Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Aline de Sousa dos Santos

Efeito da dieta contendo óleo de canola sobre a composição corporal e a estrutura óssea de ratas jovens e de ratas adultas ovariectomizadas

Rio de Janeiro

2016

Aline de Sousa dos Santos

Efeito da dieta contendo óleo de canola sobre a composição corporal e a estrutura óssea de ratas jovens e 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.

Orientadora: Prof.ª Dra. Celly Cristina Alves do Nascimento Saba

Rio de Janeiro

2016

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

S237 Santos, Aline de Sousa dos.
Efeito da dieta contendo óleo de canola sobre a composição corporal e a estrutura óssea de ratas jovens e de ratas adultas ovariectomizadas / Aline de Sousa dos Santos. 2016.
118 f.

Orientadora: Celly Cristina Alves do Nascimento Saba.
Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Dieta - Teses. 2. Óleos vegetais - Uso terapêutico - Teses. 3. Ossos - Densidade – Fisiologia - Teses. 4. Ossos - Crescimento - Fisiologia. 5. Ovariotomia - Teses. 6. Rato como animal de laboratório – Teses. 7. Ratos Wistar. I. Saba, Celly Cristina Alves do Nascimento. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 613.268

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

_____ _____

Assinatura Data

Aline de Sousa dos Santos

Efeito da dieta contendo óleo de canola sobre a composição corporal e a estrutura óssea de ratas jovens e 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 28 de setembro de 2016.

Banca Examinadora:

_____

Prof.ª Dra. Celly Cristina Alves do Nascimento Saba (Orientadora)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

_____

Prof.ª Dra. Norma Aparecida dos Santos Almeida

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

_____

Prof. Dr. Gilson Teles Boaventura

Universidade Federal Fluminense

_____

Prof.ª Dra. Alessandra Alves Thole

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

_____

Prof.ª Dra. Elaine de Oliveira

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2016

DEDICATÓRIA

A Deus, por sua infinita proteção e toda graça alcançada.

Ao meus pais, Marlene de Sousa e Manoel dos Santos, e meu irmão Rodrigo, por estarem sempre ao meu lado, amparando e encorajando, por todos os momentos de apoio, união, amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

À minha família, por todo apoio e incentivo ao meu crescimento pessoal e profissional. Agradeço a educação que me deram e todo amor dedicado. O estímulo e a força que tenho para seguir em frente são reflexos da fortaleza que é a nossa família.

À minha orientadora Celly Cristina A. Nascimento Saba, por ter me apoiado e orientado ao longo da graduação e pós-graduação. Agradeço toda atenção e os ensinamentos ao longo desta jornada acadêmica.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Soares da Costa, pela presença segura e competente, por ser um grande exemplo profissional e por todo auxílio e orientação durante minha jornada acadêmica.

Aos companheiros do Laboratório de Análises Morfofuncionais, Gabrielle Gonzalez, Karine Albuquerque, Aluana Santana, Sanderson Soares, Cynthia Carneiro, Rejane Pontes, por todos os momentos alegres e até os estressantes, por tantas idas e vindas, pelos trabalhos executados, pela colaboração e ensinamentos técnicos, pela companhia constante, e pelas inúmeras estórias que ficaram guardadas na memória.

À técnica de laboratório Andreia Bertoldo pela realização do processamento histológico.

Aos chefes do Laboratório de Fisiologia Endócrina, Egberto Gaspar de Moura, Patricia Cristina Lisboa e Elaine de Oliveira, por ceder o espaço do laboratório e seus equipamentos. Ademais, a Nayara Peixoto por auxiliar com as técnicas de análise hepática.

Ao Prof. Dr. Gilson Teles Boaventura e toda equipe do Laboratório de Nutrição Experimental da UFF, pela boa receptividade em seu laboratório e por todo auxílio técnico para execução de grande parte deste trabalho. Em especial agradeço a Aline D'Ávila, Danielle Ribeiro e Paula Cristina da Silva pelas colaborações e trabalhos desenvolvidos.

Ao Instituto de Nutrição da UERJ e da UFF, pela realização dos exames de densitometria.

Ao Hospital Universitário Pedro Ernesto, pela utilização do tomógrafo para a realização das análises radiológicas.

E todos aqueles, que de forma direta ou indireta, contribuíram para a elaboração deste trabalho.

A todos, muito obrigada!

Tim...Tim...

Um brinde pra mim,
Sou exemplo de vitórias,
Trajetos e glórias.
(...)

São poucos
Que entram em campo pra vencer,
A alma guarda
O que a mente tenta esquecer.

Racionais Mc's

RESUMO

SANTOS, Aline de Sousa dos. *Efeito da dieta contendo óleo de canola sobre a composição corporal e a estrutura óssea de ratas jovens e de ratas adultas ovariectomizadas.* 2016. 118 f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

A homeostase óssea é modulada por fatores nutricionais e hormonais. A baixa relação ômega-6/ômega-3, observada no óleo de canola, apresenta efeitos benéficos para a integridade óssea. O maior conhecimento sobre a ação dos ácidos graxos sobre a estrutura óssea pode beneficiar mulheres na menopausa, reduzindo o risco de doenças osteometabólicas e de fraturas. Assim, o objetivo do estudo foi avaliar o efeito da dieta contendo óleo de canola sobre a composição corporal e a estrutura óssea de ratas, ao longo do desenvolvimento, na presença e na deficiência de esteróides sexuais femininos. Ratas Wistar receberam dieta normolipídica contendo óleo de soja (grupo S) ou óleo de canola (grupo C) dos 21 aos 180 dias de vida. Aos 90 dias, as ratas foram ovariectomizadas (OVX) ou pseudo-operadas (SHAM), formando 4 grupos: ShamS, ShamC, OVXS e OVXC. A eutanásia ocorreu aos 60, 90 e 180 dias, sendo análisados: ingestão alimentar, massa e comprimento corporal, teste de tolerância à glicose, HOMA, insulina e estradiol plasmáticos, perfil lipídico, proteínas plasmáticas, composição corporal por absorciometria de feixe duplo de raios-X (DXA), tomografia computadorizada (TC), conteúdo de triglicerídeo, colesterol e glicogênio hepáticos, morfologia do pâncreas, do tecido adiposo e do fígado. Em fêmur e quarta vértebra lombar (VL4) foram analisados o conteúdo (CMO) e a densidade minerais ósseos (DMO), a área óssea (AO) e a radiodensidade da cabeça do fêmur (RCF) e do corpo vertebral (RCV). Aos 60 dias: não houve diferença entre os grupos quanto a ingestão alimentar, composição corporal e parâmetros ósseos. O grupo C apresentou intolerância à glicose, hiperinsulinemia, resistência à insulina, aumento da área da ilhota pancreática, menor área de adipócito, aumento da massa do fígado, aumento de triglicerídeo e glicogênio hepáticos, micro esteatose hepática, aumento de fosfatase alcalina e alanina transaminase e menor concentração de estradiol. Aos 90 dias: não houve diferença entre os grupos em todos os aspectos analisados, exceto, a menor área do adipócito e o aumento de fosfatase alcalina e glicogênio hepático no grupo C. Aos 180 dias: a ingestão alimentar e o comprimento corporal foram similares entre os quatro grupos. Os grupos OVX apresentaram intolerância à glicose; maiores massa corporal, adiposidade, área de adipócitos e concentrações plasmáticas de fosfatase alcalina; e menores massa magra, massa do útero, concentração de estradiol, DMO de fêmur e VL4, RCF e RCV. O grupo OVXS apresentou hipercolesterolemia. O grupo OVXC apresentou resistência à insulina, aumento de triglicerídeo hepático e esteatose hepática. A dieta contendo óleo de canola não promoveu maior pico de massa óssea na maturidade sexual, aos 60 dias, e nem preveniu a perda óssea no período de deficiência estrogênica. Adicionalmente, foi deletéria para o metabolismo glicídico e promoveu danos hepáticos, nas ratas jovens e, quando associada à deficiência estrogênica exacerbou as alterações glicídicas e hepáticas.

Palavras-chave: Composição corporal. Estrutura óssea. Óleo de canola. Ovariectomia. Ratas.

ABSTRACT

SANTOS, Aline de Sousa dos. *Effects of diet containing canola oil on body composition and bone structure of young rats and ovariectomized adults rats.* 2016. 118 f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Bone homeostasis is modulated by dietary and hormonal factors. Low omega-6/omega-3 ratio, present in canola oil, promotes beneficial effects on bone integrity. The understand about fatty acids action on bone structure can benefit menopausal women, reducing the risk of bone metabolic diseases and fractures. Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of diet containing canola oil on body composition and bone structure of rats throughout the development, in the presence and deficiency of female sex steroids. Wistar rats fed diet containing soybean oil (S group) or canola oil (C group) from 21 to 180 days old. At 90 days, the rats were ovariectomized (OVX) or sham-operated (SHAM), creating 4 groups: Shams, ShamC, OVXS and OVXC. Euthanasia occurred at 60, 90 and 180 days and were analyzed: food intake; body weight and body length; glucose tolerance test; HOMA; plasmatic insulin and estradiol; lipid profile; plasmatic proteins; body composition by dual energy X-ray absorptiometry (DXA); computed tomography (CT); hepatic triglyceride, cholesterol and glycogen; pancreatic, adipose tissue and liver morphology. In femur and fourth lumbar vertebra (VL4) were analyzed bone mineral content (BMC) and bone mineral density (BMD), bone area (AO), radiodensity of femoral head (RCF) and radiodensity of vertebral body (RCV). At 60 days: there was no difference between groups in food intake, body composition and bone parameters. C group showed glucose intolerance, hyperinsulinemia, insulin resistance, increased pancreatic islet area, lower adipocytes area, increased liver weight, increased hepatic triglyceride and glycogen, hepatic steatosis, increased alkaline phosphatase and alanine transaminase, and lower estradiol concentrations. At 90 days: there was no difference between the groups in all aspects analyzed, except, lower adipocyte area and increased alkaline phosphatase and hepatic glycogen in the C group. At 180 days: food intake and body length were similar among the groups. OVX groups showed glucose intolerance; higher body weight, adiposity, adipocytes area and plasmatic alkaline phosphatase; and lower lean mass, uterine mass, estradiol concentrations, BMD of femur and VL4, RCF and RCV. OVXS group had hypercholesterolemia. OVXC group showed insulin resistance, increased hepatic triglyceride and hepatic steatosis. The diet containing canola oil promoted no higher peak bone mass at sexual maturity, at 60 days, and not prevented bone loss in estrogen deficiency period. Additionally, it was harmful to glucose metabolism and promoted hepatic damage in young rats, and when associated with estrogen deficiency exacerbated glucose and liver alterations.

Keywords: Body composition. Bone structure. Canola oil. Ovariectomy. Rats.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Processo de formação das células ósseas 20
Figura 2 – Ossificação intramembranosa 21
Figura 3 – Ossificação endocondral 22
Figura 4 – Etapas da remodelação óssea 23
Figura 5 – Alterações da estrutura óssea associada à menopausa 28
Figura 6 – Metabolismo de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa 33
Figura 7 – Delineamento experimental e formação dos grupos experimentais 40
Figura 8 – Fotografia demonstrando o aparelho DXA 45
Figura 9 – Imagem obtida por meio de tomografia computadorizada 50
Figura 10 – Fotomicrografias de pâncreas de ratas aos 60 dias de vida 60
Figura 11 – Fotomicrografias de tecido adiposo retroperitoneal de ratas aos 60 dias de vida 62
Figura 12 – Fotomicrografias de fígado de ratas aos 60 dias de vida 63
Figura 13 – Fotomicrografias de pâncreas de ratas aos 90 dias de vida 72
Figura 14 – Fotomicrografias de tecido adiposo retroperitoneal de ratas aos 90 dias de vida 74
Figura 15 – Fotomicrografias de fígado de ratas aos 90 dias de vida 75
Figura 16 – Fotomicrografias de pâncreas de ratas aos 180 dias de vida 85
Figura 17 – Fotomicrografias de tecido adiposo retroperitoneal de ratas aos 180 dias de vida 87
Figura 18 – Fotomicrografias de fígado de ratas aos 180 dias de vida 89

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Ingestão alimentar, massa e comprimento corporais de ratas aos 60 dias de vida 54
Gráfico 2 – Teste de tolerância à glicose intraperitoneal aos 60 dias de vida 58
Gráfico 3 – Índice de HOMA de ratas aos 60 dias de vida 59
Gráfico 4 – Área das ilhotas pancreáticas de ratas aos 60 dias de vida 61
Gráfico 5 – Área dos adipócitos retroperitoneais de ratas aos 60 dias de vida 62
Gráfico 6 – Análise de triglicerídeo, colesterol e glicogênio hepáticos aos 60 dias de vida 64
Gráfico 7 – Ingestão alimentar, massa corporal e comprimento corporal de ratas aos 90 dias de vida 66
Gráfico 8 – Teste de tolerância à glicose intraperitoneal aos 90 dias de vida 70
Gráfico 9 – Índice de HOMA de ratas aos 90 dias de vida 71
Gráfico 10 – Área das ilhotas pancreáticas de ratas aos 90 dias de vida 73
Gráfico 11 – Área dos adipócitos retroperitoneais de ratas aos 90 dias de vida 74
Gráfico 12 – Análise de triglicerídeo, colesterol e glicogênio hepáticos aos 90 dias de vida 76
Gráfico 13 – Ingestão alimentar, massa e comprimento corporais de ratas aos 180 dias de vida 79
Gráfico 14 – Teste de tolerância à glicose intraperitoneal aos 180 dias de vida 83
Gráfico 15 – Índice de HOMA de ratas aos 180 dias de vida 84
Gráfico 16 – Área das ilhotas pancreáticas de ratas aos 180 dias de vida 86
Gráfico 17 – Área dos adipócitos retroperitoneais de ratas aos 180 dias de vida 88
Gráfico 18 – Análise de triglicerídeo, colesterol e glicogênio hepáticos aos 180 dias de vida 91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição nutricional das rações purificadas 42
Tabela 2 – Características das fases do ciclo estral de ratas Wistar 43
Tabela 3 – Medidas corporais e bioquímicas de ratas aos 21 dias de vida 53
Tabela 4 – Composição corporal aos 60 dias de vida 55
Tabela 5 – Massa dos órgãos aos 60 dias de vida 56
Tabela 6 – Dosagens plasmáticas aos 60 dias 57
Tabela 7 – Análises ósseas aos 60 dias de vida 65
Tabela 8 – Composição corporal aos 90 dias de vida 67
Tabela 9 – Massa dos órgãos aos 90 dias de vida 68
Tabela 10 – Dosagens plasmáticas aos 90 dias de vida 69
Tabela 11 – Análises ósseas aos 90 dias de vida 77
Tabela 12 – Composição corporal aos 180 dias de vida 80
Tabela 13 – Massa dos órgãos aos 180 dias de vida 81
Tabela 14 – Dosagens plasmáticas aos 180 dias de vida 82
Tabela 15 – Análises ósseas aos 180 dias de vida 92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido araquidônico
AGMI	Ácidos graxos monoinsaturados
AGPI	Ácidos graxos poliinsaturados
AGS	Ácidos graxos saturados
AIN	*American Institute of Nutrition*
ALA	Ácido alfa-linolênico
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BMP	Proteína osteomorfogênica
C	Grupo canola
CLA	Ácido linoléico conjugado
CMO	Conteúdo mineral ósseo
DHA	Ácido docosahexaenóico
DHEA	Desidroepiandrosterona
DMO	Densidade mineral óssea
DXA	*Dual-energy X-ray Absorptiometry*
E_1	Estrona
E_2	Estradiol
E_3	Estriol
EPA	Ácido eicosapentaenóico
ER	Receptor de estrogênio
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
FAO	*Food and Agriculture Organization*
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
GPR	Receptor acoplado a proteína G
GPER	Receptor de estrogênio acoplado à proteína G
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HE	Hematoxilina-Eosina
HOMA	*Homeostasis Model Assessment*
HU	Unidades de Hounsfield
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina

IL	Interleucina
IR	Receptor de insulina
IRS	Substrato do receptor de insulina
LA	Ácido linoléico
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LPL	Lipoproteína lipase
M-CSF	Fator estimulante de colônia de macrófagos
MITF	Fator de transcrição induzido por microftalmia
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPG	Osteoprotegerina
OVX	Ovariectomia
OVX C	Grupo ovariectomizado alimentado com dieta de óleo de canola
OVX S	Grupo ovariectomizado alimentado com dieta de óleo de soja
PGE	Prostaglandina E
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinase
PR	Receptor de progesterona
PPAR	Receptor ativado do proliferador de peroxissoma
PTH	Paratormônio
RANK	Receptor ativador do fator nuclear κβ
RANKL	Ligante do receptor ativador do fator nuclear κβ
S	Grupo soja
SHAM	Pseudo-operada
Sham C	Grupo pseudo-operado alimentado com dieta de óleo de canola
Sham S	Grupo pseudo-operado alimentado com dieta de óleo de soja
SRC	*Scientific Review Committee*
SREBP	Proteína ligante do elemento regulatório de esteróides
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TTGI	Teste de tolerância à glicose intraperitoneal
VL4	Quarta vértebra lombar
VLDL	Lipoproteínas de muito baixa densidade

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
1	**REVISÃO DA LITERATURA**	18
1.1	**Osso: organização estrutural e metabolismo**	18
1.2	**Hormônios sexuais femininos e suas ações metabólicas**	24
1.2.1	Menopausa e suas consequências	26
1.2.1.1	Menopausa e osso	27
1.3	**Ácidos graxos**	29
1.3.1	Ácidos graxos no organismo	31
1.3.2	Óleos de soja e de canola: fontes de AGPI	34
2	**JUSTIFICATIVA**	36
3	**OBJETIVOS**	37
3.1	**Geral**	37
3.2	**Específicos**	37
4	**MATERIAIS E MÉTODOS**	38
4.1	**Animais**	38
4.2	**Delineamento experimental**	39
4.3	**Produção da ração**	41
4.4	**Avaliação do ciclo estral**	43
4.5	**Ovariectomia**	44
4.6	**Teste de tolerância à glicose intraperitoneal (TTGI)**	44
4.7	**Absorciometria de Feixe Duplo de Raios-X (DXA)**	44
4.8	**Análises plasmáticas**	45
4.9	**Índice de HOMA**	46
4.10	**Coleta de órgãos e processamento dos tecidos**	47
4.10.1	Processamento e análise histomorfométrica de fígado, pâncreas e tecido adiposo	47
4.11	**Quantificação de triglicerídeo, colesterol e glicogênio hepáticos**	48
4.12	**Análises ósseas**	49
4.13	**Análise estatística**	51
5	**RESULTADOS**	52
5.1	**Animais de 21 dias**	52

5.2 **Período experimental de 60 dias**..... 54
5.2.1 Evolução da ingestão alimentar, massa e comprimento corporais..... 54
5.2.2 Análise da composição corporal por DXA..... 55
5.2.3 Massa dos órgãos..... 55
5.2.4 Dosagens plasmáticas..... 56
5.2.5 Teste de tolerância à glicose intraperitoneal (TTGI)..... 57
5.2.6 Índice de HOMA..... 58
5.2.7 Análise histomorfométrica do pâncreas..... 60
5.2.8 Análise histomorfométrica do tecido adiposo retroperitoneal..... 61
5.2.9 Morfologia hepática..... 63
5.2.10 Conteúdo intra-hepático de triglicerídeo, colesterol e glicogênio..... 64
5.2.11 Análises ósseas..... 65
5.3 **Período experimental de 90 dias**..... 66
5.3.1 Evolução da ingestão alimentar, massa e comprimento corporais..... 66
5.3.2 Análise da composição corporal por DXA..... 67
5.3.3 Massa dos órgãos..... 67
5.3.4 Dosagens plasmáticas..... 68
5.3.5 Teste de tolerância à glicose intraperitoneal (TTGI)..... 69
5.3.6 Índice de HOMA..... 70
5.3.7 Análise histomorfométrica do pâncreas..... 72
5.3.8 Análise histomorfométrica do tecido adiposo retroperitoneal..... 73
5.3.9 Morfologia hepática..... 75
5.3.10 Conteúdo intra-hepático de triglicerídeo, colesterol e glicogênio..... 76
5.3.11 Análises ósseas..... 77
5.4 **Período experimental de 180 dias**..... 78
5.4.1 Evolução da ingestão alimentar, massa e comprimento corporais..... 78
5.4.2 Análise da composição corporal por DXA..... 79
5.4.3 Massa dos órgãos..... 80
5.4.4 Dosagens plasmáticas..... 81
5.4.5 Teste de tolerância à glicose intraperitoneal (TTGI)..... 82
5.4.6 Índice de HOMA..... 83
5.4.7 Análise histomorfométrica do pâncreas..... 85
5.4.8 Análise histomorfométrica do tecido adiposo retroperitoneal..... 86
5.4.9 Morfologia hepática..... 88

5.4.10 Conteúdo intra-hepático de triglicerídeo, colesterol e glicogênio..... 90
5.4.11 Análises ósseas..... 92
6 **DISCUSSÃO**..... 93
CONCLUSÃO..... 103
REFERÊNCIAS..... 104

INTRODUÇÃO

Um aspecto diferencial dos séculos XX e XXI é a transição demográfica caracterizada pelo aumento da expectativa de vida das populações. Estima-se que, de 1996 a 2025, o percentual de idosos aumentará cerca de 200% nos países em desenvolvimento. O Brasil vem seguindo essa tendência mundial, com a estimativa de mais de 33 milhões de idosos em 2025, que o tornará o sexto país com a maior população de idosos no mundo (FREITAS *et al*, 2002; SILVA *et al*, 2006). Atualmente, a expectativa de vida populacional brasileira é de 75,2 anos, sendo nos homens a média de 71,6 anos e nas mulheres de 78,8 anos (IBGE, 2014). Frente à nova realidade, as mulheres passaram a viver mais tempo com os efeitos deletérios da perda da função gonadal, que além de causar diversos distúrbios sistêmicos provoca a perda da integridade óssea, aumentando a probabilidade do desenvolvimento da osteoporose. Nesta condição, o maior risco de fraturas está associado a morbidades que tornaram a osteoporose um problema de saúde pública (RINALDI, 2004; COMPSTON, 2006; HADJI *et al*, 2007, ADAMI *et al*, 2009).

O tecido ósseo é dinâmico e sua renovação é contínua, através do processo de remodelação óssea (FATORRE *et al*, 2010). Fatores genéticos, hormonais e nutricionais, atuando de forma isolada e em ação combinada, modulam a homeostase óssea. Dentre os fatores nutricionais, os lipídios têm um importante papel na regulação do metabolismo ósseo, durante os períodos de crescimento e desenvolvimento, e que se mantém no adulto (CORWIN, 2003).

Na composição lipídica, os ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa se destacam pelos efeitos benéficos para a integridade óssea, quando consumidos em quantidades apropriadas (KRUGER *et al*, 2010). O ácido linoléico (família do ômega-6) e o ácido alfa linolênico (família do ômega-3), ácidos graxos essenciais, têm proporções específicas para atuar sobre o metabolismo ósseo (RUXTON *et al*, 2007; ZEVENBERGEN *et al*, 2009). A alta proporção ômega-6/ômega-3 está associada a efeitos negativos sobre a fisiologia óssea, com maior estímulo para a reabsorção óssea, enquanto, uma baixa proporção ômega-6/ômega-3 estimula formação óssea (WATKINS *et al*, 2000; WEISS, BARRET-CONNOR & VON MUHLEN, 2005).

Com o intuito de melhorar a qualidade de vida de mulheres na menopausa, reduzindo o risco de doenças osteometabólicas e de fraturas, dentre outros fatores, busca-se conhecer melhor o papel dos ácidos graxos da dieta sobre a composição corporal e o metabolismo

ósseo. Dessa forma, o presente estudo pretende analisar o efeito de dieta contendo óleo de canola (baixa proporção ômega-6/ômega-3) sobre a composição corporal e a estrutura óssea de ratas ao longo da vida, estudando fases importantes no processo de formação óssea, como a puberdade, a vida adulta e a fase de perda da função gonadal, através de pesquisa experimental em condições controladas e análise quantitativa dos dados.

1 REVISÃO DA LITERATURA

A temática em questão no presente trabalho é bastante abrangente e, foram destacados três temas para discussão: o metabolismo ósseo, os ácidos graxos, e a ação dos hormônios sexuais femininos. Os temas são independentes e interligados simultaneamente. A opção escolhida para o desenvolvimento de ideias na revisão da literatura tem início com o tema metabolismo ósseo, ressaltando suas características histológicas, fisiológicas e funcionais. Esse tema inicial está relacionado com os demais, uma vez que o osso sofre influências de fatores nutricionais e hormonais. Em continuidade, foi abordado o tema dos hormônios sexuais femininos e suas ações no organismo, destacando seu efeito no osso. Por fim, a caracterização e atuação dos ácidos graxos insaturados no metabolismo, ressaltando o papel do óleo de canola e o óleo de soja, que são, respectivamente, ácidos graxos mono e poliinsaturados.

1.1 Osso: organização estrutural e metabolismo

O esqueleto é composto de osso e cartilagem. Estes tecidos são compostos de populações de células funcionalmente distintas que promovem o suporte estrutural e a integridade mecânica e bioquímica do esqueleto. As funções do esqueleto, que incluem o papel no crescimento, locomoção, sustentação, hematopoiese, homeostase de íons e proteção de órgãos vitais, são fundamentais para um organismo saudável (FARQUHARSON & STAINES, 2011). Anatomicamente, o esqueleto pode ser dividido em axial e apendicular, definindo como esqueleto axial os ossos do crânio, da coluna vertebral e da bacia e, como esqueleto apendicular, os ossos dos membros inferiores e superiores (LAZARETTI-CASTRO & BIANCO, 2013).

Sob o aspecto morfológico, o tecido ósseo é dividido em osso cortical e osso trabecular. O osso cortical constitui 80% da massa óssea total, é compacto, compreende as camadas concêntricas externas dos ossos do esqueleto apendicular (ossos longos) e recobre, como uma fina camada, a superfície do esqueleto axial (bacia e vértebras). O osso trabecular é formado por inúmeras trabéculas ósseas, apresentando um aspecto esponjoso. Constitui cerca de 20% da massa óssea total e pode ser encontrado, predominantemente, nos ossos chatos,

como vértebras, bacia e escápula, e também nas metáfises dos ossos longos (LAZARETTI-CASTRO & BIANCO, 2013).

O tecido ósseo é composto por uma matriz extracelular formada por componentes orgânicos (35%), inorgânicos (60%) e água (5%), sendo apenas uma pequena parte da massa óssea correspondente às células: osteoblastos, osteoclastos e osteócitos (WEHRLI, 2007).

O principal componente da matriz orgânica é o colágeno tipo I (90%), no entanto, outras proteínas estão presentes na matriz óssea, como a osteocalcina que é sintetizada pelos osteoblastos, a osteonectina e as proteínas osteoindutoras – fator de transformação do crescimento β (TGF-β), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I e II), fator de crescimento de fibroblasto (FGF) e proteínas osteomorfogênicas (BMP). A parte inorgânica do osso é composta por cálcio e fósforo, rearranjados sob a forma de cristais de hidroxiapatita, juntamente com outros componentes como, sódio, potássio, magnésio e bicarbonato. Esta combinação de componentes na matriz óssea permite ao osso apresentar elasticidade e resistência à compressão (WEHRLI, 2007; LAZARETTI-CASTRO & BIANCO, 2013).

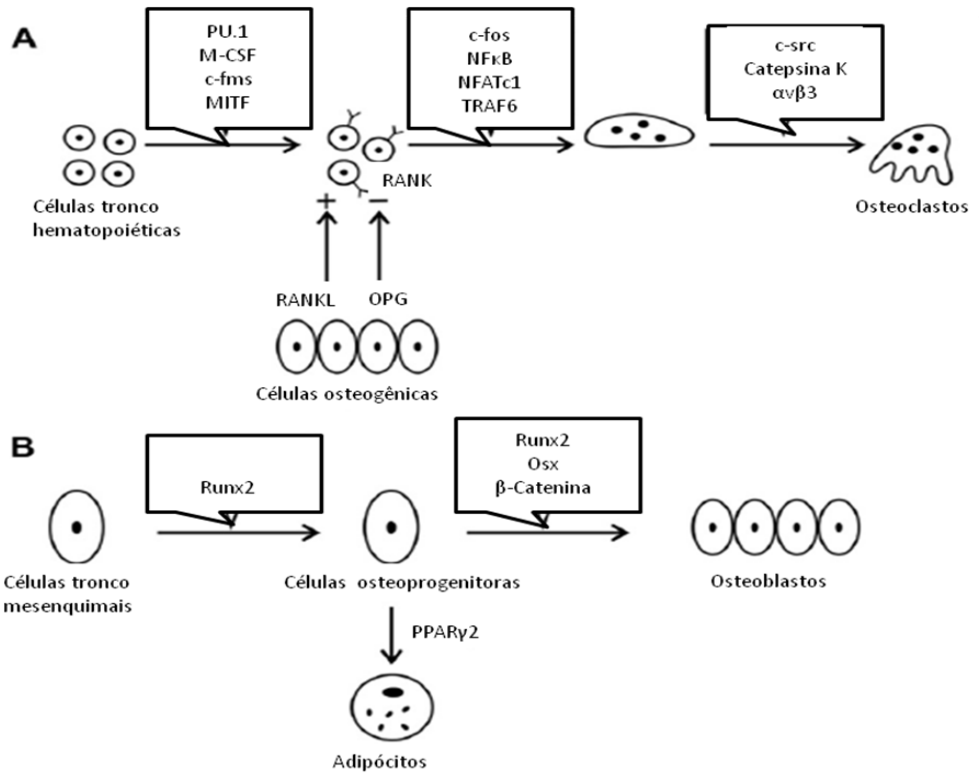
Em relação aos componentes celulares, os osteoblastos são células de formação óssea originados de células mesenquimais sob a influência de fatores de crescimento locais (FGF e BMP) e de fatores de transcrição *Runx2* e *Osterix* (GUNTUR & ROSEN, 2011). Expressam um ligante para o receptor ativador do fator nuclear κB (RANKL), que é importante para a diferenciação de osteoclastos e, também a osteoprotegerina (OPG), que inibe a ligação do RANKL ao receptor ativador do fator nuclear κB (RANK) e, a osteoclastogênese (KRUGER *et al*, 2010).

