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

ANA PAULA MACEDO

**Efeitos do treinamento físico nas propriedades físicas de ossos de
ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica**

Ribeirão Preto

2014

ANA PAULA MACEDO

**Efeitos do treinamento físico nas propriedades físicas de ossos de
ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica**

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

Orientador: Prof. Dr. Antônio
Carlos Shimano

Versão Corrigida
(Versão original encontra-se disponível na secretaria de Pós-graduação em Ciências
da Saúde Aplicadas ao Aparelho Locomotor)

Ribeirão Preto

2014

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

Macedo, Ana Paula

Efeitos do treinamento físico nas propriedades físicas de ossos de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica. Ribeirão Preto, 2014.

165 p.: il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

Orientador: Shimano, Antônio Carlos.

1. Ovariectomia. 2. Dieta hiperlipídica. 3. Osteoporose. 4. Ganho de peso. 5. Densidade mineral óssea. 6. Exercício físico.

Nome: MACEDO, Ana Paula

Título: Efeitos do treinamento físico nas propriedades físicas de ossos de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica

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

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

A **Deus**, pela força me dada em todas as
dificuldades encontradas, por não me
proporcionar nada além do que eu era
capaz de fazer

Ao meu marido **Marcelo**, pelo apoio
incondicional, por acreditar e compartilhar os
meus sonhos

Aos meus Pais **Jamil** e **Gracy**, pelo
exemplo de retidão e honestidade, pelos
limites ensinados, obrigado por me
tornarem o que sou hoje

A minha irmã **Vanessa** (in memoriam), minha
querida Daminha, de quem sinto muita
saudades e me faz tanta falta

A minha irmã **Claudia**, por sua coragem
em momentos difíceis e pelo apoio em todas
as minhas escolhas

Agradecimento Especial

Ao meu orientador, *Prof. Dr. Antônio Carlos Shimano*, por
ter me acolhido e acreditado na minha capacidade. Tenho em
você um exemplo de como incentivar o ser humano em todas as
suas qualidades, cultivando a criatividade.

Agradecimientos

Agradeço a todas as pessoas que de modo direto ou indireto participaram na realização deste trabalho.

Ao professor Alceu Afonso Jordão Junior, pelo conhecimento compartilhado que viabilizou o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores João Paulo Mardegan Issa e Mamie Mizusaki Iyomasa, pelos ensinamentos durante as análises histológicas.

Ao Prof. Dr. José Batista Volpon, por permitir o acesso ao Laboratório de Bioengenharia.

Ao Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

Aos amigos do Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto Carlos Alberto Moro, Francisco Carlos Mazzocato, Luís Henrique Alves Pereira, Maria Teresinha de Moraes e Reginaldo Trevilato da Silva por toda a ajuda e pelo convívio agradável.

À secretária da pós-graduação Rita de Cássia Stela Cossalter por todo carinho e atenção.

Aos amigos Débora Taffarel Ferrari, Heloísa Ferreira Spagnoli, Jorge Caolo Imori Júnior e Roberta Carminati Shimano companheiros nas dificuldades e sucessos durante a execução deste trabalho.

Aos colegas de pós-graduação Adriana Valadares da Silva, Aline Goulart de Paiva, Ariane Zamarioli, Bruno Cimatti, Ana Carolina Sanches Félix, Gabriela Rezende Yanagihara, Hildemberg Agostinho Rocha de Santiago, João Henrique Dutra Blanco, Karina Delgado Maida, Maria Júlia Escanhoela Paulo, Mariana Avelino dos Santos, Matheus Machado Gomes, Maurício José Falcai, Patrícia Silva, Rodrigo Andraus, Rodrigo Okubo, Sabrina Graziani Veloso Dutra, Thiago Augusto Rochetti Bezerra e Vitor Aparecido Castania pela amizade e agradável convivência durante o curso.

Às alunas de iniciação científica, Adriely Bittencourt Morgenstern, Mariana Maloste Butezloff, Patrícia Albuquerque Moura e Taiane Paliologo sempre solícitas e dedicadas.

Aos alunos do curso de nutrição Priscila Nogueira Bezan e Héric Holland.

Aos professores e funcionários do Departamento de Matérias Dentárias de Prótese da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP, em especial aos professores Dr. Osvaldo Luiz Bezzon, Dra. Helena de Freitas Oliveira Paranhos e Dra. Claudia Helena Lovato da Silva pelo incentivo a este trabalho.

À professora Dra. Maria da Glória Chiarello de Mattos, pelo incentivo e amizade em todo o meu desenvolvimento como pesquisadora, a final de contas "se alguém foi capaz de fazer, você também é".

Ao amigo querido Luiz Sérgio Soares pela amizade e apoio incondicionais.

Às amigas Junia Ramos, Regiane de Cássia Tirado Damasceno, Renata Cristina Silveira Rodrigues Ferracioli e Adriana Cláudia Lapria Faria, por tudo que

representam em minha vida, afinal de contas, amigos são a família que escolhemos.

À minha nova "irmã" Viviane de Cássia Oliveira, que ouviu todos os meus desabafos, me apoiando em momentos difíceis.

Ao meu cunhado Leandro e a minha cunhada Sônia, pelos momentos de descontração e apoio.

Ao professor Dr. Ricardo Faria Ribeiro, pela solicitude que permitiu o desenvolvimento de parte deste trabalho.

A Prof. Dra. Marisa Semprini, pelo incentivo e oportunidade no ingresso na pós-graduação.

Ao professor Osvaldo de Freitas por disponibilizar os equipamentos utilizados no preparo da ração.

Aos funcionários do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ronaldo de Araújo e Reinaldo Fernando Batista, pela solicitude a que me atenderam.

Ao professor Dr. Francisco José e às técnicas Marta e Rita de Cássia, do Laboratório de Endocrinologia de Metabolismo da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Ao professor Dr. Celso Rodrigues Franci e aos técnicos Mariana Holanda e Rogério Rosário de Azevedo do Laboratório de Neuroendocrinologia.

Aos amigos do laboratório da Morfologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP, Bruna Gabriela dos Santos Kotake, Daniela Mizusaki Iyomasa, Miliane Gonçalves Gonzaga, Nilce de Oliveira Wolga, Ricardo Alexandre Junqueira Calzzani, Rodrigo Alberto Restrepo Fernandez e Yamba Carla Lara Pereira, pela solicitude e agradável convívio.

Aos funcionários do Laboratório de Dosagem de Metais do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, Tânia Maria Beltramini Trevilato e Marcos Paulo Souza Muniz, e às alunas Aline Faccioli Bodoni e Camila Ruy.

"Temos que nos tornar a mudança que queremos ver"
Mahatma Gandhi

RESUMO

MACEDO, A. P. **Efeitos do treinamento físico nas propriedades físicas de ossos de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica.** 2014. 165 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

A nutrição e o treinamento físico adequado têm papel importante no acúmulo e manutenção de massa óssea e têm se mostrado duas ferramentas importantes para a prevenção de fraturas em pessoas com osteoporose. A ingestão de lipídio acima do recomendado gera interferência na remodelação óssea, mas não há relatos sobre a ação da dieta hiperlipídica em osso após a menopausa. Com isso, o objetivo deste estudo foi avaliar, em ratas ovariectomizadas (OVX), os efeitos do treinamento físico associado à dieta hiperlipídica (DH) no peso, nos níveis de estresse oxidativo do fígado e nas propriedades ósseas. Foram utilizadas oitenta ratas *Wistar*, divididas em 8 grupos (n=10), tratadas por 12 semanas, que são: OVX, sedentárias e dieta padrão (DP); OVX, sedentárias e DH; OVX, treinadas e DP; OVX, treinadas e DH; SHAM, sedentário e DP; SHAM, sedentárias e DH; SHAM, treinadas e DP; SHAM, treinadas e DH. No momento da cirurgia e na eutanásia foi coletada amostra de sangue para análise do hormônio folículo-estimulante. Durante o experimento foi aferido o ganho de peso semanal. Após o procedimento experimental, foi avaliada a densidade mineral óssea (DMO) total e o percentual de gordura, em seguida à eutanásia dos animais, o fígado foi coletado para análise dos níveis de estresse oxidativo pela dosagem de glutathiona reduzida (GSH) e malondialdeído (MDA). As tíbias e fêmures foram dissecados, limpos das partes moles e analisados mecanicamente. Os dados foram analisados por teste estatístico em modelo linear generalizado ($p < 0,05$) e teste complementar de Bonferroni. A ovariectomia foi comprovada pelo aumento significativo ($p < 0,000$) dos níveis de hormônio folículo-estimulante nos animais OVX. Os animais dos grupos OVX ($p = 0,001$) e treinado ($p < 0,000$) apresentaram maior ganho de peso. Houve aumento de estresse oxidativo no fígado, com aumento nos níveis de MDA em animais treinados ($p = 0,021$) e com DH ($p = 0,020$), sem alteração nos níveis de GSH. Os animais do grupo OVX ($p < 0,000$) e DH ($p < 0,000$) tiveram aumento do percentual de gordura. Na

densitometria de corpo total e quantificação de área de osso trabecular (OT) da tíbia, foi observado diferença entre as cirurgias ($p < 0,000$) e treinados (DMO - $p < 0,000$ e OT - $p = 0,002$), com piores resultados para OVX e sedentários. A DMO da região medial da tíbia ($p = 0,019$) e da proximal do fêmur ($p = 0,002$) foi maior para treinados. A OVX diminuiu a DMO na proximal do fêmur ($p < 0,000$). Na análise da espessura do osso cortical, a região medial apresentou maior espessura nos grupos OVXs com DH ($p = 0,014$). No ensaio mecânico de alta velocidade, o ângulo de fratura foi maior para OVX ($p < 0,000$) e DH ($p = 0,031$) e o torque máximo para OVX ($p = 0,014$). No ensaio de flexo-compressão do fêmur, o treinamento aumentou a força máxima ($p = 0,037$) e OVX diminuiu a rigidez ($p = 0,000$). Portanto, conclui-se que a diferença entre os tipos de cirurgias foi evidente, e que o treinamento físico foi eficaz para melhora da qualidade óssea, já a dieta, apesar de ter influenciado os níveis de estresse oxidativo e o acúmulo de gordura, não foi fator determinante na qualidade óssea entre os grupos.

Palavras-chave: Ovariectomia. Dieta hiperlipídica. Osteoporose. Ganho de peso.
Densidade mineral óssea. Exercício físico.

ABSTRACT

MACEDO, A. P. **Effects of exercise on physical properties of bones from ovariectomized rats to high-fat diet.** 2014. 165 p. Thesis (Doctoral) – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Nutrition and appropriate physical training have important roles in the accumulation and maintenance of bone mass and as a tool for the prevention of fractures in osteoporosis. Fat intake over the recommended generates interference in bone remodeling, but there are no reports about the action of high fat diet on bone after menopause. Thus, the aim of this study was to evaluate, in ovariectomized rats (OVX), the effects of treadmill training associated with high fat diet (HFD) on weight and on bone properties. Eighty *Wistar* female rats, divided into 8 groups ($n = 10$), treated for 12 weeks: OVX, sedentary and control diet - CD; OVX, sedentary and HFD; OVX, trained and CD; OVX, trained and HFD; SHAM, sedentary and CD; SHAM, sedentary and HFD; SHAM, trained and CD; SHAM, trained and HFD. During surgery and euthanasia were collected blood samples for analysis of follicle-stimulating hormone. During the experiment was verified the weekly weight gain. After the experimental procedure it was evaluated the total BMD and percentage of body fat, then euthanasia of animals, the liver was collected for analysis of the levels of oxidative stress by measuring levels of reduced glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA). The tibia and femur were dissected, cleaned of soft tissue and analyzed mechanically. Data were analyzed by statistical tests in generalized linear model ($p < 0.05$) and Bonferroni post test. Ovariectomy was confirmed by a significant increase ($p < 0.000$) levels of follicle-stimulating hormone in OVX animals. The animals of the OVX group ($p = 0.001$) and trained ($p < 0.000$) showed greater weight gain. There was an increase of oxidative stress in the liver, with an increase in MDA levels in trained animals ($p = 0.021$) and in animals with DH ($p = 0.020$), without change in the levels of GSH. The animals of the OVX Group ($p < 0.000$) and DH ($p < 0.000$) had higher fat percentage. In total body densitometry and quantification of tibial trabecular bone area (TB), difference was observed between surgeries ($p < 0.000$) and trained (BMD - $p < 0.000$ and TB - $p = 0.002$), with the worst results for OVX and sedentary. The BMD of the medial tibia ($p = 0.019$) and proximal femur ($p = 0.002$) was higher in trained. The OVX decreased BMD at the proximal femur

($p < 0.000$). In the analysis of the thickness of cortical bone, the medial region showed the highest thickness in groups OVXs with DH ($p = 0.014$). In mechanical testing of high speed, the angle of fracture was greater for OVX ($p < 0.000$) and DH ($p = 0.031$) and the maximum torque to OVX ($p = 0.014$). In flexion-compression test of the femur, the training increased the maximum force ($p = 0.037$) and OVX decreased stiffness ($p = 0.000$). Therefore, the conclusions were that the difference between the types of surgeries was evident, and that physical training was effective in improving bone quality, as the diet, despite having influenced the levels of oxidative stress and the accumulation of fat, was not a factor determinant in bone quality between groups.

Keywords: Ovariectomy. High fat diet. Osteoporosis. Weight gain. Bone mineral density. Physical training.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Procedimento de Ovariectomia.....	70
Figura 2 – Indução ao sedentarismo.....	71
Figura 3 – Rótulo da dieta padrão com sua composição.....	73
Figura 4 – Animal anestesiado e posicionamento para avaliação da densitometria de corpo total e percentual de gordura	74
Figura 5 – Área de varredura para o exame de densitometria de corpo total.....	74
Figura 6 – Região de análise da área de osso trabecular neoformado.....	76
Figura 7 – Esquema das regiões de análise de espessura de osso cortical.....	76
Figura 8 – Região da tíbia em que foi avaliado o colágeno.....	77
Figura 9 – Tíbia direita dissecada.	77
Figura 10 – Análise de densidade mineral óssea na diáfise da tíbia.....	77
Figura 11 – Ensaio de torção por impacto em alta velocidade.....	78
Figura 12 – Sequência de Inclusão da tíbia em resina acrílica para realização do ensaio de torção.....	79
Figura 13 – Análise de densidade mineral óssea na região proximal do fêmur.....	80
Figura 14 – Inclusão do fêmur em resina acrílica para realização do ensaio de flexo-compressão	81
Figura 15 – Fêmur posicionado na máquina universal de ensaio para realização do ensaio de flexo-compressão	82
Figura 16 – Comparação dos níveis de FSH (ng/mL) antes da cirurgia e após 12 semanas de experimento.....	85
Figura 17 – Ganho de peso médio (g) x tempo (semanas) dos grupos experimentais.....	86
Figura 18 – Densidade mineral óssea de corpo total (g/cm ²)	87

Figura 19 – Percentual de gordura dos grupos experimentais antes da eutanásia.....	88
Figura 20 – Níveis de GSH ($\mu\text{mol/gP}$) ao final de 12 semanas de experimento	89
Figura 21 – Níveis de MDA ($\mu\text{mol/gP}$) ao final de 12 semanas de experimento.....	89
Figura 22 – Fotomicrografias de osso trabecular na região proximal da tíbia: A) OVXSP; B) OVXSH; C) OVXEP; D) OVXEH; E) SHAMSP; F) SHAMSH; G) SHAMEP e H) SHAMEH.....	91
Figura 23 – Osso trabecular ($\times 10^5 \mu\text{m}^2$) na região proximal da tíbia.....	92
Figura 24 – Espessura de osso cortical (μm) na região C1 da tíbia.....	93
Figura 25 – Espessura de osso cortical (μm) na região C2 da tíbia.....	93
Figura 26 – Espessura de osso cortical (μm) na região C3 da tíbia.....	94
Figura 27 – Fotomicrografia de colágeno total na região proximal da tíbia: A) OVXSP; B) OVXSH; C) OVXEP; D) OVXEH; E) SHAMSP; F) SHAMSH; G) SHAMEP e H) SHAMEH.....	95
Figura 28 – Área de colágeno ($\times 10^5 \mu\text{m}^2$) na região proximal da tíbia.....	96
Figura 29 – Densidade mineral óssea (g/cm^2) da região diáfise da tíbia.....	97
Figura 30 – Ângulo de fratura ($^\circ$) após torção da tíbia.....	98
Figura 31 – Torque máximo (N.cm) durante o ensaio de torção da tíbia.....	98
Figura 32 – Densidade mineral óssea (g/cm^2) da região proximal do fêmur.....	99
Figura 33 – Força máxima (N) no ensaio de flexo-compressão da cabeça do fêmur.....	100
Figura 34 – Rigidez (N/mm) no ensaio de flexo-compressão da cabeça do fêmur.....	101

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Grupos experimentais.....	68
Quadro 2 - Protocolo de treinamento físico	72

LISTA DE SIGLAS

FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE ABREVIATURAS

μCT	micro tomografia computadorizada
50x	aumento de cinquenta vezes
alt.	altura
C1	região proximal da diáfise da tíbia
C2	região medial da diáfise da tíbia
C3	região distal da diáfise da tíbia
comp.	comprimento
DXA	Dupla Emissão de Fonte de RaioX abreviação do inglês - <i>dual energy X-ray absorptiometry</i>
DH	Dieta Hiperlipídica
DMO	Densidade Mineral Óssea
DP	Dieta Padrão
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
Ep	Energia potencial
FSH	Hormônio folículo-estimulante
GSH	Glutathione reduzida
larg.	largura
MDA	Malondialdeído
OM	óleo de milho
OVX	cirurgia de ovariectomia
OVXSP	grupo experimental com cirurgia de ovariectomia, indução ao sedentarismo e dieta padrão de biotério
OVXSH	grupo experimental com cirurgia de ovariectomia, indução ao sedentarismo e dieta hiperlipídica
OVXEP	grupo experimental com cirurgia de ovariectomia, treinamento em esteira e dieta padrão de biotério
OVXEH	grupo experimental com cirurgia de ovariectomia, treinamento em esteira e dieta hiperlipídica

SHAM	cirurgia simulada
SHAMSP	grupo experimental com cirurgia simulada, indução ao sedentarismo e dieta padrão de biotério
SHAMSH-	grupo experimental com cirurgia simulada, indução ao sedentarismo e dieta hiperlipídica
SHAMEP	grupo experimental com cirurgia simulada, treinamento em esteira e dieta padrão de biotério
SHAMEH	grupo experimental com cirurgia simulada, treinamento em esteira e dieta hiperlipídica

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
U/kg	unidades por quilograma
%	porcentagem
H ₂ O	água
cm	centímetro
m/min.	metro por minuto
min./dia	minuto por dia
mL/g	mililitro por grama
g/cm ²	grama por centímetro quadrado
RPM	rotações por minuto
ng/mL	nanogramas por mililitro
N	newtons
μm ²	micrometro ao quadrado
rad/s	radianos por segundo
N.cm	newtons vezes centímetro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	41
1.1 Nutrição	43
1.2 Osteoporose	44
1.3 Propriedades mecânicas do osso	46
1.4 Treinamento físico	47
1.5 Ensaio mecânico	50
2. HIPÓTESES	53
3. OBJETIVO.....	57
4. JUSTIFICATIVA	61
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	65
5.1. Grupos experimentais.....	67
5.2. Técnica cirúrgica.....	68
5.2.1. Ovariectomia	69
5.2.2. Sham.....	70
5.3. Atividade	71
5.3.1. Sedentarismo	71
5.3.2. Treinamento em esteira	71
5.4. Dieta hiperlipídica	72
5.5. Análises nos animais	73
5.5.1. Ganho de peso.....	73
5.5.2. Densitometria de corpo total e percentual de gordura.....	73
5.5.3. Coleta de sangue	75
5.5.4. Fígado	75
5.6. Análise dos ossos.....	75

5.6.1. Tíbia.....	75
5.6.1.1. Análise histológica quantitativa	75
5.6.1.2. Densidade mineral óssea	77
5.6.1.3. Ensaio mecânico de alta velocidade	78
5.6.2. Fêmur	80
5.6.2.1. Densidade mineral óssea	80
5.6.2.2. Ensaio mecânico de baixa velocidade	80
5.7. Análise dos resultados	82
6. RESULTADOS	83
6.1. Análises dos animais.....	85
6.1.1. Ganho de peso	85
6.1.2. Dosagem de hormônio folículo-estimulante (fsh)	85
6.1.3. Densitometria de corpo total	87
6.1.4. Percentual de gordura	87
6.1.5. Glutathiona reduzida (gsh)	88
6.1.6. Malonaldeído (mda).....	89
6.2. Análise dos ossos	90
6.2.1. Tíbias.....	90
6.2.1.1. Análise histológica quantitativa	90
6.2.1.2. Densidade mineral óssea na região da diáfise da tíbia	96
6.2.1.3. Ensaio mecânico de alta velocidade	97
6.2.2. Fêmur	99
6.2.2.1. Densidade mineral óssea da região proximal do fêmur	99
6.2.2.2. Ensaio mecânico de baixa velocidade	99
7. DISCUSSÃO	103

8. CONCLUSÃO.....	117
REFERÊNCIAS.....	121
APÊNDICE.....	137
ANEXOS	159

1. INTRODUÇÃO

1.1 Nutrição

A ingestão de macronutrientes (carboidrato, lipídio e proteína) e de micronutrientes (vitaminas e sais minerais) está diretamente relacionada ao crescimento e ao desenvolvimento físico, cognitivo e motor de um indivíduo. O excesso ou a carência de macro e micronutrientes na infância podem acarretar doenças graves na fase adulta (MORAIS; BURGOS, 2007). A nutrição por sua vez estuda o equilíbrio quantitativo e qualitativo necessários, para um funcionamento saudável do organismo.

A nutrição adequada tem papel importante no acúmulo e manutenção de massa óssea e tem se mostrado uma ferramenta importante para a prevenção de fraturas em pessoas com osteoporose (PINHEIRO et al., 2009). O desenvolvimento ósseo está diretamente ligado aos níveis de nutrientes, em especial a vitamina D e o cálcio. Pinheiro et al., em 2009, ao avaliarem a ingestão de nutrientes diretamente relacionados ao osso, no Brasil, observaram que o consumo médio é inferior aos níveis recomendados pelo *Dietary Reference Intakes* (DRIs) do *Institute of Medicine* (Estados Unidos), independente da classe social.

A nutrição adequada, segundo Bruyere et al. (2008) é fundamental para ajudar a reparação óssea e prevenir novas fraturas especialmente em pacientes desnutridos. Assim, a ingestão de dieta balanceada é de vital importância em mulheres após menopausa, por ser um fator importante na manutenção das propriedades mecânicas do osso e na prevenção da osteoporose.

Outro problema enfrentado pela saúde pública é o sobrepeso decorrente de dietas erradas. Pesquisas realizadas, em ratas, mostraram que baixos níveis de vitamina D e cálcio associados a uma dieta hiperlipídica prejudicam o desenvolvimento ósseo (LAC et al. 2008, CAO; GREGOIRE; GAO, 2009). Especificamente no fêmur, tíbia e vértebra, o conteúdo mineral ósseo e a densidade mineral óssea (DMO) são prejudicados pelas dietas hiperlipídicas após 10 semanas em modelos experimentais de ratas (WARD; KIM; ROBERT BRUCE, 2003; CAO; GREGOIRE; GAO, 2009; PARHAMI et al., 2001). Dietas hiperlipídicas, combinadas com regimes alimentares curtos ou longos pioram ainda mais a qualidade óssea.

