UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Aplicadas ao Aparelho Locomotor

JONATAS EVANDRO NOGUEIRA

Efeito do exercício físico sobre a ação do LPS no reparo
ósseo em ratos

Ribeirão Preto
2015

JONATAS EVANDRO NOGUEIRA

**Efeito do exercício físico sobre a ação do LPS no reparo
ósseo em ratos**

Versão corrigida

Dissertação apresentada a Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade
de São Paulo para obtenção do título Mestre
em Ciências

Orientador: Prof. Dr. João Paulo Mardegan
Issa

**Ribeirão Preto
2015**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E
PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Nogueira, Jonatas Evandro

Efeito do exercício físico sobre a ação do LPS no reparo ósseo
em ratos. Ribeirão Preto, 2015.

96p.: il.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto/USP.

Orientador: Prof. Dr. João Paulo Mardegan Issa.

1. Reparo Ósseo. 2. Exercício Físico 3. Lipopolissacarídeo

FOLHA DE APROVAÇÃO

Jonatas Evandro Nogueira

Efeito do exercício físico sobre a ação do LPS no reparo ósseo em ratos

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade
de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof.

Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.

Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.

Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais e irmãos, António Aílton Nogueira, Rachel Leandrini Nogueira, Marília de Cássia Nogueira Monteverde e Herbert Leandro Nogueira, pelo apoio em todos os momentos da minha vida e durante a realização desta dissertação.

Mensagem

“O segredo do sucesso na vida de uma pessoa reside na sua persistência, na sua perseverança, na sua vontade incontrolável de conquistar seus objetivos. Por isso, nunca desista de seus sonhos, de seus ideais, nunca desista de viver, nunca desista de amar. O melhor momento para se ver as estrelas é durante a escuridão. Quando tudo parece escuro e sombrio na sua vida, olhe para a beleza das estrelas e se guie pelo o seu brilho, rumo ao um novo amanhecer. Nunca desista de recomeçar. Nunca, nunca desista.”

Autor Desconhecido

Agradecimientos

- *Agradeço a Deus por me proporcionar a vida, a saúde, a paz e a sabedoria. Só Ele é capaz de nos guiar para enfrentar as dificuldades na nossa vida.*

- *Aos profs. Dr. João Paulo Mardegan Issa e Dr. Luiz Guilherme de Siqueira Branco pela acolhida em seus laboratórios e pelas orientações nesta dissertação.*

- *A profa. Dra. Luciana Renata Muzzeti Martínez pelos primeiros ensinamentos científicos durante a graduação.*

- *A minha namorada Denise Gomes de Oliveira Polloni pela paciência, compreensão e apoio.*

- *Aos amigos de Laboratório Alberto Donatti, Bruna Gabriela dos Santos Kotake, Fellipe Augusto Tocchini de Figueiredo, Glauber dos Santos Ferreira da Silva, João Paulo Sabino, Marcelo Kwiatkowski, Renato Nery Soriano, Roberta Carminati Shimano, Rodrigo Alberto Restrepo Fernandez pelos ensinamentos e convivência durante este trabalho.*

- *Aos técnicos de laboratórios Ana Paula Macedo, Junia Ramos, Mauro Ferreira Silva e Nilce de Oliveira Wolga pela grande colaboração na parte experimental deste trabalho.*

- *A secretária da pós-graduação Rita de Cássia Stela Cossalter pela competência e prontidão para ajudar.*

- *Aos docentes do curso de pós-graduação pelo aprendizado.*

- *Aos funcionários do biotério da Faculdade de Odontologia pelo cuidado com os animais.*

- *A todos que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.*

- *Aos órgãos de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Fundação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ).*

1. INTRODUÇÃO	29
1.1. Tecido Ósseo	30
1.1.1. Osteoblastos.....	30
1.1.2. Osteócitos.....	31
1.1.3. Osteoclastos	31
1.1.4. Matriz Óssea.....	32
1.1.5. Tecido ósseo primário e secundário	33
1.2. Reparo Ósseo	34
1.3. Tecido ósseo e exercício físico	40
2. OBJETIVO	43
3. MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1. Animais	46
3.2. Drogas.....	46
3.3. Obtenção do plasma	46
3.4. Dosagem de Citocinas	47
3.5. Grupos Experimentais.....	47
3.6. Protocolos Experimentais.....	47
3.6.1. Treinamento na Esteira.....	47
3.6.2. Cirurgia para realização do Defeito Ósseo	49
3.6.3. Administração de LPS	50
3.6.4. Desenho experimental e obtenção das amostras	51
3.7. Densitometria dos ossos	51
3.8. Histologia	52
3.8.1. Processamento Histológico	52
3.8.2. Análise microscópica	53
3.8.2.1. Análise da densitometria óptica das fibras colágenas tipo I e III.....	53

3.8.2.2. Análise da área do tecido ósseo neoformado	54
3.9. Técnica imuno-histoquímica.....	55
3.9.1. Análise imuno-histoquímica.....	55
3.10. Análise Estatística	56
4. RESULTADOS	57
4.1. Avaliação Clínica.....	58
4.2. Efeito do exercício físico sobre o peso corporal.....	58
4.3. Análises Radiográficas.....	58
4.3.1. Efeito do exercício físico sobre a área óssea global, DMO e CMO	58
4.4. Análises Histológicas	61
4.4.1. Efeito do exercício físico sobre as fibras colágenas tipo I e III.....	61
4.4.2. Efeito do exercício físico sobre a neoformação do tecido ósseo	63
4.4.3. Efeito do exercício físico sobre a OC, OPG, RANK e TRAP	65
4.5. Análise Sanguínea	69
4.5.1. Efeito do exercício físico sobre as citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α	69
5. DISCUSSÃO	70
6. CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS.....	79
APÊNDICE.....	94

Lísta de abreviaturas

BMP	-	Proteínas ósseas morfogenéticas
BSP	-	Sialoproteína óssea
CMO	-	Conteúdo mineral ósseo
DMO	-	Densidade mineral óssea
EDTA	-	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FGF	-	Fator de crescimento de fibroblastos
GM-CSF	-	Fator estimulante de colonização macrófago-granulocitário
i.p	-	Intraperitoneal
IFN- γ		Interferon- γ
IGF	-	Fator de crescimento semelhante à insulina
IL-1	-	Interleucina 1
IL-1ra	-	Receptor antagonista da IL-1
IL-1R1	-	Receptor da IL-1
IL-1R2	-	Receptor da IL-1
IL-1 β	-	Interleucina 1-beta
IL-6	-	Interleucina 6
IL-8	-	Interleucina 8
IL-10	-	Interleucina 10
IL-11	-	Interleucina 11
IL-18	-	Interleucina 18
kg	-	Kilograma
LPS	-	Lipopolissacarídeo
M-CSF	-	Fator estimulante de colônia de macrófagos
mg	-	Miligrama
ml	-	Mililitro

mm	-	Milímetro
NO	-	Óxido nítrico
OC	-	Osteocalcina
OPG	-	Osteoprotegerina
OPN	-	Osteopontina
PAF	-	Fator de ativação plaquetária
PGE ₂	-	Prostaglandina E ₂
PDGF	-	Fator de crescimento derivado de plaquetas
RANK	-	Ativador do fator nuclear - kappaB
RANKL	-	Ativador do fator nuclear - kappaB ligante
rpm	-	Rotação por minuto
Tc	-	Temperatura corporal
TGF- β	-	Fator de transformação do crescimento beta
TNF	-	Fator de necrose tumoral
TNF-R1	-	Receptor 1 do TNF
TNF-R2	-	Receptor 2 do TNF
TNF- α	-	Fator de necrose tumoral alfa
TRAP	-	fosfatase ácida tartrato-resistente
TXA ₂	-	Tromboxana A ₂
VEGF	-	Fator de crescimento vascular endotelial
μ m	-	Micrometro

Figura 1. Fases da reparação óssea.

Figura 2. Esteira para ratos Insight EP 131.

Figura 3. Cirurgia: (A) secção da pele; (B) defeito ósseo; (C) sutura dos músculos e (D) sutura da pele.

Figura 4. Desenho experimental do trabalho.

Figura 5. Exame de densitometria óssea da tíbia direita de rato.

Figura 6. Programa Axiovision quantificando área do tecido neoformado (μm^2).

Figura 7. Área óssea global (cm^2) da tíbia direita dos grupos SED SAL (7), SED LPS (6), EX SAL (8) e EX LPS (6).

Figura 8. Densidade mineral óssea (DMO), (cm^2) da tíbia direita dos grupos SED SAL (7), SED LPS (6), EX SAL (8) e EX LPS (6).

Figura 9. Conteúdo mineral ósseo (CMO), (cm^2) da tíbia direita dos grupos SED SAL (7), SED LPS (6), EX SAL (8) e EX LPS (6).

Figura 10. (A) Área das fibras colágenas tipo I (μm^2) da tíbia direita dos grupos SED SAL (7), SED LPS (6), EX SAL (6) e EX LPS (6). (B) Área das fibras colágenas tipo III (μm^2) da tíbia direita dos grupos SED SAL (7), SED LPS (6), EX SAL (6) e EX LPS (6).

Figura 11. Fotomicrografia da coloração de Picrosirius evidenciando, histologicamente, as fibras colágenas tipo I (vermelho) e tipo III (verde) do defeito ósseo da tíbia direita nos grupos SED SAL (A), SED LPS (B), EX SAL (C) e EX LPS (D).

Figura 12. Área do tecido ósseo neoformado (μm^2) da tíbia direita dos grupos SED SAL (7), SED LPS (6), EX SAL (6) e EX LPS (6).

Figura 13. Fotomicrografia da coloração Tricômio de Masson evidenciando, histologicamente, a neoformação óssea do defeito ósseo da tíbia direita nos grupos SED SAL (A), SED LPS (B), EX SAL (C) e EX LPS (D).

Figura 14. Imunomarcação para a Osteocalcina, (μm^2) da tíbia direita dos grupos SED SAL (7), SED LPS (6), EX SAL (6) e EX LPS (6).

Figura 15. Imunomarcação para a Osteoprotegerina, (μm^2) da tíbia direita dos grupos SED SAL (7), SED LPS (6), EX SAL (6) e EX LPS (6).

Figura 16. Imunomarcação para o RANK, (μm^2) da tíbia direita dos grupos SED SAL (7), SED LPS (6), EX SAL (6) e EX LPS (6).

Figura 17. Imunomarcação para o TRAP, (μm^2) da tíbia direita dos grupos SED SAL (7), SED LPS (6), EX SAL (6) e EX LPS (6).

Figura 18. Fotomicrografia da imunomarcação: (A) OC (seta amarela), (B) OPG (seta vermelha), (C) RANK (seta preta) e (D) TRAP (seta azul).

Tabela 1. Quantidade de dias, tempo (minutos) e velocidade (m/min) de adaptação dos animais na esteira.

Tabela 2. Quantidade de semanas, tempo (minutos) e velocidade (m/min) de treinamento dos animais na esteira.

Tabela 3. Peso corporal final dos animais treinados e sedentários, tratados com salina ou LPS.

Nogueira, J.E. **Efeito do exercício físico sobre a ação do LPS no reparo ósseo em ratos**. 2015. 96f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

O reparo ósseo é um processo que consiste na restauração dos tecidos lesados que é determinado por vários eventos biológicos para se obter a cura. Ele pode ser facilitado através de enxertos, estimulação bioquímica e estimulação física. Por outro lado, pode ser retardado por endotoxina (lipopolissacarídeo; LPS). O exercício físico exerce efeito benéfico para o osso, porém não é reconhecido o efeito sobre a reparação óssea. Assim, investigamos o efeito do exercício físico sobre a ação do LPS no reparo ósseo, por meio, de dosagens de citocinas plasmáticas, densitometria óssea, análise histológica quantitativa do tecido ósseo neoformado e marcadores imuno-histoquímicos, em animais sedentários e treinados. Os ratos foram divididos em quatro grupos: sedentário salina, sedentário LPS, exercício salina e exercício LPS. O exercício consistiu no treinamento físico na esteira durante quatro semanas. Após o treinamento, os ratos foram submetidos à cirurgia para confecção do defeito ósseo na tíbia direita e 24 horas após a cirurgia o LPS foi administrado na dose de 100 µg/kg ou 1 ml/kg de salina, intraperitoneal. Finalmente, após 10 dias o sangue e as tíbias direitas foram obtidos para as análises, período em que os animais não foram submetidos ao treinamento físico. Os ratos treinados tiveram menor peso corporal do que os ratos sedentários ($P<0,001$). O exercício físico exerceu efeito positivo na reparação óssea, aumentando a densidade mineral óssea ($P<0,005$), o conteúdo mineral ósseo ($P<0,005$), a neoformação óssea ($P<0,005$), o colágeno tipo I ($P<0,05$) e a expressão de osteocalcina ($P<0,05$). As citocinas plasmáticas não foram detectadas na análise. Esses parâmetros não foram afetados

pela administração sistêmica de LPS. Assim, os dados indicam que o exercício físico exerce um importante efeito osteogênico, que é mantido durante a inflamação sistêmica aguda induzida por uma única dose de LPS.

