

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE

IGOR HISASHI MURAI

Efeitos do exercício físico associado à suplementação de creatina na  
massa óssea de ratas ovariectomizadas

SÃO PAULO  
2014

IGOR HISASHI MURAI

Efeitos do exercício físico associado à suplementação de creatina na  
massa óssea de ratas ovariectomizadas

Dissertação apresentada à Escola de  
Educação Física e Esporte da  
Universidade de São Paulo para obtenção  
do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Biodinâmica do  
Movimento Humano

Orientador: Prof. Dr. Bruno Gualano

SÃO PAULO

2014

Murai, Igor Hisashi

Efeitos do exercício físico associado à suplementação de creatina na massa óssea de ratas ovariectomizadas / Igor Hisashi Murai. – São Paulo : [s.n.], 2014.

60p. ; il.

Dissertação (Mestrado) - Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Gualano.

1. Osteoporose 2. Exercício físico 3. Suplementação alimentar 4. Creatina 5. Biomecânica I. Título.

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

**Autor:** MURAI, Igor Hisashi

**Título:** Efeitos do exercício físico associado à suplementação de creatina na massa óssea de ratas ovariectomizadas.

Dissertação apresentada à Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Dedico esta dissertação ao meu pai Jorge Hideo Murai (*in memoriam*), exemplo de ser humano, guerreiro e vencedor. Sem ele seria impossível chegar até onde cheguei; sempre será a pessoa mais importante em minha vida.

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente à Deus, por me proporcionar a vida e sempre estar ao meu lado iluminando minha caminhada.

Ao orientador Prof. Dr. Bruno Gualano, pelo exemplo de profissional e pela confiança depositada em mim. Agradeço imensamente os ensinamentos e a oportunidade concebida para que eu pudesse concluir mais esta etapa da minha carreira.

Ao Prof. Dr. Hamilton Roschel, pela paciência e disponibilidade em me ajudar sempre que precisei. Suas contribuições e ensinamentos foram essenciais para a conclusão desse projeto.

À Profa. Dra. Rosa Maria Rodrigues Pereira e à Liliam Takayama, pela valiosa contribuição e, acima de tudo, pela dedicação na realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Vanda Jorgetti, ao Prof. Dr. Rodrigo Bueno, à Dra. Luciene Reis e à Miriam, pela extrema dedicação, compreensão e profissionalismo.

Ao Prof. Dr. Rafael Yague Ballester e ao Lucas Pabis, pelo companheirismo, dedicação, disponibilidade e oportunidade de aprender conhecimentos não usuais à minha área de pesquisa. A colaboração de vocês foi extremamente importante.

À todo o pessoal do Laboratório de Nutrição e Metabolismo da EEFEUSP, que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho. Em especial, quero agradecer aos amigos que me ajudaram nos experimentos, estiveram mais próximos no desenvolvimento do projeto e, principalmente, proporcionaram uma convivência sadia para o ambiente de trabalho: Renatão, Wagner, Will, Rafa, Vitão, Carlão, Fábio, Vinícius e Vitor Procópio. Muito obrigado por tudo que vocês me ensinaram.

Ao pessoal da CPG: Ilza, Paulo, Márcio e Mariana, pela excelência no serviço prestado e por estarem sempre dispostos a ajudar os alunos da instituição.

Por fim, quero dedicar meu agradecimento mais do que especial às pessoas que eu amo incondicionalmente e que me motivam a seguir em frente sob qualquer situação adversa da vida: à minha amiga, companheira e namorada Ingrid, por estar sempre ao meu lado, me dando forças, me apoiando em todos os momentos da vida, me ajudando em tudo que eu preciso e sendo extremamente compreensiva, te amo muito e obrigado por tudo; à minha mãe Marina, pelo carinho, paciência e por dedicar sua vida inteira em prol da minha educação e bem estar, sempre me dando suporte nos momentos que eu precisei, te amo muito e serei eternamente grato à tudo que me proporcionou; ao meu irmão Willian, pela amizade, apoio e exemplo de um ótimo profissional. Sempre vou buscar ser uma pessoa melhor por vocês!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de mestrado (processo 12/04695-0).

## Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	3
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	7
2.1	EFEITOS DO ESTRÓGENO SOBRE O TECIDO ÓSSEO.....	7
2.2	EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE O TECIDO ÓSSEO.....	11
2.3	EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE CREATINA SOBRE O TECIDO ÓSSEO.....	15
3	OBJETIVOS.....	20
3.1	OBJETIVO GERAL.....	20
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
4.1	PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	19
4.2	ANIMAIS.....	22
4.3	DENSITOMETRIA ÓSSEA E COMPOSIÇÃO CORPORAL.....	22
4.4	OVARIECTOMIA.....	23
4.5	PROTOCOLO DE TREINAMENTO FÍSICO.....	24
4.6	SUPLEMENTAÇÃO DE CREATINA.....	24
4.7	CONSUMO ALIMENTAR.....	25
4.8	ANÁLISE BIOMECÂNICA.....	25
4.9	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	28
5	RESULTADOS.....	29
5.1	ANIMAIS.....	29
5.2	DENSITOMETRIA ÓSSEA E COMPOSIÇÃO CORPORAL.....	30
5.3	CONSUMO ALIMENTAR.....	37
5.4	ANÁLISE BIOMECÂNICA.....	38
6	DISCUSSÃO.....	42
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

## RESUMO

MURAI, IGOR HISASHI. **Efeitos do exercício físico associado à suplementação de creatina na massa óssea de ratas ovariectomizadas. 2014. 60f. Dissertação (Mestrado em Educação Física) – Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2014.**

A literatura atual aponta o exercício físico como uma das estratégias não-farmacológicas mais utilizadas no tratamento e prevenção de condições que acometem o tecido ósseo. Ademais, estudos indicam que a suplementação de creatina pode exercer efeitos positivos sobre o ganho de massa óssea. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos preventivos do exercício físico associado à suplementação de creatina na perda de massa óssea em ratas ovariectomizadas. Diante disso, sessenta e cinco ratas da linhagem Wistar foram pareadas pelo peso corporal e divididas aleatoriamente em cinco grupos, sendo eles: 1) ratas falso-operadas (SHAM); 2) ratas ovariectomizadas (OVX), sedentárias e suplementadas com placebo (PL); 3) ratas OVX, sedentárias e suplementadas com creatina (CR); 4) ratas OVX, treinadas e suplementadas com placebo (PL+TR) e 5) ratas OVX, treinadas e suplementadas com creatina (CR+TR). Os animais foram submetidos a um protocolo de treinamento físico em declive em esteira rolante e suplementados com creatina diariamente por meio de gavagem esofágica. Foi realizada a avaliação de densitometria óssea para a obtenção dos parâmetros ósseos de conteúdo mineral ósseo (CMO) e densidade mineral óssea (DMO) de corpo total e regional, assim como a composição corporal nos períodos pré e pós-intervenção. Além disso, foi removido o fêmur direito para a análise biomecânica. Após a intervenção, o grupo PL+TR apresentou maiores valores de CMO e DMO em comparação ao grupo PL ( $p=0,004$  e  $p=0,020$ , respectivamente), ao passo que o grupo CR+TR experimentou maiores incrementos para o CMO e tendência ao aumento da DMO em comparação ao grupo CR ( $p=0,011$  e  $p=0,064$ ). A análise biomecânica do fêmur demonstrou que ambos os grupos treinados (PL+TR e CR+TR) apresentaram valores de força máxima significativamente maiores em relação aos grupos SHAM ( $p=0,024$  e  $p=0,020$ , respectivamente), PL ( $p<0,001$  e  $p<0,001$ ) e CR ( $p=0,002$  e  $p=0,002$ ). Com relação à rigidez do fêmur, observou-se que o grupo SHAM não apresentou diferença significativa quando comparado à ambos os grupos treinados ( $p=0,973$  vs. PL+TR e  $p=0,998$  vs. CR+TR), entretanto, apresentou diferença significativa em relação aos grupos sedentários ( $p=0,048$  vs. PL e  $p=0,024$  vs. CR), ainda para esse parâmetro, o grupo PL apresentou diferença significativa em relação ao grupo PL+TR ( $p=0,009$ ), assim como o grupo CR foi significativamente diferente em relação ao grupo CR+TR ( $p=0,043$ ). Não houve diferenças significantes entre os grupos PL e CR e entre os grupos PL+TR e CR+TR ao longo do estudo. Dessa forma, concluímos que a suplementação de creatina não apresentou efeitos isolados, nem aditivos, quando combinada ao treinamento físico, porém, o exercício físico promoveu efeitos positivos sobre o tecido ósseo, enfatizando, portanto, o seu papel terapêutico ímpar em atenuar a perda de massa óssea.

Palavras-chave: osteoporose, tecido ósseo, exercício físico, creatina, biomecânica, flexão em três pontos.



## ABSTRACT

MURAI, IGOR HISASHI. **Effects of exercise training associated with creatine supplementation on bone mass of ovariectomized rats. 2014. 60f. Dissertação (Mestrado em Educação Física) – Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2014.**

The current literature indicates exercise training as one of the most used non-pharmacological strategies in the treatment and prevention of conditions that affect the bone tissue. Moreover, studies indicate that creatine supplementation may exert positive effects on bone mass gain. Thus, the aim of this study was to investigate the preventive effects of exercise training associated with creatine supplementation on bone loss in ovariectomized rats. Thus, sixty-five female Wistar rats were matched by body weight and randomly assigned into five experimental groups, as follows: 1) shammed (SHAM); 2) ovariectomized (OVX), sedentary and placebo-supplemented rats (PL); 3) OVX, sedentary and creatine-supplemented rats (CR); 4) OVX, trained and placebo-supplemented rats (PL+TR) and 5) OVX rats, trained and creatine-supplemented rats (CR+TR). The animals were submitted to a downhill running training protocol performed on a treadmill and supplemented with creatine on daily basis via gavage. Bone density were evaluated pre and post-intervention to obtain bone mineral content (BMC) and bone mineral density (BMD) from whole body and regional area, as well as body composition. Right femur was removed to biomechanical assessment. After the intervention, PL+TR group had higher BMC and BMD compared to the PL group ( $p=0.004$  and  $p=0.020$ , respectively), while the CR+TR group experienced greater increases in BMC and tended to increase BMD compared to the CR group ( $p=0.011$  and  $p=0.064$ , respectively). Biomechanical assessment demonstrated significantly higher femur maximum strength of both trained groups (PL+TR and CR+TR) compared to SHAM group ( $p=0.024$  and  $p=0.020$ , respectively), PL group ( $p<0.001$  and  $p<0.001$ ) and CR group ( $p=0.002$  and  $p=0.002$ ). With respect to femur stiffness, no significant difference was observed from the SHAM group compared to both trained groups ( $p=0.973$  vs. PL+TR and  $p=0.998$  vs. CR+TR), however, significant difference was observed when compared to sedentary groups ( $p=0.048$  vs. PL and  $p=0.024$  vs. CR), moreover, significant difference was observed when the PL group was compared to PL+TR group ( $p=0.009$ ), as well as the CR group was significantly different compared to the CR+TR group ( $p=0.043$ ). There were no significant differences between PL and CR groups and between PL+TR and CR+TR groups along the study. Thus, we conclude that creatine supplementation showed no isolated, nor additive effects when combined with exercise training, however, exercise training promoted positive effects on bone tissue, thus emphasizing its unique therapeutic role in attenuating the loss of bone mass.

Key-words: osteoporosis, bone tissue, exercise training, creatine, biomechanics, three point bending.

## 1 Introdução

A osteoporose é uma desordem metabólica sistêmica, caracterizada pela deterioração da microarquitetura do tecido, baixa massa óssea e diminuição da resistência à fratura, resultando, por conseguinte, em um aumento significativo no risco de fraturas ósseas espontâneas (Kanis, 1994; Lane, 2011). O diagnóstico da osteoporose em mulheres é comumente realizado a partir do exame de densitometria óssea, cujo objetivo é a avaliação da densidade mineral óssea (DMO) da coluna vertebral (i.e. vértebras L1 a L4), quadril e colo do fêmur, sendo que os resultados obtidos são interpretados utilizando-se a classificação proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (Kanis, 1994; Camargo *et al.*, 2005; Ferrari *et al.*, 2012). Dessa forma, a osteoporose é definida pelo *T-score*, valor correspondente ao número de desvios padrão (DP) acima ou abaixo da média da DMO para indivíduos adultos jovens saudáveis, menor ou igual a -2,5 DP para as regiões anatômicas anteriormente citadas (Kanis, 1994; Camargo *et al.*, 2005; Ferrari *et al.*, 2012).

De acordo com os dados do *US Census Bureau*, 2011, a população brasileira para o mesmo ano era de aproximadamente 200 milhões de pessoas, sendo que 20% deste total estão na faixa etária de 50 anos ou mais, além disso, estima-se que 8,6 milhões são idosos com idade maior do que 70 anos. Ainda em relação à esse censo, observa-se que a população acima de 60 anos alcançou o número de 20 milhões de indivíduos, o que representa o triplo da população da mesma faixa etária há trinta anos atrás. Ademais, a expectativa de vida aumentou de 52 anos em 1952 para 71 anos em 2010, sendo que, em relação ao ano de 2050, este número tende a aumentar para 80 anos.

A osteoporose é, atualmente, um dos principais problemas de saúde pública a nível global, pois a sua alta prevalência na população é consequência, sobretudo, do aumento significativo na expectativa de vida (Kanis, 1994; Maeda & Lazaretti-Castro, 2013; Cummings *et al.*, 2002). Embora os dados da prevalência da osteoporose no Brasil não serem consistentes devido às diferenças metodológicas entre os estudos, estima-se que cerca de 33% das mulheres na pós-menopausa são acometidas por essa condição (Camargo *et al.*, 2005; Pinheiro *et al.*, 2010). Uma das principais preocupações em decorrência à essa patologia é a alta incidência de fraturas associadas, em especial, aquelas que acometem a região do quadril, uma vez que,

as conseqüências funcionais para o indivíduo são significativamente maiores em relação à qualquer outro tipo de fratura, adicionalmente, o alto custo com o tratamento torna-se um problema a ser solucionado (Cummings *et al.*, 2002). Anualmente, mais de 120 mil fraturas de quadril são registradas no Brasil, sendo que o custo médio nacional com a hospitalização de um paciente pelo sistema público de saúde é estimado em US\$ 3,940, já no sistema privado, o custo eleva-se para US\$ 12,000 (Komatsu *et al.*, 2004; Araujo *et al.*, 2005; Clark *et al.*, 2009). Considerando-se que a osteoporose acomete primordialmente as mulheres no período de pós-menopausa, torna-se de suma importância o conhecimento dos mecanismos pelos quais a deficiência na produção e expressão de receptores hormonais ovarianos pode levar à perda de massa óssea, fazendo-se necessário, portanto, a utilização de estratégias que possam atenuar os efeitos dessa doença.

O estrógeno é um hormônio essencial para o controle do funcionamento das células que expressam receptores de estrógeno ESR1 e ESR2 (também denominados ER $\alpha$  e ER $\beta$ ), membros da superfamília dos receptores nucleares, que, quando ativados, regulam a expressão de genes alvos responsivos a este hormônio (Nilsson & Gustafsson, 2011). Dentre as células que respondem aos efeitos do estrógeno, destacam-se os osteócitos, cuja principal função é a alta capacidade de detectar os estímulos mecânicos gerados pela carga externa imposta sobre o tecido ósseo (Komori, 2013). Cabe ressaltar que a perda de massa óssea, corriqueiramente observada no período de pós-menopausa, pode ser creditada à redução da produção de estrógeno, resultando na diminuição da atividade dos osteócitos e uma conseqüente prevalência da reabsorção óssea sobre a formação óssea (Lanyon *et al.*, 2004).

Dentre as estratégias utilizadas na prevenção e tratamento da osteoporose na pós-menopausa, destacam-se a reposição hormonal (Torgerson *et al.*, 2001), a suplementação de vitamina D (Holick, 2008) e a exposição adequada aos raios ultravioletas (Holick *et al.*, 2007). Entretanto, é bem estabelecido que o estímulo mecânico também pode regular a massa óssea e sua geometria (Wolff, 1892). Um estudo realizado por Aguirre *et al.*, 2006, demonstrou, por exemplo, que a ausência de estímulo mecânico e sustentação do peso corporal em camundongos submetidos à suspensão pela cauda diminuiu a DMO e a resistência à fratura na coluna vertebral ao cabo de 18 dias. Segundo os autores, a redução da massa óssea ocorreu devido à apoptose dos osteócitos e osteoblastos, células responsáveis pela

formação óssea que são altamente sensíveis ao estímulo mecânico (Aguirre *et al.*, 2006; Klein-Nulend *et al.*, 1995). Concomitantemente à apoptose dessas células, tem sido descrito aumento exacerbado de reabsorção óssea induzida por ativação de osteoclastos como conseqüência da redução de aplicação de cargas mecânicas no tecido ósseo (Riggs *et al.*, 2002; Tan *et al.*, 2007; You *et al.*, 2008; Komori, 2013). Dessa forma, o estímulo mecânico gerado pelo exercício físico poderia impedir o aumento da reabsorção óssea e o conseqüente aumento da perda de massa óssea, prevenindo, assim, a ocorrência da osteoporose (Aguirre *et al.*, 2006; Klein-Nulend *et al.*, 1995; Tan *et al.*, 2007; You *et al.*, 2008).

A rata ovariectomizada (OVX) é um modelo experimental que assegura características altamente similares à pós-menopausa observada em humanos, desenvolvendo perda óssea significativa em poucas semanas após o procedimento cirúrgico de ovariectomia (Kalu *et al.*, 1991; Li *et al.*, 1997; Jee *et al.*, 2001). Dessa forma, tal modelo tem sido vastamente empregado em intervenções que buscam mimetizar a perda de massa óssea associada à baixa produção dos hormônios ovarianos (Kalu *et al.*, 1991; Li *et al.*, 1997; Jee *et al.*, 2001; Iwamoto *et al.*, 2005). No que tange ao exercício físico, estudos demonstraram que o treinamento físico realizado em esteira rolante pode aumentar a formação óssea e a DMO, assim como os parâmetros histomorfométricos, tais como volume ósseo, número de trabéculas, espessura de trabéculas e superfície osteoblástica nos ossos cortical e trabecular em animais com baixa massa óssea (Carter, 1984; Iwamoto *et al.*, 1998; Iwamoto *et al.*, 1998; Iwamoto *et al.*, 2005). Assim sendo, o exercício físico pode ser considerado uma importante estratégia terapêutica não-farmacológica a ser considerada na prevenção e no tratamento de condições que acometem o tecido ósseo.

Além do exercício físico, estratégias nutricionais também podem ser, potencialmente, de grande valia na preservação da massa óssea. Dentre essas, pode-se destacar a suplementação de creatina (Cr).

A Cr é um composto nitrogenado sintetizado endogenamente ou obtido via dieta (Wyss & Kaddurah-Daouk, 2000; Gualano *et al.*, 2010). A Cr é responsável pela transferência rápida de energia da matriz mitocondrial (sítio de “produção” de ATP) ao citosol (sítio de “dispêndio” de ATP) através de reações catalisadas por diferentes isoformas da enzima creatina quinase (CK), localizadas em tecidos que

requerem alta demanda energética, como o músculo esquelético, o coração, o cérebro e o osso (Wallimann *et al.*, 1994).

De fato, o osso é um tecido que requer grande aporte energético para realizar os processos de diferenciação, proliferação e síntese de matriz óssea (Gerber *et al.*, 2005). Esses processos decorrem da energia proveniente da glicólise, oxidação fosforilativa e do sistema ATP/PCr (Wallimann *et al.*, 1994). Interessantemente, há evidências que apontam para um positivo papel da suplementação de Cr sobre o metabolismo ósseo. Chilibeck *et al.*, 2005, por exemplo, observaram aumento significativo do conteúdo mineral ósseo (CMO) em membros superiores de idosos em resultado à combinação entre a suplementação de creatina e o treinamento de força com duração de 12 semanas. Segundo os autores, o ganho de massa óssea poderia ser secundário ao aumento da força muscular que, por sua vez, geraria maiores níveis de tensão no osso por meio da contração muscular, ocasionando um estímulo ótimo para a formação óssea. Corroborando o importante papel da suplementação de Cr sobre a massa óssea, Louis *et al.*, (2003) relataram aumento da DMO e redução na excreção urinária do marcador de reabsorção óssea N-telopeptídeo do colágeno tipo I (NTx) em jovens com distrofia muscular de Duchenne suplementados com Cr por três meses.