1. INTRODUÇÃO

Além de alterações ósseas decorrentes do consumo de dietas hiperlipídicas, há o aumento no estresse oxidativo. As dietas hiperlipídicas são responsáveis pelo aumento do estresse oxidativo e afeta negativamente a homeostase endócrina, resultando em hiperglicemia mal controlada, hiperinsulinemia e resistência à insulina. O malonaldeído (MDA) é um dos principais indicadores de peroxidação lipídica e dano oxidativo (OHKAWA; OHISHI; YAGI¹, 1979 apud SIDDIQUE; ARA; AFZAL, 2012), tendo seus níveis aumentados com o consumo de dietas ricas em lipídios (FRANCO, 2007; LIANG et al., 2010) e diminuídos quando submetidos a treinamento físico (FRANCO, 2007).

1.2 Osteoporose

O osso é o componente do sistema músculo esquelético que está diretamente relacionado com a sustentação e movimentação do corpo. Uma de suas principais características é a capacidade de remodelação relacionada à atividade celular dos osteoclastos (absorção) e osteoblastos (formação) (ARMAMENTO-VILLAREAL et al., 2009).

Durante uma atividade física cotidiana, impõem-se ao osso forças mecânicas que provocam pequenas deformações neste e propiciam a remodelação óssea (BIKLE; SAKATA; HALLORAN, 2003).

A osteoporose é uma doença metabólica que acomete o esqueleto. É caracterizada pela perda de massa e resistência óssea (GUPTA, 1996). Seu diagnóstico é realizado pela avaliação da DMO, característica diretamente relacionada à resistência mecânica do osso (SCHMITT; SCHMITT; DÖREN, 2009).

É de consenso que se trata de uma doença de etiologia multifatorial, podendo ser influenciada pelo sexo, biótipo, etnia, ingestão de cafeína e o tabagismo, etilismo, sedentarismo e imobilização prolongada, menopausa precoce e nuliparidade, baixa ingestão de cálcio, ingestão exagerada de proteína e fosfato entre outras (ROBBINS et al., 2001; SZEJNFELD et al., 1995).

¹ OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Annals of Biochemistry**, v. 95, p. 351–358, 1979.

1. INTRODUÇÃO

Segundo Nikolaou et al. (2009) existe uma constante preocupação com o aumento anual no número de fraturas da população idosa. Com o aumento da expectativa de vida, a osteoporose tornou-se um problema de saúde pública. Esta nova expectativa de vida e aumento da proporção de mulheres idosas tem aumentado o foco sobre a menopausa como indutora de alterações fisiológicas. Estas alterações estão associadas ao risco elevado de diversas doenças como, doenças cardiovasculares, diabetes, obesidade, hipertensão, osteoporose entre outras (LEITE et al., 2010).

A expectativa de vida aumenta continuamente, na Europa até o ano de 2012, 25% da população terá 65 anos ou mais. Nesta população prevê-se 40% mulheres e 14% homens com idade superior a 50 anos suscetíveis a fraturas secundárias a condição osteoporótica (NIKOLAOU et al., 2009). Em pesquisa realizada no Brasil, Pinheiro et al., em 2009, observaram que o índice de fratura é de 13% para homens e 15% para mulheres com idade acima de 40 anos.

O envelhecimento está associado ao aumento do risco de fratura. Entre os fatores que contribuem para esta realidade está a redução da DMO. Esta redução na DMO muitas vezes está ligada a fatores nutricionais como proteínas, cálcio e vitamina D (SIMON et al., 2002), essenciais para a manutenção do esqueleto ao longo da vida e que têm sua ingestão comprometida nos idosos pela mudança na dieta. Estudos têm mostrado que o baixo crescimento e desenvolvimento, e condições ambientais adversas na infância estão associados com a osteoporose na vida adulta (KIN et al., 2007).

Nas mulheres a ocorrência da osteoporose está diretamente ligada à menopausa, período pelo qual ela deixa de produzir os hormônios ovarianos (JOHNELL, 1996). O estrógeno possui papel importante na homeostase do esqueleto, além de participar da regulação dos ciclos de remodelagem óssea (LINDSAY, 1999). Doren e Greiser (2008) relatam que no início da menopausa há uma perda considerável da DMO que pode ser prevenida por atividades físicas regulares. Esta perda varia entre 10 a 15% nos cinco primeiros anos da menopausa (RECKER, 1993), sendo menos intensa nos anos seguintes, podendo atingir de 30 a 40 % (ROBBINS, 1994).

1. INTRODUÇÃO

A ovariectomia em animais, procedimento cirúrgico que visa à remoção dos ovários, tem sido utilizada para simular a menopausa e suas consequências. Estudos realizados sobre a diminuição da massa óssea, após a indução da menopausa, verificaram o efeito supressivo direto do estrógeno sobre a atividade osteoclástica (COMPSTON, 2001).

Com o avanço da ciência e o entendimento da osteoporose como um problema de saúde pública, esta tem sido diagnosticada e tratada precocemente, em busca de um tratamento efetivo com o intuito de se obter melhores resultados, já que uma vez instalada ela se torna irreversível. (DRIUSSO, 2000). O princípio básico do tratamento preventivo da osteoporose é a manutenção da massa óssea como meio de prevenção de fraturas (CHESNUT et al., 1995).

1.3 Propriedades mecânicas do osso

A movimentação, sustentação e proteção do corpo humano são feitas principalmente pelo esqueleto e pelos músculos, assim este conjunto está sujeito a diferentes esforços concomitantemente ou isoladamente, como tração, compressão, flexão e torção. Assim é necessário o conhecimento das propriedades mecânicas destes (SHIMANO; SHIMANO, 2000).

O osso possui três tipos de componentes fibrosos: colágeno ou fibras de curso largo, que se apresentam em feixes e resistem à força de tração; pequenas fibras de elastina que são resilientes e recuperam a forma original após a tração; e pequenas ramificações de fibras reticulares localizadas principalmente na medula óssea que adicionam volume ao órgão (GOULD, 1993). Ao se avaliar a tração, a deformação prévia a ruptura é apenas de 2% (MÜLLER et al., 1993). Sua resistência mecânica a tração é consideravelmente menor que a do aço (20%). Ao avaliar a resistência a compressão se obtém melhores resultados devido à apatita do osso. Ao se comparar o osso esponjoso em relação ao cortical a resistência mecânica do esponjoso é 20% da resistência do cortical (YAMADA; EVANS, 1970).

O conhecimento do comportamento mecânico do osso permite entender a sua reação aos esforços *in vivo*, propiciando um melhor planejamento cirúrgico e a

1. INTRODUÇÃO

escolha de um material reabilitador adequado quando necessária a sua utilização (SANTOS, 1999). Além disso, permite compreender a mecânica da fratura, que é resultado da perda da integridade estrutural do osso pela sobrecarga mecânica que em fração de segundo supera a rigidez óssea. Existem diferentes tipos de fratura resultantes do tipo de força aplicada e da quantidade de energia transferida. A flexão resulta em fratura curta e oblíqua a compressão axial em impactação, sem contato entre os fragmentos principais após o reposicionamento dos fragmentos principais, e o torque resulta em fratura em espiral. Portanto, os ensaios mecânicos permitem identificar a relação entre as forças aplicadas, a velocidade de aplicação e o tipo de fratura existente, assim como o grau de fragmentação óssea. (MÜLLER et al. 1993).

1.4 Treinamento Físico

O treinamento físico regular melhora a função de todos os sistemas do corpo (TOPP et al., 2002), contrapondo-se ao sedentarismo que resulta na perda quantitativa, em relação à forma e função, dos órgãos, provocando modificações estruturais e tendência a distúrbios funcionais (MELLEROWICZ; MELLER, 1979).

A prática de exercícios físicos regularmente tem mostrado efeitos benéficos na qualidade óssea com aumento da resistência mecânica deste. Esta melhoria está ligada ao aumento da formação óssea resultante dos estímulos decorrentes da atividade física (LESPESSAILLES et al., 2007). Observa-se o aumento da espessura tanto da região cortical quanto trabecular do osso resultando em uma maior tolerância a solicitações externas (EASTELL, 2003; MAUREL et al., 2013).

Pelos seus conhecidos efeitos benéficos, a atividade física vem sendo utilizada, nos últimos anos, como método de prevenção e análise da atrofia muscular e perda óssea (TUUKKANEN; PENG, VAANANEN, 1994; van der WIEL et al., 1995; MATHEY et al., 2002). O resultado do treinamento sobre o osso depende da atividade física realizada, sendo que os estímulos moderados têm pouca influência na massa óssea (SINAK, 1978).

A prática de exercícios físicos não tem influência apenas no osso, mas na saúde de maneira geral. A glutathione reduzida (GSH) é um tripeptídeo composto de aminoácidos não-essenciais (glutamina, cisteína e glicina). É utilizado como marcador da saúde celular em que níveis baixos indicam lesão oxidante. Tem sido

1. INTRODUÇÃO

utilizado como parâmetro de verificação do sistema de defesa antioxidante, mostrando alterações resultantes da prática de exercício físico (FRANCO, 2007).

A ação da gravidade sobre o corpo, e a utilização de pesos suplementares durante a prática de exercícios tem um grande efeito sobre a estimulação e formação óssea (SZEJNFELD, 2005). A prática de exercícios como correr e saltar gera, sobre o corpo, a ação da energia de impacto, além do peso corporal, se mostra como grandes estimuladores do processo de remodelação óssea. (GRIMSTON; WILLOWS; HANLEY, 1993; PICHLER et al., 2013).

Shimano e Volpon (2009) estudaram os efeitos da diminuição da ação da gravidade sobre o osso, para isso os autores suspenderam o rato pela cauda, o que provocou a diminuição das propriedades mecânicas ósseas, apesar de não apresentar diferenças visíveis na análise microscópica. Após 21 dias do término da suspensão, os autores observaram uma recuperação parcial do comportamento mecânico do osso e o treinamento pós-suspensão permitiu a recuperação das propriedades mecânicas e estimulou a formação de osso novo.

Apesar de estudos salientarem o benefício do exercício físico sobre a osteoporose (KEMMLER et al., 2012, RENNO; DRIUSSO; FERREIRA, 2001, TANAKA et al., 1999), a forma como este processo se dá ainda não está bem elucidado. Segundo Yeh et al. (1993) e Thomas, Wideman e Lovelady (2010) o benefício não ocorre apenas na osteoporose, mas também antes da ocorrência da mesma.

O treinamento físico vem sendo estudado, como método alternativo ou combinado a reposição hormonal na manutenção da saúde da mulher após a menopausa. Para isso, modelos experimentais utilizando ratas ovariectomizadas vêm sendo utilizados para avaliar a eficácia destes treinamentos na prevenção às doenças associadas à menopausa (SHIGUEMOTO et al., 2012, BARSALANI; CHAPADOS; LAVOIE, 2010; LEITE et al., 2010).

Treinamentos físicos realizados em ratas mostraram eficácias na reversão dos efeitos deletérios da ovariectomia sobre o tecido ósseo (SHIGUEMOTO et al.,

2012). Além disso, o treinamento controla os efeitos da ovariectomia sobre o acúmulo de gordura, perfil lipídico e conteúdo lipídico do tecido (HAO et al., 2010, LEITE et al., 2009).

Estudo realizado por Zoth et al., em 2010, demonstrou através de um modelo de ratas ovariectomizadas que a ausência do estrógeno propicia o desenvolvimento da obesidade e que o treinamento físico associado à reposição é eficaz na prevenção desta.

O estudo realizado por Umemura et al., em 2008, avaliou o efeito do treinamento em grupo sham sedentário, sham treinado e ovariectomizado sedentário e ovariectomizado treinado. Após a ovariectomia os autores submeteram os grupos treinados a treinamento de salto por 8 semanas, no final deste período avaliaram a DMO por dupla emissão de fontes de Raio X (*dual energy X-ray absorptiometry* - DXA) e observaram melhora na DMO nos grupos treinados. Terminado este período todos os animais permaneceram sedentários por 24 semanas e foram novamente avaliados. Apesar do longo período sedentário, foi possível observar melhor qualidade óssea nos grupos treinados previamente em comparação com os grupos totalmente sedentários, mostrando que o treinamento físico melhora a qualidade óssea com o tempo, mesmo com a interrupção deste.

Estudos em atletas mostraram que apesar de apresentarem déficit de diferentes nutrientes provenientes de nutrição inadequada estes apresentaram DMO normal na coluna lombar e no quadril (HOCH; STAVRAKOS; SCHIMKE, 2007), o que pode indicar que a atividade física consegue manter a saúde óssea destes atletas.

Estudo realizado por Simões et al. (2008) mostrou que o treinamento físico em esteiras após 72 horas da ovariectomia, não teve modificação no peso corporal e do fêmur de ratas ovariectomizadas. O treinamento foi capaz de manter os níveis calcêmicos, aumentar a densidade óssea e manter a rigidez do fêmur, prevenindo sua fragilidade. O treinamento em esteiras após oito semanas de ovariectomia não demonstra ser tão eficaz no controle da osteopenia, em aspectos mecânicos e densitométricos.

1. INTRODUÇÃO

A eficácia de determinado exercício em estimular a formação óssea parece depender de 3 fatores: 1) tipo da atividade; 2) estímulos de curta duração e alta intensidade; 3) estímulos intervalados (TURNER, 1998).

1.5 Ensaio Mecânico

O ensaio mecânico é uma forma técnica padronizada utilizada na avaliação das propriedades mecânicas de materiais em diferentes aplicações, através de corpos de prova ou modelos experimentais. Os ensaios permitem conhecer a resposta do material ao se aplicarem diferentes forças. Estes podem ser destrutivos, nos quais se observa a destruição do corpo de prova ensaiado; e não destrutivos, nos quais é respeitado o limite elástico do material e o corpo de prova é conservado. Dentre os ensaios destrutivos incluem-se os ensaios de tração, flexão, torção, impacto, fadiga entre outros; e nos ensaios não destrutivos, há o ultra-som, faixas variadas do espectro de radiação eletromagnética (SOUZA, 1982).

O ensaio mecânico acontece em condições controladas. Em ensaios estáticos são conhecidas as forças aplicadas e analisadas as deformações produzidas. As forças aplicadas podem provocar tração, compressão ou cisalhamento no corpo de prova.

A tração corresponde a duas forças aplicadas em sentidos opostos na mesma linha de aplicação. As forças moleculares atrativas, que dificultam o alongamento do material, correspondem à resistência a tração. A compressão acontece em situação oposta à tração, assim duas forças são aplicadas, uma no sentido da outra, na mesma linha, buscando achatar o material. Neste caso, as forças moleculares repulsivas buscam manter a dimensão do corpo de prova provocando a resistência à compressão. O cisalhamento ocorre quando duas forças atuam paralelamente uma em relação à outra, com sentidos opostos, mas não na mesma linha (EINHORN, 1996).

É possível observar algumas características mecânicas de um material sem a destruição do mesmo, para isso, é necessário aplicar uma força que permita a deformação do mesmo durante a aplicação desta e ao retirá-la este retorna a

condição inicial. Dentro do limite elástico, a força aplicada ao material, alonga suas ligações atômicas, mas não as reorganiza (EINHORN, 1996).

Os diferentes tipos de ensaio mecânico vêm sendo utilizados para estudar as propriedades mecânicas do osso e a influência da menopausa sobre este. Em estudo realizado por Hogan, Ruhmann e Sampson (2000), os autores utilizaram ensaio de compressão para avaliarem a influência da menopausa sobre o osso cortical e trabecular, encontrando diferença estatística, antes e após a menopausa apenas para o osso trabecular.

Um ensaio mecânico amplamente utilizado na avaliação mecânica de ossos é o de flexo-compressão da cabeça do fêmur, por permitir conhecer o comportamento do osso em um dos principais esforços aplicados ao fêmur, escolhido assim para ser utilizado no presente estudo.

Outro tipo de força a que os ossos estão sujeitos é o impacto. Este esforço, de natureza dinâmica, consiste em uma força aplicada, repentina e bruscamente, somada a uma energia cinética relacionada à velocidade de aplicação desta força. Neste caso, o objeto de estudo é a quantidade de energia absorvida pelo material, a partir de um valor conhecido de energia inicial (MARTINS; LACENA, 2006; MARIN, 1962). Quando a força é aplicada de forma repentina, por curtíssimos períodos de tempo, geram-se, no material, ondas de tensão. A influência dessa força sobre o material é duplicada, pois esta modifica as tensões e deformações resultantes e as propriedades de resistência do material (SANTOS, 1999).

O impacto pode ser caracterizado por uma colisão de corpos ou uma rápida e breve aplicação de força ou movimento a uma estrutura, em que os danos são proporcionais às características e intensidades desta. Na maioria dos casos, se o tempo de aplicação da força é menor que a metade do menor período natural de vibração, a carga é considerada de impacto. Se o intervalo de tempo é maior que três vezes o período natural, a carga é geralmente considerada estática. (MARIN, 1962).

Apesar de existirem modelos teóricos que buscam descrever o comportamento de materiais durante o impacto, ensaios experimentais ainda são realizados para melhor conhecimento dos mesmos. O ensaio de impacto mais

1. INTRODUÇÃO

utilizado é o pêndulo, em que a energia potencial é transformada em energia cinética, e esta por sua vez é transferida para o material. Neste ensaio se obtém a resistência ao impacto, que é energia absorvida pelo corpo de prova ou estrutura, até a fratura durante o ensaio. O cálculo dessa energia é feito pela diferença da energia potencial inicial e final (MARIN, 1962; HORATH, 1995; SANTOS, 1999).

Em estudo realizado por Delye et al. (2007), os autores avaliaram a energia de impacto necessária para a fratura do osso occipital de cadáveres humanos. Neste estudo, os autores aplicaram três diferentes velocidades de impacto e observaram maior capacidade de absorção do impacto com o aumento da velocidade de ensaio. Assim, é possível observar que a resposta mecânica do osso é dependente não apenas da força aplicada, mas também da velocidade de aplicação desta.

Passi e Gefen (2005) encontraram características microestruturais muito semelhantes no osso cortical e esponjoso de seres humanos e galinhas. Assim, realizaram um trabalho com 48 amostras de fêmur de galinha, submetido ao ensaio de impacto com aumento do “nível” da energia potencial (E_p), quando aplicado 0,37 J houve uma fratura completa para quatro não fraturas, e a maior energia de impacto aplicada (1,19 J) resultou em quatro fraturas completas para uma não fratura. O resultado do estudo sustenta a hipótese de que o tecido trabecular epifisário de ossos longos contribui com a resistência e distribuição das forças de impacto, induzindo a tensão na face lateral do fêmur proximal.

Apesar de estudos relacionarem dietas hiperlipídicas com exercícios físicos (WOO et al., 2009, PATSCH et al., 2011), não há relatos da associação em modelo experimentais com déficit de estrógeno. Gerbaix et al. (2013), estudaram o efeito do treinamento físico em esteira na qualidade óssea de ratos machos após a indução de obesidade por dieta hiperlipídica, observando melhora na microarquitetura óssea. Assim, o objetivo deste estudo é avaliar a capacidade de treinamentos físicos na manutenção da qualidade e resistência óssea em ratas com dieta hiperlipídica após ovariectomia.

2. HIPÓTESES

2. HIPÓTESES

1. A dieta hiperlipídica piora as propriedades físicas dos ossos de ratas ovariectomizadas

2. O treinamento físico em esteira melhora a qualidade óssea e controla o ganho de peso de ratas ovariectomizadas.

3. OBJETIVO

3. OBJETIVO

Avaliar o efeito do treinamento físico em esteira no ganho de peso, nos níveis de glutathione reduzida (GSH) e malondialdeído (MDA) do fígado, e nas propriedades físicas de ossos de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica (DH) por 12 semanas.

4. JUSTIFICATIVA

4. JUSTIFICATIVA

Atualmente, o aumento do número de fraturas na população idosa é de grande preocupação. Este problema se torna ainda mais evidente ao se ter conhecimento que em 2012, 25% da população mundial era idosa (NIKOLAOU et al., 2009). Esta preocupação acontece em termos de mobilidade, mortalidade e, também, de aspectos financeiros. Esta realidade está ligada ao desenvolvimento da osteoporose. Esta é uma patologia multifatorial (ROBBINS et al., 2001; SZEJNFELD et al., 1995) que aumenta a fragilidade do sistema esquelético, principalmente em mulheres após a menopausa. O déficit de estrógeno aumenta os riscos de desenvolver osteoporose e fratura está diretamente relacionado com as deteriorações do colágeno ósseo. Aliado a esta situação, existe o aumento da obesidade de maneira geral.

A obesidade é um fator preponderante na população mundial, e dietas inadequadas podem estar ligadas a diminuição da qualidade óssea. Existem estudos, avaliando a obesidade e a qualidade óssea, mas pouco voltados à análise desta combinação na terceira idade. Algumas pesquisas com ratos apresentam o efeito negativo de dietas hiperlipídicas na microarquitetura (WOO et al., 2009; PATSCH et al., 2011) e na remodelação óssea (BARTELT et al. 2010, FUJITA; WATANABE; MAKI, 2012).

A fratura de ossos longos é um dos principais tipos de fratura observados na população idosa e entender o efeito da obesidade nesta situação se torna imprescindível para o desenvolvimento de políticas de prevenção. As fraturas em ossos longos são provocadas por esforço dinâmico de impacto.

Relatos clínicos e científicos elucidam que a prática de exercício físico proporciona uma melhora na resistência dos ossos, acarretando uma maior tolerância à solicitação mecânica, assim como beneficia o organismo em vista dos demais fatores fisiológicos. Ao passo que, a inatividade física acarreta uma série de malefícios ao organismo. Portanto, de acordo com os benefícios já citados, a atividade física aplicada à osteoporose, se encontra como um possível método profilático/ terapêutico.

Atualmente, em pesquisas experimentais, tem-se usado o modelo animal de rato para o estudo de doenças e alterações funcionais do sistema músculo

4. JUSTIFICATIVA

esquelético. Isto se deve ao fato deste modelo ser de fácil manuseio e possuir comportamento semelhante ao humano. A utilização deste modelo para o estudo do efeito de dietas hiperlipídicas se justifica uma vez que estes animais apresentam distúrbios metabólicos semelhantes ao observados em humanos (WOODS et al. 2003) ao ingerirem da dieta rica em lipídios (DINIZ et al., 2008). Além disso, ratas ovariectomizadas têm sido utilizadas como modelo de obesidade pela ação limitada do estrógeno (HAO et al., 2010).

Portanto, este trabalho justifica-se pelas hipóteses e objetivos apresentados.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi elaborado de acordo com o "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1996) e foi aprovado pela Comissão de Ética em pesquisa com animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP – USP), protocolo 87/2011 (Anexo A).

Foram utilizadas 80 fêmeas de *Rattus norvegicus albinus*, variedade *Wistar*, com massa corporal entre 180 g e 200 g, de 8 semanas, fornecidas pelo Biotério Central da Prefeitura do Campus da USP de Ribeirão Preto. Todos os animais foram pesados no início do experimento e, depois, semanalmente, quando, também foram examinados segundo o protocolo recomendado por Morey-Holton e Globus (2002) que consta da seguinte sequência:

1- Avaliação do aspecto geral e atividade (durante os primeiros dias é normal aparecerem pigmentos de porfirina em torno do nariz e olhos e desaparecem após três dias)

2- Evidência de que os animais estão comendo, bebendo e se movendo.