Palavras-chaves: Reparo Ósseo, Exercício Físico, Lipopolissacarídeo.

Abstract

Nogueira, J.E. **Effects of physical exercise on the action of LPS on bone repair in rats**. 2015. 95p. Master degree Thesis - Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Bone repair is a process involved in the restoration of injured tissues. It can be facilitated by grafting, biochemical and physical stimulation. On the other hand, may be delayed by endotoxin (lipopolysaccharide; LPS). Physical exercise exerts beneficial effects on the bone, but is not known its effect on bone repair. Thus, we investigated the effect of exercise on the LPS action on bone repair through plasma cytokine measurements, bone densitometry, quantitative histological analysis for new bone tissue and immunohistochemical markers in sedentary and exercised animals. Rats were divided into four groups: sedentary saline, sedentary LPS, exercise saline and exercise LPS. Exercise consisted in physical training on the treadmill for four weeks. After training, rats underwent surgery for making the bone defect in the right tibia and 24 hours after the surgery LPS was administered at a dose of 100 µg/kg or 1 ml/kg saline, intraperitoneal. Eventually, blood and right tibias were obtained for analysis after 10 days when rats were not submitted to physical training. Exercised rats had lower body weight than the sedentary rats ($P<0.001$). The physical exercise had a positive effect on bone repair, increased bone mineral density ($P<0.005$), bone mineral content ($P<0.005$), bone formation ($P<0.005$), type I collagen ($P<0.05$) and osteocalcin expression ($P<0.05$). Plasma cytokines were not detected in the analysis. These parameters were not affected by systemic administration of LPS. Thus, our data are consistent with the notion that physical exercise has an important osteogenic effect, which is maintained during acute systemic inflammation induced by exposition to a single dose of LPS.

Keywords: Bone Repair, Physical Exercise, Lipopolysaccharide.

1. Introdução

1.1. Tecido Ósseo

O tecido ósseo desempenha a função de suportar as cargas mecânicas proveniente da contração e da sustentação de peso, alojar a medula óssea, proteger os órgãos vitais, além de servir de reservatório de íons cálcio, fosfato e magnésio e auxiliar na manutenção da homeostase desses íons no sangue (BURGUER et al, 1995). Esse tecido é composto pelas células denominadas osteoblastos, osteoclastos, osteócitos e material extracelular calcificado, denominado matriz óssea (ANDRADE et al, 2007; LEGEROS, 2002).

1.1.1. Osteoblastos

Os osteoblastos localizam-se na superfície óssea e são células de formação óssea responsáveis pelo controle da mineralização da matriz orgânica e por sua síntese. São derivados do endóstio, perióstio, células mesenquimais indiferenciadas e possuem importante papel na cicatrização (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006). Secretam proteínas colágenas e não colágenas, proteoglicanos, metaloproteinases e citocinas reguladoras do desenvolvimento osteoclástico. O desenvolvimento e diferenciação dos osteoblastos a partir de células osteoprogenitoras são dependentes do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e das proteínas ósseas morfogenéticas (BMP). Os osteoblastos podem diferenciar-se em osteócitos (PETERSON et al., 2005; ANDRADE et al., 2007).

1.1.2. Osteócitos

Os osteócitos são células residentes dentro da matriz óssea durante a sua mineralização com pouca atividade secretora e de síntese. São originados de osteoblastos, que durante a secreção da matriz, são envolvidos por ela por todos os lados (TURNER, 1991; AARDEN; BURGER, 2006; HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006; ANDRADE et al., 2007). Localizam-se dentro de lacunas das quais partem canalículos e cada lacuna é ocupada por apenas um osteócito. Os prolongamentos de cada osteócito encontram-se com de outro osteócito vizinho fazendo junção e se comunicando (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

1.1.3. Osteoclastos

Os osteoclastos são células gigantes, multinucleadas, ramificadas e móveis. São geradas a partir da fusão da linhagem monocitofagocítica dos tecidos hematopoiéticos (KATCHBURIAN; ARANA, 2004). Atuam na reabsorção da matriz óssea e seu mecanismo de ação é devido à secreção de ácidos (H^+), colagenases e hidrolases que atuam localmente reabsorvendo a matriz orgânica (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; FERNÁNDEZ-TRESGUERRES-HERMÁNDEZ-GIL et al., 2006). O processo de osteoclastogênese necessita do recrutamento de seus precursores hematopoiéticos. O fator estimulante de colônia de macrófagos (M-CSF) estimula a proliferação e fusão entre as células precursoras. O sistema constituído pelo ativador do fator nuclear - kappaB (RANK), ativador do fator nuclear - kappaB ligante (RANKL) e a osteoprotegerina (OPG) também participa da regulação da osteoclastogênese. O RANK é membro da família de receptores do fator de necrose tumoral (TNF). Ele se acopla ao seu ligante (RANKL) e sinaliza a proliferação e fusão de precursores e ativa a função de reabsorção dos osteoclastos. A OPG é um

receptor do RANKL e quando se liga com o RANKL impede a fusão e ativação dos osteoclastos (ARANA-CHAVES; BRADASCHIA-CORREA, 2009).

1.1.4. Matriz Óssea

A matriz óssea possui 65% de um componente inorgânico, 20% de um componente orgânico e 15% de água. O componente inorgânico contém cálcio e fósforo na forma de cristais de hidroxiapatita. O componente orgânico é composto por 85% de colágeno tipo I, 5% de colágeno do tipo III e V e 10% são as proteínas não colágenas como osteopontina (OPN), osteocalcina (OC), OPG, sialoproteína óssea (BSP), as BMPs e as proteínas séricas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; KATCHBURIAN; ARANA, 2004).

A OC regula a mineralização e homeostase de íons de cálcio no organismo e é considerada uma marcadora da formação óssea. A OPG é considerada como inibidora da osteoclastogênese e, assim, reduz a reabsorção e é responsável por regular a massa óssea (ERIKSEN, 2010).

No início da formação óssea, os osteoblastos são responsáveis por depositar uma matriz composta por fibrilas de colágeno tipo I e proteoglicanos sulfatados de cadeias longas. Assim, essa matriz se mineraliza e os osteoblastos secretam uma matriz constituída por 90% de colágeno, principalmente do tipo I, e por elementos não colágenos como a OPN e a BSP, que se associam as fibras colágenas e colaboram com o processo de mineralização (ARANA-CHAVEZ; BRADASCHIA-CORREA, 2009).

A matriz óssea é revestida por membranas não calcificadas denominadas perióstio e endóstio. O perióstio é constituído de fibras colágenas e fibroblastos na região externa e na região interna contém uma camada de células de revestimento

potencialmente osteogênica e células indiferenciadas. O endóstio é constituído por pré-osteoblastos, osteoblastos ou células de revestimento e, em geral, apresenta maior atividade que o perióstio (KATCHBURIAN; ARANA, 2004).

1.1.5. Tecido ósseo primário e secundário

O tecido ósseo pode ser classificado histologicamente em tecido ósseo primário (imaturo) e secundário (maduro ou lamelar). Esses dois tipos possuem os mesmos constituintes da matriz e as mesmas células. O tecido primário possui menor quantidade de mineral e as fibras colágenas estão dispostas irregularmente enquanto que no secundário as fibras se organizam em lamelas e se dispõem paralelas umas as outras ou em camadas em torno de canais com vasos, constituindo o sistema de Havers ou ósteons. O ósteon é um cilindro formado por quatro a vinte lamelas ósseas que no centro possui o canal de Havers, que é revestido de endóstio e possui vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos. Os canais de Havers comunicam-se entre si, com a superfície externa do osso e com a cavidade medular por meio dos canais de Volkmann, que são transversais ou oblíquos e atravessam as lamelas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; MURUGAN; RAMAKRISHNA, 2005).

No osso primário encontram-se dois tipos de tecidos, o osso trabecular (esponjoso) e o osso cortical (compacto). O osso trabecular é formado por lamelas paralelas entre si. Essas lamelas formam trabéculas com espaços preenchidos por tecido conjuntivo frouxo, vasos sanguíneos e tecido hematopoiético, formando, assim, parte da medula óssea (KATCHBURIAN; ARANA, 2004). O osso trabecular é encontrado, predominantemente, no interior de ossos longos (metáfises e epífises) e no esqueleto axial e corresponde a 20% do total da massa esquelética (ERIKSEN,

2010). O osso cortical é constituído por vários sistemas de lamelas, os canais são estreitos, a substância óssea é densa, acomoda a medula óssea e proporciona resistência adicional aos ossos longos (KATCHBURIAN; ARANA, 2004; ERIKSEN, 2010). Os ossos trabeculares e corticais servem como reservatório de fosfato e cálcio que são removidos ou acrescentados por ação celular sob o controle de hormônios, conforme a necessidade do organismo (ERIKSEN, 2010).

1.2. Reparo Ósseo

O reparo ósseo é um processo que consiste na restauração dos tecidos lesados (AL-AQL et al., 2008). A osteogênese ocorre por meio da ossificação intramembranosa e endocondral e envolvem a diferenciação de células mesenquimais. Na ossificação intramembranosa há diferenciação direta de células mesenquimais que são derivadas da crista neural em tecido ósseo. Na ossificação endocondral ocorre o processo indireto de ossificação por meio da diferenciação das células mesenquimais em tecido cartilaginoso que posteriormente é substituído pelo tecido ósseo (KARSENTY; WAGNER, 2002).

O processo de reparo ósseo é composto por quatro fases (Figura 1): a) Formação do hematoma: após a lesão, o rompimento dos vasos sanguíneos induz à formação de um hematoma por toda a área da fratura seguida da formação de um edema. Assim, inicia-se o processo de mobilização de macrófagos e neutrófilos provocados pela liberação de substâncias quimiotáticas. b) Formação do calo mole: as células inflamatórias, os fibroblastos e células tronco são recrutadas para o local, formando novos vasos sanguíneos (angiogênese) proveniente das células remanescentes dos vasos sanguíneos rompidos e das células mesenquimais indiferenciadas que, junto com os osteoblastos e os fibroblastos, ocupam a região do

hematoma para formar um novo tecido ósseo local, pelo processo de ossificação intramembranosa, formando um osso imaturo. A resposta inflamatória está associada a dor, calor, inchaço, e a liberação de vários fatores de crescimento e citocinas que possuem papéis importantes na reparação. c) Formação do calo duro: nessa etapa os calos tornam-se mineralizados devido à hidroxipatita de cálcio. d) Remodelamento ósseo: o calo ósseo é substituído por osso lamelar. O calo é reduzido ao osso pré-existente e o suprimento vascular volta ao normal (CARANO; FILVAROFF, 2003).

Figura 1: Fases da reparação óssea.

O reparo ósseo passa por processos coordenados de células originárias do córtex, medula óssea, periosteio e tecidos moles circundantes, como no desenvolvimento embrionário (FERGUSON et al., 1999; GERSTENFELD et al., 2003a).

O hematoma é formado após o trauma e é constituído por células do sangue intramedular, periférico e da medula óssea. A resposta inflamatória é iniciada para que ocorra o processo de reparação, induzindo o hematoma a coagular entre e ao

redor das extremidades da lesão e dentro da medula, para assim formar um modelo de formação do calo ósseo (GERSTENFELD et al., 2003a).

