



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

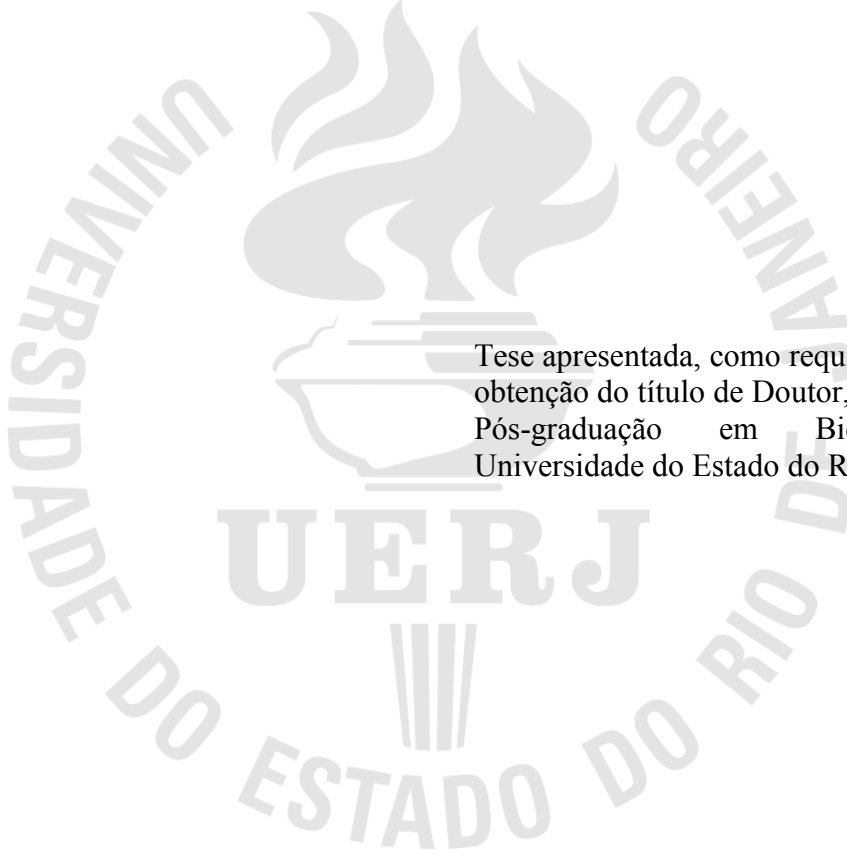
Aluana Santana Carlos

**Avaliação do uso de treinamento de força e/ou do tratamento com estradiol
sobre parâmetros ósseos, metabólicos e a adiposidade de ratas adultas
ovariectomizadas**

Rio de Janeiro
2015

Aluana Santana Carlos

Avaliação do uso de treinamento de força e/ou do tratamento com estradiol sobre parâmetros ósseos, metabólicos e a adiposidade de ratas adultas ovariectomizadas



Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof^ª. Celly Cristina Alves Nascimento Saba

Coorientadora: Prof^ª. Patrícia Cristina Lisboa

Rio de Janeiro

2015

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

C284 Carlos, Aluana Santana

Avaliação do uso de treinamento de força e/ou do tratamento com estradiol sobre parâmetros ósseos, metabólicos e a adiposidade de ratas adultas ovariectomizadas / Aluana Santana Carlos. – 2015.

134 f.

Orientadora: Prof^ª. Celly Cristina Alves Nascimento Saba

Coorientadora: Prof^ª. Patrícia Cristina Lisboa

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Ovariectomia - Teses. 2. Estradiol - Teses. 3. Composição corporal - Teses. 4. Metabolismo – Teses. 5. Ratos Wistar - Teses. I. Saba, Celly Cristina Alves Nascimento. II. Lisboa, Patrícia Cristina. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 615.8

Bibliotecária: Thais Ferreira Vieira _ CRB7/5302

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Aluana Santana Carlos

Avaliação do uso de treinamento de força e/ou do tratamento com estradiol sobre parâmetros ósseos, metabólicos e a adiposidade de ratas adultas ovariectomizadas

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 06 de fevereiro de 2015.

Orientadora:

Prof^ª. Celly Cristina Alves Nascimento Saba
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

Prof^ª. Elaine de Oliveira
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof^ª. Dr^ª. Eliete Bouskela
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof^ª. Josely Correa Koury
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof^ª. Andrea Claudia Freitas Ferreira
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2015

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha mãe Ana Maria Santana por se abster de muitas coisas para que eu pudesse chegar aqui. Todo o meu amor e gratidão por tudo o que fez por mim ao longo da minha vida. Desejo ter sido merecedora do esforço dedicado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço às pessoas mais importantes para mim, minha querida mãe Ana Maria Santana principal responsável pela minha vida.

Agradeço ao meu esposo Humberto Santos da Silva Junior sempre paciente e generoso em meus momentos de desânimo e falta de estímulo.

A minha sogra Vera Lúcia Santos da Silva e minha cunhadinha Daiana Santos da Silva pelo carinho, amor e apoio nos momentos difíceis que passei em minha vida.

A minha orientadora, Prof. Celly Cristina A. Nascimento Saba por que sinto profunda admiração, respeito e gratidão. Agradeço a você todos os ensinamentos e o cuidado para que eu sempre tomasse a melhor decisão científica e profissional. Obrigado por estar sempre presente, pelo incentivo e principalmente pelos ensinamentos.

A Prof. Patricia Cristina Lisboa e ao Prof. Egberto Gaspar Moura por incentivo e pelas orientações durante todo meu percurso e pelo suporte no desenvolvimento desta pesquisa.

A Prof. Dra. Eliete Bouskela e Prof. Dr. Luiz Guilherme Kraemer De Aguiar pelas oportunidades oferecidas, por todo o suporte necessário dado pelo BIOVASC para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao meu amigo Richard Leite sempre disposto a me ajudar, sendo fundamentais para o protocolo do treinamento de força.

A Ellen da Conceição por se disponibilizar prontamente para me ajudar realizar a dosagem nos tecidos.

Aos amigos Aline de Souza Santos da Silva, Carlos Alberto Soares da Costa, Gabriele de Paula Lopes Gonzalez, Sanderson Alves pelo carinho, amizade e com quem tenho o prazer de dividir experiências, objetivos e projetos de vida e pesquisa.

Este trabalho não é resultado apenas de um esforço individual. Ele nasce de significativas contribuições que recolhi durante minha trajetória profissional, acadêmica ao lidar com pessoas que foram fundamentais a essa construção. Muito Obrigada!

A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada, ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro.

Albert Einstein

RESUMO

CARLOS, Aluana Santana. *Avaliação do uso de treinamento de força e/ou do tratamento com estradiol sobre parâmetros ósseos, metabólicos e a adiposidade de ratas adultas ovariectomizadas*. 2015. 134 f. Tese (Doutorado em Biociências). Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Com o aumento da expectativa de vida, o impacto negativo da deficiência estrogênica tornou-se mais significativo para as mulheres. Tanto o treinamento força quanto à terapia de reposição hormonal se mostraram capazes de atenuar diversos sintomas deletérios da menopausa. O presente trabalho teve como objetivo estudar os efeitos do treinamento força e/ou do tratamento hormonal sobre a estrutura óssea, o metabolismo e a adiposidade de ratas adultas ovariectomizadas. Na primeira etapa (protocolo 1) foi estabelecida a forma de tratamento hormonal. Para tal, 32 fêmeas *Wistar* foram ovariectomizadas aos 90 dias de vida e divididas em quatro grupos experimentais (n=8/cada): Sham (controle), OVX (ovariectomizada), BED (ovariectomizadas, tratadas com estradiol 0,7µg/100g diariamente) e BEC (ovariectomizadas, tratadas com estradiol de 1.5µg/100g, ciclicamente). O tratamento teve início aos 120 dias de vida, com duração de 21 dias. O tratamento diário induziu efeitos negativos com a diminuição da ingestão alimentar e o aumento da massa do útero. O tratamento hormonal sobre os parâmetros ósseos avaliados indicam que tanto o tratamento diário como o cíclico promovem na ovariectomia equilíbrios entre os processos de reabsorção e formação óssea, porém o tratamento diário proporcionou uma influência negativa sobre a massa do útero e a morfologia do tecido adiposo subcutâneo. Por esse motivo o tratamento cíclico foi escolhido por induzir modificações positivas sobre os tecidos avaliados. Na segunda etapa do estudo (protocolo 2), foram avaliadas 40 fêmeas *Wistar* divididas, aos 120 dias de vidas, em cinco grupos experimentais (n=8/cada): Sham (controle), OVX (ovariectomizadas), ovariectomizadas tratadas com benzoato de estradiol (BE), ovariectomizadas treinadas (EX) e ovariectomizadas tratadas com benzoato de estradiol e treinadas (BE+EX), sendo o período experimental de 6 semanas. O treinamento de força e/ou a reposição cíclica proporcionou para a estrutura óssea melhora da microarquitetura com aumento da expressão de ER α , aumento das dimensões ósseas, densidade mineral óssea do fêmur. No tecido adiposo também foi observado a diminuição da massa e área dos adipócitos, no conteúdo de gordura corporal total e do tronco, aumento da expressão de PPAR- γ e melhoras sobre os perfis glicêmicos e hormonais. O treinamento força mostrou-se capaz de induzir de forma benéfica algumas alterações fisiopatológicas relacionadas à menopausa, promovendo mudanças importantes sobre a adiposidade e a estrutura óssea. Além disso, esta modalidade de treinamento associada ao tratamento hormonal também foi capaz de promover maiores mudanças nos parâmetros ósseos e de adiposidade. Com isso, houve melhoras na expressão de PPAR- γ , no conteúdo de glicogênio hepático, nos depósitos de gordura, no perfil bioquímico e na expressão de ER α no tecido ósseo. Com base em nossos achados, concluímos que o treinamento força deve ser considerado uma ferramenta de valor contra os efeitos deletérios induzidos pela deficiência estrogênica.

Palavras-chave: Treinamento de força. Estradiol. Osso. Tecido adiposo. Ovariectomia. Ratas.

ABSTRACT

CARLOS, Aluana Santana. *Evaluation of resistance training of use and / or to treatment with estradiol about bone parameters, metabolic and adiposity in adult ovariectomized rats*. 2015. 134 f. Tese (Doutorado em Biociências). Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

The increasing taxes of life expectancy, the negative impact of estrogen deficiency has become more significant to women. Both resistance training and hormone replacement therapy have shown capacity of attenuating several deleterious symptoms of menopause. The present study investigated the effects of resistance training and/or hormone replacement on the parameter of bone structure, metabolism and adiposity of adult female ovariectomized rats. In the first stage (protocol 1) it was established the form of hormone treatment. To achieve that, 32 females Wistar were previously evaluated by vaginal cytology (76 days), ovariectomized after 90 days they were born and divided in four experimental groups (n=8/each): Sham (control), OVX (ovariectomized), BED (ovariectomized, treated with estradiol 0,7µg/100g daily) and BEC (ovariectomized, treated with estradiol (1.5µg/100g cyclic). The treatment had its beginning after 120 days they were born, during 21 days. It was analyzed the corporal composition, fat mass, adipocyte tissue morphology. Daily treatment induced negative effects with the reduction on food intake and the growth of the uterine mass, on the adipose tissues there was a reduction of the area, but with the appearing of great deposits of extracellular matrix. The cyclical treatment led to decreased body mass, fat mass, decreased adipocyte area. Therefore the cyclic treatment was chosen to induce positive changes in the tissues evaluated. In the second stage of the study (protocol 2), 40 female Wistar divided in five experimental groups (n=8/each): Sham (control), OVX (ovariectomized), BE (ovariectomized treated with estradiol benzoate), EX (trained ovariectomized) and BE+EX (trained ovariectomized treated with estradiol benzoate), going through a 6-weeks experiment. The resistance training and/or cyclic replacement provided to the bone structure improvement of the microarchitecture with increasing expression of $Er\alpha$, growth of the bone dimensions, mineral density of the femur the L4 vertebra. On the adipose tissue it was also observed the reduction of the mass and the adipocyte area; on the content of total body fat and of the trunk, increasing of the expression of PPAR- γ and improvements on the glycemic and hormonal profiles. The content of hepatic glycogen was also benefic for both treatments. Hence, there was progress on the expression of PPAR- γ , on the content of hepatic glycogen, on the fat deposits, on the biochemical profile and on the $ER\alpha$ expression on the osseous tissue. Based on our studies, we concluded that strength training must be considered a worthy tool against deleterious effects provoked by estrogenic deficiency.

Keywords: resistance training. estradiol. bone. adipose tissue. ovariectomy. rats.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Alterações hormonais associadas ao envelhecimento reprodutivo.....	20
Figura 2 -	Estrutura do osso longo com ampliação da região da diáfase.....	27
Figura 3 -	Possíveis vias de ação do estrógeno sobre a reabsorção óssea.....	29
Figura 4 -	Estrutura óssea de um indivíduo normal e com osteoporose.....	31
Figura 5 -	Distribuição anatômica do tecido adiposo branco em roedores.....	37
Figura 6 -	Fotografia demonstrando a cirurgia da remoção bilateral dos ovários.....	47
Figura 7 -	Fotografia demonstrando o aparelho GE Healthcare.....	48
Figura 8 -	Escada para treinamento de força.....	54
Figura 9 -	Fotomicrografia demonstrando o aspecto morfológico do tecido adiposo subcutâneo de ratas aos 141 dias de idade.....	68
Figura 10 -	Fotomicrografia demonstrando o aspecto morfológico do tecido adiposo retroperitoneal de ratas aos 141 dias de idade.....	70
Figura 11 -	Imagem, em secção de 3 mm, demonstrando a radiodensidade de peças ósseas, fêmur e vértebra L4 de ratas aos 141 dias de vida.....	74
Figura 12 -	Fotomicrografia demonstrando o aspecto morfológico do tecido adiposo subcutâneo de ratas aos 165 dias de vida.....	85
Figura 13 -	Fotomicrografia de tecido adiposo subcutâneo de ratas aos 165 dias de vida evidenciando expressão de PPAR γ	88
Figura 14 -	Fotomicrografia de tecido adiposo retroperitoneal de ratas aos 165 dias de vida.....	89
Figura 15 -	Fotomicrografia de tecido adiposo retroperitoneal de ratas aos 165 dias de vida evidenciando expressão de PPAR γ	92
Figura 16 -	Fotomicrografia de tecido adiposo mesentérico de ratas aos 165 dias de vida.....	93
Figura 17 -	Fotomicrografia de tecido adiposo mesentérico de ratas aos 165 dias de vida, evidenciando expressão de PPAR γ	96
Figura 18 -	Fotomicrografia de fêmur de ratas do grupo Sham aos 165 dias de vida.....	100
Figura 19 -	Fotomicrografia de fêmur de ratas do grupo OVX aos 165 dias de vida.....	101
Figura 20 -	Fotomicrografia de fêmur de ratas do grupo BE aos 165 dias de vida.....	102
Figura 21 -	Fotomicrografia de fêmur de ratas do grupo EX aos 165 dias de vida.....	103

Figura 22 – Fotomicrografia de fêmur de ratas do grupo BE+ EX aos 165 dias de vida.....	104
Figura 23 – Fotomicrografia de fêmur de ratas aos 165 dias de vida evidenciando expressão de ER α	105

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Evolução da ingestão alimentar.....	61
Gráfico 2 -	Evolução da massa corporal.....	62
Gráfico 3 -	Massa do útero.....	63
Gráfico 4 -	Massa de tecido adiposo retroperitoneal.....	64
Gráfico 5 -	Massa de tecido adiposo mesentérico.....	67
Gráfico 6 -	Análise morfométrica do tecido adiposo subcutâneo.....	69
Gráfico 7 -	Análise morfométrica do tecido adiposo retroperitoneal.....	71
Gráfico 8 -	Análises das radiodensidades ósseas de fêmur e vértebra L4....	75
Gráfico 9 -	Análises do conteúdo e densidade mineral ósseo de fêmur e vértebra L4	76
Gráfico 10 -	Evolução da massa corporal.....	78
Gráfico 11 -	Concentrações séricas.....	82
Gráfico 12 -	Conteúdo hepático de colesterol, triglicerídeos e glicogênio.....	83
Gráfico 13 -	Morfometria de adipócitos subcutâneos.....	87
Gráfico 14 -	Morfometria de adipócitos retroperitoneais de ratas aos 165 dias de vida	91
Gráfico 15 -	Morfometria de adipócitos mesentéricos	95
Gráfico 16 -	Análises da densidade mineral óssea de fêmur (A) e vértebra L4 .	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1– Definições dos valores básicos de T-score.....	34
Tabela 2 – Marcadores bioquímicos ósseos disponíveis comercialmente.....	34
Tabela 3 – Parâmetros de composição corporal determinados por DXA.....	66
Tabela 4 – Avaliações séricas.....	67
Tabela 5 – Dimensões ósseas.....	72
Tabela 6 – Parâmetros físicos de vértebra L4.....	73
Tabela 7 – Parâmetros físicos de fêmur.....	73
Tabela 8 – Consumo alimentar.....	77
Tabela 9 – Massa dos órgãos.....	79
Tabela 10– Parâmetros de avaliação corporal por DXA.....	80
Tabela 11 – Índices lipídicos, glicêmicos, proteína e fósforo no soro.....	81
Tabela 12– Dimensões ósseas.....	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
ATP	Trifosfato de adenosina
BMP	Proteínas morfogenéticas ósseas
CMO	Conteúdo mineral ósseo
CSF-1	Fator estimulador de colônias tipo 1
CUCC	Centro Universitário de Controle do Câncer
DEXA	Absorciometria por dupla emissão de raios X
DMO	Densidade mineral óssea
DPA	Duplo fóton
E	Estrógeno ou estrogênio
E1	Estrona
E2	Estradiol
E3	Estriol
ER α	Receptor estrogênico tipo alfa
ER β	Receptor estrogênico tipo beta
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
FSH	Hormônio folículo-estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
HDL	Lipoproteínas de alta densidade
IBRAG	Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes
IL-6	Interleucina tipo 6
IGF-1	Fator de crescimento semelhante insulina-1
LH	Hormônio luteinizante
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
PAI-1	Inibidor ativador do plasminogênio tipo 1
PTH	Paratormônio
PPAR- γ	Receptor ativado por proliferador de peroxissoma tipo gama
PPAR- α	Receptor ativado por proliferador de peroxissoma tipo alfa
QCT	Tomografia computadorizada quantitativa
RANK	Receptor ativador do fator nuclear Kappa B
RANKL	Ligante do receptor do ativador do fator nuclear Kappa B

SPA	Absorciometria de feixe único de energia
TNF- α	Fator de necrose tumoral tipo alfa
TF	Treinamento de força
TG	Triacilglicerol, triglicerídeo
TGF β	Fator de crescimento transformante tipo alfa
TRH	Terapia de reposição hormonal
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
VO	Volume ósseo

SUMÁRIO^[Th1]

	INTRODUÇÃO	17
1	REVISÃO DA LITERATURA	19
1.1	Climatério e Menopausa	19
1.1.1	<u>Esteróides sexuais femininos e alterações induzidas pela menopausa</u>	21
1.2	O tecido ósseo	23
1.2.1	<u>Controle da estrutura óssea</u>	27
1.2.2	<u>A estrutura óssea no envelhecimento</u>	30
1.2.3	<u>Técnicas de avaliação da estrutura óssea</u>	33
1.3	O tecido adiposo branco	35
1.3.1	<u>Distribuição de tecido adiposo</u>	36
1.3.2	<u>Tecido adiposo e menopausa</u>	37
1.4	Estratégias para prevenir ou controlar os efeitos deletérios da menopausa	38
1.5	Exercício físico	40
1.5.1	<u>Treinamento de força/ Exercício resistido</u>	42
2	JUSTIFICATIVA	44
3	OBJETIVO	45
3.1	Objetivos Específicos	45
4	MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.1	Protocolo 1: Padronização do esquema de tratamento hormonal cíclico e diário em ratas adultas ovariectomizadas..	46
4.1.1	<u>Tratamento dos animais</u>	46
4.1.2	<u>Avaliação da massa corporal e ingestão alimentar</u>	47
4.1.3	<u>Avaliação da composição corporal</u>	48
4.1.4	<u>Coleta de tecidos</u>	48
4.1.5	<u>Dosagens séricas</u>	49
4.1.6	<u>Morfologia do tecido adiposo retroperitoneal e subcutâneo</u>	49
4.1.7	<u>Análises ósseas</u>	50
4.1.7.1	<u>Dimensões ósseas</u>	50

4.1.7.2	Parâmetros físicos dos ossos.....	50
4.1.7.3	Radiodensidade óssea.....	51
4.1.7.4	Densidade e Conteúdo mineral ósseos.....	51
4.1.8	<u>Análise Estatística</u>	51
4.2	Protocolo 2: Efeito do tratamento com estradiol e/ou treinamento de força em ratas adultas ovariectomizadas.....	52
4.2.1	<u>Tratamento dos animais</u>	52
4.2.2	<u>Protocolo de treinamento de força</u>	53
4.2.3	<u>Avaliação da massa corporal e da ingestão alimentar</u>	54
4.2.4	<u>Avaliação da composição corporal</u>	54
4.2.5	<u>Coleta de tecidos</u>	55
4.2.6	<u>Dosagens séricas</u>	55
4.2.7	<u>Processamento e análise morfológica de tecido adiposo</u>	56
4.2.7.1	Imunohistoquímica do tecido adiposo.....	56
4.2.8	<u>Dosagem de triglicerídeo, colesterol e glicogênio hepáticos</u>	57
4.2.9	<u>Análises ósseas</u>	57
4.2.9.1	Dimensões ósseas.....	57
4.2.9.2	Densidade e Conteúdo mineral ósseo.....	58
4.2.9.3	Processamento histológico do tecido ósseo.....	58
4.2.9.4	Imunohistoquímica do tecido ósseo.....	58
4.2.10	<u>Análise estatística</u>	59
5	RESULTADOS DO PROTOCOLO 1: Padronização do esquema de tratamento hormonal cíclico e diário em ratas adultas ovariectomizadas.....	60
5.1	Evolução do consumo alimentar	60
5.2	Evolução da massa corporal	61
5.3	Massa dos tecidos	63
5.3.1	<u>Massa do útero</u>	63
5.3.2	<u>Massa de tecido adiposo retroperitoneal e mesentérico</u>	64
5.4	Análise da composição corporal por DXA	65
5.5	Avaliações Séricas	66
5.6	Análise morfológica de tecido adiposo	67
5.6.1	<u>Morfologia do tecido adiposo subcutâneo</u>	67

5.6.1.1	Morfometria do tecido adiposo subcutâneo.....	68
5.6.2	<u>Morfologia do tecido adiposo retroperitoneal</u>	69
5.6.2.1	Morfometria do tecido adiposo retroperitoneal.....	70
5.7	Análises Ósseas	71
5.7.1	<u>Dimensões ósseas</u>	71
5.7.2	<u>Análise dos parâmetros físicos</u>	72
5.7.2.1	Parâmetros físicos da vértebra L4.....	72
5.7.2.2	Parâmetros físicos do fêmur.....	73
5.7.3	<u>Análise da radiodensidade de fêmur e vértebra L4</u>	74
5.7.4	<u>Análise densitométrica de fêmur e vértebra L4</u>	75
6	RESULTADOS DO PROTOCOLO 2: Efeito do tratamento cíclico com estradiol e/ou treinamento de força	77
6.1	Consumo alimentar	77
6.2	Evolução da massa corporal	77
6.3	Massa dos órgãos	78
6.4	Análise da composição corporal por DXA	79
6.5	Avaliações séricas	80
6.5.1	<u>Lípídeos, proteína, fósforo e índices glicêmicos</u>	80
6.5.2	<u>Hormônios</u>	81
6.5.3	<u>Determinação de colesterol, triglicerídeos e glicogênio hepáticos</u>	82
6.6	Análise morfológica de tecido adiposo	84
6.6.1	<u>Morfologia do tecido adiposo subcutâneo</u>	84
6.6.1.1	Avaliação histomorfométrica do tecido adiposo subcutâneo.....	87
6.6.1.2	Avaliação imunohistoquímica da expressão de PPAR γ no tecido adiposo subcutâneo.....	87
6.6.2	<u>Morfologia do tecido adiposo retroperitoneal</u>	89
6.6.2.1	Avaliação histomorfométrica do tecido adiposo retroperitoneal....	91
6.6.2.2	Avaliação do conteúdo de PPAR γ no tecido adiposo retroperitoneal.....	91
6.6.3	<u>Morfologia do tecido adiposo mesentérico</u>	92
6.6.3.1	Avaliação histomorfométrica do tecido adiposo mesentérico.....	95
6.6.3.2	Avaliação imunohistoquímica da expressão de PPAR γ no tecido adiposo mesentérico.....	95

6.7	Análise ósseas	97
6.7.1	<u>Dimensões ósseas</u>	97
6.7.2	<u>Análise densitométrica de fêmur e vértebra L4</u>	98
6.7.3	<u>Análise morfológica do tecido ósseo</u>	99
6.7.4	<u>Avaliação imunohistoquímica da expressão de ERα no fêmur</u>	104
7	DISCUSSÃO	106
7.1	Discussão Protocolo 1	106
7.2	Discussão Protocolo 2	112
	CONCLUSÃO	119
	REFERÊNCIAS	120

INTRODUÇÃO

Os avanços na área biomédica garantem a maior disponibilidade a recursos terapêuticos, o que tem favorecido a maior longevidade das populações com acesso a esses recursos. Dado este fato, a grande preocupação atualmente, não é mais o quanto viveremos, mas sim, como viveremos, tornando imprescindível garantir a melhor qualidade de vida.

Para as mulheres, o avançar da idade está vinculado à menopausa, que é um fator crítico para o bem estar. Nesta etapa da vida, a diminuição da síntese de estrógenos está associada ao desenvolvimento de vários distúrbios, incluindo alterações metabólicas e doenças crônicas como o diabetes mellitus e a osteoporose. As alterações metabólicas aumentam o ganho de massa corporal e modificam o padrão de distribuição de gordura pelo corpo, determinando a maior deposição de tecido adiposo visceral e promovendo a maior liberação de adipocinas, que podem contribuir para o desenvolvimento da aterosclerose e do diabetes mellitus tipo 2 (LIZCANO & GUZMÁN, 2014). Além disso, a redução da massa óssea predispõe a ocorrência de fraturas e a perda de autonomia funcional (GOURLAY *et al*, 2014). Em modelo experimental de menopausa, algumas evidências de alteração metabólica decorrente da perda da função gonadal, associada ou não à ingestão de dieta hiperlipídica, já foram descritas como a alteração do perfil lipídico e a indução de hiperplasia e hipertrofia do tecido adiposo intra-abdominal e subcutâneo (ARMADA *et al*, 2006, SANTANA *et al*, 2011).

Uma das formas de minimizar os sintomas da deficiência de esteróides sexuais, desde o início do climatério, e suas possíveis complicações é o tratamento farmacológico de reposição hormonal. Nesse contexto, diversos tipos de tratamento de reposição hormonal se mostraram eficientes no controle do incremento de adiposidade central e da perda de massa óssea. No entanto, fatores não hormonais também são capazes de modular a deposição de tecido adiposo, como o padrão alimentar adotado e a execução de atividade física. Tem sido descrito que a atividade física regular produz resultados positivos melhorando o condicionamento cardiorespiratório, prevenindo a perda da massa óssea e minimizando o acúmulo de tecido adiposo em adultos idosos, em especial através do treinamento de força. Este aumenta o impacto mecânico e a força exercida atua como um iniciador do ciclo de remodelação óssea. Assim, embora a deficiência de esteróides sexuais seja um fator importante na gênese da obesidade visceral e da osteoporose, a inatividade física constitui um fator de risco também relevante. Dessa maneira, poder conhecer a interação entre a ação estrogênica e a do treinamento de força individualmente ou associados sobre o controle

metabólico, a massa óssea e adiposidade pode ser mais uma estratégia para melhorar a qualidade de vida após a menopausa, em especial quando os tratamentos hormonais não são considerados uma opção (REED *et al*, 2014; WARD-RITACCO *et al*, 2014).

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Climatério e Menopausa

O climatério foi definido pela Organização Mundial da Saúde como uma fase biológica da vida e não um processo patológico e se refere ao período de declínio funcional ovariano associado a irregularidades menstruais e sintomas vasomotores. Enquanto a menopausa é um marco dessa fase, correspondendo ao último ciclo menstrual, somente reconhecida depois de passados 12 meses da sua ocorrência. O termo climatério é atualmente, pouco usado assim como a fase perimenopausa. O termo “transição da menopausa” substituiu a perimenopausa e o climatério como termo preferido para descrever o período de alterações fisiológicas que ocorrem em torno da cessação da função ovariana. Assim, a transição da menopausa dura em média 4 anos, podendo ocorrer em algumas mulheres o aumento da instalação que em média pode ser de até 10 anos. Nos países industrializados, a idade em que a menopausa ocorre é em média 51 anos e, possivelmente, está aumentando. Aproximadamente 95% das mulheres entram em menopausa com 55 anos de idade e, vários fatores parecem influenciar a idade em que as mulheres manifestam os sintomas do climatério e o fim do período menstrual, como por exemplo, o tabagismo que antecipa em cerca de 1,5 a 2 anos a menopausa (REED & SUTTON, 2011).

Em 2007, a população feminina brasileira totalizava 98 milhões. Nesse universo, cerca de 30 milhões de mulheres estavam entre 35 e 65 anos, ou seja, 32% das mulheres na faixa etária em que ocorre o climatério (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

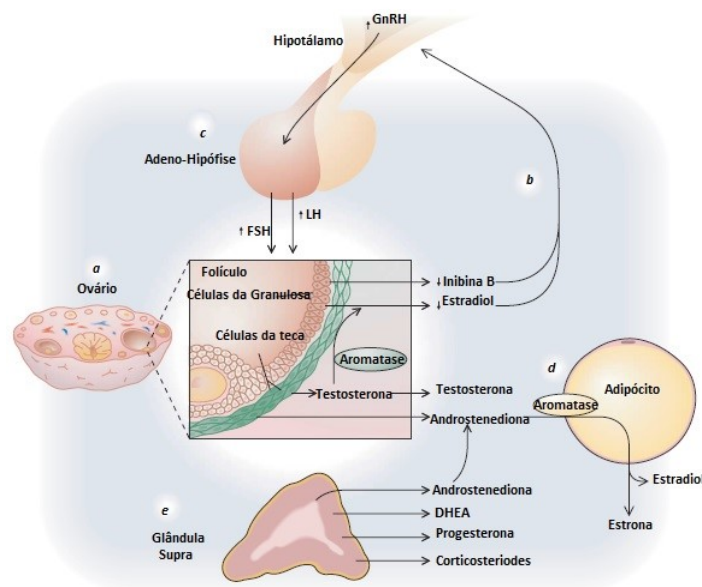
A transição da menopausa está associada a uma grande variedade de sintomas, dentre os quais se destacam as irregularidades menstruais; os distúrbios vasomotores - ondas de calor e suores noturnos (fogachos); distúrbios do sono e do humor; a atrofia geniturinária; diminuição da densidade mamária com aumento do depósito de tecido adiposo e mudanças na estrutura corporal (KEMMLER *et al.*, 2004; ELAVSKY *et al.*, 2009; REED & SUTTON, 2011).

Os sinais e sintomas da transição da menopausa são decorrentes da depleção folicular ovariana, por meio da atresia, a via final no processo de envelhecimento reprodutivo feminino, provocando um declínio da fertilidade. Existe uma estimativa que cerca de 1.000 folículos permaneçam nos ovários de uma mulher com 51 anos de idade, sendo alguns

fracamente responsivos e persistentes, após a menopausa. A perda progressiva de folículos que acompanha o envelhecimento é característica de todos os mamíferos estudados até o presente. Entretanto, os fatores que controlam este processo ainda estão pouco definidos (REED & SUTTON, 2011).

O desenvolvimento folicular insuficiente resulta na produção inadequada de estrogênio e, com pouco estrogênio disponível para estimular o endométrio, ocorre amenorreia. A diminuição progressiva dos esteroides sexuais impede a resposta adequada das gônadas à estimulação hipofisária, perdendo o mecanismo de retroalimentação negativa e promovendo a súbita elevação da concentração sérica do hormônio folículo-estimulante (FSH), antes ainda da menopausa. Os níveis do hormônio luteinizante (LH), a princípio se mantêm normais, mas logo aumentam como consequência da diminuição da secreção dos esteroides ovarianos e do aumento da concentração do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH). Com a inexistência de ovulação após a menopausa, a progesterona (produzida principalmente pelo corpo lúteo) deixa de ser sintetizada pelos ovários, e somente uma diminuta quantidade permanece circulante, proveniente das suprarrenais (Figura 1). Juntamente a perda da função hormonal e reprodutora, os ovários vão reduzindo de volume (JERILYNN, 1998; FERNANDES& PEREIRA *et al.*, 2004; REED & SUTTON, 2011).

Figura 1 - Alterações hormonais associadas ao envelhecimento reprodutivo.



Fonte: Reed & Sutton *et al.*, 2011.

Experimentalmente, a menopausa pode ser mimetizada por meio da retirada dos ovários, estando associada ao aumento do risco de desenvolvimento de doenças coronarianas,

diabetes mellitus, sarcopenia, osteoporose e mudanças na composição corporal, no perfil lipídico e na deposição de gordura. Em conjunto, a obesidade, a hiperglicemia, a hiperinsulinemia, a resistência à insulina, a dislipidemia e a hipertensão arterial sistêmica se caracterizam pelo estabelecimento da síndrome metabólica (KEMMLER *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2014). Portanto, tanto a menopausa quanto a ovariectomia induzem a significativas alterações em diversos órgãos e sistemas. Essas mudanças aumentam o risco de desenvolvimento de doenças além de proporcionar a queda na qualidade de vida. Nesse sentido, cresceu a preocupação da comunidade científica em relação à menopausa e tem-se tentado estabelecer as melhores estratégias para prevenir e reverter os efeitos deletérios do declínio dos hormônios ovarianos (PAQUETTE *et al.*, 2007; LEITE *et al.*, 2010; SANTANA *et al.*, 2011).

1.1.1 Esteróides sexuais femininos e alterações induzidas pela menopausa

Os esteróides sexuais femininos apresentam ações diversas sobre o corpo da mulher, sendo os estrógenos mais amplamente atuantes do que a progesterona. Além de ser responsável por manter a secreção do endométrio, que é necessária para a sobrevivência do embrião, bem como pelo desenvolvimento do feto ao longo da gestação, também é importante para a maturação e manutenção do trato reprodutor feminino além de ser o hormônio precursor na biossíntese dos esteróides supra-renais (HALBE & FONSECA, 1999; SPRITZER *et al.*, 2008).

Os estrógenos (E) compreendem a Estrona (E1), o Estradiol (E2) e o Estriol (E3), sendo o estradiol o mais produzido e o mais potente. No estado não gestacional, a estrona e, principalmente, o estradiol são produzidos pelos ovários em quantidades de apenas 100 a 200 microgramas por dia, e o estriol é apenas um escasso subproduto do metabolismo da estrona (SPRITZER *et al.*, 2008), sendo importante durante a gestação (JUNIOR *et al.* 2003). Após a menopausa, a estrona é produzida em pequenas quantidades nos tecidos gordurosos, através da conversão de esteróides sexuais masculinos, como a androstenediona, oriundos da adrenal. Quanto maior o depósito de tecido adiposo, maior a expressão de aromatase e, conseqüentemente, maior será a quantidade de estrona produzida. É sabido que mulheres obesas produzem mais estrogênio na menopausa do que mulheres magras na pré-menopausa (CASTRACANE *et al.*, 2006; CZAJKA-ORANIEC & SIMPSON, 2010).

Estrógenos, de uma maneira geral, tendem a promover a divisão celular, particularmente em mamas e endométrio. Regulam as alterações que ocorrem na puberdade, como o crescimento e desenvolvimento da vagina, do útero e das trompas de Falópio. Promovem a distribuição de tecido adiposo subcutâneo em mamas, coxas, quadris, dando contornos do corpo feminino e participa da maturação do esqueleto. Nos vasos possuem ação vasodilatadora, inibindo a endotelina e estimulando a prostaglandina E2 e óxido nítrico; reduzem LDL-colesterol e aumentam HDL prevenindo aterogênese; estimulam o fator V da cascata de coagulação e ativam protrombina. No sistema nervoso induzem a sinaptogênese, que está relacionada com aprendizado e memória; além de estarem associados ao comportamento sexual em função de estimularem a libido (MATURANA *et al.*, 2007; WAKE *et al.*, 2007; SPRITZER *et al.*, 2008).

O declínio na concentração de estradiol resulta na modificação do perfil lipídico, devido ao aumento nas concentrações de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), triglicerídeos (TG), colesterol e diminuição nas concentrações de lipoproteína de alta densidade (HDL) (SCHNEIDER *et al.*, 2006). Com isso, as mulheres com menopausa exibem maior incidência de elevadas concentrações de colesterol total e LDL, com HDL diminuído. Além disso, o declínio dos hormônios ovarianos promove a deposição e acúmulo de gordura principalmente na região abdominal, caracterizando o padrão de gordura androide, tanto em mulheres como em ratas. (PAQUETTE *et al.*, 2007; WORSLEY *et al.*, 2013).

Evidências demonstram que tanto a menopausa quanto a ovariectomia estão associadas ao desenvolvimento de esteatose hepática não alcoólica (PAQUETTE *et al.*, 2007; PIGHON *et al.*, 2010). Assim, o acúmulo de gordura no fígado junto com o aumento dos depósitos de gordura intra-abdominais são fatores importantes para o desenvolvimento de resistência à insulina e diabetes, sendo considerado atualmente um componente hepático da síndrome metabólica (PIGHON *et al.*, 2010).

O impacto negativo da perda da função ovariana também pode ser observado no tecido ósseo já que a integridade do osso é mantida pelo balanço de dois mecanismos metabólicos - de formação e de reabsorção e que, o estrogênio suprime a reabsorção óssea. Na transição para menopausa, a reabsorção excede a formação óssea, e pode haver uma acelerada perda de massa óssea, a uma taxa anual de 3 a 5% no decorrer dos primeiros anos subsequentes ao fim do período menstrual (COOPER *et al.*, 2008; PRESTES *et al.*, 2009). Contudo, eventualmente, esta perda fica mais lenta, se mantendo de 1 a 2% ao ano. O osso trabecular, predominante na coluna vertebral, quadril e rádio distal, é o primeiro a ser afetado, e também

de forma mais extensiva do que o osso cortical, localizado predominantemente na diáfise dos ossos longos (REED & SUTTON, 2011; FARR *et al*, 2013).

Considerando-se o aumento da longevidade das populações, em especial das mulheres brasileiras cuja expectativa de vida alcançou os 78,3 anos em 2012, conclui-se que as mulheres passaram a viver mais de 20 anos após a menopausa, numa fase que a caracteriza como adulta idosa (IBGE 2012). O envelhecimento é caracterizado pelo declínio da capacidade funcional consequente à diminuição da capacidade aeróbia e à progressiva perda da musculatura corporal. Estes fenômenos se acentuam a partir dos 50 anos de idade, coincidindo com a fase da menopausa. Por si só, o envelhecimento carrega uma tendência ao declínio da prática de atividade física, especialmente na população feminina, gerando um círculo negativo, já que o sedentarismo é um fator agravante para o envelhecimento (TAIROVA& LORENZI, 2011).

Dentro do universo de mudanças fisiológicas desencadeadas após a menopausa duas merecem especial atenção, a osteoporose e a obesidade. A primeira, pela morbidade e mortalidade e a segunda que além de alterar a estética pode contribuir para distúrbios metabólicos crônicos. Dessa maneira, a constante busca pelo conhecimento da manutenção da integridade óssea e da distribuição de tecido adiposo, em período reprodutivo ou após a menopausa, são temas inesgotáveis de estudo visando à promoção da qualidade de vida para as mulheres.

1.2 O tecido ósseo

Os ossos constituem o esqueleto, responsável por sustentar o peso corporal, fornecer suporte às partes moles do organismo, proteger os órgãos vitais, alojar a medula óssea geradora das células do sangue e proporcionar apoio aos músculos esqueléticos. Outra função, de natureza metabólica, está associada à homeostase mineral, atuando como uma reserva de íons, cuja importância pode ser avaliada pelo fato de armazenar cerca de 99% do cálcio, 85% do fósforo, 90% do sódio e 50% do magnésio corporal (MONTECINOS *et al*, 2009).

O osso é constituído por matriz extracelular (90%) e células (10%). A síntese da matriz proteica (osteóide), que é posteriormente mineralizada pela deposição de cristais de hidroxiapatita, é feita por células que evoluem por diferentes estágios de maturação e diferenciação. O processo se inicia com células indiferenciadas provenientes da medula óssea,

que proliferam e se tornam pré-osteoblastos. Quando maduros, os osteoblastos param de se multiplicar, passam a produzir a matriz óssea e finalmente são aprisionadas pela matriz óssea mineralizada, como osteócitos (BIANCO & LAZARETTI-CASTRO, 2008).

A porção orgânica da matriz extracelular é constituída principalmente por fibras colágenas do tipo I (90%), cuja função está relacionada ao processo de mineralização óssea. O restante corresponde a meio gelatinoso homogêneo constituído de líquido e proteoglicanas (sulfato de condroitina e ácido hialurônico) que ajudam a controlar a deposição dos sais de cálcio. São também constituintes da fração orgânica glicoproteínas (osteocalcina, osteonectina, osteopontina, fibronectina), proteínas osteoindutoras/ fatores de crescimento (fator de crescimento transformador β / TGF β ; fatores de crescimento semelhantes á insulina/IGF-I e -II; fator de crescimento de fibroblastos/FGF; proteínas morfogenéticas ósseas/ BMP), enzimas (colagenase, fosfatase alcalina) e proteolipídeos (DAVISON *et al*, 2006; BIANCO & LAZARETTI-CASTRO, 2008).

