



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



**Roberta Carminati Shimano**

**Efeitos do exercício de alto impacto nas propriedades físicas de ossos de  
ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperproteica**

Ribeirão Preto/SP

2017

**ROBERTA CARMINATI SHIMANO**

**Efeitos do exercício de alto impacto nas propriedades físicas de ossos de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperproteica**

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

Orientador: Prof. Dr. João Paulo Mardegan Issa

Co-orientador: Prof. Dr. João Manuel R. S. Tavares

Ribeirão Preto/SP

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo na Publicação  
Serviço de Documentação  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Shimano, Roberta Carminati

Efeito do exercício de alto impacto nas propriedades físicas de ossos de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperproteica. Ribeirão Preto, 2017.

88f. Il. ; 30cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

Orientador: Issa, Mardegan João Paulo; Co-orientador: Tavares, João Manuel R. S.

Palavras- Chave: Doença ósseo metabólica, Ovariectomia, Salto e Nutrição

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: SHIMANO, Roberta Carminati

Título: Efeito do exercício de alto impacto nas propriedades físicas de ossos de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperproteica.

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

Aprovado em:

### Banca Examinadora

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

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

*Dedico este trabalho às minhas mães,  
Maria Aparecida e Maria Teresa por todo  
apoio e amor.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** em primeiro lugar, que sempre esteve ao meu lado, iluminando minhas decisões, dando-me forças para continuar acreditando que este dia chegaria.

À minha mãe, **Maria Aparecida**, e minha madrinha “mãe”, **Maria Teresa**, pelo amor incondicional, exemplo de força, com as palavras e gestos que me deram segurança para seguir o caminho que escolhi.

À minha irmã **Renata**, o grande apoio na minha vida, aos sorrisos que me alegram, conselhos, amor, carinho e amizade incomparável.

Ao meu querido namorado, **Bill Rocha**, pela compreensão, amizade, companheirismo e paciência, oferecendo a mim sua tranquilidade e seu amor, e sonhando junto comigo os planos do futuro.

Ao meu Professor, **Dr. João Paulo Mardegan Issa**, meu orientador, exemplo de ética, competência e serenidade, pela confiança e pelo seu empenho em ajudar.

Ao professor, **Dr. Antônio Carlos Shimano**, pela oportunidade, confiança e pela constante disponibilidade em me ajudar.

Ao professor, **Dr. João Manuel Tavares**, pela oportunidade do doutorado sanduíche, atenção e ensinamentos.

Ao professor, **Dr. José Batista Volpon**, pelo exemplo de dedicação e profissionalismo, por disponibilizar o acesso ao laboratório e os recursos indispensáveis à realização do experimento.

Ao professor, **Dr. Alceu Afonso Jordão Junior**, pelo conhecimento compartilhado viabilizando o desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de

Ribeirão Preto, *Francisco Mozzocato, Maria Teresinha, Ariane Zamarioli e Luís Henrique*, pelo auxílio e convívio agradável.

Ao professor *Dr. Marcelo Riberto* e secretária da pós-graduação *Rita de Cássia Stela Cossalter* por toda atenção, paciência e cordialidade.

Às amigas que ganhei na pós-graduação, *Gabriela Yanagihara e Ana Paula Macedo* pela imensa ajuda, apoio, conselhos e todo conhecimento dispensado, vocês são meus exemplos de generosidade e competência.

À *Mariana Butezloff e Brígida Brancaleon* pela amizade, ajuda, conselhos e todo incentivo nos momentos difíceis.

As colegas *Jéssica Suzuki Yamanaka e Jacqueline Atsuko Tida* pelo companheirismo e colaboração para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas da Pós graduação, *Bruno Cimatti, Bruna Leonel, Bruna Leonel Carlos, Fellipe Figueiredo, Álvaro César de Oliveira Penoni, Aline Azevedo e Ana Paula Frantini*, pela amizade e agradável convivência durante o curso.

À técnica *Junia Ramos* pela generosidade e amizade.

À técnica *Viviane de Cássia Oliveira* por todo carinho, solicitude e atenção.

À *Dra. Bruna Gabriela Kotake de Oliveira* pela colaboração na análise imunoistoquímica.

Aos funcionários e colegas do laboratório de Odontologia, sempre atenciosos.

À *CAPES* pelo apoio financeiro.

## RESUMO

SHIMANO, R. C. **Efeitos do exercício de alto impacto nas propriedades físicas de ossos de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperprotéica**, 2017. 88p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Uma nutrição adequada é de extrema importância na manutenção óssea, especialmente nas mulheres após a menopausa, nas quais a incidência de doenças osteometabólicas é maior. Em grande maioria, apenas uma nutrição apropriada não é capaz de suprir os efeitos deletérios causados no tecido ósseo pelo déficit hormonal. Os exercícios físicos são altamente indicados como prevenção e tratamento por gerarem estímulos necessários aos ossos com mínimos efeitos colaterais. Sendo assim, o objetivo foi avaliar os efeitos do exercício físico de alto impacto como meio profilático e terapêutico em ossos osteopênicos de ratas submetidas à ovariectomia (OVX) e dieta hiperprotéica (DH). Foram utilizados 64 ratas Wistar, totalizando oito grupos (n=8), tratadas por 12 semanas: os ratos submetidos a OVX foram divididos nos seguintes subgrupos: OVX, sedentárias e dieta padrão (DP); OVXE, treinadas e DP; OVXP, sedentárias e DH; OVXEP, treinadas e DH; e os ratos submetidos a cirurgia simulada (SHAM): SH, sedentário e DP; SHE, treinados e DP; SHP, sedentárias e DH; SHEP, treinadas e DH. Foram realizadas no sangue as análises de imunoabsorção enzimática (RANKL e OPG), no fígado a glutatona reduzida (GSH), malondialdeído (MDA) e vitamina E, e no tecido ósseo densitometria, ensaio mecânico, histologia e imunoistoquímica (Osteocalcina e Osteopontina). Os dados foram analisados por teste estatístico em modelo linear generalizado ( $p < 0,05$ ) e teste complementar de Bonferroni. Os níveis de OPG não apresentaram diferenças estatísticas, já RANKL os grupos SHAMs apresentaram concentrações mais elevadas em relação aos grupos ovariectomizados ( $p = 0,003$ ). No fígado, a GSH não apresentou diferenças estatísticas. Nos níveis de MDA, a DH ( $p = 0,001$ ) e o exercício ( $p = 0,016$ ) foram menores que os controles e para vitamina E, DH maior que DP, OVXs menores que SHAMs ( $p = 0,001$ ). Na densitometria, DH com maiores resultados que DP ( $p = 0,049$ ), e OVXs menores que SHAMs ( $p < 0,001$ ). No ensaio mecânico, somente a força máxima apresentou diferenças estatísticas, a DH ( $p = 0,026$ ) foi menor que a DP, e os grupos treinados ( $p < 0,001$ ) maiores que os grupos sedentários. No trabeculado ósseo, OVXs apresentaram valores menores que SHAMs ( $p = 0,001$ ), na variável cirurgia a DH foi menor que a DP ( $p = 0,023$ ). Na imunoistoquímica, a osteocalcina na variável cirurgia ( $p = 0,004$ ) OVXs com maiores valores que os grupos SHAMs e nos de níveis de osteopontina, na variável dieta os grupos DP menores que DH ( $p = 0,005$ ), e na variável exercício os treinados menores que sedentários ( $p = 0,017$ ), na variável cirurgia os OVXs maiores que SHAMs ( $p = 0,010$ ). Neste modelo experimental, concluímos que a ovariectomia parece interferir negativamente o tecido ósseo, e a dieta hiperproteica capaz de prejudicar a microarquitetura óssea e resistência mecânica, apesar de promover aumento na DMO. O exercício físico de alto impacto, apesar de isoladamente melhorar as propriedades biomecânicas, não foi capaz de suprir os efeitos deletérios causados pela dieta hiperproteica e ovariectomia.

**Palavras – Chave:** Doença óssea metabólica, Ovariectomia, Salto e Nutrição

## ABSTRACT

SHIMANO, R. C. **Effects of high impact exercise on the physical properties of bones of ovariectomized rats submitted to protein diet.** 2017. 88p Thesis (Doctoral) – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Proper nutrition is very important in maintaining bone, especially in women after menopause, in which the incidence of bone metabolic diseases is higher. In most, only proper nutrition is not able to supply the deleterious effects on bone tissue by hormonal deficit. Physical exercises are highly indicated as prevention and treatment because they generate necessary stimuli to bones with minimal side effects. Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of high-impact physical exercise as a prophylactic and therapeutic means in osteopenic bones of rats submitted to ovariectomy and protein diet intake. We studied 64 Wistar rats divided into ovariectomized or subjected to sham surgery, during 12 weeks. The ovariectomized rats were divided into the following sub-groups: OVX, sedentary; OVXE, jump; OVXP, protein diet; and OVXEP, jump and protein diet. The rats subjected to sham surgery were divided into the following sub-groups: SH, sedentary; SHE, jump; SHP, protein diet; and SHEP, jump and protein diet. The blood was evaluated by enzymatic immunoabsorption (RANKL and OPG), in the liver by reduced glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA) and vitamin E, the bone structure was evaluated by densitometry, mechanical tests, histomorphometric and immunohistochemical (Osteocalcin and Osteopontin) analyses. Data were analyzed by statistical test in generalized linear model ( $p < 0.05$ ) and Bonferroni complementary test. OPG levels did not present statistical differences, already RANKL the SHAM groups had higher concentrations in relation to the ovariectomized groups ( $p=0.003$ ). In the liver, GSH showed no statistical differences. At the MDA levels, DH ( $p=0.001$ ) and exercise ( $p=0.016$ ) were lower than controls and for vitamin E, DH higher than DP, OVXs lower than SHAMs ( $p=0.001$ ). In densitometry, DH with greater results than DP ( $p=0.049$ ), and OVXs smaller than SHAMs ( $p<0.001$ ). In the mechanical test, just the maximum strength presented statistical differences, the DH ( $p=0.026$ ) was lower than the DP, and the trained groups ( $p<0.001$ ) larger than the sedentary groups. In the trabecular bone, OVXs showed lower values than SHAMs ( $p=0.001$ ), in the surgery variable the DH was lower than DP ( $p=0.023$ ). In the immunohistochemistry, the osteocalcina, in the surgery variable ( $p=0.004$ ) OVXs with higher values than the SHAMs and osteopontina levels, in the diet variable the DP less than DH ( $p=0.005$ ), in the exercise variable the trained less than sedentary ( $p=0.017$ ) and in the surgery variable, the OVXs greater than SHAMs ( $p=0.010$ ). In this experimental model, we conclude that ovariectomy seems to interfere negatively the bone tissue, and the high protein diet capable of impairing bone microarchitecture and mechanical resistance, despite promoting increase in BMD. The high-impact physical exercise improved the biomechanical properties; nevertheless it was not enough to supply the deleterious effects caused by the protein diet and ovariectomy.

**Keywords:** Bone Diseases, Metabolic, Ovariectomy, Jump and Nutrition

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Etapas cirurgias do procedimento de retirada dos ovários (ovariectomia).....	36
<b>Figura 2.</b>	Caixa de madeira confeccionada para o salto dos animais.....	37
<b>Figura 3.</b>	Esquema representativo do treinamento salto.....	37
<b>Figura 4.</b>	Imagens dos fêmures no densitômetro.....	40
<b>Figura 5.</b>	Processo de inclusão e ensaio mecânico do fêmur.....	41
<b>Figura 6.</b>	(A) Fotomicrografia da região proximal do fêmur (B) Área de osso trabecular selecionada em verde a partir da demarcação dos tons de azul, excluindo o disco epifisário.....	42
<b>Figura 7.</b>	Fotomicrografia evidenciando o padrão de imunomarcção de Osteocalcina (A) e Osteopontina (B).....	44
<b>Figura 8.</b>	Gráfico do ganho de peso (g) semanal dos grupos experimentais.....	47
<b>Figura 9.</b>	Gráfico da concentração de FSH (ng.mL).....	48
<b>Figura 10.</b>	Gráfico da concentração sérica de OPG (ng.mL).....	48
<b>Figura 11.</b>	Gráfico da concentração sérica de RANKL (ng.mL).....	49
<b>Figura 12.</b>	Gráfico da concentração de MDA ( $\mu\text{mol/g}$ ).....	50
<b>Figura 13.</b>	Gráfico da concentração de GSH ( $\mu\text{mol/g}$ ).....	50
<b>Figura 14.</b>	Gráfico da concentração de Vitamina E ( $\mu\text{mol/g}$ ).....	51
<b>Figura 15.</b>	Gráfico da DMO ( $\text{g/cm}^2$ ) na região proximal do fêmur.....	52
<b>Figura 16.</b>	Gráfico da Rigidez Relativa (N) no ensaio de flexo-compressão da cabeça do fêmur.....	52
<b>Figura 17.</b>	Gráfico do resultado de Força Máxima (N/mm) no ensaio de flexo-compressão da cabeça do fêmur.....	53
<b>Figura 18.</b>	Fotomicrografias do osso trabecular na região proximal das fêmures.	54
<b>Figura 19.</b>	Gráfico do percentual de osso trabecular (%), obtido por meio da razão da área de osso pela área total avaliada em $\text{mm}^2$ .....	55
<b>Figura 20.</b>	Gráfico da análise de imunistoquímica para osteocalcina.....	56
<b>Figura 21.</b>	Gráfico da análise de imunistoquímica para osteocalcina.....	56

## LISTA DE TABELA

<b>Tabela 1.</b>	Composição das Rações de manutenção e Ração 40% proteína.....	<b>35</b>
<b>Tabela 2.</b>	Parâmetros e resultados estatísticos das principais análises realizadas	<b>57</b>

## LISTA DE QUADRO

<b>Quadro 1.</b> Grupos experimentais.....	<b>34</b>
--	-----------

## LISTA DE ABREVIACÕES

B.Ar: rea de osso

BV/TV: Fração de Volume sseo

DMO: Densidade Mineral ssea

DP = Desvio Padrão

DXA: Absorptiometria de Raios-x de Dupla Energia

EDTA: cido atilenodiaminotetractico

ELISA: Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

EUA: Estados Unidos da América

FMRP: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

FORP: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

FSH: Hormônio Folículo Estimulante

GSH: Glutathiona Reduzida

IGF-1: Fator de Crescimento Semelhante  Insulina tipo 1

MDA: Malondialdeído

OC: Osteocalcina

OMS: Organização Mundial de Saúde

OPG: Osteoprotegerina

OPN: Osteopontina

OVX: Ovariectomia

Pi: Fosforo

PBS: Solução de tampão de fosfato salina

RANKL: Receptor ativador de fator nuclear ligante

ROI: Região de Interesse

SHAM: Cirurgia Simulada

TMP: Tetrametoxipropano

TNFSF11: Membro 11 da Superfamília de Ligantes de Fatores de Necrose Tumoral

Tt.Ar: rea total

USP: Universidade de São Paulo

## LISTA DE UNIDADES

°C: Graus Celsius

cm: centímetro

cm<sup>2</sup>: centímetro ao quadrado

g: grama

g/kg: grama por quilograma

Kg: quilograma

Kgf: quilograma força

mg/dL: miligrama por decilitro

mg/kg: miligrama por quilograma

mL: mililitro

mm: milímetro

mm/min: milímetro por minuto

N: Newton

N/mm: Newton por milímetro

ng/mL: nano grama por mililitro

nmol/g: nano mol por grama

°: Grau

mm: micrometro

## LISTA DE SÍMBOLOS

%: por cento

±: Mais ou menos

≤: menor ou igual

=: igual

↑: aumento

<: menor

↓: diminuição

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
1.1 Tecido ósseo.....	20
1.2 Osteoporose.....	21
1.3 Exercício Físico.....	22
1.4 Dieta Hiperprotéica.....	23
<b>2. OBJETIVO.....</b>	<b>27</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
3.1 Grupos experimentais.....	33
3.2 Dietas.....	34
3.3 Técnica cirúrgica.....	35
3.4 Treinamento Físico.....	36
3.5 Controle da massa corporal semanal.....	37
3.6 Eutanásia, coleta e prepara dos animais para análises.....	38
3.7 Análise Do Hormônio Folículo Estimulante.....	38
3.8 Análise Bioquímica do Sangue.....	39
3.9 Análise do Tecido Hepático.....	39
3.10 Densitometria.....	39
3.11 Ensaio mecânico.....	40
3.12 Análise histológica.....	41
3.13 Quantificação do osso trabecular.....	42
3.14 Análise Imunoistoquímica.....	42
3.15 Quantificação dos imunomarcadores.....	43
3.16 Análise Estatística.....	44
<b>4. RESULTADO.....</b>	<b>45</b>
4.1 Ganho de peso dos animais.....	47
4.2 Dosagem de Hormônio Folículo-Estimulante (FSH).....	47
4.3 Análise bioquímica.....	48

4.3.1 OPG.....	48
4.3.2 RANKL.....	49
4.4 Análise do Tecido Hepático.....	49
4.4.1 Malonaldeído (MDA).....	49
4.4.2 Glutathiona Reduzida (GSH).....	50
4.4.3 Vitamina E.....	50
4.5 Densitometria óssea.....	51
4.6 Ensaio Mecânico.....	52
4.6.1 Rigidez Relativa.....	52
4.6.2 Força máxima.....	53
4.7 Histologia do osso trabecular da região proximal do fêmur.....	53
4.8 Imunoistoquímica.....	55
4.8.1 Osteocalcina.....	55
4.8.2 Osteopontina.....	56
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>59</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>67</b>
<b>7. REFERENCIAS.....</b>	<b>71</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>85</b>

# *Introdução*



## 1. INTRODUÇÃO

O consumo de dietas com alto teor de proteína está ganhando popularidade. Essas dietas vêm sendo recomendadas como estratégias para perda e controle de peso, ganho de massa magra e recuperação pós-exercício (LACROIX et al., 2004; PICHON, 2008), porém, há uma enorme controvérsia sobre as consequências geradas por esta alta ingestão de proteínas. Uma nutrição equilibrada é fundamental para manutenção da saúde geral, em especial, na mulher pós-menopausa, pois um desequilíbrio alimentar constitui-se como um fator de risco para o desenvolvimento de doenças prevalentes nessa fase da vida (MONTILLA et al., 2004, MACEDO et al., 2016). Na menopausa, a densidade mineral óssea (DMO) sofre declínios rápidos decorrentes da deficiência de estrógeno, levando as mulheres a um maior risco de desenvolver osteoporose. Sendo assim, além da alimentação balanceada, com o intuito de tratamento e prevenção, o exercício físico é explorado pelo seu baixo custo e ausência de efeitos colaterais comparados aos tratamentos medicamentosos (SHIMANO et al., 2014).