A presença prolongada e crônica de citocinas inflamatórias exerce efeito negativo no osso e nas articulações, porém após uma lesão é fundamental uma secreção regulada e rápida de moléculas pró-inflamatórias para a reparação óssea (GERSTENFELD et al., 2003a).

A fase inflamatória tem seu pico nas primeiras 48h e duração de 7 a 10 dias. Nesse período há uma proliferação de leucócitos (macrófagos e linfócitos) que secretam citocinas pró-inflamatórias. O processo de condrogênese induz a formação da cartilagem ao local do defeito e a formação do osso diretamente a partir das células osteoprogenitoras localizadas sob o periósteo (EINHORN, 2005; SFEIR et al., 2005).

Os eventos biológicos que conduzem a cada etapa da reparação são regulados por moléculas de sinalização como as citocinas pró-inflamatórias, fator de transformação do crescimento beta ($TGF-\beta$) e fatores angiogênicos. As citocinas inflamatórias são liberadas no local da lesão para iniciar o processo de reparação óssea. Essas citocinas são produzidas e desempenham sua função imediatamente após a lesão e por um curto período de tempo. Em uma fase intermediária do processo, algumas citocinas inflamatórias podem ser aumentadas para estimular o processo de osteoclastogênese e de remodelação óssea (AL-AQL et al., 2008). As interleucinas 1, 6, 11 e 18 (IL-1, IL-6, IL-11 e IL 18) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) são secretadas no local da lesão pelos macrófagos, células inflamatórias e pelas células de origem mesenquimais, assim causam uma resposta à lesão, reunindo outras células inflamatórias, aumentando a síntese da matriz extracelular e estimulando a angiogênese (KON et al., 2001; CHO et al., 2002, GERSTENFELD et

al., 2003a). O pico dessas citocinas é observado com 24 horas e retornam aos valores normais dentro de 72 horas após a lesão (CHO et al., 2002; GERSTENFELD et al., 2003a). Nesse período o TNF- α é liberado por macrófagos e células inflamatórias mediadas pelos sinais inflamatórios secundários, assim atuando com agente quimiotático para recrutar células necessárias para a reparação (KON et al., 2001). O TNF- α é responsável por promover o recrutamento de células tronco mesenquimais, estimular a função dos osteoclastos e provocar a apoptose de condrócitos hipertróficos durante a formação óssea endocondral; *in vitro* tem sido expresso para induzir a diferenciação osteogênica de células tronco mesenquimais (CHO et al., 2006). Os efeitos do TNF- α são mediados pelos receptores TNF-R1 e TNF-R2 e são manifestados pelos osteoblastos e osteoclastos, porém o TNF-R1 manifesta-se a todo o momento no osso enquanto o TNF-R2 apenas após uma lesão, desempenhando função específica na reparação óssea (KON et al., 2001; BALGA, 2006). O TNF- α aumenta novamente com a reabsorção da cartilagem mineralizada no final da fase endocondral e a IL-1 e IL-6 durante a formação óssea secundária da reparação óssea (GERSTENFELD et al., 2003b).

Acredita-se que a IL-1 e IL-6 sejam as interleucinas mais importantes no processo de reparação óssea. A IL-1, produzida por macrófagos na fase aguda da inflamação, é responsável por induzir a produção de IL-6 nos osteoblastos, por atuar na produção do calo cartilaginoso primário e no processo de angiogênese no local da lesão por meio dos seus receptores, IL-1R1 e IL-1R2 (KON et al., 2001; SFEIR et al., 2005; LEE; LORENZO, 2006). A produção de IL-6 é maior na fase aguda da inflamação e atua na diferenciação dos osteoblastos e osteoclastos, no processo de angiogênese e na produção do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) (YANG et al., 2007).

O MCSF, a OPG e o RANKL são fatores reguladores da osteoclastogênese e aumentam após a lesão inicial e durante o período de reabsorção da cartilagem mineralizada. Na fase de formação óssea secundária e remodelação óssea, os níveis do MCSF, OPG e RANKL são diminuídos em relação aos apresentados durante a reabsorção da cartilagem (GERSTENFELD et al., 2003a). A angiogênese permite a oxigenação local, o fluxo de nutrientes e a liberação de fatores de crescimento. A vascularização insuficiente pode levar na formação do tecido fibroso (FILVAROFF, 2003; KLENKE et al., 2008).

O processo de reparo pode ser acelerado para obter um retorno mais rápido da função músculo-esquelética (SFEIR, 2005). Além disto, o reparo ósseo pode ser facilitado através do uso de enxerto ósseo, estimulação bioquímica por hormônios ou através de estimulação física por modalidades mecânicas e eletromagnéticas (LIND; BUNGER, 2001) ou ainda retardadas por agentes como o LPS (HAUSMANN; RAISZ; MILLER, 1970; NAIR et al., 1996, KATONO et al., 2009).

O lipopolissacarídeo (LPS) é um componente da membrana externa de bactérias gram-negativas (KLUGER, 1991). Ele é utilizado para reproduzir a febre através de injeção intraperitoneal (i.p.). A febre, por definição, é um aumento controlado na temperatura corporal (T_c) (KLUGER, 1991). O estado febril se instala quando os mecanismos termorreguladores passam a ser controlados mediante um novo *set point*, mais elevado que o do estado eutérmico (normal). O LPS é composto por moléculas de polissacarídeos, lipídeos e proteínas. Sua porção lipídica, denominada *Lipídeo A*, origina os efeitos pirogênicos do LPS, pois estimula os macrófagos a produzirem mediadores (pirógenos endógenos) protéicos e lipídicos e radicais livres. Dentre os mediadores protéicos destacam-se principalmente as seguintes citocinas, polipeptídeos imunorregulatórios: o $TNF-\alpha$ (BLATTEIS; SEHIC,

1997) as interleucinas 1 β , 6 e 8 (IL-1 β , IL-6 e IL-8) e o interferon- γ (IFN- γ). A prostaglandina E₂ (PGE₂), a tromboxana A₂ (TXA₂) e o fator de ativação plaquetária (PAF) são considerados os principais mediadores inflamatórios lipídicos. Steiner et al. (2006) documentaram que a primeira fase da febre por LPS é iniciada, pelo menos parcialmente, pela PGE₂ sintetizada pelos macrófagos dos pulmões e fígado. Quanto aos radicais livres, os de oxigênio são os mais expressivos, tendo como exemplos os íons super óxidos e o óxido nítrico (NO). Quando a produção dos mediadores é baixa ocorrem efeitos benéficos ao organismo como: febre moderada, estimulação generalizada do sistema imunitário e morte microbiana. Porém, quando os mediadores são superproduzidos ocorrem efeitos prejudiciais ao organismo como: febre alta, hipotensão e choque séptico (RIETSCHEL; BRADE, 1992).

Estudos por meio de cultura de células demonstram que no metabolismo ósseo o LPS estimula a reabsorção óssea pelos osteoclastos (HAUSMANN; RAISZ; MILLER, 1970; NAIR et al., 1996, KATONO et al., 2009). Ele estimula os osteoblastos a secretarem fatores inflamatórios osteolíticos como: fator estimulante de colonização macrófago-granulocitário (GM-CSF) (HOROWITZ et al., 1989), IL-1 (HANAZAWA et al., 1987; KEETING et al., 1991), IL-6 (ISHIMI et al., 1990; LITTLEWOOD et al., 1991), NO (DAMOULIS; HAUSCHKA, 1994), PGE₂ e RANKL, para estimular a reabsorção óssea pelos osteoclastos. Todos esses fatores induzem a maturação e / ou ativação dos osteoclastos. Alguns estudos demonstram que a diferenciação osteogênica dos osteoblastos é inibida pelo LPS, sendo assim considerado como outro mecanismo da perda óssea induzida pelo LPS (BANDOW et al., 2010).

Estudos *in vivo* e em *in vitro* tem demonstrado que o LPS é um potente estimulador da reabsorção óssea e que provoca um processo inflamatório sistêmico e localmente (NAIR et al., 1996).

O LPS é muito utilizado em laboratório como ferramenta para a resposta de fase aguda, caracterizada no modelo de inflamação sistêmica. Quando utilizado em baixas doses, o animal apresenta uma resposta febril (ROMANOVSKY et al., 2005), enquanto em doses alta, uma resposta bifásica caracterizada, na maior parte das vezes, por hipotermia que antecede a resposta febril (LIU et al., 2012). Estas alterações são mediadas pelas citocinas. Estudos experimentais em inflamação sistêmica envolvem a participação do TNF- α , IL-1 β , IL-6, receptor antagonista da IL-1 (IL-1ra), receptor solúvel do TNF (sTNF-R) e interleucina 10 (IL-10), respectivamente (AKIRA; TAGA; KISHIMOTO, 1993). A TNF- α e IL-1 estimulam a produção de IL-6 que tem sido classificada como citocina pró e anti-inflamatória (TILG; DINARELLO; MIER, 1997).

1.3. Tecido ósseo e exercício físico

O exercício físico regular é importante para minimizar a perda e aumentar a massa e a força óssea (CHANG et al., 2010). Os benefícios do exercício físico sobre o tecido ósseo têm sido estudados ao longo dos anos, porém ainda não estão completamente entendidos quais são os mecanismos específicos que atuam no metabolismo ósseo decorrente do exercício físico. O aumento da massa óssea decorrente do exercício físico é, principalmente, em resposta a um aumento da tensão mecânica (TUREK, 1991). As forças de tensão, compressão e cisalhamento geradas durante o exercício físico, associadas à alteração mecânica das contrações musculares, são capazes de provocar modificações na estrutura óssea. Essas

modificações podem estar relacionadas com as correntes de baixa energia que são geradas pela resposta piezoelétrica do cristal de hidroxiapatita ao estresse imposto a esse tecido (TUREK, 1991; AIRES, 2008). A carga mecânica produzida pelo exercício estimula a osteogênese. A tensão gerada no osso eleva os níveis de cálcio intracelular, aumenta a secreção autócrina, parácrina e a expressão de fatores de crescimento, o número de osteoblastos e a formação óssea (BILEZIKIAN; RAISZ; MARTIN, 2008).

A rigidez do osso é controlada pela região mineralizada enquanto o colágeno controla a força e a resistência. O exercício físico desloca a composição relativa dos minerais e da matriz de colágeno a favor da região óssea mais mineralizada, contribuindo na produção do colágeno e na alteração no ritmo de remodelamento das suas redes (ISAKSSON et al., 2009).

A densidade mineral óssea (DMO) e o conteúdo mineral ósseo (CMO) são dois indicadores clínicos da saúde óssea (HUANG et al., 2003). Ela representa a quantidade de mineral numa área e é expressa em gramas pela área ou volume medidos (g/cm^2 ou g/cm^3). A manutenção da DMO é importante para a prevenção da osteoporose (CADORE; BRENTANO; KRUEL, 2005). Vários fatores influenciam a DMO como a genética, idade, nutrição, peso, composição corpórea e exercício físico (CANHÃO; FONSECA; QUEIROZ, 2004).

Estudos tem demonstrado que o exercício físico na esteira produz ganhos no volume ósseo. Após 12 semanas de treinamento em esteiras, os ratos tiveram aumento no volume ósseo esponjoso (IWAMOTO; YEH; ALOIA, 1999). No estudo de Iwamoto et al. (2004), o exercício físico provocou aumento no comprimento do osso do fêmur, do conteúdo mineral ósseo da tíbia, elevou os biomarcadores de osteoblastos e osteocalcina e diminuiu o biomarcador dos osteoclastos. O

treinamento na esteira e exercícios de saltos aumentam a força e massa óssea. Em estudos com animais, foi relatado que a força e massa óssea adquirida após treinamento na esteira são perdidos quando o treinamento cessa mas ainda se mantém por algum tempo. Esses estudos sugerem que o exercício contínuo é necessário para manter os benefícios provocados no osso (IWAMOTO; YEH; ALOIA, 2000; WU et al., 2004). Ratos treinados na natação tiveram aumento do conteúdo mineral e força óssea, crescimento longitudinal e maior aposição periosteal (HART et al., 2001). Huang et al. (2003) utilizaram natação e corrida em ratos que tiveram força na tíbia e fêmur aumentados, porém não encontraram alterações na DMO e no CMO.