Em modelo animal, foi relatada melhora na DMO da coluna vertebral e nos parâmetros biomecânicos do osso, tais como força máxima até a fratura e diâmetro do sítio de fratura, em ratos jovens saudáveis da linhagem *Sprague-dawley* suplementados com Cr durante oito semanas (Antolic *et al.*, 2007). Os autores sugerem que a oferta de Cr tenha sido responsável por salientar a provisão de energia no tecido ósseo através do sistema ATP/PCr, contribuindo para a diferenciação das células ósseas, favorecendo, portanto, a formação óssea (Antolic *et al.*, 2007; Gerber *et al.*, 2005). Em consonância com esse achado, um recente estudo demonstrou que a suplementação de creatina foi capaz de aumentar o CMO (i.e. níveis de fosfato) da vértebra lombar em ratas com baixa massa óssea induzida pela ovariectomia, entretanto, nenhuma diferença foi observada para o fêmur desses animais. Especula-se que a mudança observada ocorreu pelo fato de que as vértebras são compostas predominantemente por osso trabecular e, portanto, mais responsivo às intervenções devido seu maior *turnover* ósseo (De Souza *et al.*, 2011). Esse estudo gerou evidência de que a suplementação de Cr é capaz também de alterar a qualidade do tecido ósseo em modelo animal com baixa massa óssea já

estabelecida. Contudo, não se sabe se a suplementação de creatina, acompanhada ou não de treinamento físico, pode prevenir parcialmente a perda de massa óssea em animais propensos a tal condição.

Sendo assim, pode-se inferir que há um grande potencial terapêutico da suplementação de Cr em condições de baixa massa óssea quando associada ou não ao exercício físico. Portanto, será conduzido um estudo aleatorizado e controlado por placebo em modelo animal de baixa massa óssea a fim de elucidar esta hipótese.

## **2 Revisão de literatura**

### **2.1 Efeitos do estrógeno sobre o tecido ósseo**

Desde que Albright *et al.*, (1941) demonstraram que a deficiência na produção de estrógeno, corriqueiramente observada na pós-menopausa, está relacionada principalmente com a perda de massa óssea, diversos estudos investigaram os mecanismos pelos quais esse esteróide influencia a regulação do metabolismo ósseo. Os efeitos do estrógeno, assim como os efeitos do estímulo mecânico, representam um dos principais mecanismos homeostáticos para o remodelamento ósseo normal, permitindo inferir, portanto, que diminuições significantes na massa óssea não ocorrem a menos que um desses dois fatores seja alterado (Riggs *et al.*, 2002).

O estrógeno é capaz de controlar o remodelamento ósseo por meio da ativação de vias de sinalização que agem diretamente sobre o processo de formação dos osteoclastos. Essas células, responsáveis pela reabsorção óssea, são originadas a partir de células precursoras dos osteoclastos, as quais são proliferadas e diferenciadas em osteoclastos maduros multinucleados pela ação de proteínas sinalizadoras, como o RANKL e M-CSF (Riggs, 2000; Manolagas, 2000; Boyle *et al.*, 2003). Sabe-se que o RANKL (do inglês *receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand*) e M-CSF (do inglês *macrophage colony-stimulating factor*) são duas citocinas expressas pelos osteoblastos e células estromais e possuem papel determinante para osteoclastogênese por meio dos seguintes mecanismos: o RANKL se liga nos receptores RANK (do inglês *receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B*) presentes na membrana das células precursoras dos osteoclastos, desencadeando vias de

sinalização responsáveis por ativar essas células, as quais irão se fundir e diferenciar em osteoclastos maduros multinucleados (Clarke, 2008). O RANKL é necessário em todas as etapas da osteoclastogênese, desde a ativação das células precursoras dos osteoclastos, que darão início a tal processo, até o aumento da sobrevivência e desenvolvimento dos osteoclastos maduros (Boyle *et al.*, 2003). A M-CSF é responsável principalmente pela proliferação e diferenciação dos osteoclastos precursoras, assim como pela ativação e aumento da sobrevivência dos osteoclastos maduros (Manolagas, 2000; Clarke, 2008).

O estrógeno possui papel importante na regulação do metabolismo ósseo por meio da diminuição na expressão de M-CSF e do aumento na expressão de osteoprotegerina (OPG) (Riggs *et al.*, 2002; Clarke, 2008). A OPG é uma proteína pertencente à superfamília de receptores de Fator de Necrose Tumoral (TNF), produzida e liberada pelos osteoblastos ativados (Pereira & Pereira, 2004). Essa citocina atua como um receptor solúvel que se liga com alta afinidade ao RANKL a fim de inativá-lo e impedir sua ligação ao receptor RANK presente na membrana das células precursoras dos osteoclastos, diminuindo a reabsorção óssea pela ação inibitória na maturação e ativação dessas células (Pereira & Pereira, 2004; Riggs *et al.*, 2002; Udagawa *et al.*, 2000; Boyle *et al.*, 2003).

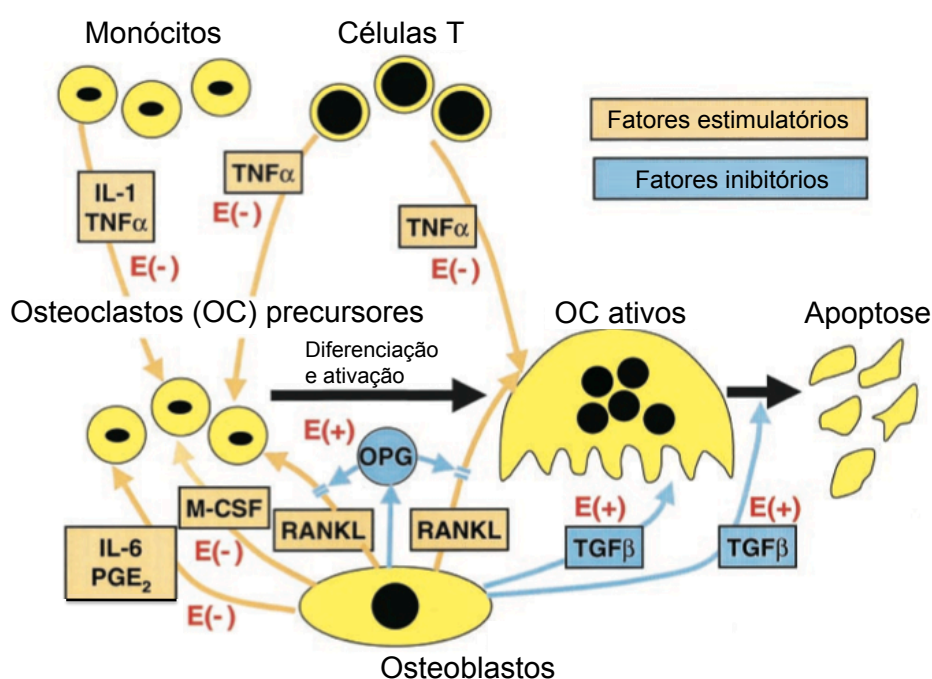


Figura 1. Representação ilustrativa da ação do estrógeno (E) na osteoclastogênese. Adaptado de Riggs *et al.*, (2002).

A deficiência na produção de estrógeno, induzida por meio do procedimento cirúrgico de ovariectomia, é reconhecida como uma estratégia válida e altamente reprodutível quando se tem o objetivo de mimetizar a perda de massa óssea em mulheres na pós-menopausa (Kalu, 1991; Li *et al.*, 1997; Wronski *et al.*, 1989; Egermann *et al.*, 2005). Esse modelo experimental tornou-se amplamente utilizado em animais, principalmente em roedores, pelo fato de que carrega consigo características favoráveis, dentre as quais destacam-se: *i*) os mecanismos de perda óssea mediada pelo estrógeno guardam semelhanças, em muitos aspectos, ao ser humano; *ii*) a capacidade de utilização de técnicas invasivas para a avaliação do tecido ósseo; *iii*) a utilização de desenhos experimentais que possibilitam testar intervenções de característica preventiva. É importante ressaltar, portanto, as limitações observadas nesse modelo animal: *i*) a ausência de um parâmetro estabelecido que caracterize uma perda óssea significativa em relação ao animal controle, como por exemplo o *T-score* utilizado para definir a osteoporose em humanos; *ii*) a magnitude da redução da massa óssea em animais ser menor do que a observada em humanos; *iii*) a ausência de fraturas ósseas espontâneas características da osteoporose (Egermann *et al.*, 2005).

Nesse contexto, um estudo clássico de Wronski *et al.*, (1989) teve como objetivo testar os efeitos da OVX a longo prazo sobre o tecido ósseo. Os autores utilizaram ratas da linhagem *Sprague-dawley* com noventa dias de vida com o intuito de avaliarem as alterações na microarquitetura óssea, assim como a taxa de perda óssea por meio de histomorfometria na metáfise proximal da tíbia dos animais, região predominantemente composta por osso trabecular. Os achados do estudo demonstram que uma fase inicial, de acelerada perda óssea, ocorre nos primeiros 100 dias pós-OVX, caracterizando-a por uma taxa de perda equivalente a 0,82%/dia; posteriormente, uma baixa taxa de perda equivalente a 0,08%/dia ocorre entre os dias 270 a 540, o que a caracteriza, assim, por uma fase lenta. Os autores denominam, portanto, que o padrão de perda óssea pós-OVX é bifásico, diferenciando claramente uma fase rápida de uma fase lenta; adicionalmente, pode-se inferir que a utilização desse modelo experimental com o intuito de mimetizar a perda óssea observada na pós-menopausa deve ser feita em períodos relativamente curtos de tempo, ou seja, até 100 dias após a realização do procedimento cirúrgico (Wronski *et al.*, 1989; Egermann *et al.*, 2005).



Posteriormente, o mesmo grupo realizou um estudo com o objetivo de caracterizar as modificações na massa óssea e no *turnover* ósseo na região do colo do fêmur de ratas OVX. Foram utilizadas ratas da linhagem *Sprague-dawley*, OVX ou falso-operadas com noventa dias de vida e eutanasiadas em vários momentos que variaram de 0 a 360 dias. Os achados do estudo demonstram que entre um período de 30 a 90 dias pós-OVX, o volume do osso trabecular na região mensurada apresentou uma porcentagem de diminuição que variou entre 75% a 82% em relação ao grupo controle. Observa-se também diminuições significantes em relação à taxa de aposição mineral após 90 dias do procedimento cirúrgico. Os resultados do estudo permitem concluir que a utilização da OVX serve como um bom modelo experimental em estudos pré-clínicos que buscam investigar os mecanismos relacionados à perda óssea induzida pela falta de estrógeno e que o pronunciamento nas modificações do tecido ósseo induzidas pela OVX não são tão tardias em animais, corroborando os achados do estudo anteriormente descrito; esses achados sugerem também que a OVX é uma boa estratégia para se testar intervenções preventivas que buscam controlar a perda óssea decorrente da pós-menopausa, uma vez que o tempo em que ocorrem as alterações no tecido ósseo estão bem descritos (Li *et al.*, 1997). Dessa forma, cabe ressaltar que a relevância do entendimento em relação ao controle do remodelamento ósseo pelo estrógeno, deve-se pelo fato de que, uma vez que os osteócitos e osteoblastos expressam ambos os receptores de estrógeno ESR1 e ESR2, a ausência desse hormônio ovariano seria capaz de diminuir o funcionamento normal dessas células ao reduzir o conteúdo e a atividade desses receptores, principalmente o ESR1, resultando, conseqüentemente, em uma redução na capacidade de formação óssea adequada (Frost *et al.*, 1992; Riggs *et al.*, 2002; Lee & Lanyon, 2003; Price *et al.*, 2011).

Corroborando as informações supracitadas, um estudo realizado por Lee *et al.*, (2003), proporcionou uma das evidências mais convincentes de que o ESR1 é essencial na resposta adaptativa óssea *in vivo*. Os autores utilizaram um modelo de camundongos *knockout* para o gene que expressa o ESR1 (ER $\alpha^{-/-}$ ), com o intuito de avaliarem a resposta osteogênica em decorrência ao estímulo mecânico, aplicado diretamente na ulna dos animais em uma intensidade aproximada de 3 N de força axial, sendo que em cada sessão foram realizadas 40 repetições, distribuídas em três dias na semana, durante duas semanas. Os achados do estudo mostram que esse padrão de aplicação de carga mecânica foi capaz de ativar a formação óssea

nos animais controle com função normal para o ESR1 (ER $\alpha^{+/+}$ ), aumentando a área cortical em aproximadamente 8%, entretanto, nos camundongos *knockout* essa resposta foi diminuída em três vezes, apresentando um aumento de apenas 2,4%. Posteriormente a esse estudo, os autores realizaram um segundo experimento em cultura primária de osteoblastos extraídos da ulna dos mesmos camundongos com o objetivo de avaliar a proliferação celular após uma aplicação única de estímulo mecânico, que consistiu em 600 ciclos a uma frequência de 1 Hz. Os resultados desse experimento *in vitro* demonstram que, após 24h da aplicação do estímulo mecânico, as células provenientes dos animais ER $\alpha^{+/+}$  apresentaram proliferação significativa em relação ao dia anterior, em uma magnitude equivalente a 58%, enquanto que o número de células provenientes dos animais *knockout* não apresentaram aumento (Lee *et al.*, 2003).

## **2.2 Efeitos do exercício físico sobre o tecido ósseo:**

O estímulo mecânico decorrente do exercício físico promove, sabidamente, efeitos positivos sobre o osso, dentre os quais destacam-se a manutenção e aumento da massa óssea, assim como a prevenção da deterioração da microarquitetura desse tecido (Iwamoto *et al.*, 1999; Iwamoto *et al.*, 2005; Hamann *et al.*, 2012). De fato, o osso é um tecido que possui a capacidade de adaptar sua massa e geometria de acordo com o estímulo mecânico imposto a fim de atingir uma eficiência mecânica ótima (Wolff, 1892). Entretanto, a ausência do estímulo mecânico é capaz de aumentar a reabsorção óssea por meio da sinalização de vias que ativam a osteoclastogênese, gerando diminuições da estrutura e função ósseas (Aguirre *et al.*, 2006; O'Brien, 2010; Komori, 2013).

Dentre os mecanismos celulares que regulam o remodelamento ósseo em decorrência ao estímulo mecânico, salienta-se a capacidade de mecanotransdução dos osteócitos (Lanyon, 1993; Clarke, 2008; You *et al.*, 2008; Komori, 2013). Os osteócitos são células originadas a partir da diferenciação de osteoblastos maduros e consistem no tipo celular em maior abundância, ou seja, compõe aproximadamente 95% de todo o tecido ósseo adulto e representam as células com maior sobrevivência, podendo manter seu funcionamento normal por décadas antes de atingirem a maturação e morte celular (Bonewald *et al.*, 2011; Schaffler *et al.*, 2013).

Essas células encontram-se incorporadas nas lacunas presentes no interior da matriz óssea e mantêm uma extensa rede de comunicação entre si e os osteoblastos localizados nas superfícies ósseas por meio de processos dendríticos citoplasmáticos, conectados por um sistema do tipo *gap-junction*, o qual permite a passagem de íons e moléculas sinalizadoras necessárias para o remodelamento ósseo normal (Bonewald, 2011; Clarke, 2008; Komori, 2013).

Estudos *in vitro* foram de extrema importância para o entendimento acerca dos mecanismos pelos quais os osteócitos controlam o remodelamento ósseo (Duncan & Turner, 1995; Scott *et al.*, 2008). Sabe-se que essas células são altamente sensíveis aos estímulos mecânicos provenientes de forças externas impostas ao tecido, sendo capazes de transformá-los em sinais bioquímicos que irão desencadear vias de sinalização a fim de ativar os osteoblastos e dar início ao processo de formação óssea. Esse processo, denominado mecanotransdução, desempenha um papel crucial nas respostas adaptativas ósseas em decorrência ao exercício físico (Duncan & Turner, 1995; Scott *et al.*, 2008; You *et al.*, 2008).

A distribuição da carga mecânica se dá de maneira distinta ao longo do osso, sendo que, enquanto em um lado da superfície óssea há a ocorrência de força compressiva, o outro lado, conseqüentemente, suporta uma força de tração; a diferença entre a distribuição de forças resulta em um gradiente de pressão no fluido intersticial que compõe a matriz óssea, o que faz com que o fluido se dirija da região de maior pressão (força compressiva) até a região de menor pressão (força de tração), com o intuito de atingir um equilíbrio hidrodinâmico no interior do sistema lacunocanalicular; o atrito entre o fluxo gerado pela passagem do fluido com a parede das canáliculas resulta em uma força tangencial de cisalhamento, a qual atinge a membrana plasmática dos osteócitos, transformando-a em processos bioquímicos intracelulares, capazes de modificar aspectos funcionais dessas células (Duncan & Turner, 1995; Ehrlich & Lanyon, 2002; Bonewald, 2011; Schaffler *et al.*, 2013; Zaman *et al.*, 2006). Essa fase, denominada acoplamento mecânico, é caracterizada basicamente pela transdução da energia mecânica em estímulos detectáveis pelos osteócitos (Duncan & Turner, 1995). Subseqüentemente, os estímulos mecânicos extracelulares são capazes de gerar deformações na membrana plasmática, causando, portanto, a ativação de moléculas sinalizadoras e algumas proteínas de membrana, dentre elas as integrinas, as proteínas que compõe o citoesqueleto, proteínas G, bem como dos canais iônicos (i.e. canais de

Ca<sup>2+</sup>) o que irá gerar, conseqüentemente, a despolarização da membrana plasmática; a ativação dessas proteínas são responsáveis por manterem o funcionamento adequado dos osteócitos e estimularem fatores de transcrição relacionados ao remodelamento ósseo (Duncan & Turner, 1995; Scott *et al.*, 2008). Sabe-se que a despolarização da membrana plasmática gera um potencial de ação que será transmitido célula a célula graças à comunicação intercelular do tipo *gap junction* até atingirem as células de revestimento ósseo; posteriormente, essas células liberam fatores parácrinos pró-osteogênicos, e.g., IGF-1 (do inglês *insulin-like growth factor 1*) e PGE<sub>2</sub> (do inglês *prostaglandin E<sub>2</sub>*), os quais estimulam as células mesenquimais osteoprogenitoras a diferenciarem-se em pré-osteoblastos; finalmente, os pré-osteoblastos se diferenciarão em osteoblastos ativos, aderindo à superfície óssea a fim de concluir o processo de formação óssea (Duncan & Turner, 1995; Ehrlich & Lanyon, 2002). Cabe ressaltar que a PGE<sub>2</sub> pode exercer tanto efeitos sobre a formação óssea *in vivo*, quanto induzir a reabsorção óssea *in vitro*, entretanto, os mecanismos pelos quais esse mediador possui ambas as funções no remodelamento ósseo ainda não estão bem elucidadas (Yoshida *et al.*, 2002; Paralkar *et al.*, 2003).

Em contrapartida, evidências demonstram que a ausência da aplicação de cargas mecânicas favorece a deterioração do tecido ósseo. Corroborando essa afirmação, um estudo de Aguirre *et al.*, (2006) demonstrou, em animais, o papel determinante do estímulo mecânico para a manutenção do tecido ósseo. Foi relatado que a ausência da sustentação do peso corporal, a partir do método de suspensão pela cauda, resultou em diminuições significantes da massa óssea e dos parâmetros biomecânicos nas vértebras de camundongos. Os achados do estudo demonstram que apenas três dias após a suspensão pela cauda, foi o suficiente para gerar um aumento significativo na incidência da apoptose dos osteócitos nos ossos cortical e trabecular; além disso, alterações na microarquitetura óssea foram observadas a partir do aumento significativo da porosidade do osso cortical, assim como reduções na espessura de ambos os ossos cortical e trabecular ao cabo de dezoito dias, o que acarretou, conseqüentemente, nas reduções da DMO e resistência à fratura. Os autores concluem que a apoptose dos osteócitos, decorrente da ausência do estímulo mecânico, culminou para o funcionamento exacerbado dos osteoclastos, o que resultou, portanto, em uma diminuição significativa da massa óssea. Nesse contexto, evidências sugerem que o aumento

do número de osteoclastos ativos, em decorrência da apoptose dos osteócitos, inicia-se a partir de um processo necrótico que irá promover, por meio do recrutamento e ativação dos macrófagos, a produção de citocinas pró-inflamatórias tais como a  $TNF-\alpha$  (do inglês *tumor necrosis factor- $\alpha$* ), interleucina-6 (IL-6) e interleucina 1 (IL-1) (Komori, 2013). Sabe-se que estas citocinas são responsáveis pelo aumento da expressão da RANKL, desencadeando, portanto, um meio favorável para a osteoclastogênese e um conseqüente aumento da reabsorção óssea (Pereira & Pereira, 2004; O'Brien, 2010).