Os animais foram mantidos, durante o experimento (12 semanas), no Biotério do Laboratório de Bioengenharia da FMRP – USP com ciclos de dia / noite de 12 / 12 horas, com umidade e temperatura ($21 \pm 1^{\circ}\text{C}$) controladas.

Ao final do experimento as ratas foram submetidos à eutanásia com dose excessiva (2 mL para cada 100g do animal) de Hidrato de Cloral.

5.1. Grupos experimentais

Os animais foram divididos em oito grupos experimentais (n=10). As caudas foram identificadas individualmente, com marcador permanente, por algarismos romanos.

Foram estabelecidos os seguintes grupos de tratamento (Quadro 1):

- **Grupo OVXSP:** submetido a procedimento cirúrgico de ovariectomia, ao sedentarismo induzido, recebendo água e alimentação padrão após a cirurgia.

- **Grupo OVXSH:** submetido a procedimento cirúrgico de ovariectomia, ao sedentarismo induzido, recebendo água e alimentação hiperlipídica após a cirurgia.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

- **Grupo OVXEP:** submetido a procedimento cirúrgico de ovariectomia e treinamento em esteira, recebendo água e alimentação padrão após a cirurgia.

- **Grupo OVXEH:** submetido a procedimento cirúrgico de ovariectomia e treinamento em esteira, recebendo água e alimentação hiperlipídica após a cirurgia.

- **Grupo SHAMSP:** submetido a procedimento cirúrgico “sham”, ao sedentarismo induzido, recebendo água e alimentação padrão após a cirurgia.

- **Grupo SHAMSH:** submetido a procedimento cirúrgico de “sham”, ao sedentarismo induzido, recebendo água e alimentação hiperlipídica após a cirurgia.

- **Grupo SHAMEP:** submetido a procedimento cirúrgico de “sham” e treinamento em esteira, recebendo água e alimentação padrão após a cirurgia.

- **Grupo SHAMEH:** submetido a procedimento cirúrgico “sham” e treinamento em esteira, recebendo água e alimentação hiperlipídica após a cirurgia.

Quadro 1 – Grupos Experimentais

Grupo	Procedimento cirúrgico	Atividade	Dieta
OVXSP	OVX	sedentário	padrão
OVXSH			hiperlipídica
OVXEP		treinamento em esteira	padrão
OVXEH			hiperlipídica
SHAMSP	Sham	sedentário	padrão
SHAMSH			hiperlipídica
SHAMEP		treinamento em esteira	padrão
SHAMEH			hiperlipídica

5.2. Técnica cirúrgica

A técnica cirúrgica aplicada seguiu a metodologia de Zarrow e Brown-Grant (1964).

5. MATERIAIS E MÉTODOS

Os animais receberam anestesia composta por Ketamina (95 mg/kg) e Xilazina (12 mg/kg) no músculo gastrocnêmio, para que cessassem seus movimentos. Após a anestesia dos animais os mesmos tiveram a cauda aquecida com o auxílio de uma lâmpada incandescente de 40 W. Tomou-se o cuidado de não encostar a cauda na lâmpada evitando assim queimaduras. Após 5 min. de aquecimento, a extremidade da cauda foi cortada (5 mm) e foram retirados 2 mL de sangue para análise do hormônio folículo-estimulante (FSH) previamente à cirurgia. Após a coleta de sangue a extremidade da cauda foi amarrada evitando assim perda de sangue.

Após a cirurgia, os animais receberam injeção de antibiótico (40.000 U/kg Penicilina G Procaína IM) (Tezini, 2008).

5.2.1. Ovariectomia

O procedimento cirúrgico de ovariectomia bilateral utilizado foi realizado através de acesso pela cavidade abdominal. Após a localização do ovário foi feita ligadura na extremidade distal da trompa uterina com fio de sutura 3-0 Vicryl (Johnson e Johnson – São José dos Campos) e o ovário retirado. A trompa uterina foi recolocada no interior da cavidade abdominal e as camadas musculares foram suturadas com fio de sutura 3-0 Vicryl e as cutâneas com fio 3-0 Mononylon Ethilon (Johnson e Johnson – São José dos Campos).

5. MATERIAIS E MÉTODOS

Figura 1 - Procedimento de Ovariectomia: a) animal anestesiado com tricotomia na região ventral entre a reborda costal inferior e o início da pelve; b) incisão reta transversal, de aproximadamente 1 cm de comprimento da pele e tecido celular subcutâneo; c) visualização da inserção na pele; d) incisão do músculo para acesso a cavidade abdominal; e) visualização do corte do músculo; f) exposição do ovário; g) ligadura da região distal da trompa uterina; h) remoção do ovário; i) reinserção da trompa uterina na cavidade abdominal; j) sutura do músculo abdominal; k) sutura da pele e tecido celular subcutâneo; l) animal após finalização do procedimento cirúrgico.

Segundo Kalu (1991) e Tomkinson et al. (1998) a osteopenia se manifesta em um período de 30 a 60 dias após a ovariectomia. Portanto, 72 horas após a cirurgia foi iniciado o treinamento dos grupos OVXEP e OVXEH para que este iniciasse antes da instalação da osteopenia decorrente da ovariectomia.

5.2.2. Sham

5. MATERIAIS E MÉTODOS

O procedimento cirúrgico sham consistiu da exposição bilateral dos ovários pelo acesso pela cavidade abdominal. Após sua localização, este foi exposto e depois reinserido no interior da cavidade abdominal e as camadas musculares e cutâneas foram suturadas isoladamente conforme descrito anteriormente.

Obedecendo ao mesmo padrão utilizado nos animais ovariectomizados, os treinamentos iniciaram 72 horas após a cirurgia nos grupos SHAMEP e SHAMEH.

5.3. Atividade

5.3.1. Sedentarismo

Seguindo a metodologia utilizada por Oliveira-Milani et al. (2008) nos grupos sedentários (OVXSP, OVXSH, SHAMSP e SHAMSH) as ratas foram colocadas individualmente, em caixas plásticas com espaço reduzido, com o intuito de diminuir sua movimentação, tornando-as sedentárias (Figura 2). As dimensões das caixas após a redução eram de 19 x 19 x 12 cm (comp. x larg. x alt.).

Figura 2 – Indução ao sedentarismo: a1) Tampa da caixa; a2) redutor de espaço em inox; a3) caixa plástica; b) animal colocado na caixa reduzida; c) animal induzido ao sedentarismo.

5.3.2. Treinamento em esteira

Os grupos que receberam treinamento em esteira (OVXEP, OVXEH, SHAMEP e SHAMEH) foram colocados em caixa plástica com dimensões de 40 x 32 x 16 cm (comp. x larg. x alt.) sendo alojados entre 3 e 4 animais em cada caixa.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

O treinamento foi realizado em esteira motorizada Insight (Modelo EP – 131), para ratos, composta por seis baias individuais com espaço interno de 50 x 10 x 15 (comp. x larg. x alt.). A esteira possui um painel de controle com regulador de velocidade, chave liga-desliga, mostrador digital para o tempo e a distância percorrida e botões para reiniciar o relógio e odômetro (contador de distância). O exercício foi realizado sem inclinação da esteira.

O protocolo de treinamento físico utilizado foi composto por uma fase de adaptação nas duas primeiras semanas e evolução gradativa da velocidade e tempo até atingir a velocidade de 17 m/min. durante 60 min./dia na sétima semana. O treinamento foi realizado 5 dias/semana durante 12 semanas. O Quadro 2 apresenta o protocolo de treinamento físico realizado:

Quadro 2: Protocolo de Treinamento Físico:

Semana de treinamento	Velocidade (m/min.)	Duração das sessões (minutos)				
		Segunda	Terça	Quarta	Quinta	Sexta
1ª	7	5	10	15		20
2ª	10	20		30		
3ª	14	35			40	
4ª	17	45			50	
5ª		55			60	
6ª		60				
7ª						
8ª						
9ª						
10ª						
11ª						
12ª						

5.4. Dieta hiperlipídica

A dieta padrão (DP) utilizada foi a Nuvilab® CR-1 autoclavável (Nitrival Nutrientes, Guarani, Brazil) (Figura 3), fornecida pelo Biotério Central da Prefeitura do Campus USP de Ribeirão Preto.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

100110036		NUVILAB CR-1 AUTOCLAVÁVEL		16	
		Ração para animais de laboratório		92-18146	
COMPOSIÇÃO BÁSICA DO PRODUTO:					
Milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicalcico, cloreto de sódio (sal comum), vitamina A, vitamina D3, vitamina E, vitamina K3, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, vitamina B12, niacina, pantotenato de cálcio, ácido fólico, biotina, cloreto de colina, sulfato de ferro, monóxido de manganês, óxido de zinco, sulfato de cobre, iodato de cálcio, selenito de sódio, sulfato de cobalto, lisina, metionina, BHT					
NÍVEIS DE GARANTIA POR QUILOGRAMA DE PRODUTO:					
UMIDADE (máx)	120 G/KG	MATÉRIA MINERAL (máx)	90G/KG	CÁLCIO (mín.máx)	10-14G/KG
PROTEÍNA BRUTA (mín)	220 G/KG	FIBRA BRUTA (máx)	70G/KG	FÓSFORO (mín)	8.000MG/KG
EXTRATO ETÉREO (mín)	40 G/KG				
VITAMINAS: VITAMINA A (mín) 25.500 UI/KG; VITAMINA D3 (mín) 2.100 UI/KG; VITAMINA E (mín) 60 UI/KG; VITAMINA K3 (mín) 12,5 MG/KG; VITAMINA B1 (mín) 14,4 MG/KG; VITAMINA B2 (mín) 11 MG/KG; VITAMINA B6 (mín) 12 MG/KG; VITAMINA B12 (mín) 60 MG/KG; NIACINA (mín) 60 MG/KG; PANTOTÊNICO DE CÁLCIO (mín) 112 MG/KG; ÁCIDO FÓLICO (mín) 6 MG/KG; BIOTINA (mín) 0,26 MG/KG; COLINA (mín) 2.400 MG/KG; MINERAIS: SÓDIO (mín) 2.700 MG/KG; FERRO (mín) 50 MG/KG; MANGANÊS (mín) 60 MG/KG; ZINCO (mín) 60 MG/KG; COBRE (mín) 10 MG/KG; IODO (mín) 2 MG/KG; SELÊNIO (mín) 0,05 MG/KG; COBALTO (mín) 1,5 MG/KG; FLUOR (máx) 80 MG/KG; AMINOÁCIDOS: LISINA (mín) 14 G/KG; METIONINA (mín) 5.000 MG/KG; ADITIVOS: BHT 100 MG/KG.					
INDICAÇÃO: Ração indicada para camundongos e ratos de laboratório.					
USO: Administração a vontade, através de comedouros suspensos.					
CONSERVAÇÃO: Conservar o produto em ambiente seco e arejado, sobre estrados, evitando-se luz e calor excessivos.					

Figura 3 – Rótulo da dieta padrão com sua composição

Para obtenção da dieta hiperlipídica (DH), a ração padrão de biotério foi triturada, e posteriormente adicionada banha de porco (Sadia – Concórdia, Brasil) (Figura 4). O aumento de lipídio na dieta dos animais foi feito de maneira gradativa. No primeiro dia após a cirurgia foi fornecida dieta com acréscimo de 20% de lipídios e após 72 horas da cirurgia iniciou-se o fornecimento de dieta com adição de 30% (LEONARDI et al., 2010). A ração para dieta hiperlipídica utilizada foi manipulada no Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP.

5.5. Análises nos animais

Foram realizadas análises nos animais previamente às análises dos ossos.

5.5.1. Ganho de peso

Foi realizada avaliação do ganho de peso semanal de cada animal. Para isso, os animais foram pesados no dia da realização do procedimento cirúrgico, e, posteriormente, semanalmente até a eutanásia. O peso obtido a cada semana foi subtraído do peso inicial, obtendo-se assim o ganho de peso de cada animal em relação ao início do experimento.

5.5.2. Densitometria de corpo total e percentual de gordura

Um dia antes da eutanásia de cada animal foi realizada a avaliação da densidade mineral óssea e do percentual de gordura com auxílio de um aparelho de densitometria por meio de dupla emissão de fontes de Raio X (*dual energy X-ray absorptiometry* - DXA) utilizando programa de análise para pequenos animais (Hologic, Discovery Wi®, Estados Unidos) do Laboratório de Endocrinologia e

5. MATERIAIS E MÉTODOS

Ciências de Imagens e Física Médica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

Os animais foram anestesiados com Ketamina e Xilazina (0,5mL/100g), 10 min. antes do exame. Para realização do exame, os animais foram posicionados em decúbito ventral sobre a mesa do equipamento (Figura 4). A configuração do equipamento foi de espaço para linha do scan de 0,0245 cm e redução para cada ponto de 0,0127 cm. Os resultados foram expressos em g/cm^2 . Após o exame os animais ficaram em observação até que se encerrasse o efeito do anestésico.

Figura 4 - Animal anestesiado e posicionamento para avaliação da densitometria de corpo total e percentual de gordura

A região avaliada corresponde a um trapézio que engloba todo o corpo do animal, menos cabeça e cauda (Figura 5).

Figura 5 – Área de varredura para o exame de densitometria de corpo total

5.5.3. Coleta de sangue

Além das amostras de sangue obtidas no momento da cirurgia inicial, foram coletados 2 mL de sangue de todos os animais após a eutanásia, por punção cardíaca. O sangue obtido no início e no final do experimento foi centrifugado a 4000 RPM logo após sua coleta em uma centrífuga para *eppendorf* no Laboratório de Endocrinologia da FMRP – USP. O soro obtido foi armazenado em freezer -20 °C para posterior análise hormônio folículo-estimulante (FSH) no Laboratório de Neuroendocrinologia da FMRP – USP, e comparação com os níveis deste hormônio antes e após a cirurgia, a fim de comprovar a eficácia da ovariectomia na diminuição dos níveis de estrógeno.

5.5.4. Fígado

O fígado dos animais foi removido e congelado individualmente em freezer a -20 °C para análise de estresse oxidativo no fígado pela dosagem dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) e malondialdeído (MDA). A análise foi realizada no Laboratório de Nutrição e Metabolismo da FMRP/USP.

5.6. Análise dos ossos

De acordo com o trabalho de Battraw et al. (1996), os pares de fêmures e tíbias apresentam geometria e comportamento mecânico semelhantes, quando comparados aos seus lados (esquerdo e direito), escolheu-se o lado esquerdo para análise histológica e o direito para análise mecânica.

5.6.1. Tíbia

5.6.1.1. Análise histológica quantitativa

As análises histológicas quantitativas foram realizadas no Laboratório de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP. Após a eutanásia as tíbias esquerdas foram limpas das partes moles e colocadas em 80 mL de solução de formol a 4% por 48h para fixação e posterior análise histológica. Passado o período de fixação iniciou-se a descalcificação em solução de EDTA (100 g EDTA/ 1L H₂O destilada). Depois de descalcificados os ossos foram submetidos a uma série ascendente de alcoóis por uma hora em cada solução (70, 90, 95% de concentração e a três alcoóis absolutos). Em seguida, as tíbias foram mergulhadas

5. MATERIAIS E MÉTODOS

em uma sequência de três xilóis, por 1 hora em cada. Após a imersão em xilol, os ossos foram banhados em três parafinas, ficando 1 hora em cada. Terminado o processo eles foram emblocados em parafina. As tíbias foram submetidas a corte longitudinais de 5 µm de espessura.

Das lâminas obtidas, seis foram coradas pela técnica de Tricrômio de Masson e seis por Picro-sírius, sendo fixadas em Entelan.

Nas lâminas coradas com Tricrômio de Masson, foi avaliada, com lente objetiva de 5x, a área de osso trabecular em área de 3,5 x 2,5 mm na região da epífise e metáfise proximal da tíbia (Figura 6).

Figura 6 – Região de análise da área de osso trabecular neoformado

Além disso, foi avaliada a espessura de osso cortical em três regiões da diáfise no comprimento da tíbia (Figura 7). Para isso também foi utilizado aumento de 5x.

Figura 7 – Esquema das regiões de análise de espessura de osso cortical:
C1 – Região Proximal, C2 – Região Medial e C3 – Região Distal

Nas lâminas coradas com Picro-sírius, foi analisada a quantidade de colágeno total na região proximal da tíbia (Figura 8).

Figura 8 - Região da tíbia em que foi avaliado o colágeno

5.6.1.2. Densidade Mineral Óssea

As tíbias direitas foram limpas das partes moles, pesadas, medidas e identificadas individualmente (Figura 9). A pesagem foi realizada em balança digital com precisão de 0,01g e o comprimento obtido com o paquímetro (precisão 0,05 mm). Estas foram envoltas em gaze embebida em solução fisiológica e armazenados em recipientes identificados (grupo e animal) e conservadas a -20°C.

Figura 9 – Tíbia direita dissecada

Antes da realização da densitometria, as tíbias foram submetidas ao protocolo de descongelamento, permanecendo em geladeira por 12h, e depois levadas a avaliação densitométrica em temperatura ambiente.

Foi avaliada a densidade mineral da diáfise da tíbia, região esta que foi submetida ao ensaio mecânico de torção em alta velocidade (Figura 10).

Figura 10 – Análise de densidade mineral óssea na diáfise da tíbia

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.6.1.3. Ensaio Mecânico de Alta Velocidade

Para avaliar a resistência mecânica do osso cortical ao impacto foi utilizado o ensaio de torção em alta velocidade. O ensaio consiste em aplicar a energia de impacto de forma repentina. Esta energia é gerada pelo movimento de um pêndulo que transforma a energia potencial em cinética. A energia cinética é transferida ao corpo de prova pelo impacto do pêndulo em uma alavanca acoplada ao eixo da máquina no qual se encontra fixa a tíbia. O equipamento (Figura 11a) e metodologia utilizados foram desenvolvidos no Laboratório de Bioengenharia – Departamento de Biomecânica Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor da FMRP/USP (Depósito de pedido de patente – BR 10 2013 005052-0 – Anexo B).

Neste ensaio buscou-se a torção com carregamento em alta velocidade para simular a fratura óssea por impacto. Foi aplicada à tíbia (Figura 11b) energia de impacto de 25 cJ, a velocidade angular de 11,5 rad/s. Após a realização do ensaio foi obtido o torque máximo (N.cm) e o ângulo de fratura (graus).

Figura 11 – Ensaio de torção por impacto em alta velocidade: a) Máquina; b) tíbia posicionada na máquina para realização do ensaio.

Para a realização do ensaio, após a avaliação da DMO as tíbias tiveram suas extremidades incluídas em resina acrílica com o auxílio de um paralelômetro. Para evitar o aquecimento da região da diáfise da tíbia, a mesma foi envolta em algodão embebido em soro fisiológico. A utilização do paralelômetro foi necessária para inclusão das extremidades da tíbia em cilindros concêntricos a uma distância padronizada. Esta inclusão permitiu o correto posicionamento da tíbia na máquina de

5. MATERIAIS E MÉTODOS

torção por impacto em alta velocidade (12b). Foi padronizada a distância de 30 mm entre os cilindros de acrílico (Figura 12).

Figura 12 – Sequência de Inclusão da tíbia em resina acrílica para realização do ensaio de torção: a) tíbia dissecada; b) posicionamento da distal em dispositivo a ser acoplado no paralelômetro; c) conferência da centralização da tíbia; d) paralelômetro com matriz em teflon posicionada; e) tíbia posicionada no paralelômetro para inclusão da proximal; f) inserção de resina acrílica no matriz de teflon; g) inclusão da região proximal da tíbia; h) posicionamento do cilindro em dispositivo a ser acoplado ao paralelômetro; i) posicionamento da tíbia no paralelômetro; j) determinação da distancia entre cilindro; k) tíbia com extremidades incluídas.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.6.2. Fêmur

5.6.2.1. Densidade mineral óssea

Os fêmures direito foram submetidos aos mesmos procedimentos de dissecação e conservação das tíbias. A análise da DMO foi realizada na região proximal do fêmur (Figura 13), que foi submetida posteriormente ao ensaio mecânico de flexo-compressão da cabeça do fêmur.

Figura 13 - Análise de densidade mineral óssea na região proximal do fêmur

5.6.2.2. Ensaio mecânico de baixa velocidade

Foi realizado ensaio de flexo-compressão da cabeça do fêmur conforme metodologia descrita por Shimano e Volpon (2009). Neste ensaio, buscou-se avaliar a resistência mecânica do osso trabecular. Foi avaliada a Força máxima (N) e a Rigidez (N/mm).

Para isso a região distal do fêmur foi incluída em resina acrílica. A região proximal do fêmur foi envolta em algodão embebido em soro fisiológico para evitar o aquecimento da região a ser avaliada durante a polimerização da resina (Figura 14).

Figura 14 - Inclusão do fêmur em resina acrílica para realização do ensaio de flexo-compressão: a) fêmur, suporte e molde de silicone; b) fêmur dissecado; c) fêmur posicionado no suporte; d) fêmur envolto em algodão embebido em soro fisiológico; e) inserção de resina acrílica no molde; f) fêmur posicionado no molde; g) fêmur incluído.

Após a inclusão, o fêmur foi posicionado na máquina universal de ensaios DL 10000 (EMIC, São José dos Pinhais) (Figura 15). O ensaio foi realizado com aplicação de carga até a ruptura com velocidade de 1,0 mm/min. e pré-carga de 5 N. Foi utilizada célula de carga de 50 N.

Figura 15 – Fêmur posicionada na máquina de universal de ensaio para realização do ensaio de flexo-compressão

5.7. Análise dos resultados

Todos os dados foram analisados como pertencentes ou não a uma distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk.

Os dados com distribuição normal foram submetidos ao teste estatístico em modelo linear geral e ajuste para múltiplas comparações de Bonferroni.

Os dados com distribuição não normal foram avaliados quanto ao tipo de distribuição. Estes apresentaram distribuição gama e foram submetidos a teste estatístico em modelo linear generalizado para distribuição Gama e teste complementar de Bonferroni.

O nível de significância adotado foi de 5%.

As tabelas estatísticas são apresentadas no Apêndice A.

6. RESULTADOS

6.1. Análises dos animais

6.1.1. Dosagem de Hormônio folículo-estimulante (FSH)

Ao avaliar os níveis de FSH prévios a cirurgia, não foi observada diferenças entre os grupos que foram submetidos à ovariectomia, em relação aos grupos Sham ($p=0,625$).

Após 12 semanas da realização da cirurgia, observaram-se diferenças estatísticas nos níveis de FSH no sangue entre os grupos OVX e SHAM ($p<0,000$).

Comparando os níveis de FSH antes do início do experimento, e após a eutanásia dos animais (Figura 16), foi possível observar diferenças estatísticas para os animais submetidos à ovariectomia ($p<0,000$). Não foram encontradas diferenças estatísticas para os animais submetidos à cirurgia sham ($p=0,507$).

Figura 16 – Comparação dos níveis de FSH (ng/mL) antes da cirurgia e após 12 semanas de experimento

6.1.2. Ganho de peso

Após a avaliação do ganho de peso semanal de cada animal, foi obtido o ganho de peso médio dos grupos a cada semana de experimento (Figura 17).