A parte inorgânica da matriz extracelular é composta fundamentalmente por cálcio e o fósforo, que formam um cristal semelhante às apatitas naturais e, por ser hidratado, é denominado hidroxiapatita. Existem ainda, em menores quantidades e diferentes proporções, magnésio, sódio, potássio, carbonato, fluoreto, estrôncio, zinco, rádio, cloreto e sulfato. A associação entre a hidroxiapatita e as fibras colágenas é a responsável pela dureza e resistência características do tecido ósseo (MOTTA, 2009). A proporção relativa dos componentes da matriz óssea variam com a idade, sexo, local, doenças e tratamentos (BOSKEY, 2013).

As células - osteoblastos, osteócitos e osteoclastos - regulam a distribuição e o conteúdo do componente inorgânico, sendo responsáveis pela manutenção dos níveis circulantes de cálcio; além de manter contínuo o processo de remodelação da matriz óssea (reabsorção e formação), permitindo ao sistema esquelético responder às forças mecânicas geradas pela sustentação do peso corporal e por atividade física. Assim, as células são responsáveis por manter a homeostase mineral e esquelética.

Os osteoblastos se originam de células mesenquimais osteoprogenitoras pela influencia de fatores de crescimento locais, como o FGF e as BMP. A membrana plasmática é rica em fosfatase alcalina e receptores para paratormônio (PTH), citocinas e prostaglandinas. As células expressam citocinas como o fator estimulador de colônia tipo 1 (CSF-1) e o ligante do receptor ativador do fator nuclear kB (RANKL), que por ação parácrina ativam a osteoclastogênese. Osteoblastos se localizam na superfície de formação óssea e elaboram os componentes orgânicos da matriz extracelular.

Os osteócitos são osteoblastos que se tornaram prisioneiros em lacunas ósseas, após a mineralização osteóide a seu redor e têm um importante papel no metabolismo ósseo e na manutenção da concentração do cálcio plasmático (BIANCO& LAZARETTI-CASTRO, 2008). Os osteócitos são os prováveis sensores capazes de detectar deformidades exercidas por forças mecânicas, através de vários sinais bioquímicos, orientando o processo de remodelação de maneira a provocar a adaptação da estrutura óssea de acordo com as exigências das linhas de força (REIJNDERS *et al*, 2013). Os osteoclastos são células gigantes derivadas de uma célula hematopoiética, na medula óssea, que apresentam alta mobilidade e também são encontrados na superfície óssea, onde reabsorvem o osso deixando em seu rastro uma lacuna de reabsorção (BIANCO& LAZARETTI-CASTRO, 2008).

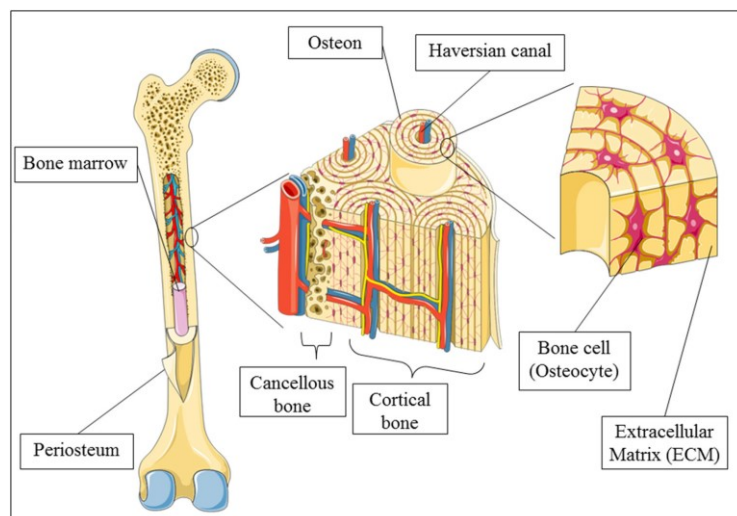
A estrutura óssea é dinâmica, sendo continuamente renovada e reconstituída. A remodelação óssea ocorre pela ação combinada de osteoblastos, osteoclastos e osteócitos, sendo caracterizada como intensa e contínua, ocorrendo na taxa de 10% ao ano e se mantendo por toda a vida. Todo o processo acontece em resposta a forças mecânicas e é sensível a influências metabólicas, nutricionais e endócrinas (TENÓRIO *et al*, 2005). O processo de remodelação pode ser dividido nas fases de: ativação, reabsorção, reversão e formação, baseado na predominância de tipos e atividades celulares em cada fase (BIANCO & LAZARETTI-CASTRO, 2008).

A remodelação tem como principal função, a reparação de micro fraturas ocorridas no dia a dia por um contínuo ciclo de destruição e posterior renovação óssea. A ativação dos osteoclastos leva a reabsorção da matriz calcificada, pois essas células produzem enzimas como a fosfatase ácida tartarato resistente, as cisteinaproteinases (catepsinas), colagenase e anidrase carbônica tipo II que delimitam uma área com redução de pH para a reabsorção. A fosfatase alcalina, entretanto, é um marcador de formação óssea, atividade desempenhada pelos osteoblastos que sintetizam uma matriz orgânica protéica que é posteriormente calcificada, levando à nova mineralização do tecido. Em condições normais, a quantidade de osso removido pelo osteoclasto é igual a quantidade de osso formado pelo osteoblasto, e uma massa óssea estável é mantida. Diferenças entre as atividades osteoblásticas e osteoclásticas podem elevar ou reduzir a mineralização óssea, perdendo o equilíbrio dinâmico entre eles que possibilita a manutenção da densidade mineral óssea (DMO) (KASSEM& MARIE, 2011).

Macroestruturalmente, os ossos se subdividem em cortical e trabecular (Figura 2), sendo cerca de 80% do esqueleto composto de osso cortical e apenas 20% do volume ósseo total correspondendo a osso trabecular. Entretanto, apesar de estar em menor proporção, o osso trabecular é o mais ativo metabolicamente e, o que mais contribui para a taxa de

remodelação óssea (MONTECINOS *et al*, 2009). O osso cortical consiste de uma camada compacta e densa que se localiza na região externa dos ossos longos apresentando diversas lamelas intensamente empacotadas (ósteons), na forma de dutos cilíndricos, dispostos paralelamente ao eixo principal desses ossos. É encontrado como revestimento de todos os ossos do organismo possuindo uma camada de espessura variável. Possui porosidade e relação superfície/volume baixas e remodela-se anualmente cerca de 2-3%. O osso trabecular é encontrado principalmente nas epífises dos ossos longos e nos ossos chatos, sendo revestido por uma camada unicelular chamada endósteo. Sua porosidade e relação área/volume são elevadas, o que acarreta uma maior atividade metabólica, correspondendo a cerca de 24% de taxa de remodelação anual (GENUTH, 2004).

Figura 2 - Estrutura do osso longo com ampliação da região da diáfise



Fonte: AMI et al, 2012.

1.2.1 Controle da estrutura óssea

A densidade mineral óssea é fortemente afetada (60-70%) por fatores hereditários. No entanto, outros fatores locais e sistêmicos, incluindo fatores de crescimento, citocinas, prostaglandinas, hormônios e nutrientes, assim como a carga mecânica diária aplicada, em uma ação combinada são indispensáveis para a manutenção da homeostase do tecido ósseo em humanos e animais (TENÓRIO *et al*, 2005; FALONI *et al*, 2007; REIJNDERS *et al*, 2013).

A ação dos hormônios sobre o osso ocorre de formas variadas. A calcitonina, por exemplo, estimulada por elevações agudas da concentração de cálcio circulante, reduz as concentrações circulantes de cálcio e fósforo através de sua ação nos osteoclastos. A calcitonina se liga ao seu receptor CTR (receptor de calcitonina) nos osteoclastos promovendo diminuição ou inibição da reabsorção óssea. Com isso, contribuindo para a hipocalcemia (CARTER & SCHIPANI, 2006).

O paratormônio atua sobre os ossos, se ligando aos osteoblastos e através de seu receptor (PTHr) desencadeando a estimulação da reabsorção óssea, consequentemente aumentando os níveis de cálcio no sangue. O PTH atua diretamente sobre *oturnover* ósseo através de mecanismos anabólicos e catabólicos. Os efeitos anabólicos induzem a

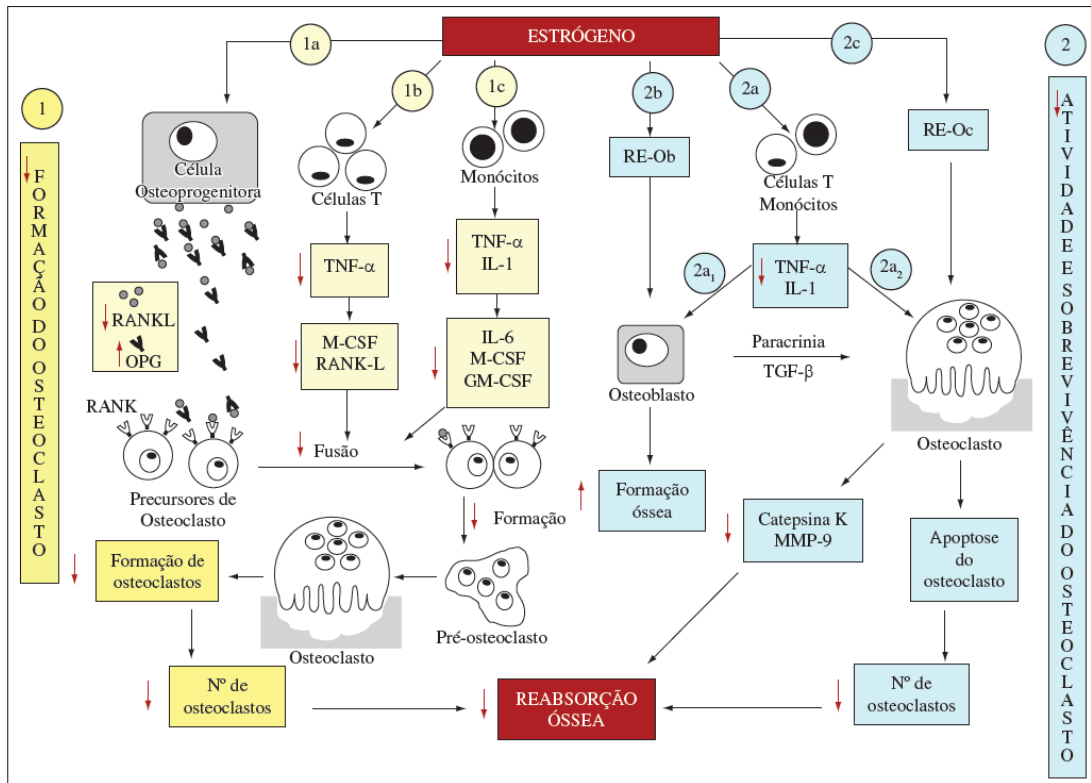
diferenciação e proliferam dos osteoblastos estimulando a mineralização óssea. Em contrapartida, os efeitos catabólicos proporcionam o aumento do número de osteoclastos, consequentemente aumentando a reabsorção óssea (POOLE &REEVE, 2005; DATTA 2011). A vitamina D também está envolvida na remodelação óssea e na homeostase do cálcio, estimulando a absorção intestinal e reabsorção renal de íons cálcio. No osso atua como regulador de transcrição de proteínas da matriz óssea induzindo aumento de osteocalcina e suprimindo a síntese de colágeno tipo I (SYLVIA *et al* 2013).

O pico de massa óssea é atingido em torno dos 20 anos de idade em homens e mulheres, tornando o processo de desenvolvimento do osso importante, pois determinará o pico de massa óssea e a DMO do adulto. Na fase da puberdade, a nutrição e os esteróides sexuais são essenciais a um desenvolvimento ósseo normal, contribuindo positiva ou negativamente para a prevalência de doenças osteometabólicas na vida adulta (SAGGESE *et al*, 2002).

Em mulheres, durante a puberdade, os estrogênios circulantes atuam na promoção do crescimento longitudinal do osso e na taxa de remodelação óssea, reduzindo a reabsorção, aumentando a espessura de osso cortical e, consequentemente, tornando os ossos mais fortes. Portanto, uma deficiência estrogênica nessa fase afeta tanto o crescimento ósseo como o período do pico de massa óssea (SAGGESE *et al*, 2002).

Estrógenos apresentam funções específicas sobre o esqueleto, atuando na conservação da massa óssea associada a tensões biomecânicas. Também atuam na remodelação óssea e mantêm as taxas de equilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea em nível tecidual. Em nível celular, afetam a proliferação, a sobrevivência e a atividade de osteoclastos e osteoblastos, diminuindo a formação de osteoclastos e sua atividade, mediante aumento dos processos apoptóticos (Figura 3). Em relação aos osteoblastos, a ação estrogênica é ainda um pouco controversa (FALONI *et al*, 2007). Algumas evidências sugerem que E aumentam a formação, diferenciação, proliferação e função dos osteoblastos, embora esses resultados tenham variado em diferentes modelos experimentais que utilizaram ratas com osteoporose (KHOSLA *et al*, 2005; HUANG *et al*, 2014).

Figura 3 - Possíveis vias de ação do estrógeno sobre a reabsorção óssea



Nota: (1) Ação do estrógeno sobre a formação do osteoclasto. (2) Ação do estrógeno sobre a atividade e a sobrevivência do osteoclasto.

Fonte: Faloni *et al*, 2007

Com o objetivo de proteção, o sistema imunológico e os ossos estão intimamente ligados, com interações físicas e funcionais significativas. O sistema imunológico inato funciona como um mecanismo de resposta imediata para iniciar proteção contra desafios locais, como patógenos e danos celulares. E, apesar do osso ser um microambiente muito específico, no qual o ataque infeccioso é menos comum, mecanismos de reparação e regeneração são contínuos e fundamentais, removendo células danificadas e apoptóticas e estimulando o reparo e regeneração do tecido normal, mantendo dessa maneira a integridade óssea (CHARLES & NAKAMURA, 2014).

1.2.2 A estrutura óssea no envelhecimento

O comprometimento da integridade da estrutura óssea atinge tanto homens como mulheres, e está associado a um desequilíbrio entre os processos de formação e reabsorção, podendo ser uma alteração fisiológica decorrente do envelhecimento ou ocorrer em função de distúrbios, como o hipogonadismo ou o uso de medicamentos.

O aumento da expectativa de vida evidencia a perda de equilíbrio do processo de remodelação óssea em função de sua menor habilidade para resistir às fraturas. Com isso, doenças osteometabólicas se tornam cada vez mais frequentes e quadros de osteopenia e volem para osteoporose (NYMAN & MAKOWSKI, 2012; BOSKEY, 2013).

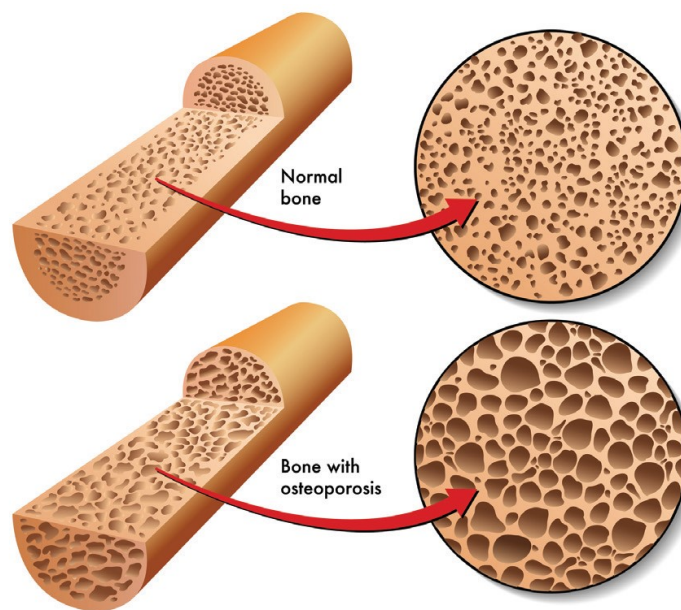
A perda óssea relacionada ao envelhecimento é em grande parte consequente a mecanismos de senescência que impactam o número e a função das células ósseas. A disfunção do osteoblasto é a principal causa de perda óssea senil em mulheres e resulta de dois grupos de mecanismos: 1) extrínsecos – mediados por mudanças do microambiente ósseo relacionados à idade como, a alteração de níveis hormonais e de fatores de crescimento; 2) intrínsecos – causados pela senilidade do osteoblasto (KASSEM & MARIE, 2011).

A matriz extracelular, pela presença do colágeno, ocupa papel de destaque, conferindo ao osso resistência e a tenacidade. No entanto, a perda da integridade do colágeno diminui a capacidade de manutenção óssea e torna o osso mais frágil. Uma causa potencialmente deletéria para a matriz extracelular é o aumento da glicação não enzimática do colágeno, decorrente da idade e do diabetes mellitus, que reduz a remodelação óssea por alterar a resposta de osteoblastos e osteoclastos (NYMAN & MAKOWSKI, 2012; VASHISHTH, 2007).

O desequilíbrio no processo de remodelação torna o osso mais frágil, levando-o a um estado osteometabólico deletério conhecido como osteoporose (Figura 4). A osteoporose é caracterizada por baixa massa óssea e deterioração da microarquitetura do esqueleto e aumenta o risco de fraturas. O desenvolvimento da osteoporose é considerado um processo multifatorial, podendo ser determinado por fatores demográficos, estilo de vida baseada em inatividade física, desnutrição, morbidade, uso de drogas e perfil hormonal alterado causado por doenças crônicas e pelo uso de glicocorticóides (BEHARI *et al.*, 2008, RABENDA *et al.*, 2011). Clinicamente, a classificação, o aparecimento e a extensão da osteoporose são avaliados pela DMO, a qual é expressa em gramas de conteúdo mineral por área ou volume. A capacidade do osso de resistir a forças mecânicas e a fraturas depende não apenas da

quantidade do tecido ósseo, mas também da sua qualidade, que inclui o grau de mineralização, o tamanho dos cristais de hidroxapatita, a estrutura do colágeno, a heterogeneidade da microestrutura, a conectividade das trabéculas e as microlesões (MARTIN *et al.*, 2010).

Figura 4 - Estrutura óssea de um indivíduo normal e com osteoporose



Fonte: KOUKEL & JIMENEZ, 2013.

Há algumas décadas, estudos buscaram correlações entre a osteoporose desenvolvida após a menopausa e a deficiência de estrogênio e mostraram que tratamentos de reposição hormonal, associados ao balanço de cálcio positiva poderiam prevenir a acelerada perda óssea induzida pela falência ovariana (RIGGS *et al.*, 2002).

Apesar de vários fatores estarem associados à perda da integralidade óssea após a menopausa, o declínio da produção de E_2 tem implicações importantes para saúde óssea devido a seu papel essencial no desenvolvimento e manutenção do esqueleto ao longo da vida. A redução da concentração circulante de E_2 está associada a menor DMO e ao maior risco de fraturas, que por volta dos 50 anos de idade, atinge cerca de 46% das mulheres, sendo duas

vezes maior do que o fator de risco para homens (22%) (AMES *et al.*, 2010). Após a menopausa, a menor quantidade de osso trabecular decorrente da alta invasão dos osteoclastos, cuja ação deixa de ser inibida em função da deficiência estrogênica, determina uma perda substancial de tecido ósseo, já que a ação osteoblástica não é capaz de repor a massa perdida. As trabéculas tendem a diminuir em espessura, com aumento do espaço entre elas, causando os quadros de osteopenia que podem evoluir a osteoporose (IWAMOTO *et al.*, 2004; LORMEAU, 2004). Experimentalmente, a influência da idade e do sítio esquelético tem demonstrado a influência do E no desenvolvimento do tecido ósseo. Assim, é possível que certas combinações de idade, sítio do esqueleto e tempo pós-ovariectomia possam levar a diferentes níveis de degradação óssea em resposta à deficiência hormonal (AMES *et al.*, 2010).

Além de agir diretamente no osso, o E₂ estimula a absorção intestinal e a reabsorção renal de cálcio. Na senescência, no entanto, o hipoestrogenismo aumenta a perda de cálcio livre que, não sendo revertida pela alimentação, levará a um aumento compensatório da secreção de PTH causando o hiperparatireoidismo secundário e progressivo (MANOLAGAS, 2000; RIGGS *et al.*, 2002).

Considerando que dos 19 milhões de idosos brasileiros, 55,8% são mulheres (IBGE, CENSO 2010), e essas mulheres estão em estado de hipoestrogenismo, vários outros fatores devem ser tidos em conta para a avaliação do risco de fraturas. Sabe-se que a perda de equilíbrio postural aumenta a frequência de quedas e fraturas após os 65 anos de idade, sendo um fator significativo de morbidade e mortalidade para essa população. Após a menopausa, a musculatura se modifica e provoca alteração na postura, fazendo com que o centro de gravidade se desloque e prejudique o equilíbrio. Fraturas osteoporóticas de quadril são em 90% dos casos consequência de quedas e representa a sexta causa de morte entre mulheres, enquanto fraturas de fêmur proximal apresentam taxa de mortalidade de 15-30% no ano seguinte ao seu aparecimento (ADAMI *et al.*, 2009;. NAHAS *et al.*, 2013).

A osteoporose após a menopausa tem se tornado uma importante questão de saúde pública, por se tratar de uma doença crônica, que requer tratamentos continuados e de baixa adesão. Os efeitos indesejáveis, secundários ao tratamento da osteoporose, com drogas e/ou com reposição de estrogênio, têm levado pesquisadores a procurarem alternativas não farmacológicas para o tratamento da doença. Assim, procedimentos como o exercício físico, coordenação e prevenção de quedas, ganharam importância no tratamento da osteoporose nos últimos anos (MESSALI *et al.*, 2009).

1.2.3 Técnicas de avaliação da estrutura óssea

Vários métodos têm sido empregados no estudo quantitativo da estrutura óssea. As principais técnicas desenvolvidas nos últimos anos com essa finalidade foram a absorciometria de feixe único de energia (SPA) e duplo fóton (DPA), absorciometria por raios-X de dupla energia (DXA), tomografia computadorizada quantitativa (QCT) e estudo pelo ultrassom (LINK *et al*, 1999; CUI *et al* , 2014).

Os raios-X foram às primeiras radiações a serem utilizadas em equipamento médico, e continuam a ser uma importante ferramenta clínica utilizada rotineiramente na prática médica. Em redes hospitalares representam a primeira abordagem ao paciente, dado o baixo custo, a facilidade de execução e a fácil visualização da arquitetura óssea. (CHAPPARD *et al*, 2005).

A tomografia computadorizada (TC) é um método de diagnóstico na reprodução de uma secção do corpo humano em uma imagem representativa, baseada na derivação do tratamento informático dos dados obtidos de projeções angulares na emissão dos raios x. Através de cortes axiais proporciona um estudo detalhado de diferentes estruturas do corpo humano, principalmente os tecidos mineralizados, permitindo a delimitação de irregularidades tridimensionalmente (CHEUNG *et al*, 2013).

O DXA é a técnica que mais tem se destacado para uso clínico e experimental, sendo considerado atualmente, como métodos de escolha para avaliação da massa óssea. O DXA tornou-se o método de escolha para medida da composição corporal porque não baseia-se na estimativa do estado de hidratação ou inter-relação entre os componentes corporais, é rápido e simples, e apresenta uma dose de radiação muito baixa (TANNER, 2011).

A composição corporal é importante para o tecido ósseo durante o crescimento e envelhecimento, para as mudanças de peso corporal em indivíduos adultos e mudanças na composição corporal durante o curso de algumas doenças (obesidades, diabetes, menopausa). Além disso, o DXA permite a medida de alterações regionais da massa óssea e da composição corporal. Todas essas vantagens fazem com que a avaliação da composição corporal pelo DEXA tenha se tornado importante para a avaliação da estrutura óssea (CUMMINGS *et al.*, 2002; LIM *et al.*, 2009).

Para padronizar os valores de densitometria óssea de diferentes testes, os resultados são relatados como *Z-score* ou *T-score*, ambos expressos com unidades de desvio padrão. O *T-score* é útil para expressar a DMO em uma população pós-menopausa e é calculado através da comparação da DMO atual com a DMO média do pico de massa óssea de um adulto jovem

normal do mesmo sexo. O banco de dados de referência é de mulheres brancas, embora esta abordagem não seja universalmente utilizada. Para as mulheres pré-menopausa com idade inferior a 50 anos, o Z-score é a forma preferida de expressar a DMO. Baseia-se na diferença entre a DMO do indivíduo e a DMO média de uma população de referência do mesmo sexo, idade e etnia. Dessa forma, quadros de osteopenia e osteoporose são definidos segundo os valores do T-score (Tabela 1), (NAMS, 2010).

Tabela 1 - Definições dos valores básicos de T-score

Normal	T-score acima ou igual a -1.0
Osteopenia	T-score entre -1.0 e -2.5
Osteoporose	T-score abaixo ou igual a -2.5

Fonte: Fontes et al, 2012.

A avaliação da remodelação do osso é mais comumente avaliada na clínica, pela medição de marcadores bioquímicos de reabsorção e formação (Tabela 2), essencialmente de base sérica, refletindo o processo em todo o corpo (COMPSTON, 2006; HLAING et al, 2014 ; LUPO *et al.*, 2014).

Tabela 2 - Marcadores bioquímicos ósseos disponíveis comercialmente

Formação Óssea	Reabsorção Óssea
Fosfatase Alcalina Total	Fosfatase Ácida tartaro resistente (TRAP)
Fosfatase Alcalina Óssea	Telopeptídeo de colágeno tipo I da carboxila terminal da região $\alpha 1$ (ICTP)
Osteocalcina	Telopeptídeo de colágeno tipo I da região carboxila terminal (CTX)
Própeptídeo N-terminal de colágeno tipo I (PINP)	Telopeptídeo de colágeno tipo I amino terminal (NTX)
Própeptídeo C-terminal de colágeno tipo I (PICP)	Deoxipiridinolina Piridinolina Hidroxirolina Cálcio /Creatinina

Fonte: Montecinos *et al*, 2009.

1.3 O tecido adiposo branco

O tecido adiposo branco (TA) é conhecido atualmente, não apenas como um reservatório energético, mas também, como um importante e ativo órgão endócrino. Assim, além de ser especializado em armazenar lipídios na forma de triacilglicerol (TG), sem comprometimento da integridade funcional do adipócito, também produz e secreta uma variedade de moléculas bioativas, as adipocitocinas (CALLEGARI *et al*, 2009).

Os adipócitos são células tipicamente esféricas, cujo diâmetro pode variar de 20 a 200 μm e, com frequência, se tornam poligonais devido à deformação provocada pela grande inclusão lipídica. Os TG ocupam 90% do adipócito e representam de 60 a 85% da célula. Todas as organelas intracelulares, inclusive o núcleo, são comprimidas em uma estreita faixa citoplasmática delimitada entre a inclusão lipídica e a membrana plasmática (FONSECA-ALANIS *et al*, 2006, OHTA & ITOH, 2014). A maquinaria enzimática do adipócito é responsável por efetuar a lipogênese, estocando TG em períodos de oferta abundante de energia, e ainda mobilizar os TG através da lipólise quando há déficit energético. O sistema nervoso autônomo atua diretamente sobre o tecido adiposo. O sistema nervoso simpático, por estimulação β -adrenérgica, ativa a enzima lipase hormônio sensível (LHS) e promove a lipólise dos TG; enquanto o sistema nervoso parassimpático organiza as ações anabólicas por incrementar a secreção de insulina, aumentando a captação de glicose e de ácidos graxos pelos adipócitos (FONSECA-ALANIS *et al*, 2006; WARJCHENBERG *et al*, 2009; PROENÇA *et al*, 2014).

As adipocitocinas modulam vários processos fisiológicos, incluindo a regulação da sensibilidade à insulina, o metabolismo da glicose e dos lipídios e o funcionamento dos sistemas de coagulação e inflamação. Nos últimos anos, estudos vêm mostrando que a obesidade, principalmente a do tipo central, está relacionada ao aumento de algumas dessas moléculas como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), o fator inibidor de ativação de fibrinogênio, a interleucina-6 (IL-6), a leptina e a resistina. Essas moléculas determinam a menor sensibilidade à insulina e a disfunção endotelial, presentes no diabetes mellitus tipo 2 e na doença cardiovascular, que são reconhecidas comorbidades relacionadas à obesidade, além da dislipidemia, hipertensão arterial sistêmica e aterosclerose (CALLEGARI *et al*, 2009).

A leptina, a primeira adipocitocina identificada no TA, é considerada um sinal adipostático ao cérebro em relação ao balanço energético. Sua ação no hipotálamo, principalmente no núcleo arqueado, determina uma série de sinais em resposta à ingestão ou à

privação de alimentos, regulando a ingestão de alimentos e/ou o gasto energético. A IL-6, o TNF- α e os componentes do sistema complemento B, C3 e D, tem funções bem definidas em estágios inflamatórios, mas, também são produzidas em condições não inflamatórias. TNF- α e IL-6 exercem papel no metabolismo dos lipídios e da glicose, inibindo a lipoproteína lipase, induzindo a lipólise e aumentando a captação de glicose. A IL-6, aumentada na obesidade e diminuída com a perda de peso, é um marcador de resistência à insulina (TILG & MOSCHEN, 2006). O PAI-1 (inibidor de ativação do plasminogênio tipo 1) também está associado à obesidade, sobretudo, ao acúmulo de gordura visceral e ao risco cardiovascular. (WARJCHENBERG *et al*, 2009). Mais recentemente foi identificada a adiponectina, uma molécula sintetizada e secretada exclusivamente pelo TA maduro e, que se encontra reduzida em homens e na obesidade, sendo considerado o único hormônio dentre as adipocitocinas, regulado negativamente pela obesidade e pelo padrão de distribuição de gordura central. Apresenta propriedades antiaterogênicas, anti-inflamatórias e regula a sensibilidade à ação da insulina, já que reduz a produção hepática de glicose, aumenta a ação da insulina no fígado, reduz a atividade de enzimas gliconeogênicas (fosfoenolpiruvato-carboxicinase e glicose 6-fosfatase) e, diminui a oxidação dos ácidos graxos no fígado dentre outras ações (CALLEGARI *et al*, 2009)

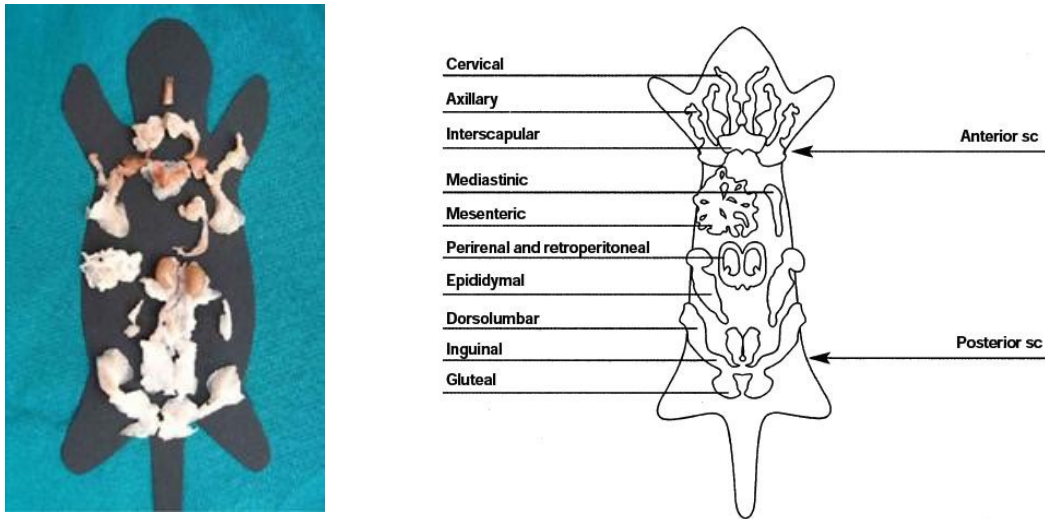
1.3.1 Distribuição de tecido adiposo

O tecido adiposo é um tecido de ampla e variada distribuição orgânica, cujos compartimentos diferem quanto à atividade metabólica. A distribuição da gordura também difere de acordo com o gênero. Nos homens se encontra em maior quantidade na região abdominal (tipo andróide ou maçã), enquanto nas mulheres se localiza nas regiões do quadril e membros inferiores (tipo ginecóide ou pêra).

Em roedores (ratos e camundongos) a distribuição anatômica do tecido adiposo branco fica localizada nas regiões subcutânea e visceral (Figura 5). O depósito subcutâneo representa as porções anterior (cervical, axilar, intercapsular) e posterior (dorso-lombar, inguinal e gluteal). Já a gordura visceral é a mais compartimentalizada dentro da cavidade da abdominal, compreendendo os depósitos visceral mediastino, intra-abdominal ou mesentérica, retroperitoneal, perirenal, e epididimal (CINTI, 2001; CINTI, 2002; CINTI, 2004; GIORDANO *et al*, 2013).

Na prática, temos observado que em ratos Wistar a distribuição de gordura corporal entre machos e fêmeas também é desigual.

Figura 5 - Distribuição anatômica do tecido adiposo branco em roedores



Fonte: CINTI, 2004; CINTI, 2005.

A regulação da distribuição de tecido adiposo é uma importante questão, considerando-se as associações epidemiológicas e metabólicas entre o acúmulo central de gordura/ obesidade central e comorbidades associadas. Na fase reprodutiva (pré- menopausa), as mulheres apresentam maior atividade no tecido subcutâneo abdominal do que no femural. Estudos indicam que essa diferença de atividade diminui com a queda da função ovariana, mas que é reestabelecida em presença de estrogênio (LIZCANO & GUZMÁN, 2014).

1.3.2 Tecido adiposo e menopausa

Com o advento da menopausa, a mulher passa por várias transições, incluindo a estética, conseqüente à redistribuição da gordura e, cujo acúmulo se direciona para a região visceral, proporcionando uma característica de distribuição andróide (TCHERNOF *et al*, 2004; WAKE *et al*, 2007).

Observações clínicas indicam que os hormônios esteroides sexuais femininos estão envolvidos na determinação da distribuição da massa adiposa, isto é, maior acúmulo de gordura subcutânea na região glúteo-femural e menor na região visceral (VAN *et al*, 2005). Essa distribuição de gordura tende a desaparecer, ou pelo menos reduzir parcialmente na menopausa, quando ocorre acúmulo de gordura visceral, a qual pode ser prevenida pela terapia de reposição hormonal (WAJCHENBERG *et al*, 2009 SANTANA *et al*, 2011). A perda sistêmica de estrógenos está associada ao aumento da adiposidade e, conseqüentemente, da incidência de doenças metabólicas tanto em humanos (TCHERNOF *et al*, 2004) quanto em camundongos (D'EON *et al*, 2005).

1.4 Estratégias para prevenir ou controlar os efeitos deletérios da menopausa

Existe uma crescente preocupação a respeito dos efeitos da menopausa, em função do aumento da incidência de patologias que diminuem a qualidade de vida e estão associadas à morbidade e mortalidade. Nesse sentido, terapias com o objetivo de prevenir e/ou reverter às alterações provocadas pela menopausa são investigadas, avaliadas e testadas constantemente. Essas terapias incluem: tratamento hormonal, intervenção dietética e atividade física (PAQUETE *et al*, 2007; SACCO *et al*, 2009; ANISHCHENKO *et al*, 2011; SANTANA *et al*, 2011).

A terapia de reposição hormonal (TRH) é preconizada para suprir as baixas concentrações dos hormônios ovarianos. No entanto, ainda existem contraindicações à terapia hormonal na pós-menopausa, pois apesar dos muitos benefícios evidenciados os riscos ainda existem. As contraindicações podem ser absolutas ou relativas. Dentre as absolutas tem destaque os pacientes com câncer de mama e/ou do endométrio. Já as relativas são para pacientes com risco para câncer de mama e de endométrio, doença tromboembólica progressiva, miomas uterinos e endometriose (STEVENSON, 2009; NORTH AMERICAN MENOPAUSE SOCIETY, 2012).

O tratamento com estrogênio previne/controla a perda óssea na menopausa. Entretanto, embora esses efeitos sejam bem conhecidos, os efeitos sobre a saúde dos outros tecidos estrogênicos sensíveis, como útero e mama, devem ser cuidadosamente considerados. Em muitas circunstâncias, o estradiol induz a proliferação dos tecidos uterino e mamário. Além disso, as mulheres após a menopausa apresentam maiores riscas para doença arterial

coronariana e câncer de mama, comparadas a mulheres na pré-menopausa e, os efeitos da TRH podem alterar estes riscos (SACCO *et al.*, 2010).

A literatura descreve que a TRH é capaz de reverter quadros de ganho de peso corporal, resistência à insulina, aumento dos depósitos de gorduras e melhorar o perfil lipídico em roedores (SANTANA *et al.*, 2011) e prevenir os processos de osteopenia e osteoporose (GAMBACCIAN, 2013; MIRKIN & PICKAR, 2013). Paquette *et al.*, (2008) demonstraram que a TRH em ratas ovariectomizadas promoveu adaptações positivas na expressão de fatores transcricionais relacionados com a regulação hepática de lipídios como: o receptor ativado por proliferadores de perossissoma alfa (PPAR α), a proteína 1c de ligação ao elemento regulador dos esteróides (SREBP-1c) e a enzima estearoil-CoA desaturase-1 (SCD-1). No entanto, com a administração de estrogênio ocorreu à normalização da expressão gênica do PPAR α , sugerindo um papel positivo da reposição hormonal na modulação da oxidação lipídica no fígado.

Devido ao aumento do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares na menopausa, o papel da TRH no coração tem sido estudado (LIU *et al.*, 2004) e, evidenciou influência positiva sobre função cardíaca mas, sem mudanças no perfil lipídico e lipoproteínas. Os riscos de desenvolvimento de câncer de mama, útero e outros e os efeitos colaterais ainda necessitam de maiores esclarecimentos (STEVENSON, 2009; NORTH AMERICAN MENOPAUSE SOCIETY, 2012).

Em relação aos fatores nutricionais tem destaque os fitoestrógenos, substâncias derivadas de diversas plantas, que induzem efeitos biológicos no organismo, podendo mimetizar ou modular ações dos estrógenos, por se ligarem aos receptores estrogênicos (ER α e ER β), principalmente aos do tipo β (HARRIS *et al.*, 2005). Dentre os fitoestrógenos, as isoflavonas despertam um interesse maior, por indicarem índices mais baixos de cânceres hormônio-dependentes e outras doenças como osteoporose, obesidade e distúrbios cardiocirculatórios, em mulheres cujo consumo de isoflavonas estão associados às dietas tradicionais (ADLERCREUTZ, 2007). Segundo Pascale *et al.* (2011), os fitoestrógenos podem agir como estrógenos ou antiestrógenos, dependendo da dose administrada, da concentração plasmática e, ainda podem ser influenciados por um grande número de fatores tais como polimorfismo genético, interações medicamentosas, dieta e microbiota do trato gastrointestinal. Estudo epidemiológico (ADLERCREUTZ, 1995) mostrou que as mulheres asiáticas, as maiores consumidoras de soja, apresentam melhores indicadores no item saúde, quando comparadas às ocidentais. Tais indicadores são representados por menores taxas dos

sintomas da menopausa, câncer das glândulas mamárias e endométrio, além de maior longevidade, quando comparadas à média da população feminina mundial.

Associado as recomendações citadas, o exercício físico também tem sido usado como uma intervenção não farmacológica para prevenir e reverter os efeitos da ovariectomia e menopausa (CORRIVEAU *et al.*, 2008). O exercício melhora parâmetros funcionais e físicos como a composição corporal, a força, a capacidade cardiorrespiratória e a densidade mineral óssea (PAQUETE *et al.*, 2007; DE MATOS *et al.*, 2009)

Diversas modalidades de exercícios são recomendadas para promover a melhora destes parâmetros como, por exemplo, exercícios contínuos e intervalados (caminhadas e corridas), exercícios de flexibilidade e o treinamento de força. Entretanto, o treinamento de força ainda não é comumente utilizado como uma intervenção terapêutica no tratamento da menopausa (BROCHU *et al.*, 2009). Experimentalmente, o treinamento de força foi testado como uma estratégia não farmacológica para o tratamento de ratas ovariectomizadas. Entretanto, ainda são necessários estudos para se estabelecer a real influência do treinamento de força sobre os tecidos e órgãos afetados, pela menopausa ou pela ovariectomia.

Uma pesquisa epidemiológica sobre fatores clínicos de risco para fratura osteoporótica, realizada em macrorregiões brasileiras, concluiu que uma das intervenções clínicas para prevenir quedas e reduzir o risco de fraturas é a estimulação de atividade física regular (PINHEIRO *et al.*, 2009). Em estudo mais recente, avaliando mulheres nos primeiros anos após a menopausa, 48% relataram quedas e, dentre estas quase 30% declarou fazer caminhadas regulares. Entretanto, essa atividade física não foi eficaz como fator de proteção (NAHAS *et al.*, 2013).

1.5 Exercício físico

Antes de descrever e classificar exercício físico é necessário definir atividade física, a qual é entendida como qualquer movimento corporal produzido pela contração dos músculos esqueléticos, aumentando o gasto de energia acima do nível de repouso. Como exemplos: caminhar em deslocamento de um lugar a outro, subir escadas, lavar objetos, brincar, dançar, entre outros. Por outro lado, o exercício físico é uma forma de atividade física planejada e repetitiva, ou seja, uma atividade sistematizada de movimentos de diferentes segmentos

corporais que visa desenvolver a resistência física e as habilidades motoras (BALADY & BERRA, 2003; CORRIVEAU *et al.*, 2008).