As cargas e as tensões mecânicas resultantes do exercício físico desempenham função importante no desenvolvimento e manutenção do osso. É aceito que o exercício durante a maturação contribui para o aumento da massa óssea, protegendo contra doenças como osteopenia e osteoporose (PENG; TUUKKANEN; VÄÄNÄNEN, 1994).

Portanto, levando em consideração que há efeitos opostos do exercício físico e LPS no metabolismo ósseo, o presente estudo foi realizado para testar a hipótese de que os efeitos deletérios do LPS seriam diminuídos pelo treinamento.

2. Objetivo

O objetivo deste trabalho foi analisar o efeito do exercício físico sobre a ação do LPS no reparo ósseo, por meio, de dosagens de citocinas plasmáticas (IL-1 β , IL-6, TNF- α), densitometria óssea, análise histológica quantitativa do tecido ósseo neoformado e marcadores imuno-histoquímicos (OC, OPG, RANK e TRAP), em ratos sedentários e treinados.

3. Materiais e Métodos

3.1. Animais

Os experimentos foram realizados em ratos Wistar, obtidos do Biotério Central da Universidade de São Paulo (USP), campus de Ribeirão Preto, aclimatados (25°C; ciclo claro-escuro de 12:12 h) e agrupados (4 por caixas) no Biotério da Faculdade de Odontologia (FORP) antes de qualquer uso experimental. Todos os experimentos foram realizados entre 8h e 10h, em ratos pesando em média de 390g, alimentados e hidratados *ad libitum*. Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (nº 158/2012).

3.2. Drogas

Para anestesia geral foi utilizado cetamina-xilazina (100 e 10 mg kg⁻¹, i.p). Antibiótico (160,000 U kg⁻¹ benzilpenicilina, intramuscular) e analgésico (Flunixin; 2.5 mg kg⁻¹, subcutânea) foram administrados ao final da cirurgia.

O lipopolissacarídeo (LPS) (obtido a partir de *E. Coli*, sorotipo 0111:B4, Sigma, St. Louis, MO, EUA) foi dissolvido em salina estéril livre de pirógenos. Com base em trabalhos anteriores (STEINER et al., 2002), a dose de LPS administrada (i.p) foi de 100 µg/kg de peso corporal em um volume de 0,25 mL.

3.3. Obtenção do plasma

Após a decapitação dos animais, foi coletado 5mL de sangue, via cervical, e armazenados em tubos plásticos (tubos Falcon 15 mL, com 0,01 mL de heparina) para a extração do plasma que foi obtido através da centrifugação a 3500 rotações por minuto (rpm) durante 20 minutos a temperatura de 4°C. Após o final da centrifugação os plasmas foram aliquotados em tubos do tipo eppendorf (5mL) e

armazenados em freezer -70°C para as dosagens de citocinas.

3.4. Dosagem de Citocinas

Para dosagem das citocinas foi utilizado o método enzyme-linked immunoabsorbent assay (DuoSet ELISA) de captura (R&D System, Inc., Minneapolis, USA), seguindo-se as orientações do fabricante.

3.5. Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais: Animais sedentários e treinados, tratados com salina ou LPS.

Sedentário Salina - SED SAL

Sedentário LPS - SED LPS

Exercício Salina - EX SAL

Exercício LPS - EX LPS

3.6. Protocolos Experimentais

3.6.1. Treinamento na Esteira

Primeiramente os ratos foram selecionados e adaptados na esteira durante 1 semana a 10 minutos, aumentando 5 minutos a cada dia, até chegar a 30 minutos no quinto dia de adaptação. A velocidade no primeiro dia foi de 10 m/min, no segundo dia 12 m/min, no terceiro dia 13 m/min, no quarto dia 14 m/min e no quinto dia 15m/mim (Tabela 1).

Tabela 1. Quantidade de dias, tempo (minutos) e velocidade (m/min) de adaptação dos animais na esteira.

1º	2º	3º	4º	5º	<i>dia</i>
10	15	20	25	30	<i>minutos</i>
10	12	13	14	15	<i>m/min</i>

Os ratos foram treinados em uma esteira motorizada para ratos (modelo Insight EP 131, Figura 2) durante 4 semanas, 5 vezes por semana. Na primeira semana o tempo foi de 30 minutos e a velocidade de 15 m/min. Na segunda semana o tempo foi de 40 minutos e a velocidade a 17 m/min. Na terceira semana o tempo foi de 50 minutos e a velocidade de 19 m/min e na quarta semana o tempo foi de 60 minutos e a velocidade de 20 m/min (Tabela 2). Esse método foi adotado, com algumas modificações, a partir de estudos anteriores em ratos (FERREIRA et al., 2007).

Tabela 2. Quantidade de semanas, tempo (minutos) e velocidade (m/min) de treinamento dos animais na esteira.

1º	2º	3º	4º	<i>semana</i>
30	40	50	60	<i>minutos</i>
15	17	19	20	<i>m/min</i>

Figura 2. Esteira para ratos Insight EP 131.

3.6.2. Cirurgia para realização do Defeito Ósseo

Após 4 semanas de treinamento na esteira, os animais foram submetidos à cirurgia para confecção do defeito ósseo. Para isto, os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina-xilazina (100 e 10 mg kg⁻¹, i.p). O local da cirurgia foi submetido à tricotomia e higienização com solução iodada. A secção da pele foi através de um bisturi e realizou-se uma abertura transversal de 5mm de comprimento e 1mm de profundidade na região medial da tíbia direita (platô), a 8mm da região proximal (Figura 3A). Para a realização do defeito ósseo foi utilizado um aparelho cirúrgico para implantes (Dentscler, Multicler, Brasil), com caneta de baixa rotação e broca tronco cônica de 2 mm de diâmetro, 1040 rpm e uso de soro fisiológico como irrigação para não causar lesões nos tecidos. O procedimento cirúrgico foi realizado com a inserção da broca perpendicularmente ao osso, de modo que o defeito tivesse 2mm de diâmetro de extensão e trespassasse as tábuas ósseas (FREITAS; BARANAUSKA; CRUZ-HOFLING, 2000) (Figura 3B). Após a cirurgia, realizou-se a sutura dos tecidos com fio de seda 4.0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil), de modo a fechar devidamente as margens do retalho. Em seguida, cada animal recebeu uma dose de antibiótico

(160,000 U kg⁻¹ benzilpenicilina, intramuscular) e analgésico (Flunixinina; 2.5 mg kg⁻¹, subcutânea) (Figura 3C e D) .

Figura 3. Cirurgia: (A) secção da pele; (B) defeito ósseo; (C) sutura dos músculos e (D) sutura da pele.

3.6.3. Administração de LPS

Após a cirurgia para realização do defeito ósseo, todos os animais foram acondicionados individualmente em uma sala com a temperatura a 20°C. Vinte e

quatro horas após a realização do defeito ósseo foi administrado aos animais uma dose de 100 µg/kg de LPS ou 1 mL/kg de salina, i.p.

3.6.4. Desenho experimental e obtenção das amostras

Conforme mencionado acima, os animais foram treinados na esteira durante 4 semanas e posteriormente submetidos à cirurgia do defeito ósseo com administração de LPS ou solução salina, aguardando-se mais 10 dias até o sacrifício, período no qual não foram submetidos ao treinamento físico (Figura 4). Após o sacrifício, o sangue foi coletado para análise das citocinas e a região de interesse (tíbia direita) dissecada com uso de instrumentos cirúrgicos, para a realização da densitometria óssea e processamento histológico.

Figura 4. Desenho experimental do trabalho.

3.7. Densitometria dos ossos

O exame densitométrico foi realizado após a eutanásia dos animais em um aparelho de densitometria por raios X (Hologic, Discovery Wi®, Estados Unidos) no Laboratório de Endocrinologia e Ciências de Imagens e Física Médica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, com os ossos (tíbia direita) separados das partes moles e posicionados dentro de uma caixa acrílica. O protocolo utilizado foi específico para analisar em alta resolução (Sub-region Hi-

Resolution) neste modo o programa reconhece o contorno dos ossos para a densitometria óssea global (Figura 5). Três parâmetros foram analisados: área óssea global, DMO global e CMO global.

Figura 5. Exame de densitometria óssea da tíbia direita de rato.

3.8. Histologia

3.8.1. Processamento Histológico

As tíbias direitas dos ratos foram removidas e imersas na solução fixadora formaldeído a 10% durante 24 horas e posteriormente descalcificados em ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Após o período de aproximadamente 1 mês de

descalcificação, as tíbias foram submetidas ao processo de diafanização e desidratadas em série crescente de álcoois: 70%, 90%, 95%, 100% (I, II e III), durante 1h em cada. Após, as tíbias foram colocadas em partes iguais de álcool e xilol e diafanizados em xilol, com trocas a cada 1 hora em cada solução, sendo executadas 3 trocas; em seguida as tíbias foram incluídas em parafina.

3.8.2. Análise microscópica

Para a análise microscópica foram realizados 120 cortes, por tíbia, semi-seriados de 5µm de espessura percorrendo toda a extensão do defeito ósseo. Estes cortes foram colocados em 30 lâminas, contendo 4 cortes por lâminas. Dez lâminas foram coradas em PicroSirius e dez lâminas em Tricômio de Masson para a quantificação de fibras colágenas do tipo I e III e quantificação da neoformação óssea, respectivamente. Dez lâminas foram separadas para realizar a técnica imuno-histoquímica. Foi utilizado o microscópio óptico Axiomager Z2 (Zeiss, Germany) acoplado a uma câmera digital (Zeiss) adquirido no processo FAPESP n. 2011/01512-0.

3.8.2.1. Análise da densitometria óptica das fibras colágenas tipo I e III

As lâminas histológicas coradas com a coloração de PicroSirius permite observar as fibras colágenas do tipo I e III através da birrefringência das fibras no microscópio com luz polarizada, que capta as fibras colágenas do tipo I com a cor vermelha e as fibras do tipo III na cor verde (PEREIRA, VIANNA; MANDARIM-DE-LACERDA, 1998; ARANHA, 2009). A análise histológica quantitativa das fibras colágenas foi realizada na região do defeito ósseo. Foram realizados 40 cortes histológicos e capturados 6 cortes histológicos aleatoriamente ao longo do defeito

ósseo, por animal. A análise de densitometria óptica das fibras colágenas tipo I e III foi realizada por meio do programa Axiovision que capta as diferentes tonalidades de vermelho e verde e quantifica a somatória das áreas em pixel^2 referentes às diferentes fibras sobre a luz polarizada.

3.8.2.2. Análise da área do tecido ósseo neoformado

A análise histológica quantitativa foi realizada na região do defeito ósseo. Foram realizados 40 cortes histológicos e para a quantificação da área do tecido ósseo neoformado foram selecionados 6 cortes histológicos aleatoriamente ao longo do defeito ósseo, por animal. Estes cortes foram analisados por meio do microscópio na objetiva de 5 vezes, permitindo analisar quantitativamente o tecido em profundidade. A análise quantitativa do reparo ósseo foi realizada por meio do programa Axiovision que capta a imagem reconhecendo a coloração azul escuro e quantifica a área em pixel^2 (Figura 6).

Figura 6. Programa Axiovision quantificando a área do tecido neoformado (μm^2).

3.9. Técnica imuno-histoquímica

Foi realizada a imunomarcção de algumas proteínas, sendo elas, a OC, OPG, RANK e TRAP utilizando os seguintes anticorpos: anti-OC (SC 30044 - Santa Cruz) anti-OPG (Ab 73400 - Abcam) anti-RANK (SC 7628 - Santa Cruz), anti-TRAP (SC 28204 - Santa Cruz) e kit EnVision + System-HRP - DB (Dako - K4011). Posteriormente o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio (10 volumes) das ligações inespecíficas com PBS/BSA 2% por uma hora cada, os cortes foram mergulhados em solução de tampão citrato pH 6,0 em banho-maria para recuperação antigênica. Após o resfriamento e lavagem em PBS, as amostras foram incubadas com os anticorpos primários por dezoito horas a 4-8°C. A seguir, os cortes foram lavados em PBS e incubados a 4-8°C por três horas com o anticorpo secundário. A reação foi revelada com solução de diaminobenzidina (0,5mg/ml) e peróxido de hidrogênio líquido (0,005ml/100ml) em PBS por 10 minutos. Os cortes foram lavados em PBS, contra corados com hematoxilina de Mayer, desidratados, diafanizados e cobertos com lamínulas utilizando-se Entellan (Merck).