6. RESULTADOS

Figura 17 – Ganho de peso médio (g) x tempo (semanas) dos grupos experimentais

Realizada a análise estatística, foi possível observar ganho de peso significativo até a 10^a semana ($p < 0,000$) para todos os grupos experimentais. Não houve aumento de peso significativo entre a 10^a e a 11^a semana ($p = 1,000$) e entre a 11^a e 12^a semana ($p = 0,911$). Mas houve diferença entre a 10^a e 12^a semana ($p = 0,003$).

Analisando o efeito dos tipos de cirurgia, de tratamento e de dieta foi possível observar que o tipo de cirurgia interferiu no ganho de peso, com maior ganho para os grupos submetidos à ovariectomia ($p = 0,001$). O treinamento em esteira também resultou em maior ganho de peso, quando comparado com os grupos sedentários ($p < 0,000$). A dieta padrão e hiperlipídica não apresentaram efeito estatisticamente significativo em relação ao ganho de peso ($p = 0,539$).

Ao avaliar a interação entre as variáveis, foi possível observar significância estatística para cirurgia*tratamento ($p = 0,007$), e para cirurgia*tratamento*dieta ($p = 0,001$), mas não para cirurgia*dieta ($p = 0,298$) e tratamento*dieta ($p = 0,281$).

Na comparação entre os grupos, verificaram-se diferenças entre os seguintes grupos experimentais: OVXEH e SHAMEH ($p < 0,000$); OVXEH e OVXSH ($p < 0,000$); OVXEP e OVXEH ($p = 0,016$); OVXSP e OVXSH ($p = 0,045$); SHAMEP e SHAMEH ($p = 0,049$).

6.1.3. Densitometria de corpo total

A Figura 18 apresenta os resultados obtidos a partir da avaliação da Densidade Mineral Óssea de Corpo Total dos animais de cada grupo experimental.

Figura 18 –Densidade mineral óssea de corpo total (g/cm²)

Após a avaliação da densidade mineral óssea de corpo total, verificou-se que o tipo de cirurgia realizada influenciou na DMO ($p < 0,000$), com maior densidade para os animais do grupo SHAM. Observou-se também que o treinamento em esteira resultava em melhor qualidade óssea ($p < 0,000$). A variação na dieta não resultou em diferenças estatísticas nesta propriedade ($p = 0,186$). Não foi observado efeito estatisticamente significativo para as interações das variáveis.

6.1.4. Percentual de gordura

A Figura 19 apresenta os resultados de percentual de gordura corporal dos animais um dia antes da eutanásia.

6. RESULTADOS

Figura 19 – Percentual de gordura dos grupos experimentais antes da eutanásia

Após análise estatística foi possível observar que a cirurgia influenciou no percentual de gordura ($p < 0,000$) com maior percentual para os grupos submetidos à ovariectomia. O mesmo foi observado em relação ao tipo de dieta ($p < 0,000$), em que os animais que receberam dieta hiperlipídica apresentaram maior percentual de gordura. No entanto não foram encontradas diferenças estatísticas entre os tratamentos ($p = 0,240$). Não foi observado efeito estatisticamente significativo para as interações das variáveis.

6.1.5. Glutathione reduzida (GSH)

A Figura 20 apresenta os níveis de GSH obtidos na análise do fígado dos animais após 12 semanas de experimento.

Figura 20 – Níveis de GSH ($\mu\text{mol/gP}$) ao final de 12 semanas de experimento

Na análise estatística, não foram encontradas diferenças estatísticas para nenhuma das variáveis ou suas interações.

6.1.6. Malonaldeído (MDA)

A Figura 21 apresenta os níveis de MDA obtidos na análise do fígado dos animais, após 12 semanas de experimento.

Figura 21 – Níveis de MDA ($\mu\text{mol/gP}$) ao final de 12 semanas de experimento

6. RESULTADOS

Ao comparar o efeito das variáveis foi possível observar diferenças estatísticas entre os tratamentos ($p=0,021$) e entre as dietas ($p=0,020$), mas não houve diferença entre as cirurgias ($p=0,594$). Ao avaliar a interação entre as variáveis, foi possível observar significância na interação cirurgia*dieta ($p=0,046$), em que, grupos ovariectomizados com dieta padrão foram estatisticamente diferentes de ovariectomizados com dieta hiperlipídica ($p=0,014$), com maiores valores para os animais que receberam dieta hiperlipídica.

Foi encontrada diferença também na interação tratamento*dieta ($p=0,013$), em que animais sedentários que receberam diferentes dietas apresentaram diferenças estatísticas ($p=0,001$), com maiores níveis de MDA para os animais que receberam dieta hiperlipídica. Observou-se também, diferença entre os animais que receberam dieta padrão e diferentes tratamentos, os animais treinados apresentaram níveis maiores de MDA.

6.2. Análise dos ossos

6.2.1. Tíbias

6.2.1.1. Análise histológica quantitativa

A análise de quantificação do osso trabecular foi realizada na região proximal da tíbia como demonstrado nas fotomicrografias (Figura 22), onde foi evidenciado o aspecto histológico das trabéculas ósseas, que apresentaram diminuição de seu volume nos grupos ovariectomizados e nos grupos sedentários.

Figura 22 – Fotomicrografias de osso trabecular na região proximal da tíbia: A) OVXSP; B) OVXSH; C) OVXEP; D) OVXEH; E) SHAMSP; F) SHAMSH; G) SHAMEP e H) SHAMEH

Este resultado foi comprovado ao comparar os resultados de área de osso trabecular (Figura 23).

6. RESULTADOS

Figura 23 – Osso trabecular ($\times 10^5 \mu\text{m}^2$) na região proximal da tíbia

Ao comparar os resultados, foi possível observar que o tipo de cirurgia influencia na área de osso trabecular neoformado ($p < 0,000$), sendo os maiores resultados observados para os animais SHAM. O tratamento também resulta em diferenças estatísticas ($p = 0,002$), com maiores quantidades de osso neoformado para os animais treinados em esteira. O tipo de dieta não resultou em diferenças estatísticas para essa variável ($p = 0,879$). A interação cirurgia*tratamento também foi significativa ($p = 0,005$), sendo que as demais interações não foram significantes.

A Figura 24 apresenta a espessura de osso cortical na região C1 de cada animal.

Figura 24 – Espessura de osso cortical (µm) na região C1 da tíbia

Na análise estatística, não foram encontradas diferenças significantes para nenhuma das variáveis ou suas interações.

A Figura 25 apresenta a espessura de osso cortical na região C2 de cada animal.

Figura 25 – Espessura de osso cortical (µm) na região C2 da tíbia

6. RESULTADOS

A análise estatística não apresentou diferenças para nenhuma das variáveis. Foi significativa a interação apenas entre cirurgia*dieta ($p=0,014$), em que, os animais submetidos à cirurgia OVX que receberam diferentes dietas apresentaram diferenças estatísticas, com maior espessura para os animais com dieta hiperlipídica.

A Figura 26 apresenta a espessura de osso cortical na região C3 de cada animal.

Figura 26 – Espessura de osso cortical (μm) na região C3 da tíbia

Na análise estatística, não foram encontradas diferenças significantes para nenhuma das variáveis ou suas interações.

A Figura 27 apresenta fotomicrografias de colágeno total obtidas da região proximal da tíbia para os diferentes grupos experimentais.

Figura 27 – Fotomicrografias de colágeno total na região proximal da tíbia:
A) OVXSP; B) OVXSH; C) OVXEP; D) OVXEH; E) SHAMSP;
F) SHAMSH; G) SHAMEP e H) SHAMEH

6. RESULTADOS

A partir da análise das lâminas com coloração Picro-sírius foi obtida a área de colágeno na região proximal da tíbia para cada animal (Figura 28).

Figura 28 – Gráfico da área de colágeno ($\times 10^5 \mu\text{m}^2$) na região proximal da tíbia

A análise estatística apresentou diferenças significantes entre os tratamentos ($p=0,004$), com maior quantidade de colágeno nos animais treinados. As demais variáveis, assim como as interações, não resultaram em diferenças.

6.2.1.2. Densidade mineral óssea na região da diáfise da tíbia

A Figura 29 apresenta os resultados obtidos a partir da avaliação da DMO na diáfise da tíbia.

Figura 29 – Densidade mineral óssea (g/cm²) da diáfise da tíbia

A análise estatística apresentou diferenças significantes entre os tratamentos ($p=0,019$), com maior DMO para os animais treinados. As demais variáveis, assim como as interações, não resultaram em diferenças.

6.2.1.3. Ensaio mecânico de alta velocidade

A Figura 30 apresenta o ângulo em que ocorreu a fratura da tíbia, durante o ensaio de torção por impacto.

6. RESULTADOS

Figura 30 – Ângulo de fratura (°) após torção da tibia

Ao comparar o efeito das variáveis foi possível observar diferenças estatísticas entre as cirurgias ($p < 0,000$) e entre as dietas ($p = 0,031$), mas não houve diferença entre os tratamentos ($p = 0,235$). Não foi observado efeito estatisticamente significativo para as interações das variáveis.

A Figura 31 apresenta o torque máximo da tibia, obtido no ensaio de torção por impacto.

Figura 31 – Torque máximo (N.cm) durante o ensaio de torção da tibia

Ao comparar o efeito das variáveis foi possível observar diferenças estatísticas entre as cirurgias ($p=0,014$), mas não houve diferença entre os tratamentos ($p=0,676$) e entre as dietas ($p=0,744$). Não foi observado efeito estatisticamente significativo para as interações das variáveis.

6.2.2. Fêmur

6.2.2.1. Densidade mineral óssea da região proximal do fêmur

A Figura 32 apresenta os resultados obtidos a partir da avaliação da DMO da região proximal do fêmur.

Figura 32 – Densidade mineral óssea (g/cm^2) da região proximal do fêmur

A análise estatística apresentou diferenças significantes entre as cirurgias ($p<0,000$), com menor DMO para os animais OVX, e entre os tratamentos ($p=0,002$), com maior DMO para os animais treinados. A dieta, assim como as interações, não resultou em diferenças estatisticamente significantes.

6.2.2.2. Ensaio mecânico de baixa velocidade

A Figura 33 apresenta a força máxima obtida no ensaio de flexo-compressão da cabeça do fêmur.

6. RESULTADOS

Figura 33 – Força máxima (N) no ensaio de flexo-compressão da cabeça do fêmur

Analisando o efeito dos tipos de cirurgia, de tratamento e de dieta, foi possível observar que o tipo de tratamento interferiu na força máxima ($p=0,037$), com resultados maiores para o grupo treinado. O tipo de cirurgia ($p=0,079$), assim como as dietas ($p=0,159$) não resultou em diferenças estatísticas. Ao avaliar a interação entre as variáveis, foi possível observar significância estatística apenas para cirurgia*tratamento*dieta ($p=0,026$). Na comparação entre os grupos, verificaram-se diferenças entre OVXEP e SHAMEP ($p=0,037$) e entre SHAMEP e SHAMSP ($p=0,006$).

A Figura 34 apresenta a Rigidez obtida no ensaio de flexo-compressão da cabeça do fêmur.

Figura 34 – Rigidez (N/mm) no ensaio de flexo-compressão da cabeça do fêmur

Analisando o efeito dos tipos de cirurgia, de tratamento e de dieta foi possível observar que o tipo de cirurgia interferiu na rigidez ($p=0,000$), com resultados maiores para o grupo SHAM. O tipo de tratamento ($p=0,144$), assim como as dietas ($p=0,735$), não resultaram em diferenças estatísticas. Ao avaliar a interação entre as variáveis, foi possível observar significância estatística apenas para cirurgia*tratamento*dieta ($p=0,028$). Na comparação entre os grupos, verificaram-se diferenças entre OVXEH e SHAMEH ($p = 0,002$) e entre OVXSP e SHAMSP ($p = 0,001$).

7. DISCUSSÃO

A ingestão de lipídio acima do recomendado gera interferência na remodelação óssea (IONOVA-MARTIN et al., 2010; PATSCH et al., 2011; MACRI et al., 2012) , mas não há relatos sobre a ação da dieta hiperlipídica em osso após a menopausa.

A mudança dos hábitos alimentares e a ingestão cada vez maior de dietas ricas em lipídios tem gerado preocupação crescente quanto aos riscos destas dietas à saúde da população. Um dos fatores que vem sendo estudado é o efeito de dietas hiperlipídicas na qualidade óssea em diferentes situações. Este estudo buscou avaliar o efeito do treinamento em esteira nas propriedades físicas de ossos de ratas OVX submetidas à dieta hiperlipídica. Para isso utilizamos como controle a cirurgia SHAM, o sedentarismo e a dieta padrão. Nossos resultados mostraram que o treinamento em esteira melhora a qualidade óssea, e consequentemente a maioria das propriedades físicas estudadas. A cirurgia OVX acarreta em diminuição da qualidade óssea e das propriedades físicas, mas a ingestão de dieta com 30% de adição de lipídios, durante 12 semanas, pouco interfere nas propriedades físicas.

Avaliando o ganho de peso dos animais, nossos resultados mostraram que os OVX apresentaram maior ganho de peso quando comparados aos SHAM, corroborando com os achados de Hao et al. (2010). Os animais tratados com treinamento em esteira também apresentaram um maior ganho de peso. Acreditamos que este resultado seja consequência do aumento da massa muscular, que é mais densa que a gordura, além da melhor qualidade óssea apresentada pelos animais treinados.

Contrariando nossas expectativas, os animais que receberam DH não apresentaram ganho de peso significativamente maior que os outros grupos ao final das 12 semanas. O efeito da DH no ganho de peso, só foi significativo nos animais OVX e treinados, em que os animais que recebem DH apresentaram ganho de peso significativamente maior que os animais com DP. Nossos resultados divergem dos achados de Cao, Gregoire e Gao (2009), onde os autores avaliaram o efeito de DH (45% de lipídios) nos ossos de ratos C57BL/6 com seis semanas de idade, que receberam a dieta por 14 semanas. Ao avaliar o ganho de peso, os pesquisadores observaram maior peso para os animais que receberam DH durante todo o experimento. Após 14 semanas, o peso dos animais com DH era 31% maior que dos

7. DISCUSSÃO

animais com DP. Esta diferença nos resultados pode ser devido ao menor percentual de lipídios da DH utilizada em nosso estudo.

Halade et al. (2010) avaliaram o ganho de peso de animais que receberam dieta com adição de 10% de óleo de milho (OM) a partir de um ano de idade. Os autores encontraram ganho significativo de peso nos animais com dieta OM após seis meses, com maiores níveis de gordura visceral e nos tecidos dos órgãos. Apesar de não termos observado maior ganho de peso em decorrência da dieta, ao avaliarmos o percentual de gordura, na avaliação por DXA, pode-se verificar aumento significativo nesta variável nos animais com DH. Comparando a gordura intra-abdominal de animais SHAM com animais OVX, Hao et al. (2010) observaram aumento da gordura intra-abdominal nos animais OVX, e este efeito foi suprimido pela ação da reposição de estrógeno ou pela prática de exercícios físicos.

Um estudo realizado por Gnudi, Sitta, Fiume (2007) relata que a relação entre o conteúdo mineral ósseo, a DMO e a composição corporal é diferente em mulheres com ou sem osteoporose. Em mulheres osteoporóticas, a massa magra e o percentual de gordura estão diretamente associados com o conteúdo mineral ósseo e a DMO, mas em mulheres sem osteoporose, somente a massa magra tem relação direta com a composição corporal e DMO (PETIT et al., 2004). O mesmo foi observado por Cui et al. (2007), que encontraram correlação positiva entre a massa gorda e a DMO em mulheres após a menopausa. A massa magra e a gordura contribuem com a DMO do quadril e a massa magra influencia ligeiramente mais que a gordura (HSIEH et al., 2001).

Há controvérsias entre a relação da composição corporal e a qualidade óssea. Gilsanz et al. (2010) e Yerges-Armstrong (2010), descrevem em seus estudos a correlação positiva entre o percentual de gordura e a DMO, porém estes autores não avaliaram a massa corpórea total. Já Katzmarzyk et al. (2012) relataram em seu estudo a correlação negativa entre o tecido subcutâneo adiposo e a DMO em humanos, este mesmo comportamento foi observado por Yamaguchi et al. (2009) que avaliaram esta relação em mulheres com diabetes tipo II após a menopausa.

Dados epidemiológicos mostram que maior peso corporal ou índice de massa corpórea (IMC) tem uma correlação positiva com a massa óssea, e a perda de peso

pode causar perda de massa óssea (GUNEY et al., 2003; RADAK, 2004; GNUDI; SITTA; FIUME, 2007). Assim, o aumento da massa corpórea após a menopausa pode ser um fator preventivo a osteoporose. Em estudo com coortes, Beck et al. (2009) observaram que a diminuição do IMC resultava em aumento do risco de fratura de quadril e vértebra em adultos.

A utilização de dietas lipídicas com diferentes tipos de gordura (saturada / poli-insaturada) pode resultar em diferentes efeitos sobre a qualidade óssea. No estudo realizado por Macri et al. (2012), a dieta rica em gordura saturada (banha bovina) resultou em diminuição da DMO de vértebras de ratos após 8 semanas, mas a utilização de dieta rica em gordura poli-insaturada (óleo de milho) resulta em DMO intermediária, estatisticamente semelhante tanto ao controle, quanto ao grupo com gordura saturada.

No estudo realizado por Iwaniec et al. (2009), os autores avaliaram o efeito de DH (45% de gordura) sobre a massa óssea e correlacionaram a massa óssea e o peso dos animais. Os autores encontraram correlação positiva entre massa óssea e o peso para animais com DP com diferentes idades, mas o mesmo não foi observado para os animais com DH. Halade et al. (2010), ao avaliarem a perda de massa óssea por DMO (DXA) em diferentes regiões da tíbia e do fêmur, encontraram menores valores para os animais com dieta DH associada à idade.

Nossos resultados de DMO divergem dos resultados obtidos por Patsch et al. (2011), que estudaram o efeito de dieta com 60% de lipídios em ratos machos, com sete semanas de idade, por 24 semanas, em que o primeiro grupo recebeu DP, o segundo recebeu DP por 21 semanas e DH por três semanas e o terceiro DH por 24 semanas. Os autores observaram que, os dois grupos que receberam DH apresentaram diminuição da DMO comparado com o controle, sem apresentar diferença entre os dois. A avaliação do volume ósseo por μ CT confirmou os resultados do DXA sendo que, a espessura do osso cortical não foi afetada pela dieta. Esta divergência de resultados pode estar relacionada à maior idade dos animais ao final do experimento, como já descrito por Halade et al. (2010), os animais mais velhos são mais susceptíveis aos efeitos da DH.

A ferramenta padrão para a medida da DMO na maioria dos estudos em humanos é o DXA, que fornece precisão e reprodutibilidade em uma dose

7. DISCUSSÃO

relativamente baixa de radiação. No entanto, o DXA é problemático na medida em que é impossível medir a densidade óssea volumétrica e distinguir osso cortical de trabecular. Esta incapacidade de diferenciar entre as respostas de osso cortical x trabecular, pode explicar os resultados conflitantes sobre a relação entre obesidade e osteoporose que encontramos na literatura. O estudo realizado por Premaor et al. (2010) em coorte 1005 de mulheres após a menopausa com menos de 75 anos mostrou forte relação entre fraturas de baixo impacto e obesidade, e obesidade mórbida, que apesar de 59,1% das classificadas como obesas e 73,1% das classificadas com obesidade mórbida apresentarem DMO normal, estas tiveram fratura de baixo impacto.

Além disso, o efeito de DH pode ser mais evidente quando associado com doenças. Resultados encontrados por Lac et al. (2008) sugerem que massa gorda atua sobre a DMO não só por via de fatores mecânicos, mas também por meio de adipocinas como leptina e adiponectina. Correlação negativa entre adiponectina e DMO é descrita por Lenchik et al. (2003). Em humanos, a diabetes tipo I está associada à osteopenia (BOUILLON, 1991). Uma das razões para pacientes com diabetes do tipo II não apresentarem osteopenia é o fato da obesidade estar relacionada com o aumento da massa óssea e uma redução na incidência de osteoporose. Na prática de exercícios, a DMO está relacionada com a massa magra (MATHEY et al., 2002) e a massa gorda principalmente ao sedentarismo (REID et al., 1995) e/ou a pós-menopausa em mulheres (RIBOT et al., 1987; ALOIA et al., 1995).

Bartelt et al. (2010) realizaram um estudo com ratos que receberam DH com 35% de lipídios e DP com 7% de lipídios em que, os autores não observaram mudanças na massa óssea das vértebras lombares, no número de células ósseas, na formação e reabsorção óssea após o consumo da DH por 16 semanas. Corroborando com nossos achados. Em seu estudo, Bartelt et al. (2010) apresentou diferentes aspectos sobre a relação entre a gordura e o osso. Um dos fatores apresentados é que, o impacto de alguns fatores discutidos e associados com a mudança da massa óssea como a obesidade, a hiperlipidemia e a hiperglicemia são modificadas pela presença ou ausência de apolipoproteína E, mas nenhuma dessas variáveis é capaz de induzir mudanças na massa óssea por si só. Pelo estudo

destes autores, a obesidade não tem relação direta com o aumento de massa óssea. Estes resultados corroboram com os achados de Rosen e Klibanski (2009), que não encontraram correlação entre o ganho do peso com o aumento da massa óssea. Resultados semelhantes foram encontrados em humanos (HSU et al., 2006; LOOKER; FLEGAL; MELTON 3rd, 2007 e JANICKA et al., 2007).

Ao avaliarmos os níveis de glutathione reduzida (GSH), parâmetro utilizado para avaliar o sistema de defesa antioxidante dos animais, não encontramos alterações significantes para os diferentes grupos estudados. Num estudo realizado por Franco (2007) os níveis de GSH apresentaram-se significativamente diferentes entre os grupos sedentários e exercitados. O autor encontrou níveis de GSH mais altos nos animais treinados em relação aos sedentários com a mesma dieta. Estes resultados diferem dos nossos achados, pois não encontramos alterações significantes nos níveis de GSH para os diferentes grupos estudados. Acreditamos que esta divergência seja resultado dos diferentes métodos de treinamentos empregados, os autores avaliaram os níveis de GSH em ratos submetidos a treinamento de natação com sobrecarga, o que possivelmente gera maior estresse e maior nível de GSH.

Em nosso estudo, observamos aumento dos níveis séricos de MDA nos animais que receberam DH. Em um estudo realizado em ratas grávidas, Liang et al. (2010) observaram o aumento dos níveis séricos de malonaldeído (MDA) na placenta das ratas que receberam dieta com adição de 30% de lipídios. Observamos também, maior nível de MDA em animais treinados em comparação com os animais sedentários, mostrando maior estresse oxidativo resultante do treinamento físico.

Em estudo realizado por Xiao et al. (2011), os autores avaliaram o efeito da dieta rica em gordura dislipidêmica no sistema antioxidante ósseo e no metabolismo ósseo de ratos machos após 13 semanas de experimento. Os autores utilizaram dietas com 21,2% de gordura, com ou sem a adição de 0,1% de ácido lipóico. Com isso observaram o aumento do peso corporal e dos níveis de MDA, com diminuição do conteúdo mineral ósseo e de cálcio nos fêmures dos animais com DH. Os animais, que receberam 0,1% de ácido lipóico juntamente com a DH, apresentaram valores semelhantes ao grupo controle e diferentes dos DH. Pelos seus achados, os autores sugerem que a dieta rica em gordura não apenas inibe a formação óssea e a

7. DISCUSSÃO

atividade osteoblástica, mas também aumenta a reabsorção óssea e a atividade osteoclástica.