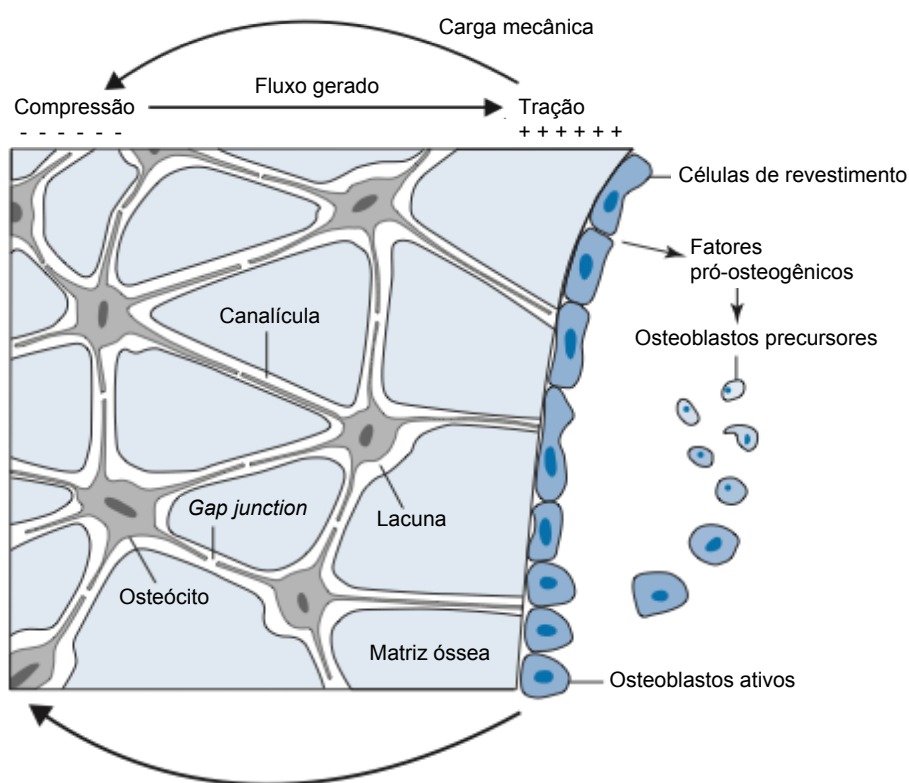


Figura 2. Representação ilustrativa de um fragmento ósseo *in vivo* sob a condição de uma aplicação de carga mecânica. Adaptado de *ACSM's Advanced Exercise Physiology*.

De fato, estudos desenvolvidos em modelo animal mostram a importância do exercício físico como estímulo promotor para o ganho de massa óssea. Em um interessante trabalho de Iwamoto *et al.*, (2005), os autores tiveram como objetivo revisar os efeitos do exercício físico realizado em esteira rolante sobre a massa óssea em modelo experimental. Foram avaliados diversos estudos com amostras de ratas saudáveis, recém-ovariectomizadas e com baixa massa óssea já estabelecida,

submetidas a diferentes tipos de protocolo de treinamento físico. Os resultados mostram que o treinamento físico, independentemente do protocolo utilizado, aumentou significativamente a massa óssea de ratas saudáveis e com baixa massa óssea já estabelecida, assim como foi capaz de atenuar a perda de massa óssea de ratas recém-ovariectomizadas, confirmando o seu potencial efeito terapêutico.

Recentemente, Hamann *et al.*, (2012) demonstraram melhora na microarquitetura óssea em modelo experimental após um período de treinamento físico em esteira rolante. Os autores dividiram a amostra, composta por 60 ratas saudáveis em crescimento, em três grupos, com o objetivo de comparar os efeitos de dois protocolos de corrida (sem inclinação *versus* declive) sobre a estrutura do fêmur dos animais. Ambos os protocolos consistiram em um treinamento com duração de 6 semanas, em sessões de trinta minutos por dia (divididos em duas sessões de quinze minutos, sendo uma pela manhã e outra a tarde), a uma intensidade de 20 m/min, porém, o protocolo em declive foi realizado a 20° de inclinação. Os resultados mostram aumento da densidade mineral óssea trabecular na região da metáfise distal do fêmur em ambos os protocolos, entretanto, apenas o protocolo em declive apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle sedentário. Os autores formularam duas principais hipóteses para elucidar os resultados do estudo: a primeira delas mostra que o treinamento em declive acarretou uma distribuição do estímulo mecânico predominantemente na metáfise do fêmur, ocasionando um potente estímulo osteogênico nessa região específica, por fim, a contração muscular excêntrica naturalmente ocasionada pelo treinamento em declive parece exercer maior tensão no osso por meio dos tendões, gerando então estímulos que favorecem a formação óssea.

### **2.3 Efeitos da suplementação de creatina sobre o tecido ósseo:**

A creatina (Cr, ácido  $\alpha$ -metil guanidinoacético) é uma amina de ocorrência natural, sintetizada predominantemente pelo fígado e em menor grau pelos rins e pâncreas, numa quantidade aproximada de 1 a 2 g por dia. Ademais, este nutriente pode ser obtido exogenamente a partir de alimentos de origem animal, especialmente pelo consumo de carnes vermelhas e peixes (Wyss & Kaddurah-Daouk, 2000).

A síntese de uma molécula de Cr ocorre por meio da ação de três enzimas: L-arginina:glicina amidinotransferase (AGAT), metionina adenosiltransferase (MAT) e guanidinoacetato metiltransferase (GAMT), sobre três aminoácidos: glicina (Gly), arginina (Arg) e metionina (Met) (Wyss & Kaddurah-Daouk, 2000; Gualano *et al.*, 2012). A síntese desta amina se inicia a partir da transferência de um radical amidino proveniente da Arg para a Gly por meio da reação catalítica da AGAT, gerando L-ornitina e guanidinoacetato. Posteriormente, a reação mediada pela MAT entre o aminoácido não-essencial Met e uma molécula de adenosina trifosfato (ATP) produz uma molécula de S-adenosil L-metionina. Este composto, por sua vez, fornece um radical metil para uma molécula de guanidinoacetato para formar S-adenosil L-homocisteína e creatina (Wyss & Kaddurah-Daouk, 2000; Brosnan *et al.*, 2011).

A captação de Cr pelas células ocorre por meio de um processo dependente de sódio e cloreto a qual é controlada pelo transportador específico CreaT. Aproximadamente 95% do conteúdo de Cr é encontrado no músculo esquelético, especialmente em fibras de contração rápida, sendo o restante distribuído no cérebro, testículos e tecido ósseo (Wyss & Kaddurah-Daouk, 2000; Gualano *et al.*, 2010). A Cr existe no interior das células nas formas livre e fosforilada (PCr, fosforilcreatina), sendo que ambas podem ser espontaneamente degradadas por meio de uma reação irreversível em creatinina e, a uma taxa de aproximadamente 2 g por dia, é excretada pelos rins (Wallimann *et al.*, 2011).

O sistema Cr-PCr exerce um papel importante no fornecimento rápido de energia aos tecidos que requerem alta demanda energética para seus processos metabólicos, tais como o músculo esquelético e cérebro (Wallimann *et al.*, 1994). A molécula de PCr transfere um grupo N-fosforil à molécula de adenosina difosfato (ADP) a fim de re-fosforilar a molécula de ATP por meio de uma reação reversível catalisada pela enzima creatina quinase (CK). A existência de diferentes isoformas de CK permite a ligação entre os sítios de geração de ATP (ou seja, as mitocôndrias; Mt-CK) aos de consumo de ATP, tais como o músculo esquelético e o cérebro (i.e. MM-CK e BB-CK, respectivamente) (Gualano *et al.*, 2012). Após Harris *et al.*, 1992 demonstrarem que a suplementação de Cr é capaz de aumentar significativamente as concentrações intramusculares desta amina, grande parte dos estudos realizados têm o objetivo de investigar os efeitos ergogênicos da suplementação desta amina em indivíduos saudáveis fisicamente ativos e/ou no âmbito do esporte (Lugaresi *et al.*, 2013; Cooper *et al.*, 2012). Entretanto, evidências indicam um potencial efeito

terapêutico desta amina em condições que acometem o músculo esquelético (Louis *et al.*, 2003) e sobretudo no tecido ósseo (Funanage *et al.*, 1992; Gerber *et al.*, 2005; Candow *et al.*, 2008).

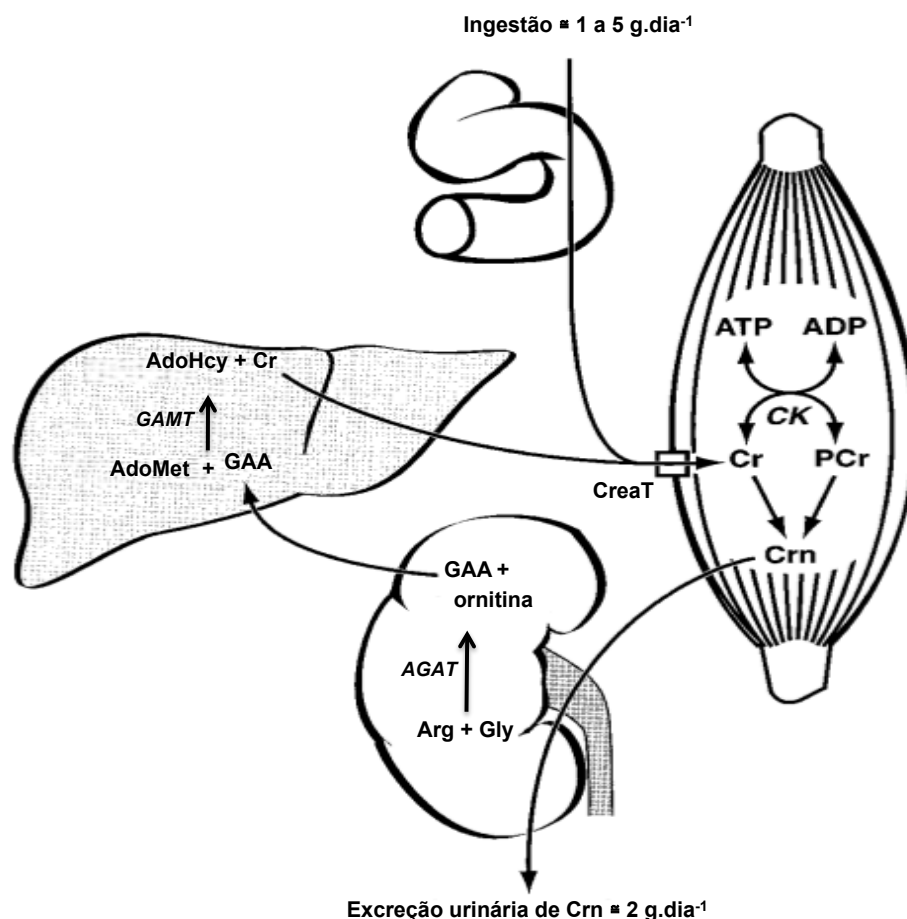


Figura 3. Representação ilustrativa do metabolismo da creatina. Adaptado de Wyss & Kaddurah-Daouk, (2000).

Com o objetivo de investigar a importância da provisão de energia de uma molécula de ATP na utilização e desenvolvimento de células ósseas, Funanage *et al.*, 1992 demonstraram que ao induzir um déficit no conteúdo intracelular de Cr e PCr a partir da administração de ácido  $\beta$ -guanidinopropiônico (GPA), um análogo da Cr que compete pela captação deste substrato pelas células, foi verificado distúrbios no funcionamento do sistema CK e, conseqüentemente, acarretou deficiências na formação da ossificação endocondral e da cartilagem de crescimento, mostrando a importância deste sistema no metabolismo ósseo normal. Posteriormente, foi demonstrado que a administração de Cr apresentou efeitos estimulatórios sobre a



proliferação, diferenciação e mineralização em cultura de células ósseas (e.g. *osteoblast-like cells*), indicando um possível efeito terapêutico da suplementação de Cr nos processos de crescimento, diferenciação e mineralização celular durante a reparação óssea *in vivo* (Gerber *et al.*, 2005).

Em um estudo desenvolvido em modelo experimental, foi demonstrado que a suplementação de Cr gerou melhoras nos parâmetros ósseos dos animais (Antolic *et al.*, 2007). Esses autores utilizaram trinta e dois ratos jovens em crescimento (5 semanas de vida) da linhagem *Sprague-dawley* divididos igualmente, de maneira randomizada, em dois grupos: controle e suplementação de Cr, utilizando-se uma dosagem equivalente de 2% do consumo alimentar diário. Os resultados do estudo, com duração de 8 semanas, demonstraram que a suplementação de Cr resultou em aumentos na densidade mineral óssea da coluna vertebral e na carga máxima até a fratura do fêmur, mensurada por meio do ensaio em três pontos, assim como aumento do diâmetro do sítio de fratura do espécime mensurado.

Em consonância com este achado, um recente estudo demonstrou que a suplementação de Cr (dosagem de 0,3g/kg de peso corporal/dia) influenciou positivamente a composição química do osso de animais em condição de baixa massa óssea (De Souza *et al.*, 2011). Os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico de ovariectomia a fim de induzir a perda óssea relacionada à interrupção na produção de estrógeno e, após doze semanas da instalação desse quadro, iniciou-se a intervenção. Após 8 semanas de suplementação, foi constatado que o conteúdo de fosfato no osso trabecular (i.e. terceira vértebra lombar) aumentou significativamente em relação ao grupo não-suplementado, sugerindo, portanto, uma influência positiva da suplementação de Cr sobre a qualidade do tecido ósseo.

Efeitos benéficos da suplementação de Cr também foram observados em estudos clínicos. Chilibeck *et al.*, 2005 investigaram a influência da suplementação de Cr combinada ao treinamento de força em idosos, a fim de avaliarem a densidade mineral e conteúdo mineral ósseo desta população. Foi conduzido um estudo duplo-cego, aleatorizado e controlado por placebo a fim de testar a hipótese dos autores de que a associação entre estas duas intervenções não-farmacológicas aumentaria em maior magnitude as propriedades estruturais do tecido ósseo. Os resultados demonstraram que o treinamento de força associado à suplementação de Cr (dosagem de 0,3 g/kg de peso corporal/dia nos 5 primeiros dias, seguido por 0,07

g/kg de peso corporal/dia até o final do protocolo experimental) foi capaz de aumentar o conteúdo mineral dos ossos do antebraço dos indivíduos. Os autores observaram correlação estatisticamente significativa entre o aumento da massa muscular com o aumento do conteúdo mineral ósseo, o que sugere um maior estímulo de formação óssea em decorrência à maior contração muscular. Este achado possui alta relevância clínica, considerando-se a maior incidência de fraturas conseqüentes à baixa massa óssea na população utilizada no estudo.

A suplementação de Cr também foi testada em indivíduos com quadros de distrofia muscular de Duchenne (DMD) e Becker (DMB), uma vez que há redução da densidade mineral óssea nesta população (Larson *et al.*, 2000). Louis *et al.*, 2003, conduziram um estudo cruzado, aleatorizado, duplo-cego e controlado por placebo em indivíduos jovens com DMD e DMB e observaram aumento da densidade mineral óssea (+3%) e diminuição da reabsorção óssea (30%) após a suplementação de Cr, assim como diminuição na excreção urinária do marcador de reabsorção óssea N-telopeptídeo do colágeno tipo I (NTx). Diante destes achados, a busca do entendimento dos mecanismos pelos quais a suplementação de Cr exerce efeitos benéficos sobre o tecido ósseo é de suma importância.

Em contrapartida, um estudo de Gualano *et al.*, (2014) não verificou efeitos da suplementação de Cr sobre o tecido ósseo em mulheres. Os autores conduziram um estudo clínico, duplo-cego, randomizado, com grupos paralelos e controlado por placebo, durante o período de 24 semanas de intervenção, no qual consistiu na combinação da suplementação de Cr e treinamento de força em idosas consideradas vulneráveis, sedentárias, com idade superior a 60 anos e diagnosticadas com osteopenia ou osteoporose decorrentes da pós-menopausa. Não foram observados efeitos benéficos, isolados e aditivos, em relação ao CMO e DMO para as seguintes regiões corporais mensuradas: corpo total, coluna vertebral (i.e. vértebras L1 a L4), fêmur total e cabeça do fêmur; assim como para os marcadores de *turnover* ósseo.

### **3 Objetivos**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar os efeitos preventivos do treinamento físico em declive realizado em esteira rolante, associado ou não à suplementação de creatina, sobre o tecido ósseo de ratas ovariectomizadas.

#### **3.2 Objetivos específicos**

Em ratas ovariectomizadas, investigar o papel preventivo do exercício físico associado ou não à suplementação de Cr sobre os seguintes parâmetros ósseos:

- Conteúdo mineral ósseo;
- Densidade mineral óssea;
- Propriedades biomecânicas do fêmur.

### **4 Materiais e Métodos**

#### **4.1 Protocolo experimental**

Foi conduzido um estudo experimental, aleatorizado e controlado por placebo. Todos os procedimentos adotados no estudo estão de acordo com os critérios exigidos pelo comitê de ética da instituição. O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da EEFEUSP sob o n° 2012/04.

Uma semana antes do início do estudo, os animais foram randomizados e equalizados pelo peso corporal em 5 grupos experimentais:

- i*) ratas falso-operadas (SHAM; n=12);
- ii*) ratas ovariectomizadas (OVX), sedentárias e suplementadas com placebo (PL; n=12);
- iii*) ratas OVX, sedentárias e suplementadas com Cr (CR; n=12);
- iv*) ratas OVX, treinadas e suplementadas com placebo (PL+TR; n=12) e

v) ratas OVX, treinadas e suplementadas com Cr (CR+TR; n=13).

Uma semana após a randomização, os animais foram submetidos à avaliação de composição corporal, à densitometria óssea de corpo inteiro e regional (i.e. fêmur e coluna vertebral) por meio de *Dual Energy X-ray Absorptiometry (DXA) in vivo* e, então, foram submetidos ao procedimento cirúrgico de ovariectomia.

Após o período de recuperação do procedimento cirúrgico, o qual durou 7 dias, os animais foram submetidos à adaptação ao treinamento físico em declive em esteira rolante e ao início da suplementação de creatina por meio de gavagem esofágica. Após 12 semanas de intervenção, período a partir do qual o animal apresenta reduções significantes da microarquitetura e taxa de aposição mineral do tecido ósseo, especificamente das regiões compostas predominantemente por osso trabecular, assim como diminuição significativa da resistência à fratura (Li *et al.*, 1997; De Souza *et al.*, 2011), os animais foram eutanasiados por decapitação após um período de 12 horas em jejum.

Foi retirado o trem posterior dos animais e dissecado o fêmur direito para a análise biomecânica. Imediatamente à dissecação dos espécimes, os mesmos foram armazenados de acordo com o procedimento para o qual foi designado, descrito com detalhe posteriormente.

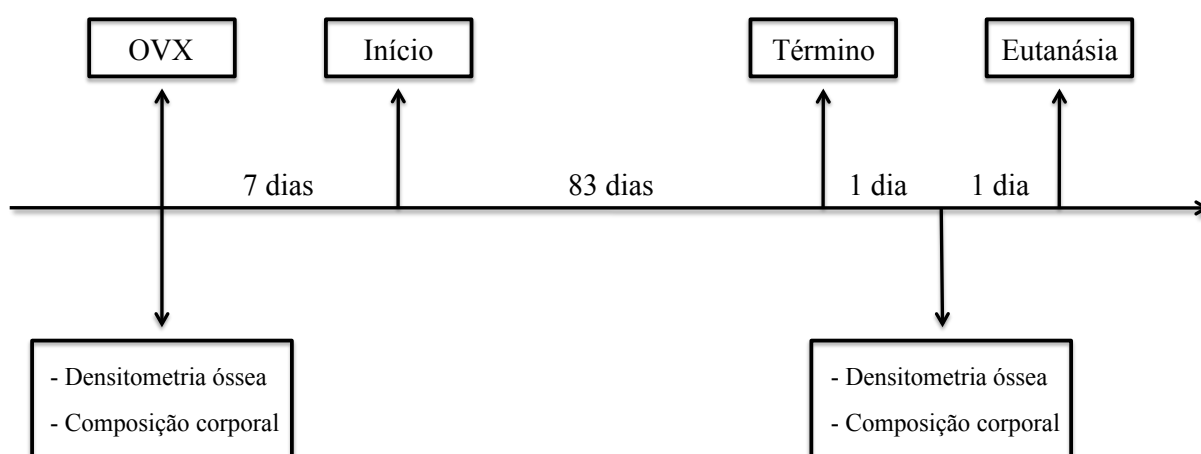


Figura 4 – Desenho experimental do estudo.