3.9.1. Análise imuno-histoquímica

A quantificação da imuno-histoquímica foi realizada na região do defeito ósseo. Foram realizados 10 cortes histológicos e selecionados 6 cortes para a análise, por animal. Estes cortes foram analisados por meio do microscópio na objetiva de 5 vezes, permitindo analisar quantitativamente as proteínas. A análise da imuno-histoquímica foi realizada por meio do programa Axiovision que capta a imagem reconhecendo a coloração castanha e quantifica a área em pixel².

3.10. Análise Estatística

Os resultados do presente estudo estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média). As alterações promovidas pelo exercício físico e pelo tratamento com LPS ou salina foram determinados por meio da análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguidos do pós-teste de Bonferroni, dentro dos seguintes grupos: SED SAL, SED LPS, EX SAL e EX LPS. O nível de significância adotado foi $P < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Avaliação Clínica

Não houve intercorrências nos grupos experimentais.

4.2. Efeito do exercício físico sobre o peso corporal

A tabela 3 apresenta o peso corporal final médio dos animais utilizados nos experimentos. O peso corporal dos animais treinados foi menor em relação aos animais sedentários.

Tabela 3. Peso corporal final médio dos animais treinados e sedentários, tratados com salina ou LPS.

	SED SAL (n=7)	SED LPS (n=6)	EX SAL (n=8)	EX LPS (n=6)
Peso corporal (g)	446,0±8,0	445,0±14,0	329,7±10,1*	347,0±8,3 [#]

* e [#] vs. SED SAL e SED LPS (P<0,001).

4.3. Análises Radiográficas

4.3.1. Efeito do exercício físico sobre a área óssea global, DMO e CMO

A Figura 7 representa os valores da área óssea global. Não houve diferença significativa (P>0,05) entre os grupos estudados, mostrando a homogeneidade da área dos ossos analisados.

Figura 7. Área óssea global (cm²) da tíbia direita dos grupos SED SAL (7), SED LPS (6), EX SAL (8) e EX LPS (6).

Foi encontrada diferença significativa para DMO ($P < 0,005$) e CMO ($P < 0,005$) nos ratos treinados comparado com os ratos sedentários, mas a administração de LPS não teve efeito na DMO e CMO dos ratos treinados e sedentários (Figuras 8 e 9).

Figura 8. Densidade mineral óssea (DMO), (cm²) da tíbia direita dos grupos SED SAL (7), SED LPS (6), EX SAL (8) e EX LPS (6). * e # vs. SED SAL e SED LPS (P<0,005).

Figura 9. Conteúdo mineral ósseo (CMO), (cm²) da tíbia direita dos grupos SED SAL (7), SED LPS (6), EX SAL (8) e EX LPS (6). * e # vs. SED SAL e SED LPS (P<0,005).

4.4. Análises Histológicas

4.4.1. Efeito do exercício físico sobre as fibras colágenas tipo I e III

A Figura 10 mostra os resultados do colágeno tipo I (A) e tipo III (B). O LPS não exerceu efeito significativo no colágeno tipo I e III dos grupos experimentais. Os ratos treinados tiveram maior formação de fibras colágenas tipo I do que os ratos sedentários ($P < 0,05$) enquanto que não houve diferença significativa para as fibras colágenas III. Na Figura 11 é observado a fotomicrografia da coloração de picrossirius dos grupos experimentais.

Figura 10. (A) Área das fibras colágenas tipo I (μm^2) da tíbia direita dos grupos SED SAL (7), SED LPS (6), EX SAL (6) e EX LPS (6). * e # vs. SED SAL e SED LPS ($P < 0,05$). (B) Área das fibras colágenas tipo III (μm^2) da tíbia direita dos grupos SED SAL (7), SED LPS (6), EX SAL (6) e EX LPS (6).

Figura 11. Fotomicrografia da coloração de Picrosirius evidenciando, histologicamente, as fibras colágenas tipo I (vermelho) e tipo III (verde) do defeito ósseo da tíbia direita nos grupos SED SAL (A), SED LPS (B), EX SAL (C) e EX LPS (D).

4.4.2. Efeito do exercício físico sobre a neoformação do tecido ósseo

A análise histológica para a neoformação óssea mostrou que os ratos treinados tiveram significativamente valores maiores comparados com os ratos sedentários ($P < 0,005$), porém a administração de LPS na teve efeito na formação

óssea (Figura 12). A Figura 13 apresenta a fotomicrografia da coloração tricrômio de masson dos grupos experimentais.

Figura 12. Área do tecido ósseo neoformado (μm^2) da tíbia direita dos grupos SED SAL (7), SED LPS (6), EX SAL (6) e EX LPS (6). * e # vs. SED SAL e SED LPS ($P < 0,005$).

Figura 13. Fotomicrografia da coloração Tricrômio de Masson evidenciando, histologicamente, a neoformação óssea do defeito ósseo da tíbia direita nos grupos SED SAL (A), SED LPS (B), EX SAL (C) e EX LPS (D).

4.4.3. Efeito do exercício físico sobre a OC, OPG, RANK e TRAP

A análise imuno-histoquímica para as proteínas OC, OPG, RANK e TRAP são apresentadas nas Figuras 14, 15, 16 e 17, respectivamente. Novamente o LPS não teve efeito significativo em qualquer expressão das proteínas nos grupos experimentais. A expressão da OC foi maior nos ratos treinados do que nos ratos sedentários ($P < 0,05$), mas não foi encontrada diferença significativa entre as

expressões de OPG, RANK e TRAP. Na figura 18 são apresentadas as fotomicrografias da imunomarcção das proteínas OC, OPG, RANK e TRAP.

Figura 14. Imunomarcção para a Osteocalcina, (μm^2) da tíbia direita dos grupos SED SAL (7), SED LPS (6), EX SAL (6) e EX LPS (6). * e # vs. SED SAL e SED LPS ($P < 0,05$).

Figura 15. Imunomarcção para a Osteoprotegerina, (μm^2) da tíbia direita dos grupos SED SAL (7), SED LPS (6), EX SAL (6) e EX LPS (6).

Figura 16. Imunomarcção para o RANK, (μm^2) da tíbia direita dos grupos SED SAL (7), SED LPS (6), EX SAL (6) e EX LPS (6).

Figura 17. Imunomarcção para o TRAP, (μm^2) da tíbia direita dos grupos SED SAL (7), SED LPS (6), EX SAL (6) e EX LPS (6).

Figura 18. Fotomicrografia da imunomarcção: (A) OC (seta amarela), (B) OPG (seta vermelha), (C) RANK (seta preta) e (D) TRAP (seta azul).

4.5. Análise Sanguínea

4.5.1 Efeito do exercício físico sobre as citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α

As citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α não foram detectadas na análise ELISA.

O presente estudo fornece a primeira evidência que não apenas o exercício físico tem efeito benéfico na reparação óssea, mas também que esse processo não é afetado pela inflamação sistêmica aguda. Esses resultados são apoiados pelas várias análises do metabolismo ósseo que foram avaliados por densitometria óssea, métodos histológicos e imuno-histoquímicos (Figuras 7-18). Esses tipos de análises do tecido têm sido adequadamente utilizados para avaliar o metabolismo ósseo (CARDEMIL et al., 2013; SCHLAUBITZ et al., 2014). No entanto, o desenho experimental utilizado nesse presente estudo, isto é, a combinação do efeito do treinamento e inflamação sistêmica na reparação óssea, nunca foi relatado.

Nossos dados indicam que, de fato, o treinamento desempenha um papel positivo na reparação óssea que é inalterada pela administração de uma única dose de LPS. Estudos prévios avaliaram o efeito da administração local de LPS no osso e mostraram que o LPS estimula a reabsorção óssea (CHIANG et al., 1999). Porém, a inflamação pode ocorrer em qualquer tecido, vindo até mesmo do osso, e nossos dados indicam que uma dose de LPS que causa febre (KWIATKOSKI et al., 2013) não afeta a reparação óssea. Nos modelos de inflamação sistêmica, a resposta febril ao LPS é mantida por algumas horas e retorna para os valores basais aproximadamente 8 horas após a administração (ROMANOVSKY et al., 2005).

Os resultados desse estudo mostram que o exercício físico é capaz de controlar o peso corporal. Sobre alimentação livre, os ratos sedentários tiveram aumentos significativos em relação aos grupos treinados. Assim, o controle do peso corporal nos ratos treinados dá suporte às evidências obtidas em estudos realizados anteriormente (HUANG et al., 2002; HUANG et al., 2003, HUANG et al., 2008).

Neste estudo, o exercício físico exerceu efeito positivo na reparação óssea, aumentando a DMO, o CMO e a neoformação óssea. O exercício físico tem sido

descrito como benéfico para a manutenção da qualidade do tecido ósseo (COOPER et al., 2006; BEAUDREUIL, 2006) e tem sido utilizado, junto com agentes farmacológicos, como protetor contra a perda da massa óssea (WOLFF et al., 1999), porém não são totalmente conhecidos os mecanismos que se obtém esses benefícios. Os exercícios de impacto e que contenham cargas mecânicas são indicados para aumentar a massa óssea (AERSSSENS et al., 1993). Estudos mostram que atletas e pessoas fisicamente ativas possuem maior massa óssea do que sedentários (FELSENBERG; GOWIN, 1998). Um dos benefícios do exercício físico é o aumento do fornecimento de sangue aos músculos em atividade, bem como os ossos, fornecendo, por meio dos canais de Volkmann e Harvers, oxigênio, hormônios e nutrientes (BORER, 2005). O aumento da massa muscular, obtida pela prática do exercício físico, gera maior tensão sobre a junção osteotendínea, causando estímulos osteogênicos e, assim, aumentando a deposição de minerais no tecido ósseo (IWAMOTO; TAKEDA; SATO, 2005).

O exercício físico tem sido amplamente aceito como benéfico para o sistema esquelético. Vários tipos de protocolos com diferentes cargas mecânicas são empregados em modelos animais, incluindo exercício em esteira rolante (IWAMOTO; YEH; ALOIA; 1999), salto (UMEMURA et al., 1997; NOTOMI et al., 2000), natação (HART et al., 2001) e plataforma vibratória (TEZVAL et al. 2011). Esses estudos examinaram a influência do exercício sobre a perda óssea e cada um mostrou-se eficaz.

No presente estudo observou-se maior DMO e CMO nos animais que foram submetidos ao treinamento físico na esteira (Figuras 8 e 9). Clinicamente, a DMO e CMO são indicadores da saúde óssea. A carga imposta pelo exercício na esteira estimula a formação e diminui a reabsorção óssea em ratos (IWAMOTO et al. 2004).

Esse tipo de exercício tem causado efeitos eficazes sobre os ossos de ratos jovens e velhos (RAAB et al., 1990; BENNELL et al., 2002), o que fornece validação para o desenho experimental usado nesse estudo. Esses efeitos incluem o aumento da área, massa e da densidade mineral óssea, especialmente do fêmur e da tíbia dos animais treinados em esteira (RAAB et al., 1990; HOLY; ZÉRATH, 2000; MATHEY et al., 2002; IWAMOTO et al., 2004; WARD et al., 2004, HAGIHARA et al., 2005; KAYSER et al., 2010). O exercício físico com cargas é reconhecido por aumentar o CMO e DMO durante o seu desenvolvimento (GUSTAVSSON; THORSEN; NORDSTROM, 2003; HIND; BURROWS, 2007). Vários estudos com diferentes modalidades de exercícios comprovam esses benefícios em animais. Ratas jovens e ovariectomizadas tiveram aumento da DMO e CMO após treinamento de natação (HART et al., 2001; WARNER et al., 2006). No estudo de Ooi et al. (2012), ratos que treinaram saltos tiveram aumento na massa óssea da tíbia maior do que os animais sedentários. Ratos submetidos ao treinamento de salto durante 8 semanas tiveram aumento da massa e força óssea e esses benefícios obtidos pelo treinamento foram preservados durante 6 meses de destreinamento (HONDA et al., 2008). Shimamura et al. (2002) e Wu et al. (2004) constataram que a massa e CMO de ratos podem ser mantidas com cargas menores do que aquelas inicialmente utilizadas para induzir aos ganhos. Ratos treinados na esteira tiveram aumento da DMO da tíbia (IWAMOTO et al., 1998; HUANG et al., 2003; HAGIHARA et al., 2005).