Ao avaliar a área de osso trabecular na região proximal da tíbia, encontramos menores valores associados a animais OVX em relação aos animais SHAM. Estes resultados sugerem que a ovariectomia provocou diminuição da densidade trabecular óssea. Também foram encontradas diferenças entre animais treinados e sedentários, com os animais treinados apresentando melhores resultados. Esta melhora na quantidade de osso trabecular, resultante do treinamento físico, fica mais evidente nos animais SHAM. A dieta não resultou em diferenças estatisticamente significantes.

Ao avaliarmos a espessura do osso cortical em três diferentes regiões ao longo do comprimento da tíbia, não encontramos diferença entre os grupos experimentais, com exceção para animais OVX que receberam DH, que apresentaram maior espessura na diáfise da tíbia, quando comparados com os que receberam DP.

Nossos resultados para osso cortical estão de acordo com os achados de Cao, Gregoire e Gao (2009), que ao avaliarem por μ CT parâmetros relativos ao osso cortical da tíbia, e não encontraram diferenças entre os animais que receberam diferentes dietas. No entanto, ao avaliarem o osso trabecular, na região proximal da tíbia, foram encontradas diferenças entre os grupos, com diminuição do volume de osso trabecular em animais com DH. Ao compararem a espessura das trabéculas, não houve diferença entre os grupos, mas houve diferença na quantidade de trabéculas nos animais com DH, onde estas eram menores do que dos animais com DP. Segundo os autores, estes achados sugerem que a reabsorção óssea pode ser aumentada em animais com DH. Acreditamos que essas divergências de resultados ocorreram pelas diferenças nos modelos experimentais, uma vez que os autores utilizaram dieta com 45% de lipídios por um período de 14 semanas.

Em nosso estudo, não encontramos diferença entre as dietas, e na força máxima no ensaio de flexo-compressão do fêmur. Uma vez que não observamos diminuição do trabeculado ósseo da tíbia pela dieta, não esperávamos diferença na resistência. Divergindo de nossos resultados, o estudo realizado por Woo et al. (2009), observou diminuição do volume de osso trabecular em vértebras de ratos

machos com 6 semanas após 15 semanas de ingestão de DH. Em análise pelo método dos elementos finitos, os autores observaram a diminuição da resistência óssea das vértebras, resultante da diminuição do volume de osso após a utilização da dieta. Pelo fato de não termos encontrado diferença no volume trabecular ósseo associado à dieta, também não encontramos diminuição da força máxima nestes.

Brahmabhatt et al. (1998), observaram que o ganho de peso por dieta que induz a obesidade, pode gerar melhora nos fatores biomecânicos (como força máxima e energia absorvida) em ratos, estes achados são tanto para o osso cortical como para o osso trabecular. Este estudo também mostrou que ao avaliar o conteúdo de cinzas de osso cortical e esponjoso, era inferior para os ratos obesos cujo peso corpóreo era 19 % maior que os controles, indicando desmineralização.

Ao avaliarmos o ângulo de fratura no ensaio de torção, verificamos maior ângulo nos animais OVX e nos animais que receberam DH. Diante destes resultados, acreditamos que ocorreu uma diminuição da mineralização do osso cortical, tornando-o mais resiliente, permitindo assim uma maior deformação até a ruptura. No estudo de Ionova-Martin et al. (2010) foi observado aumento do tamanho dos fêmures, porém, com diminuição da qualidade do osso nos ratos que receberam dieta com 60% de lipídios por seis semanas. Assim, a ausência de diferença estatística entre as espessuras de osso cortical não representariam resultados semelhantes na resistência à deformação.

Ao avaliarmos a resistência mecânica do osso cortical ao impacto, o torque máximo após o ensaio de torção em alta velocidade foi influenciado pelo tipo de cirurgia realizada, com maiores valores para os animais OVX. Em nosso estudo, foi possível observar uma tendência ao aumento do torque máximo para os animais com DH, porém, sem diferenças estatísticas. Estes resultados diferem dos achados de Wohl et al. (1998), que tiveram como objetivo avaliar a resistência mecânica do osso cortical. Para isso, os autores realizaram ensaio de flexão de três pontos em tíbias de galinhas, após a ingestão de diferentes dietas com adição de lipídeo, por 20 semanas. Os autores não encontraram diferenças entre os grupos com dieta lipídica. Estes foram estatisticamente superiores aos valores observados no grupo controle: tanto para a força máxima quanto para a rigidez. Ao avaliarem a resistência do osso cortical, os autores observaram que há uma tendência a diminuição das

7. DISCUSSÃO

propriedades mecânicas nos animais com DH em comparação aos animais com dieta com baixo teor de gordura, sem diferenças estatísticas. Essa tendência também foi observada em relação ao volume de osso trabecular na região proximal da tíbia. Os autores concluíram que, o efeito deletério da dieta lipídica é mais evidente em ossos jovens ainda em formação em comparação com o osso maduro, em que há remodelação.

Nossos resultados corroboram os achados de Fried et al. (2012). Os autores avaliaram ratos machos submetidos à DH por 8 semanas, porém, não encontraram diferenças nos parâmetros morfométricos do osso cortical, e nem na resistência mecânica das tíbias submetidas ao ensaio de flexão de três pontos. Num estudo realizado por Shen et al. (2012), os autores avaliaram a resistência mecânica do osso cortical em fêmures de ratas submetidas à DH, e observaram redução significativa da força máxima no ensaio de flexão de três pontos. Em nosso estudo, não foi possível observar o efeito da DH nas propriedades físicas de ossos de ratos. No estudo realizado por Parhami et al. (2001), os autores observaram diferenças apenas em animais com suscetibilidade geneticamente diferente para lipídios oxidados e aterogênese, após 7 meses de ingestão de dieta com 15,8% de lipídios. Assim, acreditamos que o efeito deletério da DH possa estar intimamente ligado a propensão genética de desenvolvimento da obesidade.

O exercício físico pode aumentar a massa óssea, tanto em animais experimentais quanto em humanos (NEWHALL et al., 1991; HATORI et al., 1993). Este efeito positivo foi encontrado tanto em animais sem cirurgia, bem como em OVX (BARENGOLTS et al., 1994; TUUKKANEN; PENG e VAANANEN, 1994). Em nosso estudo, a realização de treinamento resultou em ganho estatisticamente significativo na força máxima, mas não na rigidez durante o ensaio de flexo-compressão do fêmur, independente da cirurgia realizada ou dieta utilizada. A análise histológica da matriz de colágeno da região proximal da tíbia mostrou que, o treinamento em esteira resulta em maior área de colágeno que a observada em animais sedentários. O estudo do colágeno é importante para entender o comportamento mecânico do osso (RIZK et al., 2008), existindo uma relação complexa entre ele e a mineralização óssea (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Os autores relatam que, alterações na matriz de colágeno podem influenciar na

disposição dos minerais, e consequentemente na resposta mecânica do osso. Acreditamos que a maior força máxima observada em animais treinados esteja diretamente relacionada com a maior área de colágeno encontrada nestes animais.

Nossos resultados após o treinamento em esteira a 17m/min. diferem dos achados de Peng et al. (1997), que não encontraram melhora após treinamento a 18m/min., mas encontraram após treinamento a 10m/min. Acreditamos que esta diferença seja resultante dos diferentes protocolos de exercícios utilizados. Em nosso estudo, realizamos adaptação tanto do tempo quanto da velocidade, já os autores utilizaram a mesma velocidade de treino desde o início do experimento.

Resultados semelhantes aos de Peng et al. (1997) foram encontrados por Barengolts et al. (1993), que também observaram que uma velocidade relativamente baixa de treinamento (12 m/min.) foi mais eficiente na prevenção de perda óssea, induzida por OVX, do que o treinamento de maior intensidade (21 m/min.). Estes resultados sugerem que a intensidade do exercício pode ser de importância crítica. A fim de melhorar as propriedades mecânicas do osso por meio de exercício é, portanto, importante utilizar uma intensidade ótima. Uma vez que encontramos resultados positivos decorrentes de treino com aumento de intensidade gradual, acreditamos que períodos de adaptação mais elaborados e suaves podem trazer benefícios frente a grandes intensidades em curto prazo.

Assim como no estudo realizado por Barengolts et al. (1993) e Peng et al. (1997), os resultados mais eficientes foram observados nos animais com um peso corporal mais elevado, é possível que o aumento da carga sobre os ossos, por causa de um maior peso do corpo é tão importante quanto o tipo do exercício.

As avaliações de força máxima no ensaio de flexo-compressão do colo do fêmur não mostraram diferenças referentes à OVX. Em contrapartida, foi observada maior rigidez nos animais SHAM. Os resultados de rigidez também estão de acordo com os dados obtidos a partir de medições de volume de osso trabecular e mostra o efeito da deterioração óssea pela ovariectomia. Por outro lado, o aumento do torque da tíbia foi observado após a ovariectomia. Segundo Peng et al. (1997), a ovariectomia realizada em animais adultos jovens pode trazer mudanças notáveis na geometria do osso (aumento do diâmetro externo), de tal forma que em testes realizados no osso cortical, estas alterações podem superar todos os efeitos de

7. DISCUSSÃO

deterioração possíveis a nível estrutural do osso. No estudo realizado por Pirih et al. (2012), os autores não encontraram diferenças significantes entre ratas que receberam DP e os que receberam DH por 13 semanas, tanto pela comparação do volume ósseo / volume total quanto pela porosidade do osso cortical, através de μ CT. Também não foi encontrada diferença entre os dois grupos estudados para a rigidez e a força máxima.

Um efeito conhecido da ovariectomia é o aumento do peso corporal e da taxa de crescimento em ratos jovens. Assim, ao avaliar o efeito da ovariectomia na resistência do osso cortical, é importante considerar que as alterações causadas na geometria do osso podem mascarar o enfraquecimento do mesmo (Peng et al., 1997). Eventuais diferenças entre espécies também devem ser lembradas, principalmente quando comparamos nossos resultados com os obtidos a partir de estudos em seres humanos.

O estudo realizado por Fujita, Watanabe e Maki (2012) descreve a diminuição da qualidade óssea como resultante do tipo de gordura adicionada à dieta. Os autores acreditam que, a ingestão de dieta rica em gorduras por ratos, provoca um aumento da reabsorção óssea e inibe a formação de osso, em vez de afetar diretamente a massa óssea. Embora tenham observado formação mais lenta de osso cortical em ratos com DH em comparação com ratos de controle, a formação óssea sobre a superfície periosteal aumentou com a idade. Estes resultados provavelmente refletem uma alta taxa de remodelação óssea em animais jovens. Além disso, ratos com DH não mostraram uma diminuição significativa na área da seção transversal de osso cortical, quando comparados com o grupo controle até 19 semanas, indicando que a arquitetura do osso trabecular tem resposta mais rápida do que o osso cortical a uma dieta rica em gordura. Neste estudo, os autores questionam a capacidade de avaliação da perda óssea por DXA, uma vez que este método não traz detalhes, como diferenciação de osso trabecular e cortical e sugerem que o método ideal seria o μ CT, por permitir esta diferenciação.

Desde o início dos estudos sobre o efeito de DH na qualidade óssea, os efeitos deletérios da dieta, tanto na microestrutura quanto na resistência mecânica, vêm sendo observados em ratos. E pelo fato da obesidade ser uma doença multifatorial, no enfraquecimento ósseo, outros parâmetros devem ser observados,

como o tempo de ingestão, idade e a quantidade de lipídeo. Neste caso, 30% de lipídio na ração durante 12 semanas pode ter sido pouco para influenciar diretamente nas propriedades físicas dos ossos analisados.

Muitos autores relacionam a maior massa corporal com a melhor qualidade óssea em mulheres pós-menopausa. Assim, poderíamos acreditar que, o modelo utilizado neste estudo não seria adequado para a correlação com humanos. No entanto, estudos recentes tem mostrado uma relação diferente da obesidade com a qualidade óssea, como a coorte estudada por Preamor et al. (2010).

Rosen e Klibanski (2009) descreveram a relação direta entre a origem das células de gordura e ósseas, que são originadas da mesma célula-tronco da medula óssea. Em um estudo realizado por Halade et al. (2011), os autores observaram por marcadores imunohistoquímicos que, a obesidade em ratas é acompanhada pelo aumento da reabsorção óssea e redução da massa óssea. Isto é ocasionado pela mudança no metabolismo de gordura, que leva ao aumento da obesidade, afetando assim a saúde do sistema músculo-esquelético e estimulando a osteoclastogênese.

Assim, não encontramos diferenças significativas nas análises dos ossos para a DMO, as características histomorfométricas e a resistência mecânica, utilizando a dieta com 30% de lipídios. Por isso, propomos que novos estudos sejam realizados, pois o efeito deletério da dieta hiperlipídica pode estar relacionado com diferentes fatores, como por exemplo, a pré-disposição genética.

8. CONCLUSÃO

8. CONCLUSÃO

O treinamento físico em esteira resulta em maior ganho de peso. O treinamento físico em esteira associado à dieta hiperlipídica aumenta os níveis de malondialdeído, mas não altera os níveis de glutathione reduzida. O treinamento físico em esteira melhorou a microarquitetura trabecular óssea, mas não foi suficiente para sensibilizar o tecido cortical. A dieta hiperlipídica com 30% de lipídios, no período de estudado, não interferiu na qualidade óssea.

REFERÊNCIAS

²ALOIA, J. F.; VASWANI, A.; MA, R.; FLASTER, E. To what extent is bone mass determined by fat-free or fat mass? **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 61, n. 5, p. 1110-4, 1995.

ARMAMENTO-VILLAREAL, R.; NAPOLI, N.; DIEMER, K.; WATKINS, M.; CIVITELLI, R.; TEITELBAUM, S.; NOVACK, D. Bone turnover in bone biopsies of patients with low-energy cortical fractures receiving bisphosphonates: A case series. **Calcified Tissue International**, v. 85, n. 1, p. 37-44, 2009.

BARENGOLTS, E. I.; CURRY, D. J.; BAPNA, M. S.; KUKREJA, S. C. Effects of two non-endurance exercise protocols on established bone loss in ovariectomized adult rats. **Calcified Tissue International**, v. 52, n. 3, p. 239-43, 1993.

BARENGOLTS, E. I.; LATHON, P. V.; CURRY, D. J.; KUKREJA, S. C. Effects of endurance exercise on bone histomorphometric parameters in intact and ovariectomized rats. **Bone and mineral**, v. 26, n. 2, p. 133-40, 1994.

BARSALANI, R.; CHAPADOS, N. A.; LAVOIE, J. M. Hepatic VLDL-TG production and MTP gene expression are decreased in ovariectomized rats: effects of exercise training. **Hormone and Metabolic Research**, v. 42, n. 12, p. 860-7, 2010.

BARTELT, A.; BEIL, F. T.; SCHINKE, T.; ROESER, K.; RUETHER, W.; HEEREN, J.; NIEMEIER, A. Apolipoprotein E-dependent inverse regulation of vertebral bone and adipose tissue mass in C57Bl/6 mice: modulation by diet-induced obesity. **Bone**, v. 47, n. 4, p. 736-45, 2010.

BATTRAW, G. A.; MIERA, V.; ANDERSON, P. L.; SZIVEK, J. A. Bilateral symmetry of biomechanical properties in rat femora. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 32, n. 2, p. 285-8, 1996.

BECK, T. J.; PETIT, M. A.; WU, G.; LEBOFF, M. S.; CAULEY, J. A.; CHEN, Z. Does obesity really make the femur stronger? BMD, geometry, and fracture incidence in the women's health initiative-observational study. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 24, n. 8, p. 1369-79, 2009.

BIKLE, D. D.; SAKATA, T.; HALLORAN, B. P. The impact of skeletal unloading on bone formation. **Gravitational and Space Biology Bulletin**, v. 16, n. 2, p. 45-54, 2003. Review.

² Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) – NBR 6023

REFERÊNCIAS

- BOUILLON, R. Diabetic bone disease. **Calcified Tissue International**, v. 49, n. 3, p. 155-60, 1991.
- BRAHMABHATT, V.; RHO, J.; BERNARDIS, L.; GILLESPIE, R.; ZIV, I. The effects of dietary-induced obesity on the biomechanical properties of femora in male rats. **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders**, v. 22, n. 8, p. 813-8, 1998.
- BRUYERE, O.; BRANDI, M. L.; BURLET, N.; HARVEY, N.; LYRITIS, G.; MINNE, H.; BOONEN, S.; REGINSTER, J. Y.; RIZZOLI, R.; AKESSON, K. Post-fracture management of patients with hip fracture: a perspective. **Current Medical Research and Opinion**, v. 24, n. 10, p. 2841-51, 2008.
- CAO, J. J.; GREGOIRE, B. R.; GAO, H. High-fat diet decreases cancellous bone mass but has no effect on cortical bone mass in the tibia in mice. **Bone**, v. 44, n. 6, p. 1097-104, 2009.
- CHESNUT, C. H. 3rd.; MCCLUNG, M. R.; ENSRUD, K. E.; BELL, N. H.; GENANT, H. K.; HARRIS, S. T.; SINGER, F. R.; STOCK, J. L.; YOOD, R. A.; DELMAS, P. D, et al. Alendronate treatment of the postmenopausal osteoporotic woman: effect of multiple dosages on bone mass and bone remodeling. **The American Journal of Medicine**, v. 99, n. 2, p. 144-52, 1995.
- COMPSTON, J. E. Sex steroids and bone. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 1, p. 419-47, 2001. Review.
- CUI, L.H.; SHIN, M.H.; KWEON, S.S.; PARK, K.S.; LEE, Y.H.; CHUNG, E.K.; NAM, H.S.; CHOI, J.S. Relative contribution of body composition to bone mineral density at different sites in men and women of South Korea. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 25, n. 3, p. 165-71, 2007.
- DELYE, H.; VERSCHUEREN, P.; DEPREITERE, B.; VERPOEST, I.; BERCKMANS, D.; SLOTEN, J.; PERRE, G.; GOFFIN, J. Biomechanics of frontal skull fracture. **Journal of Neurotrauma**, v. 24, n. 10, p. 1576 – 85, 2007.
- DINIZ, Y.S.; BURNEIKO, R.M.; SEIVA, F.R.; ALMEIDA, F.Q.; GALHARDI, C.M.; FILHO, J.L.; MANI, F.; NOVELLI, E.L. Diet compounds, glycemic index and obesity-related cardiac effects. **International journal of cardiology**, v. 124, n. 1, p. 92-9, 2008.
- DRIUSSO P. (2000). **Efeitos de um programa de atividade física na qualidade de vida de mulheres com osteoporose**. São Carlos - 2000. 137p. Dissertação

(Mestrado em Fisioterapia) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2000.

DOREN, M.; GREISER, E. M. Postmenopausal hormone therapy in clinical perspective. **Menopause**, v. 15, n. 1, p. 204-5, 2008.

EASTELL, R. Management of osteoporosis due to ovarian failure. **Medical and Pediatric Oncology**, v. 41, n. 3, p. 222-7, 2003. Review.

EINHORN, T. A. Biomechanics of bone. In: BILEZIKIAN, J.P.; RAISZ, L.G.; RODAN, G.A. **Principles of Bone Biology**. San Diego: Academic Press, 1996. Cap.3, p. 25-37.

FRANCO, L. D. P. **Dieta hiperlipídica e exercício físico**: consequências sobre o metabolismo e a peroxidação lipídica - estudo em modelo animal. Araraquara, 2007. 107 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2007.

FRIED, A.; MANSKE, S. L.; ELLER, L. K.; LORINCZ, C.; REIMER, R. A.; ZERNICKE, R. F. Skim milk powder enhances trabecular bone architecture compared with casein or whey indiet induced obese rats. **Nutrition**, v. 28, n. 3, p. 331-5, 2012.

FUJITA, Y.; WATANABE, K.; MAKI, K. Serum leptin levels negatively correlate with trabecular bone mineral density in high-fat diet-induced obesity mice. **Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions**, v. 12, n. 2, p. 84-94, 2012.

GERBAIX, M.; METZ, L.; MAC-WAY, F.; LAVET, C.; GUILLET, C.; WALRAND, S.; MASGRAU, A.; VICO, L.; COURTEIX, D. A well-balanced diet combined or not with exercise induces fat mass loss without any decrease of bone mass despite bone micro-architecture alterations in obese rat. **Bone**, v. 53, n. 2, p. 382-90, 2013.

GILSANZ, V.; CHALFANT, J.; MO, A. O.; LEE, D. C.; DOREY, F. J.; MITTELMAN, S. D. Reciprocal relations of subcutaneous and visceral fat to bone structure and strength. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** v. 94, n. 9, p. 3387-93, 2009.

GNUDI, S.; SITTA, E.; FIUME, N. Relationship between body composition and bone mineral density in women with and without osteoporosis: relative contribution of lean and fat mass. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 25, n. 5, p. 326–32, 2007.

REFERÊNCIAS

GOULD, J.A. 3rd. **Fisioterapia na ortopedia e na medicina do esporte**. Tradução Alfredo Jorge Cherem. São Paulo: Manole, 1993.

GRIMSTON, S.K.; WILLOWS, N.D.; HANLEY, D.A. Mechanical loading regime and its relationship to bone mineral density in children. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 25, n. 11, p. 1203-10, 1993.

GUNEY, E.; KISAKOL, G.; OZGEN, G.; YILMAZ, C.; YILMAZ, R.; KABALAK, T. Effect of weight loss on bone metabolism: comparison of vertical banded gastroplasty and medical intervention. **Obesity Surgery**, v. 13, n. 3, p. 383–8, 2003.

GUPTA, A. Osteoporosis in India--the nutritional hypothesis. **The National Medical Journal of India**, v. 9, n. 6, p. 268-74, 1996.

HALADE, G. V.; RAHMAN, M. M.; WILLIAMS, P. J.; FERNANDES, G. High fat diet-induced animal model of age-associated obesity and osteoporosis. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 21, n. 12, p. 1162-9, 2010.

HALADE, G. V.; JAMALI, A. E.; WILLIAMS, P. J.; FAJARDO, R. J.; FERNANDES, G. Obesity-mediated inflammatory microenvironment stimulates osteoclastogenesis and bone loss in mice. **Experimental Gerontology**, v. 46, n. 1, p. 43-52, 2011.

HAO, L.; WANG, Y.; DUAN, Y.; BU, S. Effects of treadmill exercise training on liver fat accumulation and estrogen receptor alpha expression in intact and ovariectomized rats with or without estrogen replacement treatment. **European Journal of Applied Physiology**, v. 109, n. 5, p. 879-86, 2010.

HATORI, M.; HASEGAWA, A.; ADACHI, H.; SHINOZAKI, A.; HAYASHI, R.; OKANO, H.; MIZUNUMA, H.; MURATA, K. The effects of walking at the anaerobic threshold level on vertebral bone loss in postmenopausal women. **Calcified Tissue International**, v. 52, n. 6, p. 411-4, 1993.

HOCH, A. Z.; STAVRAKOS, J. E.; SCHIMKE, J. E. Prevalence of female athlete triad characteristics in a club triathlon team. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 88, n.5, p. 681-2, 2007.

