997.

SIMPSON, E.; JONES, M.; KYLIE, M.; HILL, R.; MAFFEI, L.; CARANI, C.; BOON, W. C. Estrogen, a fundamental player in energy homeostasis. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 95, n.1-5, p. 3-8, 2005.

SMITH, R. J.; LIN, J.; TRINDADE, M. C. D.; SHIDA, J.; KAJIYMA, G.; VU, T.; HOFFMAN, A. R.; VAN DER MULEN, M. C. H.; GOODMAN, S.B.; SCHURMAN, D. J.; CARTER, D. R. Time-dependent effects of intermittent hydrostatic pressure on articular chondrocyte type II collagen and aggrecan mRNA expression. **Journal of Rehabilitation Research and Development**, v. 37, n. 2, p. 153-161, 2000.

SNIEKERS, Y. H.; WEINANS, H.; BIERMA-ZEINSTRA, S. M.; VAN LEEUWEN, J. P. ; VAN OSCH, G. J. Animal models for osteoarthritis: the effect of ovariectomy and estrogen treatment - a systematic approach. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 16, n. 5, p. 533-541, 2008.

SOMMER, H. M. The biomechanical and metabolic effects of a running regime on the Achilles tendon in the rat. **International Orthopaedics**, v. 11, n. 1, p. 71-75, 1987.

SOWERS, M. R.; LA PIETRA, M. T. Menopause: its epidemiology and potential association with chronic diseases. **Epidemiologic Reviews**, v. 17, n. 2, p. 287-302, 1995.

STERIO, D. C. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the dissector. **Journal of Microscopy**, v. 134, p. 127-136, 1984.

STEVENS, A.; LOWE, J. Tecido Conjuntivo In:_____ STEVENS, A.; LOWE, J. **Human histology**. 2. ed. USA: Morby, 1997. p. 49-64.

SUN, H. B. Mechanical loading, cartilage degradation, and arthritis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1211, p. 37-50, 2010.

TAKANO, H.; AIZAWA, T.; IRIE, T.; ITOI, E.; KOKUBUN, S.; ROACH, H. I. Normal bone growth requires optimal estrogen levels: negative effects of both high and low dose estrogen on the number of growth plate chondrocytes. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 214, n. 3, p. 269-280, 2008.

TAKANO, H.; AIZAWA, T.; IRIE, T.; KOKUBUN, S.; ITOI, E. Estrogen deficiency leads to decrease in chondrocyte numbers in the rabbit growth plate. **Journal of Orthopaedic Science**, v12, n. 4, p. 366-374, 2007.

TALWAR, R. M.; WONG, B. S.; SVOBODA, K.; HARPER, R. P. Effects of estrogen on chondrocyte proliferation and collagen synthesis in skeletally mature articular cartilage **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 64, n. 4, p. 600-609, 2006.

TANKÓ, L. B.; SØNDERGAARD, B. C.; ØESTERGAARD, S.; KARSDAL, M. A.; CHRISTIANSEN, C. An update review of cellular mechanisms conferring the indirect and direct effects of estrogen on articular cartilage. **Climacteric: the Journal of the International Menopause Society**, v. 11, n. 1, p. 04-16, 2008.

TESCHE, F.; MIOSGE, N. New aspects of the pathogenesis of osteoarthritis: the role of fibroblast-like chondrocytes in late stages of the disease. **Histology and Histopathology**, v. 20, n.1, p. 329-337, 2005.

THORNDIKE, E. A.; TURNER, A. S. In search of an animal model for postmenopausal diseases. **Frontiers in Bioscience**, v. 3, p. 17-26, 1998.

TOTH, M.; TCHERNOF, A.; SITES, C.; POEHLMAN, E. Menopause-related changes in body fat distribution. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 904, p. 502-506, 2000.

TRATTNIG, S. Overuse of hyaline cartilage and imaging. **European Journal of Radiology**, v. 25, n. 3, p. 188-198, 1997.

TSAI, C. L.; LIU, T. K. Osteoarthritis in women: its relationship to estrogen and current trends. **Life Sciences**, v. 50, n. 23, p. 1737-1744, 1992.

TURNER, A. S.; ATHANASIOU, K. A.; ZHU, C. F.; ALVIS, M. R.; BRYANT, H. U. Biochemical effects of estrogen on articular cartilage in ovariectomized sheep. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 5, n. 1, p. 63-69, 1997.

URQUHART, D. M.; TOBING, J. F.; HANNA, F. S.; BERRY, P. ; WLUKA, A. E.; DING, C.; CICUTTINI, F. M. What is the effect of physical activity on the knee joint?: a systematic review. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, Epub ahead of print, 2010.

USHIYAMA, T.; UEYAMA, H.; INOUE, K.; OHKUBO, I.; HUKUDA, S. Expression of genes for estrogen receptors alpha and beta in human articular chondrocytes. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 7, n. 6, p. 560-566, 1999.