As fibras colágenas fazem parte de uma família de proteínas, são componentes orgânicos do tecido ósseo e tem função de elasticidade, sustentação e resistência a tração. Elas são depositadas na matriz extracelular durante a reparação do tecido ósseo, sendo composta por aproximadamente 90% de colágeno tipo I, principal produto dos osteoblastos (VARGAS; AUDI; CARRASCOSA, 1997).

Nosso trabalho analisou, por meio do microscópio de luz polarizada, as fibras colágenas do tipo I e do tipo III observadas na matriz de tecido ósseo neoformado. Constatamos aumentos das fibras colágenas do tipo I para os ratos treinados. Isaksson et al. (2009) investigaram se o aumento da carga mecânica, ocasionada pelo exercício físico, modularia o desenvolvimento do colágeno ósseo. Ensaio de tração de úmeros descalcificados revelaram melhora nas propriedades mecânicas da rede de colágenos e aumento da resistência mecânica nos animais treinados em comparação com os animais sedentários. Assim, o exercício físico parece acelerar o desenvolvimento da rede de colágeno ósseo. Uma explicação para a melhora da rede de colágeno nos animais treinados pode ser que o exercício acelere a taxa de reorientação da estrutura de colágeno, como a disposição de fibras na direção longitudinal, ao invés de aumentar a formação colágena (PUUSTJARVI et al., 1999). A orientação dos osteons e suas fibras de colágeno podem ser alteradas pelo exercício físico. Nas regiões que suportam as cargas de tensão predominam as fibras longitudinais e nas regiões com cargas de compressão, encontram-se mais fibras transversais. Esta reorientação, devido ao exercício físico, das fibras de colágeno está relacionada à deposição óssea e contribui para a manutenção da força óssea (GUADALAPE-GRAU et al., 2009).

Uma descoberta importante desse estudo é que o exercício físico aumentou a reparação óssea comparado com os controles (ratos sedentários). Isso indica um efeito osteogênico do exercício físico no metabolismo ósseo. O sistema esquelético é constantemente submetido a cargas mecânicas devido à força da gravidade e pela contração muscular, estimulando o remodelamento por meio da mecanotransdução. A mecanotransdução pode ser entendida como um processo de produção de uma reação bioquímica a partir de um estímulo mecânico. Os osteócitos são células

capazes de detectar os sinais mecânicos e modular a formação e reabsorção óssea pela sinalização dos osteoblastos e osteoclastos (LUU et al., 2009). Dessa forma, a estimulação mecânica causada pelo exercício físico resulta no fortalecimento e o sedentarismo causa desequilíbrio no metabolismo ósseo, prejudicando a qualidade óssea (BURR; ROBLING; TURNER, 2002; SHIGUEMOTO et al., 2012). Os osteócitos são sensíveis ao fluxo de fluido gerado pelo efeito piezoelétrico, ocasionado pelo aumento das corrente elétricas no osso (TUREK, 1991; BERGMANN et al., 2010). O efeito piezoelétrico é um marcador de fluido que é responsável por ativar os canais iônicos mecanossensíveis de cálcio e potássio e assim induzir o fluxo iônico na célula óssea, alterando o potencial da membrana celular para positivo (despolarização) ou negativo (hiperpolarização). A resposta eletrofisiológica da célula óssea pode ser com maior ou menor ativação dos canais iônicos. A intensidade da ativação dos canais iônicos ainda não está clara, mas sabe-se que a frequência e a intensidade do estímulo mecânico e a velocidade do fluxo do fluido são responsáveis por regular esses canais. A despolarização está associada à reabsorção óssea e a hiperpolarização com a osteogênese. Acredita-se que os canais iônicos transmitem as modificações mecânicas para os osteoclastos, osteoblastos e osteócitos, além de regular a resposta celular ao estímulo mecânico (YOKOTA; TANAKA, 2005; SCOTT et al., 2008).

O exercício físico é responsável por induzir uma carga mecânica que produz deformação óssea e estimula a osteogênese (BOPPART et al., 1998). A carga mecânica melhora a força óssea e inibem a perda óssea com a idade (ROBLING; CASTILLO; TURNER, 2006). Além disso, cria um gradiente de fluido no osso que promove uma cascata de acontecimentos celulares, incluindo a elevação do cálcio intracelular, expressão de fatores de crescimento e aumento da produção da matriz

óssea, aumentando a osteogênese (TURNER; ROBLING, 2003). Notomi et al. (2000) demonstraram que o treinamento de salto em ratos aumentou a formação óssea devido ao aumento do número de osteoblastos e diminuição do número de osteoclastos.

A OC é uma proteína encontrada na matriz óssea e predominantemente sintetizada pelos osteoblastos (OWEN et al., 1990). Neste estudo, os animais treinados tiveram quantidade maior na expressão de OC do que os animais sedentários (Figura 14). É reconhecido que a OC interage com cálcio e com cristais de hidroxiapatita, porém não são totalmente conhecidas suas funções. O aumento da produção da OC é coincidente com o início do processo de mineralização (OWEN et al., 1990). No estudo de Renno et al. (2012), houve aumento da expressão da OC em ratos com defeito ósseo na tíbia tratados com ultrassom após 7 e 13 dias da cirurgia.

A OPG e RANKL são proteínas envolvidas com a regulação da indução do processo de osteoclastogênese. A OPG bloqueia a interação RANK/RANKL, agindo como receptor inibitório para RANKL, impedindo o término da diferenciação osteoclástica e, dessa forma, diminuindo a reabsorção óssea (HOFBAUER, 2006; BAUD'HUIN et al., 2007). O TRAP, presente nos osteoclastos, é considerado um marcador bioquímico da reabsorção óssea (ERIKSEN, 2010). No presente estudo não foi encontrado diferença significativa para a OPG, RANK e TRAP. Portanto, podemos concluir que o observado aumento no metabolismo ósseo dos ratos treinados ocorreu apesar dessas proteínas manterem-se constantes.

6. Conclusão

Concluiu-se neste trabalho que os ratos treinados tiveram aumento na reparação óssea, que é apoiado pelas nossas descobertas por meio do aumento da DMO, CMO, neoformação óssea, colágeno tipo I e expressão de osteocalcina. A administração sistêmica de LPS em uma única dose não causou qualquer alteração nesses parâmetros. Portanto, sugerimos que o efeito benéfico do exercício físico sobre o metabolismo ósseo não é afetado pela inflamação sistêmica aguda. Portanto, nossos resultados suportam parcialmente nossa hipótese, uma vez que, de fato observamos efeito benéfico do exercício físico na reparação óssea, mas o LPS não conseguiu agravar essa condição.

Referências

AARDEN, E. M; BURGER, E. H; NILJWEIDE, P. J. Function of osteocytes in bone. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 55, n. 3, p. 287-99, 1994.

AERSSSENS, J.; VAN AUDEKERCKE, R.; GEUSENS, P.; SCHOT, L. P.; OSMAN, A. A.; DEQUEKER, J. Mechanical properties, bone mineral content, and bone composition (collagen, osteocalcin, IGF-I) of the rat femur: influence of ovariectomy and nandrolone decanoate (anabolic steroid) treatment. **Calcified Tissue International**, v. 53, n. 4, p. 269-77, 1993.

AIRES, M. M. **Fisiologia**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

AKIRA, S.; TAGA, T.; KISHIMOTO, T. Interleukin-6 in biology and medicine. **Advances in Immunology**, v. 54, p. 1-78, 1993.

AL-AQL, Z. S.; ALAGL, A. S.; GRAVES, D. T.; GERSTENFELD, L. C.; EINHORN, T. A. Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction. **Journal of Dental Research**, v. 87, n. 2, p. 107-18, 2008.

ANDRADE, A. D.; MARINHO, C. F.; BARCELOS, M.; ZORZAL, M. B.; CONZ, M. B.; VIDIGAL, G. M. Jr. Biologia óssea: uma revisão da literatura. **Revista ImplantNews**, v. 4, n. 6, p. 659-662, 2007.

ARANA-CHAVES, V. E.; BRADASCHIA-CORREA, V. Clastic cells: mineralized tissue resorption in health and disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 41, n. 3, p. 446-50, 2009.

ARANHA, Marcelo Alves. **Avaliação quantitativa das fibras colágenas tipo I e tipo III, do tecido uretral de ratas submetidas à simulação de trabalho de parto e ooforectomia: estudo estereológico**. 2009. 62f. Tese (Mestre em cirurgia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

BALGA, R.; WETTERWALD, A.; PORTENIER, J.; DOLDE, S.; MUELLER, C.; HOSFSTETTER, W. Tumor necrosis factor-alpha: alternative role as an inhibitor of osteoclast formation in vitro. **Bone**, v. 39, n. 2, p 325-35, 2006.

BANDOW, K.; MAEDA, A.; KAKIMOTO, K.; KUSUYAMA, J.; SAMOTO, M.; OHNISHI, T.; MATSUGUCHI, T. Molecular mechanisms of the inhibitory effect of lipopolysaccharide (LPS) on osteoblast differentiation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 26, n. 4, p. 755-61, 2010.

BAUD'HUIN, M.; LAMOUREUX, F.; DUPLOMB, L.; RÉDINI, F.; HEYMANN, D. RANKL, RANK, osteoprotegerin: key partners of osteoimmunology and vascular diseases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, n. 18, p. 2334-50, 2007.

BEAUDREUIL, J. Nonpharmacological treatments for osteoporosis. **Annales de Réadaptation et de Médecine Physique**, v. 49, n. 8, p.581-8, 2006.

BENNEL K. L.; KHAN K. M.; WARMINGTON, S.; FORWOOD, M. R, COLEMAN, B. D.; BENNETT, M. B.; WAR J. D. Age does not influence the bone response to treadmill exercise in female rats. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 34, n. 12, p. 1958–65, 2002.

BERGMANN, P.; BODY, J. J.; BOONEN, S.; BOUSEN, Y.; DEVOGELAER, J. P.; GOEMARE, S.; KUFMAN, J.; REGINSTER, J. Y, ROZENBERG, S. Loading and skeletal development and maintenance. **Journal of Osteoporosis**, v. 20, p. 1-15, 2010.

BILEZIKIAN, J. P.; RAISZ, L. G, MARTIN, T. J. **Principles of Bone Biology**. 3^aed., USA: Elsevier, 2008.

BLATTEIS, C. M.; SEHIC, E. Fever: how may circulating pyrogens signal the brain? **News in Physiological Sciences**, v. 12, n. 1, p. 1-9, 1997.

BOPPART, M. D.; KIMMEL, D. B.; YEE, J. A.; CULLEN, D. M. Time course of osteoblast appearance after in vivo mechanical loading. **Bone**, v. 23, n.5, p. 409-15, 1998.

BORER, K. T. Physical activity in the prevention and melioration of osteoporosis in women: interaction of mechanical, hormonal and dietary factors. **Sports Medicine**, v. 35, n. 9, p. 779-830, 2005.

BURGUER, E. H, KLEIN-NULEND, J.; VAN DER PLAS, A.; NIJWEIDE, P. J. Function of osteocytes in bone: their role in mechanotransduction. *Journal of Nutrition*, v. 125, p. 2020S-23S, 1995.

BURR, D. B.; ROBLING, A. G.; TURNER, C. H. Effects of biomechanical stress on bones in animals. **Bone**, v. 30, p. 781–86, 2002.

CADORE, E. L.; BRENTANO, M. A.; KRUEL, L. F. M. Effects of the physical activity on the bone mineral density and bone remodeling. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 11, n. 6, p. 373-79, 2005.