HOGAN, H. A.; RUHMANN, S. P.; SAMPSON, H. W. The mechanical properties of cancellous bone in the proximal tibia of ovariectomized rats. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 15, n. 2, p. 284-92, 2000.

HORATH, L. **Fundamentals of materials science for technologists – properties, testing and laboratory exercises**. New Jersey, Prentice Hall, p. 355-360. 1995.

HSIEH, Y. F.; ROBLING, A. G.; AMBROSIOUS, W. T.; BURR, D. B.; TURNER, C. H. Mechanical loading of diaphyseal bone in vivo: the strain threshold for an osteogenic response varies with location. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 16, n. 12, p. 2291-7, 2001.

HSU, Y. H.; VENNERS, S. A.; TERWEDOW, H. A.; FENG, Y.; NIU, T.; LI, Z.; LAIRD, N.; BRAIN, J. D.; CUMMINGS, S. R.; BOUXSEIN, M. L.; ROSEN, C. J.; XU, X. Relation of body composition, fat mass, and serum lipids to osteoporotic fractures and bone mineral density in Chinese men and women. **The American Journal of Clinical Nutrition** v. 83, n. 1, p. 146-54, 2006.

IONOVA-MARTIN, S. S.; DO, S. H.; BARTH, H. D.; SZADKOWSKA, M.; PORTER, A. E.; AGER, J.W.3rd; AGER, J. W. Jr.; ALLISTON, T.; VAISSE, C.; RITCHIE, R. O. Reduced size-independent mechanical properties of cortical bone in high-fat diet-induced obesity. **Bone**, v. 46, n. 1, p. 217-25, 2010.

IWANIEC, U. T.; DUBE, M. G.; BOGHOSSIAN, S.; SONG, H.; HELFERICH, W. G.; TURNER, R. T.; KALRA, S. P. Body mass influences cortical bone mass independent of leptin signaling. **Bone**, v. 44, n. 3, p. 404-12, 2009.

JANICKA, A.; WREN, T. A.; SANCHEZ, M. M.; DOREY, F.; KIM, P. S.; MITTELMAN, S. D.; GILSANZ, V. Fat mass is not beneficial to bone in adolescents and young adults. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 92, n. 1, p. 143-7, 2007.

JOHNELL, O. Advances in osteoporosis: better identification of risk factors can reduce morbidity and mortality. **Journal of Internal Medicine**, v. 239, n. 4, p. 299-304, 1996. Review.

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

KALU, D. N. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. **Bone and Mineral**, v. 15, n. 3, p. 175-91, 1991. Review.

KATZMARZYK, P. T.; BARREIRA, T. V.; HARRINGTON, D. M.; STAIANO, A. E.; HEYMSFIELD, S. B.; GIMBLE, J. M. Relationship between abdominal fat and bone

REFERÊNCIAS

mineral density in white and African American adults. **Bone**, v. 50, n. 2, p. 576-9, 2012.

KEMMLER, W.; von STENGEL, S.; BEBENEK, M.; ENGELKE, K.; HENTSCHEKE, C.; KALENDER, W. A. Exercise and fractures in postmenopausal women: 12-year results of the Erlangen Fitness and Osteoporosis Prevention Study (EFOPS). **Osteoporosis International**, v. 23, n. 4, p. 1267-76, 2012.

KIN, C. F.; SHAN, W. S.; SHUN, L. J.; CHUNG, L. P.; JEAN, W. Experience of famine and bone health in post-menopausal women. **International Journal of Epidemiology**, v. 36, n. 5, p. 1143-50, 2007.

LAC, G.; CAVALIE, H.; EBAL, E.; MICHAUX, O. Effects of a high fat diet on bone of growing rats. Correlations between visceral fat, adiponectin and bone mass density. **Lipids in health and disease**, v. 7, p.16, 2008.

LEITE, R. D.; PRESTES, J.; BERNARDES, C. F.; SHIGUEMOTO, G. E.; PEREIRA, G. B.; DUARTE, J. O.; DOMINGOS, M. M.; BALDISSERA, V.; de ANDRADE PEREZ, S. E. Effects of ovariectomy and resistance training on lipid content in skeletal muscle, liver, and heart; fat depots; and lipid profile. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 34, n. 6, p. 1079-86, 2009.

LEITE, R. D.; PRESTES, J.; PEREIRA, G. B.; SHIGUEMOTO, G. E.; PEREZ, S. E. Menopause: highlighting the effects of resistance training. **International Journal of Sports Medicine**, v. 31, n. 11, p. 761-7, 2010.

LENCHIK, L.; REGISTER, T.C.; HSU, F. C.; LOHMAN, K.; NICKLAS, B. J.; FREEDMAN, B. I.; LANGEFELD, C. D.; CARR, J. J.; BOWDEN, D. W. Adiponectin as a novel determinant of bone mineral density and visceral fat. **Bone**, v. 33, n. 4, p. 646-51, 2003.

LEONARDI, D. S.; FERES, M. B. C.; PORTARI, G. V.; ZANUTO, S.; JORDÃO, A. A. Low-carbohydrate and high-fat diets on the promotion of hepatic steatosis em rats. **Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes**, v. 118, n. 10, p. 724-9, 2010.

LESPESSAILLES, E.; GADOIS, C.; LEMINEUR, G.; DO-HUU, J. P.; BENHAMOU, L. Bone texture analysis on direct digital radiographic images: precision study and relationship with bone mineral density at the os calcis. **Calcified Tissue International**, v. 80, n. 2, p. 97-102, 2007.

LIANG, C.; DECOURCY, K.; PRATER, M. R. High-saturated-fat diet induces gestational diabetes and placental vasculopathy in C57BL/6 mice. **Metabolism: clinical and experimental**, v. 59, n. 7, p. 943-50, 2010.

LINDSAY, R. Clinical utility of biochemical markers. **Osteoporosis International**, v. 9, p. S29-32, 1999. Supplement 2

LOOKER, A. C.; FLEGAL, K. M.; MELTON, L. J. 3rd. Impact of increased overweight on the projected prevalence of osteoporosis in older women. **Osteoporosis International**, v. 18, n. 3, p. 307-13, 2007.

MACRI, E. V.; GONZALES CHAVES, M. M.; RODRIGUEZ, P. N.; MANDALUNIS, P.; ZENI, S.; LIFSHITZ, F.; FRIEDMAN, S. M. High-fat diets affect energy and bone metabolism in growing rats. **European Journal of Nutrition**, v. 51, n. 4, p. 399-406, 2012.

MARIN, J. **Mechanical behavior of engineering materials**. New Jersey, Prentice-Hall, p. 237-271. 1962.

MARTINS, S. M.; LUCENA, S. E. **Instrumentação de um pêndulo de impacto charpy**. 17º CBECI Mat - Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, de Novembro de 2006, Foz do Iguaçu, PR, Brasil.

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

MAUREL, D. B.; BOISSEAU, N.; PALLU, S.; ROCHEFORT, G. Y.; BENHAMOU, C. L.; JAFFRE, C. Regular exercise limits alcohol effects on trabecular, cortical thickness and porosity, and osteocyte apoptosis in the rat. **Joint Bone Spine**, v. 80, n. 5, p. 492-8, 2013.

MELLEROWICZ, H.; MELLER, W. **Bases fisiológicas do treinamento físico**. Tradução W Bettina. São Paulo : Editora da Universidade de São Paulo, 1979. p. 64-70.

MORAIS, G. Q.; BURGOS, M. G. P. A. Impacto dos nutrientes na saúde óssea: novas tendências. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 42, n. 7, p. 189-94, 2007.

REFERÊNCIAS

MOREY-HOLTON, E. R.; GLOBUS, R. K. Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. **Journal of Applied Physiology**, v. 92, n. 4, p. 1367-77, 2002. Review.

MÜLLER, M. E.; ALLGOWER, M.; SCHNEIDER, R.; WILLENEGGER, H. **Manual of internal fixation – techniques recommended by AO-ASIF group**. Springer – Verlag. 1993.

NEWHALL, K. M.; RODNICK, K. J.; van der MEULEN, M. C.; CARTER, D. R.; MARCUS, R. Effects of voluntary exercise on bone mineral content in rats. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 6, n. 3, p. 289-96, 1991.

NIKOLAOU, V. S.; EFSTATHOPOULOS, N.; KONTAKIS, G.; KANAKARIS, N. K.; GIANNOUDIS, P. V. The influence of osteoporosis in femoral fracture healing time. **Injury**, v. 40, n. 6, p. 663-8, 2009.

OLIVEIRA-MILANI, J. G.; MATHEUS, J. P.; GOMIDE, L. B.; VOLPON, J. B.; SHIMANO, A. C. Biomechanical effects of immobilization and rehabilitation on the skeletal muscle of trained and sedentary rats. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 36, n. 10, p. 1641-8, 2008.

PARHAMI, F.; TINTUT, Y.; BEAMER, W. G.; GHARAVI, N.; GOODMAN, W.; DEMER, L. L. Atherogenic high-fat diet reduces bone mineralization in mice. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 16, n. 1, p. 182-8, 2001.

PASSI, N.; GEFEN, A. Trabecular Bone contributes to strength of the proximal fêmur under mediolateral impact in the avian. **Journal of Biomechanical Engineering**, v. 127, n. 1, p. 198-204, 2005.

PATSCH, J. M.; KIEFER, F. W.; VARGA, P.; PAIL, P.; RAUNER, M.; STUPPHANN, D.; RESCH, H.; MOSER, D.; ZYSSET, P. K.; STULNIG, T. M.; PIETSCHMANN, P. Increased bone resorption and impaired bone microarchitecture in short-term and extended high-fat diet-induced obesity. **Metabolism: clinical and experimental**, v. 60, n. 2, p. 243-9, 2011.

PENG, Z. Q.; VÄÄNÄNEN, H. K.; TUUKKANEN, J. Ovariectomy-induced bone loss can be affected by different intensities of treadmill running exercise in rats. **Calcified Tissue International**, v. 60, n. 5, p. 441-8, 1997.

PETIT, M. A.; BECK, T. J.; LIN, H. M.; BENTLEY, C.; LEGRO, R. S.; LLOYD, T. Femoral bone structural geometry adapts to mechanical loading and is influenced by

sex steroids: the Penn State Young Women's Health Study. **Bone**, v. 35, n. 3, p. 750-9, 2004.

PICHLER, K.; LORETO, C.; LEONARDI, R.; REUBER, T.; WEINBERG, A. M.; MUSUMECI, G. RANKL is downregulated in bone cells by physical activity (treadmill and vibration stimulation training) in rat with glucocorticoid-induced osteoporosis. **Histology and Histopathology**, v. 28, n. 9, p. 1185-96, 2013.

PINHEIRO, M. M.; SCHUCH, N. J.; GENARO, P. S.; CICONELLI, R. M.; FERRAZ, M. B.; MARTINI, L. A. Nutrient intakes related to osteoporotic fractures in men and women—the Brazilian Osteoporosis Study (BRAZOS). **Nutrition Journal**, v. 8, p. 6, 2009.

PIRIH, F.; LU, R. J.; YE, F.; BEZOUGLAIA, O.; ATTI, E.; ASCENZI, M. G.; TETRADIS, S.; DEMER, L.; AGHALOO, T.; TINTUT, Y. Adverse effects of hyperlipidemia on bone regeneration and strength. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 27, n. 2, p. 309-18, 2012.

PREMAOR, M. O.; PILBROW, L.; TONKIN, C.; PARKER, R. A.; COMPSTON, J. Obesity and Fractures in Postmenopausal Women. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 25, n. 2, p. 292-7, 2010.

RADAK, T. L. Caloric restriction and calcium's effect on bone metabolism and body composition in overweight and obese premenopausal women. **Nutrition Reviews**, v. 62, n. 12, p. 468–81, 2004.

RECKER, R. R. Clinical review 41: Current therapy for osteoporosis. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 76, n. 1, p. 14-6, 1993. Review.

REID, I. R.; LEGGE, M.; STAPLETON, J. P.; EVANS, M. C.; GREY, A. B. Regular exercise dissociates fat mass and bone density in premenopausal women. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 80, n. 6, p. 1764-8, 1995.

RENNO, A. C. M.; DRIUSSO, P.; FERREIRA, V. Atividade física e osteoporose: uma revisão bibliográfica. **Revista Fisioterapia em Movimento**, v. 13, n. 2, p. 49-54, 2001.

RIBOT, C.; TREMOLLIÈRES, F.; POUILLES, J. M.; BONNEU, M.; GERMAIN, F.; LOUVET, J. P. Obesity and postmenopausal bone loss: the influence of obesity on vertebral density and bone turnover in postmenopausal women. **Bone**, v. 8, n. 6, p. 327-31, 1987.

REFERÊNCIAS

RIZK, D. E.; HASSAN, H. A.; AL-MARZOUQI, A. H. Combined estrogen and ghrelin administration restores number of blood vessels and collagen type I/III ratio in the urethral and anal canal submucosa of old ovariectomized rats. **International Urogynecology Journal and Pelvic Floor Dysfunction**, v.19, p.547-52, 2008.

ROBBINS, J.; HIRSCH, C.; WHITMER, R.; CAULEY, J.; HARRIS, T. The association of bone mineral density and depression in an older population. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 49, n. 6, p. 732-6, 2001.

ROBBINS, S. (1994) **Patologia estrutural e funcional**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara.

ROSEN, C. J.; KLIBANSKI, A. Bone, fat, and body composition: evolving concepts in the pathogenesis of osteoporosis. **The American Journal of Medicine**, v. 122, n. 5, p. 409-14, 2009.

SANTOS R. **Projeto e adaptação de uma máquina de ensaio de impacto para ossos longos de animais de pequeno e médio porte**. São Carlos – 1999. 57p. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos. Universidade de São Paulo. São Carlos, 1999.

SCHMITT, N. M.; SCHMITT, J.; DÖREN, M. The role of physical activity in the prevention of osteoporosis in postmenopausal women—An update. **Maturitas**, v. 63, n. 1, p. 34-8, 2009.

SZEJNFELD, V. L.; ATRA, E.; BARACAT, E. C.; ALDRIGHI, J. M.; CIVITELLI, R. Bone density in white Brazilian women: rapid loss at the time around the menopause. **Calcified Tissue International**, v. 56, n. 3, p. 186-91, 1995.

SZEJNFELD, V. L. (2005). Osteoporose. In: PRADO, F. C.; RAMOS, J. A.; VALLE, J. R. **Atualização terapêutica: manual prático de diagnóstico e tratamento**. 22. ed. São Paulo: Artes Médicas. Cap. 12, p. 601-604

SHEN, C. L.; CAO, J. J.; DAGDA, R. Y.; CHANJAPLAMMOOTIL, S.; LU, C.; CHYU M. C.; GAO, W.; WANG, J. S. YEH, J. K. Green tea polyphenols benefits body composition and improves bone quality in long-term high-fat diet-induced obese rats. **Nutrition Research**, v. 32, n. 6, p. 448-57, 2012.

SHIGUEMOTO, G. E.; PRESTES, J.; LEITE, R. D.; PEREIRA, G. B.; PONTES, C. L.; D'ÁVILA, F. V.; BOTERO, J. P.; BALDISSERA, V.; NONAKA, K. O.; SELISTRE-DE-

ARAÚJO, H. S, PEREZ SE. 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 and Science in Sports**, v. 22, n. 5, p. 607-17, 2012.

SHIMANO, A. C.; SHIMANO, M. M. **Ensaio tecnológicos de matérias biológicas**. In: VII Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, 2000, Florianópolis, Santa Catarina. Anais do VIII CEBEB, p, 15-21.

SHIMANO, M. M.; VOLPON, J. B. Biomechanics and structural adaptations of the rat femur after hindlimb suspension and treadmill running. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, n. 4, p. 330-8, 2009.

SIMÕES, P. A.; ZAMARIOLI, A.; BLOES, P.; MAZZOCATO, F. C.; PEREIRA, L. H.; VOLPON, J. B.; SHIMANO, A. C. Effect of treadmill exercise on lumbar vertebrae in ovariectomized rats: anthropometrical and mechanical analyses. **Acta of Bioengineering and Biomechanics**, v. 10, n. 2, p. 39-41, 2008.

SIMON, J.; LEBOFF, M.; WRIGHT, J.; GLOWACKI, J. Fractures in the elderly and vitamin D. **The Journal of Nutrition, Health and Aging**. 2002; 6(6):406-12.

SIDDIQUE, Y. H.; ARA, G.; AFZAL, M. Estimation of lipid peroxidation induced by hydrogen peroxide in cultured human lymphocytes. **Dose Response**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2012.

SINAK, M. Exercise and physical therapy. In: RIGGS, B. L.; MELTON, J. L. **Osteoporoses: etiology, diagnoses and management**. New York: Raven Press, 1978, p. 457-479.

SOUZA, S. A. **Ensaio mecânicos de materiais metálicos**. Ed. Edgard Blucher LTDA, São Paulo – Brasil, 1982.

TANAKA, M.; EJIRI, S.; NAKAJIMA, M.; KOHNO, S.; OZAWA, H. Changes of cancellous bone mass in rat mandibular condyle following ovariectomy. **Bone**, v. 25, n. 3, p. 339-47, 1999.

TEZINI, G. S. V. **Efeito da deficiência estrogênica sobre as adaptações autonômicas cardiovasculares induzidas pelo treinamento físico aeróbio**. Ribeirão Preto, 2008. 85 p. Dissertação (Mestrado em Ortopedia, traumatologia e reabilitação)- Programa de pós-graduação em Ortopedia, Traumatologia e Reabilitação. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2008.

REFERÊNCIAS

THOMAS, D. T.; WIDEMAN, L.; LOVELADY, C. A. Effects of calcium and resistance exercise on body composition in overweight premenopausal women. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 29, n. 6, p. 604-11, 2010.

TOMKINSON, A.; GEVERS, E. F.; WIT, J. M.; REEVE, J.; NOBLE, B. S. The role of estrogen in the control of rat osteocyte apoptosis. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 13, n. 8, p. 1243-50, 1998.

TOPP, R.; DITMYER, M.; KING, K.; DOHERTY, K.; HORNYAK, J. 3rd. The effect of bed rest and potential prehabilitation on patients in the intensive care unit. **AACN Clinical Issues**, v. 13, n. 2, p. 263-76, 2002. Review.

TURNER, C. H. Three rules for bone adaptation to mechanical stimuli. **Bone**, v. 23, n. 5, p. 399–407, 1998.

TUUKKANEN, J.; PENG, Z.; VAANANEN, HK. Effect of running exercise of bone loss induced by orchidectomy in the rats. **Calcified Tissue International**, v. 55, n. 1, p. 33-7, 1994.

UMEMURA, Y.; NAGASAWA, S.; SOGO, N.; HONDA, A. Effects of jump training on bone are preserved after detraining, regardless of estrogen secretion state in rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 104, n. 4, p. 1116-20, 2008.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Antônio Carlos Shimano, Jorge Caolo Imori Jr, Ana Paula Macedo. **Equipamento de ensaio de torção por alta velocidade e ensaio de torção por impacto**. BR n. 10 2013 005052-0, 01 mar. 2013.

van der WIEL, H. E.; LIPS, P.; GRAAFMANS, W. C.; DANIELSEN, C. C.; NAUTA, J. van LINGEN, A.; MOSEKILDE, L. Additional weight-bearing during exercise is more important than duration of exercise for anabolic stimulus of bone: a study of running exercise in female rats. **Bone**, v. 16, n. 1, p. 73-80, 1995.

XIAO, Y.; CUI, J.; LI, Y. X.; SHI, Y. H.; WANG, B.; LE, G. W.; WANG, Z. P. Dyslipidemic high-fat diet affects adversely bone metabolism in mice associated with impaired antioxidant capacity. **Nutrition**, v. 27, n. 2, p. 214-20, 2011.

WARD, W. E.; KIM, S.; ROBERT BRUCE, W. A western-style diet reduces bone mass and biomechanical bone strength to a greater extent in male compared with female rats during development. **The British Journal of Nutrition**, v. 90, n. 3, p. 589-95, 2003.

- WOHL, G. R.; LOEHRKE, L.; WATKINS, B. A.; ZERNICKE, R. F. Effects of high-fat diet on mature bone mineral content, structure, and mechanical properties. **Calcified Tissue International**, v. 63, n. 1, p. 74-9, 1998.
- WOO, D. G.; LEE, B. Y.; LIM, D.; KIM, H. S. Relationship between nutrition factors and osteopenia: Effects of experimental diets on immature bone quality. **Journal of biomechanics**, v. 42, n. 8, p. 1102-7, 2009.
- WOODS, S.C.; SEELEY, R.J.; RUSHING, P.A.; D'ALESSIO, D.; TSO, P. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. **The Journal of nutrition**, v. 133, n. 4, p. 1081-7, 2003.
- YAMADA, H.; EVANS, F.G. Strength of biological materials. Williams and Wilkins, Baltimore. 1970. Resumo em MULLER, M. E.; ALLGOWER, M.; SCHNEIDER, R.; WILLENEGGER, H. **Manual of internal fixation – techniques recommended by AO-ASIF group**. Springer – Verlag. 1993.
- YAMAGUCHI, T.; KANAZAWA, I.; YAMAMOTO, M.; KURIOKA, S.; YAMAUCHI, M.; YANO, S.; SUGIMOTO, T. Associations between components of the metabolic syndrome versus bone mineral density and vertebral fractures in patients with type 2 diabetes. **Bone**, v. 45, n. 2, p. 174-9, 2009.
- YEH, J. K.; ALOIA, J. F.; TIERNEY, J. M.; SPRINTZ, S. Effect of treadmill exercise on vertebral and tibial bone mineral content and bone mineral density in the aged adult rat: determined by dual energy X-ray absorptiometry. **Calcified Tissue International** v. 52, n. 3, p. 234-8, 1993.
- YERGES-ARMSTRONG, L. M.; MILJKOVIC, I.; CAULEY, J. A.; SHEU, Y.; GORDON, C. L.; WHEELER, V. W.; BUNKER, C. H.; PATRICK, A. L.; ZMUDA, J. M. Adipose tissue and volumetric bone mineral density of older Afro-Caribbean men. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 25, n. 10, p. 2221-8, 2010.
- ZARROW, M. X.; BROWN-GRANT, K. Inhibition of ovulation in the gonadotrophin-treated immature rat by chlorpromazine. **The Journal of endocrinology**, v. 30, p. 87-95, 1964.
- ZOTH, N.; WEIGT, C.; LAUDENBACH-LESCHOWSKI, U.; DIEHL, 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. 100-5, 2010.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Análise estatística

Teste de Normalidade

	Shapiro-Wilk		
	Statistic	Df	Sig.
GanhoP1S	.971	80	.070
GanhoP2S	.942	80	.001
GanhoP3S	.977	80	.148
GanhoP4S	.983	80	.372
GanhoP5S	.982	80	.320
GanhoP6S	.987	80	.571
GanhoP7S	.987	80	.587
GanhoP8S	.987	80	.600
GanhoP9S	.990	80	.811
GanhoP10S	.993	80	.936
GanhoP11S	.986	80	.555
GanhoP12S	.986	80	.549
DMOCT	.985	80	.496
PercGordura	.985	80	.475
DMOFemurP	.975	80	.120
FmaxFemur	.952	80	.004
RigidezFemur	.977	80	.157
DMOTíbiaC	.983	80	.372
AnguloQT	.974	80	.103
TmáxT	.990	80	.805
MassomPT	.959	80	.012
MassonC1T	.962	80	.017
MassonC2T	.940	80	.001
MassomC3T	.982	80	.308
ColagenoT	.958	80	.011
MDA	.960	80	.014
GSH	.544	80	.000
FSHantes	.767	80	.000
FSHdepois	.826	80	.000

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

APÊNDICE

Ganho de Peso

Tests of Between-Subjects Effects

Measure: MEASURE_1

Transformed Variable: Average

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Cirurgia	112991.901	1	112991.901	11.172	.001
Tratamento	136207.526	1	136207.526	13.467	.000
Dieta	3860.026	1	3860.026	.382	.539
Cirurgia * Tratamento	78572.109	1	78572.109	7.769	.007
Cirurgia * Dieta	11104.401	1	11104.401	1.098	.298
Tratamento * Dieta	11935.651	1	11935.651	1.180	.281
Cirurgia * Tratamento * Dieta	119148.984	1	119148.984	11.781	.001
Error	728210.625	72	10114.036		

Mauchly's Test of Sphericity^b

Measure: MEASURE_1

Within Subjects Effect	Mauchly's W	Approx. Chi-Square	df	Sig.	Epsilon ^a		
					Greenhouse-Geisser	Huynh-Feldt	Lower-bound
tempo	.000	739.374	65	.000	.203	.230	.091

Tests the null hypothesis that the error covariance matrix of the orthonormalized transformed dependent variables is proportional to an identity matrix.

a. May be used to adjust the degrees of freedom for the averaged tests of significance. Corrected tests are displayed in the Tests of Within-Subjects Effects table.

b. Design: Intercept + Cirurgia + Tratamento + Dieta + Cirurgia * Tratamento + Cirurgia * Dieta + Tratamento * Dieta + Cirurgia * Tratamento * Dieta

Within Subjects Design: tempo

Cirurgia * Tratamento

Pairwise Comparisons

Measure: MEASURE_1

Tratamento	(I) Cirurgia	(J) Cirurgia	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a	95% Confidence Interval for Difference ^a	
						Lower Bound	Upper Bound
ESTEIRA	OVX	SHAM	39.792 [*]	9.181	.000	21.490	58.093
	SHAM	OVX	-39.792 [*]	9.181	.000	-58.093	-21.490
SEDEN	OVX	SHAM	3.604	9.181	.696	-14.697	21.905
	SHAM	OVX	-3.604	9.181	.696	-21.905	14.697

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the .05 level.

a. Adjustment for multiple comparisons: Bonferroni.