O exercício físico tem como característica ampliar todos os parâmetros funcionais, físicos e metabólicos como a composição corporal, a força, a capacidade cardiorrespiratória e a remodelação da estrutura óssea (ELAVSKY & MCAULEY, 2009). Nos últimos anos, o exercício físico também tem sido indicado como uma intervenção não farmacológica para prevenir ou melhorar disfunções decorrentes do envelhecimento. Em especial, o diabetes mellitus, a obesidade, os distúrbios cardiovasculares, as dores musculares, a osteoporose, o reumatismo e os distúrbios emocionais como a depressão que tendem a despontar em decorrência da perda da função ovariana (CORRIVEAU *et al.*, 2008; GUADALUPE-GRAU *et al.*, 2009; LEITE *et al.*, 2010).

De uma maneira geral, o envelhecimento é acompanhado pela diminuição de atividades físicas, em função da diminuição da capacidade funcional provocada por menor capacidade aeróbia e progressiva debilidade da musculatura corporal. Esses fenômenos se acentuam a partir dos 50 anos de idade e, tem no sedentarismo um fator agravante desse processo (PAQUETE *et al.*, 2008).

Os exercícios físicos podem ser classificados como aeróbicos ou anaeróbicos, de acordo com a intensidade, duração e gasto energético.

O exercício aeróbico envolve o uso de oxigênio para a produção de energia pelos músculos, durante o desenvolvimento de atividades dinâmicas, numa repetição rítmica e contínua, resultando em aumento substancial da frequência cardíaca. Nesses músculos a glicose se transforma em ácido pirúvico, que entra na mitocôndria e aumenta a atividade da Acetil CoA. Por fim, produz cerca de dezoito vezes mais ATP do que exercícios anaeróbicos. Num processo contínuo, ácidos graxos passam a ser utilizados no lugar da glicose para produzir energia. Quanto à intensidade, o exercício aeróbico é considerado moderado quando demanda de 40 a 60% do volume máximo de oxigênio (VO_2max), com aproximadamente 50 a 70% da frequência cardíaca máxima; e, é considerado intenso quando demanda mais de 60% de $VO_2 max$ e acima de 70% da frequência cardíaca máxima. Esses exercícios são fundamentais para aprimorar o sistema cardiovascular e os músculos esqueléticos e, aumentam a performance. O intervalo de formação realizado em potências bem além de potência aeróbica máxima do indivíduo, como o treinamento de força, são exemplos de tais atividades (NICHOLAS *et al.*, 2002; SIGAL *et al.*, 2004).

O exercício anaeróbico é caracterizado por ter elevada intensidade e menor duração, cujo objetivo é desenvolver a flexibilidade, a força e o aumento da massa muscular. Usa a

força muscular para mover uma força de oposição. Nos primeiros segundos, há quebra do ATP estocado nas células musculares e, posteriormente, ocorre a transformação de glicose em ATP. Quando praticado com regularidade e intensidade moderada ou intensa aumenta aptidão e massa muscular. O exercício é descrito como de alta intensidade quando a carga trabalhada corresponde a cerca de 75% da carga de repetição máxima e, de intensidade moderada, quando a carga é de 50-74% da carga máxima (SIGAL *et al*, 2004; CORRIVEAU *et al.*, 2008).

1.5.1 Treinamento de força/ Exercício resistido

O treinamento de força (TF), também conhecido como exercício resistido, é projetado para aumentar a força muscular, a potência e a resistência. Envolve ativação voluntária de músculos esqueléticos específicos contra alguma forma de resistência externa, que pode ser proporcionada pelo peso corporal, pesos livres (barras e halteres), ou uma variedade de outros tipos de exercícios (máquinas, molas, elásticos, resistência manual).

O objetivo do TF é aplicar um estímulo a cada grupo muscular principal, por aproximadamente 30-90s e fornecer uma sobrecarga ligeiramente maior em relação à sessão de treinamento anterior. Uma maior sobrecarga pode ser um pequeno aumento na carga, nas repetições ou, em ambas. A sobrecarga progressiva é essencial para aumentar a força e o tamanho do músculo. O que parece ser necessário para estimular o aumento na força e na massa muscular é justamente ultrapassar um pouco o limiar das sessões anteriores. Ultrapassar o limiar inicia reações fisiológicas complexas, como o aumento na síntese proteica. No entanto, mas uma vez que o limiar é ultrapassado, qualquer volume adicional de exercício parece desnecessário e não recomendado. Isto é, exercício desnecessário gasta tempo e atua como um estressor adicional, que pode prejudicar a recuperação da sessão de treinamento por meio de efeitos imunossupressivos. Durante o tempo de recuperação entre as sessões ocorrem as adaptações fisiológicas que dão base para sobrecargas subsequentes, na próxima sessão de treinamento (WINETT&CARPINELLI, 2001; KRAEMER *et al*, 2002). A modificação da carga de treinamento afeta as respostas metabólica, hormonal, neural e cardiovascular. E, a adequada evolução da sobrecarga no TF envolve: o aumento a carga absoluta e o aumento das repetições com uma dada carga (KRAEMER *et al*, 2002).

Modificações positivas nos parâmetros de composição corporal como massa corporal, força muscular e conteúdo mineral ósseo em mulheres após a menopausa foram evidenciados com o TF, a partir de um protocolo baseado em três séries de 10 repetições a 85% de uma repetição máxima (1RM) aplicado três vezes por semana, durante 24 semanas (KRAEMER *et al.*, 2002; BOCALINI *et al.*, 2008; BOCALINI *et al.*, 2009).

O TR estimula mudanças positivas, em relação aos fatores de risco associados à osteoporose, doenças cardiovasculares, câncer, diabetes mellitus. Além disso, o TR determina um aumento de força de 20 a 60%, independentemente do sexo ou da idade. O TF aumenta a massa corporal magra e diminui a massa gorda regional e total, principalmente, quando acompanhada de restrição calórica (WINETT & CARPINELLI, 2001; BROCHU *et al.*, 2009). Melhora os mecanismos envolvidos no metabolismo da glicose, incluindo a tolerância à glicose e a resistência à insulina, aumenta o HDL-colesterol. O aumento da força é acompanhado de aumento na mobilidade funcional e em atividades gerais, bem como por melhora em testes de equilíbrio, que reduz o risco de quedas, sendo especialmente importante na população idosa (WINETT, CARPINELLI, 2001).

Não existem dúvidas quanto ao fato do TF ter um impacto favorável em múltiplos fatores de risco associados às doenças e incapacidades (WINETT, CARPINELLI, 2001) e, que uma associação de exercícios aeróbicos, exercícios resistidos e alongamentos são recomendada. Entretanto, cabe ressaltar que na impossibilidade de executar exercícios aeróbicos, em função de entraves gerados por doenças crônicas, os indivíduos devem procurar ter o máximo de atividade física que as suas condições de saúde permitir (CHODZKO-ZAJKO *et al.*, 2009). A recomendação do treinamento de força para mulheres pode ser mais uma ferramenta no tratamento dos efeitos deletérios provocados pela menopausa. Entretanto, há necessidade de um melhor entendimento dos processos fisiopatológicos envolvidos na menopausa, bem como da influência do treinamento de força sobre os diversos tipos de tecidos e órgãos.

2 JUSTIFICATIVA

Para as mulheres, o avançar da idade é acompanhado pela menopausa, que é um fator crítico para o bem estar, antes mesmo de atingir o estágio de envelhecimento. A queda na produção dos estrogênios, característica desse período da vida, acelera a perda óssea e o ganho de massa corporal, modifica o padrão de distribuição de tecido adiposo e seu conteúdo, fatores que podem contribuir para o aparecimento de distúrbios osteominerais e do diabetes mellitus tipo 2.

Embora a terapia de reposição hormonal seja amplamente utilizada para redução das alterações metabólicas e o ganho de massa corporal, muitas mulheres não tem indicação clínica para o tratamento hormonal e, ações não farmacológicas passam a ser uma opção de tratamento, atualmente bastante empregadas. O uso de exercício físico, como por exemplo, o treinamento de força, tem crescido em popularidade devido aos resultados significativos que tem alcançado na compensação dos prejuízos metabólicos. Entretanto, estudos sobre vários aspectos funcionais devem ser construídos para dar subsídios de utilização do treinamento de força como uma opção de intervenção terapêutica de rotina para tratamento da menopausa. Portanto, a influência do treinamento de força sobre a adiposidade e a estrutura óssea é um dos aspectos funcionais que merece investigação, visando ser adotada como uma possível estratégia não farmacológica para a melhoria das alterações induzidas pela menopausa.

3 OBJETIVO

Avaliar o efeito do tratamento hormonal com estradiol e/ou treinamento físico sobre a adiposidade e a estrutura óssea de ratas fêmeas, após a perda da função gonadal.

3.1 Objetivos Específicos

1- Avaliar os efeitos dos esquemas de tratamento hormonal diário e cíclico com estradiol em ratas adultas ovariectomizadas sobre:

- a massa corporal, ingestão alimentar e composição corporal
- as massas uterinas, tecidos adiposos mesentérico e retroperitoneal
- as concentrações séricas de lipídeos, glicose, fósforo, estradiol, osteocalcina e insulina
- a morfologia de tecido adiposo subcutâneo e retroperitoneal
- a massa, as dimensões, o conteúdo e a densidade mineral de fêmur e vértebra L4

2- Avaliar os efeitos do tratamento hormonal cíclico com estradiol e/ou treinamento de força em ratas adultas ovariectomizadas sobre:

- a massa corporal, ingestão alimentar e composição corporal
- as massas uterinas, fígado, tecidos adiposos mesentérico, retroperitoneal
- as concentrações séricas de lipídeos, glicose, estradiol, insulina, leptina e osteocalcina
- as concentrações hepáticas de triglicerídeos, colesterol e glicogênio
- as dimensões, o conteúdo e a densidade mineral de fêmur e vértebra L4
- a morfologia de tecido adiposo subcutâneo, retroperitoneal e mesentérico
- a expressão de PPAR γ no tecido subcutâneo, retroperitoneal e mesentérico
- a morfologia do fêmur
- a expressão de ER α no fêmur

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Esse estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ, com protocolo nº CEUA/040/2012.

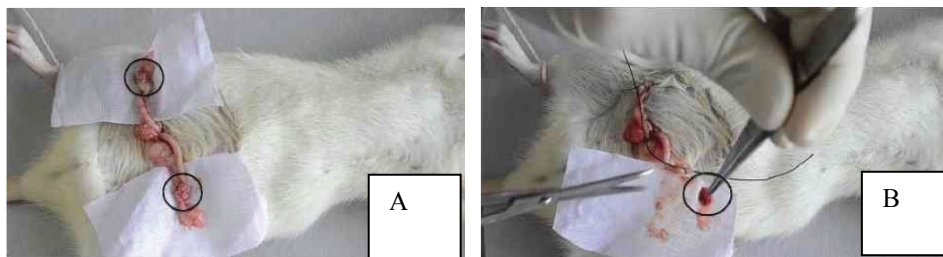
4.1 Protocolo 1: Padronização do esquema de tratamento hormonal cíclico e diário em ratas adultas ovariectomizadas

4.1.1 Tratamento dos animais

Foram utilizadas ratas adultas, de linhagem Wistar, isogênicas e virgens, mantidas em gaiolas medindo 34 x 41cm, com temperatura ambiente controlada (25 a 27°C), umidade constante e ciclo claro/escuro de 12 horas (6:00 às 18:00), sendo a ração comercial (Purina®, São Paulo) e água filtrada *ad libitum*.

A partir dos 76 dias de vida, as ratas foram submetidas à coleta de secreção vaginal para citologia, diariamente, por duas semanas. As amostras foram colhidas com finas ponteiros plásticos, cuidadosamente, introduzidas na vagina. O material foi distribuído em lâminas e analisado a fresco por meio de microscopia óptica, utilizando objetivas de 10x e 40x (Olympus, modelo Bx40, Japão). O acompanhamento da sequência de ciclos estrais permite avaliar de forma indireta as condições de funcionamento das gônadas, considerando-se a produção de seus esteroides sexuais, estradiol e progesterona, e suas ações sobre a genitália. Ao final da avaliação dos ciclos, foram selecionadas para o estudo trinta e duas (32) ratas que apresentavam ciclos estrais regulares. Aos 90 dias de idade, parte das fêmeas foi submetida à ovariectomia (OVX) através de duas pequenas incisões para-espinhais na região dorsal entre a crista ilíaca e as costelas mais inferiores. O grupo SHAM recebeu apenas a incisão cirúrgica sem a retirada das gônadas, para proporcionar o estresse cirúrgico.

Figura 6 - Fotografia demonstrando a cirurgia da remoção bilateral dos ovários



Nota: (A) ovariectomia. (B) exposição de ovários e útero; remoção dos ovários.

Fonte: khajuria *et al*, 2012.

A partir desse procedimento as ratas foram divididas em quatro grupos experimentais, como descrito abaixo. O tratamento com benzoato de estradiol (Sigma) foi iniciado após 30 dias da recuperação da cirurgia.

- Controle (Sham, n=8)
- Ovariectomizadas (OVX, n=8)
- Ovariectomizadas tratadas com benzoato de estradiol, administração diária de 0,7 μ g/100g PC, sc (BED, n=8)
- Ovariectomizadas tratadas com benzoato de estradiol, administração cíclica de 1,5 μ g/100g PC, sc a cada 4 dias (BEC, n=8).

Os grupos Sham e OVX receberam óleo de milho, veículo de diluição do benzoato de estradiol.

4.1.2 Avaliação da massa corporal e ingestão alimentar

Durante todo o período experimental os animais foram pesados semanalmente em balança eletrônica. A ingestão alimentar foi calculada de acordo com a quantidade consumida no período de 3 dias, ou seja, a subtração entre a quantidade total de ração ofertada e a quantidade remanescente na caixa foi realizada três vezes por semana e então dividida pelo número de dias e de animais na gaiola.

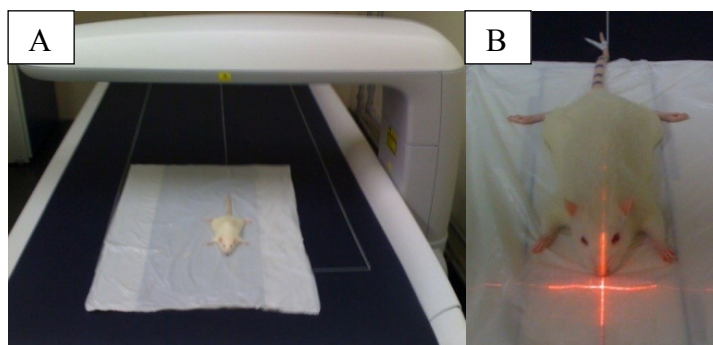
4.1.3 Avaliação da composição corporal

Após 21 dias de tratamento, ou seja, aos 141 dias de vida, as ratas foram anestesiadas com injeção intra-peritoneal de Pentobarbital sódico (0,1ml/100g PC, Thiopentax, Cristália®) para avaliação da composição corporal por absorciometria de raio X de dupla energia (DXA, GE Healthcare/lunar, USA), no Instituto de Nutrição da UERJ (Figura 7). Após exame, os parâmetros gordura corporal total (g), gordura do tronco (g), massa magra (g), densidade mineral óssea (g/cm^2), conteúdo mineral ósseo (g) e área óssea (cm^2) foram determinados. A análise das imagens foi executada pelo mesmo examinador.

4.1.4 Coleta de tecidos

Após a realização do DXA todas as ratas foram sacrificadas por exsanguinação. Os tecidos: útero, fígado, tecido adiposo retroperitoneal e mesentérico, coluna vertebral, fêmures esquerdo e direito foram coletados, pesados e armazenados em nitrogênio líquido para análises posteriores. Amostras de tecido subcutâneo foram coletadas e armazenadas para posterior análise morfológica. O sangue foi centrifugado 1590 xg por 15 minutos (Centrífuga Hitachi CR22, USA) e o soro estocado a -20°C .

Figura 7 - Fotografia demonstrando o aparelho GE Healthcare



Nota: (A) Aparelho DXA vista frontal. (B) Rata na posição de decúbito dorsal sendo escaneada pelo aparelho.
Fonte: A autora, 2015.

4.1.5 Dosagens séricas

As dosagens séricas de triglicerídeos, colesterol total e glicose foram realizados por método colorimétrico, utilizando-se Kits comerciais Bioclin® e para o fósforo o Kit comercial Labtest. As análises foram realizadas em duplicatas e a leitura efetuada em espectrofotômetro (TU-1800, UV-VIS®, Columbia, MD, USA). Todos os resultados foram expressos em mg/dL.

As dosagens hormonais de estradiol, insulina e foram realizadas por radioimunoensaio específico (RIE) (MP Biomedicals, Inc., CA, USA), em duplicata e a detecção da radioatividade foi efetuada em contador gamma (Gamma-C12, USA). As concentrações séricas de estradiol são expressas em pg/mL e coeficiente de variação intraensaio foi de 3,4% com limite mínimo de detecção de 10,0 pg/mL pg/mL, enquanto a insulina foi expressa em μ UI/ml, coeficiente de variação intraensaio foi de 2,8% e com limite mínimo de detecção de 1 mUI/ml. A dosagem de osteocalcina foi realizada pelo grupo Gênese (São Paulo), da equipe do IgAc pela analista Mayra M. Silva. Para a dosagem de osteocalcina sérica lote (RBN-31K, Millipore, USA) as amostras foram diluídas 1:100, realizada pelo equipamento Milliplex Analyser, com software Xponent versão 3.1 (Software IS, Millipore, USA). As concentrações plasmáticas desses hormônios foram expressas em pg/mL. A sensibilidade para osteocalcina foi de 0.8 pg/mL e o coeficiente de variação intraensaio foi de 5%.

4.1.6 Morfologia do tecido adiposo retroperitoneal e subcutâneo

As amostras do tecido adiposo retroperitoneal e subcutâneos foram fixados em formol tamponado. Após 72 horas de fixação, estas foram desidratadas com etanol 100% (5x), incubadas com xilol (3x) e parafina líquida (3x) e embebidas em parafina. Secções de 5 μ m foram obtidas no micrótomo (Microtec-CUT 4050, SC, USA), colocados em lâminas e coradas com hematoxilina/eosina, segundo técnica de rotina. Os cortes histológicos foram analisados por meio de um sistema microscópico computadorizado, composto por um microscópio óptico Olympus BX 40, cuja ocular é acoplada a uma câmera de vídeo (Olympus DP 71, CA, EUA) que transmite as imagens obtidas a um microcomputador. As imagens visualizadas pelo monitor foram gravadas para posterior análise através do programa Image J.

O tamanho das imagens capturadas foi de 1360 x 1024 pixels. Essas imagens foram calibradas através da lâmina (Leica) com régua graduada em dois milímetros divididos 10 em unidades de 0,01mm (dez micrômetros) para a objetiva de 10x. Foram utilizadas 100 adipócitos por animal selecionadas randomicamente (n=6;10 lâminas para cada animal). As medidas de área do adipócito foram determinadas usando o programa IMAGE-J/NHI(<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

4.1.7 Análises ósseas

Os ossos, fêmures e colunas vertebrais, foram dissecados para retirada das partes moles associadas e mantidos em solução salina (NaCl 0,9%) a uma temperatura de -20°C. Na coluna lombar retirada foi destacada a vértebra L4 para análises posteriores.

4.1.7.1 Dimensões ósseas

Com auxílio de um paquímetro foram realizadas as seguintes medidas ósseas: altura da vértebra L4, comprimento do fêmur, distância entre os trocânteres e largura do ponto médio da diáfise.

4.1.7.2 Parâmetros físicos dos ossos

As peças ósseas foram inseridas em água destilada e colocadas no dessecador por 24 horas para retirada do ar presente em poros ósseos. Em seguida, foram imersos em outro recipiente contendo água destilada e pesados, com auxílio de um fio de cobre, para obtenção do peso imerso (P_i). Removido o excesso de solução, foi aferido o peso úmido (P_u) e, após desidratação em estufa a 95°C *overnight*, os ossos foram pesados para obtenção do peso seco (P_s). Com base nesses dados, o volume ósseo (VO) foi calculado seguindo o princípio de Arquimedes, a partir da seguinte fórmula (MARTIN e et al, 2001):

$$\text{Volume ósseo (VO)} = \frac{P_u - P_i}{p} \text{ (cm}^3\text{)}$$

p

Onde: p = densidade da água (g/cm³)

4.1.7.3 Radiodensidade óssea

As peças ósseas foram submetidas à análise por tomografia computadorizada (TC) em tomógrafo Modelo Helicoidal HISPEED GE, do Centro Universitário de Controle do Câncer (CUCC/UERJ). Os cortes tomográficos de 1 mm de espessura permitiram a avaliação da radiodensidade (expressa como *Hounsfield units*, HU) da região da cabeça do fêmur e do corpo vertebral, que foram mensuradas manualmente, com o uso do programa eFilm Lite (2.0, 2003, Milwaukee, USA).

4.1.7.4 Densidade e Conteúdo mineral ósseos

Os ossos foram colocados em recipiente com arroz, para simulação das partes moles, e expostas para análise por absorciometria de raios-X de dupla energia (DXA, Lunar IDXA 200368 GE Instrument), no Instituto de Nutrição - INU/UERJ. As análises permitiram determinar a densidade mineral óssea (DMO) e o conteúdo mineral ósseo (CMO) das duas peças analisadas.

4.1.8 Análise Estatística

Os resultados de consumo alimentar e massa corporal foram analisados através do método de análise de variância (ANOVA) bivariada, seguida do pós-teste de Bonferroni. Para os demais resultados foi utilizado o método de ANOVA univariada, seguida do pós-teste de comparação múltipla Newman Keuls. Todos os resultados foram expressos como média±erro

padrão da média (EPM), considerando o nível de significância de $p < 0.05$. O software utilizado foi o Prism (GraphPad Prism version 5.00 for Windows).

4.2 Protocolo 2: Efeito do tratamento com estradiol e/ou treinamento de força em ratas adultas ovariectomizadas

4.2.1 Tratamento dos animais

Foram utilizadas ratas adultas, de linhagem Wistar, seguindo os mesmos procedimentos descritos no Protocolo 1, até os 90 dias de vida, quando foram selecionadas quarenta (40) ratas que apresentavam ciclos estrais regulares. Destas, oito (8) sofreram estresse cirúrgico, enquanto as demais (32) foram ovariectomizadas. Os tratamentos foram iniciados após 30 dias da recuperação da cirurgia e as ratas passaram a formar 5 grupos experimentais.

- Grupo controle (SHAM, n=8): ratas sedentárias
- Grupo ovariectomizado (OVX, n=8): ratas sedentárias e castradas
- Ovariectomizadas tratadas com estradiol (BE, n=8): ratas castradas, sedentárias, tratadas com benzoato de estradiol (Sigma, 1.5µg/100g PC, sc a cada 4 dias), durante 6 semanas.
- Ovariectomizadas treinadas (EX, n=8): ratas castradas, tratadas com exercício resistido por 6 semanas
- Ovariectomizadas treinada e tratadas com benzoato de estradiol (BE+EX, n=8): ratas castradas, tratadas com benzoato de estradiol (Sigma, 1.5µg/100g PC, sc a cada 4 dias) e exercício resistido por 6 semanas

Os grupos SHAM e OVX receberam óleo de milho, veículo de diluição do benzoato de estradiol, de forma cíclica.

4.2.2 Protocolo de treinamento de força

O treinamento de força de seis (6) semanas foi realizado uma vez a cada três dias. Inicialmente, as ratas foram adaptadas ao protocolo de treinamento de força que exigia que os animais escalassem uma escada vertical (1,1 x 0,18 m, degrau de 2-cm, inclinação de 80°) com pesos presos as suas caudas (Figura 6). O tamanho da escada fazia com que os animais realizassem 8-12 movimentos por escalada. O aparato de carga foi preso à porção proximal da cauda com uma fita autoadesiva. Com o aparato fixado a cauda as ratas foram colocadas na parte inferior da escada e familiarizadas com a escalada. Caso necessário um estímulo com pinça era aplicado na cauda do animal para iniciar o movimento. No topo da escada as ratas alcançavam uma gaiola (20 x 20 x 20 cm) onde descansavam durante 120 segundos. Este procedimento foi repetido até que os animais conseguissem voluntariamente escalar a escada, três vezes consecutivas, sem estímulo.

Três dias após esta familiarização, a primeira sessão de treinamento consistiu de 4-8 escaladas na escada com cargas progressivamente mais pesadas. A escalada inicial consistia em carregar uma carga de 75% do peso corporal do animal e, em seguida, era adicionado um peso de 30g, até que fosse atingida uma carga com a qual a rata não conseguiria escalar toda a escada. A falha em escalar foi determinada quando o animal não conseguia progredir na subida da escada após três estímulos sucessivos na cauda. A maior carga carregada por toda a escada foi considerada como a capacidade máxima de carregamento da rata para aquela sessão de treinamento.

As sessões de treinamento consistiam de quatro escaladas na escada, com 50%, 75%, 90% e 100% da capacidade máxima de carregamento do animal, determinada na sessão anterior. Durante as escaladas subsequentes eram adicionados 30g até que uma nova capacidade máxima de carregamento fosse determinada. O protocolo de treinamento de força foi adaptado de HORNBERGER; FARRAR (2004), de acordo com as necessidades do presente estudo. A partir da ovariectomia as ratas foram hospedadas no biotério do Laboratório de Biologia Vascular (BioVasc) do Depto de Ciências Fisiológicas/IBRAG/UERJ que cedeu espaço e permitiu a realização do treinamento resistido.

Figura 8 - Escada para treinamento de força



Fonte: Leite *et al*, 2012

4.2.3 Avaliação da massa corporal e da ingestão alimentar

As medidas de massa corporal e de ingestão alimentar seguiram os procedimentos descritos no Protocolo 1 (item 4.1.2).

4.2.4 Avaliação da composição corporal

Aos 165 dias de vida, as ratas foram anestesiadas com injeção intraperitoneal de Pentobarbital sódico (Thiopentax, Cristália®), 0,1ml/100g PC e submetidos à avaliação da composição corporal por DXA, conforme descrito anteriormente (item 4.1.3).

4.2.5 Coleta de tecidos

Após a realização do DXA os animais foram sacrificados por exsanguinação e os tecidos adiposo mesentérico, adiposo retroperitoneal, útero, fígado, coluna vertebral e fêmures coletados, pesados e congelados em nitrogênio líquido para análises posteriores. O sangue foi processado, como descrito no item 4.1.4.

4.2.6 Dosagens séricas

As dosagens séricas de triglicerídeos, colesterol total, HDL, glicose, estradiol e insulina e osteocalcina seguiram a descrição do item 4.1.5. O coeficiente de variação intraensaio foi de 1% para o estradiol, 3,8% para a insulina e 5% para a osteocalcina. O limite mínimo de detecção para o estradiol foi de 10,0 pg/mL, para a insulina foi de 1 mUI/ml e para osteocalcina foi de 0.8 pg/mL.

A partir das concentrações de insulina e glicose foram também calculadas a resistência à insulina e a atividade das células beta. A avaliação da resistência à insulina foi determinada pelo índice HOMA-IR que consiste na multiplicação da concentração de insulina em jejum ($\mu\text{UI/mL}$) e glicose em jejum (mM/L) dividido por 22,5. A avaliação da atividade das células beta pancreáticas foi determinada pelo índice HOMA- β , que consiste na multiplicação da concentração de insulina em jejum ($\mu\text{U/mL}$) por 20, dividida pela concentração de glicose em jejum (mM/L) subtraindo 3,5 (Matthews et al, 1985).

A dosagem de leptina sérica foi realizada por radioimunoensaio específico (RIE) (MP Biomedicals, Inc., CA, USA), em duplicata e a detecção da radioatividade foi efetuada em contador gamma (Gamma-C12, USA). As concentrações séricas de leptina são expressas em ng/ml. O limite mínimo de detecção foi de 0,313 ng/mL e o coeficiente de variação intraensaio foi de 2,8%.

4.2.7 Processamento e análise morfológica de tecido adiposo

As amostras de tecido adiposo subcutâneo, retroperitoneal e mesentérico foram processadas e analisadas segundo técnica descrita no item 4.1.6.

4.2.7.1 Imunohistoquímica do tecido adiposo

Secções histológicas de tecido adiposo subcutâneo (n=6; 10 lâminas para cada animal), retroperitoneal e mesentérico foram diafanizadas em xilol e hidratadas com baterias crescentes de álcool 70%, 80%, 90% e 100%. A recuperação antigênica foi realizada utilizando panela a vapor (10 min) com as secções imersas em tampão citrato (solução ácido cítrico 0,1M diluída em pH 6,0). Após ambientação as lâminas foram lavadas (3x,5 minutos) com tampão fosfato 0,1M (pH 7.4). O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com solução H₂O₂ (DAKO, Carpinteria, CA). Em seguida, a reação foi interrompida com lavagens de tampão fosfato 0,1 M. A recuperação antigênica foi realizada com tampão citrato (pH 6,0) em banho-maria a 95-99°C por 15 minutos e após, o material lavado em tampão fosfato 0.1M. O bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos foi feito com albumina a 10% durante 40 minutos. A incubação com anticorpo primário foi realizada por 16 horas a 4°C. O anticorpo usado foi PPAR γ (Santa Cruz, CA, EUA) na diluição 1:100. O material foi lavado com tampão fosfato (3x, 5 minutos) e em seguida, foi feita a incubação com anticorpo secundário biotilado rabbit-mouse IgG usando o Kit LSAB2-HRP (DAKO, Carpinteria, CA) durante 1 hora. Por ultimo, o material foi lavado com tampão fosfato 0,1M (3x 5 minutos) e revelado com solução de 3,3'- Diaminobenzidina 3 (DAKO, Carpinteria, CA). As lâminas foram montadas com entelan e então, observadas no microscópio Olympus BX 40 e fotografadas com a câmera digital acoplada (Olympus DP 71,CA, EUA).

4.2.8 Dosagem de triglicérideo, colesterol e glicogênio hepáticos

Amostras de 50mg de fígado foram homogeneizadas em 1 ml de isopropanol (Vetec, Duque de Caxias, RJ, BR) e centrifugadas (5900 rpm, 10 minutos, 4°C). O total de triglicérideos e colesterol foi mensurado a partir de ensaio colorimétrico utilizando kit comercial (Bioclin, Belo Horizonte, Brazil).

A glicose produzida pela hidrólise do glicogênio hepático foi avaliada com kit comercial (Doles, Goiânia, GO, BR) em método previamente descrito (Trevenzoli et. al, 2010). As amostras de fígado foram pesadas e homogeneizadas com 4 mL de ácido tricloroacético (TCA) à 10%. Após a centrifugação (1.000xg, 10 min, 4°C) foram adicionados 5 mL de etanol absoluto (Vetec, Duque de Caxias, RJ, BR) a 2 mL do sobrenadante. Após 12 horas de incubação à -20°C a mistura foi centrifugada (1.000xg, 10 min, 4°C) e o sobrenadante descartado. O glicogênio foi hidrolisado pela incubação do pellet com 1 M de ácido clorídrico (HCl) (Vetec, Duque de Caxias, RJ, BR) por 30 minutos. Adicionou-se 1 mL de 1 M hidróxido de sódio (NaOH) (Vetec, Duque de Caxias, RJ, BR) para neutralizar a mistura. A glicose foi quantificada em 200 µL do sobrenadante a 510nm em espectrofluorímetro (Hidex, Turku, Finlândia).

4.2.9 Análises ósseas

4.2.9.1 Dimensões ósseas

Com auxílio de um paquímetro foram realizadas as seguintes medidas ósseas: altura da vértebra L4, comprimento do fêmur, distância entre os trocânteres e largura do ponto médio da diáfise.

4.2.9.2 Densidade e Conteúdo mineral ósseo

Avaliados segundo a descrição anterior (item 4.7.1.4).

4.2.9.3 Processamento histológico do tecido ósseo

Os fêmures (n=6) foram fixados em formol tamponado pH 7,4 por um período de 24 horas, sendo então descalcificados em solução com EDTA (ácido etilendiamino tetraacético) pH 7,4 em temperatura ambiente durante 365 dias. Logo após, as peças foram desidratadas com etanol 100% (5x), incubadas com xilol (3x), parafina líquida (3x) e emblocadas em parafina líquida. Secções de 4µm foram obtidas no micrótomo (Microtec-CUT 4050, SC, USA), colocados em lâminas e coradas com hematoxilina/eosina. Após a montagem com entelan as lâminas foram observadas no microscópio Olympus BX 40 e fotografadas com a câmera digital acoplada (Olympus DP 71,CA, EUA).

4.2.9.4 Imunohistoquímica do tecido ósseo

Decorridas 12 horas de estocagem em estufa a 30°C, as secções histológicas de fêmures foram diafanizadas em banhos sucessivos de xilol e hidratadas em banhos crescentes de etanol (100%, 95% e 70%), seguidos de água destilada. A recuperação antigênica foi realizada utilizando panela de pressão (10 min) com as secções imersas em tampão citrato (solução ácido cítrico 0,1M em pH 6,0). Após resfriamento em temperatura ambiente, os cortes foram lavados em tampão fosfato (0,1M a pH 7,4). O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com solução H₂O₂ (DAKO, Carpinteria, CA). Em seguida, a reação foi interrompida com lavagens de tampão fosfato 0,1M. A recuperação antigênica foi realizada com tampão citrato (pH 6,0) em banho-maria a 95-99°C por 15 minutos e após, o material lavado em tampão fosfato 0,1M. O bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos foi feito com albumina a 10% durante 40 minutos. A incubação com anticorpo primário foi realizada por 16 horas a 4°C. O anticorpo usado foi ERalfa (Santa Cruz, CA, EUA) na diluição 1:200. O material foi

lavado com tampão fosfato (3x, 5 minutos) e em seguida, foi feita a incubação com anticorpo secundário biotilado rabbit-mouse IgG usando o Kit LSAB2-HRP (DAKO, Carpinteria, CA) durante 1 hora. Por último, o material foi lavado com tampão fosfato 0,1 M (3x 5 minutos) e revelado com solução de 3,3'- Diaminobenzidina 3 (DAKO, Carpinteria, CA). As lâminas foram montadas com entelan e então, observadas no microscópio Olympus BX 40 e fotografadas com a câmera digital acoplada (Olympus DP 71, CA, EUA).

4.2.10 Análise estatística

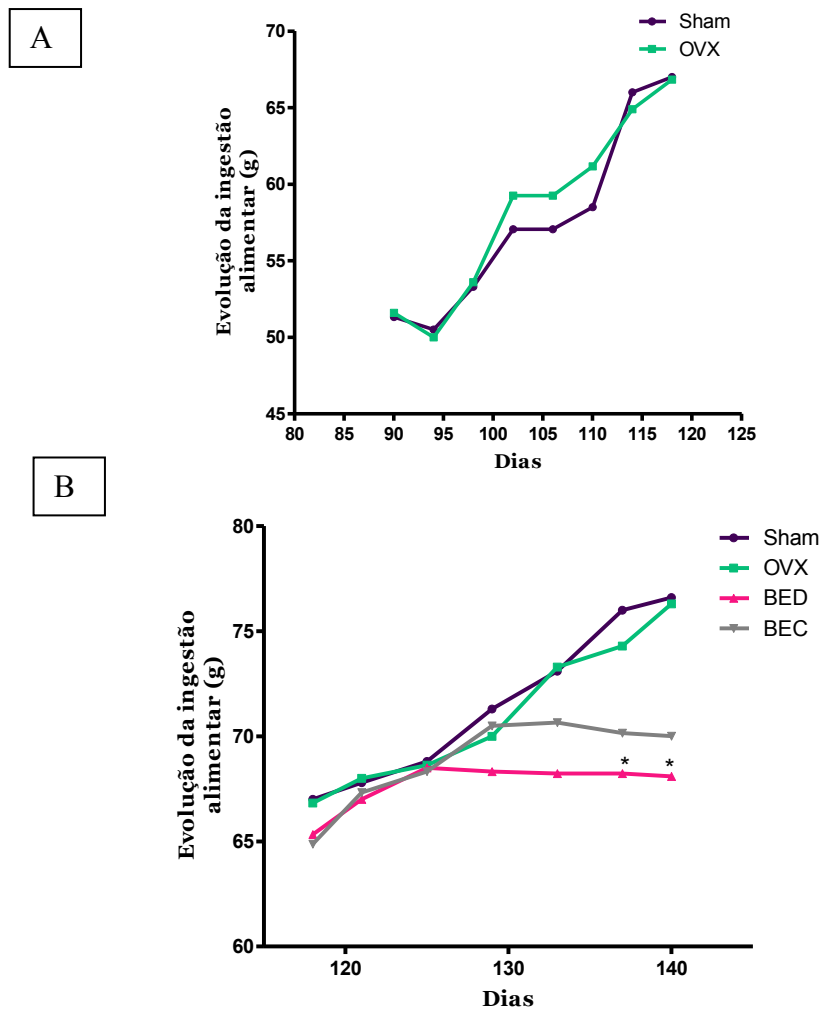
Os dados de consumo alimentar e ganho massa corporal foram analisados através de análise de variância (ANOVA) bivariada, seguida do pós-teste de Bonferroni. Os demais resultados foram avaliados por análise de variância univariada seguida de pós- teste Newman Keuls. Todos os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM), considerando o nível de significância de $p < 0,05$. O software utilizado foi o Prism (GraphPad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software, www.graphpad.com, EUA).

5 RESULTADOS DO PROTOCOLO 1: Padronização do esquema de tratamento hormonal cíclico e diário em ratas adultas ovariectomizadas

5.1 Evolução do consumo alimentar

A ingestão alimentar média dos animais aos 90 dias foi de 51,91 g. O consumo alimentar avaliado de 4 em 4 dias apresentou um perfil semelhante nos quatro grupos até os 125 dias, (Gráfico 1A). O consumo alimentar no grupo BED se manteve constante dos 125 aos 141 dias. BED e BEC apresentaram menor consumo ($p < 0,001$) que Sham e OVX a partir dos 137 dias de vida (Gráfico 1B).

Gráfico 1 - Evolução da ingestão alimentar



Nota: Evolução da ingestão alimentar entre os 120 e 141 dias nas ratas Sham (n=8, controle), OVX (n=8), BED (n=8) e BEC (n=8). * $p < 0,05$ ANOVA bivariada, seguida do pós-teste Bonferroni: BED, BEC vs Sham, OVX.

Legenda: SHAN, animais controle; OVX, ovariectomizadas; BED, ovariectomizadas tratadas com BE; BEC, ovariectomizadas tratadas com BE ciclicamente.

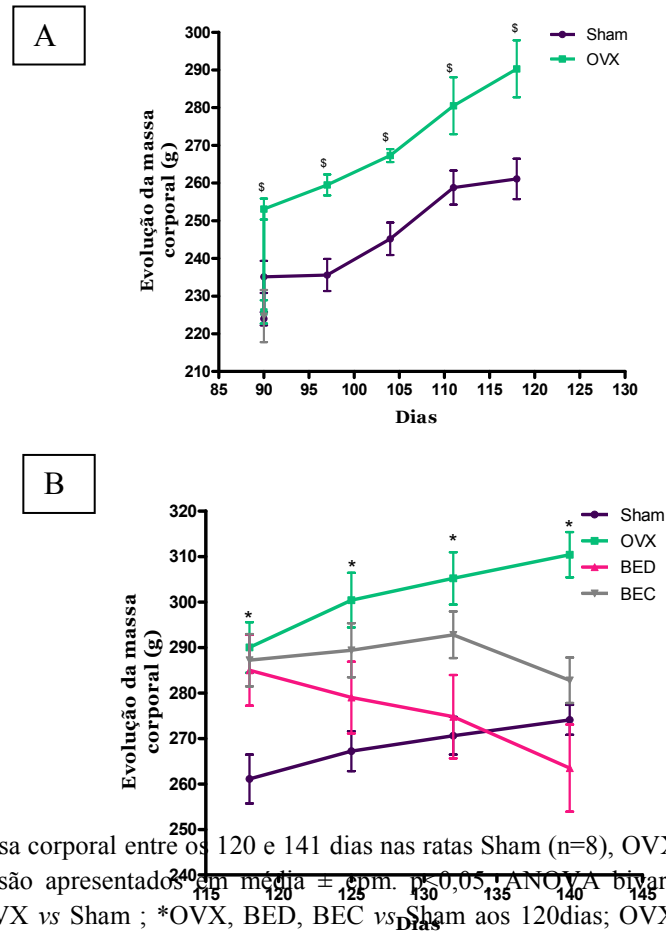
Fonte: A autora, 2015.

5.2 Evolução da massa corporal

A massa corporal média dos animais aos 90 dias foi de $247 \pm 61,42$ g. O grupo OVX obteve maior ganho de massa corporal a partir dos 97 dias até os 141 dias quando comparados ao grupo Sham. Os grupos tratados, BE D e BE C, também mostraram maior ganho de massa corporal a partir dos 97 dias em relação ao grupo Sham, entretanto, logo após o início do

tratamento com benzoato de estradiol, aos 125 dias, houve mudança do perfil. O grupo BEC manteve massa corporal enquanto o BED apresentou perda crescente até o final do experimento, (Gráfico 2B).

Gráfico 2 - Evolução da massa corporal



Nota: Evolução da massa corporal entre os 120 e 141 dias nas ratas Sham (n=8), OVX (n=8), BED (n=8) e BEC (n=8). Valores são apresentados em média \pm cm. $p < 0,05$, ANOVA bivarida, seguida do pós-teste Bonferroni: \$OVX vs Sham ; *OVX, BED, BEC vs Sham aos 120 dias; OVX vs Sham dos 125 aos 141 dias.

Legenda: SHAN, animais controle; OVX, ovariectomizadas; BED, ovariectomizadas tratadas com BE; BEC, ovariectomizadas tratadas com BE ciclicamente.