## 4.2 Animais

Os experimentos foram conduzidos de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Ratos da linhagem Wistar fêmeas com aproximadamente 12 semanas de vida e peso médio inicial de 250 g, foram obtidos no biotério central da FMUSP e mantidos no biotério do Laboratório de Nutrição e Metabolismo da Atividade Motora da EEFUSP até atingirem a idade ideal para o início do protocolo experimental. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas contendo 4 animais cada, com temperatura a  $22\pm 1^\circ\text{C}$  e regime de luz controlado em ciclos de claro/escuro invertido a cada 12 horas (20h00/8h00). O controle alimentar dos animais foi realizado por meio de ração (Nuvilab CR-1, Nuvital<sup>®</sup>) e água potável de modo *ad libitum* até o início do protocolo experimental.

## 4.3 Densitometria óssea e composição corporal

As análises de densitometria óssea e composição corporal foram realizadas por meio de *Dual Energy X-ray Absorptiometry* (DXA), em dois momentos do estudo: uma semana antes do início do protocolo experimental e um dia anterior ao término do estudo. O aparelho utilizado foi o Hologic-Discovery 4500 (Hologic, Inc., Bedford, MA, USA) e o *software* empregado foi o *Small Animal* no modo *High Resolution*, fornecido pelo próprio fabricante do aparelho. Antes do início das análises, o peso de todos os animais foi mensurado em uma balança digital (Gehaka, modelo BG 8000, Ltda, Brasil) a fim de calcular a dosagem de anestésicos necessária. Os animais foram anestesiados com uma combinação de cetamina (80 mg/kg; 10% de cloridrato de cetamina; Syntec do Brasil Ltda, Brasil) e xilazina (10 mg/kg; 2% de cloridrato de xilazina; Syntec do Brasil Ltda, Brasil) na região intraperitoneal, posicionados em decúbito ventral no leito do aparelho e então, três *scans* foram efetuados: um de corpo inteiro, um do fêmur direito e um da coluna vertebral (L1 a L4). O *scan* de corpo inteiro foi realizado para mensurar a densidade mineral óssea (DMO; expresso em  $\text{g}/\text{cm}^2$ ) e conteúdo mineral ósseo (CMO; expresso em g) total, bem como a quantidade total de massa livre de gordura (LEAN; expresso em g) e o percentual de gordura corporal (FAT; expresso em %). Os *scans* do fêmur e coluna vertebral fornecem parâmetros regionais de DMO e CMO.

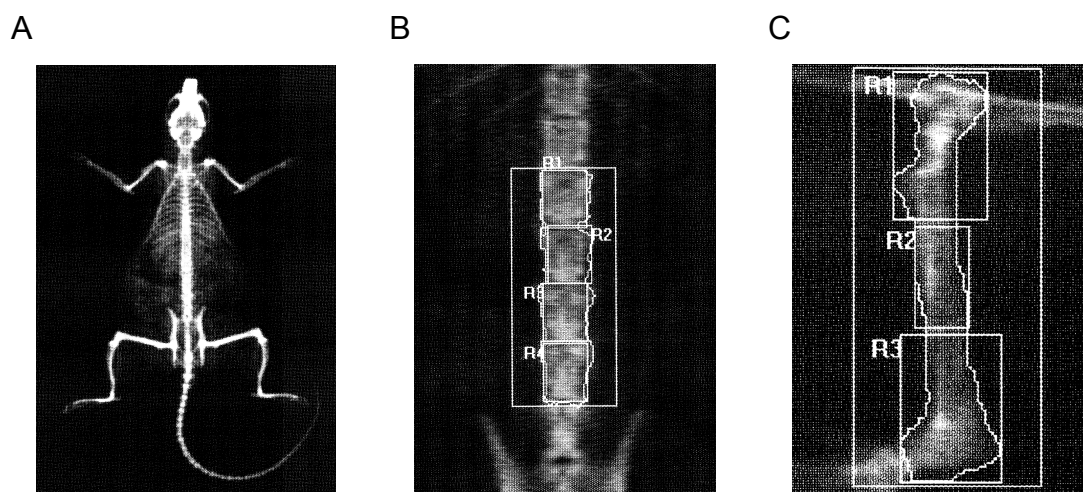


Figura 5 – Ilustração das análises de densitometria óssea e composição corporal por meio de DXA. (A) Scan de corpo inteiro utilizado para mensurar a DMO e CMO total e a composição corporal. (B) Vértex L1 a L4 indicadas respectivamente pelos retângulos R1 a R4, e o retângulo exterior indicando a área total. (C) Fêmur direito dividido pelas regiões da metáfise proximal, diáfise e metáfise distal representadas respectivamente pelos retângulos R1 a R3 e o retângulo exterior indicando a área total.

#### 4.4 Ovariectomia

Logo após a avaliação de densitometria óssea e composição corporal, os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico de ovariectomia, sob o efeito da mesma dosagem de anestésicos, conforme a técnica descrita por Zarrow *et al.*, (1964). A área da cirurgia foi higienizada com álcool 70% e uma pequena incisão transversal foi realizada na parte média do abdome. Após acessar a cavidade peritoneal, o tecido adiposo foi afastado a fim de expor as trompas uterinas esquerda e direita e efetuar a extração bilateral dos ovários. O procedimento cirúrgico foi realizado da mesma maneira para os grupos ovariectomia (OVX) e falso-operado (SHAM), entretanto, para os animais do grupo SHAM não foi realizada a remoção dos ovários. A idade inicial mínima dos animais foi de 14 semanas, descrito por Kalu *et al.*, (1991) como um animal responsivo às alterações fisiológicas ocasionadas pela deficiência hormonal acarretada pela ovariectomia. Modelos experimentais com essa idade foram utilizados em estudos prévios que investigaram os efeitos da ovariectomia sobre o tecido ósseo (De Souza *et al.*, 2012; Bu *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2011; Seidlová-Wuttke *et al.*, 2008).

#### 4.5 Protocolo de treinamento físico

Após o período necessário para a recuperação do procedimento cirúrgico, os grupos PL+TR e CR+TR foram submetidos ao treinamento físico em esteira rolante à 20° de declinação em sessões de 30 min/dia, 5 dias/semana, por 12 semanas. Durante os primeiros cinco dias de treinamento, os animais foram submetidos à familiarização ao protocolo de treinamento por meio de acréscimos diários de velocidade (i.e., 10, 12, 15, 18 e 20 m/min) e declinação (i.e., 10, 10, 15, 15 e 20°). O treinamento foi dividido em duas sessões diárias de 15 minutos cada, no período da manhã e da tarde. A iluminação do local de treinamento foi reduzida a fim de respeitar o ciclo escuro dos animais e a parte da frente da esteira rolante foi coberta com um material opaco para impedir a passagem de luz. A última sessão de treinamento foi realizada 48 horas antes da eutanásia dos animais a fim de eliminar quaisquer efeitos agudos do exercício físico. Esse protocolo de treinamento físico foi utilizado em estudos prévios (Hamann *et al.*, 2012; Hamann *et al.*, 2014) e mostrou significativo potencial osteogênico ao aumentar a DMO trabecular da metáfise distal do fêmur de ratas saudáveis em crescimento (Hamann *et al.*, 2012).

#### 4.6 Suplementação de creatina

A suplementação de creatina (creatina monohidratada; Ethika, Ribeirão Preto, SP) nos grupos CR e CR+TR foi oferecida diariamente por meio de gavagem esofágica em uma dose diária de 300 mg/kg de peso corporal após a última sessão de treinamento aeróbico, e pela manhã aos sábados e domingos. A concentração da solução de creatina foi de 2% (2 g de creatina para 100 mL de água destilada) e, para garantir que a solubilidade fosse completa, utilizou-se um agitador magnético com controle de temperatura (Corning® PC-420D), a uma temperatura de 35° C. Os grupos PL e PL+TR foram submetidos ao mesmo protocolo de suplementação, entretanto, o veículo administrado foi a água destilada. Essa dose foi utilizada previamente em estudos com animais (De Souza *et al.*, 2012; Young *et al.*, 2007; Young *et al.*, 2002) e demonstrou ser capaz de influenciar positivamente a composição do osso trabecular em modelo experimental de ovariectomia com significativa baixa massa óssea já estabelecida (De Souza *et al.*, 2012).

#### 4.7 Consumo alimentar

Juntamente com o início do treinamento aeróbio e a suplementação de creatina, o consumo alimentar de todos os grupos OVX foi controlado de modo *pair-feeding* com o grupo SHAM. Uma quantidade inicial padronizada de ração (100 g) foi disponibilizada para o grupo SHAM todos os dias pela manhã e, 24 horas após, foi mensurada a quantidade final de ração que corresponde ao consumo diário total (CDt) daquele grupo, ou seja,  $CDt_{SHAM} (g) = \text{Quantidade inicial } (Q_i) (g) - \text{Quantidade final } (Q_f) (g)$ . Para garantir que o consumo alimentar foi proporcionalmente igual para todos os grupos, a somatória do peso do grupo SHAM ( $\Sigma \text{ peso}_{SHAM}$ ), expresso em kg, foi mensurado e efetuado o consumo diário relativo (CDr), o qual será utilizado para os demais grupos:  $CDr (g/kg) = CDt / \Sigma \text{ peso}_{SHAM}$ . Desta forma, o consumo diário total para os grupos OVX ( $CDt_{OVX}$ ) será calculado a partir do CDr, da seguinte forma:  $CDt_{OVX} (g) = CDr (g/kg) \times \Sigma \text{ peso}_{OVX} (kg)$ . O consumo alimentar inicial foi semelhante, uma vez que os grupos foram pareados pelo peso corporal no início do estudo. Dentre as alterações fisiológicas encontradas em modelo experimental de pós-menopausa, a deficiência de estrógeno foi relacionada ao aumento do consumo alimentar (hiperfagia) (Fisher *et al.*, 2000; Jiang *et al.*, 2008; Eckel, 2011; Ferreira *et al.*, 2012) tornando-se relevante, portanto, o controle dessa variável a fim de eliminar possíveis vieses. O protocolo *pair-feeding* utilizado foi adaptado de um estudo prévio que utilizou suplementação de creatina em animais tratados com dexametasona (Nicastro *et al.*, 2012).

#### 4.8 Análise biomecânica

Os parâmetros biomecânicos foram obtidos a partir do ensaio mecânico de flexão em três pontos, realizado no fêmur direito, em uma máquina de ensaio universal Instron modelo 5565 (Instron Corp., Canton, MA, USA). Foi utilizada uma célula de carga com capacidade máxima de 100 kgf.

Após a extração dos fêmures, os espécimes foram enrolados em uma gaze embebida com solução de cloreto de sódio a 0.9%, guardados em tubos cônicos tipo *Falcon* e mantidos congelados a uma temperatura de  $-20^{\circ} C$  até o dia do teste. Doze horas antecedentes ao teste, os ossos foram descongelados à temperatura de



4° C e mantidos em solução salina até o momento do teste. As extremidades do fêmur foram apoiadas em dois roletes, com diâmetro de 2,0 mm, suportados por apoios distanciados de 15,9 mm entre eles. A força foi aplicada perpendicularmente ao eixo longitudinal do osso, no sentido ântero-posterior, no ponto médio entre os dois apoios, por uma haste cilíndrica com um rolete de 2,0 mm fixado em sua extremidade, a uma velocidade constante de 10 mm/min até o momento de ruptura do corpo de prova.

Anteriormente à execução do teste nos espécimes do projeto, foi realizado teste-piloto em amostras provenientes de animais de descarte, com o intuito de padronizar o protocolo em questão. Foi constatado que, em grande parte das amostras testadas, o ponto de aplicação da carga não ficava perfeitamente alinhado com os pontos de apoio devido à heterogeneidade anatômica dos fêmures, o que gerava um momento angular no corpo de prova, que resultava em um giro sobre o eixo longitudinal do espécime testado. Esse fato provocava um viés na curva força-deslocamento, uma vez que dessa forma a aplicação da carga não ocorreria no mesmo ponto do início ao final do teste. Para corrigir esse problema, utilizou-se o expediente de colocar uma gota de resina composta fotopolimerizável do tipo *flow* (3M® Dental Products, St Paul, MN, USA) no dispositivo conectado à célula de carga. Após a aplicação da resina, aproximou-se o dispositivo até contactar o corpo de prova com uma força de 0,1 N e, nesse momento, realizou-se a fotopolimerização por 60 segundos, imediatamente antes de iniciar o teste. A força aplicada e o deslocamento da cabeça de avanço da máquina, no qual a célula de carga está acoplado, foram monitorados e registrados através do *software* próprio do equipamento. O protocolo de análise biomecânica previamente descrito foi semelhante ao utilizado no estudo de Antolic *et al.*, (2007) que avaliou o efeito da suplementação de creatina na massa óssea de ratos saudáveis em crescimento; entretanto, foram realizadas as adaptações supracitadas com o intuito de otimizar o teste.

A partir da curva força-deslocamento, foram obtidos:

1. Força máxima (N): corresponde a maior força aplicada durante o ensaio;
2. Força de ruptura (N): corresponde a força registrada no momento de ruptura do osso na ocasião do ensaio;

3. Rigidez (N/mm): determinada a partir do coeficiente angular (b na fórmula  $y=a+bx$ ) da reta ajustada aos pontos de curva força-deslocamento na fase elástica;
4. Tenacidade ( $\text{mJ}^*$ ): corresponde à energia mecânica necessária para a ruptura do espécime, calculada a partir da área sob a curva força-deslocamento até o ponto de ruptura óssea, obtida através de integração numérica;
5. Deslocamento ou flecha (mm): distância percorrida pelo dispositivo de aplicação de carga.

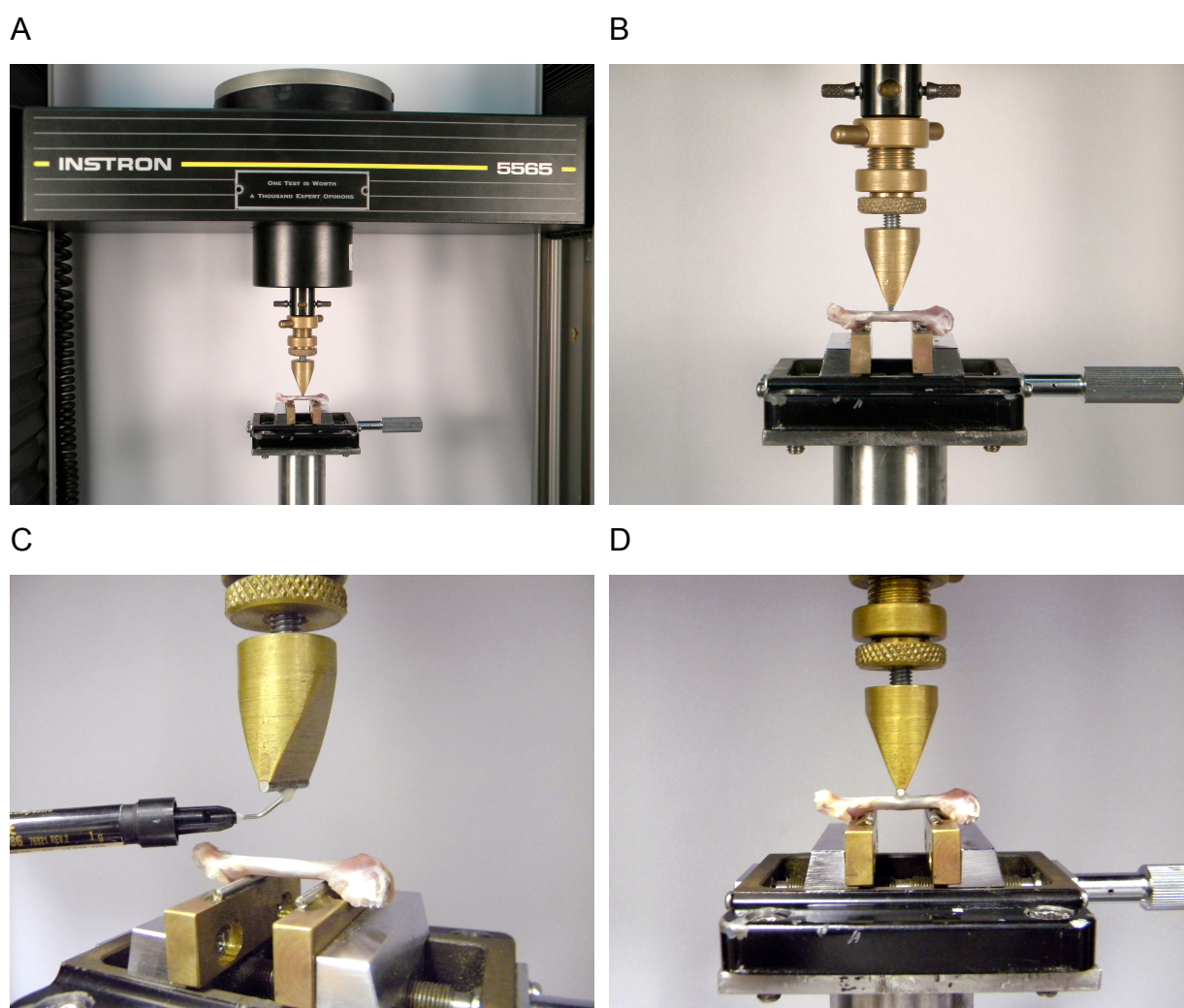


Figura 6 – Análise biomecânica do fêmur. (A) Máquina de ensaio universal utilizada para a obtenção dos parâmetros biomecânicos do osso. (B) Representação da aplicação perpendicular da força no ponto médio do fêmur, no sentido ântero-posterior. (C) Aplicação da resina composta no dispositivo. (D) Acomodação da resina sobre o espécime, anteriormente à realização da fotopolimerização.

\*  $\tau = \text{Força} \times \text{deslocamento} = \text{kg} \times \text{m}^2 / \text{s}^2 = 1 \text{ J} = 1 \text{ N.m} \therefore 1 \text{ N.mm} = 1 \text{ mJ}$

#### 4.9 Análises estatísticas

Anteriormente à análise descritiva, realizou-se o teste de Shapiro-Wilk para testar a normalidade dos dados e verificou-se a presença de *outliers* na amostra por meio de *boxplots*. Para todas as variáveis dependentes avaliadas ao longo do tempo (i.e. peso corporal do animal, consumo alimentar, dados de densitometria óssea e composição corporal), foi empregado um *Mixed Model* (SAS<sup>®</sup> 9.3, Cary, NC, USA) para análises de medidas repetidas (tempo e grupo como fatores). Para as demais variáveis dependentes mensuradas apenas no final do protocolo experimental, utilizou-se um *Mixed Model* para um fator (grupo como único fator). Os grupos e os momentos foram considerados fatores fixos e os animais definidos como fatores aleatórios. Foi realizado *post-hoc* de Tukey para comparações múltiplas sempre que um valor “F” significativo foi encontrado. Os dados são expressos em média  $\pm$  desvio padrão. O nível de significância adotado para se rejeitar a hipótese de nulidade foi de  $p < 0,05$ .

## 5 Resultados

### 5.1 Animais

Os animais foram mantidos sob ambiente com temperatura e regime de luz controlados até completarem 14 semanas de vida. A partir dessa idade, os animais foram randomizados e alocados nos grupos experimentais de forma pareada pelo peso corporal. Nenhuma diferença significativa foi encontrada na alocação dos grupos experimentais. Dois animais foram excluídos do estudo por não se adaptarem ao protocolo de treinamento físico. Nenhum animal rejeitou a suplementação ao longo de todo o protocolo experimental. Dois animais morreram ao longo do estudo devido à administração de anestésicos necessária para o procedimento cirúrgico de ovariectomia.

A figura 7 representa a progressão de peso corporal mensurado semanalmente ao longo do protocolo experimental. Não houve diferença significativa entre os grupos, em nenhum momento do estudo, indicando que o pareamento pelo peso corporal no início do estudo, bem como o controle do consumo alimentar por meio do *pair-feeding* foi efetivo.