Por muitos anos, a alta ingestão de proteínas estava associada a um aumento da excreção urinária de cálcio, resultando na diminuição da massa óssea (DAWSON-HUGHES, 2003; MORAIS; BURGOS, 2007;). Porém, com o avanço da pesquisa, já foi possível encontrar uma relação positiva das dietas ricas em proteínas com o tecido ósseo, especialmente, quando associadas ao exercício físico (CHEVALLEY et al., 2014).

Diversos tratamentos são testados e idealizados para prevenção de doenças osteometabólicas, entre eles está a prática regular de exercícios físicos, nos quais os benefícios no tecido ósseo já são evidentes (BONNET et al., 2007). O exercício de alto impacto, em especial o salto, vem se destacando entre os demais, já que geram uma alta tensão com uma maior taxa de deformação (NIKANDER et al., 2010).

Apesar de alguns estudos associarem à dieta hiperproteica com exercício físico (TAKEDA et al., 2012; ABIZANDA et al., 2015), não há relatos da associação em modelos experimentais com déficit de estrógeno. Sendo assim, fica clara a necessidade de estudos adicionais relacionando a prática de exercícios físicos com dietas hiperproteicas na menopausa.

## 1.1 Tecido ósseo

O tecido ósseo é complexo, organizado e composto de vários tipos celulares e uma matriz acelular (osteóide) rica em colágeno e outras proteínas, sendo o único tecido conjuntivo que possui um processo regulado e organizado de mineralização (MANOLAGAS, 2000). São inúmeras as funções do tecido ósseo: oferecer estabilidade ao organismo, abrigar a medula óssea, proteger os órgãos vitais, sustentar e deslocar o corpo e propiciar sistemas de alavancas musculares (GUYTON, 2006; PORTINHO et al., 2008; DUTRA et al., 2012).

Macroscopicamente, o tecido ósseo consiste em dois tipos: trabecular (esponjoso) e cortical (compacto). O osso trabecular consiste em 20% do esqueleto e localiza-se na extremidade dos ossos longos e no interior dos ossos irregulares e planos. As trabéculas de tecido ósseo mineralizado se interconectam formando uma rede resistente às cargas mecânicas, e de maneira contínua são remodeladas nas superfícies endosteais e os espaços vazios entre estas são preenchidos pela medula óssea (KALFAS, 2001). Já o osso cortical está localizado na superfície externa dos ossos, formado por fibras de colágeno e minerais. Suas trabéculas têm orientação comum, colocando-se justapostas umas às outras de modo a formar uma estrutura densa (OTT, 1990).

As principais células do tecido ósseo são responsáveis por diversas funções metabólicas do osso (ERIKSEN, 2010), em especial o remodelamento ósseo. O processo de remodelação óssea é contínuo e consiste na remoção do osso antigo e a substituição por uma matriz óssea recém-formada (osteóide) que então passa por mineralização para formar osso novo, mantendo assim a integridade estrutural e a homeostasia mineral.

As principais células envolvidas na remodelação óssea são: os osteoblastos responsáveis pela formação óssea (KARSENTY; KRONENBERG; SETTEMBRE, 2009) e osteoclastos responsáveis pela reabsorção óssea (TEITELBAUM, 2007). A função dessas células é fortemente acoplada e dependente, realizando reabsorção de osso antigo e formação de osso novo sequencialmente. As células adicionais envolvidas na remodelação óssea são os osteócitos, localizados na matriz óssea e responsáveis pela manutenção de sua integridade (BONEWALD; JOHNSON, 2008) e a célula do revestimento ósseo responsável pela proteção das superfícies ósseas (ANDERSEN et al., 2009).

Por ser um tecido metabolicamente ativo, o tecido ósseo é facilmente sensibilizado por mudanças nutricionais, metabólicas e hormonais, o que pode gerar um desequilíbrio desses dois processos ocasionando doenças minerais ósseas, como a osteoporose.

## 1.2 Osteoporose

A osteopenia é caracterizada por uma diminuição da massa óssea e deterioração óssea devido à alteração do remodelamento (NORDIN, 1983), podendo ter como consequência a osteoporose (VAGAS et al., 2003; RENA, 2005).

A osteoporose é considerada como um dos problemas de saúde mais comuns, com prevalência progressiva tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (MAALOUF et al., 2007). A definição de osteoporose com base nos critérios da Organização Mundial da Saúde consiste na diminuição da densidade mineral óssea (DMO) de 2,5 desvios-padrão abaixo da DMO máxima média de adultos jovens, quando medida por absorção de raio-x de energia dupla (DXA), tendo como consequência um aumento da fragilidade óssea e susceptibilidade a fraturas (SHAW; WITZKE, 1998). A osteoporose tem etiologia multifatorial, podendo ser influenciada pelo gênero, biótipo, etnia, ingestão de cafeína e tabagismo, etilismo, sedentarismo e imobilização prolongada, menopausa, baixa ingestão de cálcio, ingestão exagerada de proteína e fosfato entre outros (ROBBINS et al., 2001).

Com o aumento da expectativa de vida e conseqüentemente da proporção de mulheres idosas, grande enfoque é dado à menopausa como indutora de alterações fisiológicas. A osteoporose em mulheres acima de quarenta anos pode ser decorrente da privação hormonal pós-menopausa, juntamente com a diminuição da atividade física praticada nessa faixa etária (MACEDO et al., 2016). Na pós-menopausa, a densidade mineral óssea sofre declínios rápidos decorrentes da deficiência de estrogênio, levando as mulheres a um maior risco de desenvolverem osteoporose em relação aos homens (HART et al., 2001). O estrogênio possui funções de extrema importância; nos osteoblastos ocorre o controle da expressão que codifica o colágeno tipo I, a fosfatase alcalina, a osteopontina, osteocalcina e a osteonectina (OKAZAKI et al., 2002), aumenta a diferenciação dos osteoblastos e estimula a síntese e a mineralização da matriz óssea (BLAND, 2000), além de estimular a apoptose dos osteoclastos e manter os osteócitos viáveis (D'AMELIO et al., 2008).

Além de altos custos financeiros (BRAVO et al., 1997), a osteoporose também diminui a qualidade de vida (DARGENT-MOLINA, 1998), com isso, é importante que, com o avanço da ciência e o entendimento da osteoporose, cada vez mais, ela seja diagnosticada e tratada precocemente.

### 1.3 Exercício Físico

Inúmeros tratamentos são idealizados a fim de propiciar uma prevenção e um tratamento adequado para a osteopenia e a osteoporose. Entre estes métodos, o exercício físico tem se destacado por proporcionar estímulos adequados para melhorar a saúde óssea, além de aumentar a expressão de fatores de crescimento, diminuir os efeitos de fatores inflamatórios e induzir a perda de peso (IWAMOTO et al., 2004; ROBLING et al., 2006).

O exercício físico regular, no geral, acarreta uma variedade de benefícios para saúde; entretanto, nem todas as modalidades são igualmente osteogênicas. O preceito é de que o treinamento aeróbico prolongado, como natação, ciclismo e caminhada, é onipresente para os sistemas do corpo, contudo, sem evidências empíricas, sugerindo que essas atividades não fornecem um estímulo notável para o osso (MARTYN-ST JAMES; CARROLL, 2008; PALIOLOGO et al., 2015).

A tensão mecânica imposta pelo exercício é um estímulo para a formação óssea e possui função importante para diminuir a perda óssea em mulheres pós-menopausa (BARENGOLTS et al., 1994) e em ratas ovariectomizadas (OKUBO et al., 2017). Martin (2007), afirma que a remodelação óssea é determinada pela forma com que é requisitada, sendo assim, os ossos que sofrem maiores deformações, impacto ou compressão teriam melhor adaptação, adquirindo maior massa óssea. Estudos anteriores indicaram que o exercício mais osteogênico são os com cargas de alta magnitude, dinâmicas e multidirecionais (CHENG et al., 2002; NIKANDER et al., 2005).

A prática de exercícios como correr, escalar e saltar gera sobre o corpo a ação da energia do impacto, além do peso corporal, retratando-se como um grande aliado na remodelação óssea. Estudos com treinamento físico em esteira apresentaram resultados positivos na melhora da qualidade óssea em ratas ovariectomizadas (MACEDO et al., 2014, SHIMANO et al., 2014). Com oito semanas de treinamento de escalada, autores concluíram a eficácia na prevenção da perda óssea e deterioração da microarquitetura óssea, mas não encontraram um efeito significativo sobre a força óssea cortical em ratos obesos (TANG et al., 2016). Já o exercício de alto impacto demonstrou ser capaz de sensibilizar o tecido ósseo na puberdade, pré-menopausa e pós-menopausa (XU et al., 2016).

Os exercícios com salto, em especial, vêm apresentando resultados satisfatórios para o tecido ósseo, porém muito se discute sobre um protocolo ideal. A duração, intensidade e frequência dos exercícios são diretrizes essenciais para uma resposta positiva do tecido ósseo (NAVEGA et al., 2003).

Ju e colaboradores (2013), em seus estudos experimentais com o método de

suspensão da cauda para gerar o quadro osteopênico, concluíram que o exercício de alto impacto (30 saltos diários) inibiu a perda óssea, aumentando a espessura e o número de trabéculas. Em outro estudo, autores avaliaram os efeitos do treinamento salto, com 20 saltos diários, na estrutura óssea antes e após a osteopenia induzida pela ovariectomia, foi observado um aumento da DMO e propriedades mecânicas, mostrando que o exercício de alto impacto é eficaz tanto na prevenção quanto no tratamento da osteopenia (OKUBO et al., 2017). Também com efeitos positivos, Honda et al., (2003) afirmam que 10 saltos diários em ratos osteopênicos de meia idade possuem efeitos benéficos na massa óssea.

Clinicamente, pesquisadores afirmaram que o exercício de intensidade moderada e de tempo não muito prolongado para mulheres pós-menopausa apresentam maiores benefícios em relação aos exercícios de longa duração como a maratona, que podem levar a uma redução da densidade mineral óssea (HAGIHARA et al., 2005). Exercícios de *endurance* de alto rendimento podem induzir uma perda óssea prematura, explicada pelos efeitos na homeostase dos hormônios sexuais, gerando uma alteração no ciclo menstrual. A tríade da atleta, uma síndrome que consiste em distúrbios alimentares, amenorreia e osteoporose, com todos inter-relacionados, é um exemplo. Essa tríade não ocorre apenas em atletas, mas também em mulheres ativas praticantes de diversas modalidades esportivas (YEAGER et al., 1993).

Apesar das mudanças que o exercício gera no metabolismo ósseo não serem totalmente elucidadas, é de consenso que o estresse mecânico induzido pelo salto é eficaz para melhoras estruturais e funcionais do sistema esquelético, sendo assim adequado para estudar problemas relevantes como a perda óssea na menopausa.

#### **1.4 Dieta Hiperproteica**

Além dos exercícios, outra variável muito influente no tecido ósseo, é a alimentação. Os nutrientes são de grande importância durante as diversas fases da vida e sua ingestão adequada é fundamental para manutenção da saúde geral, especialmente da massa óssea, e consequente prevenção de fraturas (NEW et al., 2000; CAMPOS et al., 2003; MORAIS; BURGOS, 2007). Em especial, na mulher pós-menopausa, o consumo inadequado constitui-se como um fator de risco para o desenvolvimento de doenças prevalentes nessa fase da vida (MONTILLA et al., 2004). Com isso, a ingestão adequada de cálcio, fósforo, vitamina D, proteínas e valor energético total da dieta desempenham funções importantes (CAMPOS et al., 2003; MONTILLA et al., 2004; MORAIS; BURGOS, 2007).

O aumento da ingestão proteica é uma das abordagens mais comuns para manejo dietético da obesidade. As dietas ricas em proteínas parecem reduzir a ingestão energética, o ganho de peso corporal e a deposição de gordura (CRIBB et al., 2007; PICHON et al., 2008; HAYES; CRIBB, 2008). A perda de peso, especialmente por meio de restrição de energia, tem sido alvo de estudiosos por sugerirem perda óssea (PRITCHARD et al., 1996; REID, 2002).

A ingestão de proteína pode ser expressa em porcentagem da ingestão total de energia ou em relação ao peso corporal (gramas por quilograma de peso corporal por dia). A porcentagem de energia total pode ser usada para comparar a ingestão de proteína com ingestão de gordura e carboidratos, que geralmente são apresentadas como porcentagem de energia total. Uma vez que a necessidade de proteína está intimamente relacionada ao corpo/massa magra, a ingestão de proteína é descrita com mais frequência como gramas por quilograma de peso corporal por dia.

A referência proteica ingerida por indivíduos é variável. Para a população em geral é de 0,8 g/kg diários (OTTEN; MEYERS, 2006), e nos indivíduos com treinamento físico regular essa quantidade é maior, aproximadamente 1-7 g/kg diários (CAMPBELL et al., 2007; RODRIGUES et al., 2009).

As dietas com alta proteína foram testadas por vários grupos de pesquisas, especialmente examinando a sua influência no tecido ósseo, contudo produzindo respostas conflitantes. Autores afirmam que o efeito acidogênico da dieta rica em proteínas pode resultar em reabsorção óssea (WEISS et al., 1981), porém esse efeito pode ser modificado por alguns nutrientes (MASSEY, 2003). Estudos em ratos saudáveis relataram um efeito deletério no tecido ósseo (WEISS et al., 1981; TALBOTT et al., 2001), todavia há estudos também com roedores que afirmam não existir nenhum relacionamento da dieta rica em proteínas e o tecido ósseo (LACROIX et al., 2004; MARDON et al., 2008).

Segundo alguns autores, a ingestão de proteína pode exercer tanto efeito positivo quanto negativo no balanço do cálcio, gerando efeitos sobre a massa óssea e risco de fraturas dependentes da ingestão concomitante de cálcio (CAMPOS et al., 2003; MONTILLA et al., 2004; RAJESHWARI et al., 2004; MORAIS; BURGOS, 2007). Um excesso de ingestão proteica acarreta a elevação da excreção urinária de cálcio (CAO; NIELSEN, 2010). Apesar de um consenso de que a hipercalciúria induzida por proteínas é justificada em parte pelo aumento da taxa de filtrado glomerular e diminuição da reabsorção de cálcio renal, há estudos sugerindo que uma grande ingestão proteica está associada a um aumento significativo da absorção intestinal, de modo que o cálcio urinário pode ser explicado pela absorção de cálcio melhorada e que, em curto prazo, não há aumento no catabolismo esquelético (HUNT et al.,

2009).

A ação da dieta proteica sobre a massa óssea é também influenciada por fatores de crescimento, mais especificamente o hormônio de crescimento, via ação do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1). O aumento do nível circulante de IGF-1 pode ser observado em resposta ao aumento de proteínas ingeridas, na ausência de fornecimento de energia alimentar.

A ingestão proteica aumenta o nível sanguíneo de IGF-1, o que constitui um importante determinante do crescimento ósseo e aquisição mineral (YAKAR et al., 2002). O IGF-1 também pode melhorar a musculatura, aumentando a força óssea. No tecido ósseo, alguns aminoácidos como a arginina pode desempenhar um efeito estimulador na produção local de IGF-1 por células osteoblásticas, aumentando assim a proliferação de células osteoblásticas e a síntese de colágeno (CHEVALLEY et al., 1998). Ademais, as elevações na ingestão de proteínas estimulam a taxa de filtração glomerular e, por isso, aumentam a capacidade de excreção de ácido líquido renal (REMER; MANZ, 1995; JEHLE et al., 2000). Desse modo, o consumo elevado de proteínas pode impactar positivo na mineração óssea por uma ação renal dupla. O IGF-1 aumenta a produção de calcitriol, a forma ativa de vitamina D, que por sua vez, estimula a absorção intestinal de cálcio e fosfato inorgânico. Uma outra forma, o IGF-1 a nível renal, é aumentar a reabsorção tubular de fosfato (Pi). Com a dupla ação do IGF-1, a concentração de cálcio e Pi aumentam, influenciando positivamente a mineralização óssea (KERSTETTER et al., 2003).