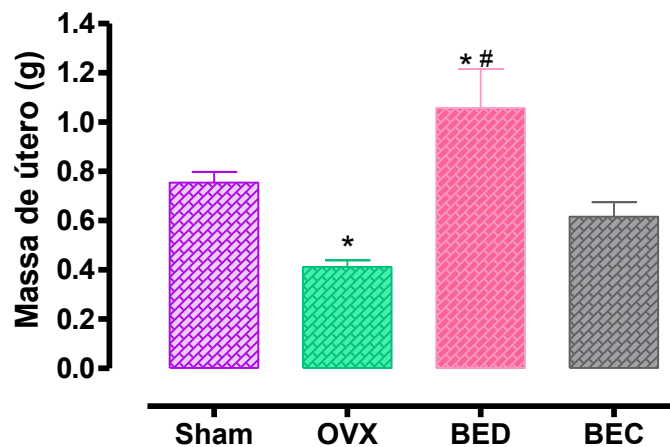
Fonte: A autora, 2015.

5.3 Massa dos tecidos

5.3.1 Massa do útero

A massa do útero do grupo OVX ($0,4123 \pm 0,026\text{g}$) foi menor em relação aos grupos Sham (Sham: $0,7549 \pm 0,04\text{ g}$) e BED ($1,058 \pm 0,158\text{ g}$). O grupo BED apresentou a maior massa de útero quando comparada aos demais grupos experimentais. O grupo BEC ($0,616 \pm 0,059\text{ g}$) apresentou a massa do útero similar a do grupo Sham, (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Massa do útero



Nota: Massa do útero aos 141 dias de idade nas ratas Sham (n=8), OVX (n=8), BED (n=8) e BEC (n=8). Valores são apresentados em média \pm epm. ANOVA univariada, seguida do pós-teste Newman-Keuls, $p < 0,0005$.

*OVX vs Sham, BED; # BED vs todos.

Legenda: SHAN, animais controle; OVX, ovariectomizadas; BED, ovariectomizadas tratadas com BE; BEC, ovariectomizadas tratadas com BE ciclicamente.

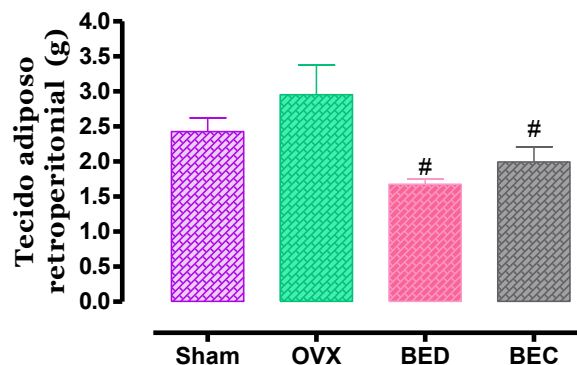
Fonte: A autora, 2015.

5.3.2 Massa de tecido adiposo retroperitoneal e mesentérico

O compartimento retroperitoneal apresentou menores massas nos grupos BED ($1,675 \pm 0,075$ g) e BEC ($1,994 \pm 0,216$ g) em relação ao OVX ($2,953 \pm 0,423$ g), não diferindo significativamente do grupo Sham ($2,426 \pm 0,196$ g), (Gráfico 4).

No compartimento mesentérico, o tratamento (BED: $5,495 \pm 0,488$ g; BEC: $5,452 \pm 0,216$ g) determinou menor massa em relação aos grupos OVX ($10,34 \pm 1,264$ g) e Sham ($2,426 \pm 1,92$), (Gráfico 5).

Gráfico 4 - Massa de tecido adiposo retroperitoneal

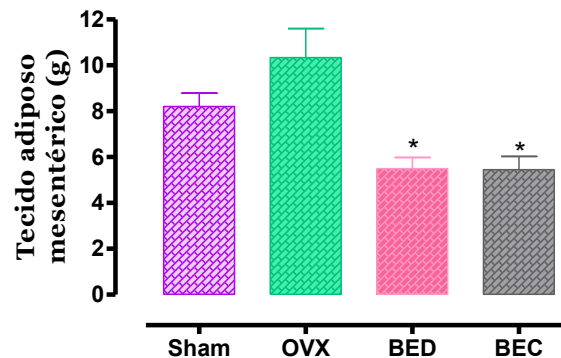


Nota: Massa de tecido adiposo retroperitoneal aos 141 dias de idade nas ratas Sham (n=8), OVX (n=8), BED (n=8) e BEC (n=8). Valores são apresentados em média \pm epm. ANOVA univariada, seguida do pós-teste Newman-Keuls, $p < 0,02$. # BED, BEC vs OVX.

Legenda: SHAN, animais controle; OVX, ovariectomizadas; BED, ovariectomizadas tratadas com BE; BEC, ovariectomizadas tratadas com BE ciclicamente.

Fonte: A autora, 2015.

Gráfico 5 - Massa de tecido adiposo mesentérico



Nota: Massa de tecido adiposo mesentérico aos 141 dias de idade nas ratas Sham (n=8), OVX (n=8), BED (n=8) e BEC (n=8). Valores são apresentados em média±epm. ANOVA univariada, seguida do pós-teste Newman-Keuls, $p < 0,0002$, * BED, BEC vs Sham, OVX.

Legenda: SHAN, animais controle; OVX, ovariectomizadas; BED, ovariectomizadas tratadas com BE; BEC, ovariectomizadas tratadas com BE ciclicamente.

Fonte: A autora, 2015.

5.4 Análise da composição corporal por DXA

A análise da composição corporal por DXA evidenciou no grupo OVX diminuição da densidade mineral óssea, do conteúdo mineral ósseo e da área óssea, aumento ($p < 0,05$) da gordura corporal total e do tronco em relação ao grupo Sham. O grupo BE D apresentou menor ($p < 0,05$) massa magra, gordura corporal total e do tronco em relação ao grupo OVX e o Sham. O grupo BEC apresentou valores semelhantes ao grupo Sham para todos os parâmetros analisados. Comparando a resposta de BED e BEC, nota-se que o tratamento diário determinou menor massa magra, gordura corporal total e do tronco em relação ao tratamento cíclico, mas não mostraram diferença em relação aos parâmetros ósseos, (Tabela 3).

Tabela 3 - Parâmetros de composição corporal determinados por DXA

	Sham	OVX	BED	BEC
Massa magra (g)	200,30±8,250	181,50±8,874	162,30±6,489 ^{#§}	188,80±6,575
Gordura corporal total (g)	61,33±1,453	74,75±4,191*	55,33±3,480 [#]	65,67±2,667
Gordura do tronco (g)	36,75±1,931	50,50±3,069*	36,50±2,533	46,67±6,227
Densidade mineral óssea (g/cm²)	0,14±0,002	0,13±0,009*	0,14±0,001	0,14±0,001
Conteúdo mineral ósseo (g)	7,70±0,135	7,07±0,133*	8,00±0,100	7,80±0,122
Área óssea (cm²)	54,00±0,408	50,50±1,190*	54,00±1,225	56,50±0,645

Nota: Parâmetros analisados por DXA aos 141 dias de vida. Grupo Sham, OVX, BED e BEC. Valores são expressos em média±epm. $p<0,005$, ANOVA univariada, seguida do pós-teste Newnam-Keuls. * OVX vs Sham, BED; [#]BED vs Sham, OVX; [§] BED vs Sham-

Legenda: SHAN, animais controle; OVX, ovariectomizadas; BED, ovariectomizadas tratadas com BE; BEC, ovariectomizadas tratadas com BE ciclicamente.

Fonte: A autora, 2015.

5.5 Avaliações Séricas

As concentrações séricas de fósforo, triglicerídeos e colesterol não diferiram entre os grupos experimentais. A glicose foi maior ($p<0.0001$) em todos os grupos experimentais comparados ao grupo Sham.

O grupo OVX apresentou diminuição ($p<0.005$) da concentração sérica de estradiol e aumento ($p<0.005$) da insulina e HOMA-IR em relação aos demais grupos. A osteocalcina sérica foi menor ($p<0.006$) nos grupos tratados (BED e BEC) comparados aos grupos OVX e Sham, (Tabela 4).

Tabela 4 - Avaliações séricas

	Sham	OVX	BED	BEC
Triglicerídeo (mg/dL)	61,33±1,45	74,75±4,19	55,33±3,49	65,67±2,66
Colesterol total (mg/dL)	44,61±6,63	56,85±6,51	50,38±6,39	57,88±13,75
Glicose (mg/dL)	78,12±7,6	145,00±3,9*	97,92±2,3*#	108,20±12,07#*
Insulina (UI/ml)	25,60±5,24	55,32±7,99**	36,98±3,395#	27,95±5,11#
HOMA-IR	4,93±3,12	19,79±1,23**	8,93±1,25*#	7,46±2,23*#
Estradiol (pg/ml)	92,08±14,2	38,60±5,3**	103,7±9,9	100,6±8,5
Fósforo (mg/dL)	4,05±0,32	5,11±0,42	4,74±0,28	4,95±0,47
Osteocalcina (pg/ml)	20966±3505	29117±2795	13031±1646#	13908±2672#

Nota: Determinação sérica de triglicerídeos, colesterol total, fósforo, glicose, estradiol e insulina e HOMA-IR aos 141 dias de vida de ratas. Sham, OVX, BED e BEC. Valores são apresentados em média±epm. p<0,0001 ANOVA univariada, seguida do pós-teste Newnam-Keuls. *todos vs Sham; ** todos vs OVX; #BED,BEC vs Sham e OVX.

Legenda: SHAN, animais controle; OVX, ovariectomizadas; BED, ovariectomizadas tratadas com BE; BEC, ovariectomizadas tratadas com BE ciclicamente.

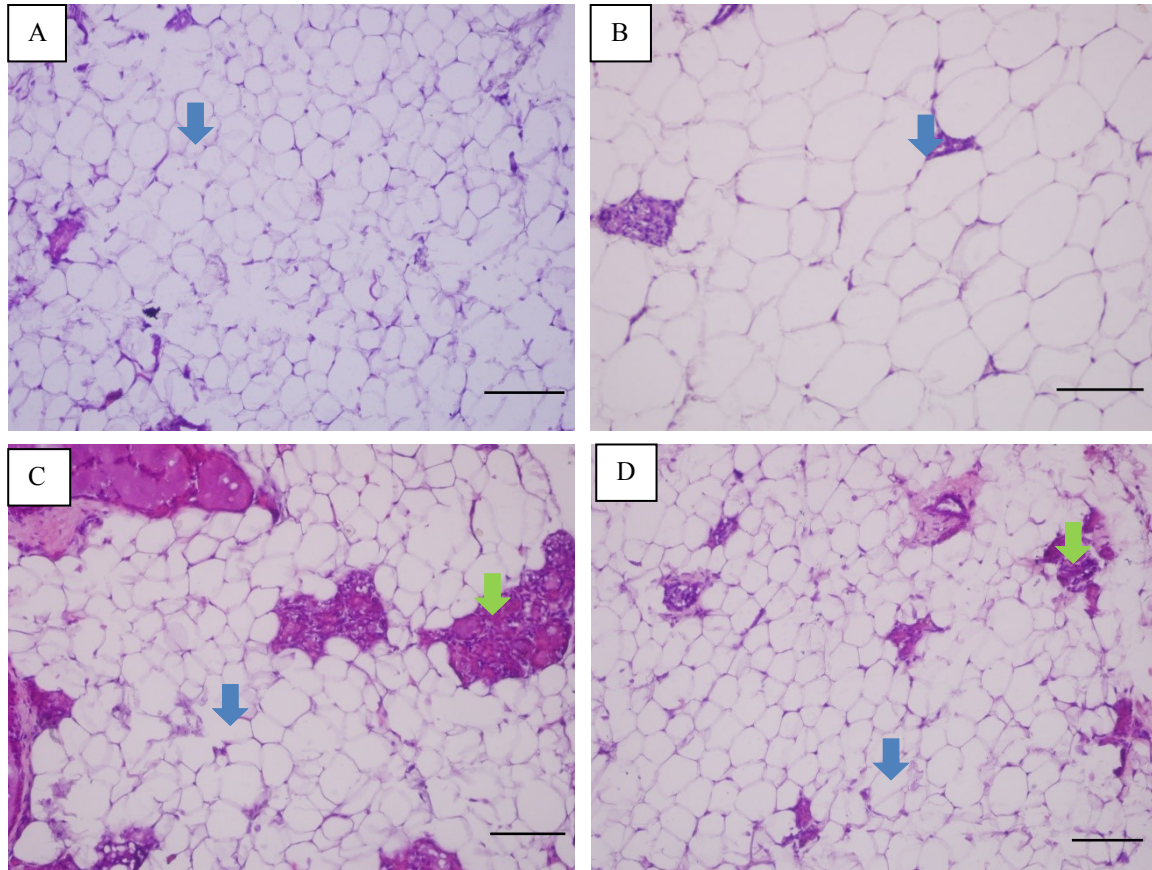
Fonte: A autora, 2015.

5.6 Análise morfológica de tecido adiposo

5.6.1 Morfologia do tecido adiposo subcutâneo

O aspecto histológico do tecido adiposo subcutâneo aos 141 dias de vida apresentou no grupo Sham características próprias, com células de tamanhos semelhantes e formato oval. No grupo OVX as células apresentaram tamanho semelhantes e formato predominantemente poligonal. Nos grupos BED e BEC os adipócitos são de tamanho semelhante com formato variando de oval a poligonal, entretanto o grupo BED apresentou aumento de depósito exacerbado de matriz extracelular, (Figura 9).

Figura 9 - Fotomicrografia demonstrando o aspecto morfológico do tecido adiposo subcutâneo de ratas aos 141 dias de idade



Nota: Fotomicrografia demonstrando o aspecto morfológico do tecido adiposo subcutâneo de ratas aos 141 dias de idade. (A): Sham (ratas controle), (B): OVX (ratas ovariectomizadas), (C): BED (ratas ovariectomizadas, tratadas com benzoato de estradiol, diariamente), (D): BEC (ratas ovariectomizadas, tratadas com benzoato de estradiol, ciclicamente). Seta azul = adipócitos, Seta verde = matriz extracelular, barra de escala 100 μ m.

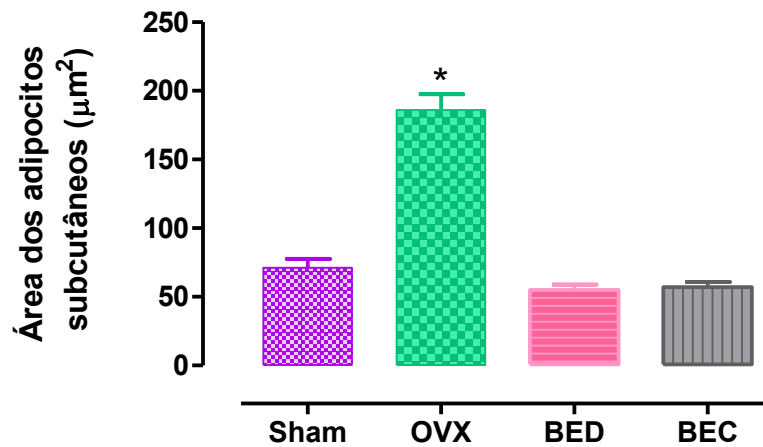
Legenda: SHAN, animais controle; OVX, ovariectomizadas; BED, ovariectomizadas tratadas com BE; BEC, ovariectomizadas tratadas com BE ciclicamente.

Fonte: A autora, 2015.

5.6.1.1 Morfometria do tecido adiposo subcutâneo

A avaliação morfométrica dos adipócitos evidenciou no grupo OVX área significativamente maior quando comparada a dos demais grupos (Sham: $71,14 \pm 6,46 \mu\text{m}^2$; OVX: $186,10 \pm 11,39 \mu\text{m}^2$; BED: $54,92 \pm 4,10 \mu\text{m}^2$; BEC: $57,12 \pm 3,67 \mu\text{m}^2$), (Gráfico 6).

Gráfico 6 - Análise morfométrica do tecido adiposo subcutâneo



Nota: Análise morfométrica do tecido adiposo subcutâneo de ratas aos 141 dias de vida. Sham (n=8), OVX (n=8), BED (n=8) e BEC (n=8). Valores são apresentados em média \pm epm. ANOVA univariada, seguida do pós-teste Newnam-Keuls, $p < 0,0001$. * OVX vs Sham; BED, BEC.

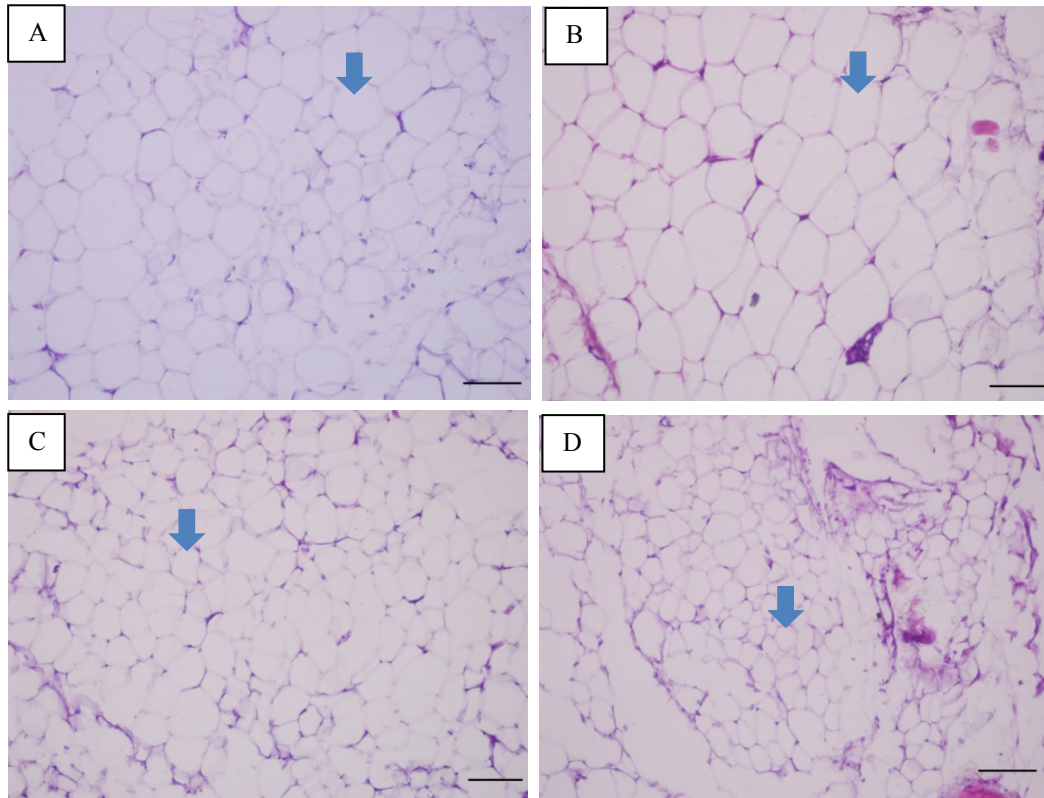
Legenda: SHAN, animais controle; OVX, ovariectomizadas; BED, ovariectomizadas tratadas com BE; BEC, ovariectomizadas tratadas com BE ciclicamente.

Fonte: A autora, 2015.

5.6.2 Morfologia do tecido adiposo retroperitoneal

O aspecto histológico do tecido adiposo retroperitoneal das ratas aos 141 dias de vida apresentou nos grupos Sham e OVX células em formato poligonal. No entanto, em relação ao tamanho, as células do grupo OVX parecem maiores. Nos grupos BED e BEC as células apresentaram formato oval e tamanho semelhante, sem evidência de matriz extracelular, (Figura 10).

Figura 10 - Fotomicrografia demonstrando o aspecto morfológico do tecido adiposo retroperitoneal de ratas aos 141 dias de idade



Nota: Fotomicrografia demonstrando o aspecto morfológico do tecido adiposo retroperitoneal de ratas aos 141 dias de idade. (A) Grupo Sham; (B) Grupo OVX, (C) Grupo BED e (D) Grupo BEC. Seta azul = adipócitos, barra de escala 100 μ m.

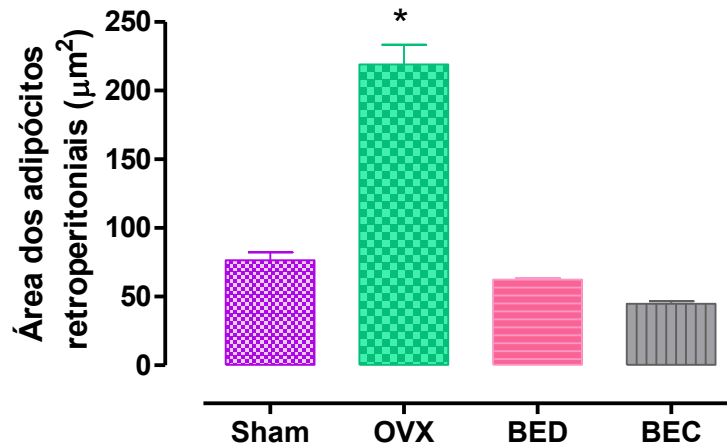
Legenda: SHAN, animais controle; OVX, ovariectomizadas; BED, ovariectomizadas tratadas com BE; BEC, ovariectomizadas tratadas com BE ciclicamente.

Fonte: A autora, 2015.

5.6.2.1 Morfometria do tecido adiposo retroperitoneal

A avaliação morfométrica dos adipócitos retroperitoneais mostrou um aumento significativo da área no grupo OVX comparado aos demais grupos (Sham: $77,17 \pm 49,0 \mu\text{m}^2$; OVX: $225,97 \pm 16,88 \mu\text{m}^2$; BED: $62,65 \pm 1,54 \mu\text{m}^2$; BEC: $45,90 \pm 2,51 \mu\text{m}^2$), (Gráfico 7).

Gráfico 7 - Análise morfométrica do tecido adiposo retroperitoneal



Nota: Análise morfométrica do tecido adiposo retroperitoneal de ratas aos 141 dias de vida. Sham (n=8), OVX (n=8), BED (n=8) e BEC (n=8). Valores são apresentados em média±epm, ANOVA univariada, seguida do pós-teste Newman-Keuls, $p < 0,0001$. * OVX vs todos.

Legenda: SHAN, animais controle; OVX, ovariectomizadas; BED, ovariectomizadas tratadas com BE; BEC, ovariectomizadas tratadas com BE ciclicamente.

Fonte: A autora, 2015.

5.7 Análises Ósseas

5.7.1 Dimensões ósseas

As análises das medidas ósseas em fêmures mostraram menores valores ($p < 0,006$) para os parâmetros da distância entre as epífises e largura do ponto médio da diáfise no grupo OVX em relação aos demais grupos experimentais. Em relação à altura da vértebra L4, não houve diferença significativa entre os grupos, (Tabela 5).

Tabela 5 - Dimensões ósseas

Dimensões ósseas (mm)	Sham	OVX	BED	BEC
Fêmur:				
-Distancia entre as epífises	34,12±0,01	33,40±0,02*	35,07±0,03 [#]	34,41±0,01 [#]
-Largura do ponto médio da diáfise	3,85±0,03	3,40±0,03*	3,84±0,05	3,89±0,02
Vértebra:				
-Altura da L4	7,40±0,09	7,25±0,06	7,40±0,02	7,32±0,01

Nota: Dimensões ósseas aos 141 dias de vida de ratas Sham, OVX, BED, BEC. Valores são apresentados em média±epm. ANOVA univariada, seguida do pós-teste Newnam-Keuls, $p<0,0006$. * OVX vs todos; [#] BED, BEC vs OVX.

Legenda: SHAN, animais controle; OVX, ovariectomizadas; BED, ovariectomizadas tratadas com BE; BEC, ovariectomizadas tratadas com BE ciclicamente.

Fonte: A autora, 2015.

5.7.2 Análise dos parâmetros físicos

5.7.2.1 Parâmetros físicos da vértebra L4

A análise dos parâmetros físicos da vértebra L4 demonstrou maior peso imerso nos grupos tratados (BED E BEC) comparados a Sham e OVX. Na análise de peso úmido foi evidenciado apenas no grupo BEC um aumento ($p<0,0001$) em relação aos demais. O grupo BED diferiu dos demais grupos em relação aos parâmetros volume e densidade. O peso seco e o percentual de água não diferiram entre os grupos. Resultados apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Parâmetros físicos de vértebra L4

Parâmetros físicos da vértebra L4	Sham	OVX	BED	BEC
Peso imerso (g)	0,29±0,01	0,28±0,01	0,34±0,01 [#]	0,36±0,01 [#]
Peso úmido (g)	0,38±0,01	0,36±0,01	0,40±0,01	0,46±0,01 [§]
Peso seco (g)	0,15±0,01	0,14±0,01	0,14±0,01	0,16±0,01
Volume (mg/dL)	0,09±0,00	0,08±0,00	0,05±0,01 [@]	0,10±0,00
Densidade (pg/ml)	4,16±0,22	4,60±0,19	8,93±1,86 [@]	4,62±0,18
Água (%)	59,15±2,51	60,89±1,39	62,55±2,15	63,59±3,16

Nota: Parâmetros físicos da vértebra L4 de ratas aos 141 dias de vida. Valores são apresentados em média±epm.

Valores são apresentados em média±epm. ANOVA univariada, seguida do pós-teste Newnam-Keuls.

[#]BED, BEC vs Sham, OVX; [§]BEC vs todos; [@] BED vs todos.

Legenda: SHAN, animais controle; OVX, ovariectomizadas; BED, ovariectomizadas tratadas com BE; BEC, ovariectomizadas tratadas com BE ciclicamente.

Fonte: A autora, 2015.

5.7.2.2 Parâmetros físicos do fêmur

Os parâmetros físicos: pesos imerso, úmido e seco, volume, densidade e percentual de água em fêmur não diferiram entre os grupos experimentais. Resultados apresentados na Tabela 7.

Tabela 7- Parâmetros físicos de fêmur

Parâmetros físicos do fêmur	Sham	OVX	BED	BEC
Peso imerso (g)	0,70 ± 0,03	0,64 ± 0,01	0,67 ± 0,03	0,72 ± 0,03
Peso úmido (g)	0,98 ± 0,03	0,90 ± 0,01	0,94 ± 0,05	1,00 ± 0,03
Peso seco (g)	0,54 ± 0,01	0,48 ± 0,01	0,49± 0,02	0,50 ± 0,01
Volume (mg/dL)	0,27 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,26 ± 0,02	0,28 ± 0,01
Densidade (pg/ml)	3,56 ± 0,18	3,51 ± 0,05	3,55 ± 0,16	3,60 ± 0,15
Água (%)	44,65 ± 1,84	46,06 ± 1,35	47,76 ± 1,1	49,22 ± 3,5

Nota: Parâmetros físicos de fêmur de ratas aos 141 dias de vida. Valores são apresentados em média ± epm.

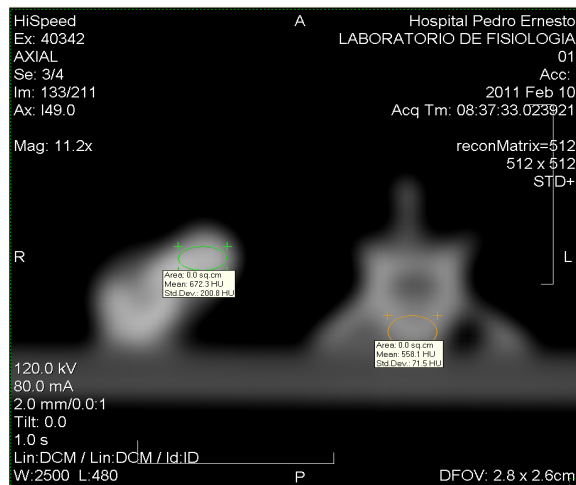
Legenda: SHAN, animais controle; OVX, ovariectomizadas; BED, ovariectomizadas tratadas com BE; BEC, ovariectomizadas tratadas com BE ciclicamente.

Fonte: A autora, 2015.

5.7.3 Análise da radiodensidade de fêmur e vértebra L4

A análise óssea por TC determinou menor densidade na cabeça do fêmur no grupo OVX comparado aos demais grupos experimentais. O grupo BED apresentou a maior densidade comparada aos grupos Sham e OVX. Em relação a VL4 houve diminuição significativa da densidade no corpo vertebral nos grupos OVX e BEC, (Gráficos 8A e 8B).

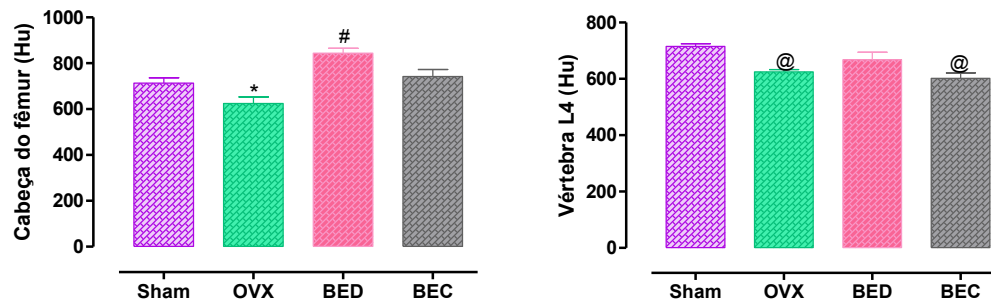
Figura 11 - Imagem, em seção de 3 mm, demonstrando a radiodensidade de peças ósseas, fêmur e vértebra L4 de ratas aos 141 dias de vida



Nota: Imagem, em seção de 3 mm, demonstrando a radiodensidade de peças ósseas, fêmur e vértebra L4 de ratas aos 141 dias de vida, efetuadas em tomógrafo computadorizado.

Fonte: A autora, 2015.

Gráficos 8 - Análises das radiodensidades ósseas de fêmur e vértebra L4



Nota: Análises das radiodensidades ósseas de fêmur (A) e vértebra L4 (B) determinadas por Tomografia Computadorizada, em ratas aos 141 dias de vida. Valores expressos em média \pm epm. $p < 0,005$, ANOVA univariada, seguida do pós-teste Newnam-Keuls. *OVX vs todos; # BED vs Sham OVX; @ OVX, BEC vs Sham, BED.

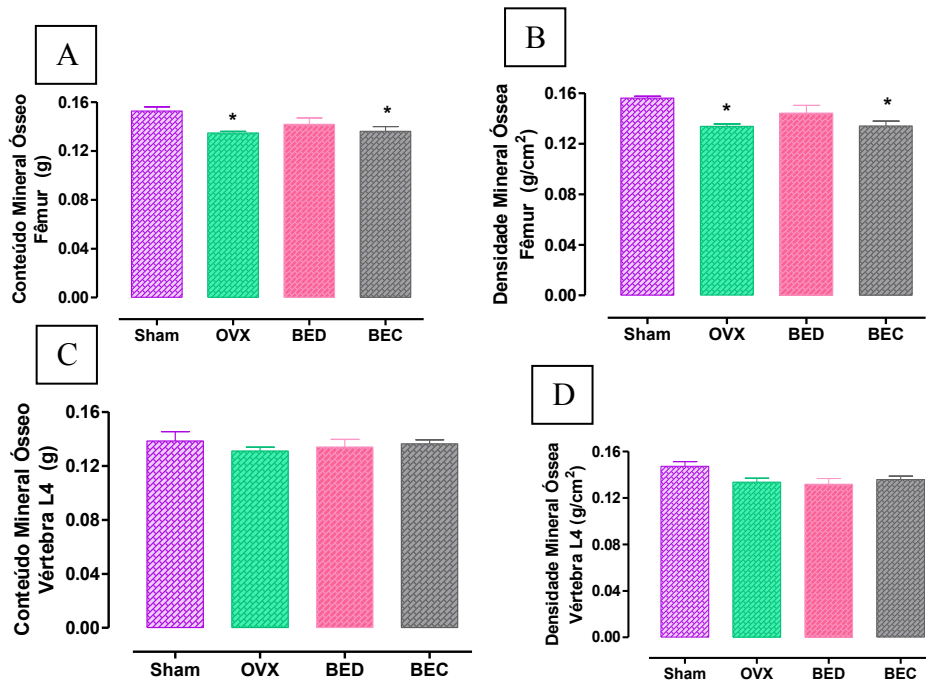
Legenda: Sham, ratas controle; OVX, ratas ovariectomizadas; EX, ratas ovariectomizadas, tratadas com exercício resistido; BE, ratas ovariectomizadas, tratadas com benzoato de estradiol 4/4 dias e BE+EX, ratas ovariectomizadas, tratadas com benzoato de estradiol 4/4 dias e exercício resistido.

Fonte: A autora, 2015.

5.7.4 Análise densitométrica de fêmur e vértebra L4

A partir da análise das peças ósseas por DXA foi evidenciada a diminuição significativa do conteúdo mineral ósseo (CMO) e densidade mineral óssea (DMO) nos grupos OVX e BEC em relação aos grupos Sham. No entanto, a análise da densidade e conteúdo mineral ósseo da vértebra L4 não mostrou diferenças entre os grupos. Resultados apresentados nos gráficos 9A e 9B.

Gráfico 9 - Análises do conteúdo e densidade mineral óssea de fêmur e vértebra L4



Nota: Análises do conteúdo e densidade mineral óssea de fêmur (A, B) e vértebra L4 (B, C) por DXA, em ratos aos 141 dias de vida. Valores são apresentados em média ± epm. $p < 0,01$ (ANOVA univariada, seguida do pós-teste Newman-Keuls). * OVX e BEC vs. Sham.

Legenda: Sham, ratos controle; OVX, ratos ovariectomizadas; EX, ratos ovariectomizadas, tratadas com exercício resistido; BE, ratos ovariectomizadas, tratadas com benzoato de estradiol 4/4 dias e BE+EX, ratos ovariectomizadas, tratadas com benzoato de estradiol 4/4 dias e exercício resistido.

Fonte: A autora, 2015.

6 RESULTADOS DO PROTOCOLO 2: Efeito do tratamento cíclico com estradiol e/ou treinamento de força

6.1 Consumo alimentar

O consumo alimentar médio das ratas aos 90 dias de vida era de $14,60 \pm 1,5$ g. Aos 120 dias de idade, o grupo Sham consumia em média $16,75 \pm 1,2$ g, enquanto as ratas castradas consumiam $16,95 \pm 2,3$ g. Aos 135 dias foi evidenciada maior tendência na ingestão no grupo EX, alcançando $24,51 \pm 1,57$ g/ dia ao final do período experimental. A menor ingestão alimentar foi verificada no grupo BE ($16,71 \pm 0,3$ g), (Tabela 8).

Tabela 8 - Consumo alimentar

Ingestão alimentar (g)	Sham	OVX	BE	EX	BE+EX
135 dias	18,04 \pm 0,43	18,77 \pm 0,36	17,79 \pm 0,39	19,99 \pm 1,43	18,77 \pm 0,59
165 dias	18,31 \pm 0,50	18,71 \pm 0,19	16,71 \pm 0,33 [#]	24,51 \pm 1,50 [*]	17,89 \pm 0,27

Nota: Consumo alimentar das ratas aos 135 e 165 dias de vida. Valores expressos em média \pm epm. $p < 0,05$ * EX vs todos; # BE vs Sham, OVX.

Legenda: Sham, ratas controle; OVX, ratas ovariectomizadas; EX, ratas ovariectomizadas, tratadas com exercício resistido; BE, ratas ovariectomizadas, tratadas com benzoato de estradiol 4/4 dias e BE+EX, ratas ovariectomizadas, tratadas com benzoato de estradiol 4/4 dias e exercício resistido.

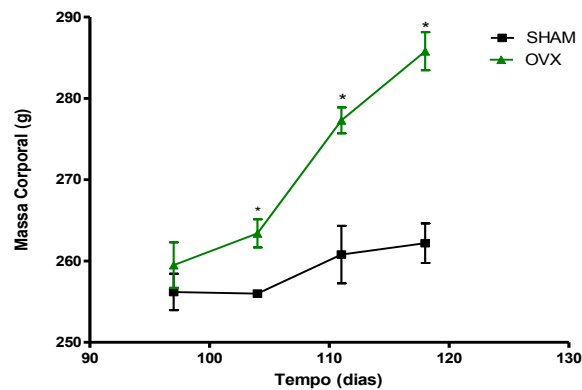
Fonte: A autora, 2015.

6.2 Evolução da massa corporal

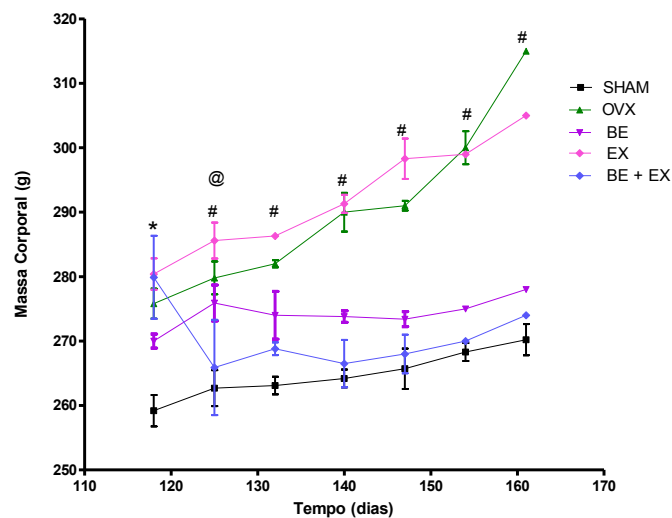
Aos 90 dias de vida a massa corporal média das ratas era 258,80g. Após a ovariectomia o grupo OVX teve ganho de massa corporal significativa até os 120 dias, (Gráfico 10A). Após o início de tratamento (120 dias) os grupos OVX e EX apresentaram maior ganho de massa em relação aos grupos BE, BE+EX e Sham. O grupo BE+EX perdeu de massa ao iniciar o tratamento comparado aos grupos ovariectomizados, e manteve valores semelhantes aos do grupo Sham até os 165 dias, (Gráfico 10B).

Gráfico 10 - Evolução da massa corporal

A



B



Nota: Evolução da massa corporal. (A) De 90 e 120 dias de vida: da ovariectomia ao início do tratamento. (B) De 120 e 165 dias de vida: durante tratamento. Valores expressos em média±epm. ANOVA bivariada, seguido de pós-teste Bonferroni, $P < 0,001$. * OVX vs Sham; # OVX, EX vs Sham, BE, BE+EX; @ BE+EX vs OVX, BE, EX.

Legenda: Sham, ratas controle; OVX, ratas ovariectomizadas; EX, ratas ovariectomizadas, tratadas com exercício resistido; BE, ratas ovariectomizadas, tratadas com benzoato de estradiol 4/4 dias e BE+EX, ratas ovariectomizadas, tratadas com benzoato de estradiol 4/4 dias e exercício resistido.

Fonte: A autora, 2015.

6.3 Massa dos órgãos

Ao final do período experimental os grupos OVX e EX apresentaram as menores massas uterinas ($P < 0,0001$). Os tecidos adiposos mesentérico e retroperitônio foram maiores comparados aos grupos OVX, BE, EX e BE+EX. Em relação ao fígado, o grupo BE apresentou maior massa ($P < 0,002$) comparado aos grupo Sham, OVX e EX, (Tabela 9).

Tabela 9 - Massa dos órgãos

Massa dos órgãos (g)	Sham	OVX	BE	EX	BE+EX
Útero	0,878±0,01	0,144±0,01*	0,759±0,05	0,138±0,01*	0,724±0,09
Tecido adiposo mesentérico	3,699± 0.03	8,092±0.01#	5,244± 0.03	6,099±0.05	4,369± 0.03
Tecido adiposo retroperitoneal	3,238± 0.01	6,882±0.01#	2,612± 0.01	3,482± 0.02	3,544± 0.01
Fígado	6,596±0,01	6,559± 0,05	8,350±0,01\$	6,628 ±0,09	7,431±0,01

Nota: Massa dos órgãos das ratas aos 165 dias de vida. Valores expressos em média±epm. ANOVA univariada, seguida do pós-teste Newnam-Keuls. *OVX, EX vs Sham, BE, BE+EX; # OVX VS todos, \$ BE vs Sham, OVX e EX.

Legenda: Sham, ratas controle; OVX, ratas ovariectomizadas; EX, ratas ovariectomizadas, tratadas com exercício resistido; BE, ratas ovariectomizadas, tratadas com benzoato de estradiol 4/4 dias e BE+EX, ratas ovariectomizadas, tratadas com benzoato de estradiol 4/4 dias e exercício resistido.

Fonte: A autora, 2015.

6.4 Análise da composição corporal por DXA

A análise da composição corporal revelou menor massa magra no grupo BE e maior massa no grupo EX ($p < 0,0001$). Em relação à gordura corporal total e do tronco foi observado um aumento significativo no grupo OVX e a diminuição no grupo BE+EX ($p < 0,0001$). Para os parâmetros ósseos analisados, o grupo OVX apresentou os menores valores de densidade ($p < 0,002$) e conteúdo ($p < 0,01$) mineral ósseos, sem diferenças entre os grupos Sham, BE, Ex, BE+EX. Enquanto a área óssea apresentou menores valores ($p < 0,002$) no grupo no BE+EX em relação aos demais, (Tabela 10).