CANHÃO, H.; FONSECA, J. E.; QUEIROZ, M. V. Diagnosis and treatment of osteoporosis in childhood. **Acta Médica Portuguesa**, v. 17, n.5, p. 385-90, 2004.

CARANO, R. A. D.; FILVAROFF, E. H. Angiogenesis and bone repair. **Drug Discovery Today**, v. 8, n. 21, p. 980-9, 2003.

CARDEMIL, C.; ELGALI, I.; XIA, W.; EMANUELSSON, L.;NORLINDH, B.; OMAR O., THOMSEN, P. Strontium-doped calcium phosphate and hydroxyapatite granules promote different inflammatory and bone remodeling responses in normal and ovariectomised rats. **PLoS One**, v.8, n.12, p. 1-11, 2013.

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 reticular cartilage in ovariectomized rats. **BMS Musculoskeletal Disorders**, v. 20, n. 11, p. 185-91, 2010.

CHIANG, C. Y.; KYRITSIS, G.; GRAVES, D.T.; AMAR, S. Interleukin-1 and tumor necrosis factor activities partially account for calvarial bone resorption induced by local injection of lipopolysaccharide. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 6, p. 4231-6, 1999.

CHO T. J.; GERSTENFELD, L. C.; EINHORN, T. A. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 17, n. 3, p. 513-20, 2002.

CHO, H. H.; KYOUNG, K. M.; SEOEO, M. J.; KIM, Y. J.; BAE, Y. C.; Jung JS. Overexpression of XCR4 increases migration and proliferation of human adipose tissue cells. **Stem Cells and Development**, v. 15, n. 6, p. 853-64, 2006.

COOPER, C.; WESTLAKE, S.; HARVEY, N.; JAVAID, K.; DENNISON, E.; HANSON, M. Review: developmental origins of osteoporotic fracture. **Osteoporosis International**, v. 17, n. 3, p. 337-47, 2006.

DAMOULIS, P. D.; HAUSCHKA, P. V. Cytokines induce nitric oxide production in mouse osteoblasts. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 201, n. 2, p. 924-31, 1994.

EINHORN, T. A. The science of fracture healing. **Journal of Orthopaedic Trauma**, v. 19, n. 10, p. S4-6, 2005.

ERIKSEN, E. F. Cellular mechanisms of bone remodeling. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 11, n. 4, p. 219-27, 2010.

FELSENBER, D.; GOWIN, W. Bone densitometry: applications in sports-medicine. **European Journal of Radiology**, v. 28, n. 2, p. 150-4, 1998.

FERGUSON, C.; ALPERN, E.; MICLAU, T.; HELMS, J. A. Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation? **Mechanisms of Development**, v. 87, n. 1-2, p. 57-66, 1999.

FERNÁNDEZ-TRESGUERRES-HERMÁNDEZ-GIL, I.; ALOBERA-GRACIA, M. A.; DEL-CANTO-PINGRRÓN, M.; BLANCO-JEREZ, L. Physiological bases of bone

regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. **Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugía Bucal**, v. 11, n. 1, p. E47-51, 2006.

FERREIRA, J. C. B.; ROLIM, N. P. L.; BARTHOLOMEU, J. B.; GOBATTO, C. A.; KOKUBUM, E.; BRUM, P. C. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 34, n. 8, p. 760-5, 2007.

FILVAROFF, E. H. VEGF and bone. **Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions**, v. 3, n. 4, p. 304-7, 2003.

FREITAS, I. G. F.; BARANAUSKA, V.; CRUZ-HOFLING, M. A. Laser effects on osteogenesis. **Applied Surface Science**, v. 154-155, p. 548-54, 2000.

GERSTENFELD, L. C.; CULLINANE, D. M.; BARNES, G. L.; GRAVES, D. T.; EINHORN, T. A. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 88, n. 5, p. 873-84, 2003a.

GERSTENFELD, L. C.; CHO T. J.; KON, T.; AIZAWA, T.; TSAY, A.; FITCH, J.; BARNES, G. L.; GRAVES D. T.; EINHORN T. A. Impaired fracture healing in the absence of TNF-alpha signaling: the role of TNF-alpha in endochondral cartilage resorption. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 18, n. 9, p. 1584-92, 2003b.

GUADALUPE-GRAU, A.; FUENTES, T.; GUERRA, B.; CALBET, A. L. Exercise and bone mass in adults. **Sports Medicine**, v. 39, n. 6, p. 439-68, 2009.

GUSTAVSSON, A.; THORSEN, K.; NORDSTROM, P. A 3-year longitudinal study of the effect of physical activity on the accrual of bone mineral density in healthy adolescent males. **Calcified Tissue International**, v. 73, n. 2, p. 108-14, 2003.

HADJIDKIS, D. J.; ANDROULAKIS, I. I. Bone remodeling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1092, p. 385-96, 2006.

HAGIHARA, Y.; FUKUDA, S.; GOTO, S.; IIDA, H.; YAMAZAKI, M.; MORIYA, H. How many days per week should rats undergo running exercise to increase BMD? **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 23, n. 4, p. 289-94, 2005.

HANAHAWA, S.; AMANO, S.; NAKADA, K.; OHMORI, Y.; MIYOSHY, T.; HIROSE, K.; KITANO, S. Biological characterization of interleukin-1-like cytokine produced by cultured bone cells from newborn mouse calvaria. **Calcified Tissue International**, v. 41, n. 1, p. 31-7, 1987.

HART, K. J.; SHAW, J. M.; VAJDA, E.; HEGSTED, M.; MILLER, S. C. Swim-trained rats have greater bone mass, density, strength, and dynamics. **Journal of Applied Physiology**, v. 91, n. 4, p. 1663-8, 2001.

HAUSMANN, E.; RAISZ, L. G.; MILLER, W. A. Endotoxin: stimulation of bone resorption in tissue culture. **Science**, v. 168, n. 3933, p. 862-4, 1970.

HIND, K.; BURROWS, M. Weight-bearing exercise and bone mineral accrual in children and adolescents: a review of controlled trials. **Bone**, v. 40, n.1, p. 14-27, 2007.

HOFBAUER LC. Pathophysiology of RANK ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG). **Annals d` Endocrinologie**, v.67, n.2, p. 139-41, 2006.

HOLY, X.; ZÉRATH, E. Bone mass increases in less than 4 wk of voluntary exercise in growing rats. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 32, n. 9, p. 1562-9, 2000.

HONDA, A., SOGO, N.; NAGASAAWA, S.; KATO, T.; UMEMURA, T. Bones benefits gained by jump training are preserved after detraining in young and adult rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 105, n.3, p. 849-53, 2008.

HOROWITZ, M. C.; COLEMAN, D. L.; RYABY, J. T.; EINHORN, T. A. Osteotropic agents induce the differential secretion of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by the osteoblast cell line MC3T3-E1. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 4, n. 6, p. 911-21, 1989.

HUANG, T. H.; YANG, R. S.; HSIEH, S. S.; LIU, S. H. Effects of caffeine and exercise on the development of bone: a densitometric and histomorphometric study in young Wistar rats. **Bone**, v. 30, n. 1, p. 293-9, 2002.

HUANG, T. H.; LIN, S. C.; CHANG, F. L.; HSIEH, S. S.; LIU, S. H, YANG, R. S. Effects of different exercise modes on mineralization, structure, and biomechanical properties of growing bone. **Journal of Applied Physiology**, v. 95, n. 1, p. 300-7, 2003.

HUANG, T. H.; CHANG, F. L.; LIN, S. C.; LIU, S. H.; HSIEH, S. S, YANG, R. S. Endurance treadmill running training benefits the biomaterial quality of bone in growing male Wistar rats. **Journal of Bone Mineral Metabolism**, v.26, n. 4, p. 350-7, 2008.

ISAKSSON, H.; TOLVANEN, V.; FINNILÄ, M. A.; IIVARINEN, J.; TUUKKANEN, J.; SEPPÄNEN, K.; AROKOSKI, J. P.; BRAMA, P. A.; JURVELIN, J. S.; HELMINEN, H. J. Physical exercise improves properties of bone and its collagen network in growing and maturing mice. **Calcified Tissue International**, v. 85, n. 3, p. 247-56, 2009.

ISHIMI, Y.; MIYAURA, C.; JIN, C. H.; AKATSU, T.; ABE, E.; NAKAMURA, Y.; YAMAGUCHI, A.; YOSHIKI, S.; MTSUDA, T.; HIRANO, T. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. **The Journal of Immunology**, v. 145, n. 10, p. 3297-303, 1990.

IWAMOTO, J.; TAKEDA, T.; ICHIMURA, S. Effects of exercise on bone mineral density in mature osteopenic rats. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 13, n. 8, p. 1308-17, 1998.

IWAMOTO, J.; YEH, J. K.; ALOIA, J. F. Differential effect of treadmill exercise on three cancellous bone sites in the young growing rat. **Bone**, v. 24, n. 3, p. 163–9, 1999.

IWAMOTO, J.; YEH, J. K.; ALOIA, J. F. Effect of deconditioning on cortical and cancellous bone growth in the exercise trained young rats. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 15, n. 9, p. 1842-9, 2000.

IWAMOTO, J.; SHIMAMURA, C.; TAKEDA, T.; ABE, H.; ICHIMURA, S.; SATO, Y.; TOYAMA, Y. Effects of treadmill exercise on bone mass, bone metabolism, and calciotropic hormones in young growing rats. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 22, n.1, p. 26–31, 2004.

IWAMOTO, J.; TAKEDA, T.; SATO, Y. Effect of treadmill exercise on bone mass in female rats. **Experimental Animals**, v. 54, n. 1, p. 1-6, 2005.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KARSENT, G.; WAGNER, E.F. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. **Developmental Cell**, v.2, n.4, p. 389-406, 2002.

KATCHBURIAN E. ARANA V. **Histologia e Embriologia Oral**. 2ª edição. Guanabara Koogan, 2004.

KATONO, T.; KAWATO, T.; TANABE, N.; TANAKAB, H.; SUZUKI, N.; KITAMI, S.; MORITA, T.; MOTOHASHI, M.; MENO, M.. Effects of nicotine and lipopolysaccharide on the expression of matrix metalloproteinases, plasminogen 48 activators, and their inhibitors in human osteoblasts. **Archives of Oral Biology**, v. 54, n. 2, p. 146-55, 2009.

KAYSER, B. D.; GODFREY, J. K, CUNNIGHAM, R. M.; PIERCE, R. A, JAQUE, S. V.; SUMIDA, K. D. Equal BMD after daily or triweekly exercise in growing rats. **International Journal of Sports Medicine**, v. 31, n. 1, p. 44-50, 2010.

KEETING, PE.; RIFAS, L.; HARRIS, S. A.; COLVARD, D. S.; SPELBERG, T. C.; PECK, W. A.; RIGGS, B. L. Evidence for interleukin-1 beta production by cultured normal human osteoblast-like cells. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 6, n. 8, p. 827-33, 1991.

KLENKE, F. M.; LIU, Y.; YUAN, H.; HUNZIKER, E. B.; SIEBENROCK, K. A.; HOFSTETTER, W. Impact of pore size on the vascularization and osseointegration of ceramic bone substitutes in vivo. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 85, n. 3, p. 777-86, 2008.

KLUGER, M. J. Fever: role of pyrogens and cryogens. **Physiological Reviews**, v. 71, n. 1, p. 93-127, 1991.

KON, T.; CHO, T. J.; AIZAWA, T.; YAMAZAKI, M.; NOOH, N.; GRAVES, D.; GERSTENFELD, L.C.; EINHORN, T. A. Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 16, n. 6, p. 1004-14, 2001.

KWIATKOSKI, M.; SORIANO, R. N.; ARAUJO, R. M.; AZEVEDO, L. U.; BATALHAO, M. E., FRANCESCATO, H. D.; COIMBRA, T. M.; CARNIO, E. C.; BRANCO, L. G. Hydrogen sulfide inhibits preoptic prostaglandin E2 production during endotoxemia. **Experimental Neurology**, v. 240, p. 88-95, 2013.

LEE, S. K.; LORENZO, J. Cytokines regulating osteoclast formation and function. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 18, n. 4, p. 411-8, 2006.