Os osteócitos são osteoblastos que após mineralização do osteóide ao seu redor ficam aprisionados em lacunas ósseas. Essas células são responsáveis pela troca de nutrientes e metabólitos com o sangue e agem como sensores capazes de detectar deformidades exercidas por forças mecânicas, orientando o processo de remodelamento e promovendo uma adaptação da estrutura óssea (LAZARETTI-CASTRO & BIANCO, 2013).

Os osteoclastos são células gigantes e multinucleadas que estão relacionadas com a reabsorção óssea. Tem origem de células tronco hematopoéticas, que sob estímulo dos fatores de transcrição – PU.1, fator estimulante de colônia de macrófagos (M-CSF) e fator de transcrição induzido por microftalmia (MITF) – se diferenciam em linhagem de monócito/macrófago (precursor de osteoclastos). Os precursores de osteoclastos apresentam em suas membranas RANK e, a ligação do RANK ao RANKL, expresso pelos osteoblastos, promove a diferenciação e formação de osteoclastos maduros (CROCKETT *et al*, 2011;

MELLIS *et al*, 2011). O processo de formação das células ósseas pode ser observado na Figura 1.

Figura 1 – Processo de formação das células ósseas

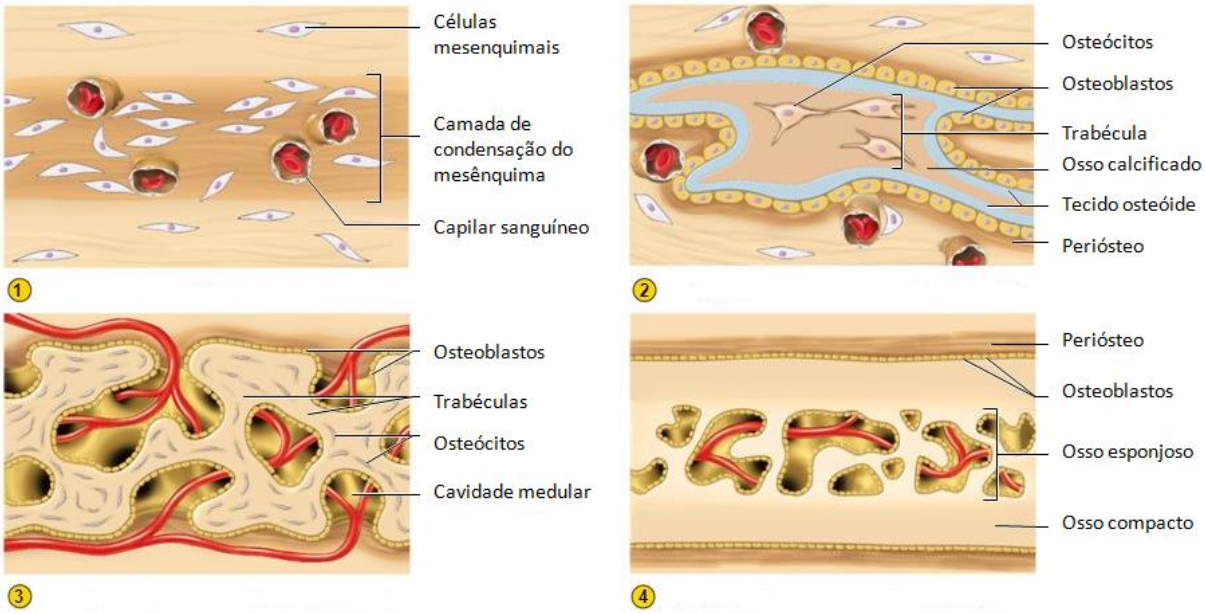


Legenda: (A) Diferenciação e maturação de osteoclastos. (B) Formação dos osteoblastos.
Fonte: adaptado de KRUGER *et al*, 2010.

O tecido ósseo é dinâmico e está em constante modificação devido a três processos: crescimento, modelação e remodelação óssea. O osso pode ser formado por dois diferentes mecanismos – ossificação intramembranosa ou ossificação endocondral.

A ossificação intramembranosa é efetuada por osteoblastos originários de células mesenquimais, os quais sintetizam, primordialmente, um tecido ósseo desorganizado, que é gradativamente substituído por um osso de conformação lamelar (Figura 2). Este tipo de ossificação contribui para o crescimento dos ossos curtos e alargamento dos ossos longos. Também forma os ossos frontal, parietal, parte do occipital, temporal e maxilar superior e inferior (LAZARETTI-CASTRO & BIANCO, 2013).

Figura 2 – Ossificação intramembranosa



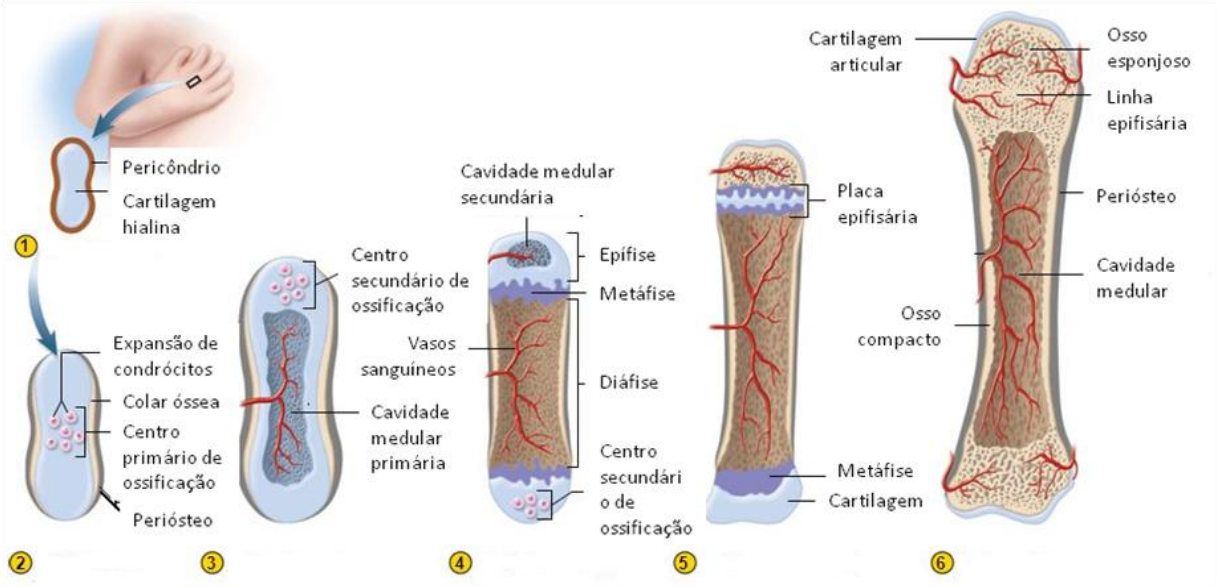
Legenda: 1- Condensação do mesênquima em suaves camadas permeadas por capilares sanguíneos; 2- Deposição de tecido osteóide por osteoblastos na superfície mesenquimal, aprisionamento dos primeiros osteócitos e formação do periósteo; 3- Trabéculas ósseas formadas por deposição mineral contínua e formação de osso esponjoso; 4- Superfície óssea preenchida por deposição óssea, convertendo osso esponjoso em osso compacto. Persistência de osso esponjoso na camada intermediária.

Fonte: adaptado de THE MCGRAW-HILL COMPANIES, [20--].

Em contrapartida, a ossificação endocondral ocorre a partir de um molde de cartilagem oriundo de precursores mesenquimais que secretam vários componentes de matriz extracelular de cartilagem, incluindo colágeno tipo II e proteoglicanas (FARQUHARSON & STAINES, 2011). O molde de cartilagem se expande através da proliferação de condrócitos. Em sua região central é formado o centro primário de ossificação, com a invasão de vasos sanguíneos e a migração de células ósseas, onde ocorre a síntese e mineralização de matriz óssea através dos osteoblastos. O centro primário de ossificação se expande até atingir as extremidades do modelo de cartilagem, com os osteoclastos removendo matriz extracelular cartilaginosa e osteoblastos depositando matriz óssea na cartilagem remanescente. Em ossos longos, um centro secundário de ossificação é formado em cada extremidade do modelo de cartilagem, deixando uma placa de crescimento cartilaginosa entre os centros primários e secundários. Esta placa de crescimento é responsável pelo crescimento longitudinal do osso e, a maturidade óssea é alcançada quando a expansão do centro primário atinge o centro secundário de ossificação (Figura 3) (MACKIE, TATARCZUCH & MIRAMS, 2011;

WOLFF *et al*, 2012). A ossificação endocondral é responsável pelo crescimento ósseo linear na placa epifisária durante a vida pré e pós-natal, formando os ossos longos, coluna vertebral, bacia e base do crânio. Inúmeros fatores estão envolvidos na regulação do desenvolvimento e crescimento ósseos, dentre eles: BMP, TGF-β, IGF-I, IGF-II e FGF (FARQUHARSON & STAINES, 2011).

Figura 3 – Ossificação endocondral



Legenda: 1- Modelo inicial de cartilagem; 2- Formação do centro primário de ossificação, colar ósseo e periósteo; 3- Invasão vascular, formação da cavidade medular primária e surgimento do centro secundário de ossificação; 4- Osso ao nascimento: cavidade medular primária em expansão e surgimento da cavidade medular secundária na epífise; 5- Osso de criança: placa epifisária na extremidade distal; 6- Osso de adulto: única cavidade medular e placa epifisária fechada.
Fonte: adaptado de THE MCGRAW-HILL COMPANIES, [20--].

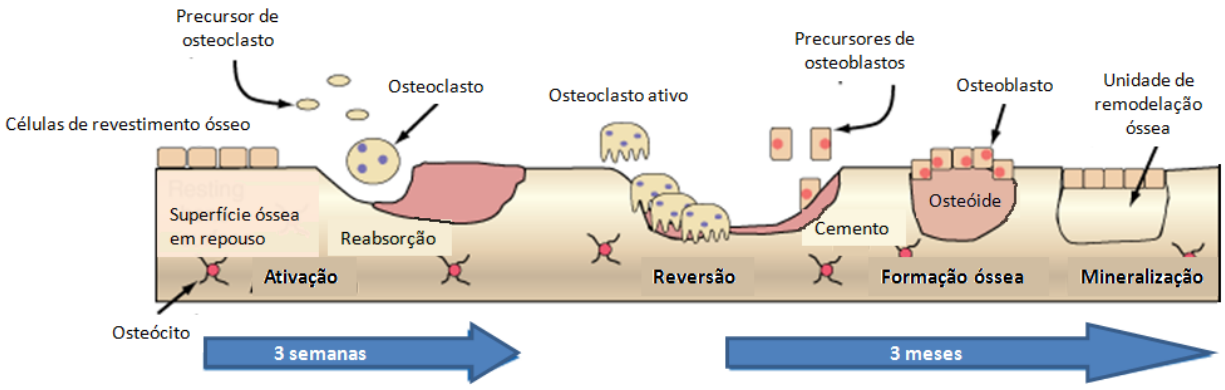
O crescimento ósseo cessa em certa idade, porém, os processos de modelação e remodelação persistem durante toda a vida. Estes processos são sincronizados e coordenados e permitem uma dinâmica óssea com o intuito de manter o volume ósseo e a homeostasia do cálcio (MAEDA, TAKAHASHI & KOBAYASHI, 2013).

A modelação óssea é a responsável pela arquitetura óssea, englobando aspectos como forma, tamanho, quantidade e estrutura tecidual, sendo influenciada por estímulos mecânicos externos e não mecânicos locais ou sistêmicos. Para a formação de um osso resistente, a força mecânica submetida à peça promove tensão e deformação, fundamentais para induzir a

resposta celular fisiológica de formação ou reabsorção em determinados pontos do esqueleto, coordenada pelos osteócitos. No local onde uma força é exercida existe uma reação para formação óssea, enquanto, no local de menor tensão predomina a reabsorção óssea (LAZARETTI-CASTRO & BIANCO, 2013).

O processo de remodelação óssea ocorre de forma mais intensa no osso trabecular que no cortical, com uma taxa de cerca de 10% ao ano e, com o objetivo de renovar o tecido, sem necessariamente alterar a arquitetura. O processo é caracterizado por uma sequência de quatro eventos que dura cerca de 3 meses para se completar: 1) ativação: fase de indução/ativação dos osteoclastos, dependente da citocina RANKL e do fator de crescimento CSF-1. Ocorre em local definido por osteócitos a partir de estímulos locais ou sistêmicos; 2) reabsorção: digestão e degradação da matriz óssea mineralizada pelos osteoclastos, processo que dura cerca de 15 dias; 3) reversão: período entre o fim da reabsorção e o início da formação óssea, quando células mononucleares limpam o local e cobrem a superfície com uma substância tipo cimento, que serve de guia para os osteoblastos, durando cerca de 1 a 2 semanas e; 4) formação: osteoblastos recém ativados preenchem a lacuna de reabsorção com uma matriz orgânica composta, principal e inicialmente, por fibras de colágeno tipo I, sendo a matriz mineralizada após 3 semanas (Figura 4) (SANTOS-ARAÚJO & LEITE-MOREIRA, 2007; LAZARETTI-CASTRO & BIANCO, 2013).

Figura 4 – Etapas da remodelação óssea



Fonte: adaptado de THE MCGRAW-HILL COMPANIES, [20--].

A remodelação óssea depende de fatores ambientais e sistêmicos, incluindo forças mecânicas, hormônios, fatores de crescimento e citocinas. Hormônios como o paratormônio (PTH) e a 1,25$(OH)_2$ vitamina D estimulam a reabsorção óssea por atuar diretamente nos osteoblastos, aumentando a produção de RANKL e estimulando a diferenciação para osteoclastos ativos (MAEDA, TAKAHASHI & KOBAYASHI, 2013). A reabsorção óssea também é estimulada por citocinas como, o fator de necrose tumoral α (TNF-α) e as interleucinas (IL-1, IL-2 e IL-6), além do fator de crescimento TGF-α (ADAMAPOULOS *et al*, 2006; PAULA & ROSEN, 2010). Por outro lado, inibidores da reabsorção óssea, como estrogênios e BMP estimulam a produção de OPG, diminuindo a quantidade de osteoclastos ativos ou inibindo diretamente os osteoclastos, como é o caso da calcitonina (INZERILLO, ZAID & HUANG, 2002; BEZERRA *et al*, 2005). A vitamina D também promove uma ação benéfica ao osso, uma vez ligada ao seu receptor estimula a síntese de proteínas como osteocalcina e fosfatase alcalina em osteoblastos, além de estar envolvida no metabolismo do cálcio, sendo fundamental para uma boa mineralização óssea (BARRAL, BARROS & ARAÚJO, 2007). A insulina, por sua vez, atua promovendo formação óssea através da síntese de colágeno e da proliferação e atividade dos osteoblastos. Outros fatores estimuladores da formação óssea são os IGF e o TGF-β (ZILLIKENS *et al*, 2010).

Durante a infância e adolescência a formação excede a reabsorção, promovendo aumento da massa óssea, sendo este período de vida crítico para a aquisição do pico de massa óssea. No indivíduo adulto, o balanço entre a formação e a reabsorção mantém a massa óssea constante (COBAYASHI, LOPES & TADEI, 2005; KRUGER *et al*, 2010). Enquanto no período de senescência ocorre perda óssea devido a um maior processo de reabsorção óssea. Em indivíduos idosos, a perda de cálcio e a fragilidade óssea, ocasionada pela diminuição da síntese protéica e da porção orgânica da matriz óssea, levam ao quadro de osteopenia e, consequentemente, osteoporose (KHOSLA & RIGGS, 2005).

1.2 **Hormônios sexuais femininos e suas ações metabólicas**

Os esteróides sexuais incluem os estrogênios, progestágenos e androgênios. Os estrogênios compreendem a estrona (E_1), o estradiol (E_2) e o estriol (E_3), dentre os quais, o estradiol, sintetizado pelos folículos ovarianos, é o principal, o mais produzido e de maior ação biológica durante a fase reprodutiva das mulheres. A estrona é oriunda, principalmente,

da conversão de androgênios em tecidos periféricos e, também é secretada pelo ovário, em pequenas quantidades. O estriol tem papel relevante no terceiro trimestre gestacional e sua produção ocorre no fígado materno, a partir de sulfato de desidroepiandrosterona (DHEA), um andrógeno de origem fetal. Quantidades mínimas podem ser produzidas pelo ovário, a partir de estrona. Em relação aos progestágenos, o mais importante é a progesterona, produzida pelo corpo lúteo, placenta, e também na zona reticulada da adrenal. Os androgênios – androstenediona, testosterona e diidrotestosterona – são produzidos em pequenas quantidades pelos ovários e outros também tem origem no córtex adrenal. Podem ter efeito direto em células alvo ou atuar como precursores de estrógenos (SPRITZER *et al*, 2008; LIMA & SERTIÉ, 2009; FRANCI & ANSELMO-FRANCI, 2013).

Os hormônios sexuais desenvolvem sua resposta biológica através de receptores específicos. Os estrógenos tem a ação mediada por receptores estrogênicos (ER) dos tipos α e β (ERα e ERβ), pertencentes a uma superfamília de receptores nucleares. Seu mecanismo de ação leva à mudanças celulares através de diferentes vias. Na via clássica ou genômica, o estrogênio entra na célula e se liga ao ER, formando um complexo que migra para o núcleo. O complexo ERα-E_2 ativa a transcrição gênica, enquanto o complexo ERβ-E_2 reprime a transcrição gênica em locais de elementos de resposta ao estrógeno. A via genômica resulta na produção de proteínas que levam ao efeito biológico, que ocorre no curso de horas (DEROO & KORACH, 2006; VILLENA & KRALLI, 2008). Na via alternativa ou não genômica, o efeito é rápido ocorrendo em minutos ou segundos, mediado pelo receptor de estrogênio acoplado a proteína G (GPER). A ativação dessa via induz produção de AMPc, mobilização de cálcio intracelular e ativação de proteínas cinase, como a fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K) e a cinase regulada por sinal extracelular (ERK) (PROSSNITZ & BARTON, 2011). A progesterona medeia sua ação através de receptores A (PR_A) e B (PR_B), sendo essencial para a implantação bem sucedida e sustento inicial do embrião, além da manutenção em longo prazo do feto (GENUTH, 2006).

Os hormônios sexuais femininos agem no trato reprodutor, nas glândulas mamárias e em diversos outros órgãos e tecidos. O estradiol promove a distribuição de tecido adiposo na região das mamas, coxas e quadris, sendo este padrão ginecóide de distribuição de gordura responsável pela mudança do formato corporal observado na puberdade; possui efeito lipolítico; no sistema cardiovascular induz aumento de óxido nítrico e promove vasodilatação e, aumenta HDL e reduz colesterol e LDL, prevenindo a arteriosclerose; induz sinaptogênese, está relacionado com melhora na função cognitiva/memória, além de estar associado ao comportamento sexual por aumentar a libido (LIMA & SERTIÉ, 2009; FRANCI &

ANSELMO-FRANCI, 2013). O endométrio, um tecido alvo clássico da ação estrogênica, sofre significativas mudanças morfofisiológicas ao longo do ciclo menstrual (POUTANEN, 2012). Por sua vez, a progesterona prepara o endométrio para a implantação do zigoto; auxilia na organização da mama para a lactação; bloqueia a proliferação endometrial; tem efeito ansiolítico e tranquilizante e, equilibra a predominância estrogênica (WOLFF *et al*, 2012).

No metabolismo ósseo o estradiol é responsável pelo acelerado crescimento linear e pelo fechamento das epífises na puberdade e, em adultos, atua na manutenção da massa óssea. A grande ação do estradiol no osso é inibir a reabsorção óssea. Para isso, diminui a formação e atividade de osteoclastos e estimula sua apoptose, através do antagonismo à ação do PTH, da inibição da síntese de IL-6 e do estímulo à produção de OPG. Entretanto, o estradiol também estimula a formação óssea por aumentar a síntese de TGF-β (KARSENTY, 2012; OURY, 2012). Sua ação no osso é mediada tanto por ERα quanto por ERβ, os quais estão presentes em condrócitos, células estromais da medula óssea, osteoblastos e osteoclastos e seus precursores (MANOLAGAS, KOUSTENI & JILKA, 2002; POUTANEN, 2012). Em relação à progesterona, seu efeito é estimular a proliferação e diferenciação dos osteoblastos, favorecendo a formação óssea (WOLFF *et al*, 2012).

1.2.1 Menopausa e suas consequências

A menopausa é um evento fisiológico definido pela cessação permanente da menstruação, resultante da perda da função folicular ovariana. É considerada natural ou espontânea após 12 meses consecutivos de amenorréia, sem causa patológica. Ocorre em torno dos 52 anos de idade, porém, pode variar dos 40 aos 58 anos. É esperado que em 2025, o número de mulheres em fase pós-menopausa seja de cerca de 1,1 bilhão, em todo o mundo (SHIFREN & GASS, 2014).

O climatério representa a transição da vida reprodutiva para a fase não reprodutiva, no qual ocorre a menopausa. Tomando a menopausa como ponto de referência, o climatério pode ser dividido, em pré-menopausa, perimenopausa e pós-menopausa. A pré-menopausa se caracteriza pela elevação gradual da concentração sérica do hormônio folículo estimulante (FSH). A perimenopausa compreende o período que vai até a caracterização da menopausa, quando os sintomas da menopausa se intensificam. A pós-menopausa se caracteriza pela exacerbação dos sintomas decorrentes do hipoestrogenismo e, concentrações de FSH muito

elevadas e estradiol muito baixo. O climatério é um período de declínio da função ovariana, no qual os ciclos menstruais se tornam irregulares devido à alteração da fase folicular e da secreção de hormônios ovarianos, e também, da dessincronização dos sinais neuro-endócrinos no hipotálamo e hipófise. É um processo complexo que implica em desconforto físico e efeitos negativos na qualidade de vida para a maioria das mulheres. Os sintomas do climatério apresentam prevalência extremamente variável, sofrendo interferência de fatores como dieta, nível sócio-econômico, aspectos culturais, clima e o impacto emocional. (ALDRIGHI *et al*, 2002; BURGER *et al*, 2008; HUANG *et al*, 2010)

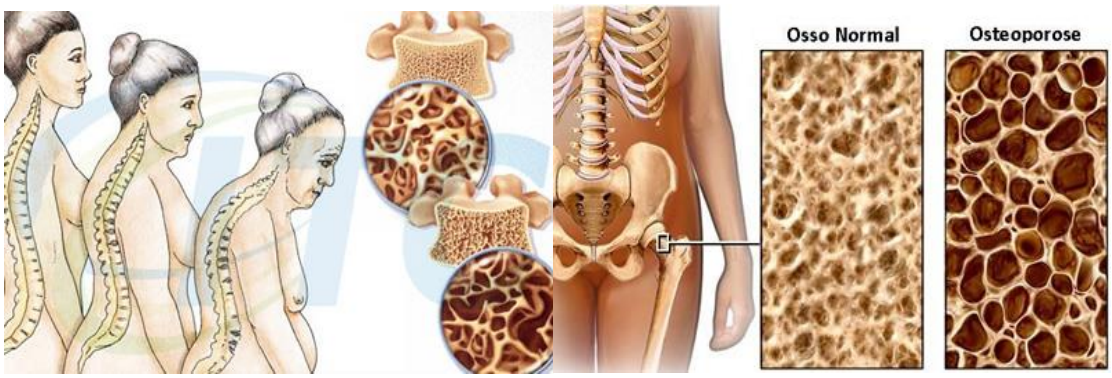
As alterações metabólicas decorrentes da deficiência estrogênica se estabelecem, principalmente, nos órgãos hormônio dependentes como útero, mamas, ossos e no sistema cardiovascular. Alguns dos sintomas da perimenopausa são os sangramentos uterinos irregulares, fogachos (ondas de calor acompanhadas de sudorese), mudanças bruscas de humor, distúrbios do sono associados à fadiga e irritabilidade, alterações de memória e depressão. Na pós-menopausa são comuns os sintomas como atrofia do endométrio, secura vaginal, ganho de peso com acúmulo de gordura abdominal (padrão andróide de deposição de gordura), diminuição da libido, predisposição a infecções vulvares, incontinência urinária, além de distúrbios vasculares, aumentando o risco para infarto do miocárdio. Soma-se a esses, as alterações na estrutura óssea que tem início com a perda de osso trabecular e a redução do cálcio ósseo, que levam a osteopenia e favorecem o desenvolvimento de osteoporose. (ALDRIGHI *et al*, 2002; LEWIS, HILDITCH & WONG, 2005; FRANCI & ANSELMO-FRANCI, 2013; SHIFREN & GASS, 2014).

1.2.1.1 Menopausa e osso

Dentre os distúrbios ocasionados pela deficiência estrogênica da menopausa, a osteoporose (Figura 5) é um dos mais complexos. É uma doença esquelética sistêmica, silenciosa, caracterizada pela redução da massa óssea, devido à diminuição da densidade mineral óssea (DMO), que tem como consequência o aumento do risco de fraturas, especialmente na coluna lombar, colo do fêmur, punho e calcâneo. A osteoporose e incidência de fraturas são de duas a três vezes maiores nas mulheres do que nos homens, devido à acelerada perda óssea durante os primeiros cinco anos após a menopausa (CLARKE & KHOSLA, 2010; GUPTA *et al*, 2012). De acordo com a Organização Mundial de Saúde, no

mundo, 13% a 18% das mulheres e 3% a 6% dos homens, acima de 50 anos, sofrem com a osteoporose. No Brasil, o número de pessoas atingidas chega a 10 milhões (BRASIL, 2016).

Figura 5 – Alterações da estrutura óssea associada à menopausa



Fonte: http://www.herniadedisco.com.br/doencas-da-coluna/osteopenia-e-osteoporose

As fraturas contribuem, consideravelmente, para a morbidade e mortalidade entre mulheres idosas (HADJI *et al*, 2007). Por isso, marcam o início de um importante declínio na capacidade funcional do indivíduo idoso, com crescente custo ao sistema de saúde, de tal forma que a Organização Mundial da Saúde reconhece a osteoporose como um problema de saúde pública, tanto em mulheres quanto em homens (ADAMI *et al*, 2009).

Na mulher, o acúmulo de massa óssea é menor durante o crescimento, em particular na puberdade, resultando em ossos menores, com região cortical mais fina e diâmetro menor (WIREN, 2005). Por outro lado, a melhor/maior formação óssea na puberdade, atingindo pico de massa óssea elevado na idade adulta (cerca de 35 - 40 anos) determina menores chances de atingir o limiar de fratura após a menopausa, prevenindo ou retardando a osteoporose (KRAHE, 2003; SOOT *et al*, 2005).

A acelerada perda de massa óssea gerada pelo processo de reabsorção dos osteoclastos realizado de forma mais profunda nas cavidades, leva à remoção de elementos esponjosos inteiros e perda da conexão entre os restantes, um fenômeno que ocorre devido à remoção do efeito pró-apoptótico do estradiol sobre os osteoclastos. Associado a isto, a ausência do estrogênio causa um aumento da prevalência de apoptose em osteoblastos e osteócitos (KOUSTENI *et al*, 2001; MANOLAGAS, KOUSTENI & JILKA, 2002; WIREN, 2005). Assim, o desbalanço entre formação e reabsorção óssea favorece o último, levando a uma

acelerada perda óssea representada por 2% do osso cortical e 5% do osso trabecular, por ano (CLARKE & KHOSLA, 2010; GUPTA *et al*, 2012).

Em mulheres, a osteoporose pode ser prevenida ou retardada maximizando o pico de massa óssea através de modificações no estilo de vida. Mudanças nos hábitos alimentares e comportamentais desde a infância, como a ingestão de dieta adequada para maior formação óssea e a prática de atividade física, contribuem para a melhor qualidade de vida no envelhecimento (SOOT *et al*, 2005). No Brasil, visando minimizar o surgimento da osteoporose, o Ministério da Saúde criou em 22 de outubro de 2011, o Dia Mundial de Combate à Osteoporose, uma campanha para prevenir a doença desde a infância (BRASIL, 2016).

O diagnóstico da osteoporose é estabelecido por mensuração da densidade mineral óssea, através da absorciometria de dupla energia de raios-X (DXA) em coluna vertebral, fêmur e/ou antebraço ou em fratura por fragilidade (SHIFREN & GASS, 2014). A densitometria óssea é considerada um biomarcador para riscos de fraturas nessas áreas do esqueleto (MILLER *et al*, 2005; GUPTA *et al*, 2012).

Algumas opções farmacológicas vem sendo indicadas para minizar a perda óssea e prevenir a osteoporose em mulheres com alto risco de fratura, entendendo-se que a terapia farmacológica deve ser individualizada, com base em avaliações risco-benefício e preferências pessoais. Por outro lado, as mulheres deveriam ser encorajadas a consumir /obter cálcio e vitamina D de forma adequada, assim como se engajar na prática regular de exercícios físicos, evitar o tabagismo, limitar o consumo de álcool e modificar o ambiente para reduzir os riscos de queda (SHIFREN & GASS, 2014).

1.3 **Ácidos graxos**

Os ácidos graxos são normalmente compostos de cadeias lineares de hidrocarbonetos com número par de átomos de carbono na molécula, podendo ser saturados ou insaturados, e representam os principais componentes de óleos e gorduras. Sua origem pode ser endógena, através da síntese de novo, hidrólise de triglicerídeos e reciclagem de lipídios de membrana e, também exógena, através de fontes alimentares (GIOIELLI, 1996; SCHAFFER, 2002).