Pairwise Comparisons

Measure: MEASURE_1

Cirurgia	(I) Tratamento	(J) Tratamento	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a	95% Confidence Interval for Difference ^a	
						Lower Bound	Upper Bound
OVX	ESTEIRA	SEDEN	41.917 [*]	9.181	.000	23.615	60.218
	SEDEN	ESTEIRA	-41.917 [*]	9.181	.000	-60.218	-23.615
SHAM	ESTEIRA	SEDEN	5.729	9.181	.535	-12.572	24.030
	SEDEN	ESTEIRA	-5.729	9.181	.535	-24.030	12.572

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the .05 level.

a. Adjustment for multiple comparisons: Bonferroni.

Cirurgia * Tratamento * Dieta

Pairwise Comparisons

Measure: MEASURE_1

Tratamento	Dieta	(I) Cirurgia	(J) Cirurgia	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a	95% Confidence Interval for Difference ^a	
							Lower Bound	Upper Bound
ESTEIRA	HIPER	OVX	SHAM	68.875 [*]	12.983	.000	42.993	94.757
		SHAM	OVX	-68.875 [*]	12.983	.000	-94.757	-42.993
	PADRAO	OVX	SHAM	10.708	12.983	.412	-15.173	36.590
		SHAM	OVX	-10.708	12.983	.412	-36.590	15.173
SEDEN	HIPER	OVX	SHAM	-11.875	12.983	.363	-37.757	14.007
		SHAM	OVX	11.875	12.983	.363	-14.007	37.757
	PADRAO	OVX	SHAM	19.083	12.983	.146	-6.798	44.965
		SHAM	OVX	-19.083	12.983	.146	-44.965	6.798

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the .05 level.

a. Adjustment for multiple comparisons: Bonferroni.

Pairwise Comparisons

Measure: MEASURE_1

Cirurgia	Dieta	(I) Tratamento	(J) Tratamento	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a	95% Confidence Interval for Difference ^a	
							Lower Bound	Upper Bound
OVX	HIPER	ESTEIRA	SEDEN	71.250 [*]	12.983	.000	45.368	97.132
		SEDEN	ESTEIRA	-71.250 [*]	12.983	.000	-97.132	-45.368
	PADRAO	ESTEIRA	SEDEN	12.583	12.983	.336	-13.298	38.465
		SEDEN	ESTEIRA	-12.583	12.983	.336	-38.465	13.298
SHAM	HIPER	ESTEIRA	SEDEN	-9.500	12.983	.467	-35.382	16.382
		SEDEN	ESTEIRA	9.500	12.983	.467	-16.382	35.382
	PADRAO	ESTEIRA	SEDEN	20.958	12.983	.111	-4.923	46.840
		SEDEN	ESTEIRA	-20.958	12.983	.111	-46.840	4.923

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the .05 level.

a. Adjustment for multiple comparisons: Bonferroni.

APÊNDICE

Pairwise Comparisons

Measure: MEASURE_1

Cirurgia	Tratamento	(I) Dieta	(J) Dieta	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a	95% Confidence Interval for Difference ^a	
							Lower Bound	Upper Bound
OVX	ESTEIRA	HIPER	PADRAO	32.125 [*]	12.983	.016	6.243	58.007
		PADRAO	HIPER	-32.125 [*]	12.983	.016	-58.007	-6.243
	SEDEN	HIPER	PADRAO	-26.542 [*]	12.983	.045	-52.423	-.660
		PADRAO	HIPER	26.542 [*]	12.983	.045	.660	52.423
SHAM	ESTEIRA	HIPER	PADRAO	-26.042 [*]	12.983	.049	-51.923	-.160
		PADRAO	HIPER	26.042 [*]	12.983	.049	.160	51.923
	SEDEN	HIPER	PADRAO	4.417	12.983	.735	-21.465	30.298
		PADRAO	HIPER	-4.417	12.983	.735	-30.298	21.465

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the .05 level.

a. Adjustment for multiple comparisons: Bonferroni.

Tempo

Pairwise Comparisons

Measure: MEASURE_1

(I) GanhodePeso	(J) GanhodePeso	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a	95% Confidence Interval for Difference ^a	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-40.938 [*]	1.712	.000	-46.960	-34.915
	3	-76.313 [*]	2.120	.000	-83.771	-68.854
	4	-103.625 [*]	2.599	.000	-112.767	-94.483
	5	-130.000 [*]	3.149	.000	-141.078	-118.922
	6	-147.125 [*]	3.567	.000	-159.675	-134.575
	7	-160.875 [*]	3.964	.000	-174.821	-146.929
	8	-175.063 [*]	3.997	.000	-189.124	-161.001
	9	-184.313 [*]	4.213	.000	-199.133	-169.492
	10	-191.875 [*]	4.522	.000	-207.784	-175.966
	11	-195.688 [*]	4.708	.000	-212.252	-179.123
	12	-199.500 [*]	4.579	.000	-215.608	-183.392
2	1	40.938 [*]	1.712	.000	34.915	46.960
	3	-35.375 [*]	1.376	.000	-40.214	-30.536
	4	-62.688 [*]	1.781	.000	-68.954	-56.421
	5	-89.063 [*]	2.335	.000	-97.279	-80.846
	6	-106.188 [*]	2.627	.000	-115.431	-96.944
	7	-119.938 [*]	3.099	.000	-130.839	-109.036
	8	-134.125 [*]	3.116	.000	-145.085	-123.165
	9	-143.375 [*]	3.506	.000	-155.709	-131.041
	10	-150.938 [*]	3.742	.000	-164.100	-137.775
	11	-154.750 [*]	4.025	.000	-168.910	-140.590
	12	-158.563 [*]	3.960	.000	-172.493	-144.632
3	1	76.313 [*]	2.120	.000	68.854	83.771

APÊNDICE

	2	35.375	1.376	.000	30.536	40.214
	4	-27.313	1.180	.000	-31.464	-23.161
	5	-53.688	1.654	.000	-59.506	-47.869
	6	-70.813	2.108	.000	-78.229	-63.396
	7	-84.563	2.494	.000	-93.337	-75.788
	8	-98.750	2.631	.000	-108.004	-89.496
	9	-108.000	3.117	.000	-118.964	-97.036
	10	-115.563	3.255	.000	-127.013	-104.112
	11	-119.375	3.505	.000	-131.705	-107.045
	12	-123.188	3.409	.000	-135.180	-111.195
4	1	103.625	2.599	.000	94.483	112.767
	2	62.688	1.781	.000	56.421	68.954
	3	27.313	1.180	.000	23.161	31.464
	5	-26.375	1.308	.000	-30.977	-21.773
	6	-43.500	1.815	.000	-49.884	-37.116
	7	-57.250	2.256	.000	-65.185	-49.315
	8	-71.438	2.276	.000	-79.444	-63.431
	9	-80.688	2.860	.000	-90.749	-70.626
	10	-88.250	2.930	.000	-98.558	-77.942
	11	-92.063	3.124	.000	-103.051	-81.074
	12	-95.875	3.050	.000	-106.604	-85.146
5	1	130.000	3.149	.000	118.922	141.078
	2	89.063	2.335	.000	80.846	97.279
	3	53.688	1.654	.000	47.869	59.506
	4	26.375	1.308	.000	21.773	30.977
	6	-17.125	1.312	.000	-21.742	-12.508
	7	-30.875	1.650	.000	-36.681	-25.069
	8	-45.063	1.880	.000	-51.675	-38.450
	9	-54.313	2.503	.000	-63.117	-45.508
	10	-61.875	2.575	.000	-70.934	-52.816
	11	-65.688	2.783	.000	-75.479	-55.896
	12	-69.500	2.624	.000	-78.730	-60.270
6	1	147.125	3.567	.000	134.575	159.675
	2	106.188	2.627	.000	96.944	115.431
	3	70.813	2.108	.000	63.396	78.229
	4	43.500	1.815	.000	37.116	49.884
	5	17.125	1.312	.000	12.508	21.742
	7	-13.750	1.249	.000	-18.143	-9.357
	8	-27.938	1.614	.000	-33.616	-22.259
	9	-37.188	2.210	.000	-44.964	-29.411
	10	-44.750	2.228	.000	-52.588	-36.912
	11	-48.563	2.666	.000	-57.943	-39.182
	12	-52.375	2.518	.000	-61.233	-43.517
7	1	160.875	3.964	.000	146.929	174.821
	2	119.938	3.099	.000	109.036	130.839
	3	84.563	2.494	.000	75.788	93.337
	4	57.250	2.256	.000	49.315	65.185
	5	30.875	1.650	.000	25.069	36.681

APÊNDICE

	6	13.750	1.249	.000	9.357	18.143
	8	-14.188	1.296	.000	-18.746	-9.629
	9	-23.438	1.905	.000	-30.141	-16.734
	10	-31.000	1.860	.000	-37.545	-24.455
	11	-34.813	2.177	.000	-42.472	-27.153
	12	-38.625	2.162	.000	-46.230	-31.020
8	1	175.063	3.997	.000	161.001	189.124
	2	134.125	3.116	.000	123.165	145.085
	3	98.750	2.631	.000	89.496	108.004
	4	71.438	2.276	.000	63.431	79.444
	5	45.063	1.880	.000	38.450	51.675
	6	27.938	1.614	.000	22.259	33.616
	7	14.188	1.296	.000	9.629	18.746
	9	-9.250	1.578	.000	-14.802	-3.698
	10	-16.813	1.499	.000	-22.087	-11.538
	11	-20.625	2.060	.000	-27.872	-13.378
	12	-24.438	2.158	.000	-32.028	-16.847
9	1	184.313	4.213	.000	169.492	199.133
	2	143.375	3.506	.000	131.041	155.709
	3	108.000	3.117	.000	97.036	118.964
	4	80.688	2.860	.000	70.626	90.749
	5	54.313	2.503	.000	45.508	63.117
	6	37.188	2.210	.000	29.411	44.964
	7	23.438	1.905	.000	16.734	30.141
	8	9.250	1.578	.000	3.698	14.802
	10	-7.563	1.316	.000	-12.191	-2.934
	11	-11.375	1.932	.000	-18.173	-4.577
	12	-15.188	1.951	.000	-22.051	-8.324
10	1	191.875	4.522	.000	175.966	207.784
	2	150.938	3.742	.000	137.775	164.100
	3	115.563	3.255	.000	104.112	127.013
	4	88.250	2.930	.000	77.942	98.558
	5	61.875	2.575	.000	52.816	70.934
	6	44.750	2.228	.000	36.912	52.588
	7	31.000	1.860	.000	24.455	37.545
	8	16.813	1.499	.000	11.538	22.087
	9	7.563	1.316	.000	2.934	12.191
	11	-3.813	1.603	1.000	-9.450	1.825
	12	-7.625	1.755	.003	-13.800	-1.450
11	1	195.688	4.708	.000	179.123	212.252
	2	154.750	4.025	.000	140.590	168.910
	3	119.375	3.505	.000	107.045	131.705
	4	92.063	3.124	.000	81.074	103.051
	5	65.688	2.783	.000	55.896	75.479
	6	48.563	2.666	.000	39.182	57.943
	7	34.813	2.177	.000	27.153	42.472
	8	20.625	2.060	.000	13.378	27.872
	9	11.375	1.932	.000	4.577	18.173

	10	3.813	1.603	1.000	-1.825	9.450
	12	-3.813	1.511	.911	-9.126	1.501
12	1	199.500 [*]	4.579	.000	183.392	215.608
	2	158.563 [*]	3.960	.000	144.632	172.493
	3	123.188 [*]	3.409	.000	111.195	135.180
	4	95.875 [*]	3.050	.000	85.146	106.604
	5	69.500 [*]	2.624	.000	60.270	78.730
	6	52.375 [*]	2.518	.000	43.517	61.233
	7	38.625 [*]	2.162	.000	31.020	46.230
	8	24.438 [*]	2.158	.000	16.847	32.028
	9	15.188 [*]	1.951	.000	8.324	22.051
	10	7.625 [*]	1.755	.003	1.450	13.800
	11	3.813	1.511	.911	-1.501	9.126

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the .05 level.

a. Adjustment for multiple comparisons: Bonferroni.

Hormônio Folículo Estimulante (FSH)

Antes da cirurgia

Ranks

VAR00001	N	Mean Rank	Sum of Ranks
FSHantes OVX	40	41.64	1665.50
SHAM	40	39.36	1574.50
Total	80		

Test Statistics^a

	FSHantes
Mann-Whitney U	754.500
Wilcoxon W	1574.500
Z	-.438
Asymp. Sig. (2-tailed)	.661

a. Grouping Variable: CIRURGIA

Depois da cirurgia

Ranks

	N	Mean Rank	Sum of Ranks
FSHdepois - FSHantes Negative Ranks	30 ^a	23.43	703.00
Positive Ranks	10 ^b	11.70	117.00
Ties	0 ^c		
Total	40		

a. FSHdepois < FSHantes

b. FSHdepois > FSHantes

c. FSHdepois = FSHantes

APÊNDICE

Test Statistics^b

	FSHdepois - FSHantes
Z	-3.939 ^a
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000

a. Based on positive ranks.

b. Wilcoxon Signed Ranks Test

Antes/depois da cirurgia

OVX

Ranks

	N	Mean Rank	Sum of Ranks
FSHdepois - FSHantes			
Negative Ranks	0 ^a	.00	.00
Positive Ranks	40 ^b	20.50	820.00
Ties	0 ^c		
Total	40		

a. FSHdepois < FSHantes

b. FSHdepois > FSHantes

c. FSHdepois = FSHantes

Test Statistics^b

	FSHdepois - FSHantes
Z	-5.511 ^a
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000

a. Based on negative ranks.

b. Wilcoxon Signed Ranks Test

Densidade Mineral Óssea de Corpo Total**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: DMOCT

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Cirurgia	.003	1	.003	37.606	.000
Tratamento	.001	1	.001	13.848	.000
Dieta	.000	1	.000	1.786	.186
Cirurgia * Tratamento	5.445E-5	1	5.445E-5	.748	.390
Cirurgia * Dieta	8.000E-5	1	8.000E-5	1.099	.298
Tratamento * Dieta	2.880E-5	1	2.880E-5	.396	.531
Cirurgia * Tratamento * Dieta	.000	1	.000	3.083	.083
Error	.005	72	7.280E-5		
Total	2.409	80			
Corrected Total	.010	79			

a. R Squared = .449 (Adjusted R Squared = .395)

Percentual de Gordura

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: PercGordura

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Cirurgia	697.381	1	697.381	19.959	.000
Tratamento	48.984	1	48.984	1.402	.240
Dieta	496.008	1	496.008	14.195	.000
Cirurgia * Tratamento	.722	1	.722	.021	.886
Cirurgia * Dieta	113.764	1	113.764	3.256	.075
Tratamento * Dieta	40.045	1	40.045	1.146	.288
Cirurgia * Tratamento * Dieta	.128	1	.128	.004	.952
Error	2515.768	72	34.941		
Total	57992.800	80			
Corrected Total	3912.800	79			

a. R Squared = .357 (Adjusted R Squared = .295)

Glutaciona reduzida (GSH)

Tests of Model Effects

Source	Type III						
	Likelihood Ratio Chi-Square	df	Sig.	F	df1	df2	Sig.
Cirurgia	.038	1	.845	.038	1	72	.846
Tratamento	1.864	1	.172	1.864	1	72	.176
Dieta	1.174	1	.278	1.174	1	72	.282
Cirurgia * Tratamento	.157	1	.692	.157	1	72	.693
Cirurgia * Dieta	.038	1	.845	.038	1	72	.846
Tratamento * Dieta	.407	1	.524	.407	1	72	.526
Cirurgia * Tratamento * Dieta	2.131	1	.144	2.131	1	72	.149

Dependent Variable: GSH

Model: (Intercept), Cirurgia, Tratamento, Dieta, Cirurgia * Tratamento, Cirurgia * Dieta, Tratamento * Dieta, Cirurgia * Tratamento * Dieta

a. Unable to compute due to invalid cases in the last iteration of the constrained model.

APÊNDICE

Malondialdeído MDA**Tests of Model Effects**

Source	Type III						
	Likelihood Ratio Chi-Square	df	Sig.	F	df1	df2	Sig.
Cirurgia	.287	1	.592	.287	1	72	.594
Tratamento	5.548	1	.019	5.548	1	72	.021
Dieta	5.685	1	.017	5.685	1	72	.020
Cirurgia * Tratamento	3.242	1	.072	3.242	1	72	.076
Cirurgia * Dieta	4.122	1	.042	4.122	1	72	.046
Tratamento * Dieta	6.552	1	.010	6.552	1	72	.013
Cirurgia * Tratamento * Dieta	1.174	1	.279	1.174	1	72	.282

Dependent Variable: MDA

Model: (Intercept), Cirurgia, Tratamento, Dieta, Cirurgia * Tratamento, Cirurgia * Dieta, Tratamento * Dieta, Cirurgia * Tratamento * Dieta

Cirurgia * Dieta**Pairwise Comparisons**

(I) Cirurgia*Dieta (J) Cirurgia*Dieta		Mean Difference (I-J)	Std. Error	df	Bonferroni Sig.	95% Wald Confidence Interval for Difference	
						Lower	Upper
OVX-HIPER	OVX-PADRAO	.4020 ^a	.13163	1	.014	.0547	.7493
	SHAM-HIPER	.2330	.13996	1	.576	-.1362	.6022
	SHAM-PADRAO	.2670	.14135	1	.353	-.1059	.6399
OVX-PADRAO	OVX-HIPER	-.4020 ^a	.13163	1	.014	-.7493	-.0547
	SHAM-HIPER	-.1690	.11603	1	.872	-.4751	.1371
	SHAM-PADRAO	-.1350	.11770	1	1.000	-.4455	.1755
SHAM-HIPER	OVX-HIPER	-.2330	.13996	1	.576	-.6022	.1362
	OVX-PADRAO	.1690	.11603	1	.872	-.1371	.4751
	SHAM-PADRAO	.0340	.12694	1	1.000	-.3009	.3689
SHAM-PADRAO	OVX-HIPER	-.2670	.14135	1	.353	-.6399	.1059
	OVX-PADRAO	.1350	.11770	1	1.000	-.1755	.4455
	SHAM-HIPER	-.0340	.12694	1	1.000	-.3689	.3009

Pairwise comparisons of estimated marginal means based on the original scale of dependent variable MDA

a. The mean difference is significant at the .05 level.

Tratamento * Dieta

Pairwise Comparisons

(I) Tratamento*Dieta	(J) Tratamento*Dieta	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Df	Bonferroni Sig.	95% Wald Confidence Interval for Difference	
						Lower	Upper
ESTEIRA-HIPER	ESTEIRA-PADRAO	-.0150	.14022	1	1.000	-.3849	.3549
	SEDEN-HIPER	-.0180	.13996	1	1.000	-.3872	.3512
	SEDEN-PADRAO	.4330 ^a	.11565	1	.001	.1279	.7381
ESTEIRA-PADRAO	ESTEIRA-HIPER	.0150	.14022	1	1.000	-.3549	.3849
	SEDEN-HIPER	-.0030	.14165	1	1.000	-.3767	.3707
	SEDEN-PADRAO	.4480 ^a	.11770	1	.001	.1375	.7585
SEDEN-HIPER	ESTEIRA-HIPER	.0180	.13996	1	1.000	-.3512	.3872
	ESTEIRA-PADRAO	.0030	.14165	1	1.000	-.3707	.3767
	SEDEN-PADRAO	.4510 ^a	.11739	1	.001	.1413	.7607
SEDEN-PADRAO	ESTEIRA-HIPER	-.4330 ^a	.11565	1	.001	-.7381	-.1279
	ESTEIRA-PADRAO	-.4480 ^a	.11770	1	.001	-.7585	-.1375
	SEDEN-HIPER	-.4510 ^a	.11739	1	.001	-.7607	-.1413

Pairwise comparisons of estimated marginal means based on the original scale of dependent variable MDA

a. The mean difference is significant at the .05 level.