Outro fator importante da relação tecido ósseo e excesso de ingestão proteica é a idade. Estudos apresentam uma relação positiva em crianças (HOPPE et al., 2000), adolescentes (RIZZOLI, 1998) e mulheres jovens com idade entre 18 e 31 anos (TEEGARDEN et al., 1998). Nas mulheres com idade avançada, há uma preocupação maior, já que o tecido ósseo sofre alterações hormonais, principalmente com o déficit de estrógeno.

Estudos com mulheres na pré-menopausa (KERSTETTER et al., 2005) e na pós-menopausa (CAO; JOHNSON; HUNT, 2011) mostram que a diferença correspondente no estado hormonal dos indivíduos não deve influenciar de forma relevante a possível influência da proteína na absorção intestinal de cálcio, todavia Nascimento da Silva e colaboradores (2014) afirmam que a dieta proteica promove mudanças significativas no fêmur e na concentração de hormônios relacionados à formação e manutenção desse tecido. Estes resultados podem sugerir que mulheres adultas, em especial aquelas na pré-menopausa e menopausa, devem se atentar à falta de equilíbrio alimentar.



*Objetivo*



## **2. OBJETIVO**

Avaliar os efeitos do exercício físico de alto impacto (Salto) como meio profilático e terapêutico em ossos osteopênicos de ratas submetidas à ovariectomia e dieta hiperproteica.



# *Materiais e Métodos*



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi elaborado de acordo com o "*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*" (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1996) e foi aprovado pela Comissão de Ética em pesquisa com animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP – USP), protocolo nº 001/2014-1 (Anexo A).

Foram utilizadas 64 fêmeas de *Rattus norvegicus albinus*, variedade *Wistar*, com massa corporal entre 180 g e 200 g de 8 semanas. Os animais foram fornecidos pelo Serviço de Biotério da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da USP e alojados no Biotério do Laboratório de Bioengenharia da FMRP/USP. O ambiente foi controlado com temperatura de  $22^{\circ}\text{C} \pm 2$ , umidade de  $55\% \pm 10$  e controle de luminosidade 12 horas claro e 12 horas escuro. Não houve restrição de ração e água.

#### 3.1 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em oito grupos experimentais (n=8). As caudas foram identificadas individualmente com marcador permanente por algarismos romanos.

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

- Grupo OVX: ratas submetidas a procedimento cirúrgico de ovariectomia, sedentárias e alimentadas com ração padrão após a cirurgia.
- Grupo OVXE: ratas submetidas a procedimento cirúrgico de ovariectomia, treinamento físico com salto e alimentadas com ração hiperproteica após a cirurgia.
- Grupo OVXP: ratas submetidas a procedimento cirúrgico de ovariectomia, sedentárias e alimentadas com ração hiperproteica após a cirurgia.
- Grupo OVXEP: ratas submetidas a procedimento cirúrgico de ovariectomia, treinamento físico com salto e alimentadas com ração hiperproteica após a cirurgia.
- Grupo SH: ratas submetidas a procedimento cirúrgico “sham”, sedentárias e alimentadas com ração padrão após a cirurgia.

- Grupo SHE: ratas submetidas a procedimento cirúrgico “sham”, treinamento físico com saltos e alimentadas com ração padrão após a cirurgia.
- Grupo SHP: ratas submetidas a procedimento cirúrgico “sham”, sedentárias e alimentadas com ração hiperproteica após a cirurgia.
- Grupo SHEP: ratas submetidas a procedimento cirúrgico “sham”, treinamento físico com salto e alimentadas com ração hiperproteica após a cirurgia.

**Quadro 1.** Grupos experimentais

Grupos	Cirurgia	Exercício	Dieta
OVX	Ovariectomia	Sedentário	Padrão
OVXP			Hiperproteica
OVXE		Treinados com Salto	Padrão
OVXEP			Hiperproteica
SH		Sham	Sedentário
SHP	Hiperproteica		
SHE	Treinados com Salto		Padrão
SHEP			Hiperproteica

### 3.2 Dietas

A quantidade de ração oferecida foi sempre superior ao consumo estimado para que os animais não tivessem restrição alimentar. Eles foram alimentados com ração padrão ou ração hiperproteica conforme cada grupo experimental. A dieta padrão utilizada foi a ração Rhosterlab de manutenção, e a dieta hiperproteica foi manipulada pela empresa Rhoster (Araçoiaba da Serra, Brasil), modificada de modo a conter aproximadamente 40% de proteína (caseína) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Composição das Rações de manutenção e Ração 40% proteína

Tipos de dieta	Ração Rhosterlab de manutenção		Ração Rhosterlab 40% proteína	
	% massa	% Kcal	% massa	% kcal
Proteína	21,25	24,52	38,65	44,3
Carboidrato	50,64	58,43	31,78	37,57
Gordura	6,57	18,13	7,03	18,13

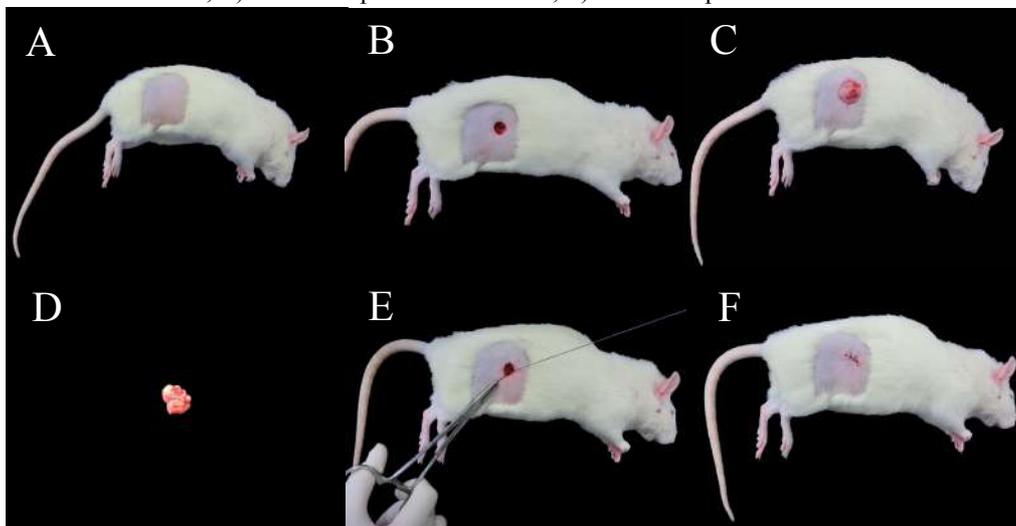
### 3.3 Técnica cirúrgica

A técnica cirúrgica aplicada nesse estudo seguiu a metodologia de Zarrow, Yochim e MacCarthy (1964). Inicialmente os animais receberam anestesia composta por Ketamina (95 mg/Kg) e Xilazina (12 mg/Kg) no músculo gastrocnêmio. Em seguida, foi realizada tricotomia na região ventral entre a reborda costal inferior e o início da pelve. Após assepsia, uma incisão reta transversal de aproximadamente 1 cm de comprimento da pele e tecido celular subcutâneo, a cerca de 1 cm da linha mediana foi realizada. A parede muscular foi avulsionada até que se tivesse acesso à cavidade abdominal, localizando o ovário em meio a uma massa gordurosa e, em seguida, foi realizada a evisceração do corno uterino. A extração dos ovários foram realizadas posteriormente à ligadura da extremidade da tuba uterina, seccionando entre a ligadura e o ovário. Por fim, foi suturada a parede muscular e, em seguida, a pele. Todo o procedimento foi realizado no lado contralateral.

O procedimento cirúrgico sham consistiu em quase todas as etapas realizadas nos grupos ovariectomizados, exceto a ligadura das trompas uterinas e retirada dos ovários. Após a exposição dos ovários eles foram recolocados intactos juntamente com a trompa uterina na cavidade abdominal.

Após as cirurgia os animais receberam buprenorfina (0,03 mg/kg) via intramuscular para analgesia pós-operatória durante 5 dias.

**Figura 1.** Etapas cirúrgicas do procedimento de retirada dos ovários (ovariectomia)  
Legenda: A) Rata posicionada em decúbito lateral, com tricotomia e assepsia realizadas; B) Incisão na pele, região entre a crista ilíaca e última costela; C) Exposição da trompa uterina e ovário e o estancamento através de uma ligadura da região distal da trompa uterina; D) Retirada do ovário; E) Sutura da parede abdominal; F) Sutura da pele.

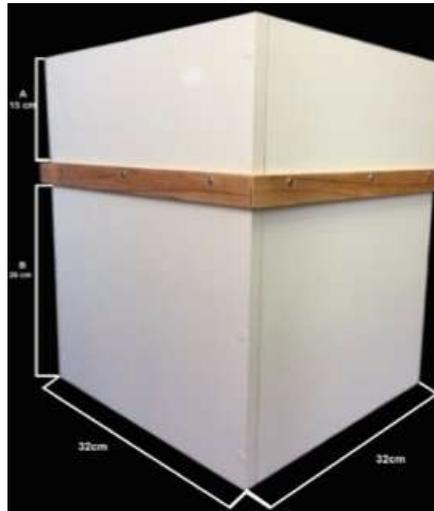


### 3.4 Treinamento Físico

Para a realização do treinamento físico de alto impacto, foi utilizada uma caixa de madeira confeccionada pela Oficina de Precisão da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

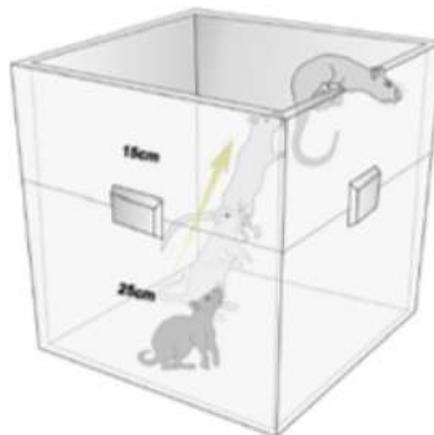
A caixa de madeira (Figura 2) foi confeccionada com dimensões de 32 cm de largura e 32 de comprimento, já a altura da caixa foi realizada em duas partes para que fosse possível a adaptação dos animais, com altura inicial de 25 cm e a parte superior com 15 cm, totalizando uma profundidade de 40 cm. No fundo da caixa foram colocados fios de aço para sustentação dos animais e permissão da transmissão de corrente elétrica (gerador de choque scrambler – Insight, Ribeirão Preto/SP), que provocou a esquiva passiva dos animais. A necessidade do estímulo elétrico foi somente nos primeiros dias, pois há um condicionamento do animal em saltar.

**Figura 2.** Caixa de madeira confeccionada para o salto dos animais



O treinamento físico foi iniciado após 72 horas da cirurgia com saltos nos grupos OVXE, OVXEP, SHE e SHEP. O protocolo de treinamento consistiu em 20 saltos/dia, 5 dias/semana (Falcai et al., 2015), durante 12 semanas.

**Figura 3.** Esquema representativo do treinamento salto (JU et al., 2014)



### 3.5 Controle da massa corporal semanal

A massa corporal dos animais foi mensurada semanalmente, por meio de uma balança da marca C&F® (Ribeirão Preto, Brasil) com precisão de 5g, pertencente ao Laboratório de Bioengenharia da FMRP/USP.

### **3.6 Eutanásia, coleta e prepara dos animais para análises**

Após o período experimental, os animais foram eutanasiados por aplicação dos anestésicos, doses excessivas de Xilazina e Quetamina (solução 1:1, 0,3 mL/100g).

O sangue foi coletado imediatamente após a morte por meio de punção cardíaca (6 a 8 ml), armazenado em tubo Falcon, sem heparina, centrifugado em uma centrífuga refrigerada Universal 320r (Hettich®, Tuttlingen, Alemanha) em 500G, durante 10 minutos a 4°C. Parte do soro foi congelada em -20°C, para análise do hormônio folículo estimulante (FSH) e a outra parte em -80°C, para ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA) de Osteoprotegerina (OPG) e Membro 11 da Superfamília de Ligantes de Fatores de Necrose Tumoral (TNFSF11/RANKL).

Após a retirada do sangue, o fígado foi coletado e armazenado em um pote de plástico estéril e congelado em -20°C para posteriores análises de Glutathiona Reduzida (GSH), Malondialdeido (MDA) e Vitamina E.

Por fim, os fêmures esquerdos foram retirados, limpos das partes moles, identificados individualmente, envoltos em gaze embebida de solução fisiológica, armazenado em criotubos de 5mL e congelados em -20°C, destinados a densitometria e ensaio mecânico. Já os fêmures do lado direito após retirados e limpos das parte moles, foram colocados diretamente em formol para fixação e início do procedimento histológico e imunoistoquímica.

### **3.7 Análise Do Hormônio Folículo Estimulante**

A concentração plasmática de FSH foi determinada para confirmar a eficácia da cirurgia ovariectomia. A análise foi realizada no Departamento de Fisiologia da FMRP/USP, por meio do método de radioimunoensaio de duplo anticorpo, utilizando hormônio de iodação, anticorpo específico para FSH e hormônio padrão de referência, ambos obtidos pelo *National Hormone and Peptide Program* (Harbor-UCLA Medical Center, EUA).

### 3.8 Análise Bioquímica do Sangue

Para a realização das análises, foram utilizadas uma lavadora de microplacas Atlantis 2 (Asys Hitech, Eugendorf, Áustria), uma incubadora *Shaker* de bancada (Novatécnica, Piracicaba, Brasil) e uma leitora monocanal de microplaca EZ Read 2000 (Biochrom®, Cambridge, Reino Unido), pertencentes ao Laboratório de Bioengenharia.

Os níveis séricos de OPG foram avaliados pelo método ELISA utilizando o kit Osteoprotegerin BioAssay<sup>TM</sup> ELISA – Rat (US Biological Life Science, Swampscott, EUA). Os níveis séricos de TNFSF11/RANKL também foram avaliados pelo método ELISA, utilizando o kit RatTNFSF11/RANKL/TRANCE ELISA for Rat (Life Span Bio Sciences, Inc, Seattle, EUA).

### 3.9 Análise do Tecido Hepático

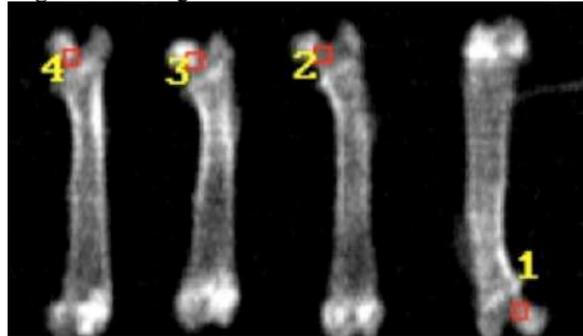
Os fígados foram analisados para concentrações de MDA seguindo o método sugerido por Gerard-Monnier e colaboradores (1998). A concentração de MDA foi calculada comparando-a com uma curva de hidrolisado de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP). A análise da GSH seguiu o método proposto por (SEDLAK et al., 1968). Os fígados também foram analisados quanto à vitamina E utilizando a determinação de  $\alpha$ -tocoferol por espectrofotometria. A análise do tecido hepático foi realizada no Laboratório de Nutrição e Metabolismo da FMRP/USP.

### 3.10 Densitometria

Para a realização da densitometria (DMO), os fêmures foram submetidos a protocolo de descongelamento, permanecendo em geladeira por 12h, e depois levado a avaliação DMO em temperatura ambiente. Os fêmures foram submersos em um recipiente plástico contendo água a 2,0 cm de profundidade, alinhados e, em seguida, escaneados através de um densitômetro de absorvometria de raios X de dupla energia, modelo DPX-IQ da marca Lunar®

(USA). As imagens capturadas foram analisadas na região de interesse utilizando o *software* DPX versão 4.7 e especial para pequenas amostras, de alta resolução, pertencente ao Laboratório de Bioengenharia da FMRP/USP. A região analisada foi o colo femoral (ROI: 0,09 cm<sup>2</sup>).