A nomenclatura dos ácidos graxos é definida pela sua estrutura química, considerando a extensão da cadeia e o grau de saturação. Quanto a extensão da cadeia, os ácidos graxos são

classificados como de cadeia curta, contendo menos de 6 carbonos; de cadeia média, os que possuem entre 6 a 12 carbonos; de cadeia longa, os que possuem mais de 12 carbonos e; os de cadeia muito longa, com mais de 22 carbonos. Quanto à saturação, os ácidos graxos podem ser classificados como: a) saturados (AGS) - apresentam uma única ligação entre carbonos e são definidos como AGS de cadeia média (os ácidos capróico, caprílico e cáprico) e AGS de cadeia longa (os ácidos láurico, mirístico, palmítico e esteárico); b) monoinsaturados (AGMI) - contém uma dupla ligação em sua cadeia na conformação *cis*; c) poliinsaturados (AGPI) - contêm de 2 a 6 duplas ligações na conformação *cis* e estão dispostas em padrão metileno interrompido (LARSSON & QUINN, 1994; GIOIELLI, 1996).

Uma forma de representar os ácidos graxos insaturados é citando a posição do carbono que recebe a primeira dupla ligação; a contagem começa a partir do grupo metil terminal da molécula, estando a dupla ligação na configuração *cis* e separada por um grupo metileno. Assim, esses ácidos graxos podem ser divididos em famílias: ômega-9 (n-9) que compreende os ácidos oléico (18:1), eicosatrienóico (20:3), erúcico (22:1) e nervônico (24:1); ômega-7 (n-7) representada pelo ácido palmitoléico (16:1); ômega-6 (n-6) representada pelos ácidos linoléico (18:2), gama-linolênico (18:3), homo-gama-linolênico (20:3) e araquidônico (20:4) e; ômega-3 (n-3) representada pelos ácidos alfa-linolênico (18:3), eicosapentaenóico (20:5) e docosahexaenóico (22:6) (GIOIELLI, 1996; SALARI *et a*l, 2008).

Em geral, o ácido linoléico (LA) é designado como ômega-6, bem como, o ácido alfa-linolênico (ALA) é retratado como ômega-3 e, por sua vez, o ácido oléico como ômega-9. Importante ressaltar que estes são apenas exemplares em suas respectivas famílias. Outro ponto de atenção está relacionado a descrição que se observa na literatura sobre a razão ômega-6/ômega-3, a qual faz alusão a proporção entre ácido linoléico e alfa-linolênico.

Dentre as fontes alimentares que contém AGS, destacam-se os óleos de palma, de coco e de babaçu com AGS de cadeia média; enquanto os AGS de cadeia longa estão presentes na manteiga de cacau, gordura do leite, banha e sebo. Em relação aos AGMI, o ácido oléico tem como fontes os óleos de oliva, canola e alguns híbridos e, como exemplo de fonte do ácido palmitoléico se destaca o óleo de macadâmia. Dentre os AGPI, o linoléico está fortemente presente nos óleos de milho, soja, algodão, girassol e açafrão, enquanto, o alfa-linolênico está na linhaça, salmão, atum, cavalinha, anchova, dentre outros (VISENTAINER *et al*, 2000; HOLUB, 2002; TVRZICKA *et al*, 2011).

Os AGS e AGMI são considerados ácidos graxos não essenciais, pois conseguem ser sintetizados pelo organismo. Por sua vez, alguns ácidos graxos são considerados essenciais, como o linoléico, o linolênico e o araquidônico, por não serem sintetizados pelo organismo,

devido à falta de enzimas responsáveis pela dessaturação, as quais estão presentes apenas em plantas e algas marinhas. Dessa forma, se faz necessária a ingestão dietética diária desses ácidos graxos essenciais (RUXTON *et al*, 2007; ZEVENBERGEN *et al*, 2009).

1.3.1 Ácidos graxos no organismo

A composição lipídica da dieta tem recebido uma atenção particular, pois o tipo de lipídio ingerido influencia de forma diferenciada o metabolismo (MIELKE *et al*, 2006; FRANCO, 2009).

Em humanos, o LA e o ALA são necessários para manter sob condições normais as membranas celulares, as funções cerebrais e as transmissões dos impulsos nervosos, além de participar da transferência de oxigênio para o sangue, da síntese da hemoglobina e da divisão celular (MARTIN *et al*, 2006). O ácido docosahexaenóico (DHA) atua na formação, desenvolvimento e funcionamento do cérebro e da retina e, sua deficiência está associada com anormalidades no desenvolvimento do sistema visual e diminuição da acuidade visual (SANGIOVANNI & CHEW, 2005).

O consumo de ômega-6 está associado a mudanças significativas nos níveis sanguíneos de lipoproteínas, provocando a diminuição de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e de alta densidade (HDL), sem alterar os níveis de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (RICCARDIA, GIACCOB & RIVELLESE, 2003). A redução do HDL, isoladamente, promovida pelo ômega-6, é considerada um significativo fator de risco para doenças cardiovasculares. Relatos relacionam ômega-6 também a distúrbios da coagulação, inflamação e agregação plaquetária (NOAKES & CLIFTON, 1998; DORFMAN *et al*, 2005).

Os ácidos graxos da família ômega-3, particularmente o ácido eicosapentaenóico (EPA), interferem na produção de prostaglandina trombótica e tromboxano ou são transformados em prostaglandinas anti-trombóticas e apresentam ações vasculares e hemostáticas, demonstrando benefícios sobre doenças coronarianas e prevenção de doenças auto-imune, pela redução do processo inflamatório (VISENTAINER *et al*, 2000; WAHRBURG, 2004).

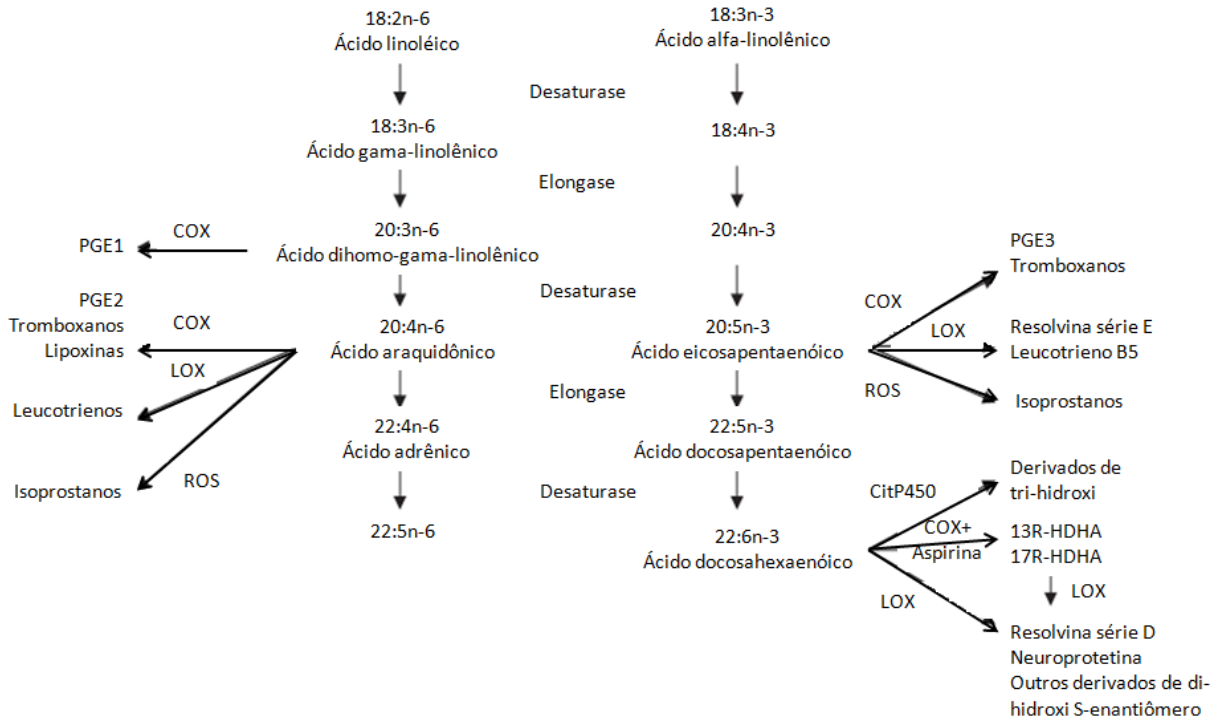
Em relação à composição corporal, muito se tem discutido a respeito da ação do ácido linoléico conjugado (CLA), que é considerado uma gordura *trans*, visto que há presença de dupla ligação na configuração *trans* e não são separadas por um grupo metileno. Em modelos

experimentais, a redução do peso e da gordura corporal não é consenso. Camundongos suplementados com 0,5% de CLA exibiram diminuição de 60% da gordura corporal e aumento de 14% na massa magra, enquanto ratos suplementados com a mesma quantidade apresentaram redução modesta de 15% – 25% da gordura corporal (PARK *et al*, 1999; AZAIN *et al*, 2000). Em humanos, os estudos com CLA são limitados e discordantes (MOURÃO *et al*, 2005), não sendo aprovada sua comercialização para fins de redução da gordura corporal (ANVISA, 2007).

Os ácidos graxos também influenciam o metabolismo ósseo, nos períodos de crescimento e desenvolvimento e, na vida adulta, reduzem o risco de fraturas de vértebras e fêmures. Sua ação ocorre pela modulação da biossíntese de prostaglandinas, produzidas pelas células osteogênicas, que são reguladoras da formação e da reabsorção ósseas (BARHMAN *et al*, 2000; WATKINS *et al*, 2001; SACCO *et al*, 2009). Como exemplo de moduladores do metabolismo ósseo, os AGPI de cadeia longa, principalmente os que contêm mais de 18 carbonos, são considerados os mais benéficos (KRUGER *et al*, 2010).

O LA é precursor do ácido araquidônico (AA), necessário para a síntese de prostaglandina E_2 (PGE_2) e leucotrienos da série 4 – ambos desempenhando ação pró-inflamatória. Além disso, PGE_2 é um potente modulador da remodelação óssea. Em excesso está associado à reabsorção óssea, enquanto, em baixa concentração estimula formação óssea (CORWIN, 2003). Por sua vez, o ALA é precursor do EPA e do DHA, fundamentais para a síntese de prostaglandina E_3 (PGE_3) e leucotrienos da série 5 (Figura 6). Ambos reduzem a produção dos derivados de AA, estimulam a formação óssea e tem ação anti-inflamatória (BARHMAM *et al*, 2000; KRUGER *et al*, 2010). O ALA aumenta a atividade da fosfatase alcalina e do fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-1), relacionados com a formação óssea (KRUGER & SCHOLLUM, 2005). A adição de ALA e EPA na dieta está associada à redução da atividade osteoclástica e do *turnover* ósseo e melhora da massa óssea, sendo descrito como tratamento experimental contra osteoporose (WATKINS, LI & SEIFERT, 2001; WATKINS *et al*, 2003; RAHMAN *et al*, 2009).

Figura 6 – Metabolismo de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa



Legenda: Ácido linoléico e ácido alfa linolênico são desaturados e elongados por enzimas desaturases/elongases para formar outros ácidos graxos. PGE1, protaglandinas E_1; PGE_2, prostaglandinas E2; PGE_3, prostaglandinas E3.
Fonte: adaptado de KRUGER *et al*, 2010.

Os benefícios do LA e do ALA para o metabolismo ósseo, a prevenção e terapêutica das doenças cardiovasculares, inflamatórias e metabólicas, estão relacionados ao consumo em quantidades apropriadas (CORWIN, 2003; RUXTON *et al*, 2007; DECKELBAUM, WORGALL & SEO, 2008). Assim, é importante ressaltar a proporção ômega-6/ômega-3, sendo várias as recomendações de ingestão diária estipuladas pelos órgãos de saúde. A Organização Mundial de Saúde e a *Food and Agriculture Organization* (FAO) recomendam valores para a razão ômega-6/ômega-3 entre 5:1 – 10:1. No Canadá, a *Scientific Review Committee* (SRC) recomenda valores entre 4:1 – 10:1 (SRC, 1990; WHO, 1995). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) propõe o consumo de 1g de EPA + DHA, 2g de ALA e 15g de LA, perfazendo a razão ômega-6/ômega-3 de 5:1 (ANVISA, 2001; KIM, STEEL & CHANG, 2005).

Estudos indicam que a baixa razão ômega-6/ômega-3 promove benefícios para a saúde, destacando a menor incidência de doenças cardiovasculares; redução nas inflamações decorrentes da artrite reumatóide; diminuição dos sintomas da asma e; melhor controle

glicêmico em indivíduos diabéticos (STORLIEN *et al*, 1996; JAMES & CLELAND, 1997; BROUGHTON *et al*, 1997; CONNOR, 2000).

No metabolismo ósseo, a alta razão ômega-6/ômega-3 está associada a efeitos negativos sobre a fisiologia óssea, com maior estímulo para a reabsorção óssea (KRUGER *et al*, 2010). Enquanto, a baixa razão ômega-6/ômega-3 reduz a produção de PGE_2, levando a formação óssea e redução da excreção urinária de cálcio (WATKINS *et al*, 2000; LUCIA, FITZPATRICK-WONG & WEILER, 2003; WEISS *et al*, 2005). Dessa forma, fica evidente que o aumento da ingestão de alimentos ricos em ácidos graxos da família do ômega-3 e a redução na razão ômega-6/ômega-3 são fatores importantes para a saúde.

1.3.2 Óleos de soja e de canola: fontes de AGPI

Os óleos vegetais são abundantes em AGPI e representam a principal fonte de lipídios da dieta dos brasileiros. Dentre os diversos tipos de óleos, o óleo de soja é o mais consumido pela população brasileira, representando 82% do total de calorias oriundas de óleos e gorduras vegetais. O grande consumo de óleo de soja se deve ao fato da grande oferta e do custo mais acessível; o preço menor que o dos demais óleos é determinante ao consumo por todas as classes sociais. Este fato decorre do Brasil ser o maior produtor e exportador mundial de soja desde 2003 (SIQUEIRA, 2004; LEVY-COSTA *et al*, 2005; ABIOVE, 2014).

O óleo de soja, rico em AGPI, é composto basicamente por 15% de ácidos graxos saturados, 23% de ácidos graxos monoinsaturados e 62% de ácidos graxos poliinsaturados (54% de LA e 8% de ALA). A elevada proporção de ômega-6 determina uma alta razão ômega-6/ômega-3, que é igual a 6,75 (MCDONALD, 2005).

O óleo de canola é um termo genérico, derivado de *CANadian Oil Low Acid* . Esse óleo foi denominado pela diretoria da Associação de Colza no Canadá em 1970, e em sua descrição oficial consta que deve conter baixos fatores antinutricionais, como o ácido erúcico e o glicosinolato, sendo indicado menos de 2% de ácido erúcico e 3 mg de glicosinolato por grama de óleo (CANOLA COUNCIL OF CANADA, 1999). A cultura da canola foi introduzida no Brasil no início dos anos 90, com o intuito de produzir óleo de qualidade para o consumo humano. A produção do óleo ocorre a partir do melhoramento genético de três espécies de plantas da família das crucíferas, gênero *Brassica* (PRADO, LAGE & SCAPINELLO, 2001). O baixo consumo do óleo de canola, que corresponde a menos de 10%

do total de calorias oriundas de óleos vegetais, consumidas nos Estados Unidos e Brasil, é decorrente do fato de ser o óleo vegetal de maior custo disponível no mercado (RUXTON *et al*, 2007; LEVY-COSTA *et al*, 2005).

Em sua composição, o óleo de canola contem 7% de AGS, 61% de AGMI e 32% de AGPI (21% de LA e 11% de ALA), sendo considerado rico em ácidos graxos monoinsaturados e, apresentando a razão ômega-6/ômega-3 igual a 1,90, considerada baixa. O ácido graxo oléico corresponde a 98% do total de AGMI presentes no óleo de canola (PRZYBYLSKI, 1999; MCDONALD, 2005).

Diversos estudos experimentais são realizados com diferentes óleos vegetais para avaliar o efeito dos ácidos graxos sobre o metabolismo. Os resultados mostraram que o consumo de dietas contendo óleo de soja proporciona maior ganho de peso corporal em roedores do que o consumo de dieta baseada em óleo de peixe, rico em ômega-3 (IKEMOTO *et al*, 1996). Outro estudo revelou que ratos adultos/velhos alimentados com dieta suplementada com óleo de soja apresentaram aumento na pressão arterial, comparados a ratos alimentados com dieta à base de óleo de canola (ÁGUILA *et al*, 2002). Ainda comparando o efeito do consumo dos óleos de soja e de canola por ratos jovens, fica evidente que a dieta cuja fonte lipídica é o óleo de canola é benéfica por reduzir a massa de tecido adiposo abdominal e a área dos adipócitos e melhorar a sensibilidade à insulina. Porém, é prejudicial à integridade óssea, por reduzir sua densidade mineral (COSTA *et al*, 2012).

2 **JUSTIFICATIVA**

O tecido ósseo pode ser modulado por fatores nutricionais e hormonais. Em relação aos fatores nutricionais, uma das recomendações para beneficiar o metabolismo ósseo é o consumo de alimentos com baixa razão ômega-6/ômega-3. Ademais, os hormônios sexuais femininos apresentam um efeito protetor e atuam na manutenção da massa óssea. Na menopausa observa-se maior reabsorção óssea devido à perda do efeito protetor do estradiol sobre os ossos. Dessa forma, nota-se a relevância de esclarecer sobre a forma de ação dos ácidos graxos sobre a estrutura óssea nos vários estágios da vida, em especial da mulher.

Nesse contexto, alguns questionamentos surgem: a) O consumo de dieta com baixa razão ômega-6/ômega-3, na puberdade, pode estimular maior pico de massa óssea? E a manutenção do consumo dessa dieta na vida adulta previne risco de fratura óssea? b) O maior pico de massa óssea pode reduzir a fragilidade óssea na deficiência de esteróides sexuais?

Assim, considerando a influência de fatores hormonal e nutricional sobre a integridade óssea, é relevante conhecer o papel dos ácidos graxos da dieta sobre o metabolismo ósseo, na presença e na deficiência de esteróides sexuais femininos, avaliando períodos importantes para o processo de remodelação óssea, como a puberdade, a vida adulta e a fase de perda da função gonadal. Tais esclarecimentos podem facilitar a escolha da fonte lipídica utilizada na dieta que favoreça o metabolismo ósseo nas mulheres.

3 **OBJETIVOS**

3.1 **Objetivo geral**

Avaliar o efeito de dieta contendo óleo de canola sobre a composição corporal e a estrutura óssea de ratas, ao longo do desenvolvimento, na presença e na deficiência de esteróides sexuais femininos.

3.2 **Objetivos específicos**

Analisar aos 60, 90 e 180 dias de vida de ratas hígidas ou ovariectomizadas:

- O desenvolvimento corporal;
- Aspectos estruturais e radiológicos de fêmur e coluna lombar;
- Aspectos histomorfométricos de pâncreas, tecido adiposo e fígado;
- Os indicadores do metabolismo glicídico e do perfil lipídico;
- As concentrações plasmáticas de insulina e estradiol.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho se baseou no tipo de pesquisa explicativa/experimental. Nesse tipo de pesquisa há preocupação em identificar fatores que determinam a ocorrência de fenômenos, manipulando alguns aspectos da realidade dentro de condições predefinidas, com o intuito de verificar a relação de causalidade entre variáveis (GIL, 1991; MORAES & MONTALVÃO, 1998). Para alcançar os objetivos foi empregado o método hipotético-indutivo, com a percepção de lacuna nos conhecimentos, formulação de hipótese e testes da predição da ocorrência de fenômenos (LAKATOS & MARCONI, 1991). Os dados obtidos pela pesquisa foram analisados de forma quantitativa e qualitativa.

O presente estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (IBRAG/UERJ), com protocolo nº CEUA/040/2013.

4.1 Animais

Fêmeas Wistar, aos 3 meses de vida foram acasaladas com machos em um sistema poligâmico, na proporção de 3:1 (3 fêmeas para 1 macho). Após a confirmação da gestação, as fêmeas foram identificadas e alocadas em caixas individuais. No dia do nascimento dos filhotes foi realizado um reajuste da ninhada, permanecendo com as lactantes somente 6 filhotes fêmeas, com o intuito de melhorar a performance lactotrófica (FISHBECK & RASMUSSEN, 1987). As fêmeas lactantes tiveram livre acesso à água e a ração comercial (Nuvilab®). Após 21 dias de lactação, os filhotes foram desmamados, alocados juntos em uma gaiola para organização dos grupos experimentais através de seleção aleatória dos animais. Cada grupo experimental continha 8 animais.

Os animais destinados à experimentação eram fêmeas, linhagem *outbread*, nulíparas, acompanhadas dos 21 aos 180 dias de vida. Foram mantidas quatro ratas por gaiola de polipropileno, dimensão 50x35x20cm, alocadas no biotério do Laboratório de Fisiologia Endócrina do IBRAG/UERJ, sob condições controladas de: temperatura (22°±2°C), umidade

relativa (50%±5%), ciclo artificial de claro-escuro de 12 horas (Luz de 6:00h às 18:00h) e exaustão de ar constante. Os animais tiveram livre acesso à água e a ração manufaturada.

4.2 **Delineamento experimental**

Aos 21 dias de vida foram anestesiados e eutanasiados 7 animais com o intuito de obter um perfil murino padrão antes de iniciar o modelo experimental. Esse ponto inicial de observação funciona como um controle para observar homogeneidade entre as amostras.

A partir do desmame, 21 dias de vida, as ratas receberam dieta manufaturada, contendo como fonte lipídica os óleos de soja ou de canola, e foram divididas em dois grupos:

- Grupo S (n=32) – ratas alimentadas com ração contendo de óleo de soja;
- Grupo C (n=32) – ratas alimentadas com ração contendo óleo de canola.

Aos 60 e aos 90 dias de idade, 8 animais de cada grupo foram anestesiados e eutanasiados para análises. As demais ratas do grupo permaneceram recebendo as rações manufaturadas.

Aos 90 dias de vida foi realizada ovariectomia (OVX) ou pseudo-operação (Sham) nos animais, e a partir deste ponto foram formados quatro grupos experimentais:

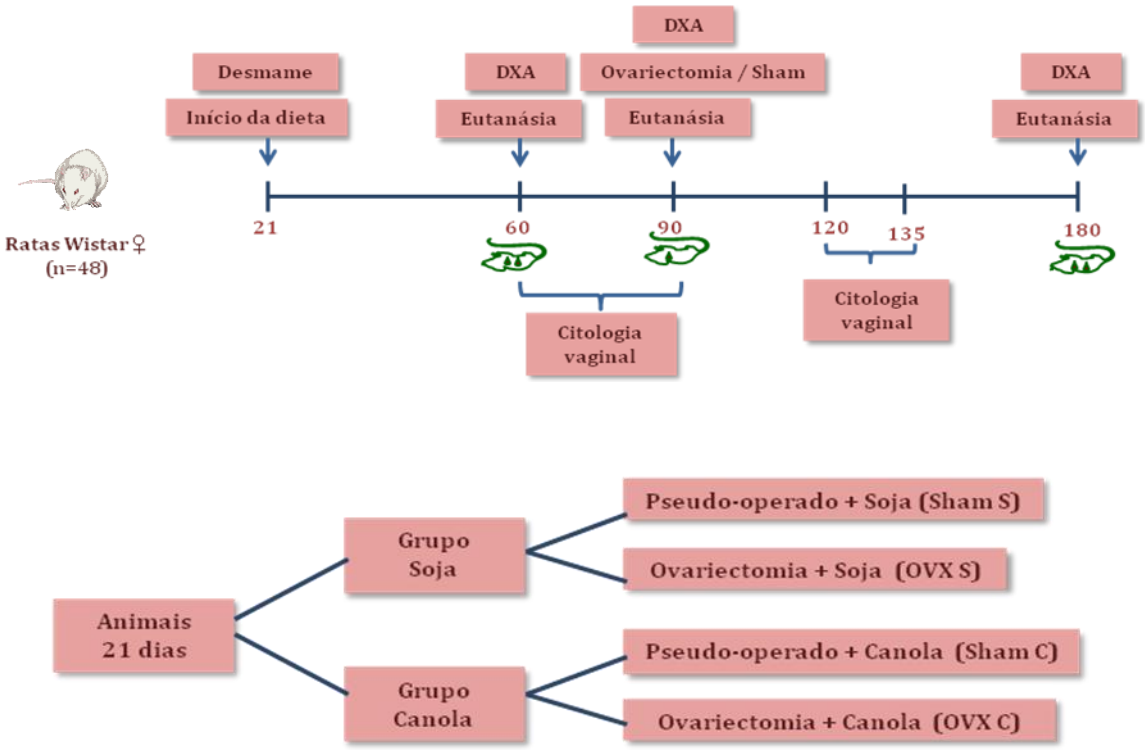
- Grupo Sham S (n=8) – ratas pseudo-operadas alimentadas com ração contendo de óleo de soja;
- Grupo OVX S (n=8) – ratas ovariectomizadas alimentadas com ração contendo óleo de soja;
- Grupo Sham C (n=8) – ratas pseudo-operadas alimentadas com ração contendo óleo de canola;
- Grupo OVX C (n=8) – ratas ovariectomizadas alimentadas com ração contendo óleo de canola.

Durante todo o período experimental foram verificados a evolução da massa e do comprimento corporal, semanalmente, e a ingestão alimentar a cada 4 dias. As aferições de ingestão alimentar, massa e comprimento corporais foram sempre realizadas no mesmo horário, utilizando balança digital (MF Filizola).

A ingestão diária média de cada animal foi determinada a partir do resto-ingestão. Foram ofertadas aos animais 300g de ração por gaiola, as sobras eram pesadas e subtraídas da quantidade inicial ofertada, dividindo este valor pelo número de animais na gaiola e pelo período em dias.

Dos 60 dias aos 180 dias de vida foi realizada citologia vaginal para verificar a fase do ciclo estral. Ao final dos períodos experimentais de 60, 90 e 180 dias, e após um jejum de 12 horas, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de Avertin (Tribromoethanol - 300mg/kg) e eutanasiados através do método de exsanguinação por punção cardíaca. O sangue e os tecidos foram coletados para posteriores análises. O esquema do delineamento experimental pode ser observado na Figura 7.

Figura 7 – Delineamento experimental



Fonte: A autora, 2016.

4.3 **Produção da ração**

A ração manufaturada foi preparada, na fábrica de ração do Departamento de Ciências Fisiológicas do IBRAG/UERJ, de acordo com a recomendação do *American Institute of Nutrition* (AIN), para estudos de nutrição experimental com roedores.

Para animais em crescimento, o AIN recomenda a utilização de dieta de crescimento (AIN-93G), cuja composição contém 7% de lipídios de origem vegetal, sendo o óleo de soja a fonte lipídica indicada. Para animais adultos é recomendada uma dieta de manutenção (AIN-93M) contendo 4% de lipídios, também representado pelo óleo de soja. A diferença entre as dietas de crescimento e de manutenção está relacionada com o percentual lipídico, percentual protéico (caseína) e quantidade de minerais (Mix Mineral G ou M) (REEVES, 1997).

Para elaboração da dieta utilizada neste estudo, a dieta de crescimento teve apenas a substituição do óleo de soja por óleo de canola (COSTA *et al*, 2012). A dieta de manutenção foi elaborada com a mistura de 2% de óleo de soja e 2% de óleo de canola, já que na quantidade de 4% o óleo de canola carece de ácidos graxos essenciais (família ômega-6). Para roedores é recomendada a ingestão diária por kg de ração de 12g de ômega-6 e 2g de ômega-3 (REEVES, 1997), portanto, somente com a mistura dos óleos é possível alcançar a quantidade necessária de ômega-6. As dietas utilizadas neste estudo estão descritas na Tabela 1.

Os ingredientes da ração foram pesados em balança digital e misturados em batedeira industrial (Hobart), em ciclo leve por 15 minutos, sendo adicionados ao final o óleo e água filtrada aquecida, misturados até formar uma massa. Após esse processo, a massa foi separada em *pellet* e colocada para secagem, em estufa a 50°C por 24 horas. Para minimizar a oxidação da fonte lipídica, a ração foi preparada quinzenalmente, embalada em sacos plásticos e estocada à temperatura de 4°C, para a conservação, até o momento de sua distribuição aos animais.

Tabela 1 – Composição nutricional das rações purificadas, segundo o AIN

Conteúdo da ração (g/100g)	**Dieta de Crescimento**		**Dieta de Manutenção**	
	S	**C**	**S**	**C**
Caseína[1]	20	20	14	14
Amido de milho[1]	54.34	54.34	63	63
Sacarose[2]	10	10	10	10
Óleo de soja[3]	7	---	4	2
Óleo de canola[3]	---	7	---	2
Celulose[4]	5	5	5	5
Mix mineral G[4]	3.5	3.5	---	---
Mix mineral M[4]	---	---	3.5	3.5
Mix vitamínico[4]	1	1	1	1
L-cistina[4]	0.3	0.3	0.18	0.18
Bitartarato de colina[4]	0.25	0.25	0.25	0.25
Percentual energético	**Kcal %**	**Kcal %**	**Kcal %**	**Kcal %**
Carboidrato	65	65	76	76
Proteína	17	17	12	12
Lipídio	17	17	10	10
Kcal/g	4.7	4.7	3.6	3.6
Ácidos graxos	**Em 7g de óleo**	**Em 7g de óleo**	**Em 4g de óleo**	**Em 4g de óleo**
Saturados	16.65%	8.32%	16.65%	12.49%
Monoinsaturados	24.15%	60.82%	24.15%	44.99%
Poliinsaturados	59.15%	30.82%	59.15%	42.49%
Relação ômega-6/ômega-3	**6,7**	**1,9**	**6,7**	**3,9**

Nota: Composição nutricional das dietas experimentais. *As misturas de vitaminas e minerais seguiram as recomendações da AIN-93 para alimentação de roedores. Descrição dos ingredientes: 1= Farmos®; 2= União®; 3= Liza®; 4= Prag soluções®.