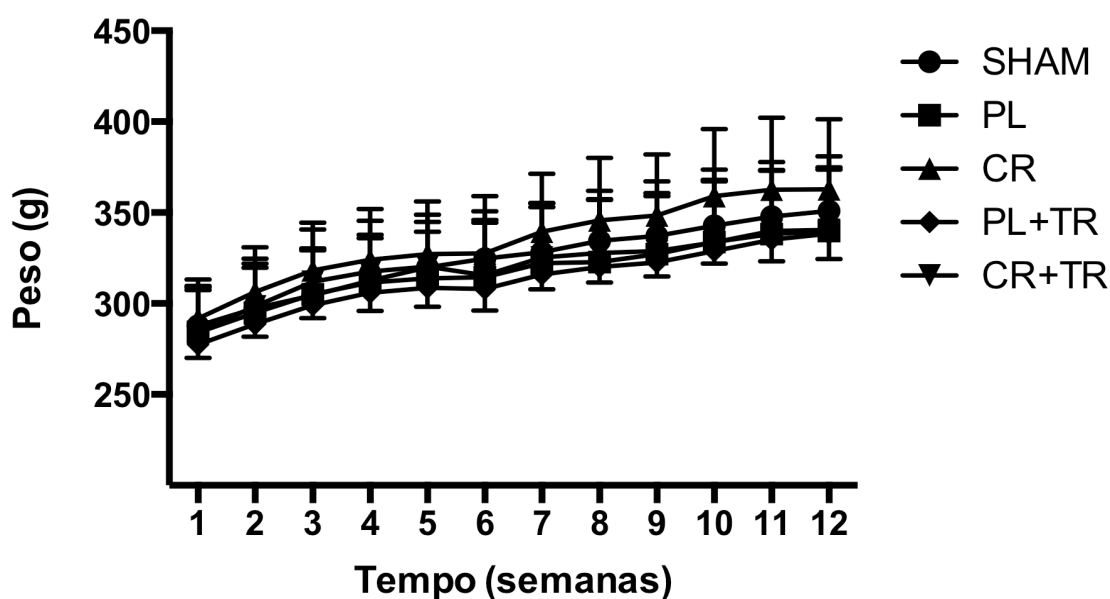


Figura 7 – Peso corporal semanal. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Não foram observadas diferenças significantes entre os grupos.

## 5.2 Densitometria óssea e composição corporal

A figura 8 ilustra os efeitos do exercício físico, associado ou não à suplementação de creatina, sobre o CMO de corpo total. Nenhuma diferença foi observada entre os grupos no período basal (Pré). Nota-se que todos os grupos apresentaram aumento significativo no período pós-intervenção quando comparados ao período basal (efeito principal de tempo). No período pós-intervenção, foi observado aumento significativo do grupo PL+TR em relação ao grupo PL ( $p=0,027$ ). Ademais, o grupo PL apresentou ganhos significativamente menores de CMO em relação ao SHAM ( $p=0,019$ ), o que sugere a eficácia do procedimento cirúrgico de ovariectomia.

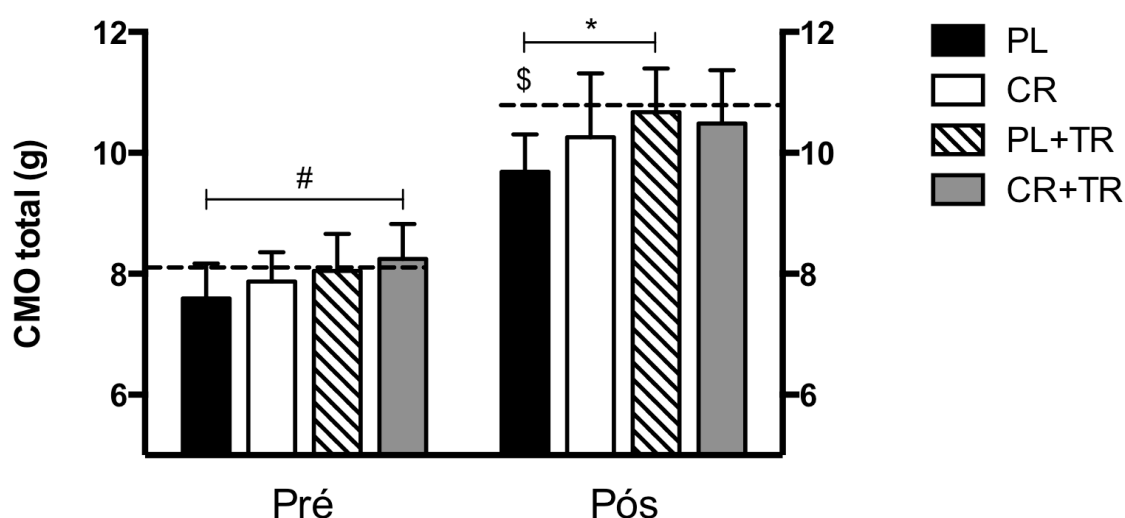


Figura 8 – Conteúdo mineral ósseo de corpo total. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. As linhas tracejadas indicam a média do grupo SHAM. # indica  $p<0,05$  para as comparações Pré vs. Pós intragrupo. \* indica  $p<0,05$  para as comparações intergrupo no período Pós. \$ indica  $p<0,05$  para as comparações em relação ao grupo SHAM.

A figura 9 apresenta os efeitos da intervenção sobre a DMO de corpo total. Nenhuma diferença foi observada entre os grupos no período basal (Pré). Todos os grupos apresentaram aumento significativo no período pós-intervenção quando comparados ao período basal (efeito principal de tempo). Observa-se que ambos os grupos sedentários (PL e CR) tiveram valores de DMO significativamente menores em relação ao SHAM ( $p=0,037$  e  $p=0,050$ , respectivamente). Além disso, o exercício

físico isolado mostrou-se relevante em aumentar a DMO, evidenciado na comparação entre os grupos PL e PL+TR ( $p=0,044$ ).

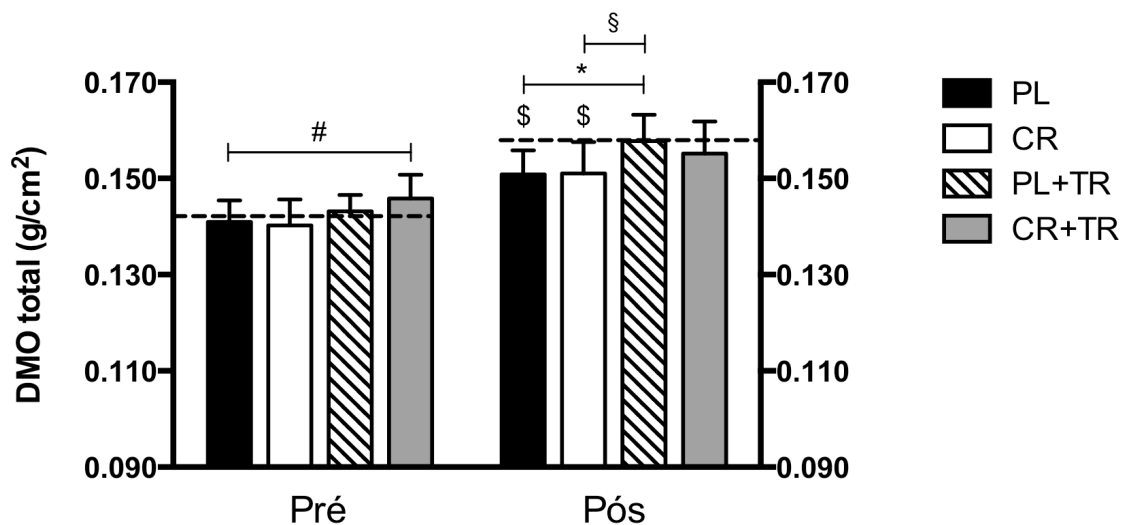


Figura 9 – Densidade mineral óssea de corpo total. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. As linhas tracejadas indicam a média do grupo SHAM. # indica  $p<0,05$  para as comparações Pré vs. Pós intragrupo. \* indica  $p<0,05$  para as comparações intergrupo no período Pós. § indica  $p<0,05$  para as comparações em relação ao grupo SHAM. §  $p=0,061$ .

As adaptações regionais do tecido ósseo mediante à intervenção são sumarizadas a seguir.

A figura 10 demonstra o comportamento do CMO do fêmur direito. Nenhuma diferença foi observada entre os grupos no período basal (Pré). Neste caso, todos os grupos tiveram aumento significativo de CMO ao longo do tempo, exceto para o grupo PL ( $p=0,072$ ), o que sugere, novamente, a eficácia da ovariectomia. Além disso, houve aumento significativo do SHAM em relação ao grupo PL ( $p=0,005$ ) após a intervenção.

A figura 11 ilustra a DMO do fêmur direito. Nenhuma diferença foi observada entre os grupos no período basal (Pré). Apenas o grupo PL não apresentou aumento significativo ao longo do tempo ( $p=0,093$ ). Conclui-se, portanto, a eficácia da ovariectomia em face do aumento significativo do grupo SHAM em comparação ao grupo PL ( $p<0,001$ ) e ao grupo CR ( $p<0,001$ ) no período pós-intervenção. Sugere-se, também, a prevenção da perda de massa óssea ocasionada pelo exercício físico, uma vez que o grupo SHAM não apresentou diferença significativa em comparação ao grupo PL+TR ( $p=0,183$ ) e ao grupo CR+TR ( $p=0,272$ ). Ademais, não

foi observada diferença significativa entre os grupos treinados ( $p=0,999$ ), embora apenas o grupo PL+TR tenha apresentado valores significativamente maiores de DMO em comparação ao grupo PL ( $p=0,018$ ).

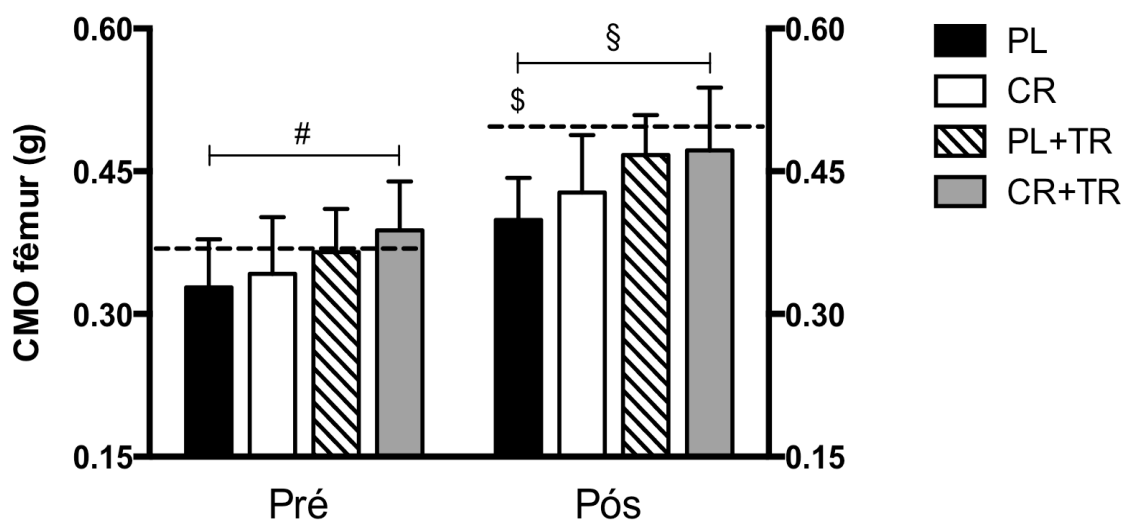


Figura 10 – Conteúdo mineral ósseo do fêmur direito. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. As linhas tracejadas indicam a média do grupo SHAM. # indica  $p<0,05$  para as comparações Pré vs. Pós intragrupo. \* indica  $p<0,05$  para as comparações intergrupo no período Pós. \$ indica  $p<0,05$  para as comparações em relação ao grupo SHAM. §  $p=0,064$ .

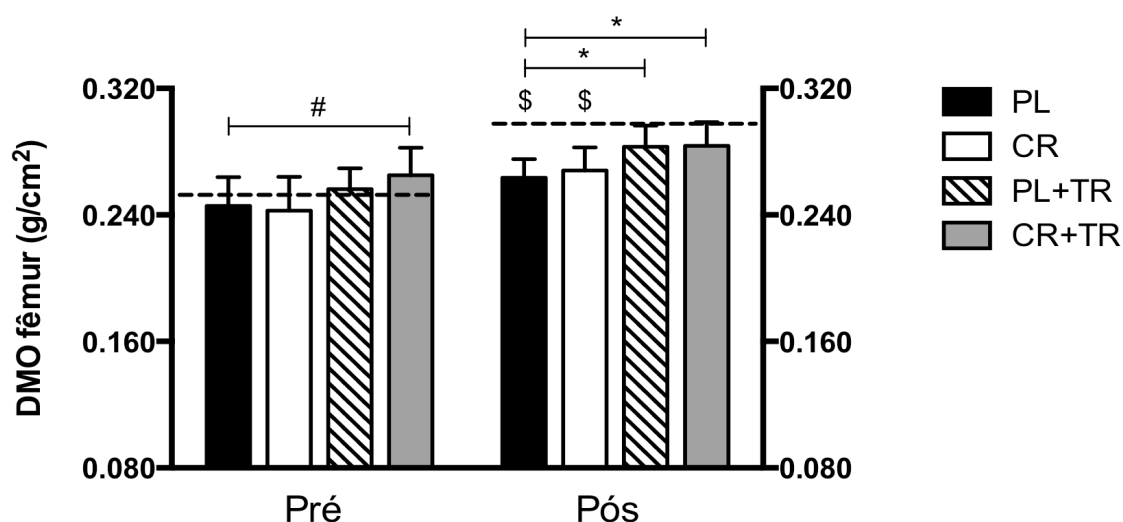


Figura 11 – Densidade mineral óssea do fêmur direito. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. As linhas tracejadas indicam a média do grupo SHAM. # indica  $p<0,05$  para as comparações Pré vs. Pós intragrupo. \* indica  $p<0,05$  para as comparações intergrupo no período Pós. \$ indica  $p<0,05$  para as comparações em relação ao grupo SHAM.

As figuras a seguir ilustram os dados da coluna vertebral. A figura 12 demonstra o CMO das vértebras L1 a L4. Nenhuma diferença foi observada entre os grupos no período basal (Pré). Nota-se que apenas os grupos sedentários não apresentaram aumento significativo ao longo do protocolo experimental. O efeito positivo do exercício físico pode ser observado nas comparações entre os grupos PL e PL+TR ( $p=0,004$ ) e entre os grupos CR e CR+TR ( $p=0,011$ ). Nenhuma diferença significativa foi observada na comparação entre os grupos SHAM e PL+TR ( $p=0,092$ ), e entre o grupo CR+TR ( $p=0,372$ ), o que indica, portanto, o papel preventivo do exercício físico na perda de massa óssea da coluna. Não houve efeito da suplementação de creatina nos grupos sedentários (PL vs. CR;  $p=0,961$ ) ou nos grupos treinados (PL+TR vs. CR+TR;  $p=0,995$ ).

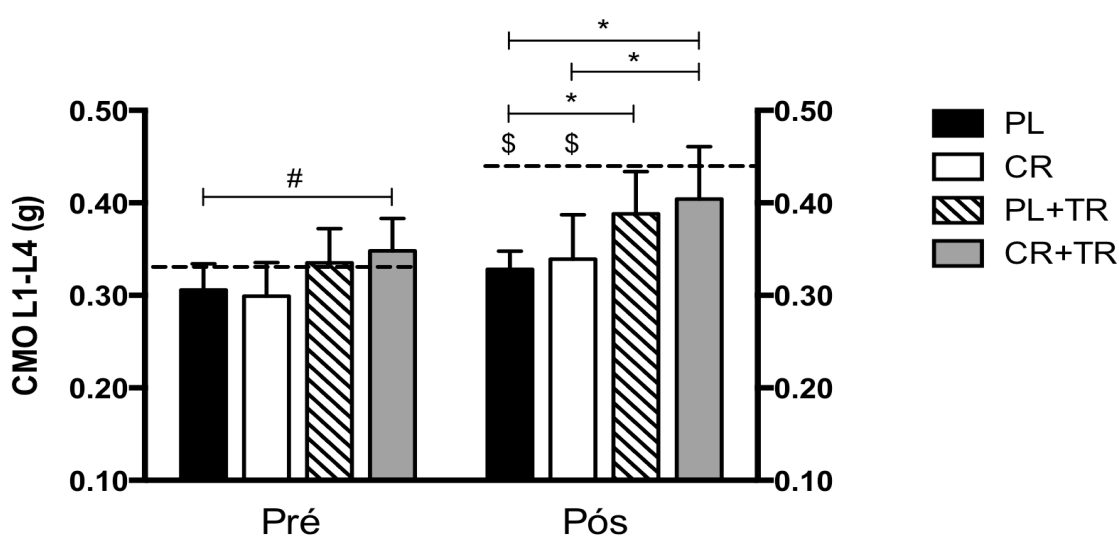


Figura 12 – Conteúdo mineral ósseo da coluna vertebral (L1-L4). Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. As linhas tracejadas indicam a média do grupo SHAM. # indica  $p < 0,05$  para as comparações Pré vs. Pós intragrupos. \* indica  $p < 0,05$  para as comparações intergrupos no período Pós. \$ indica  $p < 0,05$  para as comparações em relação ao grupo SHAM.

A figura 13 expressa os valores de DMO das vértebras L1-L4. Nenhuma diferença foi observada entre os grupos no período basal (Pré). Nota-se que apenas o grupo SHAM apresentou aumento significativo ao longo do protocolo experimental ( $p < 0,001$ ). Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos sedentários, todavia, observa-se um aumento significativo do grupo SHAM em relação ao grupo PL ( $p < 0,001$ ) e ao grupo CR ( $p < 0,001$ ). Nenhuma diferença significativa foi observada entre o grupo SHAM e os grupos treinados. Contudo, o



grupo PL+TR apresentou aumento significativo em comparação ao grupo PL ( $p=0,020$ ), enquanto que o grupo CR+TR apresentou tendência ao aumento dessa variável em relação ao grupo CR ( $p=0,064$ ). Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos treinados.

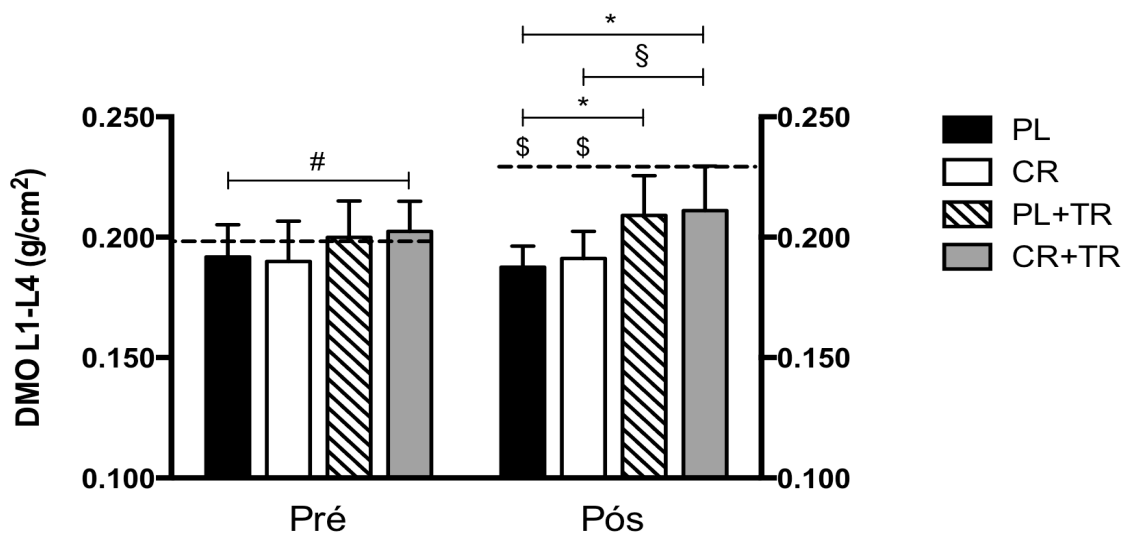


Figura 13 – Densidade mineral óssea da coluna vertebral (L1-L4). Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. As linhas tracejadas indicam a média do grupo SHAM. # indica  $p<0,05$  para as comparações Pré vs. Pós intragrupo. \* indica  $p<0,05$  para as comparações intergrupo no período Pós. \$ indica  $p<0,05$  para as comparações em relação ao grupo SHAM. §  $p=0,064$ .

As figuras a seguir representam os dados de composição corporal mediante à intervenção.