**Figura 4.** Imagem dos fêmures no densitômetro

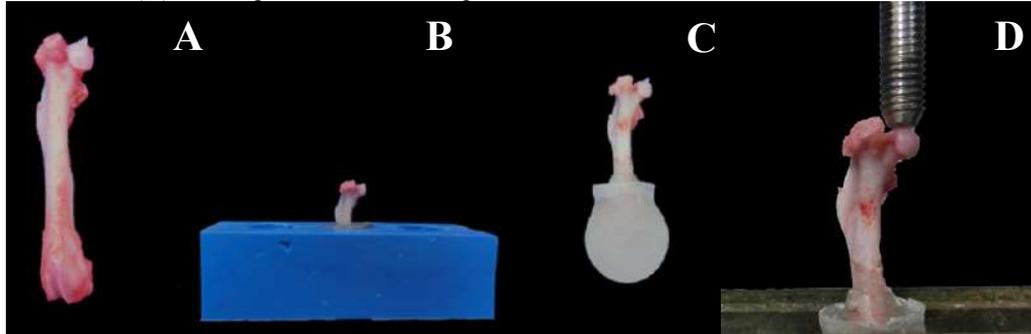


### 3.11 Ensaio mecânico

Após a DMO, realizou-se o ensaio mecânico de flexo-compressão da cabeça do fêmur, com metodologia descrita por Shimano e Volpon (2009). Neste ensaio, buscou-se avaliar as propriedades mecânicas de força máxima (N) e rigidez relativa (N/mm). Para isso, a região distal do fêmur foi incluída em resina acrílica em molde esférico, formando uma base de fixação para manter o paralelismo e alinhamento durante o ensaio mecânico. Após a inclusão, o fêmur foi posicionado na máquina universal de ensaios (EMIC®- DL10000), pertencente ao Laboratório de Bioengenharia DA FMRP/USP. O ensaio foi realizado com a célula de carga de 50 kg. Foi utilizada uma pré-carga de 5N e 30 segundos de acomodação de. A aplicação da força foi com velocidade de 0,5mm/min sobre a cabeça do fêmur.

**Figura 5.** Processo de inclusão e ensaio mecânico do fêmur

Legenda- (A) Fêmur dissecado; (B) Inclusão na resina acrílica, (C) Fêmur pronto para o ensaio mecânico e (D) Fêmur posicionado na máquina universal de ensaio mecânico.



### 3.12 Análise histológica

Os fêmures esquerdos foram mantidos em formol 10% durante 24 horas para fixação, em seguida, descalcificados em ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 10% por 30 dias à temperatura ambiente, com troca da solução realizada a cada 2 dias. Em seguida foram desidratados em serie crescente de álcoois: 70% (*overnight*), 80%, 90%, 95% e 100% (uma hora em cada concentração). Feito isso os ossos foram colocados em partes iguais de álcool e xilol (*overnight*) e diafanizados em xilol com trocas a cada uma hora (três vezes), e por fim foram confeccionados os blocos retangulares de parafina.

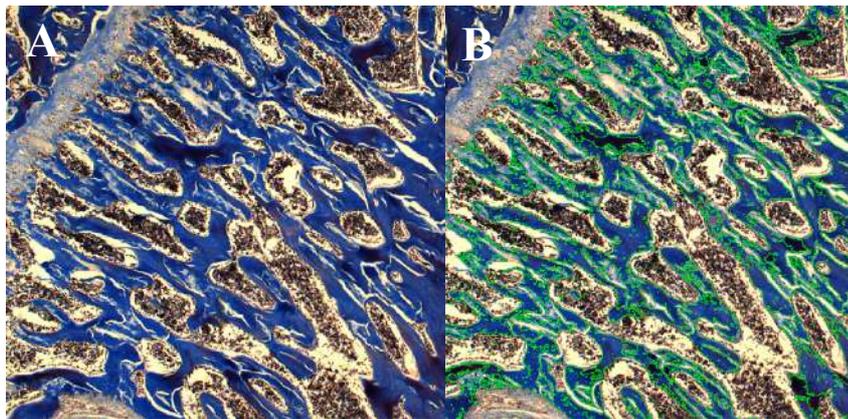
Os blocos foram seccionados em cortes longitudinais de 5  $\mu\text{m}$  de espessura. Em cada fêmur foram coletados 48 cortes semi-seriados, em que após a coleta de 5 cortes, os 10 cortes subsequentes eram descartados e o procedimento era repetido. Os fragmentos foram capturados em lâminas de vidro com polilisina, sendo posicionados 2 cortes em cada lâmina. Das 24 lâminas obtidas, 12 foram coradas pela técnica de Tricrômico de Masson (lâminas pares), e 4 destinada a imunohistoquímica (lâminas 1,7,13 e 19).

Para o exame das lâminas foi utilizado o microscópio óptico AxionImager® Z2 (Zeiss, Germany) acoplado a uma câmera digital (Zeiss®) pertencente ao Laboratório de Ciências Morfológicas da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/ USP.

### 3.13 Quantificação do osso trabecular

Por meio das lâminas coradas com Tricrômio de Masson foi avaliada a área de osso trabecular. Foi selecionada área de 3,5 x 2,5 mm, na objetiva de 5x, imediatamente abaixo do disco epifisário. Por meio do programa Axionvision® foi selecionada a cor azul referente a osso trabecular, toda a área foi demarcada e foram excluídas as regiões que não representavam osso trabecular abaixo do disco epifisário. A área foi expressa pela razão da área de osso pela área total (B.Ar/Tt.Ar - %) (PARFITT et al., 1987).

**Figura 6.** (A) Fotomicrografia da região proximal do fêmur (B) Área de osso trabecular selecionada em verde a partir da demarcação dos tons de azul, excluindo o disco epifisário.



### 3.14 Análise Imunoistoquímica

Os cortes histológicos foram submetidos à remoção da parafina em xilol e hidratados em série decrescente de etanol (100°, 100°, 100°, 90° e 70°). A recuperação antigênica foi realizada através da imersão das lâminas histológicas em tampão Diva Decloaker® (Biocare Medical, CA, USA), em câmara pressurizada Decloaking Chamber® (Biocare Medical, CA, USA), a 95°C, por 10 minutos. Após lavagens em solução de tampão de fosfato salina (PBS) 0,1M, pH 7,4, as lâminas histológicas foram imersas em 3% de peróxido de hidrogênio durante 1 hora, para o bloqueio da peroxidase endógena. Em prosseguimento, depois das lavagens em PBS, os cortes histológicos foram tratados em 3% de soro albumina bovino por

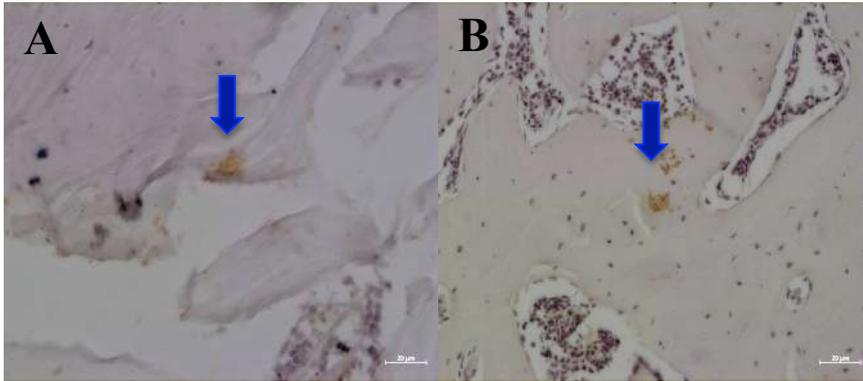
12 horas, para bloqueio dos sítios inespecíficos.

As lâminas histológicas contendo amostras dos grupos experimentais foram submetidas à incubação com um dos seguintes anticorpos primários: anti-OC (osteocalcina) do rato gerado em coelho (1:100; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) e anti-OPN (osteopontina) do rato gerado em coelho (1:100; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Os anticorpos primários foram diluídos em PBS acrescido de 0,1% Triton X-100 (PBS-TX), durante 24 horas, em câmara úmida. Nas etapas subsequentes empregou-se o Dako Labeled (HRP) Streptavidin-Biotin Kit® (Dako Laboratories, CA, USA). Após lavagens, as secções histológicas foram incubadas no anticorpo secundário biotilado, durante 2 horas, lavadas e tratadas com estreptavidina conjugada com a peroxidase da raiz forte (HRP), por 1 hora. Depois de três lavagens em PBS-TX procedeu-se a revelação utilizando-se como cromógeno o 3,3'- tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB chromogen Kit®, Dako Laboratories, CA, USA). Ao término de uma série de lavagens em PBS, os cortes histológicos foram contracolorados com hematoxilina de Harris. Como controle negativo, as amostras foram submetidas aos procedimentos descritos anteriormente suprimindo-se a utilização dos anticorpos primários.

### **3.15 Quantificação dos imunomarcadores**

As áreas positivas de imunomarcção (OC-positivas e OPN-positivas) foram expressas na aparência acastanhada. As regiões proximais do fêmures foram avaliadas com um microscópio óptico Axio Imager Z2® (Zeiss, Göttingen, Alemanha) com uma ampliação de 400x. Utilizando o software AxioVision 4.8 (Zeiss). Estas áreas foram reconhecidas pela cor e quantificadas. A proporção de áreas positivas de imunomarcção por área total de interesse foram avaliadas (YAMANAKA et al., 2017).

**Figura 7.** Fotomicrografia evidenciando o padrão de imunomarcaco de Osteocalcina (A) e Osteopontina (B).



### 3.16 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando IBM SPSS *Statistics* 20 (IBM Corporation, Amonk, New York, USA). Foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk para testar se os dados pertenciam ou não a uma curva de distribuio normal. O modelo linear de efeitos mistos foi utilizado para avaliar o peso corporal, para identificar as diferenças significantes foi realizado pós-teste de Bonferroni. Para os demais resultados foram realizadas as análises de variância (ANOVA) com três fatores, cada um com dois níveis. Todas as comparaes foram realizadas com ajuste de Bonferroni. Foi adotado nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ).

# *Resultados*

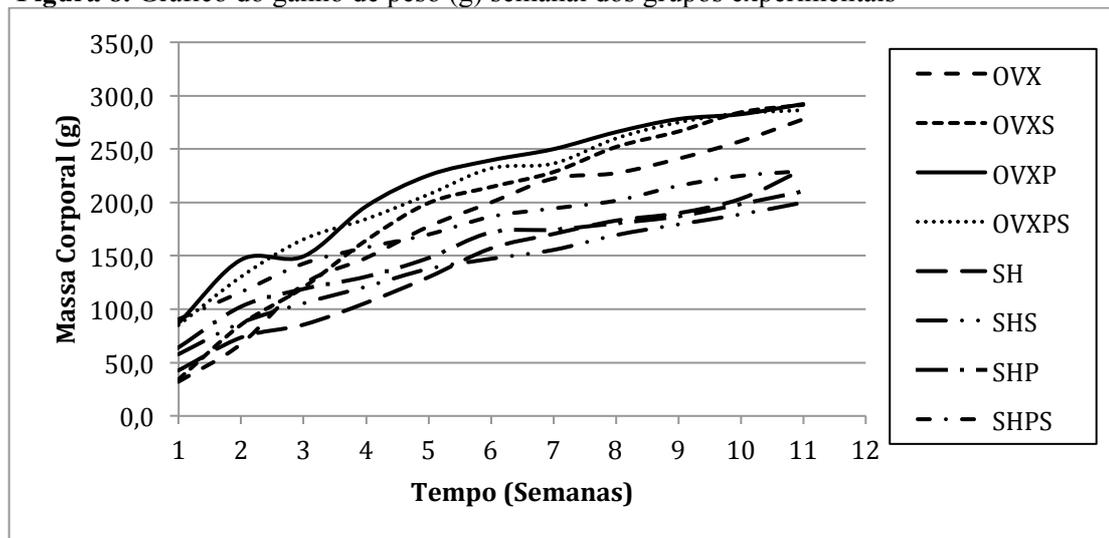


## 4. RESULTADO

### 4.1 Ganho de peso dos animais

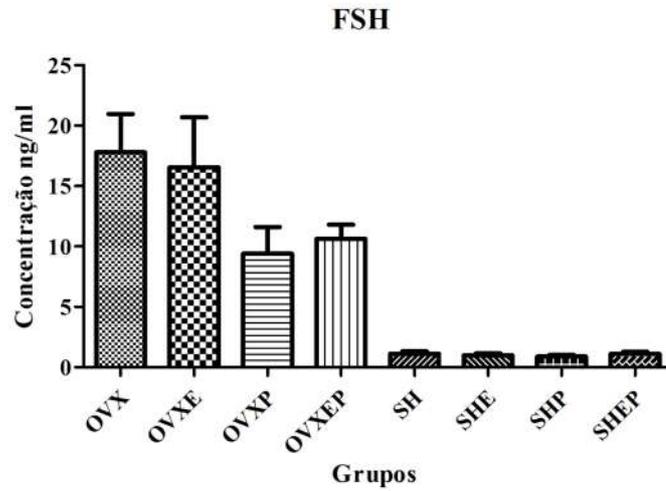
A figura 8 apresenta a curva de massa corporal semanal dos grupos experimentais. Todos os animais ganharam peso durante o experimento. Analisando o efeito dos tipos de cirurgia, de tratamento e de dieta foi possível observar que o tipo de cirurgia interferiu no ganho de peso, com maior ganho para os grupos submetidos à ovariectomia ( $p < 0,001$ ). A dieta hiperproteica também resultou em maior ganho de peso, quando comparado com os grupos dieta padrão ( $p < 0,001$ ).

**Figura 8.** Gráfico do ganho de peso (g) semanal dos grupos experimentais



### 4.2 Dosagem de Hormônio Folículo-Estimulante (FSH)

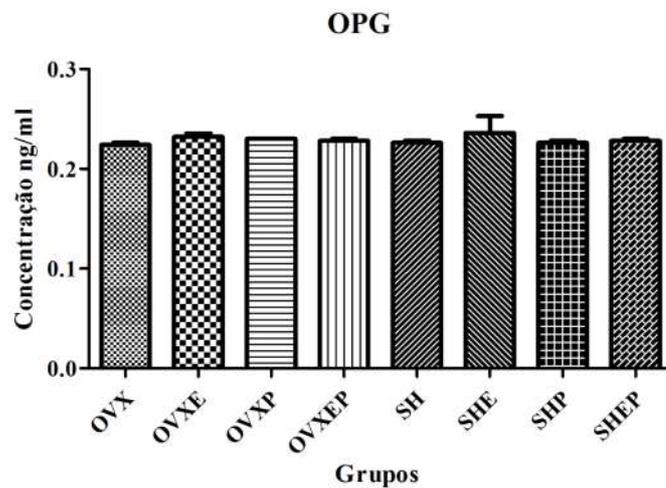
A análise de FSH permitiu a comprovação da eficácia da ovariectomia. Após 12 semanas da realização da cirurgia houve aumento significativo dos níveis de FSH nos animais ovariectomizados ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos SHAMs (Figura 9).

**Figura 9.** Gráfico da concentração de FSH (ng.mL)

### 4.3 Análise bioquímica

#### 4.3.1 OPG

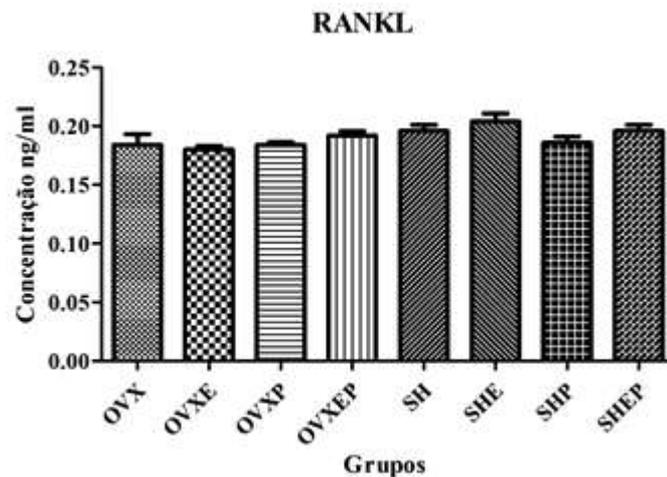
Para as concentrações séricas de OPG, não foi possível observar diferenças estatísticas (Figura 10) (Tabela 2).

**Figura 10.** Gráfico da concentração sérica de OPG (ng/ml)

### 4.3.2 RANKL

Nas concentrações séricas de RANKL, na variável cirurgia, os grupos SHAMs apresentaram concentrações mais elevadas em relação aos grupos ovariectomizados. ( $p=0,003$ ). Na interação exercício\*cirurgia, os grupos treinados ovariectomia apontaram menores concentrações que os grupos treinados sham ( $p=0,014$ ) (Figura 11) (Tabela 2).