Fonte: A autora, 2016.

4.4 **Avaliação do ciclo estral**

Desde os 60 até aos 90 dias de vida, as ratas foram submetidas à coleta de secreção vaginal para avaliação do ciclo estral através da técnica de citologia vaginal. A citologia foi realizada sempre no horário das 13:00h às 14:00h. A secreção vaginal foi colhida com auxílio de finas ponteiras plásticas acopladas a um bulbo, contendo 20μL de solução salina NaCl 0.9%, e cuidadosamente introduzida no orifício vaginal das ratas. O material coletado foi distribuído em lâminas e analisado a fresco por meio de microscópio óptico com objetiva de 10x (Olympus, modelo BX40, Japão), com o intuito de observar as características celulares e identificar as fases do ciclo estral (Tabela 2). O acompanhamento das sequências de ciclos estrais das ratas visa avaliar as condições de funcionamento das gônadas, e assim, indiretamente, a influência sistêmica do estrogênio endógeno. Para compor o grupo experimental foram selecionadas somente as ratas que apresentavam ciclos estrais regulares. Entende-se por ciclo estral regular a presença em sequência das fases: proestro – estro – metaestro – diestro, além da duração correta de cada fase (MARCONDES, BIANCHI & TANO, 2002; ARMADA *et al*, 2006).

A avaliação do ciclo estral foi reiniciada após 30 dias da intervenção cirúrgica, sendo realizada por um período de 15 dias, para verificar a manutenção de ciclos regulares nas ratas pseudo-operadas, assim como, o estágio de anestro em ratas ovariectomizadas.

Tabela 2 – Características das fases do ciclo estral de ratas Wistar

Fases do ciclo estral	Características citológicas
Proestro (12 horas)	Presença de numerosas células epiteliais nucleadas. Presença de muco.
Estro (24 horas)	Numerosas células queratinizadas.
Metaestro (24 horas)	Igual proporção entre células queratinizadas, células epiteliais nucleadas e leucócitos.
Diestro (24 – 48 horas)	Numerosos leucócitos.

Fonte: MARCONDES, BIANCHI & TANNO, 2002.

4.5 **Ovariectomia**

Aos 90 dias de vida, as ratas foram anestesiadas com injeção intraperitoneal de Avertin e submetidas à cirurgia para remoção bilateral dos ovários (ovariectomia – OVX). Foi realizada a tricotomia e assepsia do local cirúrgico e feitas duas pequenas incisões para-espinhais na região dorsal, entre as costelas mais inferiores e a crista ilíaca. Após identificação dos ovários, as tubas uterinas foram suturadas e ambos os ovários excisados. No final do procedimento foi realizada a sutura da parede muscular e da pele do animal. O grupo pseudo-operado (Sham) recebeu apenas a incisão cirúrgica sem a retirada das gônadas, para proporcionar o estresse cirúrgico (ARMADA *et al*, 2006; SANTANA *et al*, 2011). Após a cirurgia, todos os animais receberam solução analgésica de dipirona (100mg/kg) via oral.

4.6 **Teste de tolerância à glicose intraperitoneal (TTGI)**

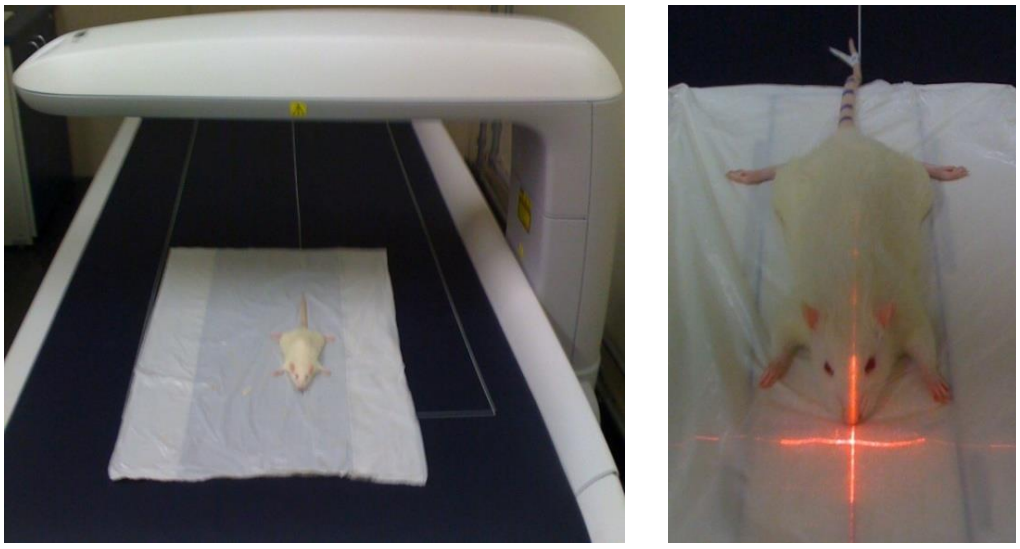
Os animais foram mantidos em jejum por 6 horas para a realização do teste de tolerância à glicose intraperitoneal (TTGI), na véspera das avaliações de 60, 90 e 180 dias. A primeira coleta de sangue, considerada o ponto inicial da curva (ponto 0, glicemia de jejum) foi realizada através de uma pequena incisão na cauda dos animais, permitindo mensurar a glicemia através de fitas reagentes e glicosímetro (ACCU-CHEK® Performa, Roche). Em seguida, foi injetada solução de glicose (2g/kg PC), intraperitoneal, para a determinação da glicemia nos tempos 30, 60, 90 e 120 minutos após administração da solução. A glicemia foi expressa em mg/dL.

4.7 **Absorciometria de Feixe Duplo de Raios-X (DXA)**

Antes da ovariectomia, aos 90 dias de vida, e ao final dos períodos experimentais de 60, 90 e 180 dias de vida, as ratas foram anestesiadas com injeção intraperitoneal de Avertin e submetidas à avaliação da composição corporal através do aparelho de DXA (Lunar DXA 200368 GE instrument, Wisconsin, USA). Os animais foram posicionados em decúbito

ventral (Figura 8) e o exame densitométrico avaliou a gordura corporal total, a gordura localizada no tronco, a massa magra total e do tronco, a densidade mineral óssea (DMO), o conteúdo mineral ósseo (CMO) e a área óssea de cada animal. A análise das imagens foi realizada com auxílio de software específico (Encore 2008. Version 12.20 GE Healthcare), de acordo com protocolos descritos previamente (LUKASKI *et al*, 2001; GLICKMAN *et al*, 2004; TSUJIO *et al*, 2009).

Figura 8 – Exame densitométrico realizado em ratas



(a) (b)

Legenda: (a) Avaliação da composição corporal de rata no aparelho DXA (vista frontal); (b) Rata na posição de decúbito ventral.
Fonte: A autora, 2016.

4.8 **Análises plasmáticas**

O sangue coletado através de punção cardíaca foi acondicionado em tubos heparinizados (10 UI/ml) e centrifugado a 3000rpm (centrífuga Hitachi CR22, USA), por 15 minutos. O plasma obtido foi armazenado a -20^{o} C para posteriores análises.

As dosagens de triglicerídeos, colesterol, HDL-colesterol, aspartato aminotransferase, alanina transaminase, albumina, proteínas totais, cálcio, fósforo e fosfatase alcalina foram realizadas por método colorimétrico, através de aparelho analisador automático de bioquímica (Bioclin BS-120®, Quibasa – Química Básica Ltda/Belo Horizonte – MG). As concentrações

de VLDL-colesterol e LDL-colesterol foram obtidas através da Fórmula de Friedwald (1 e 2). Todos os resultados foram expressos em mg/dL.

Fórmula de Friedwald → VLDL-c = triglicerídeos / 5 (1)

Fórmula de Friedwald → LDL-c = colesterol total – HDL-c – VLDL-c (2)

As concentrações plasmáticas de insulina e de estradiol foram determinadas por radioimunoensaio específico, através de Kit comercial (MP Biomedicals, Inc., CA, USA). As análises foram realizadas em duplicata e a quantificação foi efetuada em contador gama (Gamma-C12, USA). O limite de detecção foi de 4,6 µUI/mL e 1,4 pg/mL e a variação intra-ensaio foi de 10,7 µUI/mL e 25,4 pg/mL, para insulina e estradiol, respectivamente.

4.9 **Índice de HOMA**

Para determinar o grau de sensibilidade periférica à insulina e a capacidade funcional da célula beta pancreática foi utilizado o Modelo de Avaliação da Homeostasia (*Homeostasis Model Assessment* – HOMA). Estes modelos matemáticos (3 e 4) foram desenvolvidos como uma forma alternativa de quantificar a resistência insulínica e a atividade da célula beta em humanos, mas vem sendo empregado também em estudos experimentais (COSTA *et al*, 2013). Para isso são utilizadas como variáveis a glicemia e a insulinemia de jejum (TURNER & HOLMAN, 1979; MATTHEWS *et al*, 1985).

HOMA-IR→ insulina de jejum (µU/mL) x glicose de jejum (mmol/L) / 22,5 (3)

HOMA-β→ 20 x insulina de jejum (µU/mL) / glicose de jejum (mmol/L) - 3,5 (4)

4.10 **Coleta de órgãos e processamento dos tecidos**

Foram coletados e pesados em balança de precisão: fígado, pâncreas, gordura visceral (retroperitoneal, mesentérica e gonadal), ovário, útero, fêmur e coluna lombar.

4.10.1 Processamento e análise histomorfométrica de fígado, pâncreas e tecido adiposo

Uma amostra de tecido adiposo retroperitoneal, um pedaço do fígado e a região da cauda do pâncreas foram fixados, por 72 horas e 48 horas, respectivamente, em formol tamponado a 10%. Após fixação seguiu o protocolo convencional de rotina histológica, passando por baterias crescentes de álcool - para desidratar o tecido, diafanização com xilol, banhos de parafina e emblocamento com parafina.Os blocos de parafina foram seccionados utilizando-se micrótomo (Microtec-CUT 4050). Cortes escalonados de 7µm foram coletados em lâminas e corados com Hematoxilina-Eosina (HE). Neste método escalonado para cada 2 secções histológicas seriadas coletadas pula-se 20 secções, e no final foram feitas 4 lâminas por animal contendo 4 cortes em cada.

Para análise histomorfométrica, secções histológicas foram observadas e as imagens capturadas utilizando um sistema de vídeo-microscopia (microscópio óptico Olympus BX40 e câmara de vídeo Optronics 1-CCD). As imagens foram capturadas no formato TIFF, com tamanho de 1360x1024 pixels e calibradas de acordo com a objetiva utilizada para obtenção da imagem. As análises morfométricas foram realizadas com o auxílio do Software *Image J* (NIH, USA - http://rsb.info.nih.gov/ij/).

Imagens do tecido adiposo retroperitoneal foram capturadas com objetiva de 20x para mensurar a área do adipócito, conforme protocolo descrito (SANTANA *et al*, 2011). Foi delimitada uma área de 60000 μm^2 e mensurada a área dos adipócitos contidos nesse espaço, sendo eliminados da análise os adipócitos interceptados pelas linhas proibidas que delimitem a área. A área dos adipócitos foi expressa em μm^2.

A área da ilhota pancreática foi mensurada em secções histológicas do pâncreas, utilizando objetiva de 20x. O perfil de 20 ilhotas pancreáticas por animal foi selecionado randomicamente e analisado. Tal análise foi realizada por um processo semi-automático, com

o auxílio do cursor, onde a ilhota pancreática foi contornada e o programa avaliou a área em μm^2, conforme protocolo previamente descrito (RÊGO *et al*, 2014).

As secções histológicas do fígado foram capturadas utilizando objetiva de 20x e 40x. As imagens foram utilizadas somente para análise morfológica, buscando verificar presença ou ausência de anomalias teciduais.

4.11 **Quantificação de triglicerídeo, colesterol e glicogênio hepáticos**

As análises hepáticas foram baseadas em protocolo previamente descrito (PEIXOTO-SILVA *et al*, 2014).

Uma amostra de 50 mg de fígado foi coletada e armazenada em -80ºC para análise de triglicerídeo e colesterol hepático. As amostras foram picotadas, adicionado 1 mL de álcool isopropílico e homogeinizadas em sonicador. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 2.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado, disposto em tubos do tipo eppendorff e foi adicionada solução reagente de triglicerídeo ou colesterol (kit Bioclin). A amostra foi agitada em vórtex e mantida em banho-maria a 37°C por 10 minutos. A absorbância da amostra foi quantificada em espectrofotômetro e os resultados expressos em mg/dl por mg de tecido.

Para determinação de glicogênio hepático foi coletada 500 mg de tecido e armazenada em -80°C para posterior análise. As amostras foram homogeinizadas em 1 ml de ácido tricloroacético 10% e centrifugadas a 3.000 rpm por 15 minutos. Foram coletados 500 µl de sobrenadante e adicionado a 1,5 ml de álcool absoluto, sendo a mistura armazenada em geladeira, *overnight*. Em seguida, a mistura foi centrifugada (3.000 rpm, 15 min, 4°C) e o sobrenadante foi descartado. O pellet (glicogênio) foi dissolvido em 2 ml de água destilada e 250 µl de HCl 1N, e fervido em banho-maria a 60°C por 5 minutos. A mistura foi resfriada e neutralizada com 40 µl de NaOH 1N. A glicose produzida por hidrólise do glicogênio foi mensurada em 500 µl do sobrenadante, usando kit comercial (Glucox, Doles, Goiânia - GO). A absorbância da amostra foi quantificada em espectrofotômetro e os resultados expressos em mM de glicose/g de tecido.

4.12 **Análises ósseas**

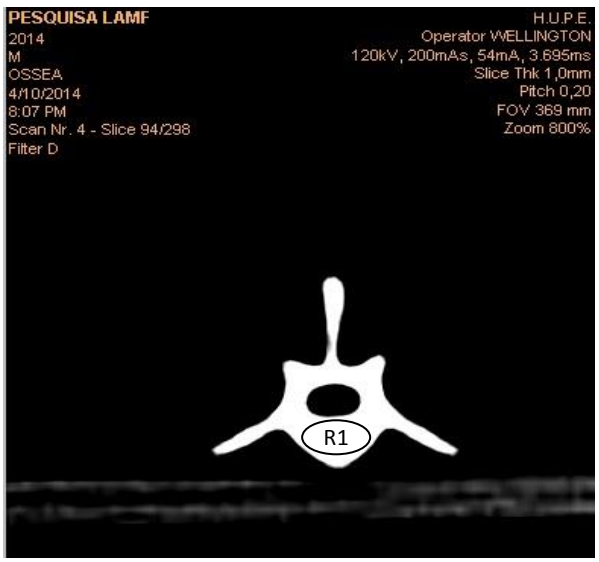
O fêmur esquerdo e a coluna lombar, entre a primeira e a sexta vértebra (VL1-VL6), foram limpos de tecidos moles e armazenados em tubos *Falcon* contendo solução salina NaCl 0,9%.

Foram realizadas as seguintes medidas: a) no fêmur – distância entre as epífises; distância entre os trocanteres; largura do ponto médio da diáfise; b) coluna lombar – excisada e medida a altura da quarta vértebra (VL4). Essas mensurações ósseas foram realizadas com auxílio de paquímetro digital com precisão de leitura de 0,01 milímetros.

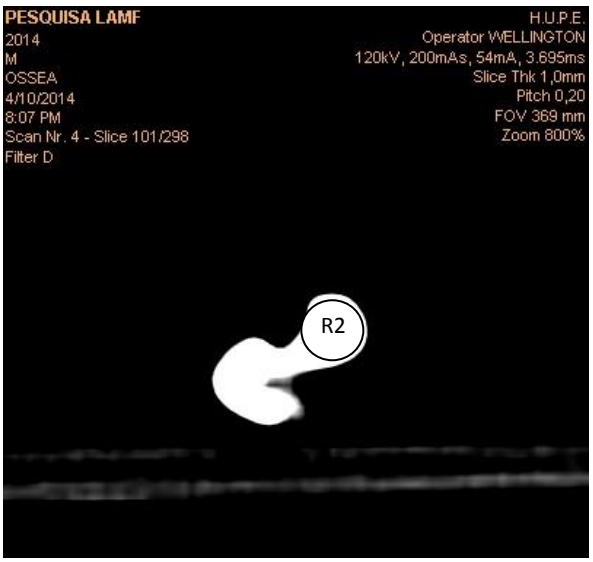
Após as medidas, fêmur e VL4 foram pesadas em balança de precisão e armazenados para posterior análise por DXA. Para tal, as peças ósseas foram colocadas em recipiente de plástico contendo volume constante de arroz, a fim de simular as condições dos tecidos moles, conforme protocolos previamente estabelecidos (COSTA *et al*, 2011; COSTA *et al*, 2012; RÊGO *et al*, 2014). Através do DXA foram avaliados a densidade (DMO) e o conteúdo mineral ósseo (CMO) e a área óssea do fêmur e da VL4.

Os ossos também foram analisados por meio de tomografia computadorizada (Tomógrafo modelo helicoidal HISPEED, GE®). As imagens de fêmur e VL4 foram obtidas através de cortes axiais de espessura de 1mm. De acordo com protocolos descritos anteriormente (COSTA *et al*, 2011; COSTA *et al*, 2012; RÊGO *et al*, 2014), a radiodensidade (expresso em unidades de Hounsfield, HU) na região da cabeça do fêmur e no corpo vertebral foi medida com auxílio do software Philips DICOM Viewer (Figura 9).

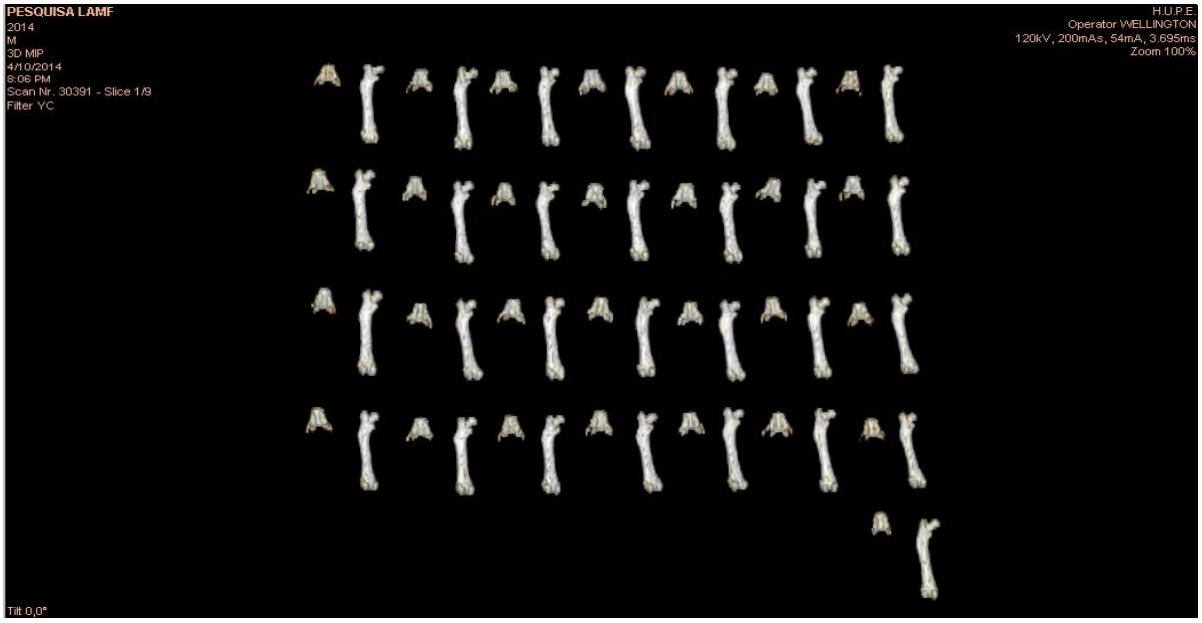
Figura 9 – Imagens obtidas por meio de Tomografia Computadorizada (TC)



(a)



(b)



(c)

Legenda: (a) Quarta vértebra lombar da coluna vertebral; (b) Fêmur esquerdo; (c) Imagem em 3D das peças ósseas. Regiões de interesse para análise de radiodensidade: (R1) Corpo vertebral e (R2) Cabeça do fêmur.

Fonte: A autora, 2016.

4.13 **Análise estatística**

O software utilizado foi o *GraphPad Prism 5* (GraphPad Software, www.graphpad.com, EUA), sendo os resultados expressos como média±erro padrão da média (EPM), considerando o nível de significância de $p<0.05$. Todos os resultados foram previamente analisados com o teste de normalidade Kolmogorov-Sminorv para verificar se as amostras apresentavam ou não uma distribuição paramétrica. Os resultados de ingestão alimentar, massa e comprimento corporais foram analisados através do método de análise de variância (ANOVA) bivariada, seguida do pós-teste de Bonferroni. Nos resultados do período experimental de 60 e 90 dias foram utilizados o teste *t* de Student. Nos resultados do período experimental de 180 dias foi utilizado o método de ANOVA univariada, seguida do pós-teste de comparação múltipla Newman-Keuls.

5 **RESULTADOS**

Os resultados são apresentados por período experimental específico. Os dados são descritos, primeiramente, com uma visão geral da composição corporal dos animais; seguidos dos dados bioquímicos, das análises histológicas, e por fim, das análises ósseas.

5.1 **Animais de 21 dias**

As medidas da composição corporal e os dados bioquímicos dos animais ao desmame, 21 dias de vida, foram analisados para estabelecer um padrão inicial do perfil murino antes de uma intervenção experimental. A massa corporal ao desmame é em torno de 46 gramas e o comprimento corporal atinge 20 cm. Todos os dados podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3 – Medidas corporais e bioquímicas de ratas aos 21 dias de vida

Medidas	Técnica utilizada	Fêmeas 21 dias
Massa corporal (g)	Medição corporal	46,50±0,682
Comprimento corporal (cm)	Medição corporal	20,17±0,155
Massa gorda total (g)	DXA	25,43±0,895
Massa magra total (g)	DXA	14,86±0,857
Massa gorda do tronco (g)	DXA	20,43±0,428
Massa magra do tronco (g)	DXA	12,43±0,719
Gordura do tronco (%)	DXA	62,70±1,84
Gordura total (%)	DXA	63,23±1,86
CMO (g)	DXA	1,44±0,057
DMO (g/cm²)	DXA	0,067±0,001
Área óssea (cm²)	DXA	21,29±0,606
Gordura visceral (g)	Pesagem de órgãos	0,397±0,031
Fígado (g)	Pesagem de órgãos	1,711±0,021
Pâncreas (g)	Pesagem de órgãos	0,126±0,009
Ovário (g)	Pesagem de órgãos	0,026±0,002
Útero (g)	Pesagem de órgãos	0,019±0,001
Glicemia jejum (mg/dl)	Dosagem plasmática	108,8±1,985
Colesterol (mg/dl)	Dosagem plasmática	70,83±4,976
Triglicerídeos (mg/dl)	Dosagem plasmática	35,71±3,503
HDL-c (mg/dl)	Dosagem plasmática	21,50±3,149
LDL-c (mg/dl)	Dosagem plasmática	42,30±3,572
VLDL-c (mg/dl)	Dosagem plasmática	7,143±0,701
Proteínas totais (mg/dl)	Dosagem plasmática	3,171±0,111
Albumina (mg/dl)	Dosagem plasmática	2,283±0,284
Cálcio (mg/dl)	Dosagem plasmática	8,471±0,341
Fósforo (mg/dl)	Dosagem plasmática	7,643±0,399
Fosfatase alcalina (mg/dl)	Dosagem plasmática	151,0±6,790
Aspartato aminotransferase (mg/dl)	Dosagem plasmática	125,2±6,665
Alanina transaminase (mg/dl)	Dosagem plasmática	14,20±3,056

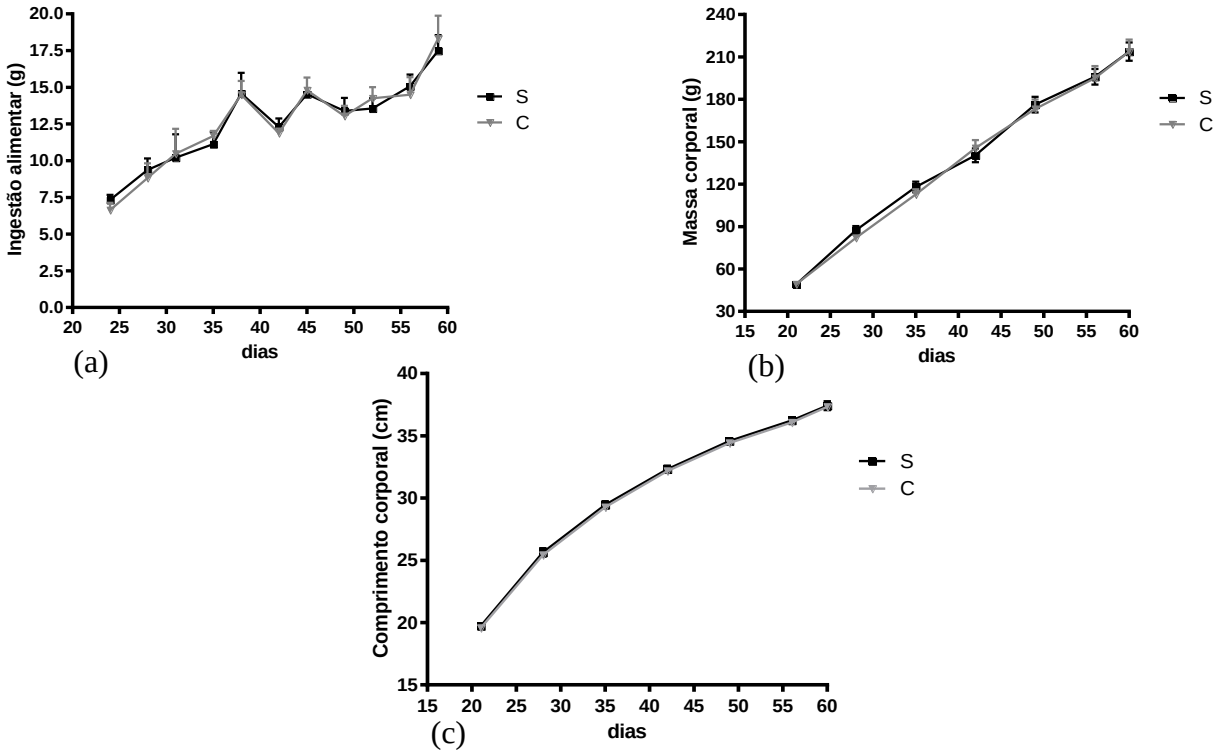
Nota: Análises de fêmeas após desmame, 21 dias de vida. N=7. Valores expressos em média±epm.
Fonte: A autora, 2016.

5.2 **Período experimental de 60 dias**

5.2.1 Evolução da ingestão alimentar, massa e comprimento corporais

Dos 21 até os 60 dias de vida, os animais não apresentaram diferença significativa entre os grupos em relação à ingestão alimentar, massa e comprimento corporais. Inicialmente, o consumo diário médio de ração por animal foi de 6,98 gramas, aumentando gradativamente até atingir a média de 17,90 gramas no final do período experimental. A massa corporal média dos animais, aos 21 dias de vida, foi de 49,15±1,25g e o comprimento corporal foi de 19,65±0,15cm, e seguindo um crescimento exponencial, aos 60 dias de vida, alcançaram massa corporal de 213,7±7,5g e comprimento médio de 37,37±0,25cm. Esses resultados podem ser observados no Gráfico 1 (A-C).

Gráfico 1 – Ingestão alimentar, massa e comprimento corporais de ratas aos 60 dias de vida



Legenda: (a) Ingestão alimentar; (b) Massa corporal; (c) Comprimento corporal das ratas de 21 aos 60 dias de vida. S (n=8, animais alimentados com dieta contendo óleo de soja) e C (n=8, animais alimentados com dieta contendo óleo de canola). Valores são apresentados em média±epm. ANOVA bivariada, seguida do pós-teste Bonferroni.
Fonte: A autora, 2016.

5.2.2 Análise da composição corporal por DXA

No final do período experimental de 60 dias de vida não houve diferença significativa entre os grupos em relação aos indicadores de composição corporal analisados pelo DXA. Esses resultados podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 4 – Composição corporal aos 60 dias de vida

Indicadores	S	C
Massa gorda total (g)	67,67±1,626	67,0±3,890
Massa magra total (g)	104,20±3,774	101,0±2,898
Massa gorda do tronco (g)	55,67±1,498	55,83±3,516
Massa magra do tronco (g)	92,80±4,576	88,33±2,472
Gordura do tronco (%)	37,55±1,297	37,74±0,852
Gordura total (%)	38,78±1,213	39,16±0,668
CMO (g)	5,10±0,295	4,80±0,181
DMO (g/cm²)	0,110±0,001	0,112±0,001
Área óssea (cm²)	44,20±0,969	43,0±1,125

Nota: Composição corporal de ratas aos 60 dias de vida, analisada por DXA. S (n=8, animais alimentados com dieta contendo óleo de soja) e C (n=8, animais alimentados com dieta contendo óleo de canola). Valores são apresentados em média±epm. Teste *t* de Student.
Fonte: A autora, 2016.

5.2.3 Massa dos órgãos

Aos 60 dias de vida, a massa do fígado foi significativamente maior no grupo C (22%). A massa do pâncreas não apresentou diferença estatística entre os grupos, apesar do aumento de 28% no grupo C. A massa dos demais órgãos não diferiu entre os grupos. Esses resultados podem ser observados na Tabela 5.

Tabela 5 – Massa dos órgãos aos 60 dias de vida

Massa (g)	S	C
Gordura visceral	7,398±0,815	6,681±0,446
Fígado	7,603±0,409	9,314±0,473*
Pâncreas	0,586±0,061	0,752±0,074
Ovário	0,115±0,009	0,115±0,013
Útero	0,378±0,049	0,405±0,038

Nota: Quantificação da massa dos órgãos de ratas aos 60 dias de vida. S (n=8, animais alimentados com dieta contendo óleo de soja) e C (n=8, animais alimentados com dieta contendo óleo de canola). Valores são apresentados em média±epm. Teste *t* de Student. * $p<0,05$.
Fonte: A autora, 2016.