A figura 14 ilustra o ganho de gordura corporal total dos animais ao longo do protocolo experimental. Nenhuma diferença foi observada entre os grupos no período basal (Pré). Nota-se que todos os grupos apresentaram acúmulo de tecido adiposo ao término da intervenção, o que reflete o crescimento dos animais. Entretanto, exceto para o grupo PL+TR, todos os grupos tiveram aumento significativo de gordura corpora, o que sugere a eficácia do exercício físico em impedir este acontecimento. A partir deste dado, pode-se concluir também que o *pair-feeding* foi efetivo em impedir o aumento da gordura corporal total ao longo da intervenção, pois não houve diferença significativa entre os grupos.

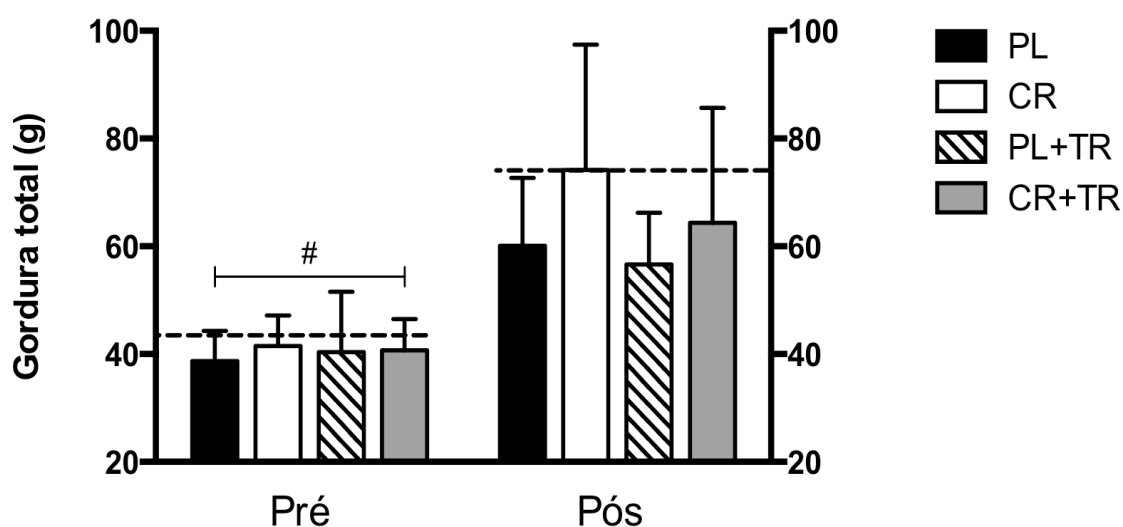


Figura 14 – Gordura corporal total. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. As linhas tracejadas indicam a média do grupo SHAM. # indica  $p < 0,05$  para as comparações Pré vs. Pós intragrupo.

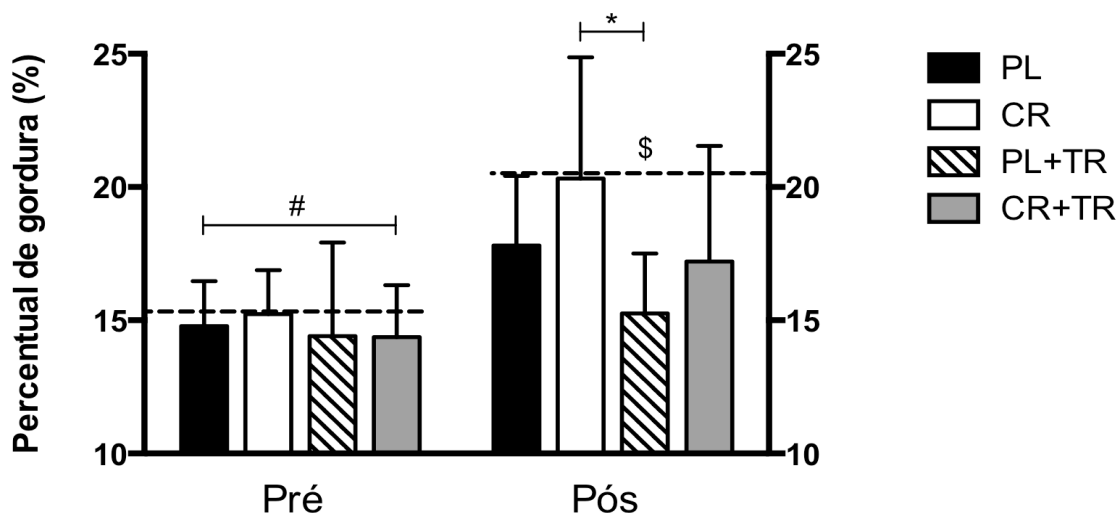


Figura 15 – Percentual de gordura. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. As linhas tracejadas indicam a média do grupo SHAM. # indica  $p < 0,05$  para as comparações Pré vs. Pós intragrupo. \* indica  $p < 0,05$  para as comparações intergrupo no período Pós. \$ indica  $p < 0,05$  para as comparações em relação ao grupo SHAM.

A figura 15 representa o percentual de gordura. Nenhuma diferença foi observada entre os grupos no período basal (Pré). Apenas os grupos SHAM e CR apresentaram aumento significativo ao longo do protocolo experimental. No período pós-intervenção, observa-se que o grupo PL+TR apresentou menor percentual de gordura em relação ao grupo SHAM ( $p = 0,002$ ) e em relação ao grupo CR ( $p = 0,006$ ). Nenhuma outra diferença significativa foi observada.

A figura 16 demonstra os dados da quantidade total de massa magra. Nenhuma diferença foi observada entre os grupos no período basal (Pré). Todos os grupos apresentaram aumento significativo ao longo do protocolo experimental. Nota-se que no período pós-intervenção, o grupo PL+TR apresentou acúmulo significativamente maior de massa magra em relação aos grupos SHAM ( $p=0,003$ ), PL ( $p<0,001$ ) e CR ( $p=0,009$ ). Ademais, o grupo CR+TR obteve incremento significativamente maior deste parâmetro em relação ao grupo PL ( $p=0,013$ ). Nenhuma diferença significativa foi observada entre o grupo SHAM e os grupos sedentários para essa variável, assim como os grupos treinados não apresentaram diferença significativa entre eles.

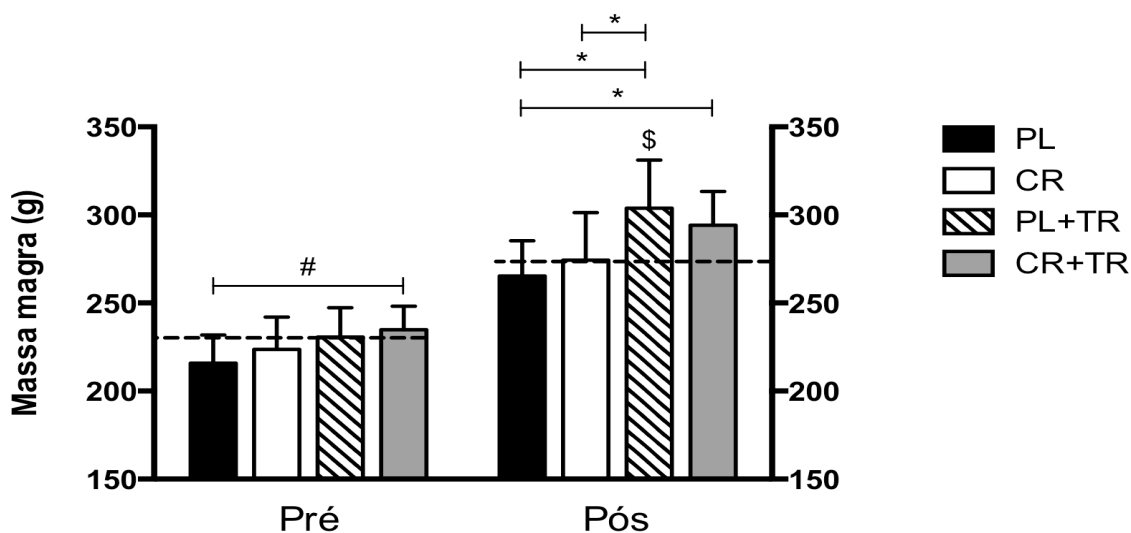


Figura 16 – Quantidade total de massa magra. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. A linha tracejada indica a média do grupo SHAM. # indica  $p<0,05$  para as comparações Pré vs. Pós intragrupo. \* indica  $p<0,05$  para as comparações intergrupo no período Pós. \$ indica  $p<0,05$  para as comparações em relação ao grupo SHAM.

### 5.3 Consumo alimentar

A figura 17 ilustra o consumo alimentar relativo semanal. Uma vez que o consumo relativo foi obtido a partir do grupo SHAM, todos os grupos apresentaram o mesmo consumo alimentar, razão pela qual apenas uma curva foi demonstrada.

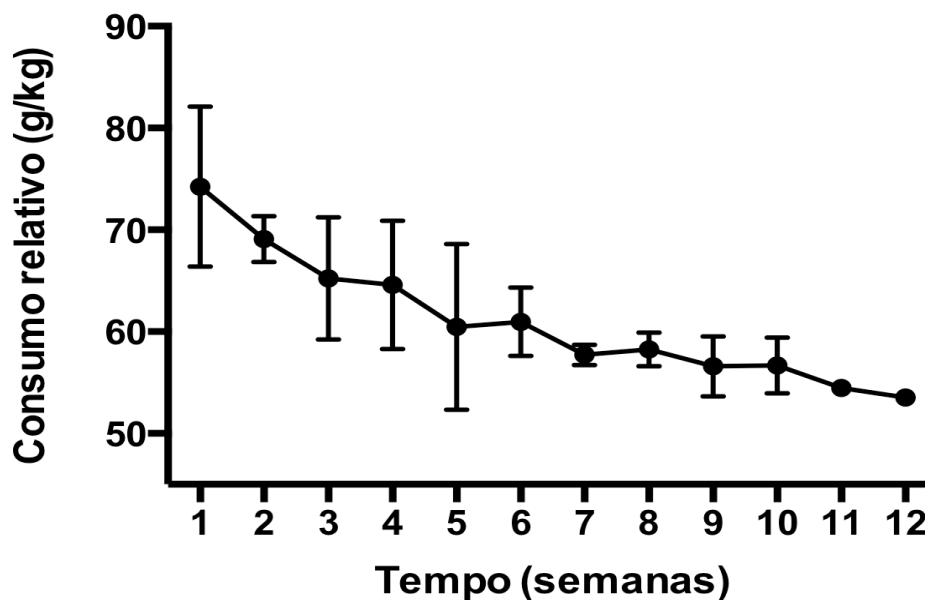


Figura 17 – Consumo alimentar pareado. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

#### 5.4 Análise biomecânica

A figura 18 representa os dados de força máxima do fêmur direito. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos sedentários ( $p=0,763$ ) e entre os grupos treinados ( $p>0,999$ ). O grupo SHAM não demonstrou diferença significativa em relação aos grupos PL ( $p=0,305$ ) e CR ( $p=0,938$ ). Ambos os grupos treinados (PL+TR e CR+TR) apresentaram valores de força máxima significativamente maior em relação aos grupos SHAM ( $p=0,024$  e  $p=0,020$ , respectivamente), PL ( $p<0,001$  e  $p<0,001$ ) e CR ( $p=0,002$  e  $p=0,002$ ).

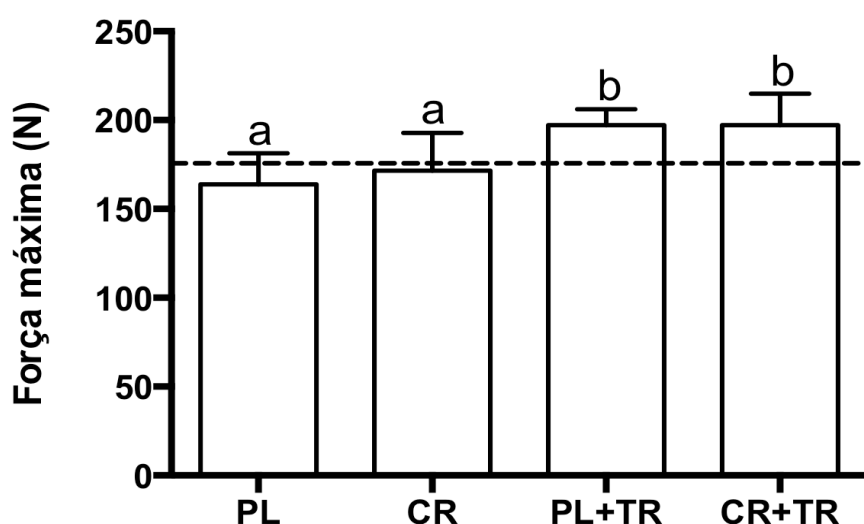


Figura 18 – Força máxima. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. A linha tracejada representa a média do grupo SHAM. As letras diferentes, sobrepostas às barras, indicam diferença significativa entre elas. a, diferença significativa em relação aos grupos treinados. b, diferença significativa em relação ao grupo SHAM.

A figura 19 expressa os dados da força de ruptura do fêmur direito. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos sedentários ( $p=0,748$ ) e entre os grupos treinados ( $p>0,999$ ). O grupo SHAM não demonstrou diferença significativa em relação aos grupos PL ( $p=0,284$ ) e CR ( $p=0,933$ ). Ambos os grupos treinados (PL+TR e CR+TR) apresentaram valores de força de ruptura significativamente maior em relação aos grupos SHAM ( $p=0,047$  e  $p=0,049$ , respectivamente), PL ( $p<0,001$  e  $p<0,001$ ) e CR ( $p=0,006$  e  $p=0,006$ ).

Cabe ressaltar que o comportamento deste parâmetro biomecânico é semelhante ao demonstrado na força máxima atingida no teste (Figura 18), uma vez

que, a partir da análise das curvas individuais de cada espécime testado, constatou-se que apenas em duas ocasiões a força de ruptura não coincidiu com a força máxima atingida no teste, sendo estas, um espécime do grupo CR+TR e um do grupo PL+TR. Excluindo-se esses dois casos descritos, observou-se que todas as demais curvas força-deslocamento obtidas seguem um comportamento quase linear, o que permite, portanto, inferir que a aplicação da força se deu apenas em um ponto do início ao final do teste, eliminando, quase que totalmente, o viés do giro longitudinal sobre o eixo do espécime testado, assim como descrito detalhadamente na subseção 4.9 da seção 4.

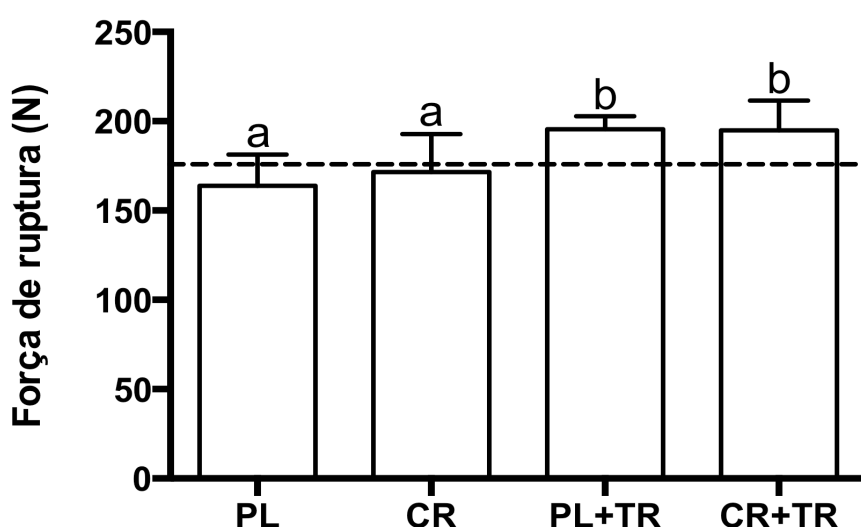


Figura 19 – Força de ruptura. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. A linha tracejada representa a média do grupo SHAM. As letras diferentes, sobrepostas às barras, indicam diferença significativa entre elas. a, diferença significativa em relação aos grupos treinados. b, diferença significativa em relação ao grupo SHAM.

A figura 20 ilustra os dados de rigidez do fêmur direito. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos sedentários ( $p=0,999$ ) e entre os grupos treinados ( $p=0,892$ ). O grupo SHAM não demonstrou diferença significativa em relação aos grupos PL+TR ( $p=0,973$ ) e CR+TR ( $p=0,998$ ), ao passo que este grupo foi significativamente maior em relação aos grupos sedentários ( $p=0,048$  vs. PL e  $p=0,024$  vs. CR). Além disso, observa-se diferença significativa entre os grupos PL e PL+TR ( $p=0,009$ ) e entre os grupos CR e CR+TR ( $p=0,043$ ).

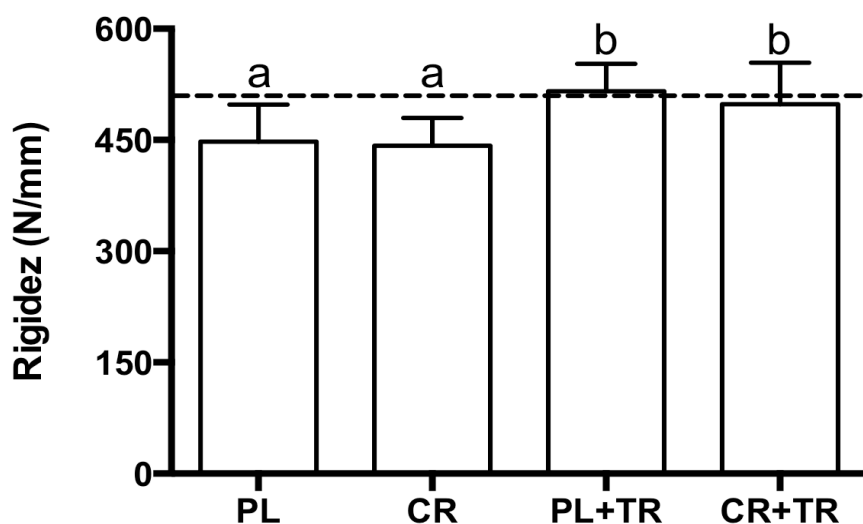


Figura 20 – Rigidez. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. A linha tracejada representa a média do grupo SHAM. As letras diferentes, sobrepostas às barras, indicam diferença significativa entre elas: a, diferença significativa em relação aos grupos treinados. b, nenhuma diferença significativa em relação ao grupo SHAM.

A figura 21 demonstra os dados de tenacidade do fêmur direito. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos sedentários ( $p=0,857$ ) e entre os grupos treinados ( $p=0,136$ ). Nota-se que o grupo CR+TR foi significativamente maior em relação aos grupos SHAM ( $p=0,001$ ) e PL ( $0,025$ ). Nenhuma outra interação foi observada.

A partir da observação anteriormente descrita a respeito do comportamento das curvas força-deslocamento, não foi apresentada nesta dissertação a resiliência do fêmur, que se refere à propriedade de um material acumular energia no seu limite elástico, ou seja, o ponto no qual o material poderá retornar ao seu formato inicial ou apresentar deformações residuais após a cessação da força aplicada, entretanto, sem ocorrer ruptura. Constatou-se que os espécimes testados neste estudo apresentaram um comportamento estritamente plástico, razão pela qual as curvas força-deslocamento apresentaram comportamento quase linear.

A figura 22 representa os valores de deslocamento, referentes à distância percorrida pelo dispositivo de aplicação de carga. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos sedentários ( $p=0,989$ ) e entre os grupos treinados ( $p=0,568$ ). O grupo CR+TR apresentou deslocamento significativamente maior em relação ao grupo SHAM ( $p=0,001$ ), bem como tendência ao aumento desta variável em relação ao grupo PL ( $p=0,054$ ). Nenhuma outra interação foi observada.