Área de osso trabecular

Tests of Model Effects

Source	Type III						
	Likelihood Ratio Chi-Square	df	Sig.	F	df1	df2	Sig.
Cirurgia	39.942	1	.000	39.942	1	72	.000
Tratamento	10.445	1	.001	10.445	1	72	.002
Dieta	.024	1	.878	.024	1	72	.879
Cirurgia * Tratamento	8.350	1	.004	8.350	1	72	.005
Cirurgia * Dieta	.581	1	.446	.581	1	72	.449
Tratamento * Dieta	.090	1	.764	.090	1	72	.765
Cirurgia * Tratamento * Dieta	.273	1	.601	.273	1	72	.603

Dependent Variable: Osso

Model: (Intercept), Cirurgia, Tratamento, Dieta, Cirurgia * Tratamento, Cirurgia * Dieta, Tratamento * Dieta, Cirurgia * Tratamento * Dieta

APÊNDICE

Cirurgia * Tratamento

Pairwise Comparisons

(I) Cirurgia* Tratamento	(J) Cirurgia* Tratamento	Mean Difference (I-J)	Std. Error	df	Bonferroni Sig.	95% Wald Confidence Interval for Difference	
						Lower	Upper
OVX-ESTEIRA	OVX-SEDEN	30567.0538	99348.36667	1	1.000	-231539.4971	292673.6048
	SHAM-ESTEIRA	-8.2161E5	1.45195E5	1	.000	-1.2047E6	-438544.7729
	SHAM-SEDEN	-266731.2194	1.14169E5	1	.117	-567938.0256	34475.5868
OVX-SEDEN	OVX-ESTEIRA	-30567.0538	99348.36667	1	1.000	-292673.6048	231539.4971
	SHAM-ESTEIRA	-8.5217E5	1.44099E5	1	.000	-1.2323E6	-472003.9565
	SHAM-SEDEN	-297298.2733	1.12771E5	1	.050	-594818.3228	221.7763
SHAM-ESTEIRA	OVX-ESTEIRA	8.2161E5	1.45195E5	1	.000	438544.7729	1.2047E6
	OVX-SEDEN	8.5217E5	1.44099E5	1	.000	472003.9565	1.2323E6
	SHAM-SEDEN	5.5487E5	1.54689E5	1	.002	146764.1984	962985.0516
SHAM-SEDEN	OVX-ESTEIRA	266731.2194	1.14169E5	1	.117	-34475.5868	567938.0256
	OVX-SEDEN	297298.2733	1.12771E5	1	.050	-221.7763	594818.3228
	SHAM-ESTEIRA	-5.5487E5	1.54689E5	1	.002	-962985.0516	-146764.1984

Pairwise comparisons of estimated marginal means based on the original scale of dependent variable osso trabecular

a. The mean difference is significant at the .05 level.

Cortical 1

Tests of Model Effects

Source	Type III						
	Likelihood Ratio Chi-Square	df	Sig.	F	df1	df2	Sig.
Cirurgia	.525	1	.469	.525	1	72	.471
Tratamento	.177	1	.674	.177	1	72	.675
Dieta	2.003	1	.157	2.003	1	72	.161
Cirurgia * Tratamento	.374	1	.541	.374	1	72	.543
Cirurgia * Dieta	.598	1	.439	.598	1	72	.442
Tratamento * Dieta	.524	1	.469	.524	1	72	.472
Cirurgia * Tratamento * Dieta	.036	1	.850	.036	1	72	.851

Dependent Variable: C1

Model: (Intercept), Cirurgia, Tratamento, Dieta, Cirurgia * Tratamento, Cirurgia * Dieta, Tratamento * Dieta, Cirurgia * Tratamento * Dieta

Cortical 2

Tests of Model Effects

Source	Type III						
	Likelihood Ratio Chi-Square	df	Sig.	F	df1	df2	Sig.
Cirurgia	.316	1	.574	.316	1	72	.576
Tratamento	.745	1	.388	.745	1	72	.391
Dieta	2.842	1	.092	2.842	1	72	.096
Cirurgia * Tratamento	.583	1	.445	.583	1	72	.448
Cirurgia * Dieta	6.352	1	.012	6.352	1	72	.014
Tratamento * Dieta	.421	1	.517	.421	1	72	.519
Cirurgia * Tratamento * Dieta	.004	1	.952	.004	1	72	.952

Dependent Variable: C2

Model: (Intercept), Cirurgia, Tratamento, Dieta, Cirurgia * Tratamento, Cirurgia * Dieta, Tratamento * Dieta, Cirurgia * Tratamento * Dieta

Cirurgia * Dieta

Pairwise Comparisons

(I) Cirurgia*Dieta (J) Cirurgia*Dieta		Mean Difference (I-J)	Std. Error	df	Bonferroni Sig.	95% Wald Confidence Interval for Difference	
						Lower	Upper
OVX-HIPER	OVX-PADRAO	67.7835 ^a	22.61564	1	.016	8.1176	127.4494
	SHAM-HIPER	31.5270	23.46144	1	1.000	-30.3703	93.4243
	SHAM-PADRAO	18.1075	23.79136	1	1.000	-44.6602	80.8752
OVX-PADRAO	OVX-HIPER	-67.7835 ^a	22.61564	1	.016	-127.4494	-8.1176
	SHAM-HIPER	-36.2565	21.79570	1	.577	-93.7592	21.2462
	SHAM-PADRAO	-49.6760	22.15045	1	.150	-108.1146	8.7626
SHAM-HIPER	OVX-HIPER	-31.5270	23.46144	1	1.000	-93.4243	30.3703
	OVX-PADRAO	36.2565	21.79570	1	.577	-21.2462	93.7592
	SHAM-PADRAO	-13.4195	23.01334	1	1.000	-74.1346	47.2956
SHAM-PADRAO	OVX-HIPER	-18.1075	23.79136	1	1.000	-80.8752	44.6602
	OVX-PADRAO	49.6760	22.15045	1	.150	-8.7626	108.1146
	SHAM-HIPER	13.4195	23.01334	1	1.000	-47.2956	74.1346

Pairwise comparisons of estimated marginal means based on the original scale of dependent variable C2

a. The mean difference is significant at the .05 level.

APÊNDICE

Cortical 3**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: MassomC3T

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Cirurgia	56.970	1	56.970	.011	.916
Tratamento	7071.620	1	7071.620	1.404	.240
Dieta	3544.853	1	3544.853	.704	.404
Cirurgia * Tratamento	13790.964	1	13790.964	2.738	.102
Cirurgia * Dieta	764.652	1	764.652	.152	.698
Tratamento * Dieta	58.670	1	58.670	.012	.914
Cirurgia * Tratamento * Dieta	3853.782	1	3853.782	.765	.385
Error	362707.180	72	5037.600		
Total	3.232E7	80			
Corrected Total	391848.691	79			

a. R Squared = .074 (Adjusted R Squared = -.016)

Colágeno Total**Tests of Model Effects**

Source	Type III						
	Likelihood Ratio Chi-Square	df	Sig.	F	df1	df2	Sig.
Cirurgia	.023	1	.880	.023	1	72	.880
Tratamento	9.005	1	.003	9.005	1	72	.004
Dieta	2.009	1	.156	2.009	1	72	.161
Cirurgia * Tratamento	.000	1	1.000	.000	1	72	1.000
Cirurgia * Dieta	1.278	1	.258	1.278	1	72	.262
Tratamento * Dieta	.000	1	1.000	.000	1	72	1.000
Cirurgia * Tratamento * Dieta	2.967	1	.085	2.967	1	72	.089

Dependent Variable: ColagenoT

Model: (Intercept), Cirurgia, Tratamento, Dieta, Cirurgia * Tratamento, Cirurgia * Dieta, Tratamento * Dieta, Cirurgia * Tratamento * Dieta

Densidade Mineral óssea da Região Diáfise da tíbia

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:DMOTíbiaC

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Cirurgia	4.500E-5	1	4.500E-5	.337	.563
Tratamento	.001	1	.001	5.762	.019
Dieta	.000	1	.000	.900	.346
Cirurgia * Tratamento	4.805E-5	1	4.805E-5	.360	.550
Cirurgia * Dieta	3.920E-5	1	3.920E-5	.294	.589
Tratamento * Dieta	.000	1	.000	1.349	.249
Cirurgia * Tratamento * Dieta	.000	1	.000	1.583	.212
Error	.010	72	.000		
Total	2.470	80			
Corrected Total	.011	79			

a. R Squared = .128 (Adjusted R Squared = .043)

Ângulo de fratura

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:AnguloQT

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Cirurgia	350.245	1	350.245	15.769	.000
Tratamento	31.843	1	31.843	1.434	.235
Dieta	106.949	1	106.949	4.815	.031
Cirurgia * Tratamento	27.329	1	27.329	1.230	.271
Cirurgia * Dieta	52.751	1	52.751	2.375	.128
Tratamento * Dieta	12.896	1	12.896	.581	.449
Cirurgia * Tratamento * Dieta	46.578	1	46.578	2.097	.152
Error	1599.218	72	22.211		
Total	27934.390	80			
Corrected Total	2227.808	79			

a. R Squared = .282 (Adjusted R Squared = .212)

APÊNDICE

Torque máximo**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: TmáxT

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Cirurgia	.022	1	.022	6.329	.014
Tratamento	.001	1	.001	.177	.676
Dieta	.000	1	.000	.107	.744
Cirurgia * Tratamento	.003	1	.003	.746	.391
Cirurgia * Dieta	.005	1	.005	1.409	.239
Tratamento * Dieta	.008	1	.008	2.223	.140
Cirurgia * Tratamento * Dieta	.004	1	.004	1.214	.274
Error	.251	72	.003		
Total	3.566	80			
Corrected Total	.293	79			

a. R Squared = .145 (Adjusted R Squared = .062)

Densidade mineral óssea da região proximal do fêmur**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: DMOFemurP

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Cirurgia	.011	1	.011	60.303	.000
Tratamento	.002	1	.002	10.626	.002
Dieta	2.311E-5	1	2.311E-5	.126	.724
Cirurgia * Tratamento	1.711E-5	1	1.711E-5	.093	.761
Cirurgia * Dieta	2.531E-5	1	2.531E-5	.138	.711
Tratamento * Dieta	.000	1	.000	2.038	.158
Cirurgia * Tratamento * Dieta	.001	1	.001	3.571	.063
Error	.013	72	.000		
Total	4.607	80			
Corrected Total	.027	79			

a. R Squared = .516 (Adjusted R Squared = .469)

Força máxima

Força Máxima – Compressão Fêmur

Tests of Model Effects

Source	Type III						
	Likelihood Ratio Chi-Square	df	Sig.	F	df1	df2	Sig.
Cirurgia	3.174	1	.075	3.174	1	72	.079
Tratamento	4.522	1	.033	4.522	1	72	.037
Dieta	2.024	1	.155	2.024	1	72	.159
Cirurgia * Tratamento	.614	1	.433	.614	1	72	.436
Cirurgia * Dieta	.224	1	.636	.224	1	72	.638
Tratamento * Dieta	.483	1	.487	.483	1	72	.489
Cirurgia * Tratamento * Dieta	5.150	1	.023	5.150	1	72	.026

Dependent Variable: FmaxFemur

Model: (Intercept), Cirurgia, Tratamento, Dieta, Cirurgia * Tratamento, Cirurgia * Dieta, Tratamento * Dieta, Cirurgia * Tratamento * Dieta

Cirurgia * Tratamento * Dieta

Pairwise Comparisons

Dependent Variable: FmaxFemur

				Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a	95% Confidence Interval for Difference ^a	
Tratamento	Dieta	(I) Cirurgia	(J) Cirurgia				Lower Bound	Upper Bound
ESTEIRA	HIPER	OVX	SHAM	-2.559	6.820	.709	-16.155	11.037
		SHAM	OVX	2.559	6.820	.709	-11.037	16.155
	PADRAO	OVX	SHAM	-14.491 [*]	6.820	.037	-28.087	-.895
		SHAM	OVX	14.491 [*]	6.820	.037	.895	28.087
SEDEN	HIPER	OVX	SHAM	-12.426	6.820	.073	-26.022	1.170
		SHAM	OVX	12.426	6.820	.073	-1.170	26.022
	PADRAO	OVX	SHAM	5.797	6.820	.398	-7.799	19.393
		SHAM	OVX	-5.797	6.820	.398	-19.393	7.799

Based on estimated marginal means

a. Adjustment for multiple comparisons: Bonferroni.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

APÊNDICE

Cirurgia * Tratamento * Dieta

Pairwise Comparisons

Dependent Variable:FmaxFemur

				Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a	95% Confidence Interval for Difference ^a	
Cirurgia	Dieta	(I) Tratamento	(J) Tratamento				Lower Bound	Upper Bound
OVX	HIPER	ESTEIRA	SEDEN	9.689	6.820	.160	-3.907	23.285
		SEDEN	ESTEIRA	-9.689	6.820	.160	-23.285	3.907
	PADRAO	ESTEIRA	SEDEN	-.769	6.820	.911	-14.365	12.827
		SEDEN	ESTEIRA	.769	6.820	.911	-12.827	14.365
SHAM	HIPER	ESTEIRA	SEDEN	-.178	6.820	.979	-13.774	13.418
		SEDEN	ESTEIRA	.178	6.820	.979	-13.418	13.774
	PADRAO	ESTEIRA	SEDEN	19.519 [*]	6.820	.006	5.923	33.115
		SEDEN	ESTEIRA	-19.519 [*]	6.820	.006	-33.115	-5.923

Based on estimated marginal means

a. Adjustment for multiple comparisons: Bonferroni.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Cirurgia * Tratamento * Dieta

Pairwise Comparisons

Dependent Variable:FmaxFemur

				Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a	95% Confidence Interval for Difference ^a	
Cirurgia	Tratamento	(I) Dieta	(J) Dieta				Lower Bound	Upper Bound
OVX	ESTEIRA	HIPER	PADRAO	-1.072	6.820	.876	-14.668	12.524
		PADRAO	HIPER	1.072	6.820	.876	-12.524	14.668
	SEDEN	HIPER	PADRAO	-11.530	6.820	.095	-25.126	2.066
		PADRAO	HIPER	11.530	6.820	.095	-2.066	25.126
SHAM	ESTEIRA	HIPER	PADRAO	-13.004	6.820	.061	-26.600	.592
		PADRAO	HIPER	13.004	6.820	.061	-.592	26.600
	SEDEN	HIPER	PADRAO	6.693	6.820	.330	-6.903	20.289
		PADRAO	HIPER	-6.693	6.820	.330	-20.289	6.903

Based on estimated marginal means

a. Adjustment for multiple comparisons: Bonferroni.

Rigidez

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: RigidezFemur

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Cirurgia	48552.629	1	48552.629	19.767	.000
Tratamento	5356.592	1	5356.592	2.181	.144
Dieta	284.409	1	284.409	.116	.735
Cirurgia * Tratamento	767.189	1	767.189	.312	.578
Cirurgia * Dieta	397.654	1	397.654	.162	.689
Tratamento * Dieta	433.287	1	433.287	.176	.676
Cirurgia * Tratamento * Dieta	12394.723	1	12394.723	5.046	.028
Error	176845.345	72	2456.185		
Total	5794300.937	80			
Corrected Total	245031.827	79			

a. R Squared = .278 (Adjusted R Squared = .208)

Cirurgia * Tratamento * Dieta

Pairwise Comparisons

Dependent Variable: RigidezFemur

Tratamento	Dieta	(I) Cirurgia	(J) Cirurgia	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a	95% Confidence Interval for Difference ^a	
							Lower Bound	Upper Bound
ESTEIRA	HIPER	OVX	SHAM	-72.431 [*]	22.164	.002	-116.614	-28.248
		SHAM	OVX	72.431 [*]	22.164	.002	28.248	116.614
	PADRAO	OVX	SHAM	-13.724	22.164	.538	-57.907	30.459
		SHAM	OVX	13.724	22.164	.538	-30.459	57.907
SEDEN	HIPER	OVX	SHAM	-35.029	22.164	.118	-79.212	9.154
		SHAM	OVX	35.029	22.164	.118	-9.154	79.212
	PADRAO	OVX	SHAM	-75.900 [*]	22.164	.001	-120.083	-31.717
		SHAM	OVX	75.900 [*]	22.164	.001	31.717	120.083

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the .05 level.

a. Adjustment for multiple comparisons: Bonferroni.

APÊNDICE

Cirurgia * Tratamento * Dieta

Pairwise Comparisons

Dependent Variable: RigidezFemur

Cirurgia	Dieta	(I) Tratamento	(J) Tratamento	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a	95% Confidence Interval for Difference ^a	
							Lower Bound	Upper Bound
OVX	HIPER	ESTEIRA	SEDEN	2.319	22.164	.917	-41.864	46.502
		SEDEN	ESTEIRA	-2.319	22.164	.917	-46.502	41.864
	PADRAO	ESTEIRA	SEDEN	42.799	22.164	.057	-1.384	86.982
		SEDEN	ESTEIRA	-42.799	22.164	.057	-86.982	1.384
SHAM	HIPER	ESTEIRA	SEDEN	39.721	22.164	.077	-4.462	83.904
		SEDEN	ESTEIRA	-39.721	22.164	.077	-83.904	4.462
	PADRAO	ESTEIRA	SEDEN	-19.377	22.164	.385	-63.560	24.806
		SEDEN	ESTEIRA	19.377	22.164	.385	-24.806	63.560

Based on estimated marginal means

a. Adjustment for multiple comparisons: Bonferroni.

Cirurgia * Tratamento * Dieta

Pairwise Comparisons

Dependent Variable: RigidezFemur

Cirurgia	Tratamento	(I) Dieta	(J) Dieta	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a	95% Confidence Interval for Difference ^a	
							Lower Bound	Upper Bound
OVX	ESTEIRA	HIPER	PADRAO	-20.928	22.164	.348	-65.111	23.255
		PADRAO	HIPER	20.928	22.164	.348	-23.255	65.111
	SEDEN	HIPER	PADRAO	19.552	22.164	.381	-24.631	63.735
		PADRAO	HIPER	-19.552	22.164	.381	-63.735	24.631
SHAM	ESTEIRA	HIPER	PADRAO	37.779	22.164	.093	-6.404	81.962
		PADRAO	HIPER	-37.779	22.164	.093	-81.962	6.404
	SEDEN	HIPER	PADRAO	-21.319	22.164	.339	-65.502	22.864
		PADRAO	HIPER	21.319	22.164	.339	-22.864	65.502

Based on estimated marginal means

a. Adjustment for multiple comparisons: Bonferroni.

ANEXOS

ANEXO A – Aprovação na comissão de ética em experimentação animal

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 087/2011, sobre o projeto intitulado “*Efeitos do treinamento nas propriedades mecânicas de músculos e ossos de ratas ovariectomizadas submetidas a dieta hiperlipídica*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Antônio Carlos Shimano** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** em reunião de 26 de setembro de 2011.

(We certify that the protocol nº 087/2011, about “*Effects of physical training at mechanical properties of muscle and bones in ovariectomized rats submitted to high-lipidic diet*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the College of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo – Ethical Commission of Ethics in Animal Research (CETEA) in 09/26/2011.

Ribeirão Preto, 26 de setembro de 2011.

Prof. Dr. Márcio Dantas
Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal

ANEXO B – Depósito de pedido de patente:

“Equipamento de ensaio de torção por alta velocidade e ensaio de torção por impacto” BR n. 10 2013 005052-0, 01 mar. 2013.

<Uso exclusivo do INPI>

Espaço para etiqueta

DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU CERTIFICADO DE ADIÇÃO

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:
O requerente solicita a concessão de uma patente na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. Depositante (71):

1.1 Nome: UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP
 1.2 Qualificação: AUTARQUIA ESTADUAL DE REGIME ESPECIAL
 1.3 CNPJ/CPF: 63025530000104
 1.4 Endereço completo: AV. BRASIL, Nº 1971 JARDIM PAULISTA São Paulo SP BR
 1.5 CEP: 01431001 1.6 Telefone: (11)30911580 1.7 FAX: (11)30310922
 1.8 E-mail: PIDIRETO@USP.BR ☐ continua em folha anexa

2. Natureza: ☒ Invenção ☐ Modelo de Utilidade ☐ Certificado de Adição
 Escreva, obrigatoriamente e por extenso, a Natureza desejada: 2.1 INVENÇÃO

3. Título da Invenção, do Modelo de Utilidade ou do Certificado de Adição (54):
 "EQUIPAMENTO DE ENSAIO DE TORÇÃO POR ALTA VELOCIDADE E ENSAIO DE TORÇÃO POR IMPACTO"
☐ continua em folha anexa

4. Pedido de Divisão: do pedido **Data de Depósito:**

5. Prioridade ☐ interna ☐ unionista
 O depositante reivindica a(s) seguinte(s) prioridade(s):

Pais ou organização de origem	Número do depósito	Data do depósito

6. Inventor (72):

☒ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)

6.1 Nome: ANTONIO CARLOS SHIMANO
 6.2 Qualificação: BRASILEIRO CASADO PROF. UNIVERSITÁRIO 6.3 CPF: 32322020630
 6.4 Endereço completo: RUA GUATAMBÚ, 285 JARDIM RECREIO RIBEIRÃO PRETO SP
 6.5 CEP: 14040160 6.6 Telefone: (11)30911580 6.7 FAX (11)30310922
 6.8 E-mail: PIDIRETO@USP.BR ☒ continua em folha anexa

ANEXOS

7. Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo nº 127/97:

☐ **7.1** Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

☐ em anexo

8. Declaração de divulgação anterior não prejudicial (Período de graça):
(art. 12 da LPI e item 2 do AN nº 127/97)

☐ em anexo

9. Procurador (74)

9.1 Nome: MARIA APARECIDA DE SOUZA

9.2 CPF/CNPJ: 12184617806

9.3 API/OAB: 1833

9.4 Endereço completo: AV. BRASIL, Nº 1971

9.5 CEP: 01431001

9.6 Telefone: (11)30911580

9.7 FAX: (11)30310922

9.8 E-Mail: PIDIRETO@USP.BR

10. Listagem de seqüências Biológicas (documentos anexados) (se houver):

- ☐ Listagem de seqüências em arquivo eletrônico: n° de CDs e DVDs (originais e cópias).
- ☐ Código de controle alfanumérico no formato de código de barras: fl.
- ☐ Listagem de seqüências em formato impresso: fls.
- ☐ Declaração de acordo com o artigo da Resolução do INPI nº 228/09: fls.

11. Documentos anexados (assinale e indique também o número de folhas):
(Deverá ser indicado o nº total de somente uma das vias de cada documento)

☒	11.1 Guia de recolhimento	1 fls.	☒	11.5 Relatório descritivo	15 fls.
☒	11.2 Procuração	1 fls.	☒	11.6 Reivindicações	5 fls.
☐	11.3 Documentos de prioridade	fls.	☒	11.7 Desenhos	2 fls.
☐	11.4 Doc. de contrato de Trabalho	fls.	☒	11.8 Resumo	1 fls.
☒	11.9 Outros que não aqueles definidos no campo 11 (especificar): AUTORIZAÇÃO DOS INVENTORES				3 fls.

12. Total de folhas anexadas (referentes aos campos 10 e 11): 28 fls.**13. Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras**

SÃO PAULO, 01/03/2013

Local e Data

MARIA APARECIDA DE SOUZA - API 1833
CPF: 12184617806

Assinatura e Carimbo

Formulário 1.01 -

Depósito de Pedido de Patente ou de Certificado de Adição (folha 2/2)

ÍNDICE DE INVENTORES

Titulo: "EQUIPAMENTO DE ENSAIO DE TORÇÃO POR ALTA VELOCIDADE E ENSAIO DE

Página : 1

Nome: JORGE CAOLO IMORI JUNIOR
Qualificação: BRASILEIRO SOLTEIRO ESTUDANTE CNPJ/CPF: 22011788870
Endereço: RUA PARANÁ, 421
Bairro: SUMAREZINHO Cidade: RIBEIRÃO PRETO
CEP: 14055490 Estado: SP País: BR
Telefone: (11)30911580 Fax: (11)30310922

Nome: ANA PAULA MACEDO
Qualificação: BRASILEIRA CASADA ESTUDANTE CNPJ/CPF: 27713045899
Endereço: AV. RIO PARDO, 4369
Bairro: CIDADE UNIVERSITÁRIA Cidade: RIBEIRÃO PRETO
CEP: 14051520 Estado: SP País: BR
Telefone: (11)30911580 Fax: (11)30310922