5.2.4 Dosagens plasmáticas

Perfil lipídico, proteínas totais, albumina, cálcio, fósforo e aspartato aminotransferase não diferiram entre os grupos S e C, aos 60 dias de vida. Por outro lado, as concentrações plasmáticas de fosfatase alcalina, alanina transaminase e insulina foram significativamente maiores no grupo C, 188%, 42% e 84%, respectivamente. O estradiol foi menor o grupo C, cerca de 22%. Esses resultados podem ser observados na Tabela 6.

Tabela 6 – Dosagens plasmáticas aos 60 dias de vida

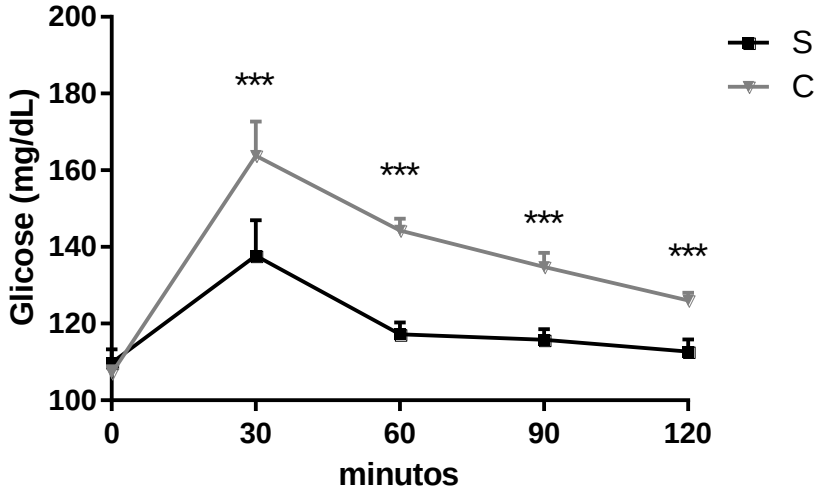
	S	C
Colesterol (mg/dL)	49,13±1,97	50,33±1,40
Triglicerídeos (mg/dL)	32,10±2,47	36,90±2,24
HDL-c (mg/dL)	21,25±1,03	23,33±0,60
LDL-c (mg/dL)	22,30±2,32	21,32±2,41
VLDL-c (mg/dL)	6,42±0,49	7,38±0,45
Proteínas totais (mg/dL)	5,52±0,23	5,59±0,08
Albumina (mg/dL)	3,40±0,06	3,38±0,04
Cálcio (mg/dL)	9,74±0,40	9,95±0,20
Fósforo (mg/dL)	6,88±0,42	6,39±0,22
Fosfatase alcalina (mg/dL)	92,0±8,95	265,7±36,72 ***
Aspartato aminotransferase (mg/dL)	149,0±8,68	148,7±7,86
Alanina transaminase (mg/dL)	19,40±1,75	27,70±2,0 **
Estradiol (pg/mL)	94,81±7,21	74,04±4,99 *
Insulina (µUI/mL)	22,02±2,33	40,57±2,66 ***

Nota: Dosagens de lipídios, hormônios, íons e proteínas em ratas aos 60 dias de vida. S (n=8, animais alimentados com dieta contendo óleo de soja) e C (n=8, animais alimentados com dieta contendo óleo de canola). Valores são apresentados em média±epm. Teste *t* de Student. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.
Fonte: A autora, 2016.

5.2.5 Teste de tolerância à glicose intraperitoneal (TTGI)

Aos 59 dias de vida foi realizado o TTGI. A glicemia de jejum, ponto 0, não diferiu entre os grupos (S=109,8±3,53mg/dL; C=107,0±1,87mg/dL). Após administração de solução de glicose, a glicemia dos animais do grupo C foi significativamente maior quando comparado ao grupo S, diferindo em todos os pontos da curva, ou seja, ponto 30 (S=137,7±9,29mg/dL; C=163,8±8,93mg/dL), ponto 60 (S=117,2±3,06mg/dL; C=144,3±3,09mg/dL), ponto 90 (S=115,8±2,80mg/dL; C=134,8±3,68mg/dL) e ponto 120 (S=112,7±3,16mg/dL; 126,0±2,04mg/dL). Esses resultados são apresentados no Gráfico 2.

Gráfico 2 – Teste de tolerância à glicose intraperitoneal aos 60 dias de vida

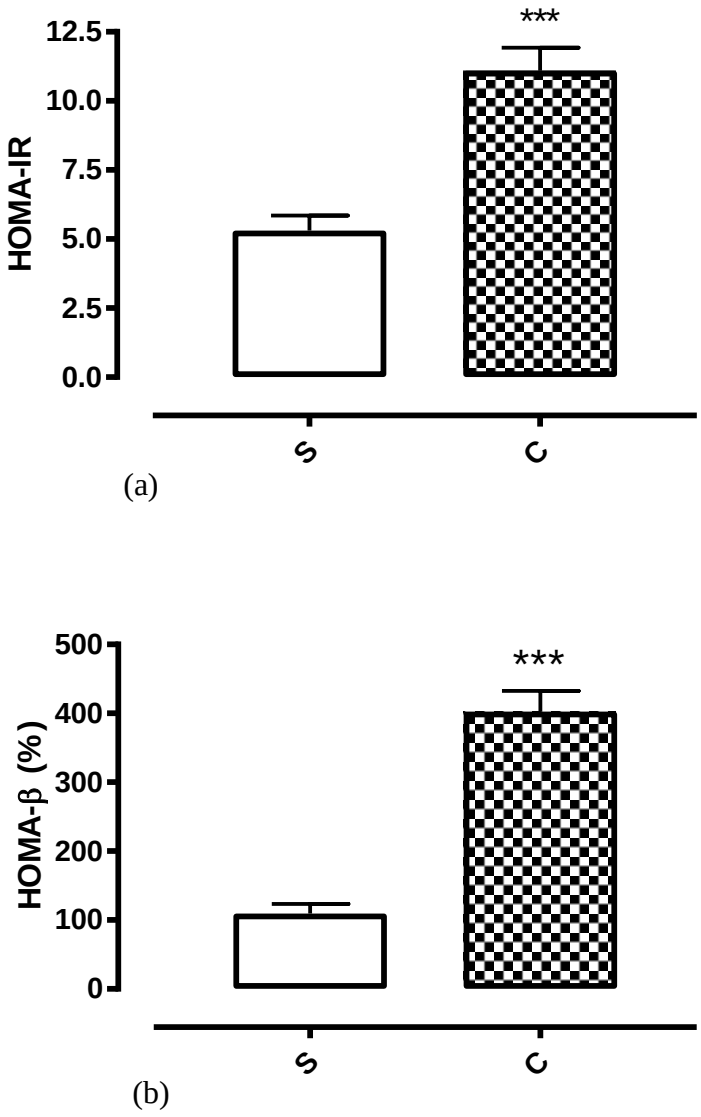


Legenda: Teste de tolerância à glicose intraperitoneal realizado em ratas após jejum de 6 horas. Solução de glicose administrada (2g glicose/kg PC). S (n=8, animais alimentados com dieta contendo óleo de soja) e C (n=8, animais alimentados com dieta contendo óleo de canola). Valores são apresentados em média±epm. ANOVA bivariada, seguida do pós-teste Bonferroni. *** p<0,001.
Fonte: A autora, 2016.

5.2.6 Índice de HOMA

Aos 60 dias de vida, os animais do grupo C apresentaram maior HOMA-IR (108%) comparados ao grupo S, indicando resistência à insulina. Da mesma forma, o HOMA-β estava maior no grupo C (267%), caracterizando hipersecreção de insulina. Esses resultados podem ser observados nos Gráficos 3A e 3B.

Gráfico 3 – Índice de HOMA de ratas aos 60 dias de vida



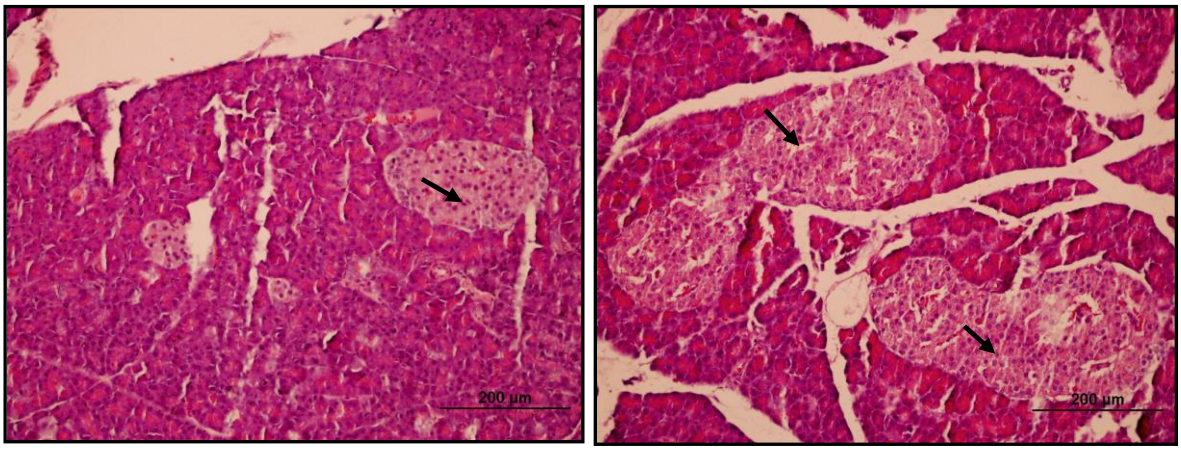
Legenda: (a) HOMA-IR; (b) HOMA-β. S (n=8, animais alimentados com dieta contendo óleo de soja) e C (n=8, animais alimentados com dieta contendo óleo de canola). Valores são apresentados em média±epm. Teste *t* de Student. *** p<0,001.

Fonte: A autora, 2016.

5.2.7 Análise histomorfométrica do pâncreas

A avaliação morfológica do pâncreas revelou um aumento do tamanho das ilhotas pancreáticas dos animais do grupo C (Figura 10). Tal observação foi confirmada através de análise morfométrica, explicitando o aumento significativo da área das ilhotas pancreáticas (76%) desses animais (Gráfico 4).

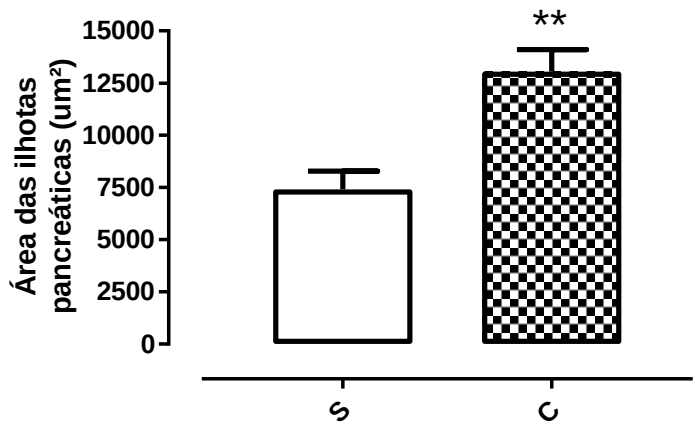
Figura 10 – Fotomicrografias de pâncreas de ratas aos 60 dias de vida



(a) (b)

Legenda: (a) Ratas alimentadas com dieta contendo óleo de soja e (b) Ratas alimentadas com dieta contendo óleo de canola. Objetiva 20x. Coloração HE. (n=8 animais por grupo). Seta = ilhota pancreática.
Fonte: A autora, 2016.

Gráfico 4 – Área das ilhotas pancreáticas de ratas aos 60 dias de vida

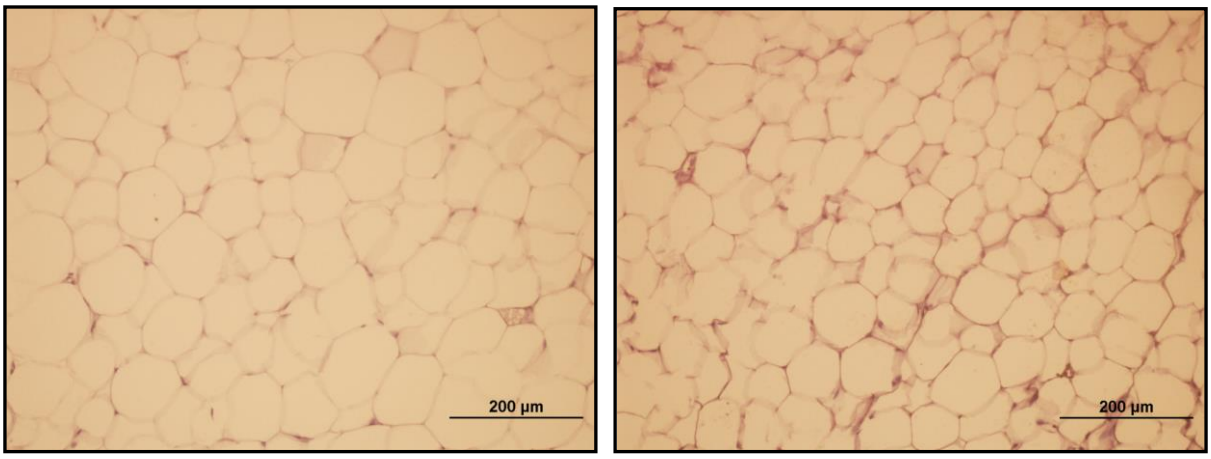


Legenda: S (n=8, animais alimentados com dieta contendo óleo de soja) e C (n=8, animais alimentados com dieta contendo óleo de canola). Valores são apresentados em média±epm. Teste *t* de Student. ** p<0,01.
Fonte: A autora, 2016.

5.2.8 Análise histomorfométrica do tecido adiposo retroperitoneal

A avaliação morfológica do tecido adiposo retroperitoneal mostrou, em ambos os grupos, adipócitos com formato predominantemente poligonal, sendo o tamanho das células visivelmente reduzido nos animais do grupo C (Figura 11). Tal observação foi confirmada através de análise morfométrica, explicitando a menor área dos adipócitos retroperitoneais (-35%) desses animais (Gráfico 5).

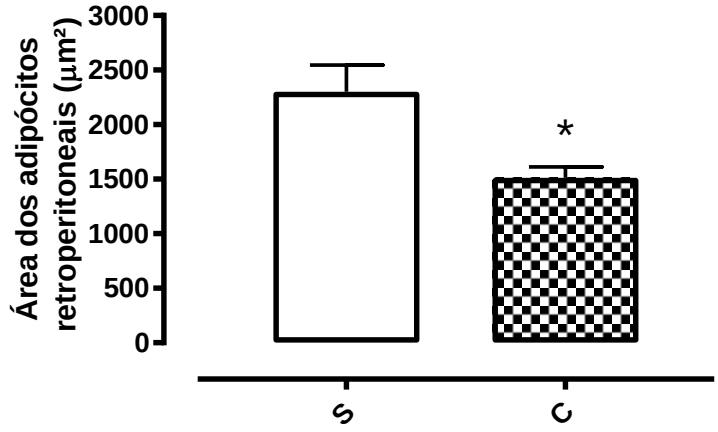
Figura 11 – Fotomicrografias de tecido adiposo retroperitoneal de ratas aos 60 dias de vida



(a) (b)

Legenda: (a) Ratas alimentadas com dieta contendo óleo de soja e (b) Ratas alimentadas com dieta contendo óleo de canola. Objetiva 20x. Coloração HE. (n=8 animais por grupo).
Fonte: A autora, 2016.

Gráfico 5 – Área dos adipócitos retroperitoneais de ratas aos 60 dias de vida

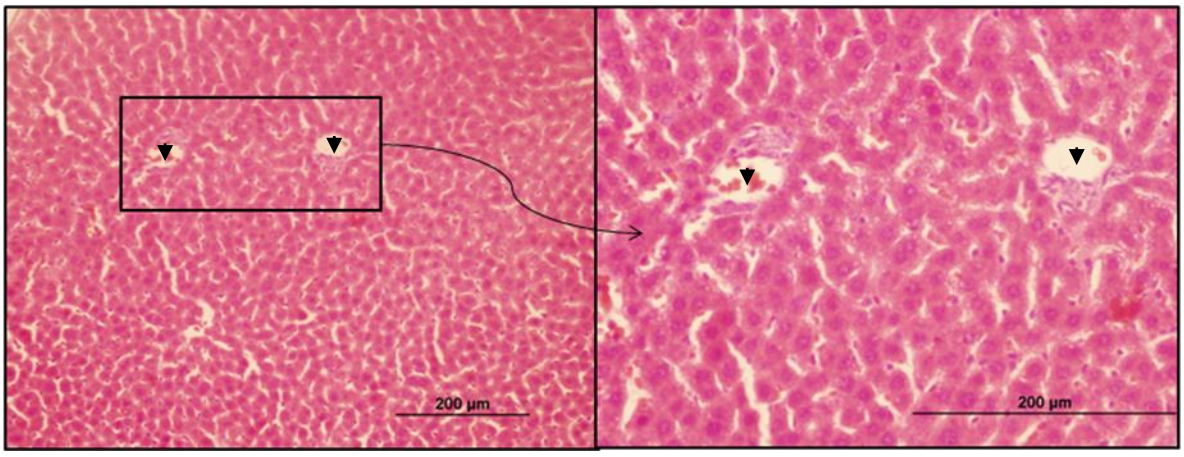


Legenda: S (n=8, animais alimentados com dieta contendo óleo de soja) e C (n=8, animais alimentados com dieta contendo óleo de canola). Valores são apresentados em média±epm. Teste *t* de Student. * p<0,05.
Fonte: A autora, 2016.

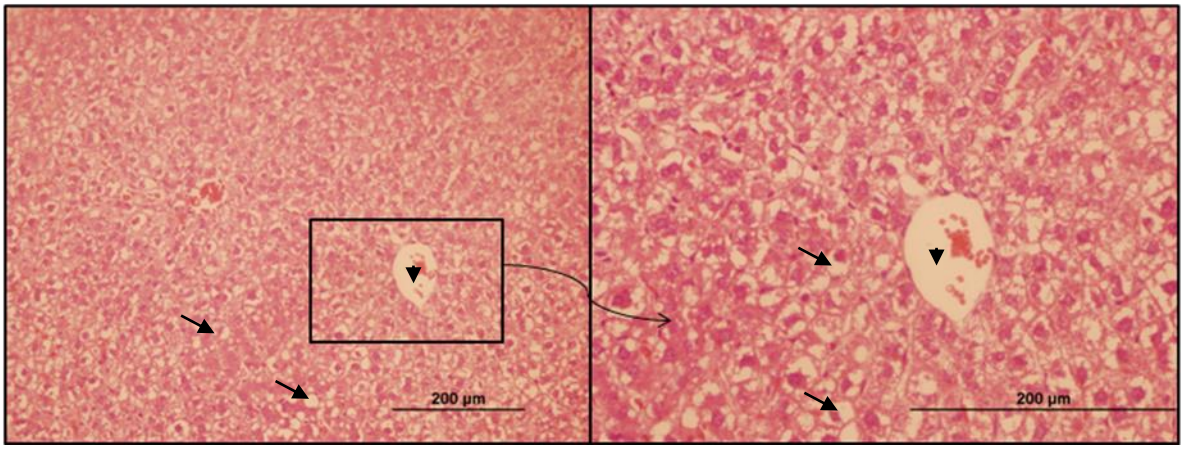
5.2.9 Morfologia hepática

A avaliação morfológica do fígado dos animais do grupo soja revelou parênquima íntegro com características próprias. No grupo canola, o quadro de esteatose hepática microvesicular fica evidenciado, destacando a presença de gotículas lipídicas dentro dos hepatócitos (Figura 12).

Figura 12 – Fotomicrografias de fígado de ratas aos 60 dias de vida



(a)



(b)

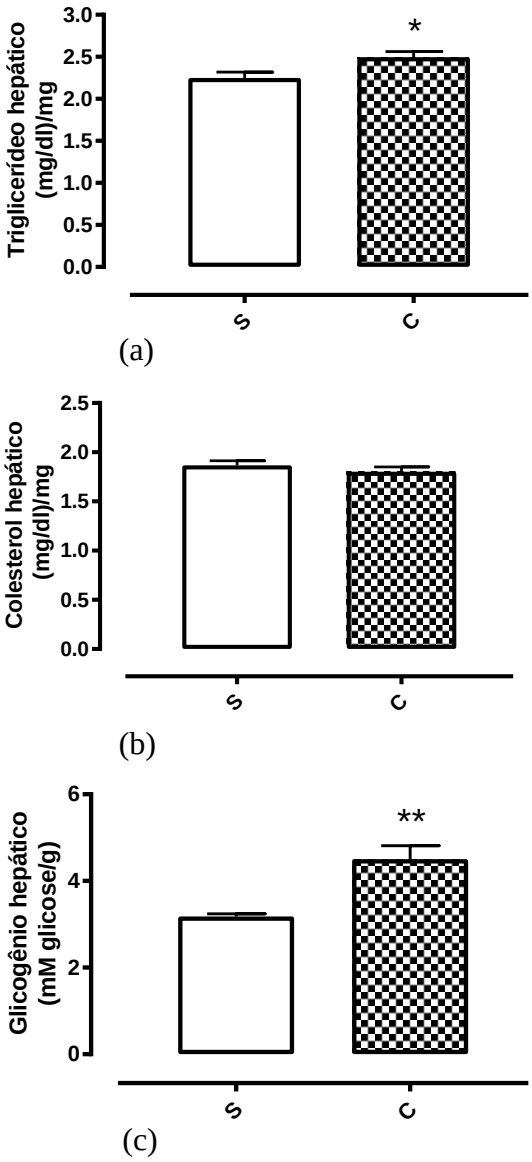
Legenda: (a) Ratas alimentadas com dieta contendo óleo de soja e (b) Ratas alimentadas com dieta contendo óleo de canola. Coloração HE. (n=8 animais por grupo). Imagens à esquerda = objetiva de 20x; Imagens à direita = objetiva de 40x. Setas = gotas lipídicas dentro dos hepatócitos. Cabeça de seta = veia centro-lobular.

Fonte: A autora, 2016.

5.2.10 Conteúdo intra-hepático de triglicerídeo, colesterol e glicogênio

O grupo canola apresentou aumento de 11% no conteúdo de triglicerídeo e 41,5% no glicogênio hepático, sem alteração no conteúdo de colesterol hepático entre os grupos. Esses resultados podem ser observados nos Gráficos 6A-C.

Gráfico 6 – Análise de triglicerídeo, colesterol e glicogênio hepáticos aos 60 dias de vida



Legenda: (a) Triglicerídeo; (b) Colesterol; (c) Glicogênio hepático de ratas aos 60 dias de vida. S (n=8, animais alimentados com dieta contendo óleo de soja) e C (n=8, animais alimentados com dieta contendo óleo de canola). Valores são apresentados em média±epm. Teste *t* de Student. *p< 0,05; ** p<0,01.

Fonte: A autora, 2016.

5.2.11 Análises ósseas

As medidas ósseas e os indicadores de integridade óssea avaliados por DXA e tomografia computadorizada não apresentaram diferença significativa entre os grupos, aos 60 dias de vida. Esses resultados podem ser observados na Tabela 7.

Tabela 7 – Análises ósseas aos 60 dias de vida

Medidas ósseas	S	C
Peso fêmur (g)	0,76±0,03	0,72±0,02
Peso vértebra L4 (g)	0,27±0,005	0,29±0,010
Distância entre as epífises (mm)	30,51±0,39	30,15±0,25
Distância entre os trocânteres (mm)	5,67±0,04	5,56±0,06
Largura da diáfise (mm)	3,73±0,04	3,72±0,07
Altura da vértebra L4 (mm)	6,97±0,09	7,07±0,05
Indicadores de integridade óssea	S	C
DMO fêmur (g/cm²)	0,110±0,003	0,108±0,002
CMO fêmur (g)	0,26±0,016	0,26±0,016
Área óssea fêmur (cm²)	2,20±0,13	2,10±0,10
DMO vértebra L4 (g/cm²)	0,112±0,003	0,109±0,001
CMO vértebra L4 (g)	0,10±0,001	0,10±0,001
Área óssea vértebra L4 (cm²)	1,0±0,001	1,0±0,001
Radiodensidade da cabeça do fêmur (HU)	492,50±39,52	498,50±20,34
Radiodensidade do corpo vertebral da L4 (HU)	400,10±20,36	376,10±13,16

Nota: Medidas de fêmur e quarta vértebra lombar de ratas aos 60 dias de vida. S (n=8, animais alimentados com dieta contendo óleo de soja) e C (n=8, animais alimentados com dieta contendo óleo de canola). Valores são apresentados em média±epm. Teste *t* de Student.

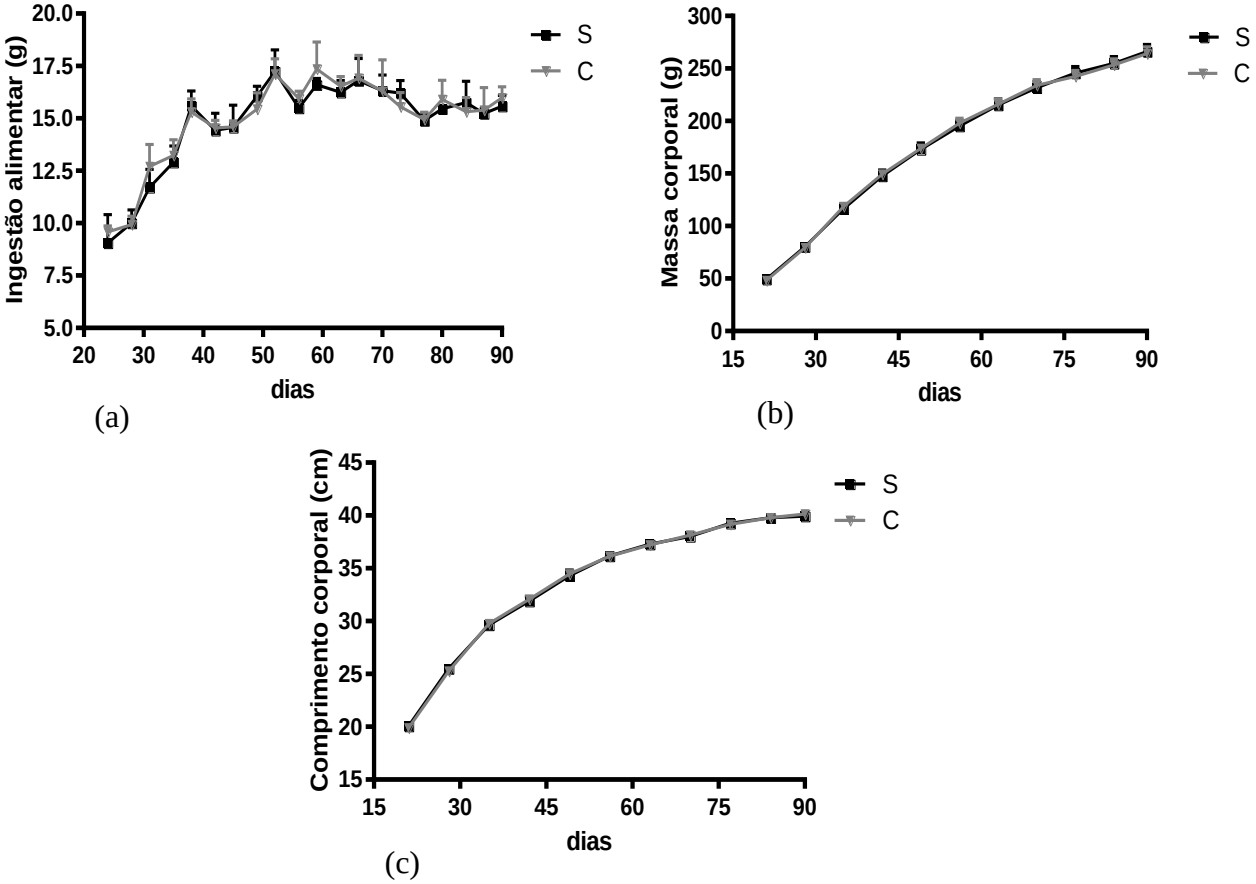
Fonte: A autora, 2016.

5.3 **Período experimental de 90 dias**

5.3.1 Evolução da ingestão alimentar, massa e comprimento corporais

Não houve diferença na ingestão alimentar, massa e comprimento corporais entre os grupos S e C, até 90 dias de vida. Aos 90 dias a ingestão diária média por animal era de 15,78 gramas. Os animais apresentaram massa corporal média de 265,1±6,7g e comprimento corporal de 40,13±0,28cm. Esses resultados podem ser observados no Gráfico 7 (A-C).

Gráfico 7 – Ingestão alimentar, massa e comprimento corporais de ratas aos 90 dias de vida



Legenda: (a) Ingestão alimentar; (b) Massa corporal; (c) Comprimento corporal das ratas de 21 aos 90 dias de vida. S (n=8, animais alimentados com dieta contendo óleo de soja) e C(n=8, animais alimentados com dieta contendo óleo de canola). Valores são apresentados em média±epm. ANOVA bivariada, seguida do pós-teste Bonferroni.

Fonte: A autora, 2016.

5.3.2 Análise da composição corporal por DXA

Aos 90 dias de vida, os indicadores de composição corporal analisados pelo DXA não diferiram significativamente entre os grupos S e C. Esses resultados podem ser observados na Tabela 8.