Tabela 10 - Parâmetros de avaliação corporal por DXA

	Sham	OVX	BE	EX	BE+EX
Massa magra (g)	175,6±4,36	182,3±5,84	167,3±5,18 ^{\$}	221,1±5,42 [#]	194,2±8,82
Gordura corporal total (g)	69,75±6,83	108,2±5,67 ^{&}	83,25±1,25	72,00±4,82	45,60±2,42 [@]
Gordura do tronco (g)	58,80±6,52	77,00±5,85 [!]	54,80±3,83	45,71±2,07	30,60±1,28 [@]
Densidade mineral óssea(g/cm²)	0,15±0,05	0,13±0,01*	0,14±0,01	0,14±0,01	0,15±0,01
Conteúdo mineral ósseo (g)	0,1564±0,05	0,1354±0,05*	0,1558±0,03	0,1487±0,02	0,1514±0,03
Área Óssea (cm²)	59,20±1,24	61,50±1,87	57,33±1,33	58,14±1,03	51,80±1,59 [@]

Nota: Parâmetros analisado por DXA em ratas aos 141 dias de idade. Valores expressos em média±epm. ANOVA univariada, seguida do pós-teste Newnam-Keuls. \$ BE vs BE+EX; # EX VS todos; @ BE+EX vs todos; & OVX vs Sham, BE;! OVX vs EX, BE; *OVX vs todos.

Legenda: Sham, ratas controle; OVX, ratas ovariectomizadas; EX, ratas ovariectomizadas, tratadas com exercício resistido; BE, ratas ovariectomizadas, tratadas com benzoato de estradiol 4/4 dias e BE+EX, ratas ovariectomizadas, tratadas com benzoato de estradiol 4/4 dias e exercício resistido.

Fonte: A autora, 2015.

6.5 Avaliações séricas

6.5.1 Lipídeos, proteína, fósforo e índices glicêmicos

As concentrações séricas de triglicerídeos ($p < 0,0001$), colesterol total ($p < 0,02$), fósforo ($p < 0,05$), glicose ($p < 0,001$), assim como os índices de resistência a insulina ($p < 0,0001$) e a função das células beta ($p < 0,002$) foram parâmetros significativamente maiores no grupo OVX. Enquanto, o HDL colesterol ($p < 0,05$), foi menor no grupo OVX quando comparados com os grupos Sham, BE, EX e BE+EX. O grupo BE apresentou as maiores concentrações de proteínas totais ($p < 0,001$), (Tabela 11).

Tabela 11 - Índices lipídicos, glicêmicos, proteína e fósforo no soro

	Sham	OVX	BE	EX	BE+EX
Triglicerídeo (mg/dL)	90,67±11,1	139,8±10,9*	109,0±3,31	107±5,72	75±6,31
Colesterol total (mg/dL)	52,17±3,10	76,60±7,10*	66,50±4,30	57,33±4,9	60,33±5,30
HDL colesterol (mg/dL)	50,01±3,80	31,89±5,30*	56,12±6,80	56,67±3,70	59,53±9,3
Glicose (mg/dL)	115,7±5,08	175,8±5,29*	131,8±9,98	102,7±4,08	86,80±5,06
HOMA – IR	0,78±0,07	1,99±0,19*	0,58±0,01	0,54±0,09	0,46±0,03
HOMA – BETA	312,2±29,9	509,2±32,3*	239,3±24,3	239,3±37,9	244,8±20,0
Proteína total (mg/dL)	5,83±0,38	5,43±0,49	9,60±1,87#	5,72±0,34	7,89±0,99
Fósforo (mg/dL)	4,057±0,59	6,590±0,80*	4,738±0,30	4,955±0,49	4,718±0,45

Nota: Concentrações séricas de glicose, triglicerídeos, colesterol total, HDL colesterol, proteínas totais, fósforo e índices de resistência à insulina (HOMA-IR) e de atividade de célula Beta (HOMA-B) aos 165 dias de vida. Valores expressos em média±epm. ANOVA univariada, seguida do pós-teste Newnam-Keuls.* OVX vs todos; #BE vs todos.

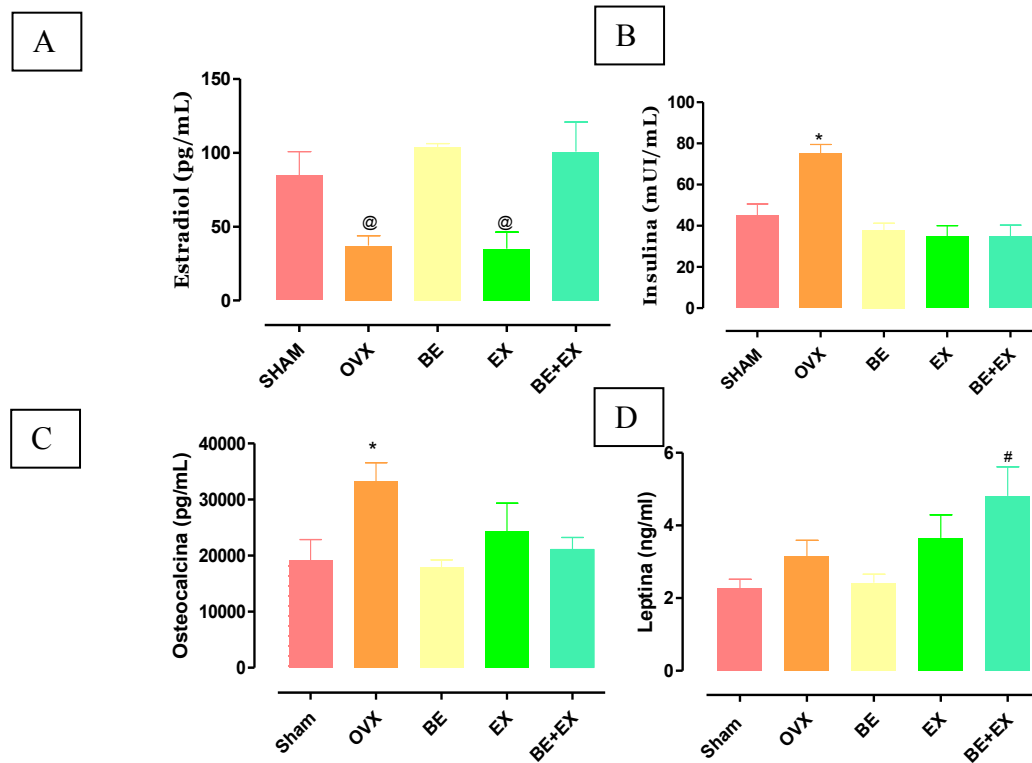
Legenda: Sham, ratas controle; OVX, ratas ovariectomizadas; EX, ratas ovariectomizadas, tratadas com exercício resistido; BE, ratas ovariectomizadas, tratadas com benzoato de estradiol 4/4 dias e BE+EX, ratas ovariectomizadas, tratadas com benzoato de estradiol 4/4 dias e exercício resistido.

Fonte: A autora, 2015.

6.5.2 Hormônios

As concentrações séricas de estradiol se mostraram diminuídas ($p < 0,001$) nos grupos OVX e EX quando comparadas as dos demais grupos (Gráfico 11^a). Em relação às dosagens de insulina ($p < 0,0001$) e osteocalcina ($p < 0,002$) foram verificados maiores valores séricos no grupo OVX (Gráfico 11 B e C). A leptina não diferiu entre os grupos Sham, OVX e BE. No entanto, o grupo BE+EX apresentou valores significativamente maiores ($p < 0,01$) de leptina em relação ao grupo Sham e grupo EX, (Gráfico 11D).

Gráfico 11 - Concentrações séricas



Nota: Concentrações séricas de estradiol (A), insulina (B), osteocalcina (C) e leptina (D) de ratas aos 165 dias de vida. Valores expressos em média±epm. ANOVA univariada, seguido de pós-teste Newman Keuls. @ OVX, EX vs Sham, BE, BE+EX; * OVX vs todos; # Sham vs BE+EX, BE.

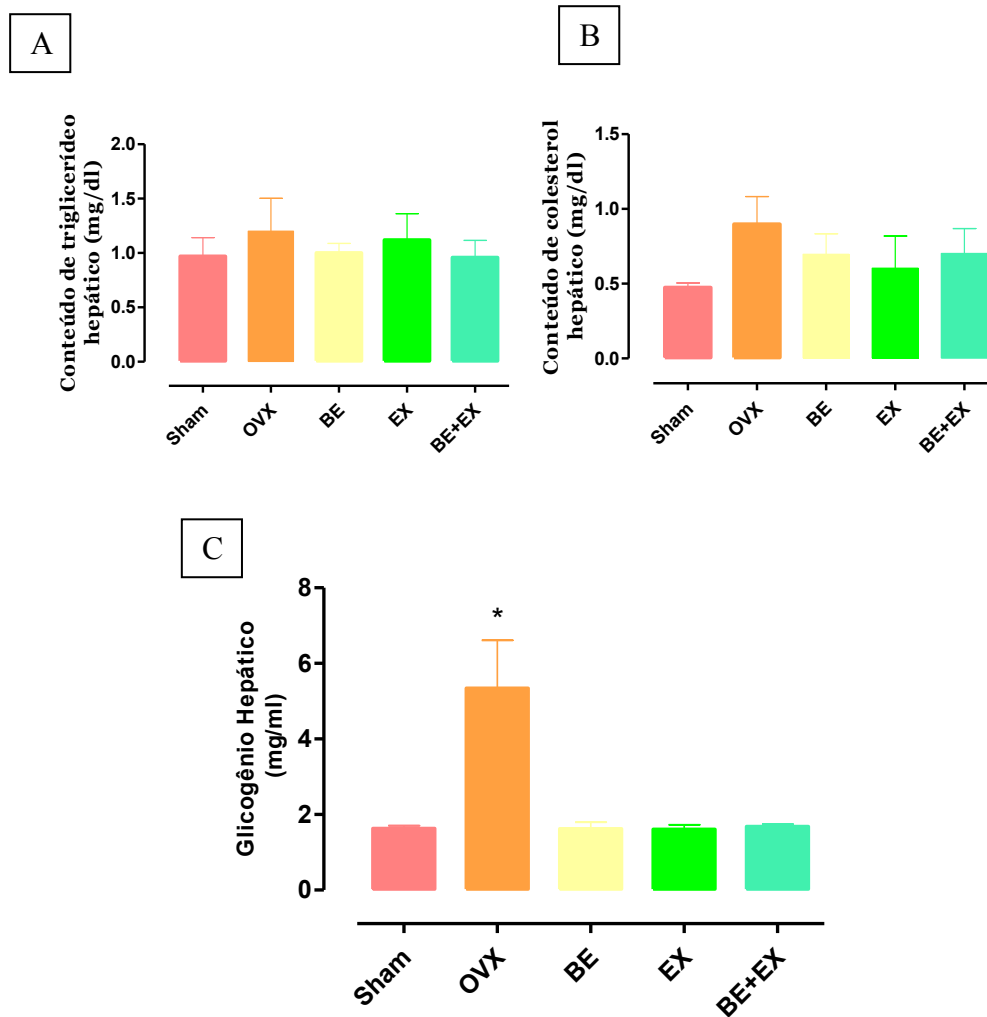
Legenda: Sham, ratas controle; OVX, ratas ovariectomizadas; EX, ratas ovariectomizadas, tratadas com exercício resistido; BE, ratas ovariectomizadas, tratadas com benzoato de estradiol 4/4 dias e BE+EX, ratas ovariectomizadas, tratadas com benzoato de estradiol 4/4 dias e exercício resistido.

Fonte: A autora, 2015.

6.5.3 Determinação de colesterol, triglicerídeos e glicogênio hepáticos

A análise dos conteúdos de triglicerídeos e de colesterol hepático não mostrou diferença significativa entre os grupos experimentais. A avaliação do glicogênio hepático evidenciou aumento do conteúdo no grupo OVX ($5,342 \pm 389$, mg/ml) em relação aos demais grupos (Sham: $1,632 \pm 70,02$ mg/ml; BE: $1,626 \pm 105,2$ mg/ml; EX: $1,609 \pm 52,70$ mg/ml; BE+EX: $1,683 \pm 83,83$ mg/ml), (Gráfico 12).

Gráfico 12 - Conteúdo hepático de colesterol, triglicerídeos e glicogênio



Nota: Conteúdo hepático de colesterol (A), triglicerídeos (B) e glicogênio (C) em ratas aos 165 dias de vida. Sham (ratas controle, n=8), OVX (ratas ovariectomizadas, n=8), EX (ratas ovariectomizadas, tratadas com exercício resistido, n=8), BE (ratas ovariectomizadas, tratadas com benzoato de estradiol 4/4 dias, n=8) e BE+EX (ratas ovariectomizadas, tratadas com benzoato de estradiol 4/4 dias e exercício resistido, n=8). Valores expressos em média±epm. (ANOVA univariada, seguido de pós-teste Newman Keuls). * $p < 0,001$ OVX vs todos.

Legenda: Sham, ratas controle; OVX, ratas ovariectomizadas; EX, ratas ovariectomizadas, tratadas com exercício resistido; BE, ratas ovariectomizadas, tratadas com benzoato de estradiol 4/4 dias e BE+EX, ratas ovariectomizadas, tratadas com benzoato de estradiol 4/4 dias e exercício resistido.

Fonte: A autora, 2015.

6.6 Análise morfológica de tecido adiposo

6.6.1 Morfologia do tecido adiposo subcutâneo

O aspecto histológico do tecido adiposo subcutâneo das ratas aos 165 dias de vida mostrou no grupo Sham adipócitos apresentando características próprias, formato oval e aspecto semelhante. No grupo OVX os adipócitos tem formato que varia de oval a poligonal e parecem ser de maior tamanho que nos demais grupos. Nos grupos BE, EX e BE+EX o formato oval das células predomina e o tamanho parece semelhante ao do grupo Sham. Destaca-se ainda no grupo BE a presença exacerbada de depósitos de matriz extracelular, Figura 12.

Figura 12 - Fotomicrografia demonstrando o aspecto morfológico do tecido adiposo subcutâneo de ratas aos 165 dias de vida (Continua)

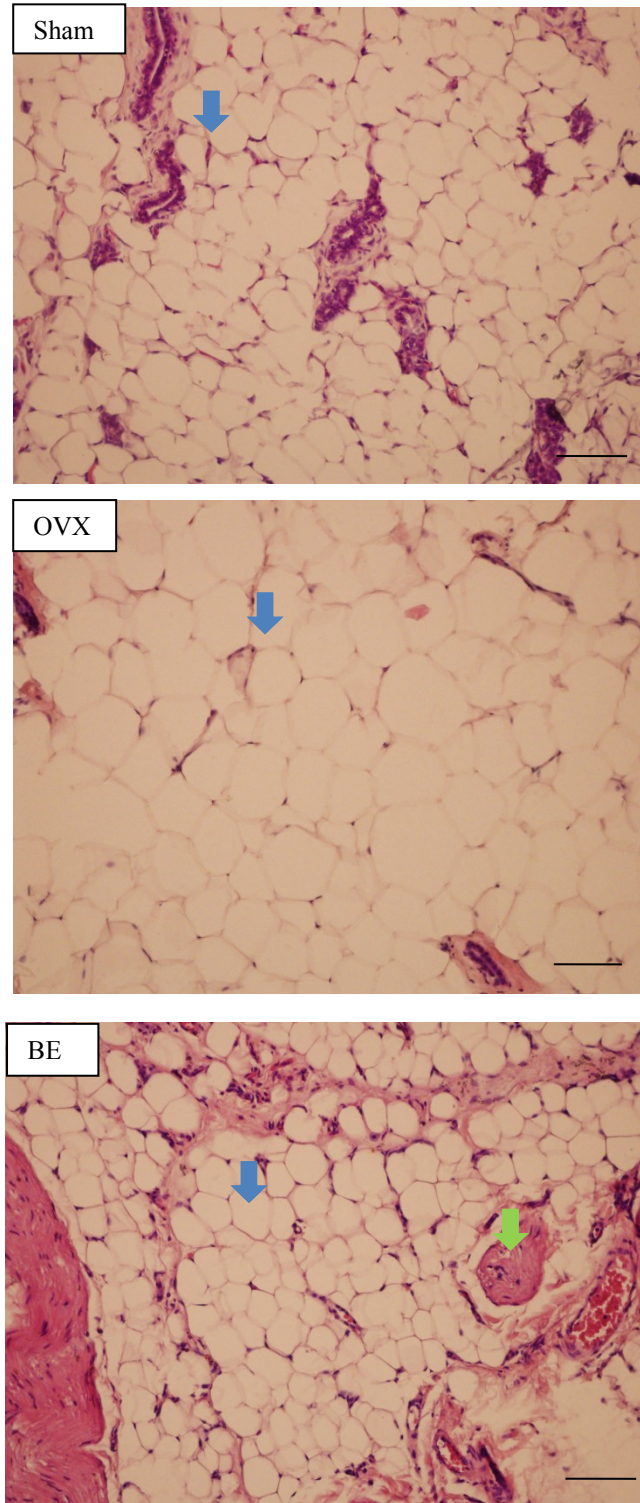
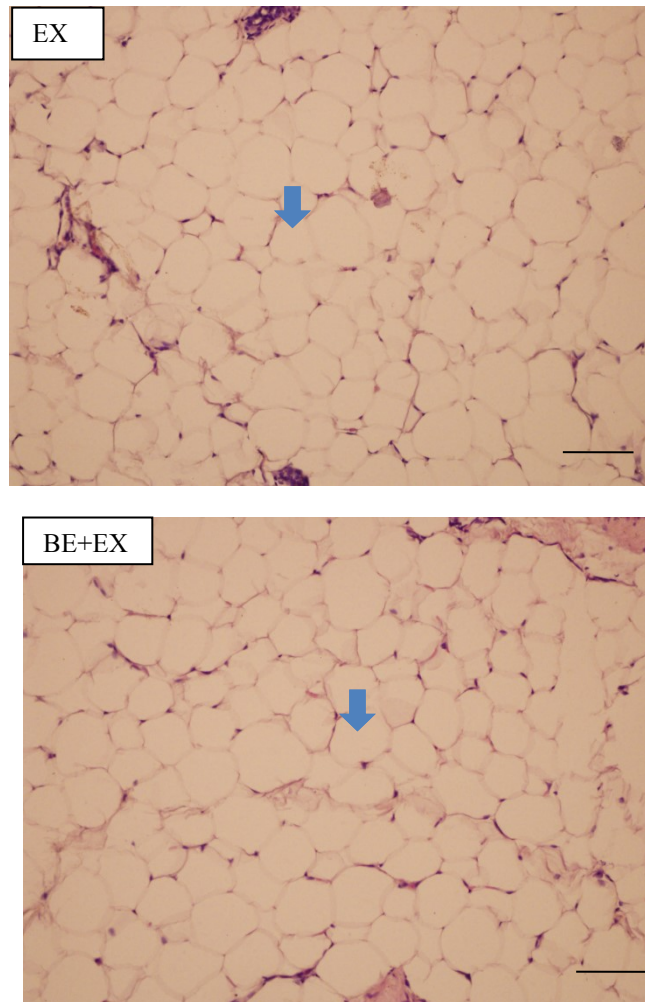


Figura 12 - Fotomicrografia demonstrando o aspecto morfológico do tecido adiposo subcutâneo de ratas aos 165 dias de vida (Conclusão)



Nota: Fotomicrografia de tecido adiposo subcutâneo de ratas aos 165 dias de vida. Seta azul = adipócitos. Seta verde = matriz extracelular. Escala da barra 100 μ m.

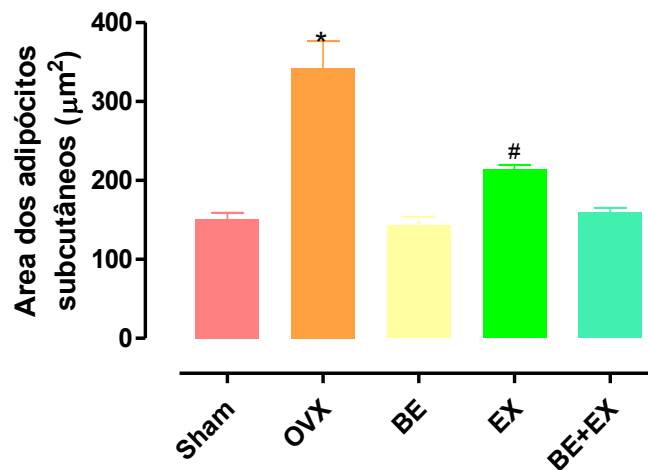
Legenda: Sham, ratas controle; OVX, ratas ovariectomizadas; EX, ratas ovariectomizadas, tratadas com exercício resistido; BE, ratas ovariectomizadas, tratadas com benzoato de estradiol 4/4 dias e BE+EX, ratas ovariectomizadas, tratadas com benzoato de estradiol 4/4 dias e exercício resistido.

Fonte: A autora, 2015.

6.6.1.1 Avaliação histomorfométrica do tecido adiposo subcutâneo

A morfometria da área de adipócitos subcutâneos revelou no grupo OVX células significativamente maiores ($412,1 \pm 389,4 \mu\text{m}^2$) quando comparadas aos demais grupos (Sham: $154,4 \pm 70,02$; BE: $116,0 \pm 105,2$; EX: $215,5 \pm 52,70$; BE+EX: $143,8 \pm 83,83 \mu\text{m}^2$). No grupo EX, a área dos adipócitos foi maior que a área do grupo BE, Gráfico 13.

Gráfico 13 - Morfometria de adipócitos subcutâneos



Nota: Morfometria de adipócitos subcutâneos de ratas aos 165 dias de vida. Valores expressos em média \pm epm.

ANOVA univariada, seguido de pós-teste Newman Keuls. $p < 0,05$, * OVX vs todos ; #EX vs BE.

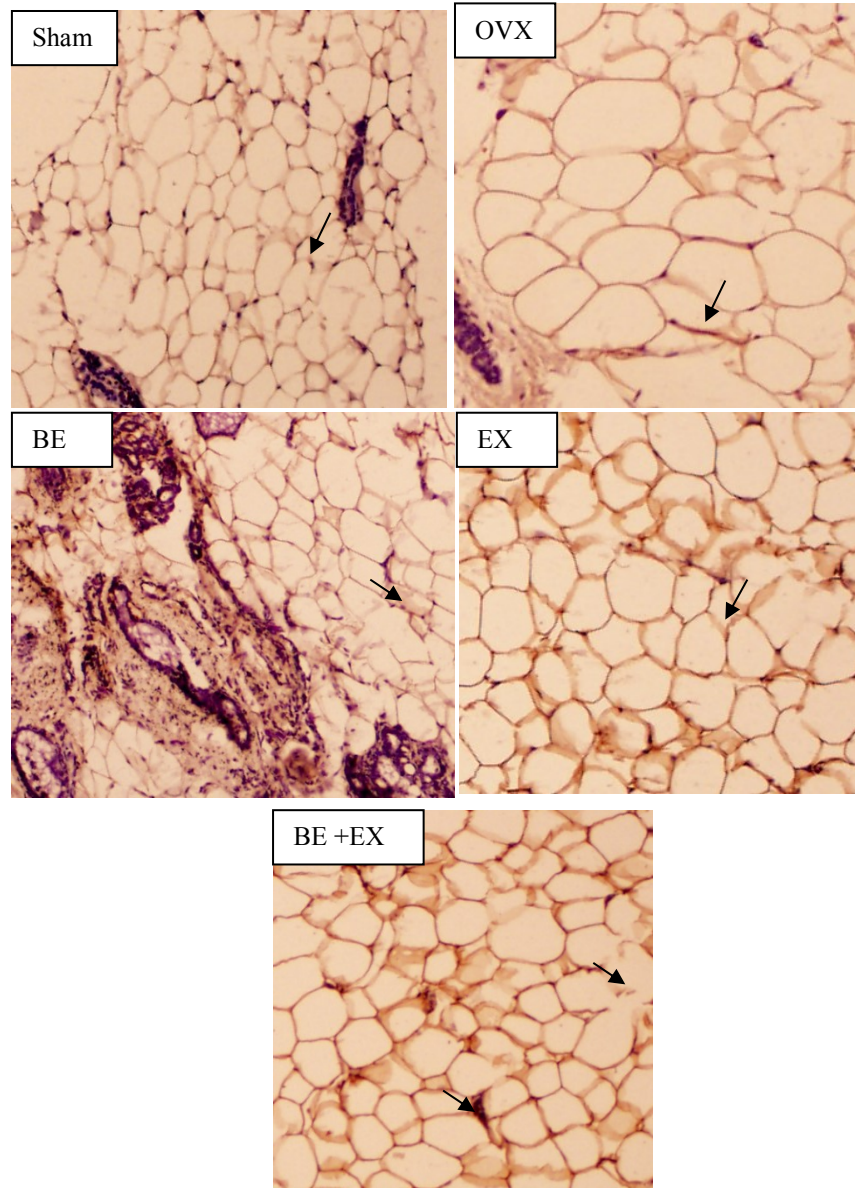
Legenda: Sham, ratas controle; OVX, ratas ovariectomizadas; EX, ratas ovariectomizadas, tratadas com exercício resistido; BE, ratas ovariectomizadas, tratadas com benzoato de estradiol 4/4 dias e BE+EX, ratas ovariectomizadas, tratadas com benzoato de estradiol 4/4 dias e exercício resistido.

Fonte: A autora, 2015.

6.6.1.2 Avaliação imunohistoquímica da expressão de PPAR γ no tecido adiposo subcutâneo

Através de avaliação imunohistoquímica foi evidenciada a expressão de **PPAR γ** ao redor dos adipócitos em todos os grupos experimentais. Contudo, a maior expressão pode ser visualizada nos grupos EX e BE+EX, Figura 13.

Figura 13 - Fotomicrografia de tecido adiposo subcutâneo de ratas aos 165 dias de vida evidenciando expressão de PPAR γ



Nota: Fotomicrografia de tecido adiposo subcutâneo de ratas aos 165 dias de vida evidenciando expressão de PPAR γ , por imunohistoquímica. Setas = PPAR γ . Aumento de 200X.

Legenda: Sham, ratas controle; OVX, ratas ovariectomizadas; EX, ratas ovariectomizadas, tratadas com exercício resistido; BE, ratas ovariectomizadas, tratadas com benzoato de estradiol 4/4 dias e BE+EX, ratas ovariectomizadas, tratadas com benzoato de estradiol 4/4 dias e exercício resistido.

Fonte: A autora, 2015.

6.6.2 Morfologia do tecido adiposo retroperitoneal

O aspecto histológico do tecido adiposo retroperitoneal das ratas aos 165 dias de vida mostrou no grupo Sham adipócitos de tamanhos iguais de formato poligonal. No grupo OVX, os adipócitos parecem maiores que aqueles dos demais grupos, apresentando formato oval a poligonal. Nos grupos, BE, EX e BE+ EX o aspecto dos adipócitos é semelhante ao grupo Sham, Figura 14.

Figura 14 - Fotomicrografia de tecido adiposo retroperitoneal de ratas aos 165 dias de vida (Continua)

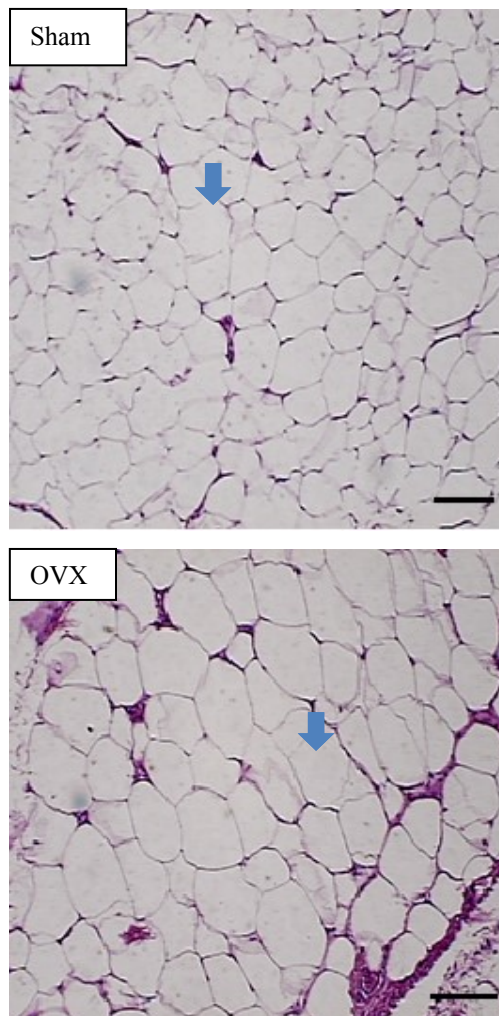
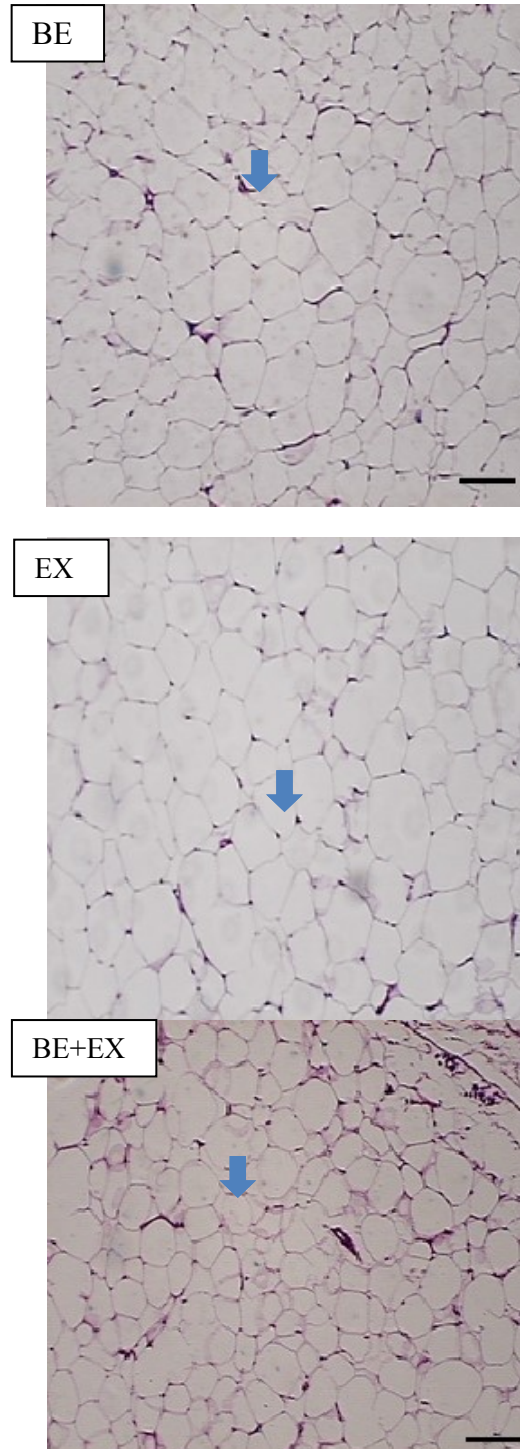


Figura 14 - Fotomicrografia de tecido adiposo retroperitoneal de ratas aos 165 dias de vida (Conclusão)



Nota: Fotomicrografia de tecido adiposo retroperitoneal de ratas aos 165 dias de vida. Seta azul = adipócitos.
Barra de escala 100 μ m.

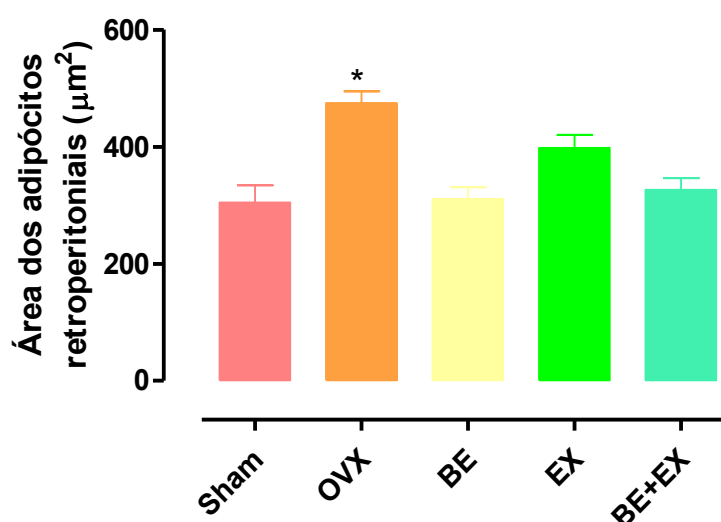
Legenda: Sham, ratas controle; OVX, ratas ovariectomizadas; EX, ratas ovariectomizadas, tratadas com exercício resistido; BE, ratas ovariectomizadas, tratadas com benzoato de estradiol 4/4 dias e BE+EX, ratas ovariectomizadas, tratadas com benzoato de estradiol 4/4 dias e exercício resistido.

Fonte: A autora, 2015.

6.6.2.1 Avaliação histomorfométrica do tecido adiposo retroperitoneal

A morfometria de adipócitos retroperitoneais revelou no grupo OVX ($462,4 \pm 1,88 \mu\text{m}^2$) área significativamente maior quando comparada a dos demais grupos (Sham: $304,5 \pm 2,97 \mu\text{m}^2$; BE: $311,1 \pm 1,970 \mu\text{m}^2$; EX: $381,5 \pm 1,6 \mu\text{m}^2$ e BE+EX: $326,5 \pm 1,91 \mu\text{m}^2$). (Gráfico 14).

Gráfico 14 - Morfometria de adipócitos retroperitoneais de ratas aos 165 dias de vida



Nota: Morfometria de adipócitos retroperitoneais de ratas aos 165 dias de vida. Valores expressos em média \pm epm. ANOVA univariada, seguido de pós-teste Newman Keuls. $p < 0,05$. *OVX vs todos.

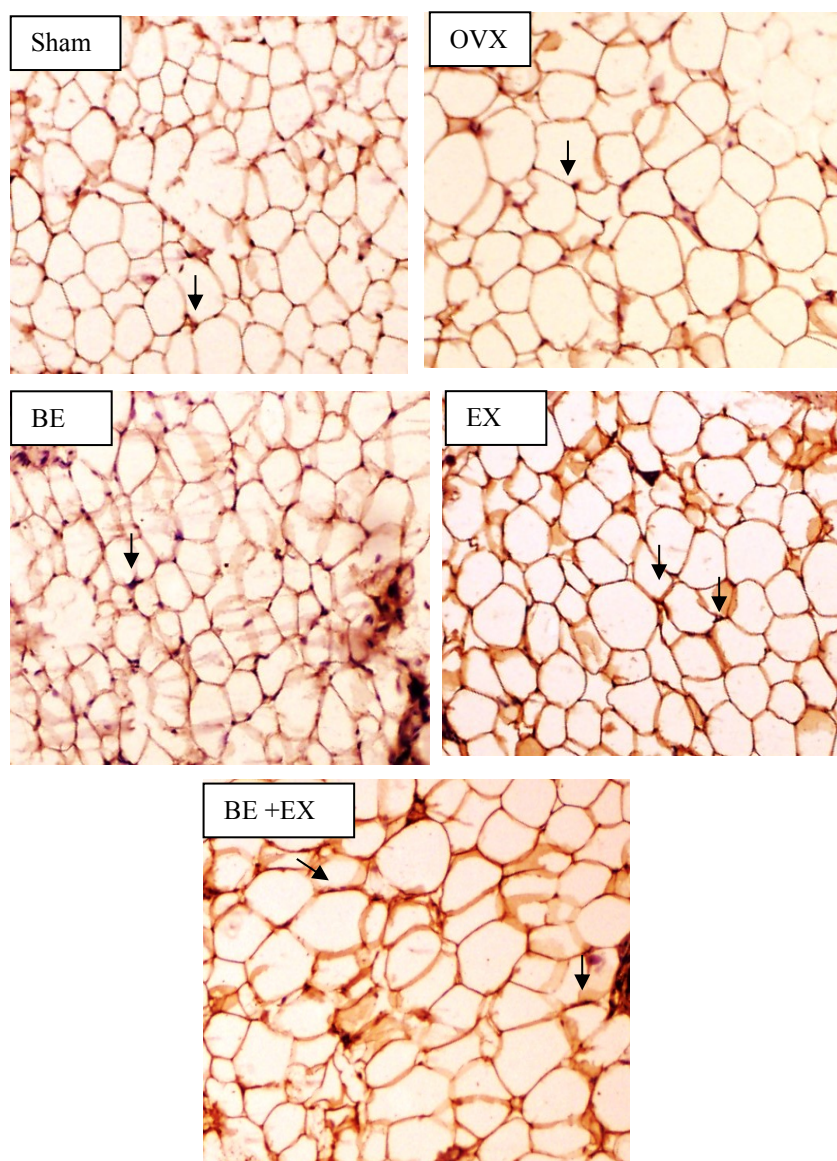
Legenda: Sham, ratas controle; OVX, ratas ovariectomizadas; EX, ratas ovariectomizadas, tratadas com exercício resistido; BE, ratas ovariectomizadas, tratadas com benzoato de estradiol 4/4 dias e BE+EX, ratas ovariectomizadas, tratadas com benzoato de estradiol 4/4 dias e exercício resistido.

Fonte: A autora, 2015.

6.6.2.2 Avaliação do conteúdo de PPAR γ no tecido adiposo retroperitoneal

Através de avaliação imunohistoquímica foi evidenciada a expressão de **PPAR γ** ao redor dos adipócitos em todos os grupos experimentais. Entretanto é evidente a maior expressão nos grupos EX e BE+EX, Figura 15.

Figura 15 - Fotomicrografia de tecido adiposo retroperitoneal de ratas aos 165 dias de vida evidenciando expressão de PPAR γ



Nota: Fotomicrografia de tecido adiposo retroperitoneal de ratas aos 165 dias de vida evidenciando expressão de PPAR γ , por imunohistoquímica; Setas = PPAR γ . Aumento de 200X.

Legenda: Sham, ratas controle; OVX, ratas ovariectomizadas; EX, ratas ovariectomizadas, tratadas com exercício resistido; BE, ratas ovariectomizadas, tratadas com benzoato de estradiol 4/4 dias e BE+EX, ratas ovariectomizadas, tratadas com benzoato de estradiol 4/4 dias e exercício resistido.

Fonte: A autora, 2015

6.6.3 Morfologia do tecido adiposo mesentérico

O aspecto histológico do tecido adiposo mesentérico das ratas aos 165 dias de vida mostrou no grupo Sham adipócitos com características próprias, formato e tamanho variando

pouco. No grupo OVX os adipócitos apresentaram formato ovalado irregular, aparentando ser de maior tamanho que nos demais grupos. Aspecto semelhante foi evidenciado no grupo EX. Nos grupos BE e BE+EX os adipócitos apresentaram características semelhantes as do grupo Sham, Figura 16.

Figura 16 - Fotomicrografia de tecido adiposo mesentérico de ratas aos 165 dias de vida (Continua)

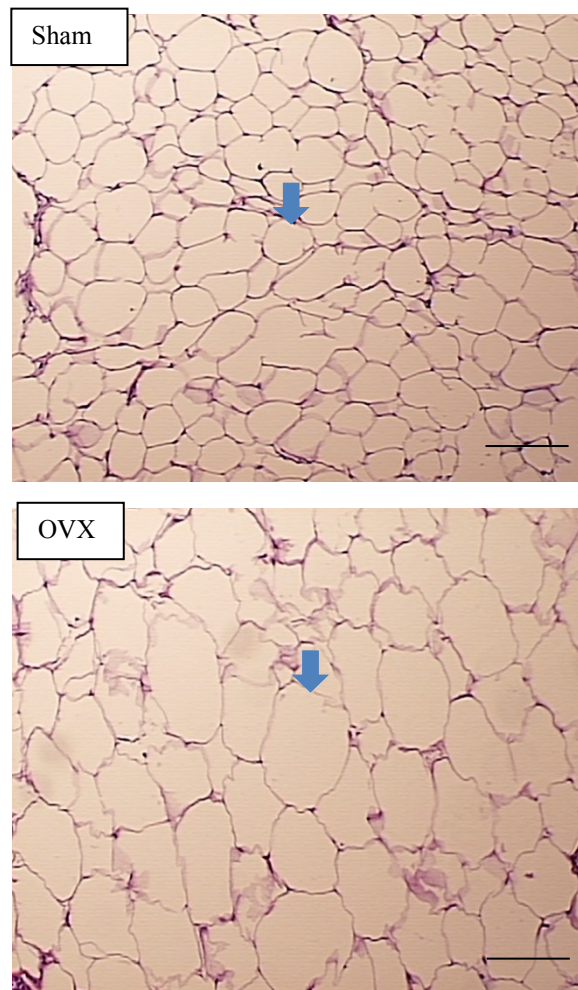
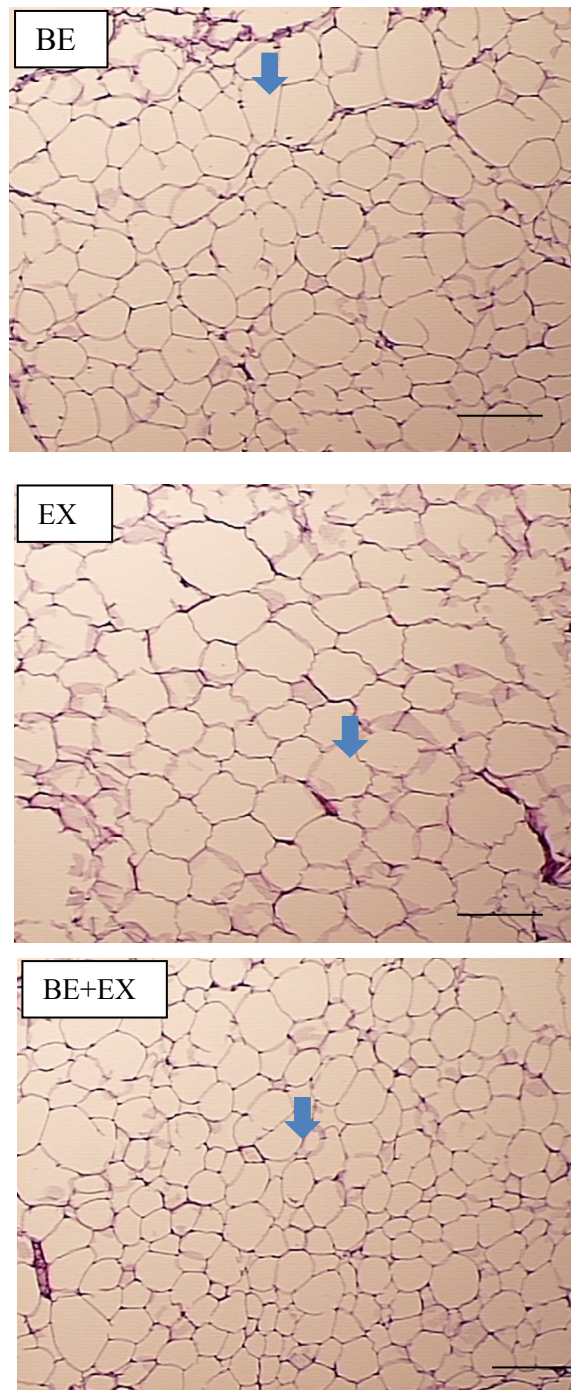


Figura 16 - Fotomicrografia de tecido adiposo mesentérico de ratas aos 165 dias de vida (Conclusão)



Nota: Fotomicrografia de tecido adiposo mesentérico de ratas aos 165 dias de vida. Seta azul = adipócitos. Barra de escala 100 μ m.