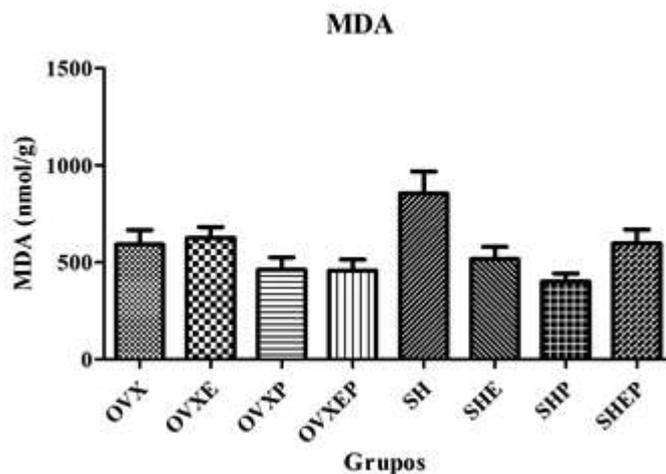
**Figura 11.** Gráfico da concentração sérica de RANKL (ng/ml)



## 4.4 Análise do Tecido Hepático

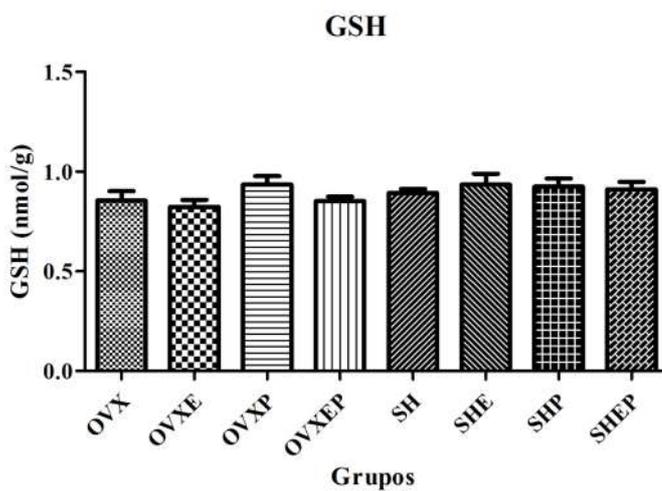
### 4.4.1 Malonaldeído (MDA)

Para as concentrações de MDA, ao comparar o efeito das variáveis, foi possível observar diferenças estatísticas para dieta ( $p=0,001$ ), sendo a dieta hiperproteica com valores menores que dieta padrão. Na interação entre as variáveis dieta\*exercício, os grupos sedentários dieta padrão apresentaram valores maiores que os grupos sedentários com dieta hiperproteica e grupos treinados dieta padrão ( $p=0,016$ ). Já na interação dieta\*exercício\*cirurgia ( $p=0,005$ ) foi possível observar maiores níveis no grupo SH quando comparados com os níveis dos grupos SHP, SHE e OVX (Figura 12) (Tabela 2).

**Figura 12.** Gráfico da concentração de MDA (nmol/g)

#### 4.4.2 Glutathiona Reduzida (GSH)

Em relação aos valores de GSH, não foi possível observar diferenças estatísticas (Figura 13) (Tabela 2).

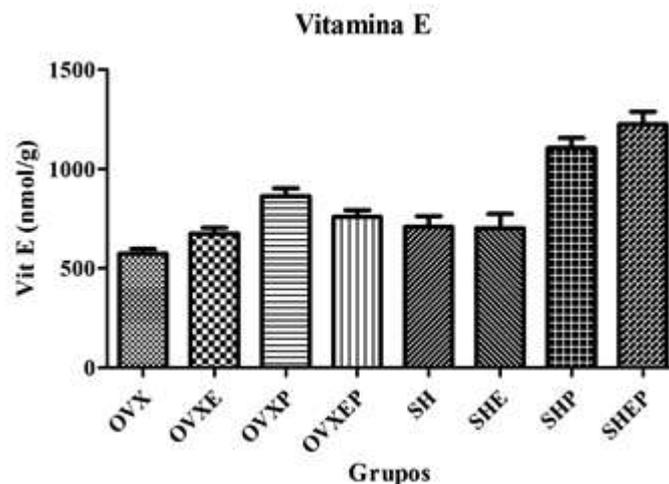
**Figura 13.** Gráfico da concentração de GSH (nmol/g)

#### 4.4.3 Vitamina E

Nas concentrações de vitamina E, ao comparar as variáveis, foi possível observar diferenças estatísticas para dieta ( $p=0,001$ ), sendo a dieta hiperproteica maior que a dieta

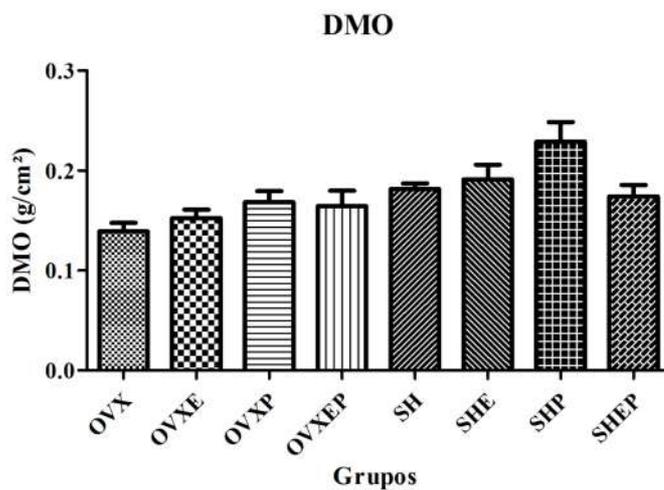
padrão. Também foi observado efeito significativo para cirurgia ( $p=0,001$ ), sendo os grupos ovariectomizados com valores menores que SHAMs. Na interação dieta\*cirurgia, os grupos dieta hiperproteica ovariectomia apresentou valores menores que dieta hiperproteica sham ( $p=0,001$ ), os grupos dieta padrão ovariectomia apontaram valores menores que dieta hiperproteica ovariectomia ( $p=0,001$ ), e os grupos dieta padrão sham os valores foram menores que dieta hiperproteica sham ( $p=0,001$ ). Na interação dieta\*exercício\*cirurgia, o grupo OVX menor que OVXP ( $p=0,001$ ) e SH ( $p=0,043$ ). Já o grupo SHP indicou valores maiores que SH ( $p=0,001$ ) e OVXP ( $p=0,001$ ). O grupo SHE menor que SHEP ( $p=0,001$ ) e o grupo OVXEP menor que SHE ( $p=0,001$ ) (Figura 14) (Tabela 2).

**Figura 14.** Gráfico da concentração de Vitamina E (nmol/g)



#### 4.5 Densitometria óssea

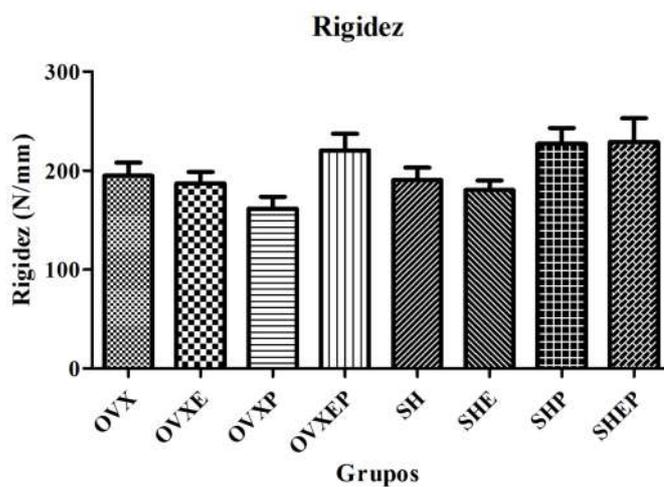
A análise estatística da DMO do colo do fêmur apresentou diferenças estatísticas entre as dietas ( $p=0,049$ ), sendo a dieta hiperproteica com valores maiores que a dieta padrão. Na variável cirurgia ( $p<0,001$ ), os grupos ovariectomizadas apresentaram valores menores que os grupos SHAMs. Ao avaliar a interação entre as variáveis, dieta\*exercício ( $p=0,025$ ), os grupos dieta hiperproteica sedentários indicaram valores maiores que os sedentários dieta padrão e entre os grupos com dieta hiperproteica os que realizaram treinamento apresentaram valores menores que os sedentários (Figura 15) (Tabela 2).

**Figura 15.** Gráfico da DMO ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ) na região proximal do fêmur

## 4.6 Ensaio Mecânico

### 4.6.1 Rigidez Relativa

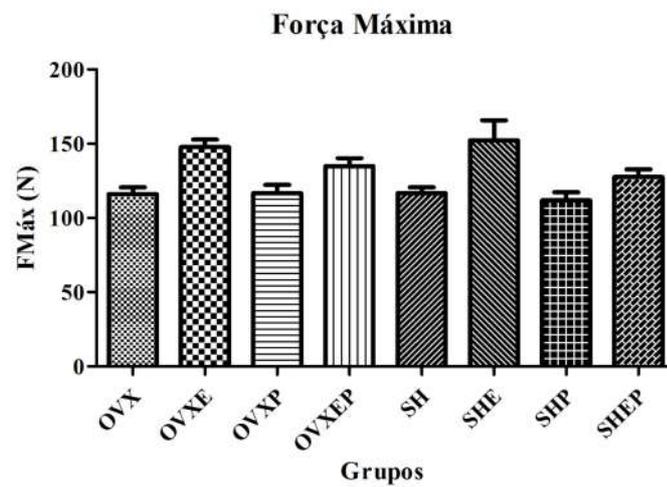
Em relação aos valores da rigidez relativa não foi observado diferenças estatísticas (Figura 16) (Tabela 2).

**Figura 16.** Gráfico da Rigidez Relativa (N) no ensaio de flexo-compressão da cabeça do fêmur

#### 4.6.2 Força máxima

A análise de força máxima apresentou diferenças estatísticas entre as dietas ( $p=0,026$ ), sendo dieta hiperproteica com valores menores que dieta padrão, e na variável exercício ( $p<0,001$ ), os grupos treinados apresentaram valores maiores que os sedentários (Figura 17) (Tabela 2).

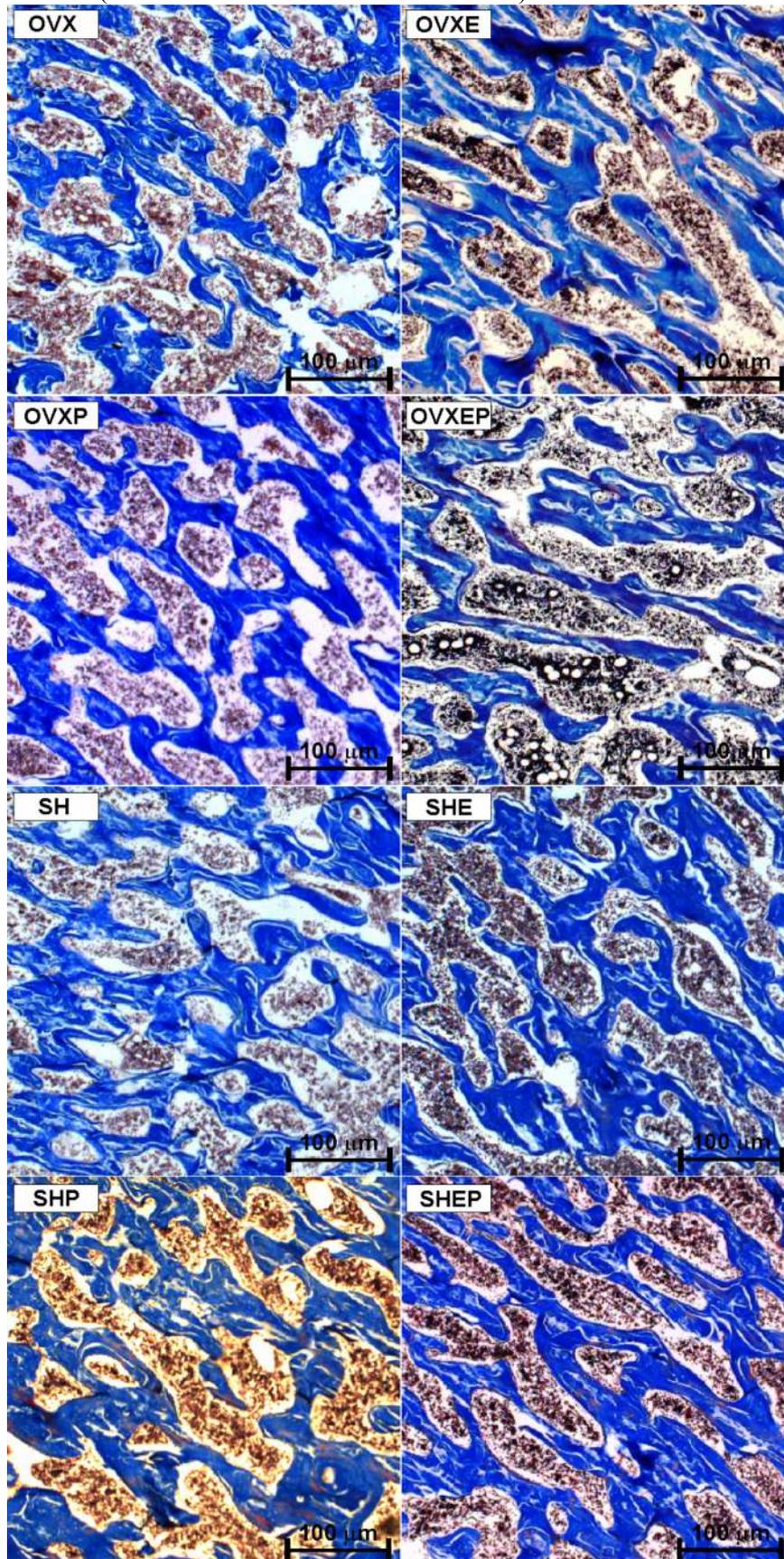
**Figura 17.** Gráfico do resultado de Força Máxima (N/mm) no ensaio de flexo-compressão da cabeça do fêmur



#### 4.7 Histologia do osso trabecular da região proximal do fêmur

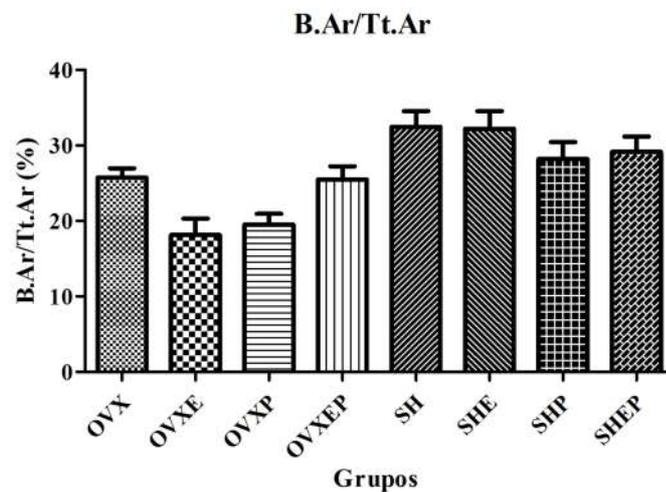
Foi possível observar o aspecto histológico das trabéculas ósseas por meio das lâminas coradas com Tricômio de Masson (Figura 18) (Tabela 2).

**Figura 18.** Fotomicrografias do osso trabecular na região proximal das fêmures (Tricômio de Masson aumento de 100x).



Na quantificação do trabeculado ósseo da região proximal do fêmur, foi possível observar diferenças estatísticas entre as dietas ( $p=0,023$ ), sendo a dieta hiperproteica com valores menores que dieta padrão. Na cirurgia ( $p=0,001$ ), os grupos ovariectomizados apresentaram valores menores que os grupos SHAMs e na interação dieta\*exercício ( $p=0,017$ ), os grupos com dieta padrão sedentários apontaram valores maiores que os grupos dieta hiperproteica sedentários (Figura 19) (Tabela 2).

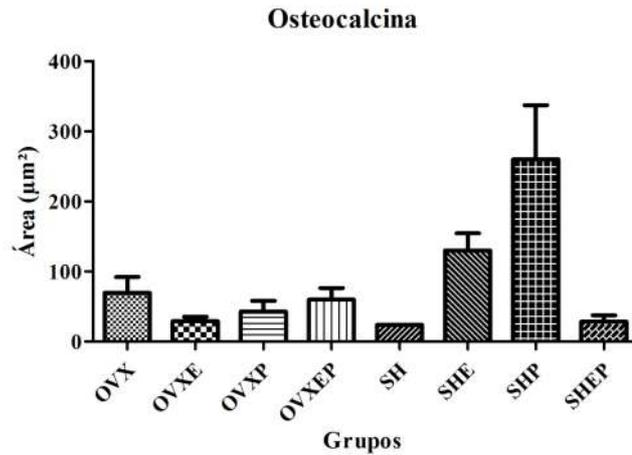
**Figura 19.** Gráfico do percentual de osso trabecular (%), obtido por meio da razão da área de osso pela área total avaliada em  $\text{mm}^2$



## 4.8 Imunoistoquímica

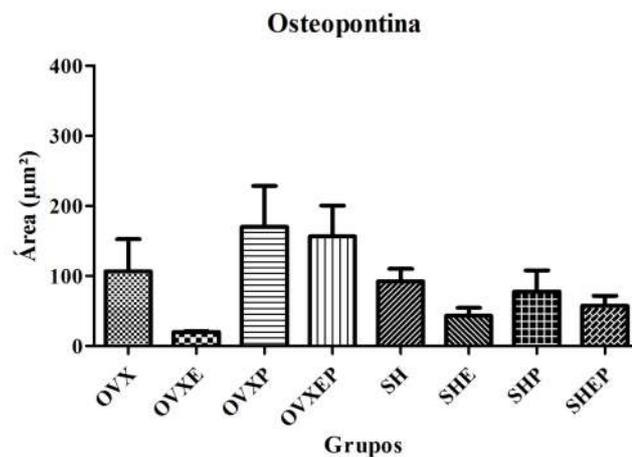
### 4.8.1 Osteocalcina

Na marcação de osteocalcina houve diferenças estatísticas na variável cirurgia ( $p=0,004$ ), sendo os grupos ovariectomizados com maiores valores que os grupos SHAMs. A interação dieta\*exercício mostrou-se significativa ( $p=0,010$ ), sendo os grupos dieta padrão sedentário com concentrações menores que os grupos dieta hiperproteica sedentário ( $p=0,026$ ) e os grupos dieta hiperproteica treinados com concentrações menores que os grupos dieta hiperproteica sedentários ( $p=0,020$ ). Na interação dieta\*exercício\*cirurgia ( $p=0,001$ ), sendo o grupo SHP as concentrações foram maiores que SH ( $p=0,021$ ), SHEP ( $p=0,028$ ) e OVXE ( $p=0,029$ ) (Figura 20) (Tabela 2).