Tabela 8 – Composição corporal aos 90 dias de vida

Indicadores	S	C
Massa gorda total (g)	81,0±5,61	74,68±2,45
Massa magra total (g)	128,8±3,53	130,4±3,91
Massa gorda do tronco (g)	67,0±4,64	62,14±2,07
Massa magra do tronco (g)	111,9±2,73	115,4±2,51
Gordura do tronco (%)	36,58±1,80	35,10±0,42
Gordura total (%)	37,85±1,80	36,21±0,44
CMO (g)	7,31±0,183	6,98±0,076
DMO (g/cm²)	0,143±0,002	0,138±0,001
Área óssea (cm²)	50,88±0,639	50,50±0,597

Nota: Composição corporal de ratas aos 90 dias de vida, analisada por DXA. S (n=8, animais alimentados com dieta contendo óleo de soja) e C (n=8, animais alimentados com dieta contendo óleo de canola). Valores são apresentados em média±epm. Teste *t* de Student.
Fonte: A autora, 2016.

5.3.3 Massa dos órgãos

As massas dos órgãos não diferiram significativamente entre os grupos, embora, destaca-se a menor massa de gordura visceral (-19%) no grupo canola, e uma pequena tendência ao aumento do peso do fígado (7%). Esses resultados podem ser observados na Tabela 9.

Tabela 9 – Massa dos órgãos aos 90 dias de vida

Massa (g)	S	C
Gordura visceral	11,26±1,053	9,147±0,588
Fígado	6,926±0,149	7,433±0,217
Pâncreas	0,655±0,023	0,678±0,036
Ovário	0,095±0,005	0,082±0,011
Útero	0,347±0,013	0,430±0,039

Nota: Quantificação da massa dos órgãos de ratas aos 90 dias de vida. S (n=8, ratas alimentadas com dieta contendo óleo de soja) e C (n=8, ratas alimentadas com dieta contendo óleo de canola). Valores são apresentados em média±epm. Teste *t* de Student.
Fonte: A autora, 2016.

5.3.4 Dosagens plasmáticas

As dosagens plasmáticas realizadas aos 90 dias não diferiram entre os grupos, exceto, a fosfatase alcalina que apresentou aumento significativo de 61% no grupo canola. Embora, não tenha diferença significativa, ressalta-se um aumento de alanina transaminase (18%) no grupo C. Esses resultados podem ser observados na Tabela 10.

Tabela 10 – Dosagens plasmáticas aos 90 dias de vida

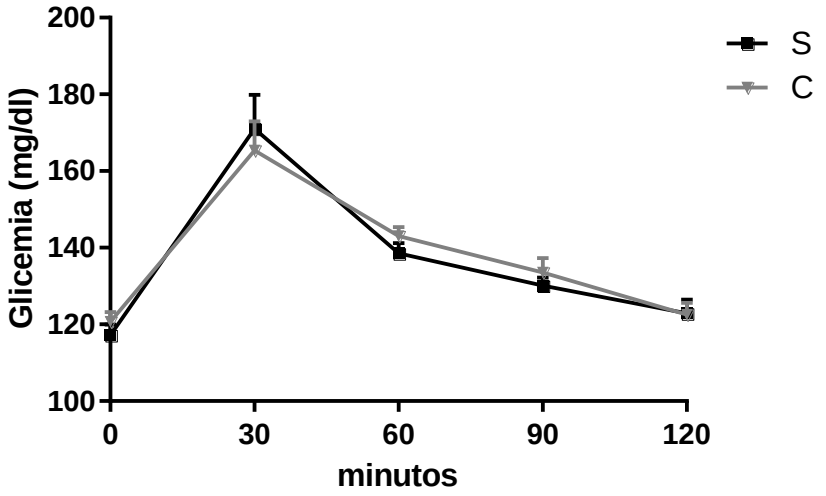
	S	C
Colesterol (mg/dL)	53,38±4,16	55,13±2,80
Triglicerídeos (mg/dL)	25,38±1,46	22,25±2,71
HDL-c (mg/dL)	22,38±1,13	23,88±0,63
LDL-c (mg/dL)	28,11±2,70	28,23±2,09
VLDL-c (mg/dL)	5,07±0,29	4,45±0,54
Proteínas totais (mg/dL)	4,76±0,16	5,03±0,19
Albumina (mg/dL)	2,53±0,11	2,86±0,09
Cálcio (mg/dL)	9,60±0,25	9,52±0,20
Fósforo (mg/dL)	6,23±0,19	5,65±0,46
Fosfatase alcalina (mg/dL)	45,0±6,53	72,67±9,80 *
Aspartato aminotransferase (mg/dL)	83,50±5,37	81,50±5,92
Alanina transaminase (mg/dL)	15,57±1,02	18,38±1,65
Insulina (µUI/mL)	31,34±3,91	31,58±2,56

Nota: Dosagens de lipídios, hormônios, íons e proteínas em ratas aos 90 dias de vida. S (n=8, animais alimentados com dieta contendo óleo de soja) e C (n=8, animais alimentados com dieta contendo óleo de canola). Valores são apresentados em média±epm. Teste *t* de Student.
Fonte: A autora, 2016.

5.3.5 Teste de tolerância à glicose intraperitoneal (TTGI)

Aos 89 dias de vida foi realizado o TTGI. A glicemia de jejum dos animais apresentou os seguintes valores: S=117,2±2,77mg/dL; C=120,7±2,49mg/dL. Todos os pontos da curva não diferiram entre os grupos. Esses resultados podem ser observados no Gráfico 8.

Gráfico 8 – Teste de tolerância à glicose intraperitoneal aos 90 dias de vida

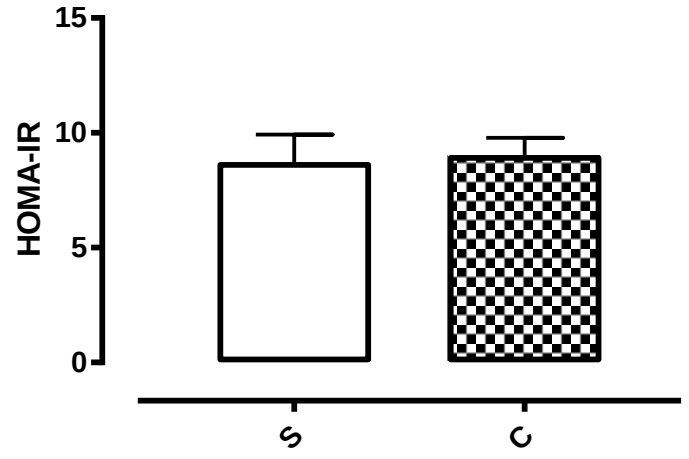


Legenda: Teste de tolerância à glicose intraperitoneal realizado em ratas após jejum de 6 horas. Solução de glicose administrada (2g glicose/kg PC). S (n=8, animais alimentados com dieta contendo óleo de soja) e C (n=8, animais alimentados com dieta contendo óleo de canola). Valores são apresentados em média±epm. ANOVA bivariada, seguida do pós-teste Bonferroni.
Fonte: A auota, 2016.

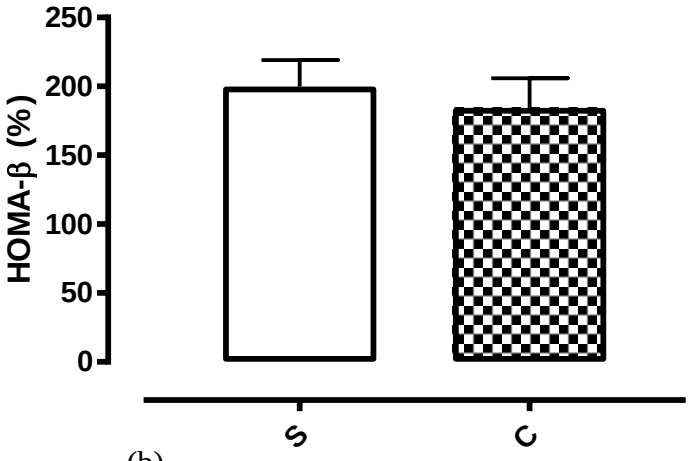
5.3.6 Índice de HOMA

Aos 90 dias de vida, não houve diferença significativa entre os grupos em relação aos índices de HOMA (HOMA-IR e HOMA-β). Estes resultados podem ser observados nos Gráficos 9A e 9B.

Gráfico 9 - Índice de HOMA de ratas aos 90 dias de vida.



(a)



(b)

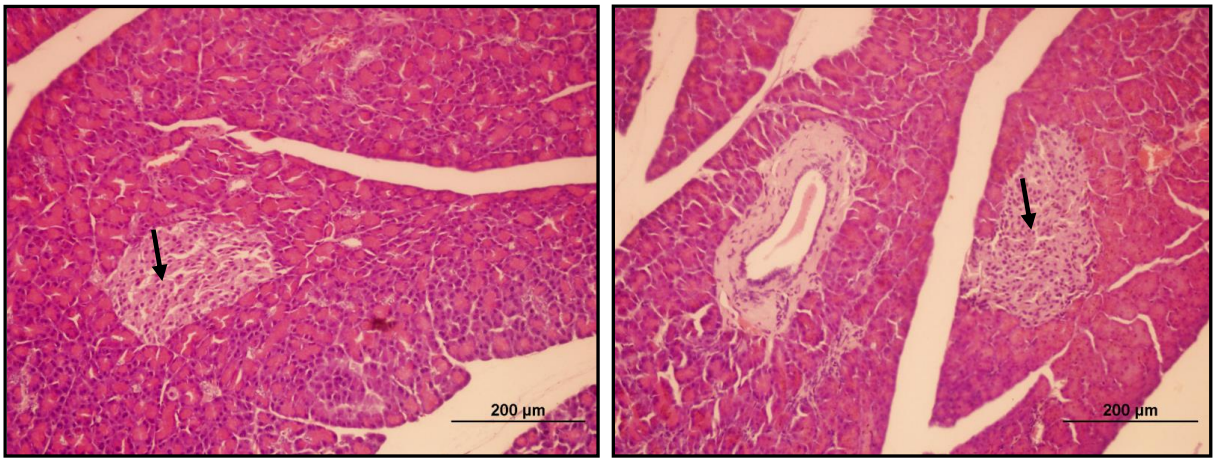
Legenda: (a) HOMA-IR; (b) HOMA-β. S (n=8, animais alimentados com dieta contendo óleo de soja) e C (n=8, animais alimentados com dieta contendo óleo de canola). Valores são apresentados em média±epm. Teste *t* de Student.

Fonte: A autora, 2016.

5.3.7 Análise histomorfométrica do pâncreas

A avaliação morfológica do pâncreas revelou semelhanças no parênquima pancreático e no tamanho das ilhotas pancreáticas dos animais alimentados com óleo de soja e com óleo de canola (Figura 13). A avaliação morfométrica confirma a ausência de diferença significativa entre os grupos quanto à área das ilhotas pancreáticas (Gráfico 10).

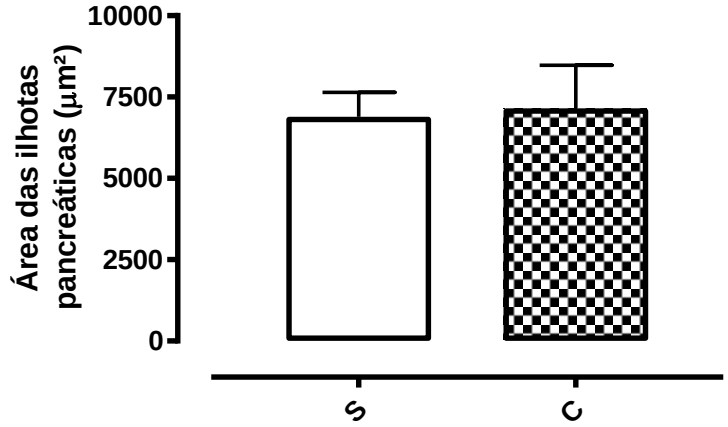
Figura 13 – Fotomicrografias de pâncreas de ratas aos 90 dias de vida



(a) (b)

Legenda: (a) Ratas alimentadas com dieta contendo óleo de soja e (b) Ratas alimentadas com dieta contendo óleo de canola. Objetiva 20x. Coloração HE. (n=8 animais por grupo). Seta = ilhota pancreática.
Fonte: A autora, 2016.

Gráfico 10 – Área das ilhotas pancreáticas de ratas aos 90 dias de vida

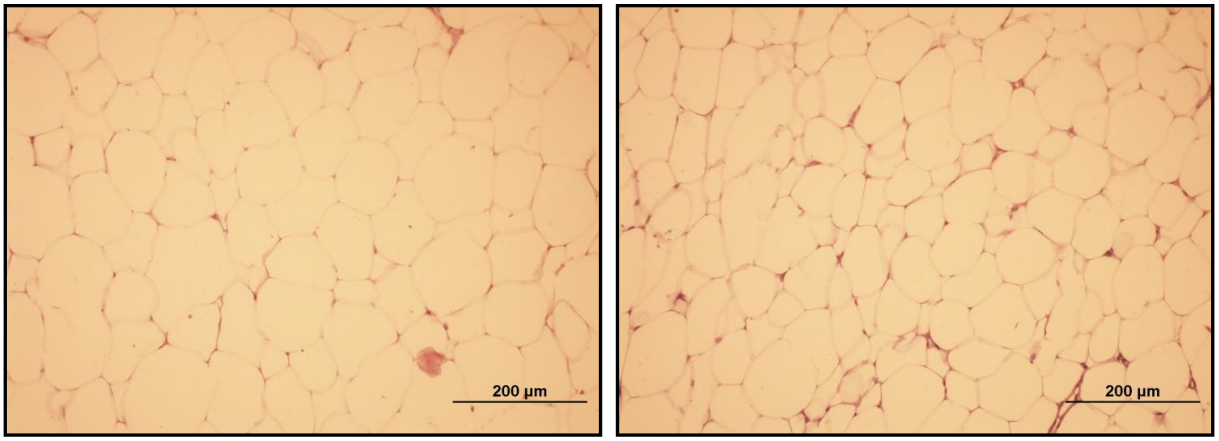


Legenda: S (n=8, animais alimentados com dieta contendo óleo de soja) e C (n=8, animais alimentados com dieta contendo óleo de canola). Valores são apresentados em média±epm. Teste *t* de Student.
Fonte: A autora, 2016.

5.3.8 Análise histomorfométrica do tecido adiposo retroperitoneal

Os adipócitos retroperitoneais aos 90 dias de vida apresentaram formato oval a poligonal. Quanto ao tamanho, o grupo soja apresentou adipócitos maiores e distribuição mais homogênea, enquanto o grupo canola apresentou adipócitos de tamanhos mais variados e menores (Figura 14). A análise morfométrica confirmou a avaliação morfológica, revelando menor área dos adipócitos retroperitoneais (-23%) nos animais do grupo C (Gráfico 11).

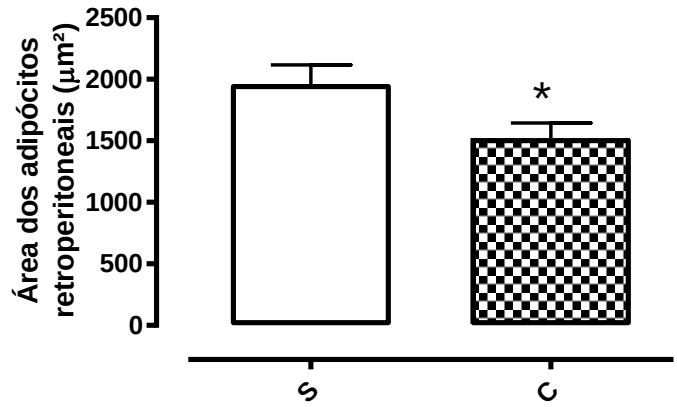
Figura 14 – Fotomicrografias de tecido adiposo retroperitoneal de ratas aos 90 dias de vida



(a) (b)

Legenda: (a) Ratas alimentadas com dieta contendo óleo de soja e (b) Ratas alimentadas com dieta contendo óleo de canola. Objetiva 20x. Coloração HE. (n=8 animais por grupo).
Fonte: A autora, 2016.

Gráfico 11 – Área dos adipócitos retroperitoneais de ratas aos 90 dias de vida

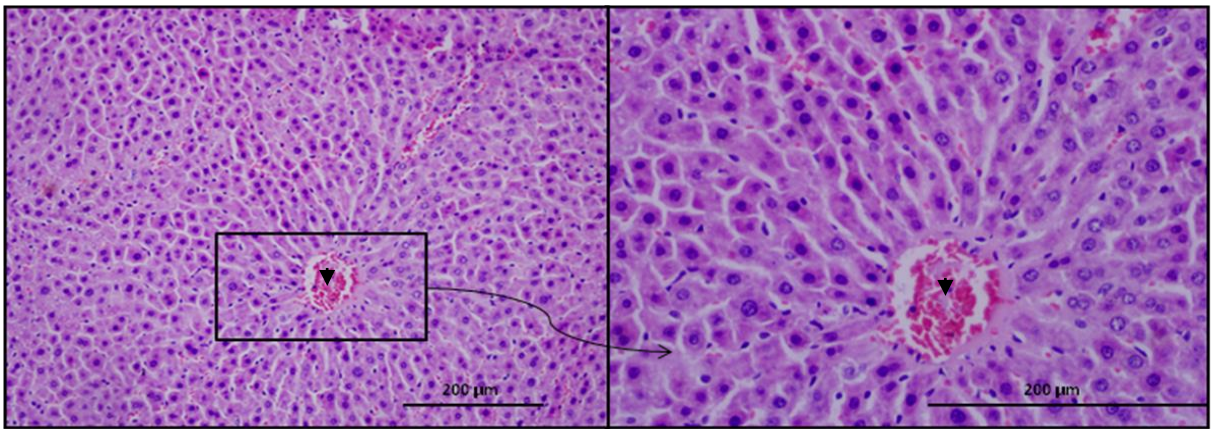


Legenda**:** S (n=8, animais alimentados com dieta contendo óleo de soja) e C (n=8, animais alimentados com dieta contendo óleo de canola). Valores são apresentados em média±epm. Teste *t* de Student. * p<0,05.
Fonte: A autora, 2016.

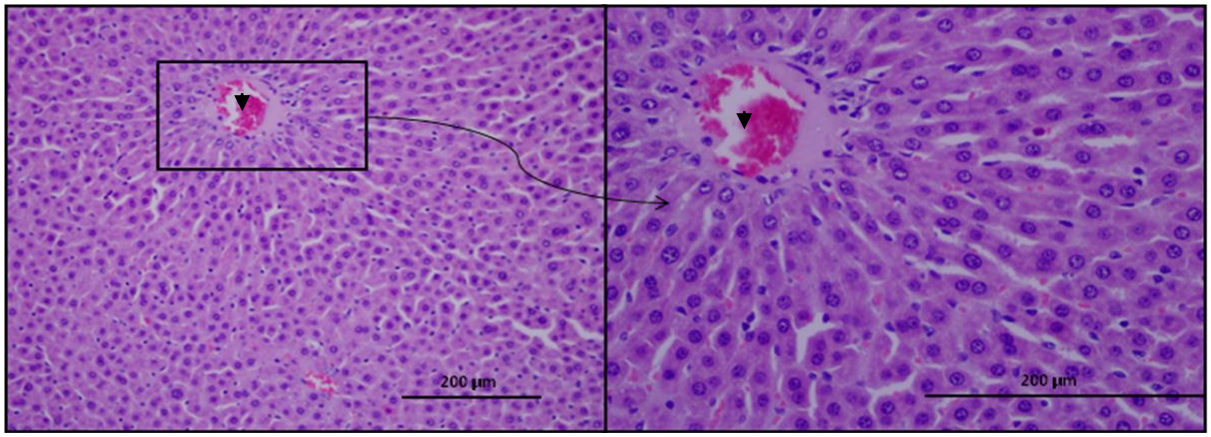
5.3.9 Morfologia hepática

As imagens histológicas de fígado mostraram aspecto de normalidade em ambos os grupos. É possível observar hepatócitos íntegros rodeando a veia centro-lobular, dispondo-se em placas radias limitando os espaços ocupados pelos sinusóides (Figura 15).

Figura 15 – Fotomicrografias de fígado de ratas aos 90 dias de vida



(a)



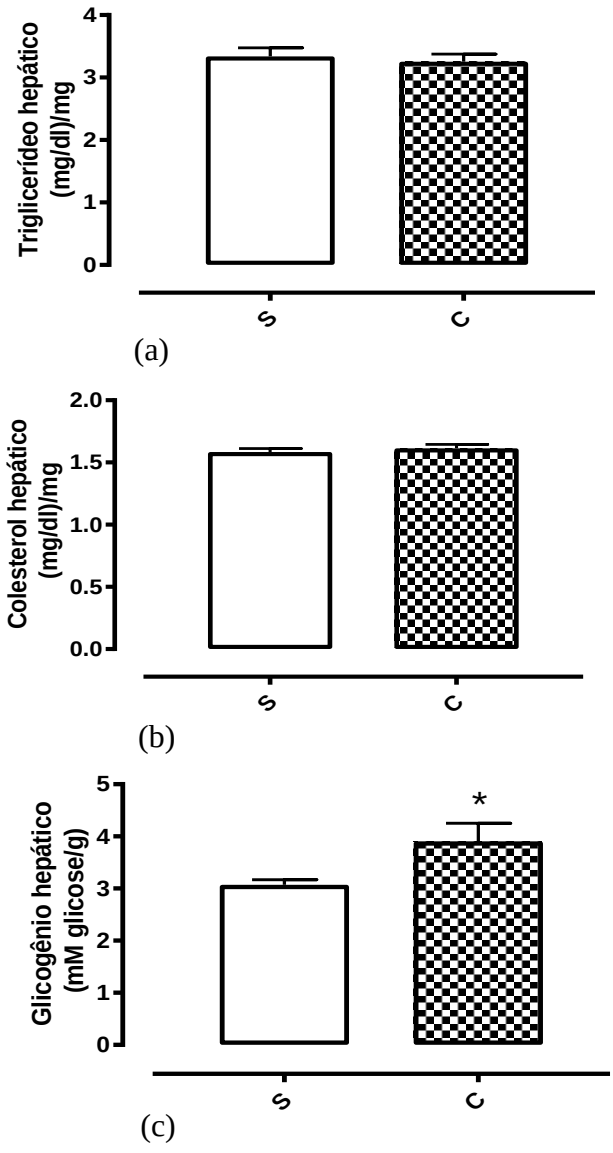
(b)

Legenda: (a) Ratas alimentadas com dieta contendo óleo de soja e (b) Ratas alimentadas com dieta contendo óleo de canola. Coloração HE. (n=8 animais por grupo). Imagens à esquerda = objetiva de 20x; Imagens à direita = objetiva de 40x. Cabeça de seta = veia centro-lobular.
Fonte: A autora, 2016.

5.3.10 Conteúdo intra-hepático de triglicerídeo, colesterol e glicogênio

As análises de amostras de fígado evidenciaram maior conteúdo de glicogênio hepático no grupo C (27%), sem diferença significativa nos conteúdos de triglicerídeo e colesterol hepáticos entre os grupos. Estes resultados são apresentados no Gráfico 12 (A-C).

Gráfico 12 – Análise de triglicerídeo, colesterol e glicogênio hepáticos aos 90 dias de vida



Legenda: (a) Triglicerídeo; (b) Colesterol; (c) Glicogênio hepáticos aos 90 dias de vida. S (n=8, animais alimentados com dieta contendo óleo de soja) e C (n=8, animais alimentados com dieta contendo óleo de canola). Valores são apresentados em média±epm. Teste *t* de Student. *p< 0,05.

Fonte: A autora, 2016.

5.3.11 Análises ósseas

No final do período experimental de 90 dias não houve diferença significativa entre os grupos quanto às medidas ósseas e análises ósseas por DXA e tomografia computadorizada. Esses resultados podem ser observados na Tabela 11.

Tabela 11 – Análises ósseas aos 90 dias de vida

Medidas ósseas	S	C
Peso fêmur (g)	0,82±0,02	0,80±0,01
Peso vértebra L4 (g)	0,33±0,007	0,32±0,007
Distância entre as epífises (mm)	33,21±0,26	33,14±0,28
Distância entre os trocânteres (mm)	7,46±0,05	7,47±0,06
Largura da diáfise (mm)	4,31±0,06	4,28±0,07
Altura da vértebra L4 (mm)	7,39±0,07	7,47±0,06
Indicadores de integridade óssea	**S**	**C**
DMO fêmur (g/cm²)	0,136±0,003	0,132±0,002
CMO fêmur (g)	0,325±0,016	0,312±0,012
Área óssea fêmur (cm²)	2,25±0,163	2,37±0,183
DMO vértebra L4 (g/cm²)	0,128±0,004	0,117±0,005
CMO vértebra L4 (g)	0,112±0,012	0,112±0,012
Área óssea vértebra L4 (cm²)	1,01±0,012	1,01±0,012
Radiodensidade da cabeça do fêmur (HU)	823,50±12,17	826,30±16,10
Radiodensidade do corpo vertebral da L4 (HU)	718,90±20,12	729,40±19,01

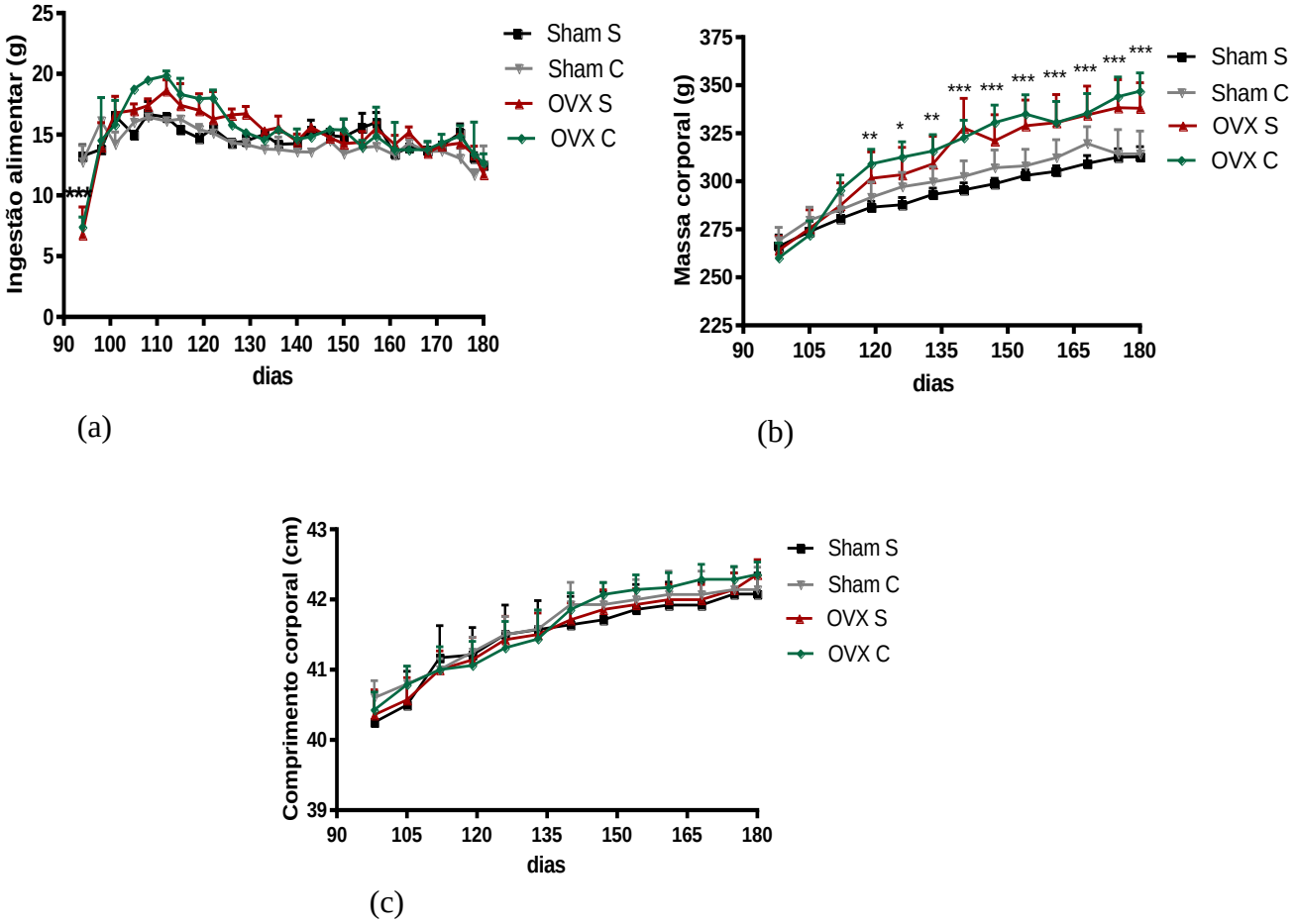
Nota: Medidas de fêmur e quarta vértebra lombar de ratas as 90 dias de vida. S (n=8, animais alimentados com dieta contendo óleo de soja) e C (n=8, animais alimentados com dieta contendo óleo de canola). Valores são apresentados em média±epm. Teste *t* de Student.
Fonte: A autora, 2016.

5.4 **Período experimental de 180 dias**

5.4.1 Evolução da ingestão alimentar, massa e comprimentos corporais

Após a intervenção cirúrgica, aos 90 dias de vida, o primeiro ponto analisado (aos 94 dias) mostrou uma redução na ingestão alimentar nas ratas ovariectomizadas, OVX S e OVX C. A partir dos 98 dias e até o final do período experimental a ingestão alimentar foi semelhante entre todos os grupos. Em relação à massa corporal, os grupos ovariectomizados (OVX S e OVX C) apresentaram aumento significativo comparados aos seus respectivos grupos controles (Sham S e Sham C), passando a diferir a partir dos 119 dias de vida. Entretanto, não houve diferença na massa corporal entre os grupos ovariectomizados e entre os grupos controles. O comprimento corporal dos animais não diferiu entre os grupos. Esses resultados podem ser observados no Gráfico 13 (A-C).