VAN DEN HOOGEN, B. M.; VAN DE LEST, C. H. A.; VAN WEEREN, P. R.; LAFEBER, F. P. J. G.; LOPES-CARDOZO, M.; VAN GOLDE, L. M. G.; BARNEVELD, A. Loading-induced changes in synovial joints affect cartilage metabolism. **British Journal of Rheumatology**, v. 37, n. 6, p. 671-676, 1998.

VAN DER EERDEN, B. C. J.; KARPERIEN, M.; WIT, J. M. Systemic and local regulation of the growth plate. **Endocrine Reviews**, v. 24, n. 6, p. 782-801, 2003.

VAN KUPPEVELT, T. H. M. S. M.; DOMEN, J. G. W.; CREMERS, F. P. M.; KUYPER, C. M. A. Staining of proteoglycans in mouse lung alveoli. Ultrastructural localization of anionic sites. **The Histochemical Journal**, v. 16, n. 6, p. 657-669, 1984.

VASAN, N. Effects of physical stress on the synthesis and degradation of cartilage matrix. **Connective Tissue Research**, v. 12, n. 1, p. 49-58, 1983.

VISSER, N. A.; KONING, M. H. M. T.; LAMMI, M. K.; HÄKKINEN, I.; TAMMI, M.; VAN KAMPEN, G. P. J. Increase of decorin content in articular cartilage following running. **Connective Tissue Research**, v. 37, n. 3-4, p. 295-302, 1998.

VISSER, N. A.; VAKAMOEN, G.P. S.; DEKONING, M.H.M.T.; VANDERKORST, J.K. The effects of loading on the synthesis of biglycan and decorin in intact mature articular cartilage in vitro. **Connective Tissue Research**, v. 30, n. 4, p. 241-250, 1994.

VOGEL, K. G. Glycosaminoglycans and proteoglycans. In: _____YURCHENCO, P. D.; BIRK, D. E.; MECHAM, R. P. **Extracellular matrix assembly and structure**, USA: Academic Press, 1994. p. 243-279.

WADE, G. N. ; GRAY, J. M.; BARTNESS, T. J. Gonadal influences on obesity. **International Journal of Obesity**, v. 9, n.1, p. 83-92, 1985.

WALDSCHMIDT, J. G.; RILLING, R. J.; KAJDACSZY-BALLA, A. A.; BOYNTON, M. D.; ERICKSON, S. J. In vitro and in vivo MR imaging of hyaline cartilage: zonal anatomy, imaging pitfalls, and pathologic conditions. **Radiographics**, v. 17, n. 6, p. 1387-1402, 1997.

WEISE, M.; DE-LEVI, S.; BARNES, K. M.; GAFNI, R. I.; ABAD, V. ; BARON, J. Effects of estrogen on growth plate senescence and epiphyseal fusion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 12, p. 6871–6876, 2001.

WIGHT, T. N. ; HEINEGARD, D. K.; HASCALL, V. C. Proteoglycans: structure and function, In:_____ HAY, E. **Cell Biology of Extracellular Matrix**. 2. ed. New York: Plenum Press, 1991.

WILLIAMS, G. M.; KLEIN, T. J.; SAH, R. L. Cell density alters matrix accumulation in two distinct fractions and the mechanical integrity of alginate-chondrocyte constructs.**Acta Biomaterialia**, v. 1, n. 6, p. 625-633, 2005.

WILSON, M. G.; MICHET JR., C. J.; ILSTRUP, D. M.; MELTON, L. J. 3RD. Idiopathic symptomatic osteoarthritis of the hip and knee: a population-based incidence study. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 65, n. 9, p. 1214-1221, 1990.

WIXSON, S. K.; WHITE, .W. J.; HUGHES JR., H. C.; LANG, C. M.; MARSHALL, W. K. A comparison of pentobarbital, fentanyl-droperidol, ketamine-xylazine and ketamine-diazepam anesthesia in adult male rats. **Laboratory Animal Science**, v. 37, n. 6, p. 726-730, 1987.

WLUKA, A. E.; CICUTTINI, F. M.; SPECTOR, T. D. Menopause, oestrogens and arthritis. **Maturitas**, v. 35, n. 3, p. 183-199, 2000.

WU, J. Z.; HERZOG, W. Elastic anisotropy of articular cartilage is associated with the microstructures of collagen fibers and chondrocytes. **Journal of Biomechanics**, v. 35, n. 7, p. 931-42, 2002.

YAMASHIRO, T.; TAKANO-YAMAMOTO, T. Differential responses of mandibular condyle and femur to oestrogen deficiency in young rats. **Archives of Oral Biology**, v. 43, n. 3, p. 191-195, 1998.

YANAGISHITA, M. Function of proteoglycans in the extracellular matrix. **Acta Pathologica Japonica**, v. 43, n. 6, p. 283-293, 1993.

ZOTH, N.; WEIGT, C.; LAUDENBACH-LESCHOWSKI, U.; DIEL, P. Physical activity and estrogen treatment reduce visceral body fat and serum levels of leptin in an additive manner in a diet induced animal model of obesity. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 122, n.1-3, p. 100-105, 2010.