**Figura 20.** Gráfico da análise de imunohistoquímica para osteocalcina.

#### 4.8.2 Osteopontina

Na marcação de osteopontina, houve diferenças estatísticas com relação à dieta ( $p=0,005$ ), sendo grupos de dieta padrão com concentrações menores que dieta hiperproteica. Também houve diferenças estatísticas na variável exercício, sendo que os grupos treinados apontaram valores menores que os sedentários ( $p=0,017$ ). Para a cirurgia ( $p=0,010$ ), foi observado que os grupos ovariectomizados apresentaram maiores valores que os SHAMs. Na interação dieta\*cirurgia, os grupos dieta padrão ovariectomia foram menores que grupos hiperproteica ovariectomia ( $p=0,008$ ). Os grupos dieta padrão sham indicaram valores menores que grupos hiperproteica ovariectomia ( $p=0,011$ ) e grupos dieta hiperproteica ovariectomia as concentrações foram maiores que dieta hiperproteica sham ( $p=0,010$ ) (Figura 21) (Tabela 2).

**Figura 21.** Gráfico da análise de imunohistoquímica para osteocalcina

**Tabela 2.** Parâmetros e resultados estatísticos das principais análises realizadas

	OVX	OVXE	OVXP	OVXEP	SH	SHE	SHP	SHEP	OVX (O)		Exercício (E)		Dieta (D)		O x E	O x D	E x D	OxExD
	média (dp)	média (dp)	média (dp)	média (dp)	média (dp)	média (dp)	média (dp)	média (dp)	Efeito	p	Efeito	p	Efeito	p	p	p	p	p
DMO	0,139 (0,027)	0,152 (0,027)	0,168 (0,035)	0,164 (0,049)	0,182 (0,017)	0,191 (0,045)	0,229 (0,063)	0,174 (0,034)	↓	<0,001*	0,319	↑	0,049*	0,132	0,762	0,025*	0,196	
Rigidez	195,0 (41,4)	187,1 (36,6)	159,0 (40,9)	220,4 (54,0)	190,5 (40,0)	180,4 (29,1)	227,2 (50,4)	228,8 (72,4)		0,129	0,296		0,057	0,150	0,443	0,061	0,180	
Fmax	116,1 (14,1)	147,7 (15,8)	116,7 (18,8)	134,9 (17,0)	116,7 (12,3)	152,2 (40,4)	111,8 (17,2)	127,6 (15,4)		0,704	↑	<0,001*	↓	0,026*	0,934	0,353	0,077	0,727
Histologia	26,88 (4,06)	19,54 (6,59)	20,75 (4,97)	27,56 (7,27)	31,47 (5,34)	31,37 (6,16)	27,02 (6,41)	28,20 (5,65)	↓	0,001*	0,722	↓	0,023*	0,354	0,652	0,017*	0,116	
Osteocalcina	69,61 (50,67)	29,00 (14,25)	42,82 (34,15)	59,78 (37,29)	23,79 (0,00)	130,05 (54,63)	260,23 (172,45)	28,66 (19,85)	↑	0,004*	0,574		0,097	0,025*	0,040*	0,010*	0,001*	
Osteopontina	106,42 (103,10)	20,03 (3,48)	170,10 (130,65)	156,58 (97,89)	92,39 (35,71)	43,07 (25,36)	77,70 (67,21)	57,51 (32,02)	↑	0,010*	0,017*	↑	0,005*	0,002*	0,010*	0,001*	0,001*	
GSH	0,85 (0,15)	0,82 (0,11)	0,93 (0,14)	0,85 (0,07)	0,89 (0,06)	0,93 (0,17)	0,92 (0,13)	0,91 (0,11)		0,076	0,442		0,296	0,202	0,364	0,344	0,961	
MDA	591,6 (237,6)	625,9 (178,8)	461,7 (202,7)	456,7 (181,1)	856,0 (356,5)	516,6 (193,7)	400,9 (131,1)	597,5 (215,4)		0,246	0,574	↓	0,001*	0,395	0,709	0,016*	0,005*	
Vitamina E	573,38 (76,17)	673,8 (94,12)	863,69 (126,37)	758,37 (107,8)	709 (168,6)	701,60 (214,6)	1105,04 (158,9)	1224,4 (190,5)	↓	0,001*	0,424	↑	0,001*	0,384	0,001*	0,559	0,015*	
OPG	0,23 (0,01)	0,23 (0,01)	0,23 (0,00)	0,23 (0,00)	0,23 (0,00)	0,24 (0,04)	0,22 (0,00)	0,23 (0,00)		0,864	0,204		0,501	0,776	0,516	0,546	0,900	
RANKL	0,18 (0,02)	0,18 (0,01)	0,18 (0,00)	0,19 (0,01)	0,19 (0,01)	0,20 (0,01)	0,18 (0,01)	0,20 (0,01)	↓	0,003*	0,600		0,600	0,014*	0,073	0,890	0,456	

\* Diferença estatisticamente significativa; dp = desvio padrão; ↓ = diminuiu; ↑ - aumentou; DMO = densidade mineral óssea; Fmax = força máxima; GSH = glutatona reduzida; MDA= malonaldeído; OPG = Osteoprotegerina; RANKL = Receptor ativador de fator nuclear ligante OVX= ovariectomizados; OVXE= ovariectomizados e treinados; OVXP= ovariectomizados com dieta hiperproteica; OVXEP= ovariectomizados, treinados e dieta hiperproteica; SH= cirurgia simulada (sham); SHE= sham e treinados; SHP= sham com dieta hiperproteica; SHEP= sham, treinados e dieta hiperproteica.



*Discussão*



## 5. DISCUSSÃO

No presente estudo, foram avaliados os efeitos do exercício físico (salto) nas propriedades biomecânicas e na microarquitetura óssea de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperproteica. Como resultado, foi possível observar uma influência negativa da dieta hiperproteica no tecido ósseo, e o exercício físico, apesar de eficaz, isoladamente não supriu os *déficits* causados pela dieta hiperproteica e ovariectomia.

Para indução do quadro osteopênico, realizou-se a ovariectomia, um modelo muito utilizado para estudar tratamentos de doenças osteometabólicas (THOMPSON et al., 1995; SHIMANO et al.; 2014 MACEDO et al., 2016). A literatura aponta que após a realização da ovariectomia, a instalação da osteopenia ocorre em até um mês (KALU, 1991; THOMPSON et al., 1995; LI; SHEN; WRONSKI, 1997). Quanto à idade dos animais, o início do experimento foi com o peso de 150 a 180 gramas, um animal considerado jovem. Segundo Thompson e seus colaboradores (1995), a idade é um fator importante nas pesquisas da perda óssea, afirmando que a diminuição óssea que ocorre após a ovariectomia depende da idade do animal, sendo mais rápida em animais jovens e mais lenta em animais idosos.

Inicialmente, a comprovação do efeito da ovariectomia foi confirmada pelo aumento da concentração plasmática de FSH. A falta de estrógeno promove um aumento expressivo desse hormônio (MACEDO et al., 2016), além de gerar uma diminuição na apoptose de osteoblastos, colaborando para um aumento da reabsorção óssea (CAO; GREGOIRE, 2016).

Um dos fatores que pode sofrer alterações após a ovariectomia é o ganho de massa (MACEDO et al., 2016). No presente estudo, todos os animais aumentaram a massa durante o experimento, contudo, grupos ovariectomizados apresentaram maior ganho quando comparados aos animais SHAMs, confirmado por alguns autores que também trabalharam com ratas ovariectomizadas (LESPESSAILLES et al., 2009; MACEDO et al., 2016).

Os grupos dieta hiperproteica também apresentaram maior ganho de massa quando comparados aos de dieta padrão, justificado por Silva et al., (2014) que afirmaram que a perda de peso com a dieta hiperproteica está relacionada a uma restrição dietética, definindo que não é a dieta hiperproteica que conduz a perda de peso e sim a restrição imposta sobre os animais. Além disso, estudos apontam que esta dieta pode conduzir a perda de peso somente após longos períodos, fundamentando-se na mudança do metabolismo que leva uma maior saciedade (HALTON; HU, 2004).

Muito se discute sobre o aumento da ingestão de proteínas no tecido ósseo, imposto

por muitos autores como prejudicial por associarem a carga ácida a uma consequente hipercalciúria. Em 1992, Abelow e seus colaboradores encontraram uma correlação positiva entre a ingestão de proteínas e as taxas de fratura de quadril, no entanto, essa teoria foi contestada nos anos seguintes. Estudos de Munger et al., (1999) ainda com relação a fraturas de quadril, mostraram que as altas taxas de fratura estavam relacionadas com o baixo consumo de proteínas na dieta.

Segundo alguns autores a dieta hiperproteica aumenta a absorção intestinal de cálcio beneficiando a homeostase óssea, remodelação óssea e produção do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) (KERSTETTER et al., 2005, O'CONNELL et al., 2005). O IGF-1 modula a homeostase dos ossos promovendo a atividade dos osteoblastos (LANGDAHL et al., 1998). Ademais, estudos apontam que além da quantidade, a qualidade pode influenciar nessa concentração (ARJMANDI et al., 2003).

Neste estudo, foi adotado uma dieta hiperprotéica com aproximadamente 40% de caseína, um valor razoavelmente maior do que dietas comuns de manutenção. A alta ingestão proteica resultou em uma diminuição das propriedades biomecânicas e trabeculado ósseo. Trabalhando com dois percentuais de proteína, alto e baixo, autores encontraram resultados semelhantes, a dieta contendo 48% de proteína foi capaz de sensibilizar o tecido ósseo negativamente (AMANZADEH et al., 2003). Zerwekh e colaboradores (2009) também avaliaram dietas com concentrações altas e baixas de proteínas suplementadas com cloreto de potássio ou citrato de potássio no intuito de avaliar os efeitos da terapia alcalina sobre as alterações induzidas pelo ácido na renovação óssea em ratos. Como resultado, os autores demonstraram que o efeito ácido gerado pela dieta rica em proteínas pode levar a uma perda óssea relacionando com a idade, o que pode justificar nossos achados, em que a dieta hiperproteica foi significativamente prejudicial ao tecido ósseo.

Mangano, Sahni e Kerstetter (2104) afirmam que a ingestão de proteínas pode ser aliada do tecido ósseo quando associada a ingestão concomitante de cálcio. Em adição a isso, um estudo recente apresentou um produto intitulado inovador para saúde óssea, nos quais seus componentes são caseína com cálcio, vitamina D2 e vitamina K2, como resultado, afirmam que quando ingerido por um longo período é capaz de melhorar a DMO de ratas ovariectomizadas (BOULIER et al., 2016).

Grande parte dos estudos epidemiológicos associa positivamente a ingestão proteica e a DMO (MUNGER et al., 1999), corroborando com nossos achados, em que a dieta alta em proteína foi capaz de sensibilizar o tecido ósseo melhorando a DMO. Embora muitos estudos utilizem da DMO como medida de fragilidade, já é questionado sua precisão na medida da

força óssea. Além disso, outra desvantagem é a variação da massa óssea e da geometria, dependendo da região analisada (YANAGIHARA et al., 2016).

Divergências foram encontradas em nossos estudos entre as análises de densitometria óssea e propriedades biomecânicas. Segundo Jamsa et al., (2002), no geral, a DMO está associada com as propriedades mecânicas, porém dependendo das condições em que o tecido ósseo é exposto, o aumento da massa óssea não vem acompanhado de um aumento da força.

Na avaliação histomorfométrica, também obtivemos resultados contrastantes à densitometria, porém, segundo alguns autores (KULAK; DEMPSTER, 2010), a quantificação histológica é uma das análises mais poderosas, já que abarca a quantificação de osso trabecular com parâmetros estruturais do desequilíbrio ósseo em condição metabólica alterada, expondo informações como nenhuma outra abordagem investigativa.

Quando associado dieta rica em proteínas e mulheres na menopausa, essa lacuna na literatura é ainda maior, gerando amplas discussões. Para Sellmeyer e colaboradores (2001) mulheres idosas com alta ingestão proteica possuem uma maior perda óssea do colo femoral, entretanto, avaliações em mulheres jovens e na pré-menopausa após consumirem uma dieta rica em proteínas mostraram uma relação positiva com a DMO (TEEGARDEN et al., 1998; BEASLEY et al., 2010).

Além da questão alimentar na menopausa, muito se discute sobre a forma eficaz de prevenção e tratamento para a osteopenia/osteoporose. Em grande parte, uma alimentação ideal não é suficiente para suprir o *déficit* hormonal causado pela menopausa, principalmente em relação ao tecido ósseo. Os exercícios físicos são considerados uma boa estratégia para manutenção da massa óssea, contudo, ainda que já se tenha discutido amplamente a eficácia dos diferentes tipos de exercícios, existe uma carência significativa sobre a modalidade ideal (SHIMANO et al., 2014; PALIOLOGO et al., 2015).

Alguns autores afirmam que o exercício aeróbico de média intensidade e com sobrecarga são mais eficientes (TROMP et al., 2006; BONNET et al., 2007), entretanto outros autores defendem que o exercício mais efetivo para a prevenção da perda óssea é o de alto impacto (HONDA et al., 2003; NAGASAWA et al., 2008). Segundo Martin (2007), a remodelação óssea é determinada pela forma com que é requisitada, ou seja, os ossos que sofrem maiores deformações, impacto ou compressão apresentam melhor adaptação, consequentemente maior massa óssea. A lei de Wolff também pode ser utilizada como justificativa para os benefícios do exercício de alto impacto, já que segundo a lei, o osso tem a capacidade de se adaptar as mudanças de tamanho, forma e estrutura dependendo dos estresses mecânicos submetidos (HAMMER, 2015).

No presente estudo, optou-se pelo salto, um exercício de alto impacto. A realização de treinamento resultou em aumento das propriedades biomecânicas, em especial, na força máxima, independente da cirurgia ou dieta. Na mesma linha e com resultados semelhantes, Ju e colaboradores (2012), estudaram os efeitos do salto em ratos suspensos pela cauda para induzir a perda de massa óssea. Os autores concluíram que a adaptação esquelética acontece por estímulo mecânico, visto que foi observado um aumento da espessura trabecular. Em adição a isso, Honda et al., (2003), avaliaram o efeito do salto em animais ovariectomizados, e o treinamento apresentou maiores efeitos em ratas ovariectomizadas em comparação às ratas SHAMs, concluindo que esta atividade melhora a massa óssea independente do fator de deficiência de estrógeno ou osteopenia presente.

Falcai e colaboradores (2015), estudaram diferentes modalidades de exercício físico após a suspensão dos membros inferiores, em específico, o salto com apenas 3 semana de treinamento, foi possível observar um aumento da massa óssea, resistência mecânica, volume e espessura trabecular. Em nossos resultados, observamos uma melhora nas propriedades biomecânicas com o salto, porém não foi possível considerar uma beneficiação do trabeculado ósseo.

Em nosso estudo, foram avaliados os níveis séricos de RANKL/OPG, pois segundo alguns autores podem ser utilizados como marcador biológico de prognóstico em patologias ósseas, como por exemplo a osteoporose, cooperando para avaliações de diferentes terapias para as patologias ósseas (BAUD'HUIN et al., 2007). Como resultado dos marcadores bioquímicos, foi possível observar que a ovariectomia diminuiu significativamente os níveis séricos de RANKL, enquanto nos níveis de OPG não foi possível encontrar diferença estatística. Corroborando com nossos achados, Okubo e colaboradores (2017), que também trabalharam com salto na prevenção e tratamento da osteopenia ocasionada pela ovariectomia, observaram que a ovariectomia não alterou os níveis de OPG e diminuiu os níveis séricos de RANKL.

Associando exercício físico (corrida) e uma ingestão de níveis diferentes de proteínas, Takeda et al., (2012) avaliaram o tecido ósseo de ratos em crescimento e concluíram que um alto consumo de proteínas combinado com o exercício físico causou um efeito adicional sobre a resistência do tecido ósseo, diferindo de nossos resultados, que não apresentaram benefício entre a associação da dieta rica em proteína e o exercício físico. Na DMO, o exercício físico associado com a dieta apresentou resultados inferiores aos grupos com apenas dieta hiperproteica, independente da cirurgia.

As proteínas osteocalcina e osteopontina são marcadores de formação óssea. Os

grupos SHAMs apresentaram maiores marcações concentrações de osteocalcina comparados aos grupos OVXs, podendo ser explicado por Owen e colaboradores (1990), que afirmam que a osteocalcina é um marcador do osteoblasto maduro. A osteocalcina sofre alterações em seus níveis durante toda a vida e quanto maior a exigência do fornecimento de energia, maior será a remodelação óssea da atividade metabólica (CHEN, 2012). Quanto à dieta, Aoe et al., (2005), estudaram os efeitos da proteína do leite no metabolismo ósseo em mulheres na menopausa, e corroborando com nossos achados, os autores também não encontraram diferenças estatísticas nas concentrações da osteocalcina entre os grupos dieta padrão e dieta hiperproteica.