Gráfico 13 – Ingestão alimentar, massa e comprimento corporais de ratas aos 180 dias de vida



Legenda: (a) Ingestão alimentar; (b) Massa corporal; (c) Comprimento corporal das ratas de 91 aos 180 dias de vida. ShamS (n=8, ratas pseudo-operadas alimentadas com dieta contendo óleo de soja); ShamC (n=8, ratas pseudo-operadas alimentadas com dieta contendo óleo de canola); OVXS (n=8, ratas ovariectomizadas alimentadas com dieta contendo óleo de soja) e OVXC (n=8, ratas ovariectomizadas alimentadas com dieta contendo óleo de canola). Valores são apresentados em média±epm. ANOVA bivariada, seguida do pós-teste Bonferroni. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 OVX S *vs* Sham S; OVX C *vs* Sham C.

Fonte: A autora, 2016.

5.4.2 Análise da composição corporal por DXA

Aos 180 dias de vida, os animais dos grupos OVX S e OVX C apresentaram massa gorda total (49% e 46%), massa gorda do tronco (42% e 33%), porcentagem de gordura total (31% e 20%) e porcentagem de gordura do tronco (31% e 20%) maiores em relação a seus controles. Por outro lado, a ovariectomia determinou menor massa magra total (-28% e -19%)

e massa magra do tronco (-25% e -19%), em relação aos seus controles Sham S e Sham C, respectivamente. A área óssea, o conteúdo mineral ósseo e a densidade mineral óssea não diferiram entre os grupos. Não houve diferença entre os grupos Sham nem entre os grupos OVX. Esses resultados podem ser observados na Tabela 12.

Tabela 12 – Composição corporal aos 180 dias de vida

Indicadores	Sham S	OVX S	Sham C	OVX C
Massa gorda total (g)	162,0±9,37	242,8±20,27**	165,4±14,47	242,8±5,34**
Massa magra total (g)	132,5±4,37	95,6±6,56***	122,5±5,88	100,0±3,86**
Massa gorda do tronco (g)	140,7±12,13	201,0±16,34*	145,0±14,08	193,0±9,08*
Massa magra do tronco (g)	112,30±4,33	84,67±5,41**	106,80±7,47	87,33±2,76*
Gordura total (%)	55,53±2,58	72,83±3,41**	58,45±3,01	70,54±1,22**
Gordura do tronco (%)	55,17±2,68	72,82±3,45**	58,13±3,25	69,84±1,13*
CMO (g)	11,10±0,45	11,42±0,47	12,06±0,55	11,82±0,27
DMO (g/cm²)	0,164±0,002	0,159±0,001	0,165±0,002	0,159±0,001
Área óssea (cm²)	70,60±3,23	71,67±2,35	71,33±3,06	72,80±1,74

Nota: Composição corporal de ratas aos 180 dias de vida, analisada por DXA. ShamS (n=8, ratas pseudo-operadas alimentadas com dieta contendo óleo de soja); ShamC (n=8, ratas pseudo-operadas alimentadas com dieta contendo óleo de canola); OVXS (n=8, ratas ovariectomizadas alimentadas com dieta contendo óleo de soja) e OVXC (n=8, ratas ovariectomizadas alimentadas com dieta contendo óleo de canola). Valores são apresentados em média±epm. ANOVA univariada, seguida do pós-teste Newman Keuls. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 OVX S *vs* Sham S; OVX C *vs* Sham C.
Fonte: A autora, 2016.

5.4.3 Massa dos órgãos

As ratas OVX S apresentaram maior massa de gordura visceral (51%), em relação ao grupo Sham S. A massa do útero foi significativamente menor nos grupos ovariectomizados, OVX S (-53%) e OVX C (-60%), em relação aos seus respectivos grupos controles. As massas dos demais órgãos não diferiram entre os grupos. Esses resultados podem ser observados na Tabela 13.

Tabela 13 – Massa dos órgãos aos 180 dias de vida

Massa (g)	Sham S	OVX S	Sham C	OVX C
Gordura visceral	26,85±2,63	40,66±2,86*	30,25±2,81	35,19±3,73
Fígado	7,61±0,22	7,76±0,34	8,16±0,14	7,89±0,25
Pâncreas	0,891±0,074	0,885±0,061	1,012±0,075	0,963±0,075
Útero	0,514±0,058	0,242±0,020***	0,505±0,029	0,207±0,023***
Ovário	0,152±0,019	----	0,128±0,014	----

Nota: Quantificação da massa dos órgãos de ratas aos 180 dias de vida. ShamS (n=8, ratas pseudo-operadas alimentadas com dieta contendo óleo de soja); ShamC (n=8, ratas pseudo-operadas alimentadas com dieta contendo óleo de canola); OVXS (n=8, ratas ovariectomizadas alimentadas com dieta contendo óleo de soja) e OVXC (n=8, ratas ovariectomizadas alimentadas com dieta contendo óleo de canola). Valores são apresentados em média±epm. ANOVA univariada, seguida do pós-teste Newman Keuls. * p<0,05; *** p<0,001 OVX S *vs* Sham S; OVX C *vs* Sham C.
Fonte: A autora, 2016.

5.4.4 Dosagens plasmáticas

Dentre as dosagens plasmáticas avaliadas, o grupo OVX S apresentou maiores valores de colesterol (22%) e fosfatase alcalina (68%), enquanto no OVX C a fosfatase foi maior (126%), comparados a seus respectivos grupos controles. O estradiol apresentou menores concentrações nos grupos ovariectomizados, OVX S (-53%) e OVX C (-29%). Embora a concentração plasmática de estradiol não difira entre os grupos Sham, destaca-se a menor concentração no grupo Sham C (-19%). A insulina não diferiu significativamente entre os grupos, no entanto, o grupo OVXC apresentou concentração 33% maior em relação ao seu controle. As demais dosagens foram semelhantes entre os grupos. Esses resultados podem ser observados na Tabela 14.

Tabela 14 – Dosagens plasmáticas aos 180 dias de vida

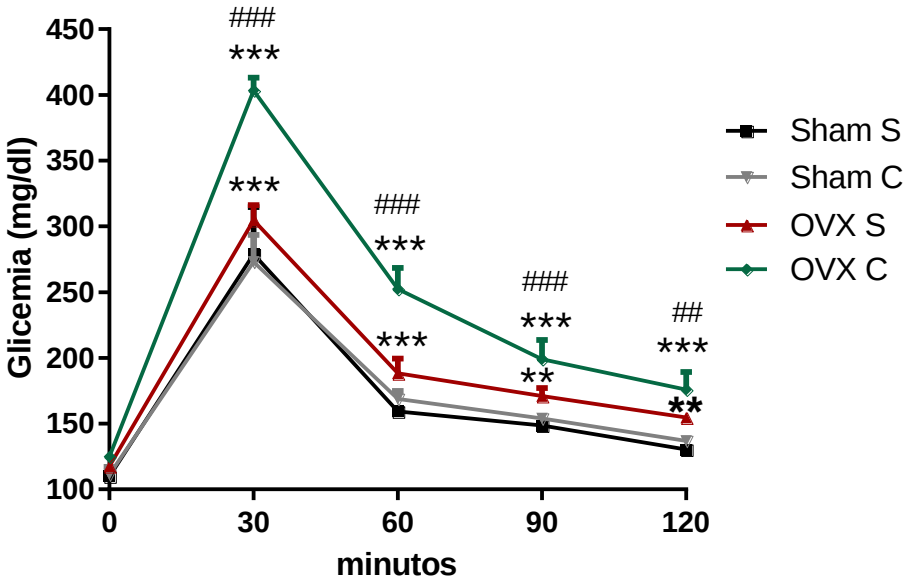
	Sham S	OVX S	Sham C	OVX C
Colesterol (mg/dL)	127,7±6,51	156,9±9,35*	139,2±2,98	146,6±5,44
Triglicerídeos (mg/dL)	87,40±3,12	93,04±1,18	86,99±3,18	91,78±2,11
HDL-c (mg/dL)	31,03±4,92	32,45±2,64	35,88±4,43	34,79±4,73
LDL-c (mg/dL)	86,72±3,58	88,76±7,50	85,14±2,89	91,87±3,79
VLDL-c (mg/dL)	17,90±0,66	18,10±0,38	18,18±0,67	19,94±1,10
Proteínas totais (mg/dL)	4,30±0,354	4,79±0,179	4,58±0,178	4,33±0,108
Albumina (mg/dL)	2,43±0,117	2,41±0,235	2,75±0,161	2,42±0,207
Cálcio (mg/dL)	9,28±0,477	8,72±0,293	9,81±0,278	9,44±0,197
Fósforo (mg/dL)	3,96±0,269	3,89±0,342	3,86±0,393	4,0±0,312
Fosfatase alcalina (mg/dL)	37,60±4,29	63,50±14,71*	30,43±4,94	68,83±5,34**
Estradiol (pg/mL)	102,40±13,26	48,97±5,51**	82,97±7,48	59,66±6,85*
Insulina (µUI/ml)	34,57±4,74	32,34±3,64	32,92±2,48	43,24±3,10

Nota: Dosagens de lipídios, hormônios, íons e proteínas em ratas aos 180 dias de vida. ShamS (n=8, ratas pseudo-operadas alimentadas com dieta contendo óleo de soja); ShamC (n=8, ratas pseudo-operadas alimentadas com dieta contendo óleo de canola); OVXS (n=8, ratas ovariectomizadas alimentadas com dieta contendo óleo de soja) e OVXC (n=8, ratas ovariectomizadas alimentadas com dieta contendo óleo de canola). Valores são apresentados em média±epm. ANOVA univariada, seguida do pós-teste Newman Keuls. * p<0,05; ** p<0,01 OVX S *vs* Sham S; OVX C *vs* Sham C.
Fonte: A autora, 2016.

5.4.5 Teste de tolerância à glicose intraperitoneal (TTGI)

Aos 179 dias de vida, a glicemia de jejum, ponto 0 da curva do TTGI, não diferiu entre os grupos (Sham S: 113,6±4,93mg/dL; OVX S:117,6±3,54mg/dL; Sham C: 118,0±6,23mg/dL; OVX C: 123,8±1,19mg/dL). Após a administração de solução de glicose, a glicemia nos grupos ovariectomizados foi significativamente maior, em todos os pontos da curva, quando comparada a de seus respectivos controles. Além disso, o grupo OVX C apresentou glicemia significativamente maior que a dos demais grupos, em todos os pontos da curva. Esses resultados podem ser observados no Gráfico 14.

Gráfico 14 – Teste de tolerância à glicose intraperitoneal aos 180 dias de vida

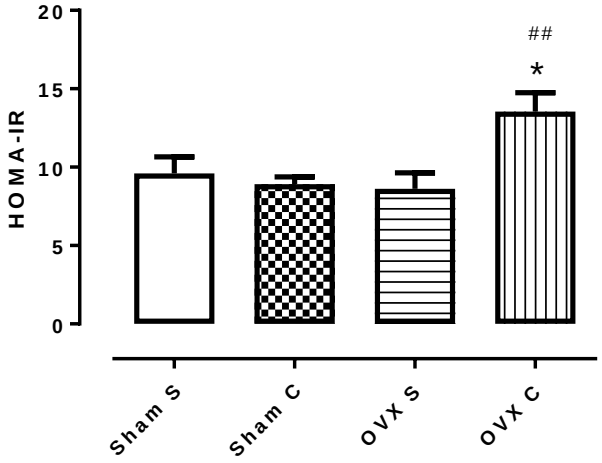


Legenda: Teste de tolerância à glicose intraperitoneal realizado em ratas após jejum de 6 horas. Solução de glicose administrada (2g /kg PC). ShamS (n=8, ratas pseudo-operadas alimentadas com dieta contendo óleo de soja); ShamC (n=8, ratas pseudo-operadas alimentadas com dieta contendo óleo de canola); OVXS (n=8, ratas ovariectomizadas alimentadas com dieta contendo óleo de soja) e OVXC (n=8, ratas ovariectomizadas alimentadas com dieta contendo óleo de canola). Valores são apresentados em média±epm. ANOVA bivariada, seguida do pós-teste Bonferroni. ** p<0,01, *** p<0,001 OVX S *vs* Sham S; OVX C *vs* Sham C. ## p<0,01, ### p<0,001 OVX C *vs* OVX S.
Fonte: A autora, 2016.

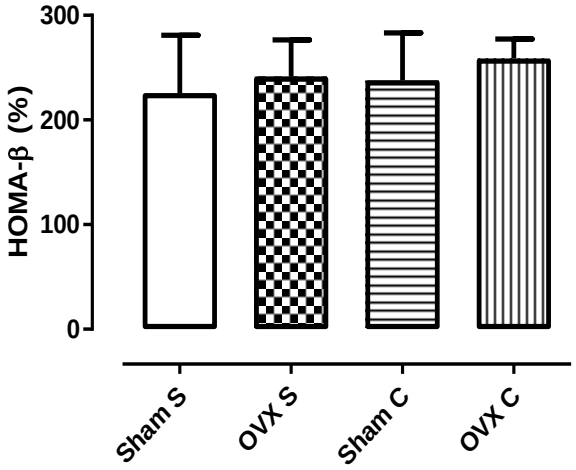
5.4.6 Índice de HOMA

Aos 180 dias de vida, o HOMA-IR foi maior somente no grupo OVX C, sendo 51% maior comparado ao seu controle Sham C e 57% maior em relação ao grupo OVX S. Enquanto, o HOMA-β não diferiu entre os grupos. Esses resultados podem ser observados no Gráfico 15A e 15B.

Gráfico 15 – Índice de HOMA de ratas aos 180 dias de vida



(a)



(b)

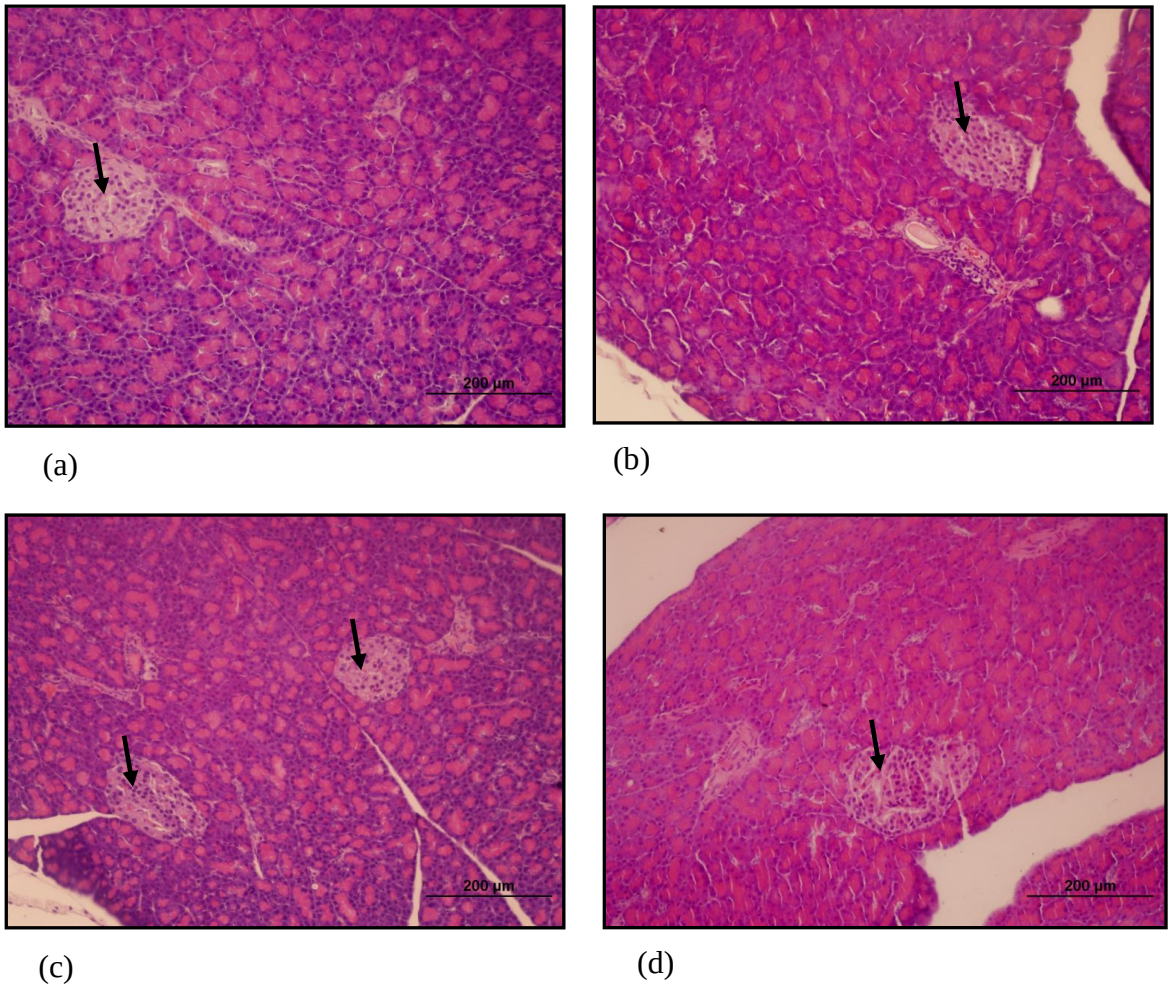
Legenda: (a) HOMA-IR; (b) HOMA-β. ShamS (n=8, ratas pseudo-operadas alimentadas com dieta contendo óleo de soja); ShamC (n=8, ratas pseudo-operadas alimentadas com dieta contendo óleo de canola); OVXS (n=8, ratas ovariectomizadas alimentadas com dieta contendo óleo de soja) e OVXC (n=8, ratas ovariectomizadas alimentadas com dieta contendo óleo de canola). Valores são apresentados em média±epm. ANOVA univariada, seguida do pós-teste Newman Keuls. * $p<0,05$ OVX C *vs* Sham C. ## $p<0,01$ OVX C *vs* OVX S.

Fonte: A autora, 2016.

5.4.7 Análise histomorfométrica do pâncreas

As imagens histológicas do pâncreas mostraram ilhotas pancreáticas de aspecto regular e de tamanhos semelhantes (Figura 16). A avaliação morfométrica confirmou a similaridade entre as áreas das ilhotas pancreáticas em todos os grupos (Gráfico 16).

Figura 16 – Fotomicrografias de pâncreas de ratas aos 180 dias de vida



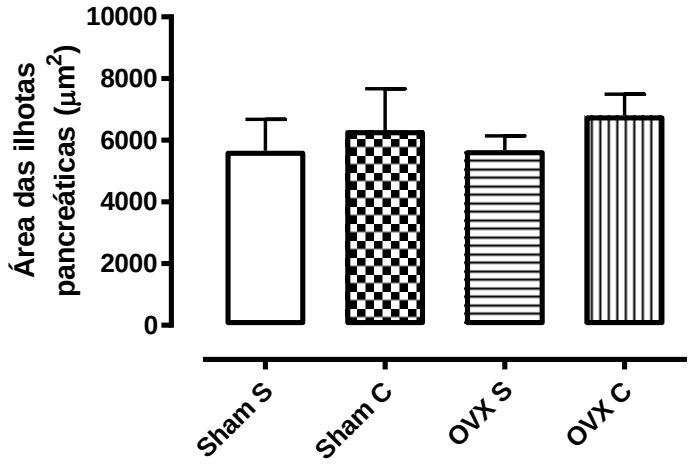
(a) (b)

(c) (d)

Legenda: (a) ShamS, ratas pseudo-operadas alimentadas com dieta contendo óleo de soja; (b) OVXS, ratas ovariectomizadas alimentadas com dieta contendo óleo de soja; (c) ShamC, ratas pseudo-operadas alimentadas com dieta contendo óleo de canola; (d) OVXC, ratas ovariectomizadas alimentadas com dieta contendo óleo de canola. n = 8 animais por grupo. Objetiva 20x. Coloração HE. Seta = ilhota pancreática.

Fonte: A autora, 2016.

Gráfico 16 – Área das ilhotas pancreáticas de ratas aos 180 dias de vida

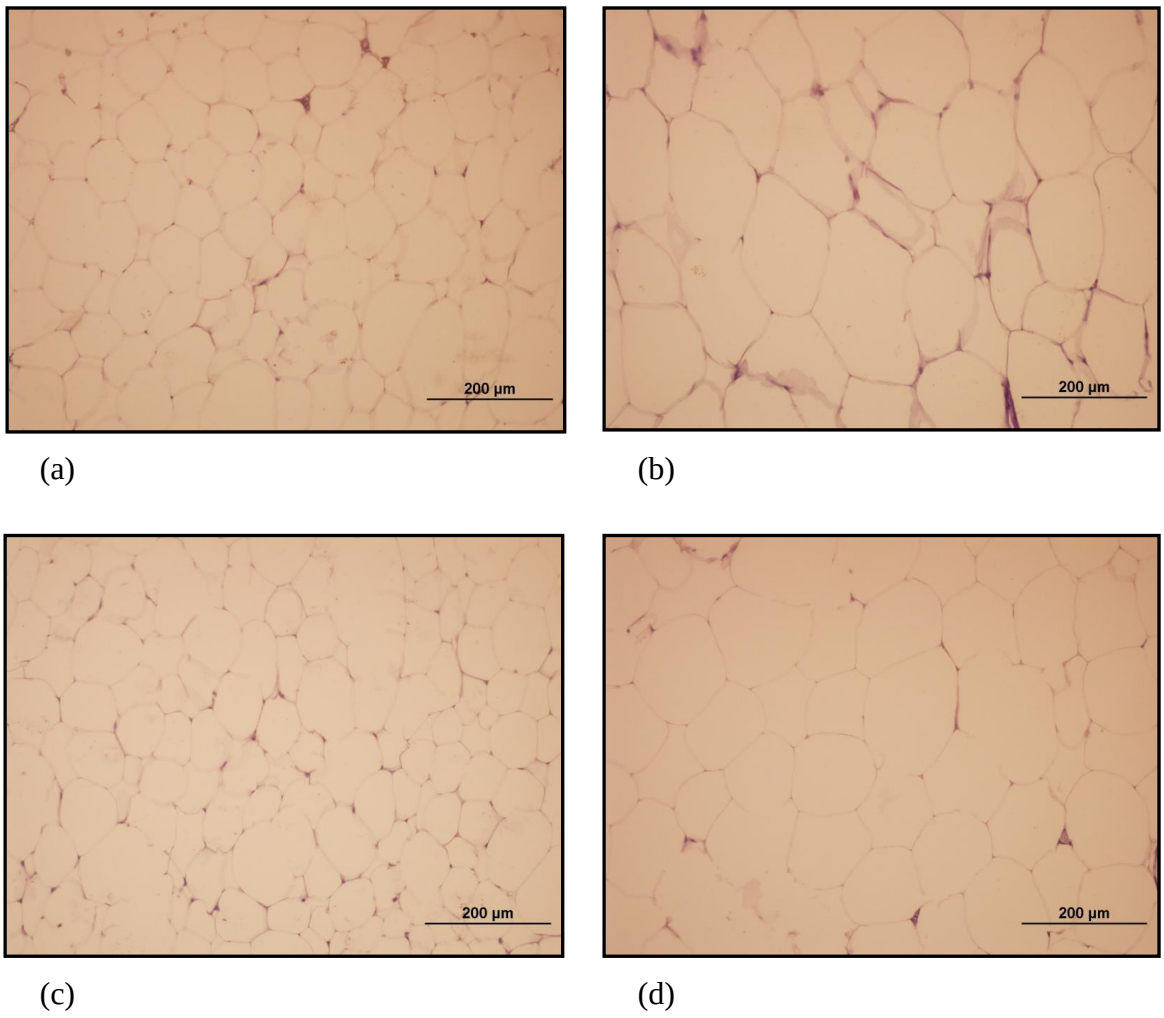


Legenda: ShamS (n=8, ratas pseudo-operadas alimentadas com dieta contendo óleo de soja); ShamC (n=8, ratas pseudo-operadas alimentadas com dieta contendo óleo de canola); OVXS (n=8, ratas ovariectomizadas alimentadas com dieta contendo óleo de soja) e OVXC (n=8, ratas ovariectomizadas alimentadas com dieta contendo óleo de canola). Valores são apresentados em média±epm. ANOVA univariada, seguida do pós-teste Newman Keuls.
Fonte: A autora, 2016.

5.4.8 Análise histomorfométrica do tecido adiposo retroperitoneal

Os animais de ambos os grupos Sham apresentaram adipócitos de tamanho médio a pequeno e, predominantemente, de formato poligonal. Enquanto, os animais ovariectomizados apresentaram adipócitos de formato poligonal e tamanho grande (Figura 17). A avaliação morfométrica corrobora estas informações, ressaltando a maior área de adipócitos nos grupos OVX S e OVX C quando comparados aos seus respectivos controles (Gráfico 17).

Figura 17 – Fotomicrografias de tecido adiposo retroperitoneal de ratas aos 180 dias de vida



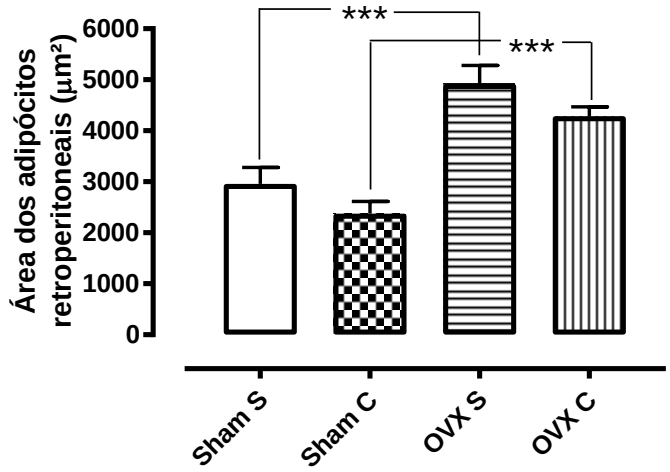
(a) (b)

(c) (d)

Legenda: (a) ShamS, ratas pseudo-operadas alimentadas com dieta contendo óleo de soja; (b) OVXS, ratas ovariectomizadas alimentadas com dieta contendo óleo de soja; (c) ShamC, ratas pseudo-operadas alimentadas com dieta contendo óleo de canola; (d) OVXC, ratas ovariectomizadas alimentadas com dieta contendo óleo de canola. n = 8 animais por grupo. Objetiva 20x. Coloração HE.

Fonte: A autora, 2016.

Gráfico 17 – Área dos adipócitos retroperitoneais de ratas aos 180 dias de vida

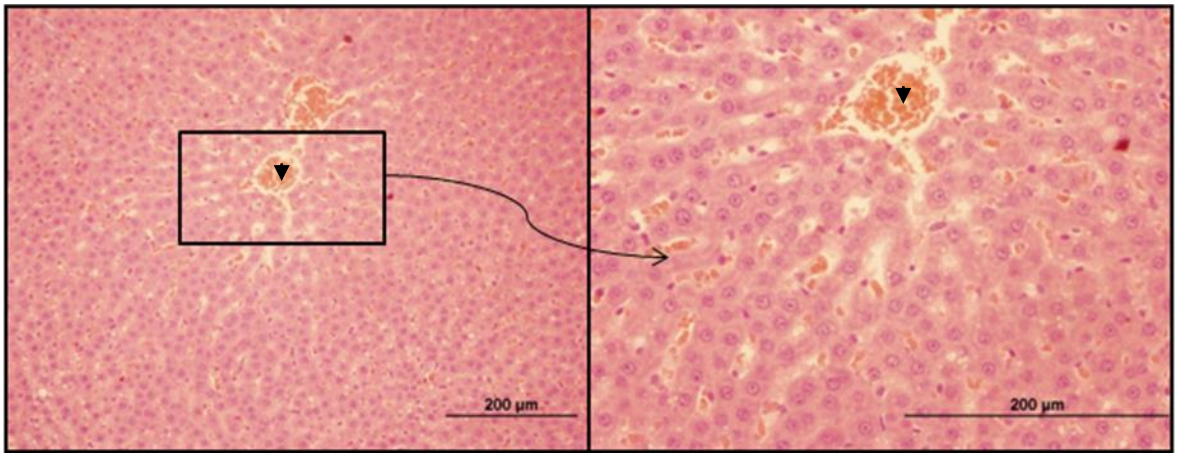


Legenda: ShamS (n=8, ratas pseudo-operadas alimentadas com dieta contendo óleo de soja); ShamC (n=8, ratas pseudo-operadas alimentadas com dieta contendo óleo de canola); OVXS (n=8, ratas ovariectomizadas alimentadas com dieta contendo óleo de soja) e OVXC (n=8, ratas ovariectomizadas alimentadas com dieta contendo óleo de canola). Valores são apresentados em média±epm. ANOVA univariada, seguida do pós-teste Newman Keuls. *** p>0,001 OVX S *vs* Sham S; OVX C *vs* Sham C.
Fonte: A autora, 2016.

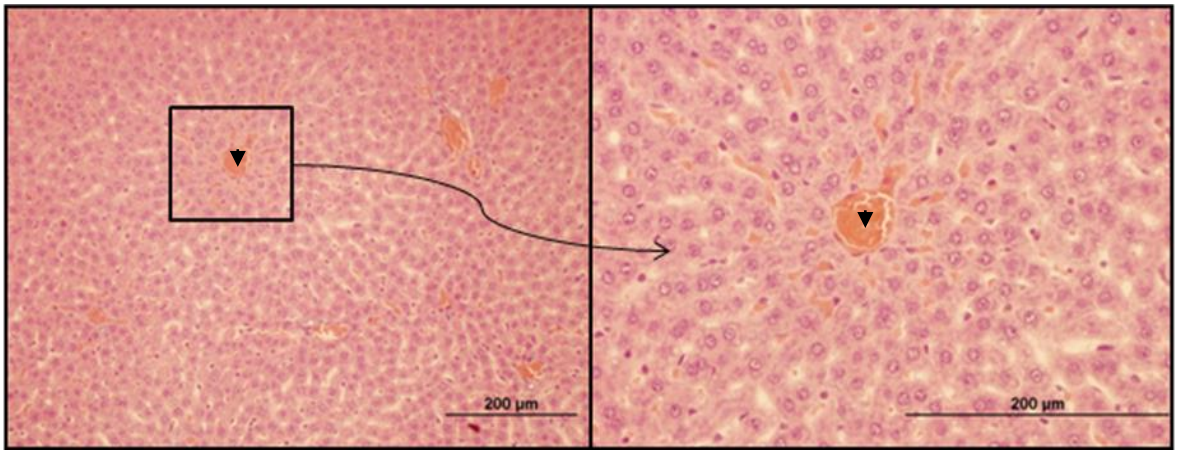
5.4.9 Morfologia hepática

As imagens histológicas de fígado revelaram que os animais alimentados com dieta contendo óleo de soja apresentam um parênquima hepático de aspecto normal, com hepatócitos íntegros rodeando a veia centro-lobular. Em contrapartida, os animais alimentados com dieta contendo óleo de canola apresentaram esteatose hepática, e, aparentemente, o quadro é mais severo nos animais do grupo OVX C (Figura 18).