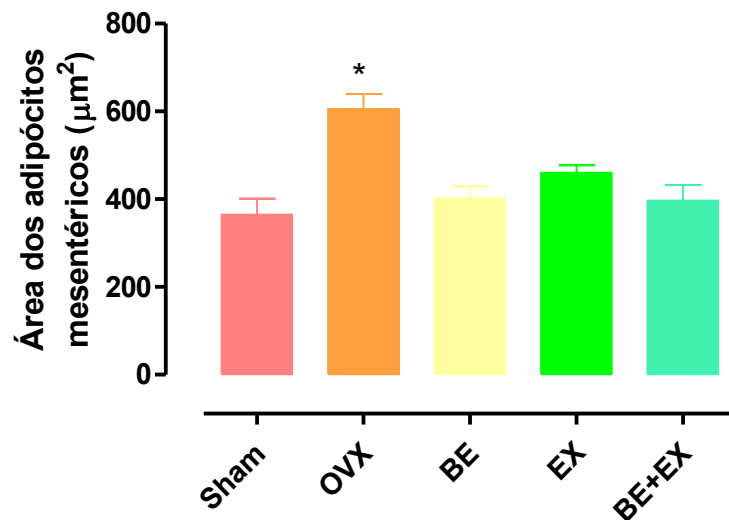
Legenda: Sham, ratas controle; OVX, ratas ovariectomizadas; EX, ratas ovariectomizadas, tratadas com exercício resistido; BE, ratas ovariectomizadas, tratadas com benzoato de estradiol 4/4 dias e BE+EX, ratas ovariectomizadas, tratadas com benzoato de estradiol 4/4 dias e exercício resistido.

Fonte: A autora, 2015.

6.6.3.1 Avaliação histomorfométrica do tecido adiposo mesentérico

A avaliação morfométrica do tecido mesentérico mostrou no grupo OVX ($572,6 \pm 36,09 \mu\text{m}^2$) o aumento significativo da área do adipócito quando comparada à área dos demais grupos (Sham: $364,8 \pm 36,57 \mu\text{m}^2$; BE: $401,7 \pm 27,73 \mu\text{m}^2$; EX: $460,0 \pm 17,31 \mu\text{m}^2$ e BE+EX: $396,5 \pm 35,40 \mu\text{m}^2$), (Gráfico 15).

Gráfico 15 - Morfometria de adipócitos mesentéricos



Nota: Morfometria de adipócitos mesentéricos de ratas aos 165 dias de vida. Valores expressos em média \pm epm. ANOVA univariada, seguido de pós-teste Newman Keuls. $p < 0,05$, * OVX vs todos.

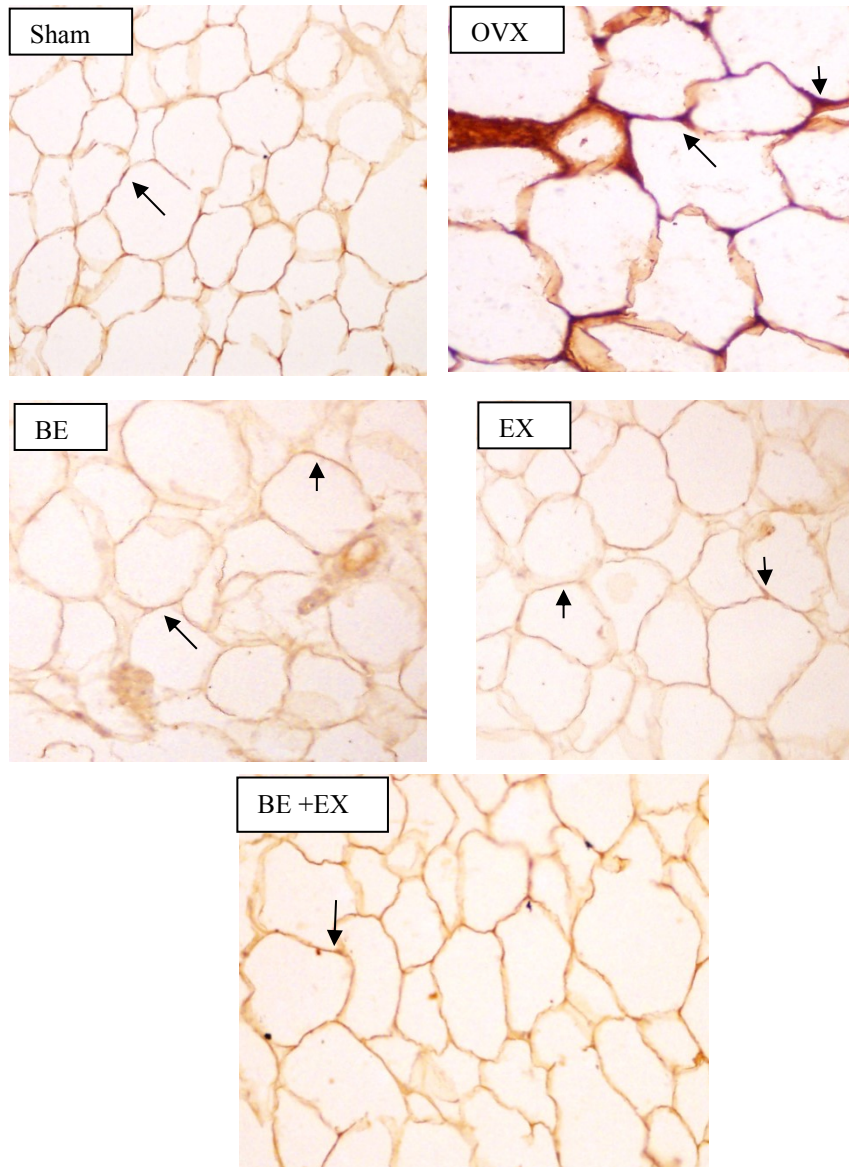
Legenda: Sham, ratas controle; OVX, ratas ovariectomizadas; EX, ratas ovariectomizadas, tratadas com exercício resistido; BE, ratas ovariectomizadas, tratadas com benzoato de estradiol 4/4 dias e BE+EX, ratas ovariectomizadas, tratadas com benzoato de estradiol 4/4 dias e exercício resistido.

Fonte: A autora, 2015.

6.6.3.2 Avaliação imunohistoquímica da expressão de PPAR γ no tecido adiposo mesentérico

Através de avaliação imunohistoquímica foi evidenciada a expressão de **PPAR γ** ao redor dos adipócitos em todos os grupos experimentais, sendo contudo, mais expressiva no grupo OVX, Figura 17.

Figura 17 - Fotomicrografia de tecido adiposo mesentérico de ratas aos 165 dias de vida, evidenciando expressão de PPAR γ



Nota: Fotomicrografia de tecido adiposo mesentérico de ratas aos 165 dias de vida, evidenciando expressão de PPAR γ , por imunohistoquímica. Setas = PPAR γ . Aumento de 200X.

Legenda: Sham, ratas controle; OVX, ratas ovariectomizadas; EX, ratas ovariectomizadas, tratadas com exercício resistido; BE, ratas ovariectomizadas, tratadas com benzoato de estradiol 4/4 dias e BE+EX, ratas ovariectomizadas, tratadas com benzoato de estradiol 4/4 dias e exercício resistido.

Fonte: A autora, 2015

6.7 Análise ósseas

6.7.1 Dimensões ósseas

A distância entre as epífises do fêmur foi menor no grupo OVX ($p < 0,005$) em relação aos demais grupos. A largura do ponto médio da diáfise apresentou menores medidas nos grupos OVX, BE+EX, o mesmo sendo observado em relação à altura da vértebra L4 ($p < 0,001$). Nota-se também que em todas as medidas avaliadas o grupo BE apresentou as maiores médias, (Tabela 12).

Tabela 12 - Dimensões ósseas

Dimensões ósseas (mm)	Sham	OVX	BE	EX	BE+EX
Fêmur:					
-Distancia entre as epífises	35,68±0,71	34,05 ±0,41 [#]	36,85±0,56	36,20±0,39	36,09 ±0,59
-Largura do ponto médio da diáfise	3,90±0.04	3,55±0.01*	3,977±0.06	3,825±0.07	3,655±0.03*
Vértebra:					
Altura da L4	7,220±0.09	7,143±0.05*	7,613±0.03 [@]	7,408±0.02	7,162±0.01*

Nota: Dimensões ósseas aos 165 dias de vida. Valores expressos em média±epm. * OVX, BE+EX vs Sham, BE, EX; @ BE vs todos, # OVX vs todos.

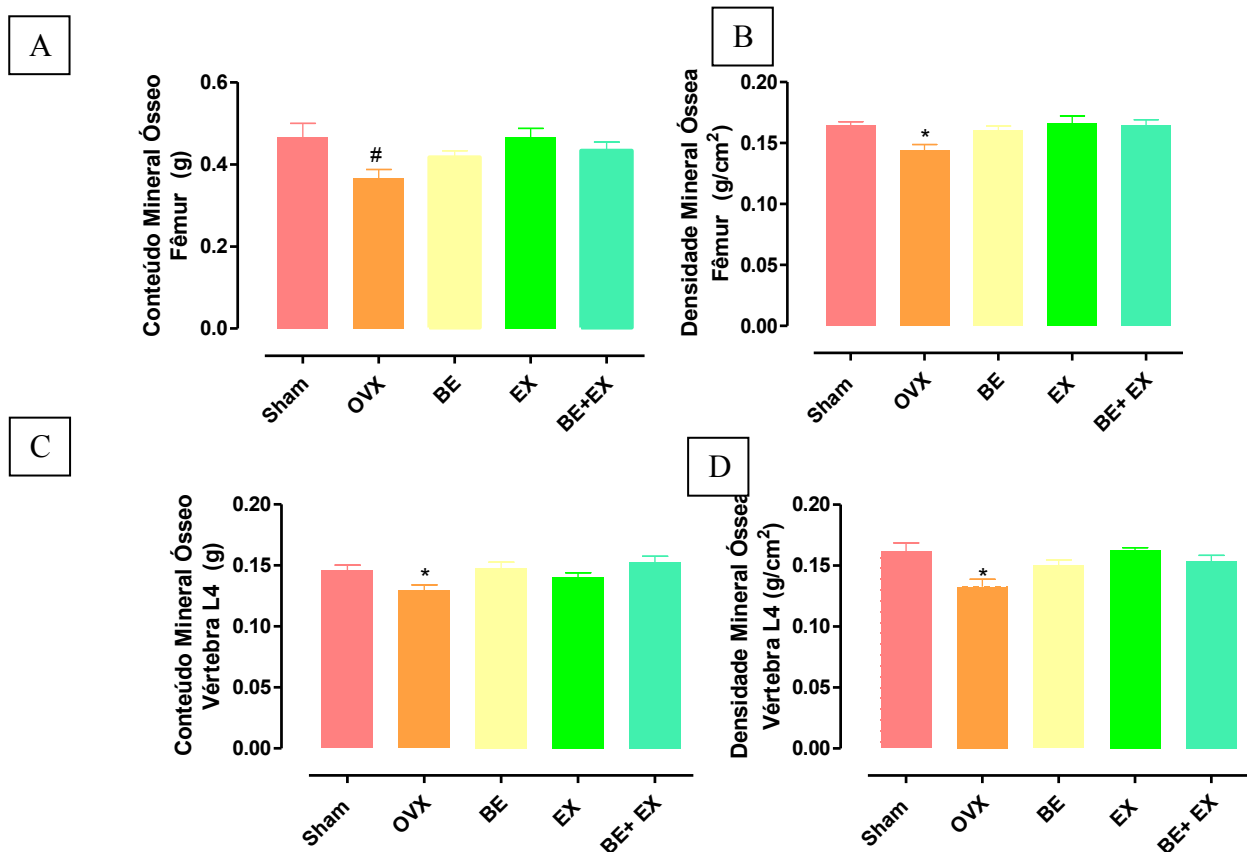
Legenda: Sham, ratas controle; OVX, ratas ovariectomizadas; EX, ratas ovariectomizadas, tratadas com exercício resistido; BE, ratas ovariectomizadas, tratadas com benzoato de estradiol 4/4 dias e BE+EX, ratas ovariectomizadas, tratadas com benzoato de estradiol 4/4 dias e exercício resistido.

Fonte: A autora, 2015.

6.7.2 Análise densitométrica de fêmur e vértebra L4

A análise densitometria efetuada por DXA evidenciou menor conteúdo mineral ósseo de fêmur ($p < 0,03$) e vértebra L4 ($p < 0,01$) no grupo OVX comparados aos demais grupos experimentais, (Gráfico 16).

Gráfico 16 - Análises da densidade mineral óssea de fêmur (A) e vértebra L4



Nota: Análises da densidade mineral óssea de fêmur (A) e vértebra L4 (B) por DXA, em ratas aos 164 dias de vida. Valores expressos em média±epm. (ANOVA univariada, seguido de pós-teste Newman Keuls). * OVX vs todos; # OVX vs Sham, EX.

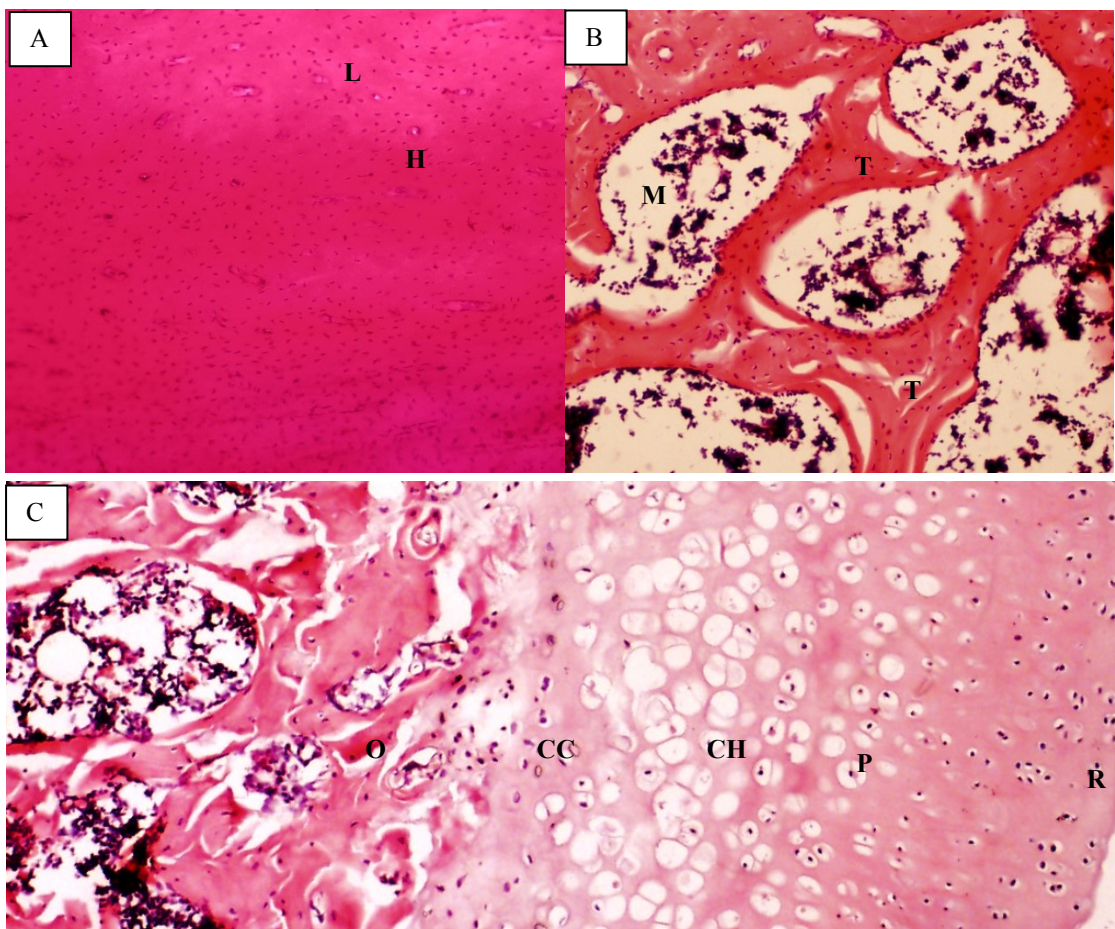
Legenda: Sham, ratas controle; OVX, ratas ovariectomizadas; EX, ratas ovariectomizadas, tratadas com exercício resistido; BE, ratas ovariectomizadas, tratadas com benzoato de estradiol 4/4 dias e BE+EX, ratas ovariectomizadas, tratadas com benzoato de estradiol 4/4 dias e exercício resistido.

Fonte: A autora, 2015.

6.7.3 Análise morfológica do tecido ósseo

O aspecto histológico do fêmur das ratas Sham aos 165 dias de vida apresentou características de normalidade. Em região de osso cortical (diáfise) foi observada a aparência uniforme dos canais de Haver e das lamelas concêntricas (Figura18 A). Na região de osso trabecular (epífise) são observadas trabéculas ósseas com osteócitos, formando o osso maduro, além de espaços bem definidos preenchidos pela medula óssea (tecido conjuntivo e células adiposas) e vasos sanguíneos (Figura18 B). Na região da placa epifisária do fêmur (cabeça do fêmur) foi observada a região de transição cartilagem-osso com camadas diferenciadas das zonas de repouso, de proliferação, de cartilagem hipertrófica, de cartilagem calcificada e de ossificação (Figura 18 C).

Figura 18 - Fotomicrografia de fêmur de ratas do grupo Sham aos 165 dias de vida



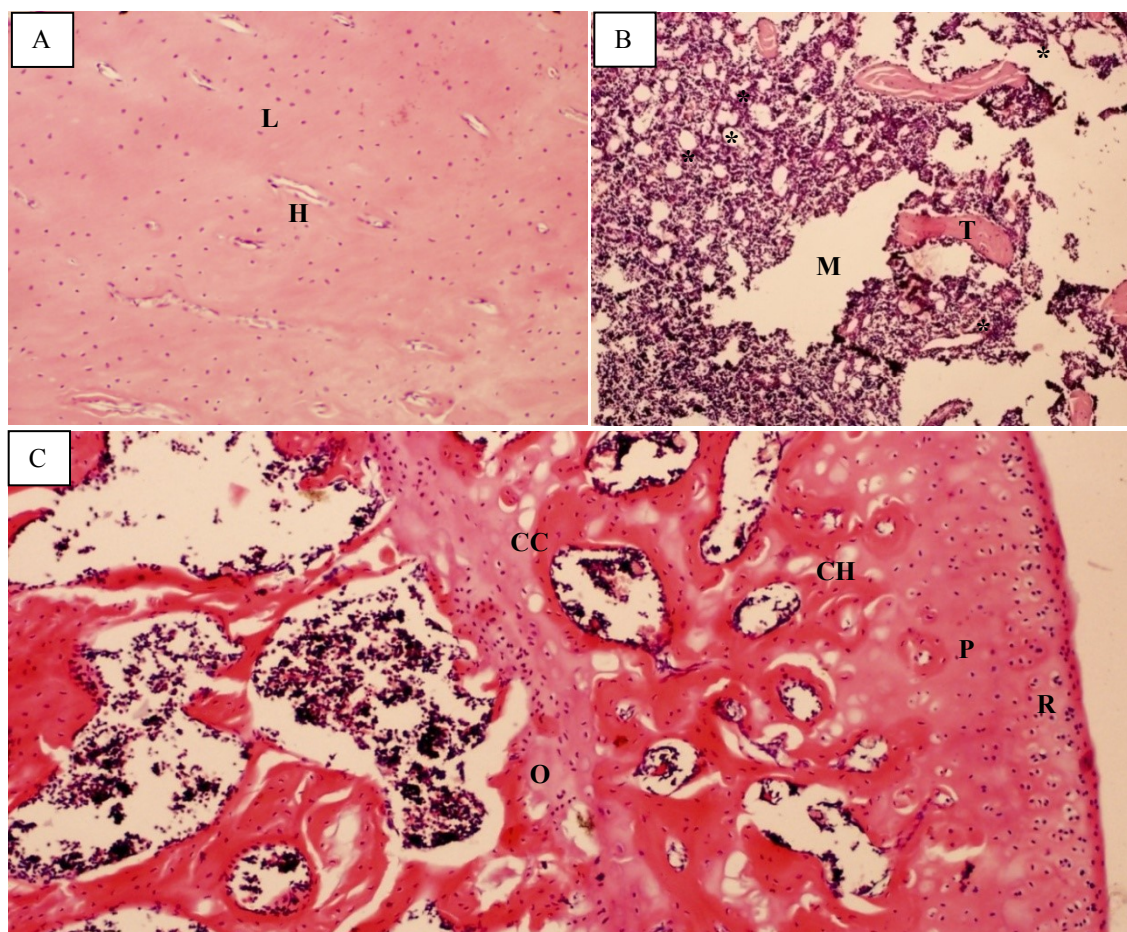
Nota: Fotomicrografia de fêmur de ratas do grupo Sham (ratas controle, n=8) aos 165 dias de vida.

Legenda: (A) região cortical, (B) região trabecular e (C) cabeça do fêmur). **L**= lamelas concêntricas, **H**= canais de Havers, **M**= medula óssea, **T**= trabéculas ósseas, **V**= vasos, **R**= zona de repouso, **P**= zona de proliferação, **CH**= zona de cartilagem hipertrófica, **CC**= zona de cartilagem calcificada e **O**= zona de ossificação. Aumento de 100x.

Fonte: A autora, 2015.

No grupo OVX o aspecto histológico do fêmur sugere a presença de osteopenia. Na região de tecido cortical o Sistema de Havers apresenta diminuição de lamelas concêntricas (Figura19A). Na região de osso trabecular as trabéculas ósseas se apresentam adelgadas e, predominantemente, fragmentadas. Também é possível observar aumento da medula óssea e de células adiposas (Figura19 B). A região da placa epifisária do fêmur se apresenta pouco diferenciada e com redução da zona de proliferação e da zona de cartilagem hipertrófica, comparando-se ao observado no grupo Sham.

Figura 19 - Fotomicrografia de fêmur de ratas do grupo OVX aos 165 dias de vida



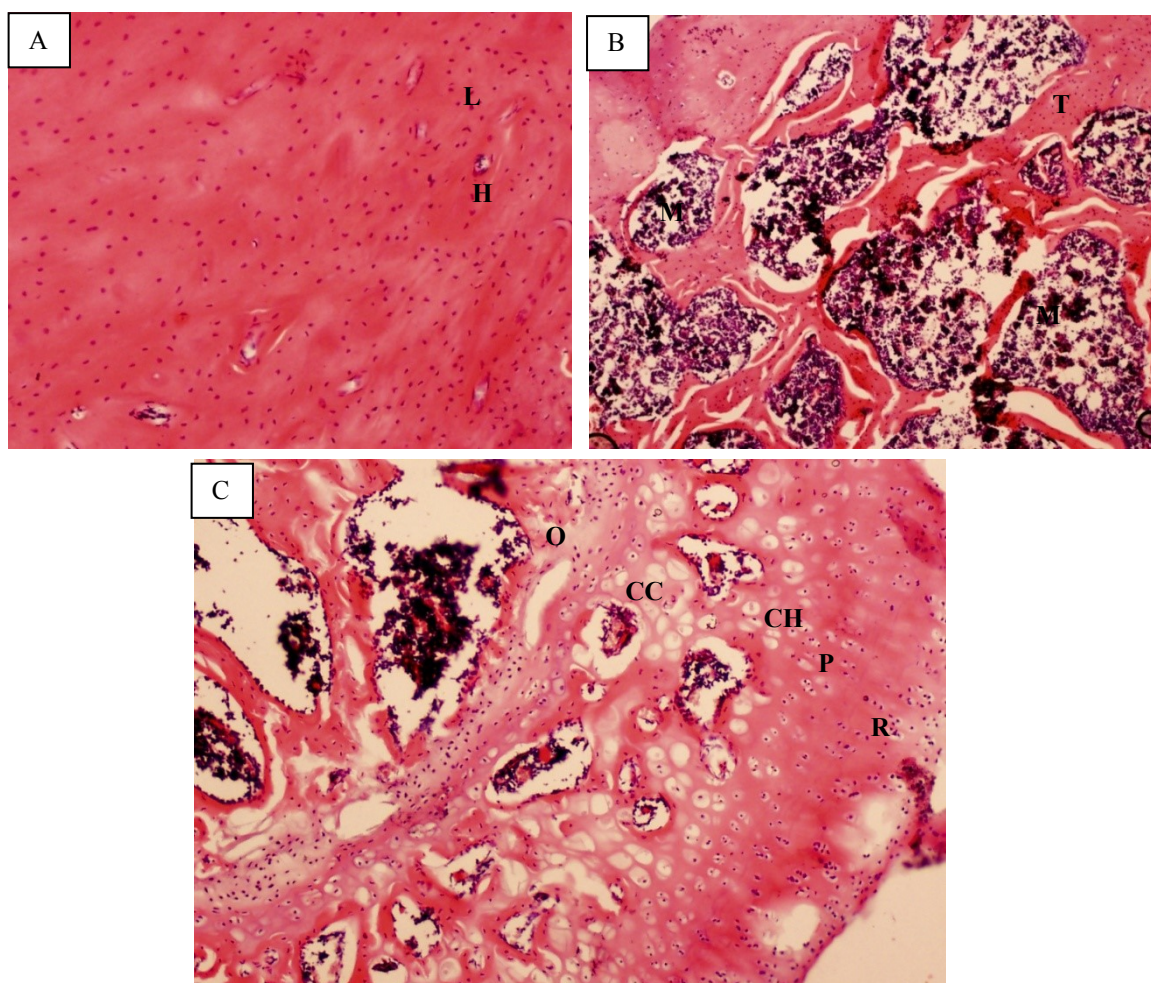
Nota: Fotomicrografia de fêmur de ratas do grupo OVX (ratas ovariectomizadas, n=8) aos 165 dias de vida.

Legenda: (A) região cortical, (B) região trabecular e (C) cabeça do fêmur. **L**= lamelas concêntricas, **H**= canais de Havers, **M**= medula óssea, **T**= trabéculas ósseas, **V**= vasos, **R**= zona de repouso, **P**= zona de proliferação, **CH**= zona de cartilagem hipertrófica, **CC**= zona de cartilagem calcificada e **O**= zona de ossificação. Aumento de 100x.

Fonte: A autora, 2015.

No grupo BE o aspecto histológico do fêmur guarda similaridades com o grupo Sham na região de osso cortical (Figura 20A). Na região de osso trabecular as trabéculas estão adelgaçadas com o espaço de medula e vasos irregulares (Figura 20B). Na região da placa epifisária as camadas se encontram bem definidas, no entanto, há redução na zona de cartilagem hipertrófica, (figura 20C).

Figura 20 - Fotomicrografia de fêmur de ratas do grupo BE aos 165 dias de vida



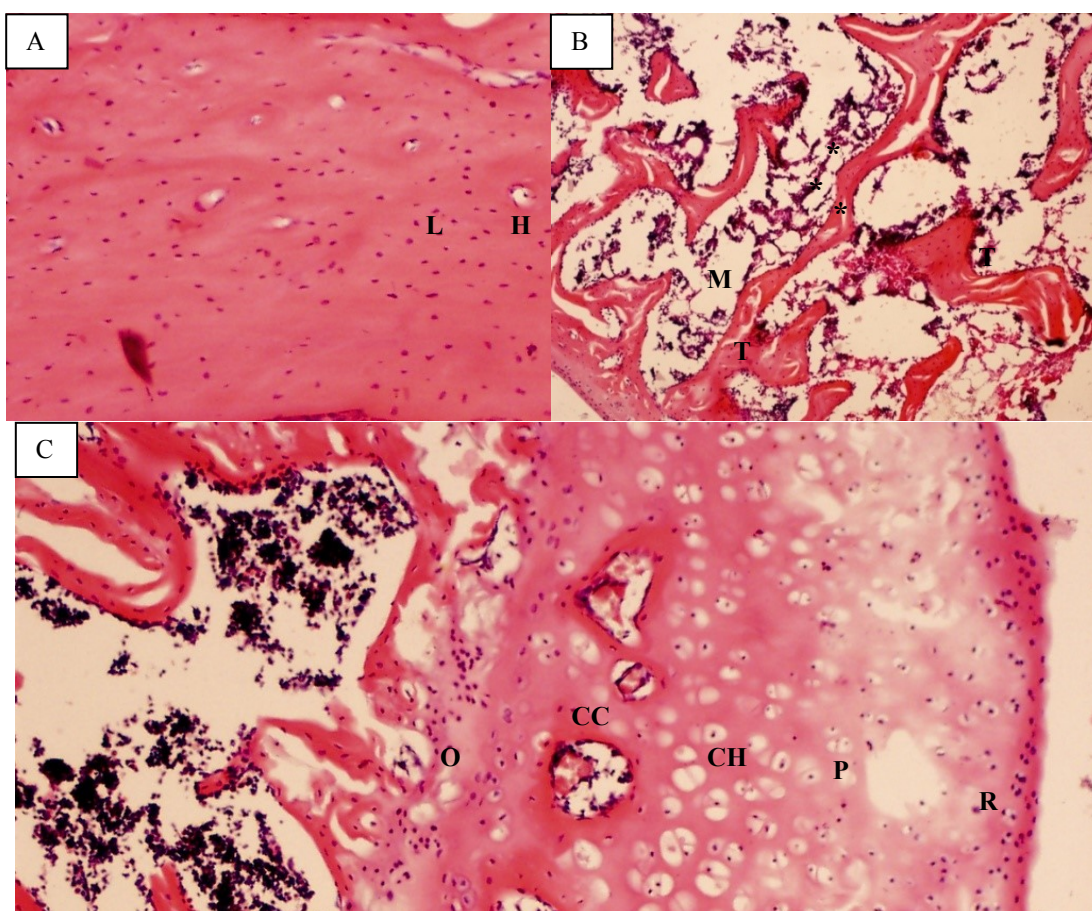
Nota: Fotomicrografia de fêmur de ratas do grupo BE (ratas ovariectomizadas tratadas com benzoato de estradiol 4/4 dias, n=8) aos 165 dias de vida.

Legenda: (A) região cortical, (B) região trabecular e (C) cabeça do fêmur). L= lamelas concêntricas, H= canais de Havers, M= medula óssea, T= trabéculas ósseas, V= vasos, R= zona de repouso, P= zona de proliferação, CH= zona de cartilagem hipertrófica, CC= zona de cartilagem calcificada e O= zona de ossificação. Aumento de 100x.

Fonte: A autora, 2015.

O aspecto histológico do fêmur nas ratas EX apresenta similaridade com o grupo BE. No entanto, na região de osso cortical é possível observar o Sistema de Haver um pouco desorganizado e com menos lamelas (Figura 21A). Na região de osso trabecular as trabéculas estão mais delgadas de células adiposas na medula óssea (figura 21B). Na região da placa epifisária do fêmur apresentam diferenciadas as de zona de repouso, a zona de proliferação, a zona de cartilagem hipertrófica, a zona de cartilagem calcificada e a zona de ossificação (figura 21C).

Figura 21 - Fotomicrografia de fêmur de ratas do grupo EX aos 165 dias de vida



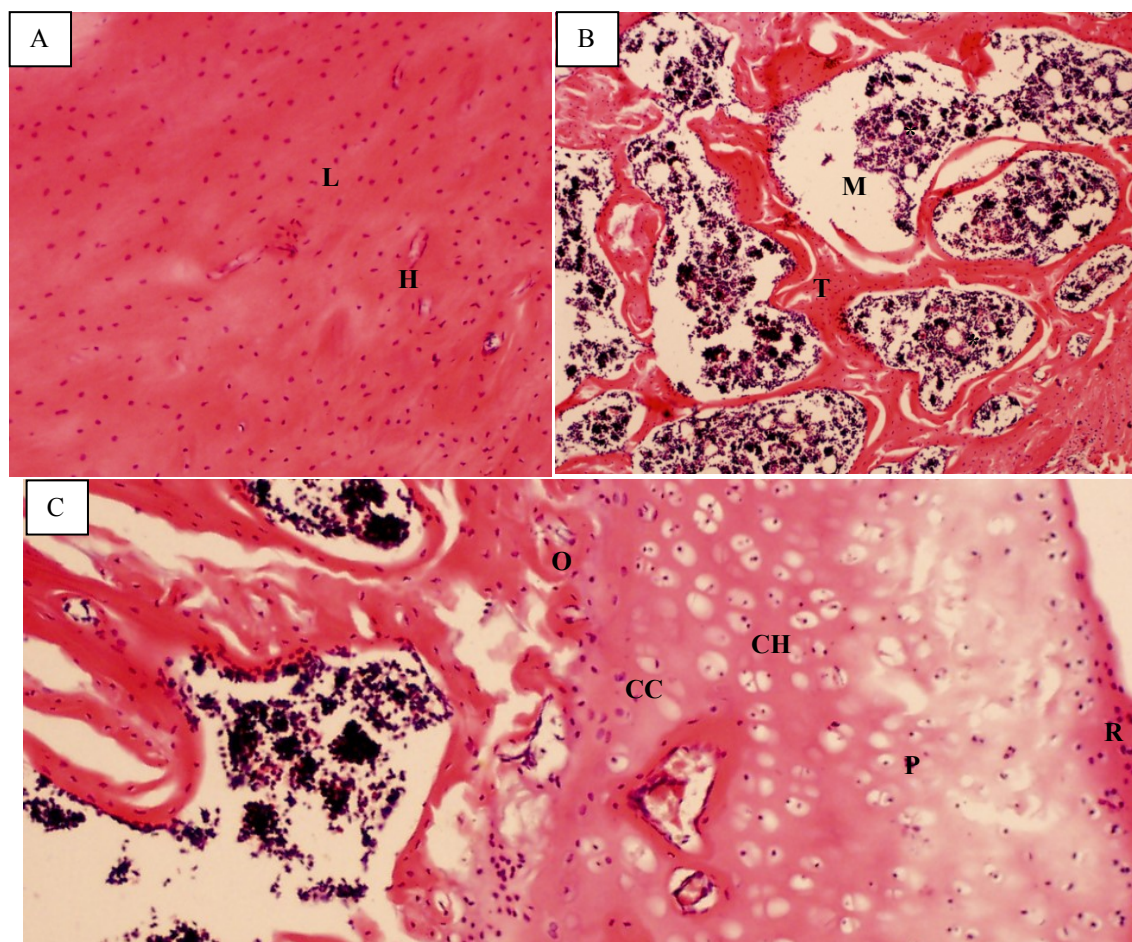
Nota: Fotomicrografia de fêmur de ratas do grupo EX (ratas ovariectomizadas tratadas com exercício resistido, n=8) aos 165 dias de vida.

Legenda: (A) região cortical, (B) região trabecular e (C) cabeça do fêmur. **L**= lamelas concêntricas, **H**= canais de Havers, **M**= medula óssea, **T**= trabéculas ósseas, **V**= vasos, **R**= zona de repouso, **P**= zona de proliferação, **CH**= zona de cartilagem hipertrófica, **CC**= zona de cartilagem calcificada e **O**= zona de ossificação. Aumento de 100x.

Fonte: A autora, 2015.

A associação dos tratamentos, hormonal e treinamento de força (grupo BE+ EX), determinou um aspecto histológico para o fêmur semelhante ao dos grupos BE e EX. Nota-se ainda melhor organização das lamelas na região cortical (figura 22A), assim como, trabéculas mais espessas e confluentes, com espaço medular mais definido, determinando o aumento de massa óssea (Figura 22B). Na região da placa epifisária as camadas estão bem definidas e diferenciadas (figura 22C).

Figura 22 - Fotomicrografia de fêmur de ratas do grupo BE+ EX aos 165 dias de vida



Nota: Fotomicrografia de fêmur de ratas do grupo BE+EX (ratas ovariectomizadas tratadas com benzoato de estradiol 4/4 dias e exercício resistido, n=8) aos 165 dias de vida.

Legenda: (A) região cortical, (B) região trabecular e (C) cabeça do fêmur). **L**= lamelas concêntricas, **H**= canais de Havers, **M**= medula óssea, **T**= trabéculas ósseas, **V**= vasos, **R**= zona de repouso, **P**= zona de proliferação, **CH**= zona de cartilagem hipertrófica, **CC**= zona de cartilagem calcificada e **O**= zona de ossificação. Aumento de 100x.

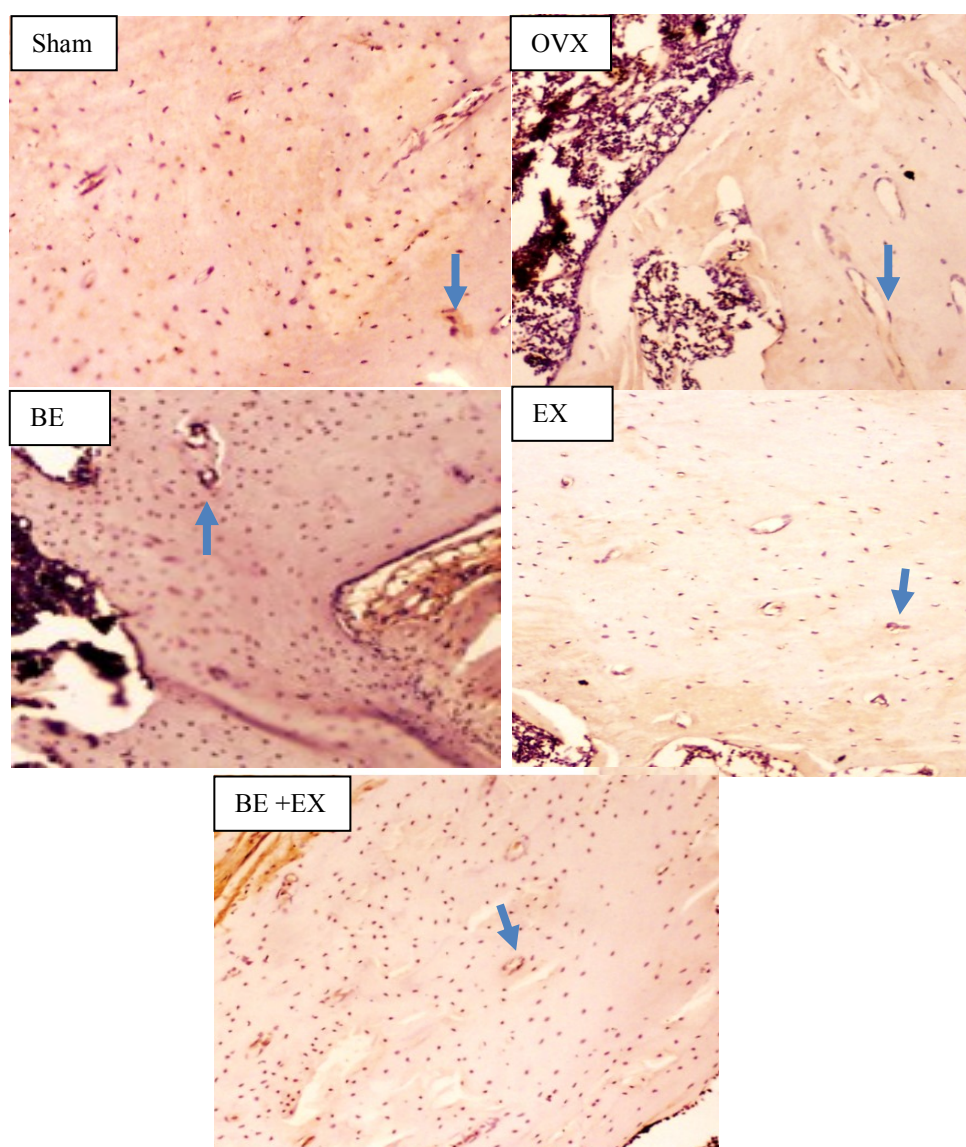
Fonte: A autora, 2015.

6.7.4 Avaliação imunohistoquímica da expressão de ER α no fêmur

A análise de imunohistoquímica identificou a expressão de **ER α** em fêmures. No grupo Sham a expressão foi identificada em torno dos canais de Havers e no tecido conjuntivo do espaço medular. No grupo OVX, BE e EX a expressão foi menos intensa em torno dos canais de Havers. No grupo BE+EX a expressão de **ER α** na região cortical está presente em

todos os canais de Havers, no entanto, de forma menos expressiva que no grupo Sham, Figura 23.

Figura 23 - Fotomicrografia de fêmur de ratas aos 165 dias de vida evidenciando expressão de ER α



Nota: Fotomicrografia de fêmur de ratas aos 165 dias de vida evidenciando expressão de ER α , por imunohistoquímica. Setas = ER α nos canais de havers,* = ER α em adipócitos. Aumento de 100x

Legenda: Sham, ratas controle; OVX, ratas ovariectomizadas; EX, ratas ovariectomizadas, tratadas com exercício resistido; BE, ratas ovariectomizadas, tratadas com benzoato de estradiol 4/4 dias e BE+EX, ratas ovariectomizadas, tratadas com benzoato de estradiol 4/4 dias e exercício resistido.