Já na marcação de osteopontina, os grupos ovariectomizados apresentaram valores maiores que os grupos SHAMs. Com resultados semelhantes, porém avaliados sericamente, Wei e colaboradores (2016) observaram que, em mulheres na menopausa, os níveis séricos da osteopontina estão negativamente relacionados à DMO e correlacionados positivamente com os níveis de turnover ósseo.

No fígado, o GSH é o parâmetro utilizado para avaliar o sistema de defesa antioxidante dos animais. Ao avaliar os níveis de GSH, não foi possível observar alterações significantes para os diferentes grupos estudados. Divergindo dos nossos achados, Franco (2007), mensurou os níveis de GSH e encontrou diferenças significantes entre os grupos sedentários e exercitados. Os animais treinados apresentaram níveis de GSH mais altos quando comparados aos sedentários com mesma dieta. Esta divergência pode ser resultado dos diferentes métodos de treinamentos empregados, pois os autores avaliaram os níveis de GSH em ratos submetidos a treinamento de natação com sobrecarga, o que possivelmente gera maior estresse e maiores níveis de GSH. As controvérsias sobre os efeitos do exercício na capacidade antioxidante hepática são inúmeras (JI, 1993), provavelmente, devido às diferentes intensidades e durações dos protocolos de exercício.

O MDA é um aldeído de cadeia curta, um dos compostos mensurados pela reação com o ácido tiobarbitúrico (TBARS). A formação de MDA ocorre pela decomposição dos hidroperóxidos lipídicos e sua concentração tem sido aplicada para quantificar a peroxidação lipídica em sistemas biológicos, em células e tecidos (BONNES; GUÉRIN, 1992). Em geral, o estresse oxidativo é uma ameaça para seres vivos, sendo assim, o sistema de antioxidante endógena é empregado pelo organismo para sua atenuação e até mesmo sua eliminação (CECONI et al., 2003). Neste estudo, a exposição dos animais ao treinamento e dieta diminuiriam os valores de MDA, o que indica um dos benefícios da dieta rica em proteínas e do exercício físico de alto impacto.

A dieta hiperproteica aumentou as dosagens de vitamina E hepática, um dado que pode servir de base indireta para deterioração esquelética. Estudos com animais, Fujita et al., (2012) afirmam que a vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) é capaz de induzir a reabsorção óssea e diminuir a massa óssea por meio da intensificação dos osteoclastos. Já estudos com ratos deficientes em estrógeno, sugerem que o  $\alpha$ -tocoferol poderia preservar a massa óssea (MUHAMMAD et al., 2012), o que pode justificar nosso estudo, em que as concentrações de vitamina E foram menores nos animais ovariectomizados.

Dada a crescente prevalência da osteoporose e o impacto de dietas ricas em proteínas sobre o metabolismo ósseo, é imprescindível que busquemos uma melhor compreensão da interação entre a alta ingestão proteica e saúde esquelética.

Com esses dados, fica claro a necessidade de estudos adicionais para melhor definição de um padrão, tanto para quantidade de proteínas capazes de beneficiar ou não interferir no tecido ósseo, e aos tipos e intensidades dos exercícios físicos. Apesar dos vários indicadores de qualidade óssea utilizados em nosso trabalho, existem algumas limitações metodológicas; o número relativamente baixo de animais para uma adequação mais fidedigna das estatísticas, análises mais específicas do efeito da proteína no tecido hepático e a ausência da quantificação de IGF-1.

*Conclusão*



## 6. CONCLUSÃO

Neste estudo experimental concluímos que a ovariectomia parece interferir negativamente o tecido ósseo, e a dieta hiperproteica capaz de prejudicar a microarquitetura óssea e resistência mecânica, apesar de promover aumento na DMO. O exercício físico de alto impacto, apesar de isoladamente melhorar as propriedades biomecânicas, não foi capaz de suprir os efeitos deletérios causados pela dieta hiperproteica e ovariectomia.



## *Referências*



## 7. REFERÊNCIAS

ABELOW, B.; HOLFORD, T.; INSOGNA, K. Cross-cultural association between dietary animal protein and hip fracture: a hypothesis. **Calcified Tissue International**, v. 50, n. 1, p. 14–8, 1992.

ABIZANDA, P.; LOPEZ, M.D.; GARCIA, V.P.; ESTRELLA, JDE D.; DA SILVA, GONZALEZ A, VILARDELL NB, TORRES KA. Effects of an oral nutritional supplementation plus physical exercise intervention on the physical function, nutritional status, and quality of life in frail institutionalized older adults: the activnes study. **Journal of the American Medical Directors Association**, v. 16. n. 5, p. 439.e9-439.e16, 2015.

AMANZADEH, J.; GITOMER, W. L.; ZERWEKH, J. E.; PREISIG, P. A.; MOE, O. W.; PAK, C. Y.; LEVI, M. Effect of high protein diet on stone-forming propensity and bone loss in rats. **Kidney International**, v. 64, n. 6, p. 2142-2149, 2003.

ANDERSEN, T. L.; SONDERGAARD, T. E.; SKORZYNSKA, K. E.; DAGNAES-HANSEN, F.; PLESNER, T. L.; HAUGE, E. M.; PLESNER, T.; DELAISSE, J. M. A physical mechanism for coupling bone resorption and formation in adult human bone. **The American Journal of Pathology**, v. 174, n. 1, p. 239–247, 2009.

AOE, S.; KOYAMA, T.; TOBA, Y.; ITABASHI, A.; TAKADA, Y. A controlled trial of the effect of milk basic protein (MBP) supplementation on bone metabolism in healthy menopausal women. **Osteoporosis International**, v. 16, n. 12, p. 2123–2128, 2005.

ARJMANDI, B. H.; KHALIL, D. A.; SMITH, B. J.; LUCAS, E. A.; JUMA, S.; PAYTON, M. E.; WILD, R. A. Soy protein has a greater effect on bone in postmenopausal women not on hormone replacement therapy, as evidenced by reducing bone resorption and urinary calcium excretion. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 88, n. 3, p. 1048–54, 2003.

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

BAUD'HUIN, M.; LAMOUREUX, F.; DUPLOMB, L.; RÉDINI, F.; HEYMANN, D. RANKL, RANK, osteoprotegerin: key partners of osteoimmunology and vascular diseases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, n. 18, p. 2334-2350, 2007.

BEASLEY, J. M.; ICHIKAWA, L. E.; ANGE, B. A.; SPANGLER, L.; LACROIX, A. Z.;

OTT, S. M.; SCHOLE, D. Is protein intake associated with bone mineral density in young women? **The American journal of clinical nutrition**, v. 91, n. 5, p. 1311-1316, 2010.

BLAND, R. Steroid hormone receptor expression and action in bone. **Clinical science**, v. 98, n. 2, p. 217-40, 2000.

BONEWALD, L. F.; JOHNSON, M. L. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. **Bone**, v. 42, n. 4, p. 606-615, 2008.

BONNES-TAOUREL, D.; GUÉRIN, M. C.; TORREILLES, J. Is malonaldehyde a valuable indicator of lipid peroxidation? **Biochemical Pharmacology**, v. 44, n. 5, p. 985-988, 1992.

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

BOULIER, A.; SCHWARZ, J.; LESPESAILLES, E.; BANIEL, A.; TOMÉ, D.; BLAIS, A. Combination of micellar casein with calcium and vitamins D2 and K2 improves bone status of ovariectomized mice. **Osteoporosis International**, 2016, v. 27, n. 10, p. 3103-12, 2016.

BRAVO, G.; GAUTHIER, P.; ROY, P. M.; PAYETTE, H.; GAULIN, P. A weight-bearing, water-based exercise program for osteopenic women: its impact on bone, functional fitness, and well-being. **Archives of physical medicine and rehabilitation**, v. 78, n. 12, p. 1375-1380, 1997.

CAMPBELL, B.; KREIDER, R. B.; ZIEGENFUSS, T.; LA BOUNTY, P.; ROBERTS, M.; BURKE, D.; LANDIS, J.; LOPEZ, H.; ANTONIO, J. International Society of Sports Nutrition position stand: protein and exercise. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 26, p. 4-8, 2007.

CAMPOS, L. M. A.; LIPHAUS, B. L.; SILVA, C. A. A.; PEREIRA, R. M. R. Osteoporose na infância e na adolescência. **The Journal of Pediatrics**, v. 79, n. 6, p. 481-8, 2003.

CAO, J. J.; JOHNSON, L. K.; HUNT, J. R. A diet high in meat protein and potential renal acid load increases fractional calcium absorption and urinary calcium excretion without affecting markers of bone resorption or formation in postmenopausal women. **The Journal of Nutrition**, v. 141, n. 3, p. 391-397, 2011.

CAO, J. J.; NIELSEN, F. H. Acid diet (high-meat protein) effects on calcium metabolism and bone health. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic care**, v. 13, n. 6, p.

698–702, 2010.

CAO, J.J.; GREGOIRE, B.R. A high-fat diet increases body weight and circulating estradiol concentrations but does not improve bone structural properties in ovariectomized mice. **Nutrition Research**, v. 36, n. 4, p. 320-327, 2016.

CECONI, C.; BORASO, A.; CARGONI, A.; FERRARI, R. Oxidative stress in cardiovascular disease: myth or fact? **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 420, n. 2, p. 217-221, 2003.

CHEN, X.; TIAN, H. M.; YU, X. J. Bone delivers its energy information to fat and islets through osteocalcin. **Orthopaedic Surgery**, v. 4, n. 2, p. 114-117, 2012.

CHENG, S.; SIPILA, S.; TAAFFE, D. R.; PUOLAKKA, J.; SUOMINEN, H. Change in bone mass distribution induced by hormone replacement therapy and high-impact physical exercise in post-menopausal women. **Bone**, v. 31, n. 1, p. 126-135, 2002.

CHEVALLEY, T.; BONJOUR, J. P.; VAN RIETBERGEN, B.; FERRARI, S.; RIZZOLI, R. Tracking of Environmental Determinants of Bone Structure and Strength Development in Healthy Boys: An Eight-Year Follow Up Study on the Positive Interaction Between Physical Activity and Protein Intake From Prepuberty to Mid-Late Adolescence. **Journal Bone Mineral Research**, v. 29, n. 10, p. 2182-2192, 2014.

CHEVALLEY, T.; RIZZOLI, R.; MANEN, D.; CAVERZASIO, J.; BONJOUR, J. P. Arginine increases insulin-like growth factor-I production and collagen synthesis in osteoblast-like cells. **Bone**, v. 23, n. 2, p. 103-109, 1998.

CRIBB, P. J.; WILLIAMS, A. D.; STATHIS, C. G.; CAREY, M. F.; HAYES, A. Effects of whey isolate, creatine, and resistance training on muscle hypertrophy. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 39, n. 2, p. 298-307, 2007.

D'AMELIO, P.; GRIMALDI, A.; DI BELLA, S.; BRIANZA, S. Z.; CRISTOFARO, M. A.; TAMONE, C.; GIRIBALDI, G.; ULLIERS, D.; PESCARMONA, G. P.; ISAIA, G. Estrogen deficiency increases osteoclastogenesis up-regulating T cells activity: a key mechanism in osteoporosis. **Bone**, v. 43, n. 1, p. 92-100, 2008.

DARGENT-MOLINA, P. Risk factors and prevention of fractures in the elderly. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 10, p. 357-361, 1998.

DAWSON-HUGHES, B. Interaction of dietary calcium and protein in bone health in humans.

**The Journal of Nutrition**, v. 133, n. 3, p. 852-854, 2003.

DUTRA, C. M. R.; PEREIRA, E.; SIQUEIRA, J. E.; KULCZYKI, M. M.; AGUIAR, L. R.; MANFFRA, E. F. Densidade mineral óssea de pessoas com lesão medular após seis meses de treino locomotor com suporte parcial de peso. **Fisioterapia em Movimento**, v. 25, n. 3, p. 489-495, 2012.

ERIKSEN, E. F. Cellular mechanisms of bone remodeling. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 11, n. 4, p. 219-227, 2010.

FALCAI, M. J.; ZAMARIOLI, A.; OKUBO, R.; DE PAULA, F. J. A.; VOLPON, J. B. 2015. The osteogenic effects of swimming, jumping, and vibration on the protection of bone quality from disuse bone loss. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 25, n. 3, p. 390-397, 2015.

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

FUJITA, K.; IWASAKI, M.; OCHI, H.; FUKUDA, T.; MA, C.; MIYAMOTO, T.; TAKITANI, K.; NEGISHI-KOGA, T.; SUNAMURA, S.; KODAMA, T.; TAKAYANAGI, H.; TAMAI, H.; KATO, S.; ARAI, H.; SHINOMIYA, K.; ITOH, H.; OKAWA, A.; TAKEDA, S. Vitamin E decreases bone mass by stimulating osteoclast fusion. **Nature Medicine**, v. 18, n. 4, p. 589-594, 2012.

GERARD-MONNIER, D.; ERDELMEIER, I.; REGNARD, K.; MOZE-HENRY, N.; YADAN, J.C.; CHAUDIERE, J. Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. **Chemical Research in Toxicology**, v. 11, n. 10, p. 1176-83, 1998.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

HAGIHARA, Y.; FUKUDA, S.; GOTO, S.; IIDA, H.; YAMAZAKI, M.; MORIYA, H. How many days per week should rats undergo running exercise to increase BMD? **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 23, n. 4, p. 289-294, 2005.

HALTON, T. L.; HU, F. B. The effects of high protein diets on thermogenesis, satiety and weight loss: a critical review. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 23, n.5, p. 373–385, 2004.

- HAMMER, A. The paradox of Wolff's theories. **Irish journal of medical science**, v. 184, n. 1, p. 13–22, 2015.
- HART, K. J.; SHAW, J. M.; VAJDA, E.; HEGSTED, M.; MILLER, S. C. Swim-trained rats have greater bone mass, density, strength, and dynamics. **Journal of Applied Physiology**, v. 91, n. 4, p. 1663-8, 2001.
- HAYES, A.; CRIBB, P. J. Effect of whey protein isolate on strength, body composition and muscle hypertrophy during resistance training. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 11, n. 1, p. 40-44, 2008.
- HONDA, A.; SOGO, N.; NAGASAWA, S.; SHIMIZU, T.; UMEMURA, Y. High-impact exercise strengthens bone in osteopenic ovariectomized rats with the same outcome as sham rats. **Journal of applied physiology**, v. 95, n. 3, p. 1032-1037, 2003.
- HOPPE, C.; MOLGAARD, C.; MICHAELSEN, K.F. Bone size and bone mass in 10-year-old Danish children: effect of current diet. **Osteoporosis International**, v. 11, n. 12, p. 1024-1030, 2000.
- HUNT, J. R.; JOHNSON, L. K.; FARIBA ROUGHEAD, Z. K. Dietary protein and calcium interact to influence calcium retention: a controlled feeding study. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 89, n. p. 1357–65, 2009.
- IWAMOTO, J.; SHIMAMURA, C.; TAKEDA, T.; ABE, H.; ICHIMURA, S.; SATO, Y.; TOYAMA, Y. Effects of treadmill exercise on bone mass, bone metabolism, and calciotropic hormones in young growing rats. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 22, n. 1, p. 26–31, 2004.
- JÄMSÄ, T.; RHO, J.Y.; FAN, Z.; MACKAY, C.A.; MARKS, S.C. JR.; TUUKKANEN, J. Mechanical properties in long bones of rat osteopetrotic mutations. **Journal of Biomechanics**, v. 35, n. 2, p.161-5, 2002.
- JEHLE, S.; HULTER, H. N.; KRAPF, R. On the mechanism of growth hormone-induced stimulation of renal acidification in humans: Effect of dietary NaCl. **Clin. Clinical Science**, v. 99, n. 1, p. 47–56, 2000.
- Jl, L. L. Antioxidant enzyme response to exercise and aging. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 25, n. 2, p. 225-31, 1993.
- JU, Y. I.; SONE, T.; OHNARU, K.; CHOI, H. J.; FUKUNAGA, M. Differential effects of

jump versus running exercise on trabecular architecture during remobilization after suspension-induced osteopenia in growing rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 112, n.5, p. 766–772, 2012.

JU, Y. I.; SONE, T.; OHNARU, K.; TANAKA, K.; YAMAGUCHI, H.; FUKUNAGA, M. Effects of different types of jump impact on trabecular bone mass and microarchitecture in growing rats. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. 107953, 2014.

JU, Y.I.; SONE, T.; OHNARU, K.; CHOI, H.J.; CHOI, K.A.; FUKUNAGA, M. Jump exercise during hindlimb unloading protect against the deterioration of trabecular bone microarchitecture in growing young rats. **Springerplus**, v. 2, n. 1, p. 35, 2013.

KALFAS, I. H. Principles of Bone Healing. **Neurosurgery Focus**. v. 10, n. 4, p. E1, 2001.  
KALU, D. N. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. **Bone and Mineral**, v. 15, n. 3, p. 175-91, 1991.

KARSENTY, G.; KRONENBERG, H. M.; SETTEMBRE, C. Genetic control of bone formation. **Annual Review of Cell and Developmental**, v. 25, p. 629-648, 2009.