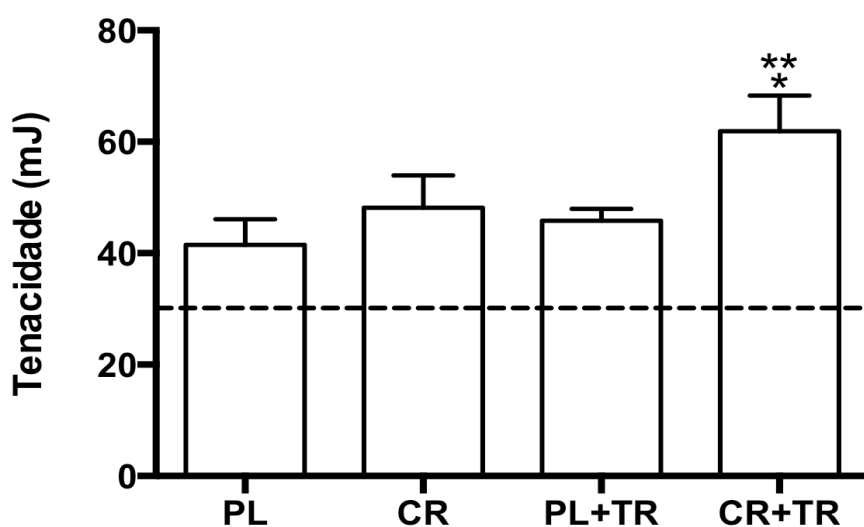


Figura 21 – Tenacidade. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. A linha tracejada representa a média do grupo SHAM. \* SHAM vs. CR+TR ( $p=0,001$ ). \*\* PL vs. CR+TR ( $p=0,025$ ).

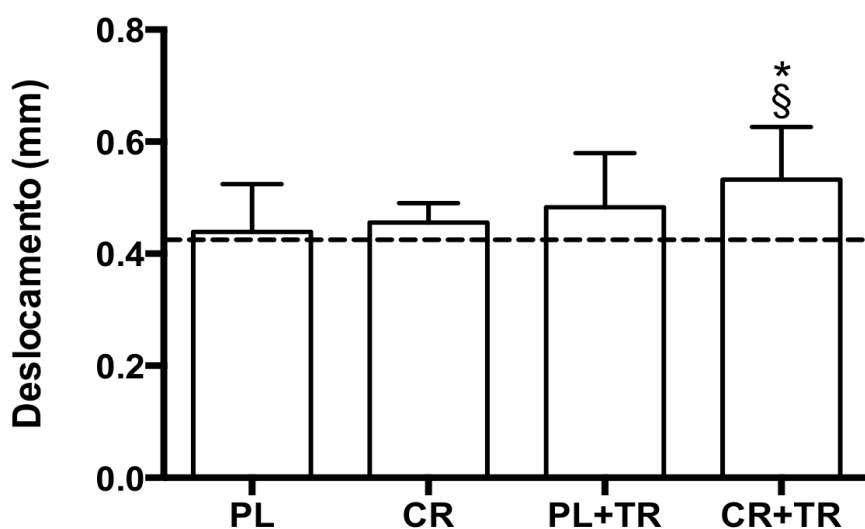


Figura 22 – Deslocamento. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. A linha tracejada representa a média do grupo SHAM. \* efeito de interação SHAM vs. CR+TR ( $p=0,012$ ). § tendência PL vs. CR+TR ( $p=0,054$ ).



## 6 Discussão

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da capacidade osteogênica proveniente do exercício físico, associado ou não à suplementação de creatina, sobre o tecido ósseo em ratas ovariectomizadas. O modelo experimental em questão foi utilizado com o intuito de mimetizar a perda de massa óssea corriqueiramente observada em mulheres na pós-menopausa. Nesse contexto, os principais achados do estudo foram a prevenção da perda de massa óssea, a melhora da resistência à fratura e aumento da rigidez do fêmur em resposta ao exercício físico, sem ação aditiva da suplementação de creatina.

É bem estabelecido que o estímulo mecânico induz efeitos benéficos sobre a microarquitetura do tecido ósseo resultando, conseqüentemente, na manutenção da função e massa ósseas o que indica, portanto, que o osso apresenta respostas significantes no que tange à utilização do exercício físico como estratégia terapêutica em condições que acometem esse tecido (Hamann *et al.*, 2012). Em contrapartida, a ausência e/ou a baixa incidência em relação ao uso do estímulo mecânico proporciona um aumento na reabsorção óssea ocasionada pela sinalização de vias que ativam a osteoclastogênese (Aguirre *et al.*, 2006; Komori, 2013). Os mecanismos que regulam o processo de remodelação óssea a partir do estímulo mecânico são controlados principalmente pela ação dos osteócitos (Bonewald, 2011; Schaffler *et al.*, 2013; Zaman *et al.*, 2006). Os osteócitos, que compreendem a quase totalidade do tipo celular em um osso adulto, são originados a partir da diferenciação de osteoblastos maduros, os quais permaneceram circundados por matriz óssea não-mineralizada (osteóide). Uma vez que o osteóide mineraliza, os osteócitos se mantêm fixos ao mesmo local de origem até atingirem a morte celular, formando uma complexa rede lacuno-canalicular, a qual dispõe de uma extensa e efetiva comunicação entre os osteócitos adjacentes e os osteoblastos localizados na superfície óssea (Bonewald, 2011). Sabe-se que os osteócitos respondem diretamente à aplicação da carga mecânica proveniente do exercício físico, entretanto, é de grande importância levar em consideração os componentes do estímulo mecânico que influenciam na adaptação óssea, que são eles: a magnitude da carga mecânica, a frequência e a taxa de aplicação de carga, assim como o gradiente da carga mecânica (Zernicke *et al.*, 2012). O maior potencial osteogênico ocorre à medida que a magnitude da carga mecânica aumenta, em

outras palavras, a adaptação óssea em relação à este componente apresenta relação linear e diretamente proporcional (Khan et al., 2000). Assim como a magnitude, a frequência de aplicação de carga é também um componente que apresenta relação linear e diretamente proporcional com a adaptação óssea, contudo, observa-se maior potencial osteogênico quando utilizada uma alta frequência de aplicação de carga associada com um baixo tempo de duração (Rubin et al., 2002; Xie et al., 2008). Em relação à taxa de aplicação de carga, sabe-se que um estímulo dinâmico possui maior capacidade osteogênica em comparação a um estímulo estático, ou seja, exercícios físicos com impacto apresentam efeitos benéficos significativamente maiores em relação aos exercícios físico sem impacto (Zernicke et al., 2012). Por fim, o gradiente está relacionado à mudança na magnitude da carga mecânica em função da posição de um corpo, por exemplo, a prática do exercício físico faz com que haja uma combinação de cargas (e.g., carga axial e carga de dobramento), como resultado, a magnitude destas cargas mecânicas aplicadas diferem espacialmente ao longo do osso (Zernicke et al., 2012). Contudo, no que se trata à escolha do exercício físico adequado para que haja respostas osteogênicas ótimas, torna-se extremamente importante considerar aquele que faça a utilização de todos esses componentes anteriormente descritos.

Atualmente, sabe-se que a sensibilidade dos osteócitos em detectar uma deformação causada no osso e traduzi-la em sinais biofísicos que desencadearão os mecanismos responsáveis para o controle da remodelação óssea chama-se mecanotransdução (Bonewald & Johnson, 2008). Basicamente, a mecanotransdução ocorre pela diferença na pressão hidrostática dos fluidos ósseos do sistema lacuno-canalicular. As regiões nas quais são aplicadas forças de compressão desenvolvem alta pressão hidrostática, o que faz com que ocorra um fluxo do fluido ósseo para as regiões de menor pressão hidrostática a fim de equilibrar esse diferencial de pressão. O fluxo gerado resulta em forças de cisalhamento, as quais desencadeiam potenciais de ação nas membranas dos osteócitos, possibilitando, então, a propagação dos sinais elétricos entre os osteócitos adjacentes, via sistema *gap-junction*, até que estimulem a atividade dos osteoblastos presentes na superfície óssea (Bonewald & Johnson, 2008; Bonewald, 2011). Em contrapartida, foi demonstrado que a ausência do estímulo mecânico resulta na apoptose dos osteócitos, o que favorece a sinalização de vias necessárias para a osteoclastogênese (Komori et al., 2013).

Sendo assim, os resultados desse estudo, parcialmente em consonância com a hipótese inicial, mostram que o exercício físico foi capaz de prevenir a perda de massa óssea, assim como aumentar as propriedades biomecânicas do osso em modelo experimental de osteoporose, entretanto, não foi observado nenhum efeito isolado ou aditivo da suplementação de creatina. Ao nosso conhecimento, esse estudo foi o primeiro a avaliar os efeitos preventivos da suplementação de creatina sobre a massa óssea em modelo experimental de baixa massa óssea. Os demais estudos que testaram a relação desse suplemento alimentar e observaram melhora do tecido ósseo em animais utilizaram ratos saudáveis (Antolic *et al.*, 2007) ou ratas ovariectomizadas com a baixa massa óssea já estabelecida (De Souza *et al.*, 2011). Portanto, é possível que a diferença de modelo experimental possa explicar, ainda que parcialmente, a ineficácia da suplementação de creatina no presente estudo. Outros fatores que potencialmente explicam os achados discordantes serão abordados mais adiante nesta discussão.

É de grande importância ressaltar os cuidados tomados em nosso estudo com relação ao modelo experimental utilizado, no intuito de se obter a perda de massa óssea efetiva e eliminar possíveis fatores de confusão na amostra. Sabe-se que em animais, o aumento do peso corporal observado após a ovariectomia está primordialmente relacionado ao surgimento da hiperfagia, uma vez que o estradiol está fortemente associado à regulação do consumo alimentar por meio de vias anorexígenas no sistema nervoso central, as quais são mediadas a partir da ativação dos receptores de estrógeno (Fisher *et al.*, 2000; Jiang *et al.*, 2008; Eckel, 2011; Ferreira *et al.*, 2012). Sendo assim, utilizamos o pareamento do consumo alimentar pelo grupo saudável no intuito de impedir o ganho exacerbado de peso corporal, o que poderia gerar uma maior magnitude de força compressiva imposta no osso pela sustentação do elevado peso corporal, acarretando, portanto, uma consequente manutenção da massa óssea. Nesse contexto, os achados do estudo mostram que o pareamento do consumo alimentar foi efetivo em equalizar e impedir que a progressão do peso corporal nos grupos ovariectomia fosse discrepante em relação ao grupo SHAM ao longo do protocolo experimental. Além disso, a partir do comportamento da curva de consumo alimentar, observa-se um declínio ao longo das semanas na relação da quantidade de alimento ingerido (expresso em gramas) com a progressão do peso corporal total dos grupos (expresso em kilogramas), o que pode ser explicado pela progressão fisiológica do peso corporal devido ao

crescimento do animal e, uma vez que a quantidade de alimento ingerido pelo grupo SHAM não oscilou ao longo das semanas, esse achado era esperado.

Outro fator determinante nesse estudo foi a eficácia do procedimento cirúrgico de ovariectomia em reduzir a massa óssea. Apesar do desenho experimental ter sido desenvolvido para testar os efeitos preventivos da intervenção, o grupo ovariectomia controle (PL) necessariamente deveria apresentar menor CMO e DMO totais e regionais em relação ao grupo SHAM. Os achados do estudo demonstram que, de fato, o grupo PL apresentou menor valor desses parâmetros ao final do protocolo experimental em relação ao grupo SHAM; além disso, exceto para o CMO e DMO totais, o grupo PL não experimentou aumentos significantes em nenhum outro parâmetro ósseo ao longo do tempo, o que indica a efetividade em utilizar a ovariectomia como um modelo promotor da deterioração do tecido ósseo. Cabe ressaltar, contudo, que esse modelo experimental foi escolhido devido às evidências existentes que mostram não só a efetiva perda de massa óssea ocasionada pela interrupção na produção de hormônios ovarianos, mas sim pela possibilidade de ter o conhecimento a respeito do período no qual o animal apresentará perda óssea significativa, permitindo, então, otimizar os desenhos experimentais e as intervenções a serem testadas (Kalu, 1991; Li *et al.*, 1997).

O mecanismo clássico de ação do ESR1 inicia-se a partir da ligação do estrógeno, o qual irá resultar na sua fosforilação e dimerização, facilitando a ligação desse complexo ativado à seqüências específicas do DNA, denominadas elementos de resposta ao estrógeno (ERE), levando à transcrição gênica (Nilsson & Gustafsson, 2011). Porém, evidências indicam a existência de outros possíveis mecanismos de ativação do ESR1 independente do estrógeno, especialmente nos osteócitos e osteoblastos. Essa ativação pode estar relacionada principalmente à ativação da ERK (do inglês *extracellular regulated kinase*) em decorrência ao estímulo mecânico, a qual será responsável por realizar a fosforilação do ESR1 e sua ligação ao ERE (Lee & Lanyon, 2003). À luz desse conceito, apesar do fato de que no presente estudo não foi mensurado nenhum elemento responsável pela regulação dessa via, pode-se especular que o ganho de massa óssea em decorrência ao exercício físico tenha ocorrido, em partes, graças à esse mecanismo de ação independente de estrógeno (Lee & Lanyon, 2003). Como o objetivo do presente estudo não foi avaliar esses mecanismos específicos, uma possível investigação *a posteriori* seria de extrema relevância para uma compreensão mais

abrangente com relação aos efeitos do exercício físico sob condições de baixa produção de estrógeno.

Esse foi o primeiro estudo que investigou os efeitos do treinamento físico em declive na prevenção da massa óssea em ratas ovariectomizadas. O protocolo de treinamento físico adotado foi adaptado do estudo realizado por Hamann e seus colaboradores (Hamann *et al.*, 2012). Nessa ocasião, os autores tinham como objetivo comparar os efeitos de um protocolo de treinamento físico em declive em relação à um protocolo sem inclinação sobre os parâmetros morfológicos, estruturais e biomecânicos do fêmur em modelo experimental. Esse estudo, entretanto, apresenta algumas diferenças metodológicas em relação ao nosso estudo, as quais merecem destaque: a amostra foi composta por animais saudáveis e considerados jovens (6 semanas de vida) e, portanto, ainda não teriam atingido a maturação óssea no período da intervenção. Tais diferenças permitem inferir, portanto, que o treinamento físico em declive parece exercer efeitos benéficos mais pronunciados quando realizado em animais de baixa massa óssea em comparação à animais saudáveis, uma vez que os achados do nosso estudo demonstrou aumento significativo da força máxima do fêmur até a fratura nos grupos treinados em relação aos grupos sedentários e SHAM. Em contrapartida, o estudo de Hamman não demonstrou diferença entre os grupos e, ainda que não apresentado significância estatística, o grupo treinamento físico em declive experimentou, quantitativamente, menor valor dessa variável em relação aos grupos controle sedentário e treinamento físico sem inclinação. Ademais, nosso estudo observou valores similares de rigidez do fêmur entre os grupos treinados e SHAM, o que nos leva a concluir que o treinamento físico em declive foi capaz de aumentar essa propriedade biomecânica nos grupos treinados ao longo do protocolo experimental, alcançando valores comparáveis ao de um grupo saudável. Sabe-se que as regiões cujas respostas adaptativas ao treinamento físico em esteira rolante apresentam maior sensibilidade, são aquelas nas quais o estímulo mecânico é imposto diretamente, neste caso os membros inferiores. Entretanto, nosso estudo mostrou, interessante, aumentos significantes do CMO e DMO da coluna vertebral em decorrência ao treinamento físico. Especula-se que, pelo fato da coluna vertebral ser composta predominantemente de osso trabecular, a remodelação óssea nessa região é mais suscetível em comparação ao osso cortical, permitindo observar alterações mais evidentes em relação aos estímulos depressor (ovariectomia) e promotor

(treinamento físico) do ganho de massa óssea (Li *et al.*, 1997; De Souza *et al.*, 2011).

O promissor papel terapêutico da suplementação de creatina sobre o tecido ósseo foi testado previamente em ratos saudáveis. Nessa ocasião, os autores dividiram trinta e dois animais em um grupo tratado com creatina, em uma quantidade equivalente a 2% do consumo alimentar diário, e um grupo controle. Os resultados mostram que a creatina foi capaz de aumentar significativamente a DMO da coluna vertebral e a força máxima do fêmur até a fratura no teste de flexão em três pontos (Antolic *et al.*, 2007). Nesse contexto, pode-se considerar que os achados do nosso estudo são controversos em relação ao trabalho realizado por Antolic *et al.*, (2007), uma vez que não observamos nenhum efeito significativo no CMO e DMO totais e regionais, assim como nenhuma diferença significativa nos parâmetros biomecânicos do fêmur quando comparados os grupos tratados com creatina em relação aos grupos tratados com placebo. Cabe salientar, contudo, que o desenho experimental do nosso estudo foi desenvolvido com o intuito de testar a hipótese de que a suplementação de creatina *per se* apresentaria efeitos positivos na prevenção da perda de massa óssea, bem como efeitos aditivos quando combinada com o exercício físico, porém, os resultados refutam a hipótese inicial do estudo. Acredita-se que o estímulo bioenergético, ao qual é creditado o efeito benéfico da creatina sobre o tecido ósseo (Wallimann *et al.*, 1994), foi insuficiente para provocar alterações em um modelo experimental cuja perda de massa óssea foi acelerada. Não obstante o trabalho de Antolic *et al.*, (2007) ter utilizado ratos saudáveis, a diferença entre as idades dos animais deste estudo para o nosso pode ter sido determinante em refletir a discrepância entre os resultados, uma vez que animais jovens tendem a manter o crescimento ósseo até que atinjam a maturação óssea, e, ao utilizar um estímulo que favoreça a diferenciação das células ósseas, como na suplementação de creatina, era de se esperar que os efeitos seriam mais pronunciados em relação aos nossos.

Recentemente, o estudo realizado por De Souza *et al.*, (2011) foi o pioneiro em investigar os efeitos da suplementação de creatina em condições de baixa massa óssea em modelo experimental. Para tanto, os autores utilizaram um grupo de animais saudáveis falso-operados, um grupo de ratas ovariectomizadas (OVX) controle e um grupo OVX tratadas com creatina, em uma dosagem equivalente a 300 mg/kg/dia. Foi demonstrado que o sinal espectroscópico referente ao conteúdo

de fosfato aumentou no osso trabecular após o tratamento com creatina. É significativo, contudo, destacar as diferenças na metodologia e desenho experimental existentes neste estudo em comparação ao nosso. Um fator importante a ser salientado é a discrepância em relação aos métodos de avaliação do tecido ósseo entre os dois estudos. Observa-se que De Souza *et al.*, (2011) utilizou a espectroscopia Raman para investigar o que os autores consideram o desfecho primário do trabalho, a composição química do osso. Esta análise é capaz de fornecer informações a respeito da composição orgânica e inorgânica de uma amostra, permitindo avaliações qualitativas e quantitativas não-destrutivas, uma vez que a principal característica deste método é mensurar a frequência vibracional de moléculas por meio do espalhamento de uma luz com comprimento de onda conhecida. O nosso estudo utilizou técnicas consideradas padrão-ouro para avaliar a composição corporal e conteúdo mineral de várias regiões ósseas, o que nos leva a especular que as diferenças metodológicas entre os estudos culminaram para as discrepâncias nos resultados. É importante salientar que no estudo de De Souza *et al.*, (2011), além dos autores terem utilizado animais com perda óssea já estabelecida (instituída por 12 semanas de ovariectomia), a DMO, a qual foi mensurada para correlacionar com a composição química do osso, bem como testar a eficácia do procedimento cirúrgico de ovariectomia, foi avaliada por meio de radiografia, uma técnica que não possui a mesma precisão e acurácia da densitometria óssea quando realizada no DXA, considerada técnica de primeira escolha na detecção de osteoporose (Kendler *et al.*, 2013). Além disso, os autores não realizaram nenhuma avaliação dos parâmetros biomecânicos do osso, que apontam importantes características de um tecido frente a um estímulo estressor, como na aplicação de uma força externa. Recentemente, um estudo do nosso grupo demonstrou que a suplementação de creatina *per se*, administrada a longo prazo (i.e. 24 semanas) em mulheres idosas, sedentárias e diagnosticadas com osteopenia ou osteoporose, não foi capaz de aumentar a massa óssea, nem alterar os parâmetros bioquímicos de formação e reabsorção ósseas (i.e. P1NP e CTX, respectivamente). Nenhum efeito significativo para esses parâmetros citados foi observado também quando a suplementação de creatina foi combinada com o treinamento de força (Gualano *et al.*, 2014). Assim sendo, os resultados supracitados nos permitem especular a dificuldade em reverter os quadros de deterioração do tecido ósseo já estabelecidos.

Em suma, concluímos que o treinamento físico em declive promove efeitos preventivos na perda de massa óssea, bem como aumento dos parâmetros biomecânicos do tecido ósseo em ratas ovariectomizadas. Além disso, a suplementação de creatina neste modelo experimental não apresentou efeitos isolados nem aditivos quando combinada ao treinamento físico sobre o tecido ósseo. Estes achados refutam a hipótese inicial do estudo de que a suplementação de creatina *per se* pode ser uma estratégia nutricional de grande potencial em prevenir a perda de massa óssea em um modelo experimental que mimetiza a osteoporose pós-menopausa e, quando associada ao treinamento físico, exerceria efeitos mais significativos. Em contrapartida, nosso estudo produziu evidências sólidas que fortalecem o papel terapêutico do treinamento físico em condições que acometem o tecido ósseo.