Fonte: A autora, 2015.

7 DISCUSSÃO

7.1 Discussão Protocolo 1

O envelhecimento é um processo natural e irreversível que pode ser conceituado de várias maneiras. Pode ser definido como um processo dinâmico e progressivo, no qual ocorrem modificações morfológicas, funcionais, bioquímicas e psicológicas que alteram o organismo tornando-o mais suscetível às agressões intrínsecas e extrínsecas do meio ambiente, contribuindo para maior vulnerabilidade e maior incidência de processos patológicos. Para a população feminina, alguns efeitos deletérios da menopausa tornam-se mais evidenciados, como o sobrepeso e a obesidade, a resistência à insulina e o aparecimento de doenças osteometabólicas (TCHERNOF *et al*, 2004; SYDNEY *et al*, 2010).

No desenho experimental do Protocolo 1 foram avaliadas as repercussões dos esquemas de tratamento hormonal diário e cíclico sobre a adiposidade e parâmetros ósseos de ratas adultas ovariectomizadas. A perda da função gonadal, simulando a menopausa pode ser utilizado em modelos experimentais através da ovariectomia, um procedimento cirúrgico que consiste na remoção bilateral dos ovários através de duas incisões cutâneas dorso-laterais, gerando um quadro de hipogonadismo (ARMADA *et al*, 2006; SANTANA *et al*, 2011). No presente estudo, o êxito da ovariectomia determinando a perda da função gonadal foi confirmado por dois parâmetros de avaliação do grupo OVX: a diminuição da massa do útero e a redução da concentração sérica de estradiol. A parede uterina, em particular o endométrio, tem as camadas naturalmente mantidas pelos esteróides sexuais ovarianos, estradiol e progesterona. Assim, com a perda da produção hormonal ovariana as camadas deixam de ser mantidas e conseqüentemente há perda de massa uterina. A baixa concentração de estradiol circulante detectada nos animais OVX é proveniente da conversão de androgênios da glândula suprarrenal, que ocorre principalmente no tecido adiposo, em função da expressão da enzima aromatase (GHOSH, *et al*, 2013). Nos grupos ovariectomizados tratados com benzoato de estradiol, os tratamentos diário e cíclico mantiveram as concentrações séricas de estradiol semelhantes as do grupo controle. Entretanto, apresentaram resultados distintos sobre a massa uterina. Enquanto, no tratamento cíclico a massa do útero ficou semelhante a dos animais controle, no tratamento diário houve incremento da massa, que pode refletir negativamente sobre a função deste órgão (COLAU *et al*, 2012). O estradiol é um hormônio

capaz de induzir proliferação celular em alguns tecidos alvos como mamas e útero. Logo, utilizando a reposição hormonal, as chances de ocorrer desenvolvimento tecidual indiscriminado aumentam demasiadamente. O processo é consequente da ativação do receptor de estrogênico (ER) pelo estradiol, que desencadeia a transcrição de genes envolvidos com a proliferação celular. O aumento de divisões celulares pode conduzir a erros na replicação do DNA, aumentando assim, o número de mutações. Dadas às possibilidades de malefício, o tratamento da reposição hormonal em mulheres ainda é controverso e discutido (YAGER & LIEHR, 1996; SUBRAMANIAN *et al*, 2008).

Está bem estabelecido na literatura que a deficiência de estrógenos, em mulheres após a menopausa e em modelos experimentais de menopausa, leva ao aumento de massa corporal, redistribuição e aumento de tecido adiposo em região abdominal (GLOY *et al*, 2011; GIBSON *et al*, 2013). E, que o tratamento com estradiol reduz a massa corporal e a adiposidade (ARMADA *et al*, 2006, SANTANA *et al*, 2011). Os estrógenos são considerados reguladores importantes do desenvolvimento e da deposição lipídica no tecido adiposo em humanos, em roedores e outras espécies (PAQUETE *et al*, 2007, COOKE & NAZZ, 2004).

No presente estudo, a administração de benzoato de estradiol resultou em queda da massa corporal para valores semelhantes aos do grupo Sham, revertendo, portanto, o efeito da deficiência hormonal sobre o ganho de massa corporal. Entretanto, o ajuste da massa corporal foi alcançado através de uma significativa redução da ingestão alimentar seguida da redução da massa adiposa intra-abdominal, retroperitoneal e mesentérica. Embora ambos os tratamentos tenham apresentado resultados semelhantes, houve uma diferença nas respostas, sendo o tratamento diário mais rápido e mais potente que o cíclico, confirmando que a resposta do estradiol sobre a massa corporal é dose-dependente. Esse resultado pode ser observado nos depósitos retroperitoneais do grupo BED, decorrente do aumento de lipólise nesses depósitos de gordura (COOKE & NAZZ, 2004; PEDERSEN *et al*, 2004) e anorexia (SHIMOMURA *et al*, 2002; D'EON *et al*, 2005).

A avaliação da adiposidade a partir da DXA confirma o aumento da gordura corporal nas ratas OVX e indica uma resposta sítio diferente na deposição de gordura nas ratas tratadas. Em relação à gordura corporal, houve menor acúmulo da gordura total e do tronco em resposta ao tratamento diário, indicando que o benzoato de estradiol promove a ativação de receptores estrogênicos (α e β), diminuindo significativamente a atividade lipogênica (SREBP-1c, FAS) e genes adipogênicos (LPL, PPAR γ) (WEIGT *et al*, 2013). Em contrapartida, o tratamento cíclico manteve a gordura corporal total e na gordura do tronco igual a do grupo Sham (ABELES *et al*, 2012, CÔTÉ *et al*, 2012). Esses resultados indicam

que para o período de 21 dias de tratamento hormonal cíclico, as respostas dos compartimentos de gordura são distintas.

Associando-se a massa de tecido adiposo retroperitoneal à avaliação morfológica desses adipócitos sugere-se que o tratamento com BE induziu a lipólise, tornando as células menores quando comparadas aos grupos Sham e OVX. Em estudo recente foi demonstrado que ER α aumenta a lipólise no tecido adiposo via *up-regulation* da enzima lipase hormônio sensível (HSL), contribuindo para a diminuição do volume celular desse tecido. Por outro lado, o aspecto morfológico e morfométrico do tecido adiposo subcutâneo sugere semelhança entre os grupos Sham, BED e BEC. No grupo BED foi verificado pela avaliação morfológica um aumento de matriz extracelular no tecido adiposo subcutâneo mostrando reflexo negativo do tratamento diário com BE. É descrito que no processo de diferenciação de pré adipócitos a adipócitos ocorre um aumento na deposição de matriz extracelular, a partir da ativação dos genes de PPAR γ nos pré-adipócitos. Esses genes também são responsáveis pela incorporação e armazenamento de triglicerídeos. Assim, o armazenamento de triglicerídeos e o surgimento da matriz extracelular nos adipócitos podem ser regulados por PPAR γ (MARIMAN & WANG, 2010). Em seguida, foi descrito que a reposição hormonal induz a secreção de matriz extracelular pelos adipócitos, contribuindo para a progressão do cancro em tecidos adiposos, mediada pelas integrinas - proteínas de matriz extracelular (JIYOUNG *et al*, 2011). Já o padrão celular observado no grupo OVX está de acordo com resultados anteriores (SANTANA *et al*, 2011), definido por uma hipertrofia celular. A alteração na deposição de gordura decorrente da falência gonadal parece estar relacionada à alteração no receptor estrogênio alfa (ER α). Estudos realizados com camundongos *knoukout* para o ER α mostraram que os estrógenos regulam diretamente a quantidade de tecido adiposo em fêmeas, através da regulação da expressão desses receptores (HEINE *et al*, 2000). De acordo com Brown & Clegg (2009) e Cooke & Naaz (2004), o ganho de massa corporal e a distribuição de tecido adiposo são determinados pela ligação de estradiol ao ER α , que através de ações genômicas regulam o desenvolvimento corporal e o tecido adiposo intra-abdominal, mas não a distribuição de tecido adiposo subcutâneo.

As alterações gonadais, de adiposidade e de massa corporal não repercutiram sobre as concentrações séricas de lipídios, que ficaram inalterados nos grupos estudados, no entanto, influenciaram a glicemia e insulinemia. Como esperado, a hiperglicemia no grupo OVX foi acompanhada por hiperinsulinemia. Estudos relatam que a deficiência em esteróides sexuais promove o aumento de glicose e insulina e que tais alterações podem levar para o aumento da massa de células β pancreática, contribuindo para o estado de resistência à insulina (ARAÚJO

et al, 2013; VOGEL *et al*, 2013). Nos grupos BED e BEC, a glicemia se apresentou normal e elevada, respectivamente, mas não comprometeu a insulinemia. Esses resultados indicam que o tratamento com benzoato de estradiol diminui a necessidade de insulina para manter a normoglicemia, tendo, portanto, esses animais maior sensibilidade à insulina do que as ratas deficientes de esteroides sexuais (VAN *et al*, 2013; WADA *et al*, 2013). Essas alterações podem ocorrer em função do estradiol atuar diretamente nas ilhotas pancreáticas através de seus receptores ER α e ER β , nas células β . Estudos mostram que a exposição a 17 β -estradiol, por longo prazo, diminui a expressão do gene e a liberação de insulina sem alterações na massa de células β pancreáticas (ALONSO-MAGDALENA *et al*, 2008; NADAL *et al*, 2011).

Ainda avaliando a composição corporal, a DXA evidenciou redução drástica da massa magra no grupo BED, evidenciando cada vez mais os efeitos deletérios que a reposição diária traz sobre o metabolismo desses animais. Em mulheres após a menopausa, a associação da diminuição da massa magra com o desenrolar do envelhecimento vem sendo discutida (SVENSSON *et al*, 2010; DOBSET *et al*, 2012).

O esqueleto de ratos se mostra sensível à perda de hormônios ovarianos. Uma rata ovariectomizada representa um modelo de perda óssea indicado para investigar questões relevantes ao estudo da integridade óssea após a menopausa (ARMADA *et al*, 2009), iniciando o desenvolvimento mais precoce da osteopenia e posteriormente, seguido da osteoporose (FRANCISCO *et al*, 2010; TEZVAL *et al*, 2010). A deficiência estrogênica é considerada a causa primária de perda da integridade óssea após a menopausa, sendo, conseqüentemente, um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de osteoporose em mulheres. O efeito protetor do estrogênio no osso se dá pela inibição da reabsorção, prevenindo a perda óssea e reduzindo o risco de fraturas, e sua ação ocorre por vários mecanismos: melhora da absorção de cálcio no trato intestinal e diminuição da perda de cálcio pela urina; elevação da forma ativa de vitamina D na circulação; estimulação da produção de calcitonina, que previne a remoção de cálcio do osso. Logo, a deficiência de estrogênio promove a liberação do bloqueio metabólico ósseo, resultando na maior atividade metabólica óssea, ou seja, aumenta em 43% a formação óssea e em 90% a reabsorção óssea. Esses mecanismos refletem grande atividade de osteoclastos e osteoblastos, predominando, porém, a função osteoclástica, o que resulta em maior reabsorção óssea, em função da maior liberação de citocinas (IL-1, IL-6 e TNF). Inversamente, o tratamento hormonal suprime as citocinas, prevenindo a perda óssea (GRIZ, 2000; RAMALHO *et al*, 2000). Inversamente, o tratamento hormonal suprime as citocinas, prevenindo a perda óssea (GRIZ, 2000; RAMALHO *et al*, 2000).

Os resultados sobre medidas ósseas mostram que as ratas ovariectomizadas apresentaram menores dimensões dos fêmures devido ao aumento da remodelação óssea associada à deficiência estrogênica. A perda óssea refletiu diretamente sobre tamanho e a espessura do fêmur comprovando que nas regiões trabeculares e corticais podem sofrer afinamento, susceptíveis a alterações da microarquitetura óssea decorrentes da reabsorção óssea. Entretanto, o tratamento hormonal mostrou efeito protetor sobre o tamanho e espessura dos fêmures, prevenindo contra a alta taxa de remodelação óssea, como visualizada na redução ocasionada pela ovariectomia (FONSECA *et al*, 2012).

Em relação à avaliação óssea baseada em parâmetros físicos, o período de estudo (21 dias), talvez não seja suficiente para apresentar alterações em osso longo, como o fêmur. Contudo, cabe destacar que o tratamento cíclico resultou em maiores valores para todos os parâmetros avaliados. Em ratas, o aparecimento de osteopenia em fêmur distal ocorre após 16 semanas de castração (GIAVARESI *et al*, 2002). Por outro lado, a diminuição dos pesos imerso e úmido e do volume da vértebra L4 é um indício de alteração óssea, em um osso de composição trabecular. O tratamento com BE, em especial o tratamento cíclico, incrementou os pesos imerso e úmido e, de forma surpreendente, o tratamento diário provocou uma expressiva alteração de volume e densidade dessas vértebras. Nos ossos, a porosidade reflete o adelgaçamento das trabéculas ósseas, em consequência ao desequilíbrio no processo de remodelação óssea, que pode ocorrer por fatores hormonais, deficiência de cálcio ou vitamina D, ou falta de estresse mecânico (MULLER *et al*, 2003; PASCHALIS *et al*, 2003; PEREIRA, 2009).

Métodos de avaliação do status esquelético para determinação do risco de fraturas em casos de osteoporose dependem principalmente da medição não invasiva do conteúdo mineral ósseo e da densidade mineral óssea, que são amplamente considerados como os fatores mais importantes na determinação da integridade óssea. Sítios esqueléticos que consistem predominantemente em osso trabecular são considerados os locais preferidos para aferições, por responderem mais rapidamente aos estímulos metabólicos, do que o osso cortical. As fraturas também podem ocorrer com mais frequência em locais que são substancialmente trabecular, como os corpos vertebrais, a porção proximal do fêmur e distal do rádio (GRAMP, 1996). Para avaliação do risco de fraturas qualquer técnica adequadamente validada pode ser utilizada, incluindo medidas de mais de um sítio, uma vez que isso tem demonstrado benefícios na avaliação de risco (DENSSO, 2006).

A análise das mesmas peças ósseas através de tomografia computadorizada (TC) evidenciou tanto na cabeça do fêmur quanto no corpo vertebral de L4 menor conteúdo

mineral ósseo no grupo OVX, que sem dúvida está relacionado ao desequilíbrio no processo de remodelação óssea, causado pela deficiência de estrógeno. Em humanos, a relação positiva foi estabelecida entre massa corporal e osteogênese, desencadeada pelo estresse mecânico gerado pela carga colocada sobre o esqueleto (HSU *et al*, 2006). No entanto, nesses animais, apesar da massa corporal estar elevada e gerar o estresse mecânico sobre o esqueleto parecem que a deficiência hormonal está no papel central, desequilibrando a remodelação. Assim, mesmo considerando o período experimental, como curto, as alterações físicas foram confirmadas pela TC, caracterizando a perda da integridade óssea. Nos grupos tratados, os ossos apresentaram respostas distintas aos tratamentos, diário e cíclico. Nas vértebras L4, a TC determinou melhor resposta para o grupo BED, enquanto no fêmur a resposta foi semelhante para ambos. Esses resultados sugerem que após a falta de estradiol por 30 dias, a manutenção da integridade das vértebras só é alcançada pela presença constante de E2, mas no fêmur isso não é necessário. Provavelmente, a força mecânica sobre o fêmur associada ao E2 seja o ponto que diferencia a respostas dos ossos para os tratamentos. Confirma também o efeito direto do estradiol sobre a manutenção da estrutura óssea (YAO *et al*, 2008) e é similar ao relato de Chow *et al.*(1992), que observou o aumento no volume dos ossos trabeculares de até 35% em ratas ovariectomizadas, após tratamento com 17-beta estradiol por 21 dias consecutivos.

Atualmente, a DXA é a técnica mais freqüentemente utilizada para aferição da DMO e CMO, recebendo mais atenção no que diz respeito à validação das técnicas de análise óssea. A DMO pode ser afetada pela retenção de líquidos, ganho de peso e composição tecidual alterada. Em nosso estudo, o conteúdo e a densidade mineral do fêmur foi afetado negativamente pela deficiência estrogênica e pelo tratamento cíclico o mesmo não ocorrendo com a VL4. As regiões com ossos trabeculares de vértebras são mais homogêneas do que as proporções de osso trabecular na cabeça dos fêmures, com isso podemos explicar o porquê das diferenças entre os resultados das peças ósseas (BREITMAN *et al.*, 2003). Esses resultados estão de acordo com relatos da literatura que mostram a redução da CMO em fêmures, conseqüente a perda da função ovariana (ARMADA *et al*, 2009; FRANCISCO *et al*, 2011). Além disso, confirma o êxito deste modelo experimental em promover osteopenia, já indicada em alguns estudos (HOFBAUER& KHOSLA, 1999, LEROUXEL *et al*, 2004). Da mesma maneira, o tratamento hormonal demonstrou contribuir para a manutenção da densidade e conteúdo mineral ósseo, corroborando com a literatura (ORWOLL& KLEIN, 1995; VANDERSCHUEREN& BOUILLON, 1995).

7.2 Discussão Protocolo 2

A reposição hormonal na menopausa atenua diversos distúrbios consequentes do estado de hipoestrogenismo. Entretanto, para algumas mulheres, também pode desencadear efeitos negativos, como o aumento da incidência de câncer de mama (WANNMACHER & LUBIANCA, 2004). Considerando essa possibilidade, o tratamento hormonal deixa de ser a indicação clínica e, intervenções não farmacológicas, como a realização de atividade física, passam a ser uma opção (LEITE *et al*, 2009).

Apesar da terapia de reposição hormonal seja um tema polêmico como forma de tratamento na menopausa. Atualmente diversos ginecologistas consideram se realmente é uma doença e de que forma precisa ser tratada. A menopausa é apenas uma fase natural da vida da mulher. Por outro lado, o tratamento com hormônios também pode acarretar em alguns riscos para saúde, principalmente no que diz respeito ao câncer de mama, endométrio. Desta maneira, é essencial buscar por outras fontes de alternativas para tratar a menopausa.

Partindo dos resultados do Protocolo 1, onde ficou estabelecido como forma de tratamento hormonal de ratas ovariectomizadas o esquema cíclico para a avaliação metabólica e óssea, o Protocolo 2 trata da comparação entre os tratamentos, farmacológico ou não farmacológico em ratas ovariectomizadas. Neste desenho experimental, são comparados os efeitos da administração cíclica de benzoato de estradiol, do treinamento de força e da associação entre ambos, em relação à adiposidade, à estrutura óssea e aspectos metabólicos. A hipótese inicial foi confirmada, mostrando que o treinamento de força atua de forma positiva sobre os depósitos de gordura, o perfil bioquímico e a qualidade da estrutura óssea, mantendo nas ratas ovariectomizadas padrões semelhantes aos encontrados nas ratas controle. Da mesma forma, quando o treinamento de força foi associado ao tratamento cíclico com benzoato de estradiol, os benefícios foram evidenciados.

A menopausa artificial, mimetizando o processo fisiológico e seus efeitos, foi estabelecida pelo método, já descrito e discutido, de retirada bilateral dos ovários. E, mais uma vez, as baixas concentrações de estradiol sérico nos grupos castrados (OVX e EX) confirmaram a eficácia do método e a produção extra gonadal de estrógenos (COOK & NAZZ, 2004). Ainda relacionadas a esses resultados e grupos está à diminuição da massa do útero, indicando atrofia uterina decorrente da deficiência dos esteróides sexuais femininos (SANTANA *et al*, 2011). Por outro lado, nos grupos Sham, BE e BE+EX a similaridade dos níveis séricos de estradiol e da massa uterina mostram que a administração cíclica do

benzoato de estradiol manteve padrões séricos fisiológicos e que, portanto, o estradiol exógeno atua nos receptores estrogênicos gerando respostas fisiológicas (DENG *et al*, 2003 SANTANA *et al*, 2011, PAQUETE *et al*, 2011).

O aumento da massa corporal consequente à carência estrogênica foi revertido pelo tratamento com estradiol, para valores semelhantes aos dos animais controle, como descrito em outros estudos (RAMIREZ, 1981; D'EON *et al*, 2005; ARMADA *et al* 2006). Entretanto, o treinamento de força manteve a massa corporal do grupo EX semelhante a do grupo OVX, acompanhado de maior ingestão alimentar provavelmente, a fim de compensar o maior gasto calórico decorrente do exercício físico (LEITE *et al*, 2010; PAQUETTE *et al.*, 2009). Estudos mais antigos mostraram de forma contrária, que animais realizando exercício físico aumentam o consumo energético, aumentando a taxa de repouso metabólico após o exercício, o que poderia estar relacionado à diminuição da massa corporal (HUNTER *et al*, 1998; POEHLMAN *et al*, 1998 WESTERTERP, 2010). No grupo tratado apenas com estradiol, a massa corporal foi mantida apesar de a menor ingestão alimentar. Provavelmente, ocorreu pelo efeito anorexígeno do estradiol, inibindo a ingestão de alimentos (SANTOLLO *et al*, 2010; ECKEL, 2011) ou por sua ação sobre a colecistocinina (CCK), potencializando a saciedade (GEARY, 2001), ou ainda talvez, pelas duas ações conjuntas.

O acúmulo de gordura, determinado pela deficiência de estrogênio, é um fator que favorece o desenvolvimento da síndrome metabólica (TOTH *et al.*, 2000; VOTRUBA & JENSEN *et al.*, 2007) e, tal ação parece estar relacionada à alteração no ER α (COOKE & NAZZ, 2004; LIZCANO & GUZMÁN, 2014). Os resultados de aumento de gordura determinados pela pesagem do tecido e pela DXA, no grupo OVX confirmam a ação estrogênica no tecido adiposo. As massas de tecido retroperitoneal e mesentérico, gordura corporal total e gordura do tronco responderam de forma semelhante aos tratamentos, isoladamente. Mas, a associação dos tratamentos levou a uma redução significativa dos conteúdos de gordura verificados pela DXA.

O treinamento de força aumenta o consumo energético e, como consequência, diminui a massa corporal, melhora a sinalização que promove a oxidação de gorduras no músculo esquelético, inibe a lipogênese nos adipócitos, fígado e músculos e aumenta a lipólise nos adipócitos (LAVOIE & GAUTHIER, 2006; CHAPADOS *et al*, 2008; CORRIVEAU *et al*, 2008). Esses resultados são semelhantes aos do presente estudo, exceto pelo fato dos animais EX apresentarem aumento da massa corporal que ao contrário do grupo OVX, se deu em função do ganho significativo de massa muscular, comprovado pela análise da composição corporal da DXA.

Para que o armazenamento de lipídios se concretize é necessário que exista equilíbrio entre a, captação, a síntese e a mobilização dos triglicerídeos no tecido adiposo. Diferentes etapas de controle mantêm as vias metabólicas em resposta a estimulação exercida por fatores ambientais e hormonais e, é sabido que este controle ocorre também em nível de transcrição gênica. Alterações no volume dos adipócitos condizem diretamente com a mobilização de triglicerídeos pelos adipócitos, sendo em resposta a lipólise ou a lipogênese (ARNER, 2001; KERSTEN *et al*, 2002). A morfometria dos adipócitos subcutâneo, retroperitoneal e mesentérico apontou a ovariectomia como causadora do aumento dos adipócitos, o que pode ser indício de hipertrofia celular devido à ausência de esteróides sexuais. Tal fato gera uma hipótese de que a célula hipertrofiou devido ao aumento da expressão de lipoproteína lípase (LPL) e diminuição da lípase hormônio sensível (HSL), contribuindo assim, para a lipogênese (COOKE & NAZZ, 2004). De forma oposta, o tratamento com estradiol isolado ou associado ao exercício físico manteve a areados adipócitos à semelhança dos animais controle. Neste contexto, alguns estudos têm investigado e confirmado os efeitos benéficos do estradiol sobre a adiposidade (D'EON *et al*, 2005; ZOTH *et al*, 2012; STUBBINS *et al*, 2012), já que regula o tamanho dos adipócitos e induz o *up regulation* nos receptores β adrenérgicos, contribuindo para lipólise no tecido adiposo (PEDERSEN *et al*, 2004). O exercício físico como único tratamento foi eficaz para a morfologia/equilíbrio metabólico dos tecidos retroperitoneal e mesentérico, mas não alcançou os mesmos resultados no tecido subcutâneo, onde a hipertrofia dos adipócitos foi evidenciada pela presença de adipócitos significativamente maiores que os controles.

O aumento dos adipócitos poderia ser resultante do aumento da expressão de receptores de insulina (GOLLISCH *et al*, 2009). Segundo Craig *et al*.(1981), o treinamento físico parece aumentar a capacidade de captação de glicose pelo tecido adiposo, contribuindo desta maneira para lipogênese.

Ainda em relação à resposta metabólica do tecido adiposo ao exercício físico, a maior expressão de PPAR- γ nos tecidos adiposos subcutâneo e retroperitoneal nos grupos EX e BE+EX, sugere que o treinamento de força traz maiores benefícios para a saúde. Evidências têm mostrado que a realização de exercício pode afetar a sinalização metabólica através da ativação deste receptor, trazendo benefícios cardiovasculares e melhor sensibilidade à insulina (BUTCHER *et al*., 2008; YAKEU *et al*., 2010, RUSHKE *et al*., 2010). RUSCHKE *et al*. (2010). O exercício realizado por quatro semanas aumentou a expressão de PPAR γ em músculo esquelético e no tecido adiposo, com impacto benéfico na sensibilidade à insulina. Secundariamente à ativação de PPAR γ , estão relacionadas às vantagens potenciais na

expressão de receptores de adiponectina, IL-6, TNF- α , PAI-1, angiotensinogênio (PUIGSERVER & SPIELGEMAN, 2003).

Como esperado, a ovariectomia aumentou as concentrações séricas de colesterol total e triglicerídeos e diminuiu as de HDL, confirmando as evidências do papel dos estrógenos mantendo um perfil lipídico favorável à saúde (PAQUETTE *et al.*, 2007; CORRIVEAU *et al.*, 2008). A alteração dos lipídios séricos de forma negativa está associada ao maior risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (MEDINA *et al.*, 2003). Por outro lado, o tratamento hormonal cíclico e o treinamento de força, juntos ou isoladamente mantiveram os lipídios em concentrações séricas adequadas. A ativação de ER β no fígado provoca a melhora do perfil lipídico, através do incremento ao número de receptores hepáticos de colesterol LDL, favorecendo o catabolismo de colesterol. Ocorre a inibição da lipase hepática, que está envolvida no metabolismo de colesterol HDL, ocasionando seu incremento. Nos animais treinados (EX) as concentrações de HDL, colesterol total e triglicerídeos são mantidas, independentemente do estado hormonal. Com a depleção do glicogênio, os ácidos graxos não esterificados se tornam a mais importante fonte de energia; o treinamento de força aumenta a habilidade dos músculos em captá-los e oxidá-los por aumentar o número de transportadores para os ácidos graxos nos músculos (SIGAL, 2004). Recentemente, foi relatado que a prática de treinamento de força em ratas ovariectomizadas diminui o acúmulo de tecido adiposo e a gordura hepática. Seja por aumentar a oxidação lipídica no fígado, através da ativação da via AMPK (QI *et al.*, 2013), seja por regular de forma negativa a expressão de genes de enzimas lipogênicas (PAQUETTE *et al.*, 2008).

Os conteúdos hepáticos de triglicerídeos e colesterol não se alteraram com os tratamentos. No entanto, o aumento do glicogênio nas ratas deficientes de esteroides é provavelmente, conseqüente ao maior acúmulo e menor gasto energético/metabólico nesses animais. Nos animais EX, o resultado confirma os dados de Paquete *et al.* (2008) que também não observou alteração de glicogênio em função do exercício físico. Mesmo sem causar alteração no conteúdo hepático de triglicerídeos, colesterol e glicogênio, o tratamento hormonal isolado provocou o aumento da massa do fígado; podendo ser essa mais uma resposta negativa do estradiol. Já foi relatado que o uso crônico de estradiol aumenta a expressão de ER α no fígado, levando a cirrose hepática (KANG *et al.*, 2005).

Quanto à avaliação glicêmica, nota-se o melhor resultado quando o treinamento de força está associado ao tratamento hormonal, evidenciando tanto o papel do estradiol quanto do exercício para a captação de glicose pelas células. Resposta oposta ao que se observa no grupo OVX, no qual fica evidente que a privação dos hormônios ovarianos influencia o

metabolismo da glicose. Esses resultados estão de acordo com descrições clássicas do estado metabólico na menopausa, como uma fase associada à redução da resposta da glicose à insulina (LATOURET *et al.*, 2001; CHOI *et al.*, 2005; SOUZA *et al.*, 2007). A importância dos ERs na homeostase da glicose (ALONSO-MAGDALENA *et al.*, 2008), assim como a regulação do transportador de glicose do tipo 4 (GLUT4) no músculo esquelético e a sensibilidade à insulina no fígado, por ER α e ER β (WEND *et al.*, 2012) já foram descritas, evidenciando a importância do estradiol para o controle do metabolismo glicídico.

O treinamento de força induz adaptações do organismo, para a geração de componentes essenciais ao melhor desempenho metabólico e à captação de glicose. Além disso, nas horas seguintes ao treinamento, há aumento da captação de glicose, para o restabelecimento dos depósitos de glicogênio (GULVE, 2008). A produção endógena de glicose está intimamente ligada ao aumento da absorção muscular. Estudos relatam que durante o treinamento físico, o tecido hepático desempenha papel na manutenção da glicemia, por meio da glicogenólise e da gliconeogênese (CORRIVEAU *et al.*, 2008). Esses mecanismos, estimulados por glucagon e, principalmente, por catecolaminas, também estimulam o metabolismo hepático de aminoácidos e a oxidação de gorduras, gerando energia e precursores para gliconeogênese. Durante o exercício intenso, as concentrações séricas de catecolaminas aumentam em até 15 vezes, produzindo até sete vezes mais glicose, e essa resposta não se reproduz em nenhuma outra condição fisiológica (SIGAL *et al.*, 2004; MATTHEW *et al.*, 2010).

Associada à glicemia está a concentração de insulina. Ambos foram parâmetros metabólicos alterados apenas pela deficiência estrogênica. Nas ratas OVX, como esperado, houve aumento da glicemia e da insulinemia, que causou o estado de resistência à insulina e determinou a maior atividade das células beta pancreáticas. Os tratamentos, estradiol e exercício físico, isolados ou associados, por sua ação positiva sobre a glicemia mantiveram o metabolismo glicídico dos animais em padrões de normalidade.

A reposição hormonal juntamente com treinamento de força nas ratas BE+EX, induziu um aumento de leptina sérica, tem sido demonstrado que ERs expressos em adipócitos e a administração de estrógeno pode estimular a liberação da leptina pelos adipócitos *in vitro* (KRISTENSEN & PEDERSEN; 1999). A expressão de RNAm para leptina no tecido adiposo e a leptina sérica são menores em animais ovariectomizados tratados com veículo, do que ovariectomizadas tratadas com estradiol, indicando possivelmente efeito modulador do estrógeno sobre a síntese de leptina no tecido adiposo (SHIMIZU *et al.*, 1997). O treinamento de força parece também influenciar no aumento das concentrações plasmáticas de leptina.

Tem sido relatado que o exercício leva a um grande gasto energético, estimulando a perda da massa gorda e auxilia na manutenção da massa magra. A relação do papel da leptina com o treinamento de força pode ser um importante determinante das concentrações de leptina, implicando em possíveis efeitos crônicos do treinamento físico com respostas da leptina a alterações da composição corporal, gasto energético e insulina (FRIEDMAN *et al.*, 1997; PRESTES *et al.*, 2009).

O osso foi afetado de forma negativa pela deficiência estrogênica, que determinou a diminuição das medidas do CMO e da DMO das peças ósseas (vertebra L4 e fêmur) assim como a DMO e o CMO totais do esqueleto, semelhantes a relatos da literatura (ARMADA *et al.*, 2009; GOVINDARAJAN *et al.*, 2013). A deficiência estrogênica e o sedentarismo se destacam como causas para a menor integridade do tecido ósseo, conduzindo ao desenvolvimento de osteopenia e osteoporose. Considerando-se os resultados encontrados no presente estudo, é possível compreender que o treinamento físico pode prevenir ou atenuar a perda óssea progressiva que conduz à osteoporose (OCARINO, 2009). A força mecânica induzida pelo exercício físico promove o aumento da diferenciação osteogênica, que está associada à melhoria da integridade óssea e, conseqüentemente, da resistência óssea alcançada pelo aumento das trabéculas e do espessamento cortical (OCARINO, 2009; KOSTENUIK *et al.*, 1997). A tensão mecânica imposta ao osso é importante para a remodelação óssea e para a determinação da massa óssea, através de cargas dinâmicas impostas pelo músculo e cargas passivas, representadas pela massa corporal (IWANIEC *et al.*, 2009). Assim, nos grupos EX e BE+EX, a força mecânica desenvolvida pelo tipo de exercício físico, parece ser expressiva para a remodelação óssea. Contudo, apesar da aparente linearidade de resposta apresentada pela análise de imagem, os dados macroscópicos de dimensões ósseas, sugerem uma estimulação de crescimento provocada por estradiol na VL4. Enquanto, a associação estradiol - exercício causa a diminuição da altura da VL4. Os resultados confirmam dados da literatura que apontam para a eficiência da reposição hormonal estrogênica na conservação da massa óssea (FUJITA *et al.* 2001B, CAI *et al.* 2005, IMAI 2013, KYVERNITAKIS *et al.*, 2014). Estudos anteriores, realizados em ratos submetidos a exercício físico mostraram respostas distintas, de acordo com o gênero e perfil hormonal. Em machos jovens saudáveis, o exercício físico por curto prazo levou ao aumento do comprimento de fêmur, tíbia e úmero (KIUCHI *et al.*, 1998), já em machos castrados, o treinamento em esteira (por 15 semanas) manteve a estrutura inalterada (HORCAJADA *et al.*, 1997). Em fêmeas, exercícios por longo prazo induzem o aumento do fêmur, permitindo afirmar que a idade e o gênero dos animais, bem

como as características do exercício aplicado interferem no crescimento ósseo (IWAMOTO et al, 1999).

A integridade da estrutura óssea também pode ser correlacionada com as concentrações séricas de osteocalcina, que reflete a atividade de osteoblastos maduros e, é um marcador de formação óssea. Na menopausa, a perda da proteção estrogênica sobre o osso acelera o processo de remodelação óssea, também observada pelo aumento sérico de osteocalcina (HARA *et al*, 2007; LUVIZUTO *et al*. 2010), como visto no grupo OVX. Ambos os tratamentos, treinamento de força e estradiol, mantiveram as concentrações de osteocalcina sérica, garantindo a manutenção da integridade óssea, ou seja, a manutenção do equilíbrio entre os processos de formação e reabsorção óssea.

No estudo morfológico, as regiões constituídas por osso trabecular no femur, mostraram menor densidade, maiores espaços medulares e mais células adiposas na medula óssea, em ratas ovariectomizadas. A presença de células adiposas é uma característica do desvio da diferenciação das células da medula óssea, favorecendo a adipogênese. Como consequência, as futuras células de linhagem osteoblásticas são substituídas gradativamente, dando lugar a invasão adipocítica na medula (CAO, 2011; COHEN *et al*, 2012).

O estradiol regula a atividade de osteoblastos, osteócitos e células progenitoras, através de sua interação com ER α , determinando a formação de canais de Havers e lamelas, tornando o osso mais mineralizado. A avaliação da expressão de ER α no femur sugere que a deficiência estrogênica induz *down regulation* na região cortical da cabeça (CAO, 2011; HOU *et al*, 2006; ALMEIDA *et al*, 2013). Enquanto, a ação do treinamento de força promove a melhora da qualidade do osso, possivelmente por mecanismos independentes da ação estrogênica, considerando a força mecânica do exercício exercendo um efeito positivo sobre a microarquitetura óssea, mantendo o osso mais íntegro (NOMURA & YAMAMOTO, 2000; CHERIAN *et al*, 2003). Dessa forma, os benefícios do treinamento de força, sozinho ou associado ao estradiol foram evidenciados pela avaliação morfológica.

CONCLUSÃO

O tratamento hormonal diário induziu modificações positivas e negativas sobre os tecidos estudados. Agiu negativamente diminuindo a ingestão alimentar, aumentando a massa do útero, diminuição da área dos adipócitos e favoreceu o aparecimento de depósitos de extracelular no tecido adiposo. Entretanto, proporcionou aumento da densidade e conteúdo mineral ósseo e manutenção da massa corporal. O tratamento hormonal cíclico acarretou em modificações benéficas na manutenção da massa do útero e corporal, na matriz morfologia e área dos adipócitos, nas dosagens séricas. Sobre o osso induziu o aumento das dimensões ósseas e dos parâmetros físicos dos fêmures. Por esse motivo o tratamento cíclico foi escolhido por induzir modificações positivas sobre os tecidos avaliados.

O treinamento força promoveu, de forma benéfica, alterações em parâmetros relacionados à menopausa como, a expressão de PPAR γ no tecido adiposo subcutâneo e retroperitoneal; a massa dos tecidos adiposos retroperitoneal e mesentérico; a composição corporal; as concentrações séricas de hormônios, índices lipídicos, glicêmicos, proteínas e íons; a melhora na microarquitetura óssea e a expressão de ER α .

A associação entre tratamento hormonal cíclico e treinamento força foi eficaz na restauração dos parâmetros estudados em relação à adiposidade e a estrutura óssea.

O treinamento força pode ser considerado uma ferramenta de valor contra os efeitos deletérios induzidos pela deficiência estrogênica.

REFERÊNCIAS

Abeles ED, Cordeiro LM, Martins Ade S, Pesquero JL. Estrogen therapy attenuates adiposity markers in spontaneously hypertensive rats. *Metabolism*; n. 8, p.1100-7,2012.

Adami S, Bertoldo F, Brandi ML, Cepollaro C, Filippini P, Fiore E, Frediani B, Giannini S, Gonnelli S, Isaia GC, Luisetto G, Mannarino E, Marcocci C, Masi L, Mereu C, Migliaccio S, Minisola S, Nuti R, Rini G, Rossini M, Varenna M, Ventura L, Bianchi G. Società Italiana dell'Osteoporosi, del Metabolismo Minerale e delle Malattie dello Scheletro.. Linee guida per la diagnosi, prevenzione e terapia dell'osteoporosi. *Reumatismo*;; n.4, p.260-284, 2009.

Adlercreutz, H. Phytoestrogens: epidemiology and a possible role in cancer protection. *Environ. Health Perspect*; n.7, p. 103-112, 1995.

Adlercreutz, H. Lignans and human health. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci*; p. 483-525, 2007.

Almeida ML, Iyer S, Martin-Millan M, Bartell SM, Han L, Ambrogini E, Onal M, Xiong J, Weinstein RS, Jilka RL, O'Brien CA, Manolagas SC. Estrogen receptor- α signaling in osteoblast progenitors stimulates cortical bone accrual. *J Clin Invest*; n.1, p.394-404, 2013.

Alonso-Magdalena P, Ropero AB, Carrera MP, Cederroth CR, Baquié M. Pancreatic insulin content regulation by the estrogen receptor ER alpha. *PLoS One*; n. 4, p.2069, 2008.

Ames, M.S. Estrogen deficiency increases variability of tissue mineral density of alveolar bone surrounding teeth. *Archives of oral biology*; n.55, p.599-605, 2010.

Ami R. Amini, Cato T. Laurencin, Syam P. Nukavarapu. Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges. *Crit Rev Biomed Eng*; n.40, p.363–408, 2012.

Anishchenko AM, Vasil'eva NV, Plotnikova TM, Aliev OI. Effects of flaxseed extract on rheological properties of blood in experimental ovariectomy. *Eksp Klin Farmakol*; n.7, p. 19-21, 2011.

Araújo TG, Oliveira AG, Saad MJ. Insulin-Resistance-Associated Compensatory Mechanisms of Pancreatic Beta Cells: A Current Opinion. *Front Endocrinol*;n. 14, p. 4:146, 2013.

Armada L, Nogueira CR, Neves UL, dos Santos Souza P, Detogne JP, Armada-Dias L, Moreira RM, Nascimento-Saba CC. Mandible analysis in sex steroid-deficient rats. *Oral Dis*; n.2, p. 181-6, 2006.

Arner P. Regional differences in protein production by human adipose tissue. *Biochem Soc Trans*; n. 2, p. 72-5, 2001.

Balady GJ, Berra KA, Golding LA. Diretrizes do ACSM para os Testes de Esforço e sua Prescrição. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan SA; 2003.

Behari, J.; Behari, J. Changes in bone histology due to capacitive electric field stimulation of ovariectomized rat. *Indian. J. Med. Res.*, n.130, p.720-725, 2009.

Bianco & Lazaretti-castro. Fisiologia do metabolismo osteomineral. In: Aires MM. Guanabara Koogan. p.1137-1162, 2008

Bocalini DS, Serra AJ, Murad N, Levy R. F. Water- versus land-based exercise effects on physical fitness in older women. *Geriatr Gerontol Int*; n. 4, p. 265-271, 2008.

Bocalini D S, Rica R L, Triviño RN. Desempenho em testes de velocidade de nadadores treinados com parachute. *Integração*, ano XV; n. 57, p. 145-149, 2009

Boskey AL. Bone composition: relationship to bone fragility and antiosteoporotic drug effects. *Bonekey Rep.*; n. 2, p. 447, 2013.

Breitman PL, Fonseca D, Cheung AM, Ward WE. Isoflavones with supplemental calcium provide greater protection against the loss of bone mass and strength after ovariectomy compared to isoflavones alone. *Bone*; n. 33, p. 597-605, 2003.