KERSTETTER, J. E.; O'BRIEN, K. O.; CASERIA, D. M.; WALL, D. E.; INSOGNA, K. L. The impact of dietary protein on calcium absorption and kinetic measures of bone turnover in women. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 90, n. 1, p. 26–31, 2005.

KERSTETTER, J. E.; O'BRIEN, K. O.; INSOGNA, K. L. Dietary protein, calcium metabolism, and skeletal homeostasis revisited. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 78, n. 3, p. 584S-592S, 2003.

KULAK, C. A.; DEMPSTER, D.W. Bone histomorphometry: a concise review for endocrinologists and clinicians. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 54, n. 2, p. 87-98, 2010.

LACROIX, M.; GAUDICHON, C.; MARTIN, A.; MORENS, C.; MATHE, V.; TOME, D.; HUNEAU, J. F. A long- term high-protein diet markedly reduces adipose tissue without major side effects in Wistar male rats. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 287, n. 4, p. 934-42, 2004.

LANGDAHL, B.L.; KASSEM, M.; MOLLER, M.K.; ERIKSEN, E.F. The effects of IGF-I and IGF-II on proliferation and differentiation of human osteoblasts and interactions with growth hormone. **European journal of clinical investigation**, v. 28, n.3, p. 176–83, 1998.

LESPESSAILLES, E.; JAFFRE, C.; BEAUPIED, H.; NANYAN, P.; DOLLEANS, E.; BENHAMOU, C.L.; COURTEIX, D. Does Exercise Modify the Effects of Zoledronic Acid on Bone Mass, Microarchitecture, Biomechanics, and Turnover in Ovariectomized Rats? **Calcified Tissue International**, v. 85, n. 5, p. 146-157, 2009.

LI, M.; SHEN, Y.; WRONSKI, T. J. Time course of femoral neck osteopenia in ovariectomized rats. **Bone**, v. 20, n. 1, p. 55-61, 1997.

MAALOUF, G.; GANNAGE-YARED, M. H.; EZZEDINE, J.; LARIJANI, B.; BADAWI, S.; RACHED, A.; ZAKROUI, L.; MASRI, B.; AZAR, E.; SABA, E.; NAMMARI, R.; ADIB, G.; ABOU SAMRA, H.; ALRAWI, Z.; SALMAN, S.; EL MUNTASSER, K.; TARSEEN, R.; EL KHAROUSI, W.; AL-LAMKI, M.; ALOTHMAN, A. N.; ALMARZOOK, N.; EL DESSOUKI, M.; SULAIMANI, R.; SALEH, J.; SUHAILI, A. R.; KHAN, A.; DELMAS, P.; SEEMAN, E. Middle East and North Africa consensus on osteoporosis. **Journal of musculoskeletal & neuronal interactions**, v. 7, n. 2, p. 131-43, 2007.

MACEDO, A. P.; SHIMANO, R. C.; FERRARI, D. T.; ISSA, J. P. M.; JORDÃO, A. A.; SHIMANO, A. C. Influence of treadmill training on bone structure under osteometabolic alteration in rats subjected to high-fat diet. **Scandinavian journal of medicine & science in sports**, v. 27, n. 2, p. 167-176, 2016.

MANGANO, K. M.; SAHNI, S.; KERSTETTER, J. E. Dietary protein is beneficial to bone health under conditions of adequate calcium intake: an update on clinical research. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, v. 17, n. 1, p. 69-74 2014.

MANOLAGAS, S. C. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. **Endocrine reviews**, v. 21, n. 2, p. 115-137, 2000.

MARDON, J.; HABAUZIT, V.; TRZECIAKIEWICZ, A.; DAVICCO, M. J.; LEBECQUE, P.; MERCIER, S.; TRESSOL, J. C.; HORCAJADA, M. N.; DEMIGNÉ, C.; COXAM, V. Long-term intake of a high-protein diet with or without potassium citrate modulates acid-base metabolism, but not bone status, in male rats. **The Journal of nutrition**, v. 138, n. 4, p. 718-724, 2008.

MARTIN, R. B. Targeted bone remodeling involves BMU steering as well as activation. **Bone**, v. 40, n. 6, p. 1574-80, 2007.

MARTYN-ST JAMES, M.; CARROLL, S. Meta-analysis of walking for preservation of bone mineral density in postmenopausal women. **Bone**, v. 43, n. 3, p. 521-531, 2008.

MASSEY, L. K. Dietary animal and plant protein and human bone health: a whole foods approach. **The Journal of nutrition**, v. 133, n. 3, p. 862S-865S, 2003.

MONTILLA, R. N. G.; ALDRIGHI, J. M.; MARUCCI, M.F.N. Relação cálcio/proteína da dieta de mulheres no climatério. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 50, n. 1, p. 52-54, 2004.

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

MUHAMMAD, N.; LUKE, D. A.; SHUID, A. N.; MOHAMED, N.; SOELAIMAN, I. N. Two different isomers of vitamin e prevent bone loss in postmenopausal osteoporosis rat model. *Evid Based Complement Alternat Med*, v. 2012, p. 161527, 2012. doi: 10.1155/2012/161527.

MUNGER, R. G.; CERHAN, J. R.; CHIU, B. C. Prospective study of dietary protein intake and risk of hip fracture in postmenopausal women. **The American journal of clinical nutrition**, v. 69, n. 1, p. 147-152, 1999.

NAGASAWA, S.; HONDA, A.; SOGO, N.; UMEMURA, Y. Effects of low-repetition jump exercise on osteogenic response in rats. **Journal of Bone Mineral Metabolism**, v. 26, n. 3, p. 226-230, 2008.

NASCIMENTO DA SILVA, Z.; AZEVEDO DE JESUZ V, DE SALVO CASTRO, E.; SOARES DA COSTA, C. A.; TELES BOAVENTURA, G.; BLONDET DE AZEREDO, V. Effect of the “protein diet” and bone tissue. **Nutrición hospitalaria**, v. 29, n. 1, p. 140-5, 2014.

NAVEGA, M.T.; AVEIRO, M.C.; OISHI, J. Alongamento, caminhada e fortalecimento dos músculos da coxa: um programa de atividade física para mulheres com osteoporose. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 7, n. 3, p. 261-267, 2003.

NEW, S. A.; ROBINS, S. P.; CAMPBELL, M. K.; MARTIN, J. C.; GARTON, M. J.; BOLTON-SMITH, C.; GRUBB, D. A.; LEE, S. J.; REID, D. M. Dietary influences on bone mass and bone metabolism: further evidence of a positive link between fruit and vegetable consumption and bone health? **The American journal of clinical nutrition**, v. 71, n.1, p. 142-51, 2000.

NIKANDER, R.; SIEVANEN, H.; HEINONEN, A.; DALY, R. M.; UUSI-RASI, K.; KANNUS, P. Targeted exercise against osteoporosis: A systematic review and meta-analysis for optimising bone strength throughout life. **BMC Medicine**, v. 8, p. 47, 2010.

NIKANDER, R.; SIEVANEN, H.; HEINONEN, A.; KANNUS, P. Femoral neck structure in adult female athletes subjected to different loading modalities. **Journal of bone and mineral research**, v. 20, n. 3, p. 520–528, 2005.

NORDIN, B. E. C. Skeletal metabolism. **Acta Orthopaedica Scandinavica**. v. 54, p. 482, 1983.

O'CONNELL, M. B.; MADDEN, D. M.; MURRAY, A. M.; HEANEY, R. P.; KERZNER, L. J. Effects of proton pump inhibitors on calcium carbonate absorption in women: a randomized crossover trial. **The American Journal of Medicine**, v. 118, n. 7, p. 778–81, 2005.

OKAZAKI, R.; INOUE, D.; SHIBATA, M.; SAIKA, M.; KIDO, S.; OOKA, H.; TOMIYAMA, H.; SAKAMOTO, Y.; MATSUMOTO, T. Estrogen promotes early osteoblast differentiation and inhibits adipocyte differentiation in mouse bone marrow stromal cell lines that express estrogen receptor (ER) alpha or beta. **Journal of Endocrinology**, v. 143, n. 6, p. 2349-56, 2002.

OKUBO, R.; SANADA, L. S.; CASTANIA, V. A.; LOUZADA, M. J.; DE PAULA, F. J.; MAFFULLI, N.; SHIMANO, A. C. Jumping exercise preserves bone mineral density and mechanical properties in osteopenic ovariectomized rats even following established osteopenia. **Osteoporosis International**, v. 28, n. 4, p. 1461-1471, 2017.

OTT, S. M. Attainment of peak bone mass. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**. v.71, n. 5, p. 1082A-1082C, 1990.

OTTEN, J. H. J.; MEYERS, L. (Ed). **Dietary Reference Intakes: The Essential Guide to Nutrient Requirements**. Washington: The National Academies Press, 2006.

OWEN, T.A.; ARONOW, M.; SHALHOUB, V.; BARONE, L. M.; WILMING, L.; TASSINARI, M.S.; KENNEDY, M. B.; POCKWINSE, S.; LIAN, J. B.; STEIN, G. S. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. **Journal of Cellular Physiology**, v. 143, n. 3, p. 420-430, 1990.

PALIOLOGO, T.; SHIMANO, R. C.; SHIMANO, A. C.; MACEDO, A. P.; FALCAI, M. J.; ISSA, J. P. Effects of swimming associated with risedronate in osteopenic bones: An experimental study with ovariectomized rats. **Micron**, v. 78, p. 40-4, 2015.

PAPAPOULOS, S. E. Anabolic bone therapies in 2014: new bone-forming treatments for osteoporosis. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 11, n. 1, p. 69-70, 2015.

PARFITT, A. M.; DREZNER, M. K.; GLORIEUX, F. H.; KANIS, J. A.; MALLUCHE, H.; MEUNIER, P. J.; OTT, S. M.; RECKER, R. R. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. **Bone and Mineral Research**, v. 2, n. 6, p. 595–610, 1987.

PICHON, L.; POTIER, M.; TOME, D.; MIKOGAMI, T.; LAPLAIZE, B.; MARTIN-ROUAS, C.; FROMENTIN, G. High-protein diets containing different milk protein fractions differently influence energy intake and adiposity in the rat. **The British Journal of Nutrition**, v. 99, n. 4, p. 739-748, 2008.

PORTINHO, D.; BOIN, V. G.; BERTOLINI, G. R. F. Efeitos sobre o tecido ósseo e cartilagem articular provocados pela imobilização e remobilização em ratos Wistar. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 14, n. 5, p. 408-411, 2008.

PRITCHARD, J. E.; NOWSON, C. A.; WARK, J. D. Bone loss accompanying diet- induced or exercise-induced weight loss: A randomized controlled study. **International journal of obesity and related metabolic disorders**, v. 20, n. 6, p. 513-520, 1996.

RAJESHWARI, R.; NICKLAS, T. A.; YANG, S. J.; BERENSON, G. S. Longitudinal changes in intake and food sources of calcium from childhood to young adulthood: The Bogalusa Heart Study. **The Journal of the American College of Nutrition**, v. 23, n. 4, p. 341-50, 2004.

REID, I. R. Relationships among body mass, its components, and bone. **Bone**, v. 31, n. 5, p. 547-555, 2002.

REMER, T.; MANZ, F. Potential renal acid load of foods and its influence on urine pH. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 95, n. 7, p. 791-797, 1995.

RENA, R. M. **A mulher e a osteoporose: como prevenir e controlar**. São Paulo: Látia, 2005.

RIZZOLI, R.; SCHÜRCH, M. A.; CHEVALLEY, T.; AMMANN, P.; BONJOUR, J. P. Protein Intake and Osteoporosis. In: Burckhardt, P.; Dawson-Hughes, B.; Heaney, R.P. (eds) **Nutritional Aspects of Osteoporosis**. Proceedings in the Sero Symposia USA Series. Springer, New York, NY, 1998.

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

ROBLING, A. G.; CASTILLO, A. B.; TURNER, C. H. Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. **Annual review of biomedical engineering**, v. 8, p. 455-498, 2006.

RODRIGUEZ, N. R.; DI MARCO, N. M.; LANGLEY, S. American College of Sports Medicine position stand. Nutrition and athletic performance. **Medicine and Science in Sports Exercise**, v. 41, n. 3, p. 709-731, 2009.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical biochemistry**, v. 25, n. 1, p. 192-205, 1968.

SELLMEYER, D. E.; STONE, K. L.; SEBASTIAN, A.; CUMMINGS, S. R. A high ratio of dietary animal to vegetable protein increases the rate of bone loss and the risk of fracture in postmenopausal women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. **The American journal of clinical nutrition**, v. 73, n. 1, p. 118-22, 2001.

SHAW, J. M.; WITZKE, K. A. Exercise for Skeletal Health and Osteoporosis Prevention. In ACSM'S RESOURCE. Manual for guidelines for exercise testing and prescription. 3.ed. Baltimore : Willians and Wilkins, , 288-239, 1998.

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

SHIMANO, R. C.; MACEDO, A. P.; FALCAI, M. J.; ERVOLINO, E.; SHIMANO, A. C.; ISSA, J. P. M. Biomechanical and microstructural benefits of physical exercise associated with risedronate in bones of ovariectomized rats. **Microscopy Research and Technique**, v. 77, n. 6, p. 431-438, 2014.

SILVA, Z. N.; JESUZ, V. A.; SALVO, C. E.; COSTA, C. A. S.; Boaventura, G. T.; Azeredo, V.B. Effect of the "protein diet" and bone tissue. **Nutrición Hospitalaria**, v. 29, n. 1, p. 140-145, 2014.

TAKEDA, S.; KOBAYASHI, Y.; PARK, J. H.; EZAWA, I.; OMI, N. Effect of different intake levels of dietary protein and physical exercise on bone mineral density and bone strength in growing male rats. **Journal of nutritional science and vitaminology**, v. 58, n. 4, p. 240-6, 2012.

TALBOTT, S. M.; CIFUENTES, M.; DUNN, M. G.; SHAPSES, S. A. Energy restriction reduces bone density and biomechanical properties in aged female rats. **The Journal of**

**nutrition**, v. 131, n.9, p. 2382-2387, 2001.

TANG, L.; GAO, X.; YANG, X.; LIU, C.; WANG, X.; HAN, Y.; ZHAO, X.; CHI, A.; SUN, L. Ladder-Climbing Training Prevents Bone Loss and Microarchitecture Deterioration in Diet-Induced Obese Rats. **Calcified Tissue International**, v. 98, n. 1, p. 85-93, 2016.

THOMPSON, D. D; SIMMONS, H. A.; PIRIE C. M.; KE, H. Z. FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. **Bone**, v.15, n.4, p.125S-133S, 1995.

YAKAR, S.; ROSEN, C. J.; BEAMER, W. G.; ACKERT-BICKNELL, C. L.; WU, Y.; LIU, J. L.; OOI, G. T.; SETSER, J.; FRYSTYK, J.; BOISCLAIR, Y. R.; LEROITH, D. Circulating levels of IGF-1 directly regulate bone growth and density. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 110, n. 6, p. 771-781, 2002.

YAMANAKA, J. S.; YANAGIHARA, G. R.; CARLOS, B. L.; RAMOS, J.; BRANCALEON, B. B.; MACEDO, A. P.; ISSA, J. P. M.; SHIMANO, A. C. A high-fat diet can affect bone healing in growing rats. **Journal of bone and mineral metabolism**, 2017. doi: 10.1007/s00774-017-0837-4.

YANAGIHARA, G. R.; PAIVA, A. G.; GASPARINI, G. A.; MACEDO, A. P.; FRIGHETTO, P. D.; VOLPON, J. B.; SHIMANO, A. C. High-impact exercise in rats prior to and during suspension can prevent bone loss. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 49, n. 3, p. 5086, 2016.

YEAGER, K.K.; AGOSTINI, R.; NATTIV, A.; DRINKWATER, B. The female athlete triad: disordered eating, amenorrhea, osteoporosis. **Medicine Science Sports e Exercise**, v. 25, n. 7, p. 775-777, 1993.

ZARROW, M. X.; BROWN-GRANT, K. Inhibition of ovulation in the gonadotrophin-treated immature rat by chlorpromazine. **The Journal of Endocrinology**, v. 30, p. 87-95, 1964.

ZERWEKH, J. E.; ZOU, L.; PAK, C. Y. C.; MOE, O. W.; PREISIG, P. A. Biochemical and Histological Assessment of Alkali Therapy During High Animal Protein Intake in the Rat. **Bone**, v. 45, n. 5, p. 1004-1009, 2009.

*Anexos*





UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Comissão de Ética no Uso de Animais – FMRP - USP

3602-3301

## CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação n° 001/2014-1, sobre o projeto intitulado *“Efeitos do exercício de alto impacto (salto) nas propriedades físicas de ossos de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperprotéica”*, sob a responsabilidade do **Professor Doutor João Paulo Mardegan Issa** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 31 de março de 2014.

We certify that the protocol n° 001/2014-1, entitled *“Effects of high impact exercise (jump) on the physical properties of bones from ovariectomized rats submitted to protein diet”*, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the School of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo in 03/31/2014.

Ribeirão Preto, 31 de março de 2014.

**Prof. Dr. Omerô Benedicto Poli-Neto**  
Presidente da CEUA – FMRP - USP