## 7 Referências bibliográficas

Aguirre JI, Plotkin LI, Stewart SA, Weinstein RS, Parfitt AM, Manolagas SC, Bellido T. Osteocyte apoptosis is induced by weightlessness in mice and precedes osteoclast recruitment and bone loss. *J Bone Miner Res*, v.21, n.4, p.605-615. 2006.

Albright F, Smith PH, Richardson AM. Postmenopausal osteoporosis. *JAMA*, v.116, n.22, p.2465–2474. 1941.

Antolic A, Roy BD, Tarnopolsky MA, Zernicke RF, Wohl GR, Shaughnessy SG, Bourgeois JM. Creatine monohydrate increases bone mineral density in young *Sprague-dawley* rats. *Med Sci Sports Exerc*, v.39, n.5, p.816-820. 2007.

Araujo DV, Oliveira JH, Bracco OL. Cost of osteoporotic hip fractures in the Brazilian private health care system. *Arq Bras Endocrinol Metab*, v.49, n.6, p.897-901. 2005.

Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res*, v.26, n.2, p.229-238. 2011.

Bonewald LF, Johnson ML. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone*, v.42, n.4, p.606-615. 2008.

Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, v.423, n.6937, p.337–342. 2003.

Brosnan JT, da Silva RP, Brosnan ME. The metabolic burden of creatine synthesis. *Amino Acids*, v.40, n.5, p.1325-1331. 2011.

Bu S, Chen Y, Wang S, Zhang F, Ji G. Treadmill training regulates  $\beta$ -catenin signaling through phosphorylation of GSK-3 $\beta$  in lumbar vertebrae of ovariectomized rats. *Eur J Appl Physiol*, v.112, n.9, p.3295-3304. 2012.

Camargo MB, Cendoroglo MS, Ramos LR, Oliveira Latorre MR, Saraiva GL, Lage A, et al. Bone mineral density and osteoporosis among a predominantly Caucasian elderly population in the city of Sao Paulo, Brazil. *Osteoporos Int*, v.16, n.11, p.1451-1460. 2005.

Candow DG, Little JP, Chilibeck PD, Abeysekara S, Zello GA, Kazachkov M, Cornish SM, Yu PH. Low-dose creatine combined with protein during resistance training in older men. *Med Sci Sports Exerc*, v.40, n.9, p.1645–1652. 2008.

Carter DR. Mechanical loading histories and cortical bone remodeling. *Calcif Tissue Int*, v.36 Suppl 1, S19-24. 1984.

Chen Y, Wang S, Bu S, Wang Y, Duan Y, Yang S. Treadmill training prevents bone loss by inhibition of PPAR $\gamma$  expression but not promoting of Runx2 expression in ovariectomized rats. *Eur J Appl Physiol*, v.111, n.8, p.1759-1767. 2011.

Chilibeck PD, Chrusch MJ, Chad KE, Shawn Davison K, Burke DG. Creatine monohydrate and resistance training increase bone mineral content and density in older men. *J Nutr Health Aging*, v.9, n.5, p.352-3. 2005.

Clark P, Cons-Molina F, Deleze M, Ragi S, Haddock L, Zanchetta JR, Jaller JJ, Palermo L, Talavera JO, Messina DO, Morales-Torres J, Salmeron J, Navarrete A, Suarez E, Pérez CM, Cummings SR. The prevalence of radiographic vertebral fractures in Latin American countries: the Latin American Vertebral Osteoporosis Study (LAVOS). *Osteoporos Int*, v.20, n.2, p.275-282. 2009.

Clarke B. Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*, v.3, Suppl 3, S131-139. 2008.

Cooper R, Naclerio F, Allgrove J, Jimenez A. Creatine supplementation with specific view to exercise/sports performance: an update. *J Int Soc Sports Nutr*, v.9, n.1, p.33-43. 2012.

Cummings SR, Melton LJ. Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. *Lancet*, v.359, n.9319, p.1761-1767. 2002.

de Souza RA, Xavier M, da Silva FF, de Souza MT, Tosato MG, Martin AA, et al. Influence of creatine supplementation on bone quality in the ovariectomized rat model: an FT-Raman spectroscopy study. *Lasers Med Sci*, v.27, n.2, p.487-495. 2012.

Duncan RL, Turner CH. Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcif Tissue Int*, v.57, n.5, p.344-358. 1995.

Eckel LA. The ovarian hormone estradiol plays a crucial role in the control of food intake in females. *Physiol Behav*, v.104, n.4, p.517-524. 2011.

Egermann M, Goldhahn J, Schneider E. Animal models for fracture treatment in osteoporosis. *Osteoporos Int*, v.16, Suppl 2, p.S129-138. 2005.

Ehrlich PJ, Lanyon LE. Mechanical strain and bone cell function: a review. *Osteoporos Int*, v.13, n.9, p.688-700. 2002

Ferrari S, Bianchi ML, Eisman JA, Foldes AJ, Adami S, Wahl DA, Stepan JJ, de Vernejoul MC, Kaufman JM. *Osteoporosis Int*, v.23, n.12, p.2735-2748. 2012.

Ferreira JA, Foley AM, Brown M. Sex hormones differentially influence voluntary running activity, food intake and body weight in aging female and male rats. *Eur J Appl Physiol*, v.112, n.8, p.3007-3018. 2012.

Fisher JS, Kohrt WM, Brown M. Food restriction suppresses muscle growth and augments osteopenia in ovariectomized rats. *J Appl Physiol*, v.88, n.1, p.265-271. 2000.

Fonseca H, Powers SK, Gonçalves D, Santos A, Mota MP, Duarte JA. Physical inactivity is a major contributor to ovariectomy-induced sarcopenia. *Int J Sports Med*, v.33, n.4, p.268-278. 2012.

Frost HM. The role of changes in mechanical usage set points in the pathogenesis of osteoporosis. *J Bone Miner Res*, v.7, n.3, p.253-261. 1992.

Funanage VL, Carango P, Shapiro IM, Tokuoka T, Tuan RS. Creatine kinase activity is required for mineral deposition and matrix synthesis in endochondral growth cartilage. *Bone Miner*, v.17, n.2, p.228-236. 1992.

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.382-390. 2013.

Gerber I, ap Gwynn I, Alini M, Wallimann T. Stimulatory effects of creatine on metabolic activity, differentiation and mineralization of primary osteoblast-like cells in monolayer and micromass cell cultures. *Eur Cell Mater*, v.10, p.8-22. 2005.

Gualano B, Artioli GG, Poortmans JR, Lancha Junior AH. Exploring the therapeutic role of creatine supplementation. *Amino Acids*, v.38, n.1, p.31-44. 2010.

Gualano B, Roschel H, Lancha-Jr AH, Brightbill CE, Rawson ES. In sickness and in health: the widespread application of creatine supplementation. *Amino Acids*, v.43, n.2, p.519-529. 2012.

Hagihara Y, Nakajima A, Fukuda S, Goto S, Iida H, Yamazaki M. Running exercise for short duration increases bone mineral density of loaded long bones in young growing rats. *Tohoku J Exp Med*, v.219, n.2, p.139-143. 2009.

Hamann N, Kohler T, Müller R, Brüggemann GP, Niehoff A. The effect of level and downhill running on cortical and trabecular bone in growing rats. *Calcif Tissue Int*, v.90, n.5, p.429-437. 2012.

Hamann N, Zaucke F, Heilig J, Oberländer KD, Brüggemann GP, Niehoff A. Effect of different running modes on the morphological, biochemical, and mechanical properties of articular cartilage. *Scand J Med Sci Sports*, v.24, n.1, p.179-188. 2014.

Harris RC, Söderlund K, Hultman E. Elevation of creatine in resting and exercised muscle of normal subjects by creatine supplementation. *Clin Sci (Lond)*, v.83, n.3, p.367-374. 1992.

Holick MF, Chen TC, Lu Z, Sauter E. Vitamin D and skin physiology: a D- lightful story. *J Bone Miner Res*, v.22, Suppl 2, V28-33. 2007.

Holick MF. Deficiency of sunlight and vitamin D. *BMJ*. v.336, n.7657, p.1318-1319. 2008.

Iwamoto J, Takeda T, Ichimura S. Effects of exercise on bone mineral density in mature osteopenic rats. *J Bone Miner Res*, v.13, n.8, p.1308-1317. 1998.

Iwamoto J, Takeda T, Ichimura S. Effects of moderate intensity exercise on tibial bone mass in mature ovariectomized rats: bone histomorphometry study. *Keio J Med*, v.47, n.3, p.162-167. 1998.

Iwamoto J, Takeda T, Sato Y. Effect of treadmill exercise on bone mass in female rats. *Exp Anim*, v.54, n.1, p.1-6. 2005.

Iwamoto J, Yeh JK, Aloia JF. Differential effect of treadmill exercise on three cancellous bone sites in the young growing rat. *Bone*, v.24, n.3, p.163-169. 1999.

Jee WS, Yao W. Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, v.1, n.3, p.193-207. 2001.

Jiang JM, Sacco SM, Ward WE. Ovariectomy-induced hyperphagia does not modulate bone mineral density or bone strength in rats. *J Nutr*, v.138, n.11, p.2106-2110. 2008.

Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner*. v.15, n.3, p.175-191. 1991.

Kanis JA. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: synopsis of a WHO report. WHO Study Group. *Osteoporos Int*, v.4, n.6, p.368-381. 1994.

Khan K, McKay HA, Haapasalo H, Bennell KL, Forwood MR, Kannus P, Wark JD. Does childhood and adolescence provide a unique opportunity for exercise to strengthen the skeleton? *J Sci Med Sport*, v.3, p.150–164. 2000.

Klein-Nulend J, van der Plas A, Semeins CM, Ajubi NE, Frangos JA, Nijweide PJ, Burger EH. Sensitivity of osteocytes to biomechanical stress in vitro. *FASEB J*. v.9, n.5, p.441-445. 1995.

Komatsu RS, Ramos LR, Szejnfeld VL. Incidence of proximal femur fractures in Marilia, Brazil. *J Nutr Health Aging*, v.8, n.5, p.362-367. 2004.

Komori T. Functions of the osteocyte network in the regulation of bone mass. *Cell Tissue Res*, v.352, n.2, p.191-198. 2013.

Krolner B, Toft B. Vertebral bone loss: an unheeded side effect of therapeutic bed rest. *Clin Sci (Lond)*, v.64, n.5, p.537-540. 1983.

Lane NE. Osteoporosis: yesterday, today and tomorrow. *Rheumatology (Oxford)*, v.50, n.7, p.1181-1183. 2011.

Lanyon L, Armstrong V, Ong D, Zaman G, Price J. Is estrogen receptor alpha key to controlling bones' resistance to fracture? *J Endocrinol*, v.182, n.2, p.183-191. 2004.

Lanyon LE. Osteocytes, strain detection, bone modeling and remodeling. *Calcif Tissue Int*, v.53, Suppl 1, p.S102–S107. 1993.

Larson CM, Henderson RC. Bone mineral density and fractures in boys with Duchenne muscular dystrophy. *J Pediatr Orthop*, v.20, n.1, p.71-74. 2000.

Leblanc AD, Schneider VS, Evans HJ, Engelbretson DA, Krebs JM. Bone mineral loss and recovery after 17 weeks of bed rest. *J Bone Miner Res*, v.5, n.8, p.843-850. 1990.

Lee K, Jessop H, Suswillo R, Zaman G, Lanyon L. Endocrinology: bone adaptation requires oestrogen receptor-alpha. *Nature*, v.424, n.6947, p.389. 2003.

Lee KC, Lanyon LE. Mechanical loading influences bone mass through estrogen receptor alpha. *Exerc Sport Sci Rev*, v.32, n.2, p.64-68. 2004.

Li M, Shen Y, Wronski TJ. Time course of femoral neck osteopenia in ovariectomized rats. *Bone*, v.20, n.1, p.55-61. 1997.

Louis M, Lebacq J, Poortmans JR, Belpaire-Dethiou MC, Devogelaer JP, Van Hecke P, Goubel F, Francaux M. Beneficial effects of creatine supplementation in dystrophic patients. *Muscle Nerve*, v.27, n.5, p.604-610. 2003.

Lugaresi R, Leme M, de Salles Painelli V, Murai IH, Roschel H, Sapienza MT, Lancha Junior AH, Gualano B. Does long-term creatine supplementation impair kidney function in resistance-trained individuals consuming a high-protein diet? *J Int Soc Sports Nutr*, v.10, n.1, p.26. 2013.

Maeda SS, Lazaretti-Castro M. An overview on the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, v.58, n.2, p.162-171. 2014.

Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev*, v.21, n.2, p.115-137. 2000.

McCormick KM, Burns KL, Piccone CM, Gosselin LE, Brazeau GA. Effects of ovariectomy and estrogen on skeletal muscle function in growing rats. *J Muscle Res Cell Motil*, v.25, n.1, p.21-27. 2004.

Mosley JR, Lanyon LE. Strain rate as a controlling influence on adaptive modeling in response to dynamic loading of the ulna in growing male rats. *Bone*, v.23, n.4, p.313-318. 1998.

Nicastro H, Gualano B, de Moraes WM, de Salles Painelli V, da Luz CR, dos Santos Costa A, de Salvi Guimarães F, Medeiros A, Brum PC, Lancha AH Jr. Effects of creatine supplementation on muscle wasting and glucose homeostasis in rats treated with dexamethasone. *Amino Acids*, v.42, n.5, p.1695-1701. 2012.

Nilsson S, Gustafsson JÅ. Estrogen receptors: therapies targeted to receptor subtypes. *Clin Pharmacol Ther*, v.89, n.1, p.44-55. 2011.

O'Brien CA. Control of RANKL gene expression. *Bone*, v.46, n.4, p.911–919. 2010.

Paralkar VM, Borovecki F, Ke HZ, Cameron KO, Lefker B, Grasser WA, Owen TA, Li M, DaSilva-Jardine P, Zhou M, Dunn RL, Dumont F, Korsmeyer R, Krasney P, Brown TA, Plowchalk D, Vukicevic S, Thompson DD. An EP2 receptor-selective prostaglandin E2 agonist induces bone healing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.100, n.11, p.6736-6740. 2003.

Pereira IA, Pereira RM. Osteoporose e erosões ósseas focais na artrite reumatóide: da patogênese ao tratamento. *Rev Bras Reumatol*, v.44, n.5, p.347-354. 2004.

Pinheiro MM, Reis Neto ET, Machado FS, Omura F, Yang JH, Szejnfeld J, Szejnfeld VL. Risk factors for osteoporotic fractures and low bone density in pre and postmenopausal women. *Rev Saude Publica*, v.44, n.3, p.479-485. 2010.

Price JS, Sugiyama T, Galea GL, Meakin LB, Sunter A, Lanyon LE. Role of endocrine and paracrine factors in the adaptation of bone to mechanical loading. *Curr Osteoporos Rep*, v.9, n.2, p.76-82. 2011.

Riggs BL, Khosla S, Melton LJ. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev*, v.23, n.3, p.279–302. 2002.



Riggs BL. The mechanisms of estrogen regulation of bone resorption. *J Clin Invest*, v.106, n.10, p.1203–1204. 2000.

Ruan XY, Jin FY, Liu YL, Peng ZL, Sun YG. Effects of vibration therapy on bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *Chin Med J (Engl)*, v.121, v.13, p.1155-1158. 2008.

Rubin C, Turner AS, Mallinckrodt C, Jerome C, McLeod K, Bain S. Mechanical strain, induced noninvasively in the high-frequency domain, is anabolic to cancellous bone, but not cortical bone. *Bone*, v.30, p.445–452. 2002.

Schaffler MB, Cheung WY, Majeska R, Kennedy O. Osteocytes: master orchestrators of bone. *Calcif Tissue Int*, v.94, n.1, p.5-24. 2014.

Scott A, Khan KM, Duronio V, Hart DA. Mechanotransduction in human bone: in vitro cellular physiology that underpins bone changes with exercise. *Sports Med*, v.38, n.2, p.139-160. 2008.

Seidlová-Wuttke D, Prella K, Fritzscheier KH, Wuttke W. Effects of estrogen receptor alpha- and beta-selective substances in the metaphysis of the tibia and on serum parameters of bone and fat tissue metabolism of ovariectomized rats. *Bone*, v.43, n.5, p.849-855. 2008.

Tan SD, de Vries TJ, Kuijpers-Jagtman AM, Semeins CM, Everts V, Klein-Nulend J. Osteocytes subjected to fluid flow inhibit osteoclast formation and bone resorption. *Bone*, v.41, n.5, p.745-751. 2007.

Torgerson DJ, Bell-Syer SE. Hormone replacement therapy and prevention of nonvertebral fractures: a meta-analysis of randomized trials. *JAMA*. v.285, n.22, p.2891-2897. 2001.

Turner RT. Invited review: what do we know about the effects of spaceflight on bone? *J Appl Physiol*, v.89, n.2, p.840-847. 2000.

Udagawa N, Takahashi N, Yasuda H, Mizuno A, Itoh K, Ueno Y, Shinki T, Gillespie MT, Martin TJ, Higashio K, Suda T. Osteoprotegerin produced by osteoblasts is an important regulator in osteoclast development and function. *Endocrinology*, v.141, n.9, p.3478–3484. 2000.

US Census Bureau, International Data Base, 2011.

Wallimann T, Hemmer W. Creatine kinase in non-muscle tissues and cells. *Mol Cell Biochem*, v.133-134, p.193-220. 1994.

Wallimann T, Tokarska-Schlattner M, Schlattner U. The creatine kinase system and pleiotropic effects of creatine. *Amino Acids*, v.40, n.5, p.1271-1296. 2011.

Wolff J. *Das Gesetz der Transformation der Knochen*. Hirschwald. 1892, Berlin.

Wronski TJ, Dann LM, Horner SL. Time course of vertebral osteopenia in ovariectomized rats. *Bone*, v.10, n.4, p.295-301. 1989.

Wronski TJ, Dann LM, Scott KS, Cintrón M. Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton. *Calcif Tissue Int*, v.45, n.6, p.360-366. 1989.

Wyss M, Kaddurah-Daouk R. Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev*, v.80, n.3, p.1107-1213. 2000.

You L, Temiyasathit S, Lee P, Kim CH, Tummala P, Yao W, Kingery W, Malone AM, Kwon RY, Jacobs CR. Osteocytes as mechanosensors in the inhibition of bone resorption due to mechanical loading. *Bone*, v.42, n.1, p.172-179. 2008.

Yoshida K, Oida H, Kobayashi T, Maruyama T, Tanaka M, Katayama T, Yamaguchi K, Segi E, Tsuboyama T, Matsushita M, Ito K, Ito Y, Sugimoto Y, Ushikubi F, Ohuchida S, Kondo K, Nakamura T, Narumiya S. Stimulation of bone formation and prevention of bone loss by prostaglandin E EP4 receptor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.99, n.7, p.4580-4585. 2002.

Young JC, Young RE. The effect of creatine supplementation on glucose uptake in rat skeletal muscle. *Life Sci*, v.71, n.15, p.1731-1737. 2002.

Young RE, Young JC. The effect of creatine supplementation on mass and performance of rat skeletal muscle. *Life Sci*, v.81, n.9, p.710-716. 2007.

Xie L, Rubin C, Judex S. Enhancement of the adolescent murine musculoskeletal system using low-level mechanical vibrations. *J Appl Physiol*, v.104, p.1056–1062. 2008.

Zaman G, Jessop HL, Muzylak M, de Souza RL, Pitsillides AA, Price JS, Lanyon LL. Osteocytes use estrogen receptor alpha to respond to strain but their ERalpha content is regulated by estrogen. *J Bone Miner Res*, v.21, n.8, p.1297-1306. 2006.

Zarrow MX, Brown-Grant K. Inhibition of Ovulation in the Gonadotrophin- Treated Immature Rat by Chlorpromazine. *J Endocrinol*, v.30, p.87-95. 1964.

Zernicke RF, Wohl GR, LaMothe JM. The skeletal-articular system. In: *ACSM's Advanced Exercise Physiology*. 2012 2<sup>nd</sup> ed: 97-115.

Zerwekh JE, Ruml LA, Gottschalk F, Pak CY. The effects of twelve weeks of bed rest on bone histology, biochemical markers of bone turnover, and calcium homeostasis in eleven normal subjects. *J Bone Miner Res*. v.13, n.10, p.1594-1601. 1998.