LEGEROS, R. Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 395, p. 81-98, 2002.

LIND, M.; BUNGER, C. Factors stimulating bone formation. *European Spine Journal*, v. 10, n. Suppl 2, p. S102-9, 2001.

LITTLEWOOD, A. J.; RUSSEL, J.; HARVEY, G. R.; HUGHES, D. E.; RUSSEL, R. G.; GOWEN, M. The modulation of the expression of IL-6 and its receptor in human osteoblasts in vitro. **Endocrinology**, v. 129, n. 3, p. 1513-20, 1991.

LIU, E.; LEWIA, K.; AL-SAFFAR, H.; KRALL, C. M.; SINGH, A.; KULCHITSKY, V. A.; CORRIGAN J. J.; SIMONS, C. T.; PETERSEN, S.R.; MUSTEATA, F. M.; BAKSHI, C. S.; ROMANOVSKY, A. A.; SELLATI, T. J.; STEINER, A. A. Naturally occurring hypothermia is more advantageous than fever in severe forms of lipopolysaccharide and escherichia coli-induced systemic inflammation. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 302, n. 12, p. R1372-83, 2012.

LUU, Y. K.; PESSIN, J. E.; JUDEX, S.; RUBIN, J.; RUBIN, C. T. Mechanical signals as a non-invasive means to influence mesenchymal stem cell fate, promoting bone and suppressing the fat phenotype. **BoneKey Osteovision**, v. 6, n. 4, p. 132–149, 2009.

MATHEY, J.; HORCAJADA-MOLTENI M. N.; CHANTERANNE, B.; PICHERIT, C.; PUEL, C.; LUBECQUE, P.; CUBIZOLES, C.; DAVICCO, M. J.; COXAM, V.; BARTLET, J. P. Bone mass in obese diabetic Zucker rats: Influence of treadmill training running. **Calcified Tissue International**, v. 70, n. 4, p. 305-11, 2002.

MURUGAN, R.; RAMAKRISHNA, S. Development of nanocomposites for bone grafting. **Composites Science and Technology**, v. 65, n. 15, p. 2385-2406, 2005.

NAIR, S.P.; MEGUII, S.; WILSON, M.; REDDI, K.; WHITE, P.; HENDERSON, B. Bacterially induced bone destruction: mechanisms and misconceptions. **Infect and Immunity**, v. 64, n. 7, p. 2371-80, 1996.

NOTOMI, T.; LEE, S. J.; OKIMOTO, N.; OKAZAKI, Y.; TAKAMOTO, T.; NAKAMURA, T.; SUZUKI, M. Effects of resistance exercise training on mass, strength, and turnover of bone in growing rats. **European Journal of Applied Physiology**, v. 82, n. 4, p. 268-74, 2000.

OOI, F. K.; SINGH, R.; SINGH, H. J. Changes in bone turnover markers and bone mass with reducing levels of jumping exercise regimens in female rats. **Asian Journal of Sports Medicine**, v. 3, n. 4, p. 225-32, 2012.

OWEN, T.; ARONOW, M.; SHALHOUB, V.; BRONE, L. M.; WILMING, L.; TASSINARI, M. S.; KENNEDY, M. B.; POCKWINSE, S.; LIAN, J. B.; STEIN, G. S. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. **Journal of Cellular Physiology**, v. 143, n. 3, p. 420-30, 1990.

PENG, Z.; TUUKKANEN, J.; VÄÄNÄNEN, H. K. Exercise can provide protection against bone loss and prevent the decrease in mechanical strength of femoral neck in ovariectomized rats. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 9, n. 10, p. 1559-64, 1994.

PEREIRA, L. M.; VIANNA, G. M.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Morphology and stereology of the myocardium in hypertensive rats. Correlation with the time of nitric oxide synthesis inhibition. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 70, n. 6, p. 397-402, 1998.

PETERSON, L. J.; ELLIS, E.; HUPP, Jr.; TUCKER, M. R. **Cirurgia Oral e Maxilofacial Contemporânea**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

PUUSTJARVI, K.; NIEMINEN, J.; RASANEN, T.; HYTTINEN, M.; HELMINEN, H. J.; KRÖGER, H.; HUUSKONEN, J.; ALHAVA, E.; KOVANEN, V. Do more highly organized collagen fibrils increase bone mechanical strength in loss of mineral density after one-year running training? **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 14, n. 3, p. 321-9, 1999.

RAAB, D.; SMITH, E. L.; CRENSHAW, T. D.; THOMAS, D. P. Bone mechanical properties after exercise training in young and old rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 68, n. 1, p. 130-4, 1990.

RENNO, A. C. M.; FÁVARO-PÍPI, E.; FERNANDES, K.; TIM, C.; RIBEIRO, D. A. Ultrasound therapy modulates osteocalcin expression during bone repair in rats. **Ultrasonics**, v. 52, n. 1, p. 111-6, 2012.

RIETSCHEL, E. T.; BRADE, H. Bacterial endotoxins. **Scientific American**, v. 267, n. 5, p. 54-61, 1992.

ROBLING, A. G.; CASTILLO, A. B.; TURNER, C. H. Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 8, p. 455-98, 2006.

ROMANOVSKY, A. A.; ALMEIDA, M. C.; ARONOFF, D. M.; IVANOV, A. I.; KONSMAN, J. P.; STEINER, A. A.; TUREK, V. F. Fever and hypothermia in systemic inflammation: recent discoveries and revisions. **Frontiers in Bioscience**, v. 1, n. 10, p. 2193-216, 2005.

SCHLAUBITZ, S.; DERKAoui, S. M.; MAROS, L.; MIRAUX, S.; RENARD, M.; CATROS, S.; LE VISAGE, C.; LETOURNEUR, D.; AMÉDÉE, J.; FRICAIN, J. C. Pullulan/dextran/nHA macroporous composite beads for bone repair in a femoral condyle defect in rats. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. 1-17, 2014.

SCOTT, A.; KHAN, K. M.; DURONIO, V.; HART, D. A. Mechanotransduction in human bone in vitro cellular physiology that underpins bone changes with exercise. **Sports Medicine**, v. 38, n. 2, p. 139-60, 2008.

SFEIR C.; HO, L.; DOLL, B. A.; AZARI, K.; HOLLINGER, J. O. **Fracture repair**. In: LIEBERMAN, J. R.; FRIEDLAENDER, G. E. **Bone regeneration and repair**. Humana Press: Totowa, NJ: pp. 21–44, 2005.

SHIGUEMOTO, G. E.; PRESTES, J.; LEITE, R. D.; PEREIRA, G. B.; PONTES, C. L.; D'AVILA, F. V.; BOTERO, J. P.; BALDISSERA, V.; NONAKA, K. O.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S.; PEREZ, S. E. Effects of resistance training on matrix metalloproteinase-2 activity and biomechanical and physical properties of bone in

ovariectomized and intact rats. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 22, n. 5, p. 607-17, 2012.

SHIMAMURA, C.; IWAMOTO, J.; TAKEDA, T.; ICHIMURA, S.; ABE, H.; TOYAMA, Y. Effect of decreased physical activity on bone mass in exercise-trained young rats. **Journal of Orthopaedic Science**, v. 7, n. 3, p. 358-63, 2002.

STEINER, A. A.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; McCANN, S. M.; BRANCO, L. G. S. Antipyretic role of the NO-cGMP pathway in the anteroventral preoptic region of the rat brain. **American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 282, n. 2, p. R584-93, 2002.

STEINER, A. A.; IVANOV, A. I.; SERRATS, J.; HOSOKAWA, H.; PHAYRE, A. N.; ROBBINS, J. R.; ROBERTS, J. L.; KOBAYASHI, S.; MATSUMURA, K.; SAWCHENKO, P. E.; ROMANOVSKY, A. A. Cellular and molecular bases of the initiation of fever. **PLOS Biology**, v. 4, n. 9, p. 1517-24, 2006.

TEZVAL, M.; BIBLIS, M.; SEHMISCH, S.; SCHMELZ, U.; KOLIOS, L.; RACK, T.; STUERMER, K. M.; STUERMER, E. K. Improvement of femoral bone quality after low-magnitude, high-frequency mechanical stimulation in the ovariectomized rat as an osteopenia model. **Calcified Tissue International**, v. 88, n. 1, p. 33-40, 2011.

TILG, H.; DINARELLO, C. A.; MIER, J. W. IL-6 and APPs: anti-inflammatory and immunosuppressive mediators. **Immunology Today**, v. 18, n. 9, p. 428-32, 1997.

TUREK, S. L. **Ortopedia: princípios e sua aplicação**. 4ª ed., São Paulo: Manole, p. 250-257, 1991.

TURNER, C. H. Homeostatic control of bone structure: an application of feedback theory. **Bone**, v. 12, n. 3, p. 203-17, 1991.

TURNER, C. H.; ROBLING, A. G. Designing exercise regimens to increase bone strength. **Exercise and Sport Sciences Reviews**, v. 31, n. 1, p. 45-50, 2003.

UMEMURA, Y.; ISHIKO, T.; YAMAUCHI, T.; KURONO, M.; MASHIKO, S. Five jumps per day increase bone mass and breaking force in rats. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 12, n. 9, p. 1480-5, 1997.

VARGAS, D. M.; AUDI, L.; CARRASCOSA, A. Peptídeos derivados do colágeno: novos marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 4, p. 367-70, 1997.

WARD, K.; ALSOP, C.; CAULTON, J.; RUBIN, C.; ADAMS, J.; MUGHAL, Z. Low magnitude mechanical loading is osteogenic in children with disabling conditions. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 19, n. 3, p. 360-9, 2004.

WARNER, S. E.; SHEA, J. E.; MILLER, S. C.; SHAW, J. M. Adaptations in cortical and trabecular bone in response to mechanical loading with and without weight bearing. **Calcified Tissue International**, v. 79, n. 6, p. 395-403, 2006.

WOLFF, I.; VAN CROONENBORG, J. J.; KEMPER, H. C.; KOSTENSE, P. J.; TWISK, J. W. The effect of exercise training programs on bone mass: a meta-analysis of published controlled trials in pre- and postmenopausal women. **Osteoporosis International**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 1999.

WU, J.; WANG, X. X.; HIGUCHI, M.; YAMADA, K.; ISHIMI, Y. High bone mass gained by exercise in growing male mice is increased by subsequent reduced exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 97, p. 806-10, 2004.

YANG, X.; RICCIARDI, B. F.; HERNANDEZ-SORIA, A.; SHI, Y.; CAMACHO, N. P.; BOSTROM, M. P. Callus mineralization and maturation are delayed during fracture healing in interleukin-6 knockout mice. **Bone**, v. 41, n. 6, p. 928-36, 2007.

YOKOTA, H.; TANAKA, S. M. Osteogenic potentials with joint-loading modality. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 23, n. 4, p. 302-8, 2005.

Apêndice

Tabela 1. Valores individuais do peso corporal (g) dos animais no início e final do experimento.

	SED SAL		SED LPS		EX SAL		EX LPS	
	Início	Final	Início	Final	Início	Final	Início	Final
1	143	470	145	425	146	300	145	334
2	148	475	148	495	150	365	147	365
3	150	415	147	445	140	325	150	325
4	149	435	144	400	142	380	142	375
5	149	435	149	475	149	336	150	354
6	145	440	150	435	147	310	149	330
7	148	455			148	310		
8					150	312		
Média	147,429	446,429	147,167	445,833	146,500	329,750	147,167	347,167
EPM	0,948	8,071	0,946	14,049	1,309	10,185	1,302	8,364

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Comissão de Ética em Experimentação Animal

3602-3301

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 158/2012, sobre o projeto intitulado "*Efeito do exercício físico sobre a ação do LPS no reparo ósseo em ratos.*", sob a responsabilidade do **Professor Doutor João Paulo Mardegan Issa** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 25 de fevereiro de 2013.

We certify that the protocol nº 158/2012, entitled "*Effect of physical exercise on the action of LPS on bone healing in rats*", is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the School of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo in 02/25/2013.

Ribeirão Preto, 25 de fevereiro de 2013.

Prof. Dr. Omêro Benedicto Poli-Neto
*Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal FMRP-USP*