Brochu M, Malita MF, Messier V, Doucet E, Strychar I, Lavoie JM, Prud'homme D, Rabasa-Lhoret R. Resistance training does not contribute to improving the metabolic profile after a 6-month weight loss program in overweight and obese postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*; n.9, p.3226-33, 2009.

Brown LM & Clegg DJ. Central effects of estradiol in the regulation of food intake, body weight, and adiposity. *J Steroid Biochem Mol Biol*; n.122, p.65-73, 2010.

Butcher LR, Thomas A, Backx K, Roberts A, Webb R, Morris K. Low-intensity exercise exerts beneficial effects on plasma lipids via PPARgamma. *Med Sci Sports Exerc*; n.7, p.1263-70, 2008.

Cai DJ, Zhao Y, Glasier J, Cullen D, Barnes S, Turner Ch, Wastney M, Weaver Cm. Comparative effect of soy protein, soy isoflavones, and 17beta-estradiol on bone metabolism in adult ovariectomized rats. *J Bone Miner Res*, n. 5, p. 828-39, 2005.

Castracane VD, Kraemer GR, Ogden BW, Kraemer RR.. Interrelationships of serum estradiol, estrone, and estrone sulfate, adiposity, biochemical bone markers, and leptin in postmenopausal women. *Maturitas*; n.2, p. 217-25, 2006

Callegari FVR, Leite Cm, Franci Jaa, Reis Rm, Ferriani Ra, Sá Mfs, Maranhão Tmo. Adiponectin: the link between obesity, insulin resistance and polycystic ovary syndrome? *Femina*; n.5, 288- 291, 2009.

Cao JJ. Effects of obesity on bone metabolism. *J Orthop Surg Res*; p.6- 30, 2011.

Carter PH, Schipani E. The roles of parathyroid hormone and calcitonin in bone remodeling: prospects for novel therapeutics. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*; n.1, p. 59-76, 2006.

Chappard D, Guggenbuhl P, Legrand E, Baslé MF, Audran M. Texture analysis of X-ray radiographs is correlated with bone histomorphometry. *J Bone Miner Metab*; n.23, p.24-9, 2005.

Chapados N, Collin P, Imbeault P, Corriveau P, Lavoie JM. Exercise training decreases in vitro stimulated lipolysis in a visceral (mesenteric) but not in the retroperitoneal fat depot of high-fat-fed rats. *Br. J. Nutr*; n. 3, p. 518-525, 2008

Charles JF, Nakamura MC. Bone and the Innate Immune System. *Curr Osteoporos Rep*. 2014 Feb 6. [Epub ahead of print]

Cherian PP, Cheng B, Gu S, Sprague E, Bonewald LF, Jiang JX. Effects of mechanical strain on the function of gap junctions in osteocytes are mediated through the prostaglandin EP2 receptor. *J Biol Chem*; n.278, p.43146-56, 2003.

Cheung AM, Adachi JD, Hanley DA, Kendler DL, Davison KS, Josse R, Brown JP, Ste-Marie LG, Kremer R, Erlandson MC, Dian L, Burghardt AJ, Boyd SK. High-resolution peripheral quantitative computed tomography for the assessment of bone strength and structure: a review by the Canadian Bone Strength Working Group. *Curr Osteoporos Rep*; n.2, p.136-46, 2013.

Chodzko-Zajko WJ, Proctor DN, Fiatarone Singh MA, Minson CT, Nigg CR, Salem GJ, Skinner JS. American College of Sports Medicine position stand. Exercise and physical activity for older adults. *Med Sci Sports Exerc*; n.7, p.1510-30, 2009.

Choi SB, Jang JS, Park S. Estrogen and Exercise May Enhance β -Cell Function and Mass via Insulin Receptor Substrate 2 Induction in Ovariectomized Diabetic Rats – *Endocrinology*; n.11, p.4786–4794, 2005.

Chow JW, Lean JM, Chambers TJ. 17 beta-estradiol stimulates cancellous bone formation in female rats. *Endocrinology*; n.5, p.3025-32, 1992.

Cinti S. The adipose organ: morphological perspectives of adipose tissues. *Proc Nutr Soc*; n.3, p. 319-28, 2001.

Cinti S. Adipocyte differentiation and transdifferentiation: plasticity of the adipose organ. *J Endocrinol Invest*; n.10, p.823-35, 2002.

Cinti S. Adipocyte differentiation and transdifferentiation: plasticity of the adipose organ. *J Endocrinol Invest*; n.10, p.823-35, 2004.

Cinti S. The adipose organ. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*; n.1, p.9-15, 2005.

Cohen A, Dempster DW, Stein EM, Nickolas TL, Zhou H, McMahon DJ, Müller R, Kohler T, Zwahlen A, Lappe JM, Young P, Recker RR, Shane E. Increased marrow adiposity in premenopausal women with idiopathic osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab*; n.8, p. 2782-91, 2012.

Cooke PS, Naaz A. Role of estrogens in adipocyte development and function. *Exp Biol Med*; n.11, p. 1127-35. 2004.

Colau JC, Vincent S, Marijnen P, Allaert FA. Efficacy of a non-hormonal treatment, BRN-01, on menopausal hot flashes: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Drugs R D*; n.3, p.107-19, 2012.

Compston, J. Bone Quality: What is it and How is it Measured? *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*; n.4, p.579-585, 2006.

Cooper R, Mishra G, Clennell S, Guralnik J, Kuh D. Menopausal status and physical performance in midlife: findings from a British birth cohort study. *Menopause*; n. 6, p. 1079-85, 2008.

Corriveau P, Paquette A, Brochu M, Prud'homme D, Rabasa-Lhoret R, Lavoie JM.. Resistance training prevents liver fat accumulation in ovariectomized rats. *Maturitas*; n.3, p. 259-267, 2008.

Côté I, Yasari S, Pighon A, Barsalani R, Rabasa-Lhoret R. Liver fat accumulation may be dissociated from adiposity gain in ovariectomized rats. *Climacteric*; n.15, p.594-601, 2012.

Craig BW, Hammons GT, Garthwaite SM, Jarett L, Holloszy JO. Adaptation of fat cells to exercise: response of glucose uptake and oxidation to insulin. *J Appl Physiol*; n.51, p.1500-1506, 1981.

Cui Z, Truesdale KP, Cai J, Stevens J. Evaluation of Anthropometric Equations to Assess Body Fat in Adults: NHANES 1999-2004. *Med Sci Sports Exerc*, 2014.

Cummings SR, Bates D, Black DM. Clinical use of bone densitometry: scientific review. *JAMA*, n.15; p.1889-97, 2002.

Czajka-Oraniec I, Simpson ER. Aromatase research and its clinical significance. *Endokrynol Pol*; n.1), p.126-34, 2010.

Datta NS. Osteoporotic fracture and parathyroid hormone. *World J Orthop*; n.8, p.:67-74, 2011.

Davison KS1, Siminoski K, Adachi JD, Hanley DA, Goltzman D, Hodsmann AB, Josse R, Kaiser S, Olszynski WP, Papaioannou A, Ste-Marie LG, Kendler DL, Tenenhouse A, Brown JP. Bone strength: the whole is greater than the sum of its parts. *Semin Arthritis Rheum.*; n. 1, p.22-31, 2006.

Deng WH, Lu X, Wu YY, Li YC, Yang L. The effect of estrogen benzoate on normal human breast tissue implanted into athymic nude mice. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*; n. 25; p. 70-3, 2003.

D'Eon TM, Souza SC, Aronovitz M, Obin MS. Estrogen regulation of adiposity and fuel partitioning. Evidence of genomic and non-genomic regulation of lipogenic and oxidative pathways. *J Biol Chem*; n.43, p.35983-91, 2005.

De Matos O, Lopes da Silva DJ, Martinez de Oliveira J, Castelo-Branco C. Effect of specific exercise training on bone mineral density in women with postmenopausal osteopenia or osteoporosis. *Gynecol Endocrinol*; n.9, p. 616-20, 2009.

Dobs AS, Nguyen T, Pace C, Roberts CP. Differential effects of oral estrogen versus oral estrogen-androgen replacement therapy on body composition in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.*; n.87, p.1509-16, 2002.

DENSSO. Boletim Informativo DENSSO - Centro de Diagnóstico e Pesquisa da Osteoporose. DENSSO News, ano XIII, n.34, abr/mai/jun., 2006

Eckel LA. The ovarian hormone estradiol plays a crucial role in the control of food intake in females. *Physiol Behav*; n. 4, p.517-24, 2011.

Elavsky S, McAuley E. Personality, Menopausal Symptoms, and Physical Activity Outcomes in Middle-Aged Women. *Pers Individ Dif*; n.2, p.123-128, 2009.

Faloni, A.P.S.; Cerri, P.S. Mecanismos celulares e moleculares do estrógeno na reabsorção óssea. *Revista de Odontologia da UNESP*; n.2, p.181-88, 2007.

Farr JN, Khosla S, Miyabara Y, Miller VM, Kearns AE. Effects of estrogen with micronized progesterone on cortical and trabecular bone mass and microstructure in recently postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*; n.98, p.249-57, 2013.

Fernandes CE, Pereira Filho AS. Climatério: Manual de Orientação Federação Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetrícia. Febrasco; p. 372, 2004.

Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MI, Lima FB.. O Tecido Adiposo Como Centro Regulador do Metabolismo. *Arq Bras Endocrinol Metab*; n.50, p.16-229, 2006.

Fonseca H, Moreira-Gonçalves D, Vaz M, Fernandes MH, Ferreira R, Amado F, Mota MP, Duarte JA. Changes in proximal femur bone properties following ovariectomy and their association with resistance to fracture. *J Bone Miner Metab*; n.3, p. 281-92, 2012.

Fontes TMP, Araújo LFB, Soares PRG. Osteoporose no climatério I: epidemiologia, definição, rastreamento e diagnóstico. *FEMINA*; nº 2, 2012.

Francisco, J.I.; Yu, Y.; Oliver, R.A.; Walsh, W.R. Relationship between Age, Skeletal Site, and Time Post-Ovariectomy on Bone Mineral and Trabecular Microarchitecture in Rats. *Journal of orthopaedic research*; n. 2, p. 189-96, 2011.

Friedman, J.M.; Hallas, J. L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, n. 395, p. 763-770, 1998.

Fujita T, Kawata T, Tokimasa C, Tanne K. Influence of oestrogen and androgen on modelling of the mandibular condylar bone in ovariectomized and orchietomized growing mice. *Arch Oral Biol*; n.1, p. 57-65, 2001.

Gambaccian M. Selective estrogen modulators in menopause. *Minerva Ginecol*; n.6, p. 621-30, 2013.

Geary N. Estradiol, CCK and satiation. *Peptides*, n.8, p.1251-63, 2001.

Genuth SM. As glândulas reprodutoras. In: Berne & Levy, *Fisiologia* 5ª ed, Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

Giavaresi G, Fini M, Gnudi S, De Terlizzi F, Carpi A, Giardino R. The femoral distal epiphysis of ovariectomized rats as a site for studies on osteoporosis: structural and mechanical evaluations. *Clin Exp Rheumatol*; n.2, p.171-8, 2002.

- Gibson CJ, Thurston RC, El Khoudary SR, Sutton-Tyrrell K. Body mass index following natural menopause and hysterectomy with and without bilateral oophorectomy. *Int J Obes*; n.6, p.:809-13, 2013.
- Giordano A, Murano I, Mondini E, Perugini J, Smorlesi A, Severi I, Barazzoni R, Scherer PE, Cinti S. Obese adipocytes show ultrastructural features of stressed cells and die of pyroptosis. *J Lipid Res*, n.9, p.2423-36, 2013.
- Ghosh S, Ashcraft K, Jahid MJ, April C, Ghajar CM, Ruan J, Wang H, Foster M, Hughes DC, Ramirez AG, Huang T, Fan JB, Hu Y, Li R. Regulation of adipose oestrogen output by mechanical stress. *Nat Commun.*; n.4, p.:1821, 2013.
- Gloy V, Langhans W, Hillebrand JJ, Geary N. Ovariectomy and overeating palatable, energy-dense food increase subcutaneous adipose tissue more than intra-abdominal adipose tissue in rats. *Biol Sex Differ*; n.11, p.2:6, 2011.
- Gollisch KS, Brandauer J, Jessen N, Toyoda T, Nayer A, Hirshman MF, Goodyear LJ. Effects of exercise training on subcutaneous and visceral adipose tissue in normal- and high-fat diet-fed rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*; n.2, p. 495-504, 2009.
- Gourlay ML, Hammett-Stabler CA, Renner JB, Rubin JE. Associations between Body Composition, Hormonal and Lifestyle Factors, Bone Turnover, and BMD. *J Bone Metab*, n.1, p.61-8, 2014.
- Govindarajan P, Schlewitz G, Schliepke N, Weisweiler D, Alt V, Thormann U, Lips KS, Wenisch S, Langheinrich AC, Zahner D, Hemdan NY, Böcker W, Schnettler R, Heiss C. Implications of combined ovariectomy/multi-deficiency diet on rat bone with age-related variation in bone parameters and bone loss at multiple skeletal sites by DEXA. *Med Sci Monit Basic Res*; n.19, p.76-86, 2013.
- Grampp, S. e cols. Quantitative CT Assessment of the Lumbar Spine and Radius in Patients with Osteoporosis. *AJR Am. J. Roentgenol*; n.1, p.133-140, 1996
- Griz, L. Estrógeno e SERMs na prevenção e tratamento da osteoporose. In: Bandeira F, ed. *Osteoporose*. Rio de Janeiro: Medsi.; 337-350, 2000.
- Guadalupe-Grau A, Fuentes T, Guerra B, Calbet JA. Exercise and bone mass in adults. *Sports Med*; n.6, p.439-68, 2009.
- Gulve EA. Exercise and Glycemic Control in Diabetes: Benefits, Challenges, and Adjustments to Pharmacotherapy. *Phys Ther*; n.11, p.1297-321, 2008.
- Harris DM, Besselink E, Henning SM, Go VL, Heber D. Phytoestrogens induce differential estrogen receptor alpha- or Beta-mediated responses in transfected breast cancer cells. *Exp Biol Med*; n.8, p. 558-68, 2005.
- Halbe HW, Fonseca AM. Síndrome do Climatério in *Tratado de ginecologia*. 3ª edição. São Paulo: Roca; p. 1519-1600, 1999.
- Hara K, Kobayashi M, Akiyama Y. Influence of bone osteocalcin levels on bone loss induced by ovariectomy in rats. *J Bone Miner Metab*; n.6, p.345-53, 2007.

- Harris DM, Besselink E, Henning SM, Go VL, Heber D. Phytoestrogens induce differential estrogen receptor alpha- or beta-mediated responses in transfected breast cancer cells. *Experimental Biology and Medicine*, v. 230, p. 558-568, 2005.
- Heine PA, Taylor A, Iwamoto GA, Lubahn DB, Cooke PS. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor α knockout mice. *PNAS*; n.97, p. 12729-12734.
- Hlaing TT, Compston JE. Biochemical markers of bone turnover - uses and limitations. *Ann Clin Biochem.*; n.51, p.189-202, 2014.
- Hofbauer, L.C. & Khosla, S. Androgen effects on bone metabolism: recent progress and controversies. *European Journal of Endocrinology*, n.140, p.271-286, 1999.
- Horcajada M, Coxam V, Davicco M, Gaumet N, Pastoureau P. Influence of treadmill running on femoral bone in young orchidectomized rats. *J Appl Physiol*, n.1, p. 129-33, 1997.
- Hornberger, TA, Farrar RP. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. *Can J Appl Physiol*; n.1, p. 16-31, 2004.
- Hou NN, Zhu YM, Huang HF..The expression of estrogen receptor alpha and beta in the intervention of different estrogens in rat bone metabolism. *Fen Zi Xi Bao Sheng Wu Xue Bao*; n.4, p.289-96, 2006.
- Hsu Y, Venners SA, Terwedow HA, Feng Y, Niu T, Li Z, Laird N, Brain JD, Cummings SR, Bouxsein ML, Rosen CJ, Xu X: Relation of body composition, fat mass, and serum lipids to osteoporotic fractures and bone mineral density in Chinese men and women. *Am J Clin Nutr*; n.83, p.146 –54, 2006.
- Huang RL, Yuan Y, Tu J, Zou GM, Li Q. Opposing TNF- α /IL-1 β - and BMP-2-activated MAPK signaling pathways converge on Runx2 to regulate BMP-2-induced osteoblastic differentiation. *Cell Death Dis*; n.17, p.5-1187, 2014.
- Hunter GR, Weinsier RL, Bamman MM, Larson DE. A role for high intensity exercise on energy balance and weight control. *Int J Obes Relat Metab Disord*; n.6, p.489-93, 1998.
- Imai Y. Regulation of bone metabolisms by estrogen/estrogen receptors signaling. *Clin Calcium*; n.11, p.1621-6, 2013.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [Internet]. Dados do Censo 2010. Rio de Janeiro: IBGE; 2010. Disponível em: <http://www.censo2010.ibge.gov.br>.
- Iwamoto J, Takeda T, Ichimura S. Differential effect of short-term etidronate treatment on three cancellous bone sites in orchidectomized adult rats. *Keio J. Med.*, n.1, p. 12-17, 2004.
- Iwamoto J, Yeh JK, Aloia JF. Differential effect of treadmill exercise on three cancellous bone sites in the young growing rats. *Bone*; n.3, p. 163-9, 1999.
- Iwaniec UT, Dube MG, Boghossian S, Song H, Helferich WG, Turner RT, Kalra SP. Body mass influences cortical bone mass independent of leptin signaling. *Bone*; n.3, p. 404-12, 2009.

Jerilynn C. Prior. Perimenopause: The complex endocrinology of the menopausal transition. *Endocrine Reviews*; n.4, p. 397–428, 1998.

Jiyoung P, David M, Philipp ES. Paracrine and Endocrine Effects of Adipose Tissue on Cancer Development and Progression. *Endocr Rev*; n.32, p. 550–570, 2011.

Junior S, Dale I, Guerreiro C, Santos RS, Jesus SM, Chada EB. Múltiplos mecanismos do estrogênio na membrana, citosol e no núcleo. *Femina*; n.5, p 31, 2003.

Kang JS, Wanibuchi H, Morimura K, Puatanachokchai R, Salim EI, Hagihara A, Seki S, Fukushima S. Enhancement by estradiol 3-benzoate in thioacetamide-induced liver cirrhosis of rats. *Toxicol Sci*; n.1, p. 720-6, 2005.

Khajuria DK, Razdan R, Mahapatra DR. Description of a new method of ovariectomy in female rats. *Rev Bras Reumatol*; n. 3, p. 462-70, 2012.

Kassem M, Marie PJ. Senescence-associated intrinsic mechanisms of osteoblast dysfunctions. *Aging Cell*.; n.2; p.191-7, 2011.

Kang JS, Wanibuchi H, Morimura K, Puatanachokchai R, Salim EI, Hagihara A, Seki S, Fukushima S. Enhancement by estradiol 3-benzoate in thioacetamide-induced liver cirrhosis of rats. *Toxicol Sci*; n.1, p.720-6, 2005

Kemmler W, Lauber D, Weineck J, Hensen J, Kalender W, Engelke K. Benefits of 2 years of intense exercise on bone density, physical fitness, and blood lipids in early postmenopausal osteopenic women: results of the Erlangen Fitness Osteoporosis Prevention Study (EFOPS). *Arch Intern Med*; n.164,p.1084 – 1091, 2004.

Kersten S. Effects of fatty acids on gene expression: role of peroxisome proliferator-activated receptor alpha, liver X receptor alpha and sterol regulatory element-binding protein-1c. *Proc Nutr Soc*; n.3, p.371-4, 2002.

Kiuchi A, Arai Y, Katsuta S. Detraining effects on bone mass in young male rats. *Int J Sports Med*; n.4, p.245-9, 1998.

Khosla S, Riggs BL. Pathophysiology of age-related bone loss and osteoporosis. *Endocrinol Metab Clin North Am*; n.4, p.1015-30, 2005.

Koukel S, Jimenez D. Osteoporosis. Las Cruces, NM; p.4, 2013.

Kostenuik PJ, Halloran BP, Morey-Holton ER, Bikle DD. Skeletal unloading inhibits the in vitro proliferation and differentiation of rat osteoprogenitor cells. *Am J Physiol*; n., p.1133-9, 1997.

Kraemer WJ, Adams K, Cafarelli E, Dudley GA, Dooly C, Feigenbaum MS, Fleck SJ, Franklin B, Fry AC, Hoffman JR, Newton RU, Potteiger J, Stone MH, Ratamess NA, Triplett-McBride T; American College of Sports Medicine position stand. Progression models in resistance training for healthy adults. *Med Sci Sports Exerc*; n.2, p.364-80, 2002.

Kyvernitakis I, Knöll D, Struck M, Hars O. Impact of BMI on serum estradiol and bone turnover markers in postmenopausal women with hormone-sensitive early breast cancer treated with anastrozole. *J Cancer Res Clin Oncol*; n.1, p.159-66, 2014.

Latour MG, Shinoda M, Lavoie JM. Metabolic effects of physical training in ovariectomized and hyperestrogenic rats. *Appl Physiol*; n.1, p.235-41, 2001.

Lavoie JM, Gauthier MS. Regulation of fat metabolism in the liver: link to non-alcoholic hepatic steatosis and impact of physical exercise. *Cell. Mol. Life Sci*; n.12, p.1393-1409, 2006.

Leite RD, Prestes J, Bernardes CF, Shiguemoto GE, Pereira GB, Duarte JO, Domingos MM, Baldissera V, de Andrade Perez SE. Effects of ovariectomy and resistance training on lipid content in skeletal muscle, liver, and heart; fat depots; and lipid profile. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.*; n. 6, p. 1079-86, 2009.

Leite RD, Prestes J, Pereira GB, Shiguemoto GE, Perez SE. Menopause: highlighting the effects of resistance training. *Int J Sports Med*; n.11, p.761-7, 2010.

Lerouxel, E., Libouban, H., Moreau M.F., Baslé, M.F., Audran, M. & Chappard, D. Mandibular bone in an animal model of male osteoporosis (orchidectomized rat): a radiographic and desitometric study. *Osteoporos Int*; n.15, p. 814-819, 2004.

Lim SK, Won YJ, Lee HC, Huh KB, Park YS. A PCR analysis of ERalpha and ERbeta mRNA abundance in rats and the effect of ovariectomy. *J Bone Miner Res*; n.7, p.1189-96, 1999.

Lim LS, Hoeksema LJ, Sherin K; ACPM Prevention Practice Committee. Screening for osteoporosis in the adult U.S. population: ACPM position statement on preventive practice. *Am J Prev Med.*; n.4, p.366-75, 2009.

Link TM, Majumdar S, Grampp S, Guglielmi G, van Kuijk C, Imhof H, Glueer C, Adams JE. Imaging of trabecular bone structure in osteoporosis. *Eur Radiol*; n.9, p.1781-8, 1999.

Liu XL, Li CL, Lu WW, Cai WX, Zheng LW. Skeletal site-specific response to ovariectomy in a rat model: change in bone density and microarchitecture. *Clin Oral Implants Res*. 2014 Mar 5. doi: 10.1111/clr.12360. [Epub ahead of print]

Lizcano F, Guzmán G. Estrogen Deficiency and the Origin of Obesity during Menopause. *Biomed Res Int*. 2014.

Lormeau C, Soudan B, d'Herbomez M, Pigny P, Duquesnoy B, Cortet B. Sex hormone-binding globulin, estradiol, and bone turnover markers in male osteoporosis. *Bone*; n.6, p.:933-9, 2004.

Lupo M, Brance ML, Fina BL, Brun LR, Rigalli A. Methodology developed for the simultaneous measurement of bone formation and bone resorption in rats based on the pharmacokinetics of fluoride. *J Bone Miner Metab*. 2014 Jan 21. [Epub ahead of print]

Luvizuto ER, Dias SM, Queiroz TP, Okamoto T, Garcia IR Jr, Okamoto R, Dornelles RC. Osteocalcin immunolabeling during the alveolar healing process in ovariectomized rats treated with estrogen or raloxifene. *Bone*; n.4, p.1021-9, 2010.

Mariman EC, Wang P. Adipocyte extracellular matrix composition, dynamics and role in obesity. *Cell Mol Life Sci*; n.8, p. 1277-92, 2010.

Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev*; n.2, p.115-37, 2000.

Matthew LG. Blood Glucose Regulation during Prolonged, Submaximal, Continuous Exercise: A Guide for Clinicians. *J Diabetes Sci Technol*; n.3, p. 694–705, 2010.

Martin RM, Correal PHS. Bone quality and osteoporosis therapy. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*; n.2, p.186-199, 2010.

Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*; n.7, p.412-9, 1985.

Maturana MA, Irigoyen MC, Spritzer PM. Menopause, estrogens, and endothelial dysfunction: current concepts. *Clinics*; n.1, p.:77-86, 2007.

Medina R, Aranda E, Verdugo C, Kato S, Owen IG. The action of ovarian hormones in cardiovascular disease. *Biol Res*, n.36, p. 325-341, 2003.

Messali, E.M.; Scaffa, C. Long-term safety and efficacy of raloxifene in the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis: an update. *International Journal of Women's Health.*; n.1, p.11–20, 2009.

Ministério da Saúde. Secretaria de atenção a saúde. Manual de atenção à mulher no Climatério/Menopausa. Brasília: Editora Ministério da Saúde; p.192, 2008.

Mirkin S, Pickar JH. Management of osteoporosis and menopausal symptoms: focus on bazedoxifene/conjugated estrogen combination. *Int J Womens Health*; n.5, p.465-75, 2013.

Motta, V. Metabolismo mineral e ósseo. *Bioquímica Clínica: Princípios e Interpretações*, n. 11, p.142-166, 2009.

Montecinos, B.R.; Zeni, S.N. Marcadores bioquímicos del remodelamiento ósseo. Utilidad clínica. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.*, n.2, p.177-93, 2009.

Muller ME, Webber CE, Adachi JD. Hormone replacement therapy improves distal radius bone structure by endocortical mineral deposition. *Can J Physiol Pharmacol*; n.10, p.952-8, 2003.

Nadal A, Alonso-Magdalena P, Soriano S, Ripoll C. Role of estrogen receptors alpha, beta and GPER1/GPR30 in pancreatic beta-cells. *Front Biosci*; n.16, p.251-60, 2011.

Nahas EA, Omodei MS, Cangussu LM, Nahas-Neto J. Evaluation of risk factors of falls in early postmenopausal Women. *Rev Bras Ginecol Obstet*; n.11, p.490-6, 2013.

NAMS. Management of osteoporosis in postmenopausal women: 2010 position statement of The North American Menopause Society. *Menopause: The Journal of The North American Menopause Society.*; n.1, p.25-54, 2010.

Nicholas A. AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE. Position Stand: Progression models in resistance training for healthy adults. *Med. Sci. Sports Exerc*; n.2,p. 364-380, 2002.

Nomura S, Yamamoto TT. Molecular event caused by mechanical stress in bone. *Matrix Biol*; n.9, 91-6, 2000.

North American Menopause Society. The 2012 hormone therapy position statement of: The North American Menopause Society. *Menopause*; n.3, p. 257-71, 2012.

Nyman JS & Makowski AJ. The contribution of the extracellular matrix to the fracture resistance of bone. *Curr Osteoporos Rep.*; n.2, p.169-77, 2012.

Ocarino, JM. Correlação entre um questionário de desempenho funcional e testes de capacidade física em pacientes com lombalgia. *Revista Brasileira de Fisioterapia, São Carlos*; n.4, 2009.

Ohta H, Itoh N. Roles of FGFs as Adipokines in Adipose Tissue Development, Remodeling, and Metabolism. *Front Endocrinol (Lausanne)*; n. 5, p.18, 2014.

Orwoll, E.S. & Klein, R.E. Osteoporosis in men. *Endocrine Reviews*, n.16, p.87-116, 1995.

Paquette A, Shinoda M, Rabasa Lhoret R, Prud'homme D, Lavoie JM. Time course of liver lipid infiltration in ovariectomized rats: impact of a high-fat diet. *Maturitas*; n. 2, p. 182-90, 2007.

Paschalis EP, Boskey AL, Kassem M, Eriksen EF. Effect of hormone replacement therapy on bone quality in early postmenopausal women. *J Bone Miner Res*, n.6, p.:955-9, 2003.

Pedersen SB, Kristensen K, Hermann PA, Katzenellenbogen JA, Richelsen B. Estrogen controls lipolysis by up-regulating alpha2A-adrenergic receptors directly in human adipose tissue through the estrogen receptor alpha. Implications for the female fat distribution. *J Clin Endocrinol Metab*; n.4, p.1869-78, 2004.

Pereira, F.B. Análise da correlação da força muscular com densidade mineral óssea em homens com idade igual ou superior a 60 anos, residentes em São Sebastião- DF. 2009. 126f. Tese (Mestrado) – Universidade de Brasília, Brasília, 2009,

Pighon A, Barsalani R, Yasari S, Prud'homme D, Lavoie JM. Does exercise training prior to ovariectomy protect against liver and adipocyte fat accumulation in rats? *Climacteric*; n.3, p. 238-48, 2010.

Pinheiro MM, Ciconelli RM, Martini LA, Ferraz MB. Clinical risk factors for osteoporotic fractures in Brazilian women and men: the Brazilian Osteoporosis Study (BRAZOS). *Osteoporos Int*, n.3, p. 399-408, 2009.

Poehlman ET, Melby C. Resistance training and energy balance. *Int J Sport Nutr.*; n.2, p.143-59, 1998.

Poole KE, Reeve J. Parathyroid hormone - a bone anabolic and catabolic agent. *Curr Opin Pharmacol*; n.6, p. 612-7, 2005.

Prestes J, de Cássia Marqueti R, Shiguemoto GE, Leite RD, Pereira GB, Selistre-de-Araújo HS, Baldissera V, de Andrade Perez SE. Effects of ovariectomy and resistance training on MMP-2 activity in skeletal muscle. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.*; n. 4, p. 700-6, 2009.

- Prestes J, Shiguemoto G, Botero JP, Frollini A, Dias R, Leite R, Pereira G, Magosso R, Baldissera V, Cavaglieri C, Perez S. Effects of resistance training on resistin, leptin, cytokines, and muscle force in elderly post-menopausal women. *J Sports Sci*; n.14, p:1607-15, 2009.
- Proença AR, Sertié RA, Oliveira AC, Campaña AB, Caminhotto RO, Chimin P, Lima FB. New concepts in white adipose tissue physiology. *Braz J Med Biol Res.*, 2014.
- Puigserver P, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev*; n. 1, p. 78-90, 2003.
- Qi Z, Zhai X, Ding S. How to explain exercise-induced phenotype from molecular data: rethink and reconstruction based on AMPK and mTOR signaling. *Springerplus*; n.2, p. 2-693, 2013.
- Rabenda, V.; Bruyere, O.; Reginster, J.Y. Relationship between bone mineral density changes and risk of fractures among patients receiving calcium with or without vitamin D supplementation: a meta-regression. *Osteoporos.*; n.3, p.893-901, 2011.
- Ramalho, A.C.R, Lazaretti-Castro, M., Cohen-Solal, M.E. & Vernejoul, M.C. Por que estrógeno e raloxifeno melhoram a densidade mineral óssea ? Mecanismo de ação do estrógeno e de um modulador seletivo do receptor de estrógeno (SERM) no osso. *Arq Bras Endocrinol Metab*; n.6, p.471-482, 2000.
- Ramirez I. Estradiol-induced changes in lipoprotein lipase, eating, and body weight in rats. *Am J Physiol*; n.5, p. E533-8, 1981.
- Reed SD, Sutton EL. Menopause. *ACP Medicine*; p.1-19. 2011.
- Reed SD, Guthrie KA, Newton KM, Anderson GL, Booth-LaForce C, Caan B, Carpenter JS. Menopausal quality of life: RCT of yoga, exercise, and omega-3 supplements. *Am J Obstet Gynecol*; n.3, p.244.e1-244.e11, 2014.
- Reijnders CM, van Essen HW, van Rens BT, van Beek JH, Ylstra B, Blankenstein MA, Lips P, Bravenboer N. Increased expression of matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) in cortical bone of the rat tibia after mechanical loading: identification by oligonucleotide microarray. *PLoSOne.*; n.11, p.79672, 2013.
- Riggs BL, Khosla S, Melton LJ. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev*; n. 3, p. 279-302, 2002.
- Ruschke K, Fishbein L, Dietrich A, Klötting N, Tönjes A, Oberbach A, Fasshauer M, Jenkner J, Schön MR, Stumvoll M, Blüher M, Mantzoros CS. Gene expression of PPAR-gama and PGC-1alfa in human omental and subcutaneous adipose tissues is related to insulin resistance markers and mediates beneficial effects of physical training. *Eur J Endocrinol*; n.162, , p. 515-523, 2010.
- Sacco SM, Jiang JM, Reza-Lopez S, Ma DW, Thompson LU, Ward WE. Flaxseed does not antagonize the effect of ultra-low-dose estrogen therapy on bone mineral density and biomechanical bone strength in ovariectomized rats. *J Toxicol Environ Health*; n.20, p. 1209-16, 2009.

Saggese G, Baroncelli GI, Bertelloni S. Puberty and bone development. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*; n.1, p.53-64, 2002.

Santana AC, Soares da Costa CA, Armada L, de Paula Lopes Gonzalez G, dos Santos Ribeiro M, de Sousa dos Santos A, de Carvalho JJ, do Nascimento Saba CC. Fat tissue morphology of long-term sex steroid deficiency and estrogen treatment in female rats. *Fertil Steril*; n.4, p.1478-81, 2011.

Santollo J, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA, Eckel LA. Activation of ER α is necessary for estradiol's anorexigenic effect in female rats. *Horm Behav*, n.5, p. 872-7, 2010.

Schneider JG, Tompkins C, Blumenthal RS, Mora S..The metabolic syndrome in women. *Cardiol. Ver*; n. 6, p. 286-91, 2006.

Sigal RJ, Kenny GP, Wasserman DH, Castaneda-Sceppa C. Physical activity/exercise and type 2 diabetes. *Diabetes Care*; n.10, p. 2518-39, 2004.

Shimomura, K. et al. Is leptin a key factor which develops obesity by ovariectomy? *Endocr.J.* n.4, p.417-423, 2002.

Souza SB, Flues K, Paulini J, Mostarda C, Rodrigues B, Souza LE, Irigoyen MC, De Angelis K. Role of exercise training in cardiovascular autonomic dysfunction and mortality in diabetic ovariectomized rats. *Hypertension*; n.4, p.786-91, 2007.

Subramanian A, Salhab M, Mokbel K. Oestrogen producing enzymes and mammary carcinogenesis: a review. *Breast Cancer Res Treat*; n.2, p.191-202, 2008.

Stevenson JC. Hormone replacement therapy and cardiovascular disease revisited. *Menopause Int*; n. 2, p. 55-7, 2009.

Spritzer PM, Reis FM, Franci CR, Anselmo JA. *Fisiologia*. Guanabara Koogan. 3^o edição; p.1051- 1069, 2008.

Stubbins RE1, Najjar K, Holcomb VB, Hong J. Oestrogen alters adipocyte biology and protects female mice from adipocyte inflammation and insulin resistance. *Diabetes Obes Metab*; n.1, p.58-66, 2012.

Svensson J, Movérare-Skrtic S, Windahl S, Swanson C, Sjögren K. Stimulation of both estrogen and androgen receptors maintains skeletal muscle mass in gonadectomized male mice but mainly via different pathways. *J Mol Endocrinol*; n.45, p. 45-57, 2010.

Sydney, L. et al. Management of osteoporosis in postmenopausal women: 2010 position statement of The North American Menopause Society. *Menopause: The Journal of The North American Menopause Society.*; n.1, p.25-54, 2010.

Sylvia Christakos, Martin Hewison, David G Gardner, Carol L Wagner, Igor N Sergeev, Erica Rutten, Anastassios G Pittas, Ricardo Boland, Luigi Ferrucci, and Daniel D Bikle. Vitamin D: beyond bone. *Ann N Y Acad Sci*; n.1,p. 45–58, 2013

Taivora OS, De Lorenzi DRS. The influence of exercise in the quality of life of postmenopausal women: a case-control study. *Rev. bras. geriatr. Gerontol*; n.1, 2011.

Tanner SB. Dual-energy X-ray absorptiometry in clinical practice: new guidelines and concerns. *Curr Opin Rheumatol*; n.4, p.385-8, 2011.

Tchernof A, Desmeules A, Richard C, Laberge P, Daris M, Mailloux J, Rheaume C, Dupont P. Ovarian hormone status and abdominal visceral adipose tissue metabolism. *J Clin Endocrinol Metab*; n.89, p. 3425-3430, 2004.

Tenório AS, Alves BZ, Bezerra AL. Efeito do treinamento físico sobre o tecido ósseo e a concentração sérica de cálcio em camundongos fêmeas ovariectomizadas. *Acta Cirúrgica Brasileira*; n.4, p.280-283, 2005.

Tezval M, Biblis M, Sehmisch S, Schmelz U, Kolios L, Rack T, Stuermer KM, Stuermer EK. Improvement of Femoral Bone Quality After Low-Magnitude, High-Frequency Mechanical Stimulation in the Ovariectomized Rat as an Osteopenia Model. *Calcif. Tissue Int.*; n. 1, p. :33-40, 2011.

Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*; n.10, p. 772-83, 2006.

Toth MJ, Tchernof A, Sites CK, Poehlman ET. Effect of menopausal status on body composition and abdominal fat distribution. *Int J Obes Relat Metab Disord*; n.2, p.226-31, 2000.

Vanderschueren, D. & Bouillon, R. Androgens and bone. *Calcified Tissue International*; n.56, p. 341-346, 1995.

Van Pelt RE, Jankowski CM, Gozansky WS, Schwartz RS, Kohrt WM. Lower-body adiposity and metabolic protection in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*; n.8, p. 4573-8, 2005.

Van Pelt RE, Gozansky WS, Wolfe P, Kittelson JM, Jankowski CM. Estrogen or raloxifene during postmenopausal weight loss: Adiposity and cardiometabolic outcomes. *Obesity (Silver Spring)*. 2013. [Epub ahead of print]

Vashishth D. The role of the collagen matrix in skeletal fragility. *Curr Osteoporos Rep.*; n.2, p.62-6, 2007.

Vogel H, Mirhashemi F, Liehl B, Taugner F, Kluth O. Estrogen deficiency aggravates insulin resistance and induces β -cell loss and diabetes in female New Zealand obese mice. *Horm Metab Res*; n. 45, p. 430-5, 2013.

Votruba SB, Jensen MD. Sex differences in abdominal, gluteal, and thigh LPL activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*; n.6, p.1823-8, 2007.

Wada T, Tsuneki H, Sasaoka T. New insights into metabolic regulation via bifurcated function of estrogen receptor α . *Diabetes*; n.12, p.3996-8, 2013.

Wajchenberg BL, Nery M, Cunha MR, Silva ME. Adipose tissue at the crossroads in the development of the metabolic syndrome, inflammation and atherosclerosis. *Arq Bras Endocrinol Metabol*; n.2, p.145-50, 2009.

Wake DJ, Strand M, Rask E, Westerbacka J, Livingstone DE, Soderberg S, Andrew R, Yki-Jarvinen H, Olsson T, Walker BR.. Intra-adipose sex steroid metabolism and body fat distribution in idiopathic human obesity. *Clin Endocrinol*; n.66, p. 440-446, 2007.

Wannmacher L, Lubianca JN. Terapia de reposição hormonal na menopausa: evidências atuais. *Organização Pan-Americana da Saúde*; n.6,p.1-6, 2004.

Ward-Ritacco CL, Adrian AL, Johnson MA, Rogers LQ. Adiposity, physical activity, and muscle quality are independently related to physical function performance in middle-aged postmenopausal women. *Menopause*; 2014. [Epub ahead of print]

Weigt C, Hertrampf T, Kluxen FM, Flenker U, Hülsemann F. Molecular effects of ER alpha and beta-selective agonists on regulation of energy homeostasis in obese female Wistar rats. *Mol Cell Endocrinol*; n.377, p. 1-2, 2013.

Wend K, Wend P, Krum SA. Tissue-Specific Effects of Loss of Estrogen during Menopause and Aging. *Front Endocrinol*; n. 8, p.3:19, 2012.

Westerterp KR. Physical activity, food intake, and body weight regulation: insights from doubly labeled water studies. *Nutr Rev*; n.3, p.148-54, 2010.

Winett RA & Carpinelli RN. Potential health-related benefits of resistance training. *Prev Med*; n.5, p.503-13, 2001.

Worsley R, Robinson PJ, Bell RJ, Moufärege A, Davis SR. Endogenous estrogen and androgen levels are not independent predictors of lipid levels in postmenopausal women. *Menopause*; n.6, p.640, 2013.

Yager JD, Liehr JG. Molecular mechanisms of estrogen carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*; n.36, p.203-32, 1996.

Yakeu G, Butcher L, Isa S, Webb R, Roberts AW, Thomas AW, Backx K, James PE, Morris K. Low-intensity exercise enhances expression of markers of alternative activation in circulating leukocytes: roles of PPAR γ and Th2 cytokines. *Atherosclerosis*; n.2, p.668-73, 2010.

Yao X, Yun X, Chen T, Chen M, He X, Long W, Chen S, Li L. Effects of ovariectomy and estradiol on microarchitecture and biomechanical properties in rat vertebrae. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*; n.3, p.626-31, 2008

Zoth N, Weigt C, Zengin S, Selder O, Selke N, Kalicinski M, Piechotta M, Diel P. Metabolic effects of estrogen substitution in combination with targeted exercise training on the therapy of obesity in ovariectomized Wistar rats. *J Steroid Biochem Mol Biol*; n. 130, p.64-72, 2012.