Figura 18 – Fotomicrografias de fígado de ratas aos 180 dias de vida (continua)

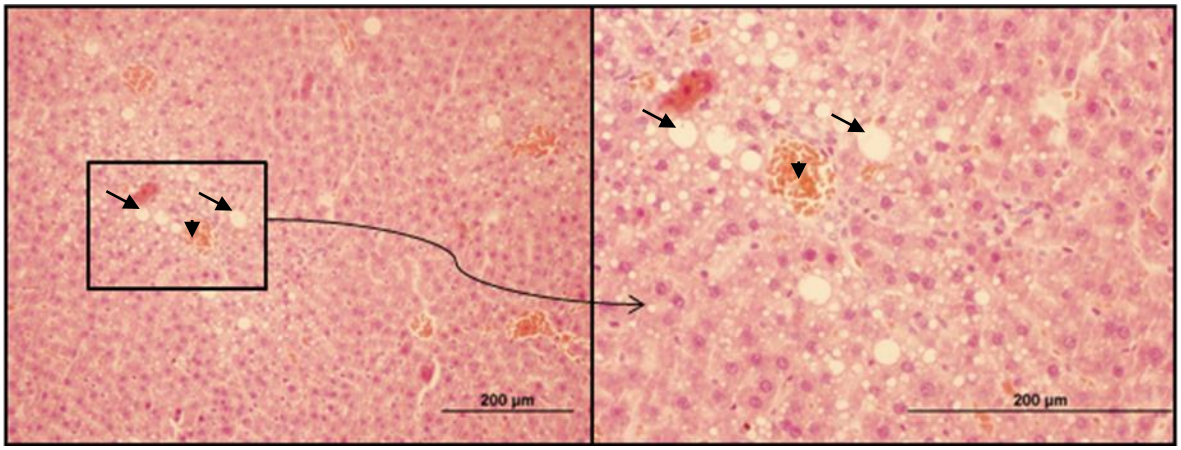


(a)

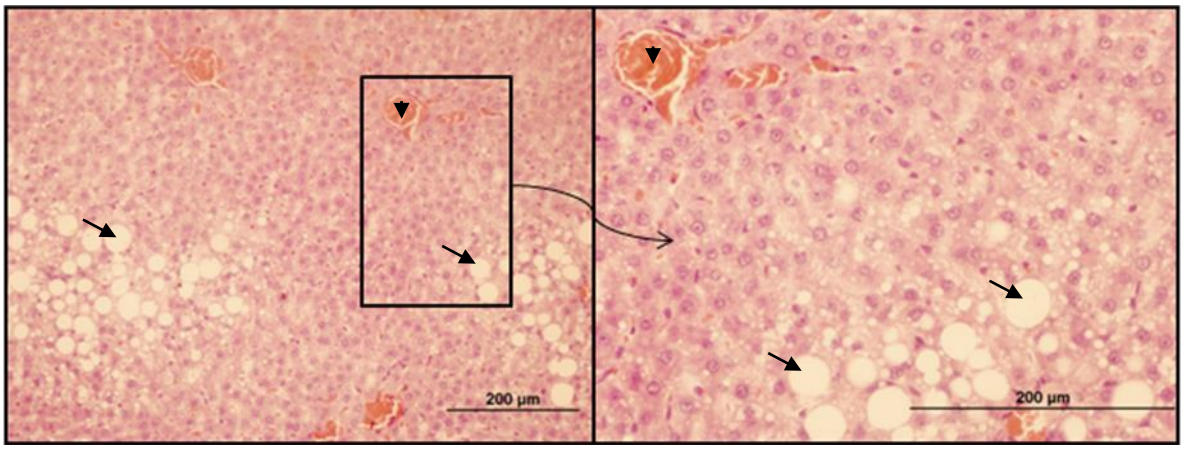


(b)

Figura 18 – Fotomicrografia de fígado de ratas aos 180 dias de vida (conclusão)



(c)



(d)

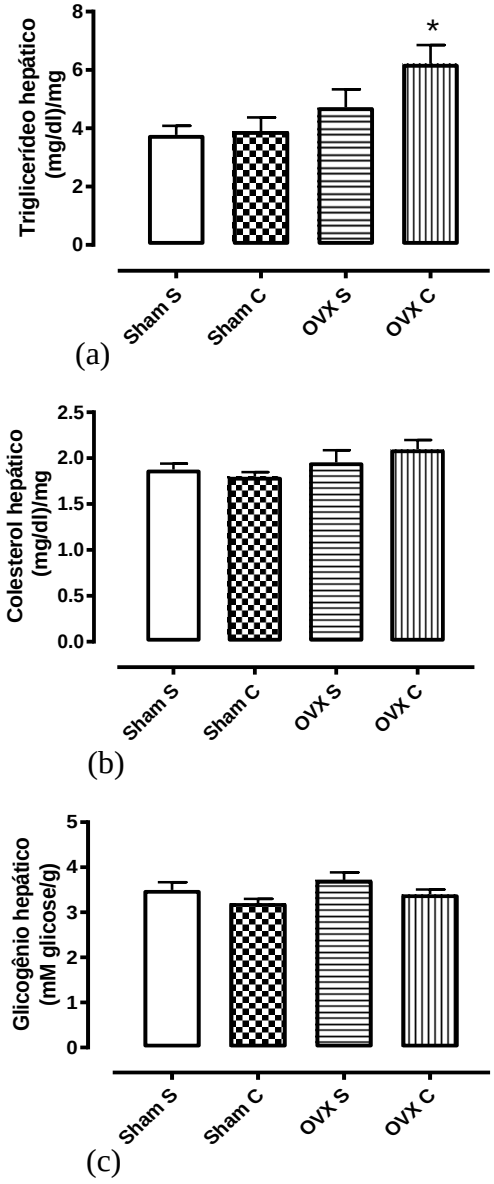
Legenda: (a) ShamS, ratas pseudo-operadas alimentadas com dieta contendo óleo de soja; (b) OVXS, ratas ovariectomizadas alimentadas com dieta contendo óleo de soja; (c) ShamC, ratas pseudo-operadas alimentadas com dieta contendo óleo de canola; (d) OVXC, ratas ovariectomizadas alimentadas com dieta contendo óleo de canola. n = 8 animais por grupo. Coloração HE. Imagens à esquerda = objetiva de 20x; Imagens à direita = objetiva de 40x. Setas = gotas lipídicas. Cabeça de seta = veia centro-lobular.
Fonte: A autora, 2016.

5.4.10 Conteúdo intra- hepático de triglicerídeo, colesterol e glicogênio

As amostras de fígado dos animais do grupo OVX C revelaram maior conteúdo de triglicerídeo hepático (52%) quando comparado ao seu controle Sham C. Os conteúdos de

colesterol e glicogênio hepáticos não diferiram entre os grupos. Esses resultados podem ser observados no Gráfico 18 (A-C).

Gráfico 18 – Análise de triglicerídeo, colesterol e glicogênio hepáticos aos 180 dias de vida



Legenda: (a) Triglicerídeo; (b) Colesterol; (c) Glicogênio hepáticos aos 180 dias de vida. ShamS (n=8, ratas pseudo-operadas alimentadas com dieta contendo óleo de soja); ShamC (n=8, ratas pseudo-operadas alimentadas com dieta contendo óleo de canola); OVXS (n=8, ratas ovariectomizadas alimentadas com dieta contendo óleo de soja) e OVXC (n=8, ratas ovariectomizadas alimentadas com dieta contendo óleo de canola). Valores são apresentados em média±epm. ANOVA univariada, seguida do pós-teste Newman Keuls. * p>0,05 OVX C *vs* Sham C.

Fonte: A autora, 2016.

5.4.11 Análises ósseas

A massa do fêmur no grupo OVX S foi menor (-14%) em relação ao seu controle Sham S. DMO de fêmur e vértebra L4 foram menores nos grupos OVX S (-10% e -13%, respectivamente) e OVX C (-9% e -14%, respectivamente), comparada aos seus controles. Da mesma forma, evidenciou menores radiodensidades em cabeça de fêmur e corpo vertebral nos grupos OVX S (-15% e -17%) e OVX C (-15% e -21%), em relação a seus respectivos controles. As demais avaliações ósseas não diferiram entre os grupos (Tabela 15).

Tabela 15 – Análises ósseas aos 180 dias de vida

Medidas ósseas	Sham S	OVX S	Sham C	OVX C
Peso fêmur (g)	1,06±0,029	0,92±0,017*	1,01±0,028	1,0±0,044
Peso vértebra L4 (g)	0,38±0,013	0,35±0,009	0,38±0,021	0,37±0,019
Distância entre as epífises (mm)	37,19±0,320	36,49±0,383	36,86±0,251	36,86±0,373
Distância entre os trocânteres (mm)	8,31±0,097	8,05±0,114	8,08±0,120	8,13±0,084
Largura da diáfise (mm)	4,24±0,045	4,08±0,060	4,18±0,049	4,21±0,054
Altura da vértebra L4 (mm)	8,36±0,101	8,21±0,075	8,31±0,105	8,21±0,115
Indicadores de integridade óssea	Sham S	OVX S	Sham C	OVX C
DMO fêmur (g/cm²)	0,166±0,003	0,150±0,003**	0,169±0,002	0,154±0,003**
CMO fêmur (g)	0,46±0,020	0,41±0,014	0,46±0,020	0,43±0,018
Área óssea fêmur (cm²)	3,0±0,001	3,0±0,001	3,0±0,001	3,0±0,001
DMO vértebra L4 (g/cm²)	0,155±0,003	0,135±0,003**	0,152±0,005	0,132±0,004**
CMO vértebra L4 (g)	0,10±0,001	0,10±0,001	0,10±0,001	0,10±0,001
Área óssea vértebra L4 (cm²)	1,0±0,001	1,0±0,001	1,0±0,001	1,0±0,001
Radiodensidade da cabeça do fêmur (HU)	1517±14,99	1302±44,17**	1558±38,73	1336±49,30**
Radiodensidade do corpo vertebral da L4 (HU)	1015±41,87	845,3±38,60**	1039±32,79	826,9±39,66**

Nota: Medidas de fêmur e quarta vértebra lombar de ratas aos 180 dias de vida. ShamS (n=8, ratas pseudo-operadas alimentadas com dieta contendo óleo de soja); ShamC (n=8, ratas pseudo-operadas alimentadas com dieta contendo óleo de canola); OVXS (n=8, ratas ovariectomizadas alimentadas com dieta contendo óleo de soja) e OVXC (n=8, ratas ovariectomizadas alimentadas com dieta contendo óleo de canola). Valores são apresentados em média±epm. (ANOVA univariada, seguida do pós-teste Newman Keuls). * p<0,05; ** p<0,01 OVX S *vs* Sham S; OVX C *vs* Sham C.

Fonte: A autora, 2016.

6 DISCUSSÃO

Dentre os vários fatores moduladores do metabolismo ósseo, o fator nutricional vem despontando nas pesquisas pelas possibilidades positivas e negativas de ação, em função do tipo e da quantidade de alimento consumido. Os lipídios, ou mais especificamente, os ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa devem ser consumidos em quantidades apropriadas, para garantir a integridade óssea (KRUGER *et al*, 2010). A ação hormonal também influencia a dinâmica óssea, sendo o estradiol um importante regulador do crescimento dos ossos, estimulando o crescimento linear e fechamento das epífises, e ainda, promovendo a manutenção da massa óssea. Dessa forma, entende-se que de acordo com a fase da vida que a mulher se encontre, reprodutiva ou pós-menopausa, a integridade do osso se altera (OURY, 2012).

Ao longo do desenvolvimento, o osso passa por diferentes fases, em um constante processo de remodelação. Na infância e adolescência predomina o processo de formação óssea; na vida adulta ocorre um equilíbrio entre formação e reabsorção, mantendo constante a massa óssea; já na senescência o processo de reabsorção prevalece, promovendo maior perda óssea (KARSENTY, 2012). Assim, torna-se relevante entender como o os fatores nutricional e hormonal, isolados ou associados, influenciam o metabolismo ósseo ao longo das etapas da vida. O adequado pico de massa óssea na adolescência pode significar benefício à manutenção de sua integridade na senescência, prevenindo a redução acentuada da massa óssea (KRAHE, 2003).

No presente estudo, o perfil de fêmeas murinas no período de desmame, 21 dias, determinou o padrão de composição corporal e dados bioquímicos antes de uma intervenção experimental. Ressalta-se que esta análise inicial foi realizada para observar se havia homogeneidade entre os animais. E assim, ratificou-se o previsto, com os animais apresentando as mesmas características corporais e metabólicas no ponto inicial, não ocorrendo discrepâncias que pudessem interferir nos resultados. Destaca-se que possíveis alterações são consequências da intervenção experimental submetida a cada grupo, visto que o perfil encontrado está de acordo com o descrito na literatura (SANTOS, 2002).

As ratas jovens que consumiram ração contendo óleo de soja ou de canola, a partir do desmame, não apresentaram alteração no padrão alimentar, massa e comprimento corporais e, composição corporal analisada pelo DXA, aos 60 dias de vida. Constata-se que a dieta normolipídica, contendo óleo de soja ou óleo de canola, promove ação similar sobre o

desenvolvimento corporal dos animais. Por outro lado, a dieta com óleo de canola promoveu a formação de adipócitos retroperitoneais menores, possivelmente, sendo estes mais numerosos, o que compensou a massa de gordura visceral, tornando-a semelhante a dos animais alimentados com dieta de óleo de soja. Esse padrão de desenvolvimento corporal e de morfologia do tecido adiposo é independente do dimorfismo sexual, visto que resultados similares foram observados em trabalho com ratos machos jovens alimentados com esta mesma dieta (COSTA *et al*, 2012).

O consumo de óleo de canola durante o período de desenvolvimento e maturidade sexual, 60 dias, promoveu alterações no metabolismo glicídico, levando ao estado de intolerância à glicose, hiperinsulinemia e resistência à insulina. Embora a glicemia de jejum não diferisse entre os grupos, a hiperinsulinemia observada no grupo canola pode ser explicada pelo fato dessas ratas secretarem maior quantidade de insulina para manter os níveis normoglicêmicos. Ademais, essas ratas não apresentam resposta eficiente a uma sobrecarga de glicose, revelando problemas na captação de glicose, em consequência de uma resistência à insulina. Esse dado foi confirmado pelo aumento da área das ilhotas pancreáticas, assim como o aumento do índice HOMA-β, que caracteriza maior atividade da ilhota pancreática com hipersecreção de insulina. O óleo de canola é rico em ácido graxo monoinsaturado, representado pelo ácido oléico, que desempenha importante papel sobre a via de secreção de insulina e função da célula beta. Sua ação através de receptor acoplado à proteína G (GPR40) estimula a secreção de insulina via aumento de cálcio intracelular, apenas em condições de alta concentração de glicose sanguínea. Portanto, a contínua exposição ao ácido oléico pode induzir a elevação do cálcio intracelular, de longa duração, e culminar em toxicidade ao cálcio, e consequente, disfunção das células beta (FUJIWARA, MAEKAWA & YADA, 2005). Nesse contexto, acredita-se que as alterações no metabolismo glicídico, observadas no grupo canola, tenham ocorrido devido à disfunção das células beta em resposta à exposição ao ácido oléico presente nessa dieta.

Aos 60 dias de vida, a dieta contendo óleo de canola também foi prejudicial para o fígado, promovendo aumento do seu peso associado com aumento de triglicerídeo hepático, de alanina transaminase e fosfatase alcalina plasmáticas, o que sugere dano hepático (BERTOLAMI, 2005; CHAVES *et al*, 2012). A avaliação morfológica revelou um quadro de micro-esteatose hepática, sendo esta alteração considerada uma esteatose leve. O acúmulo de gordura no fígado está associado à resistência dos tecidos a insulina. Esta leva ao aumento da lipólise no tecido adiposo e maior aporte de ácidos graxos ao fígado, causando alterações no metabolismo de ácidos graxos, incluindo aumento da lipogênese hepática, falha na oxidação

de ácidos graxos e aumento do conteúdo de triglicerídeo hepático (BROWNING & HORTON, 2004; CAVE *et al*, 2007). Outrossim, é descrito que o ácido oléico é bastante esteatogênico, e sua ação está relacionada com a diminuição da expressão de PPAR-α e aumento da expressão de PPAR-γ e PPAR-δ. O ácido oléico induz esteatose hepática sem alteração da via de sinalização de insulina no fígado, em consequência do aumento de PPAR-δ (RICCHI *et al*, 2009; WU *et al*, 2012). É sugestivo que o quadro de esteatose hepática microvesicular observada, seja induzido pelo ácido oléico presente no óleo de canola.

Por outro lado, o aumento de glicogênio hepático no grupo canola parece estar associado ao ácido oléico, pois segundo descrito, este ácido graxo estimula o aumento da expressão do transportador de glicose no fígado, GLUT-2, estimulando o influxo de glicose. O estudo *in vitro*, realizado com células humanas hepáticas incubadas em alta concentração de ácido oléico, induziu esteatose hepática e desencadeou o aumento da expressão de GLUT-2, favorecendo a glicogênese (OKAMOTO, TANAKA & HAGA, 2002).

Quanto às concentrações plasmáticas de estradiol, foi evidenciada em ratas, aos 60 dias, a diminuição deste hormônio com o consumo de óleo de canola. É descrito que os ácidos graxos poliinsaturados podem modular a expressão de enzimas-chaves da esteroidogênese, através de precursores da síntese de prostaglandinas, destacando a ação do ácido araquidônico que aumenta a expressão de proteína StAR (WATHES, ABAYASEKARA & AITKEN, 2007; ZACHUT *et al*, 2008). Também é descrito que o ácido linoléico aumenta o número de folículos e oócitos nos ovários e as concentrações plasmáticas de estradiol (ROBINSON *et al*, 2002; ZERON, SKLAN & ARAV 2002). Assim, é possível que nos animais do grupo canola, cuja fonte dietética contém pouco ácido linoléico, ocorra diminuição de ácido araquidônico, levando a menor esteroidogênese. Na literatura, há escassos relatos que buscam correlacionar o óleo de canola ou o ácido oléico com o sistema reprodutor. Em um estudo, a diminuição de estradiol e de ácido araquidônico plasmáticos foi observada quando vacas consumiram dieta com baixa concentração de ácidos graxos insaturados, contendo 8,4% de ácido oléico + 1,5% de ácido linoléico (ZACHUT *et al*, 2008).

Os lipídios circulantes não diferiram entre os grupos, estando de acordo com a definição que o consumo de ácidos graxos poliinsaturados em quantidades apropriadas é benéfico para o perfil lipídico (WEILER & FITZPATRICK-WONG, 2002). É descrito que o ácido linoléico diminui VLDL, não altera LDL e pode reduzir HDL, enquanto o ácido linolênico reduz VLDL, aumenta LDL e não altera HDL, já o ácido oléico reduz VLDL, LDL e colesterol total, sem aumentar triglicerídeos (RICCARDIA, GIACCOB & RIVELLESE,

2003; SMITH *et al*, 2003). A fosfatase alcalina, um marcador de formação óssea, apresentou aumento plasmático nos animais alimentados com dieta contendo óleo de canola (CADORE, BRENTANO & KRUEL, 2005). No entanto, como a técnica utilizada para avaliação de fosfatase não era específica para osso, não é possível inferir o maior estímulo para formação óssea no grupo canola, visto que alterações hepáticas também podem promover aumento de fosfatase alcalina (RAUCH *et al*, 1997; MILLER *et al*, 1999; BERTOLAMI, 2005).

Em relação à estrutura óssea, os métodos de estudo utilizados – medidas, tomografia e densitometria – não apontaram diferença entre os grupos aos 60 dias. Associado a esses resultados, as concentrações plasmáticas de cálcio e fósforo também se mantiveram similares entre os grupos. Nesse período experimental, os animais são jovens e se encontram em processo de formação óssea. A dieta contendo óleo de canola não influenciou o processo de remodelação óssea e nem estimulou um maior pico de massa óssea, considerando o papel estimulador do ômega-3 sobre a formação óssea. Provavelmente, a razão ômega-6/ômega-3 do óleo de canola, não seja suficiente para promover benefícios, além de serem desconhecidos os efeitos do ácido oléico sobre a estrutura óssea.

Ao comparar o presente resultado com estudo prévio do nosso grupo realizado em ratos machos jovens (COSTA *et al*, 2012), foram observados melhores resultados na estrutura óssea de fêmeas. Nos machos, a dieta com óleo de canola promoveu redução do peso das peças ósseas e da densidade mineral óssea de fêmur e vértebra lombar, além de menor concentração dos níveis de insulina e menor adiposidade abdominal. Essa resposta gênero-dependente pode ser devido ao fato das fêmeas possuírem o estradiol como um hormônio regulador do processo de remodelação óssea, inibindo a reabsorção e favorecendo a formação óssea (KOURSENTY, 2012; OURY, 2012). Reforçando esta resposta houve o aumento da concentração de insulina nas fêmeas, outro potente hormônio regulador do desenvolvimento ósseo, atuando diretamente na proliferação e atividade dos osteoblastos e estimulando a formação óssea (ZILLIKENS *et al*, 2010). Até mesmo a adiposidade, promovendo maior ação mecânica, pode estar beneficiando a estrutura óssea das fêmeas (RHIE *et al*, 2010).

Aos 90 dias de vida, os animais dos grupos canola e soja mostraram respostas similares a vários aspectos estudados. A estrutura corporal avaliada através de medidas e por densitometria foi semelhante entre os grupos, assim como, a ingestão alimentar. A alimentação com óleo de canola promoveu uma resposta biológica típica no tecido adiposo, ou seja, com adipócitos retroperitoneais pequenos, e provavelmente, mais numerosos. O óleo de canola, comparado ao óleo de soja, apresenta baixa quantidade de ômega-6 (21% *vs*. 54%)

e maior quantidade de ômega-3 (11% *vs.* 8%), respectivamente. É descrito que a elevada ingestão de ômega-6 promove o recrutamento e a diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos, via receptor ativado por proliferadores de peroxissoma (PPAR-γ). Logo, a menor ingestão deste ácido graxo determina menor adipogênese e menor hipertrofia de adipócitos (MASSIERA *et al*, 2003). Complementando, a ingestão de fontes ricas em ômega-3 estimula a expressão de genes relacionados à oxidação dos ácidos graxos e à supressão de genes lipogênicos através da ação de PPAR-α sobre o fator de transcrição SREBP (proteína ligante do elemento regulatório de esteróides), com consequente limitação ao acúmulo de gordura ingerida e redução da área dos adipócitos (HSU & HUANG, 2006).

Em relação ao metabolismo glicídico, não houve diferença entre os grupos quanto aos indicadores avaliados. Aos 90 dias de vida, o consumo de ração contendo óleo de soja ou de canola não interferiu na glicemia, insulinemia, índices de HOMA e estrutura das ilhotas pancreáticas, tendo ambos os grupos, uma resposta metabólica à sobrecarga de glicose, dentro dos padrões de normalidade.

Os indicadores hepáticos de estrutura e função avaliados apresentaram aspectos de normalidade, nos grupos soja e canola. Exceto pelo aumento de glicogênio hepático verificado nos animais alimentados com dieta contendo óleo de canola. O maior acúmulo de glicose hepática pode estar associado ao tipo de ácido graxo presente na dieta, posto que a resposta observada sugere um efeito estimulador do ácido oléico sobre a glicogênese hepática. De acordo com a literatura, o ácido oléico aumenta a expressão de GLUT-2 e acelera a síntese de glicogênio hepático através do aumento da atividade da enzima serina desidratase (TAKEUCHI *et al*, 2001; OKAMOTO, TANAKA & HAGA, 2002).

Surpreendentemente a fosfatase alcalina estava aumentada no grupo canola, sugestivo de um dano hepático anterior, porém, não condizendo com o aspecto morfológico do fígado e tão pouco, com a estrutura óssea aos 90 dias de vida. As análises ósseas e o conteúdo plasmático de cálcio e fósforo não diferiram entre os grupos mostrando que os óleos vegetais utilizados mantiveram a homeostasia no tecido ósseo. É bastante descrito na literatura que dietas contendo ômega-3 ou com baixa relação ômega-6/ômega-3 estão associadas à formação óssea e redução do *turnover* ósseo, sendo sugeridas como parte do tratamento contra osteoporose (WATKINS *et al*, 2000; WATKINS *et al*, 2003; WEISS *et al*, 2005; RAHMAN *et al*, 2009). Conforme verificado aos 60 dias, a baixa relação ômega-6/ômega-3 do óleo de canola, comparado ao óleo de soja, não atingiu as expectativas de um melhor padrão ósseo.

Aos 180 dias de vida, os animais estavam sobre a influência do tipo de dieta e, também da presença ou deficiência de esteróides sexuais. Esta última, determinada pela remoção bilateral dos ovários, sendo esta prática muito comum para simular a menopausa em modelos experimentais (ARMADA *et al*, 2006; KORSE *et al*, 2009; SANTANA *et al*, 2011). Antes de realizar a ovariectomia, todos os animais foram submetidos à análise da composição corporal por DXA, de forma a observar suas condições iniciais antes de submetê-los a outro fator que modula o metabolismo ósseo. Nessa etapa, todos os quatro grupos foram avaliados por citologia vaginal. As ratas dos grupos Sham apresentavam ciclo estral regular e as dos grupos OVX encontravam-se em anestro.

A evolução da massa corporal mostrou que a remoção dos ovários levou ao ganho de massa corporal, sem alteração na ingestão alimentar. Esta variação da massa corporal vem sendo relatada em muitos estudos, associada ou não com a hiperfagia (GEARY, 2004; ASSARIAN & GEARY, 2006; SANTANA *et al*, 2011). Logo após a cirurgia, os grupos ovariectomizados apresentaram uma diminuição na ingestão alimentar, que pode ser reflexo da dor causada pela intervenção cirúrgica, apesar dos animais terem recebido solução analgésica pós-cirúrgica. Poucos dias depois, o consumo alimentar foi normalizado.

A comprovação da eficácia do modelo de ovariectomia foi determinada pela redução significativa da concentração plasmática de estradiol e da massa do útero, conforme descrito em outros estudos que utilizam este modelo experimental de menopausa (ARMADA *et al*, 2006; SACCO *et al*, 2009; ARAUJO *et al*, 2010; MA *et al*, 2010; SANTANA *et al*, 2011). A massa do útero é normalmente utilizada como um indicador de deficiência estrogênica, uma vez que este órgão é alvo de estrogênios e na sua ausência é desencadeado um processo de atrofia endometrial (RIMOLDI *et al*, 2007). A concentração plasmática de estradiol observada nos grupos OVX é consequência da conversão periférica de androgênios, provenientes da glândula adrenal, no tecido adiposo pela ação da enzima aromatase (FRANCI & ANSELMO-FRANCI, 2013).

O estrogênio é um importante regulador da deposição lipídica no tecido adiposo. Sua ausência, em mulheres após a menopausa e em modelos experimentais de ovariectomia, promove o aumento da massa corporal, a redistribuição e o aumento da deposição de tecido adiposo na região abdominal e a hipertrofia de adipócitos (ARABI *et al*, 2003; ARMADA *et al*, 2006; SAENGSIRISUWAN *et al*, 2009; SANTANA *et al*, 2011). Nas ratas OVX S e OVX C o aumento típico na adiposidade foi observado, com hipertrofia de adipócitos, aumentada massa e percentual de gordura total e do tronco, avaliadas pelo DXA, bem como, pela massa de gordura visceral.

A massa magra, outro indicador de composição corporal, apresentou uma redução que já é bem descrita em modelos experimentais de ovariectomia e em mulheres após a menopausa (ORSATTI *et al*, 2006; LEITE *et al*, 2009; CORAZZA, 2012). A sarcopenia é uma característica do processo de envelhecimento e tem como fatores predisponentes, a diminuição de atividade física, o aumento dos processos catabólicos no músculo esquelético, o aumento de mediadores inflamatórios e a diminuição do hormônio do crescimento e de esteróides sexuais (DOHERTY, 2003; ALMADA-FILHO E CENDOROGLO, 2013). No presente estudo, possivelmente, a sarcopenia está relacionada à deficiência estrogênica. No entanto, há pouca informação disponível sobre este mecanismo de ação. A massa muscular não é afetada diretamente pelos estrógenos e na menopausa tal redução é oriunda de algum evento secundário, sendo postulado que a sarcopenia na menopausa é consequência dos baixos níveis séricos de testosterona livre (VOLPI, NAZEMI & FUJITA, 2004). Outro mecanismo relatado é o aumento na produção de IL-1 e IL-6 em consequência da diminuição dos hormônios sexuais, sugerindo um efeito catabólico indireto sobre o músculo (MORLEY, THOMAS & WILSON, 2006).

As ratas ovariectomizadas, apesar da normoglicemia em jejum, são intolerantes à sobrecarga de glicose, determinando uma falha no controle glicêmico. Enquanto a insulinemia não se altera entre os grupos, mas, tende a ser mais elevada nos animais OVX C, acompanhando o significativo aumento no HOMA-IR, apontando para uma resistência à insulina nestes animais. Por outro lado, a área e a capacidade secretória da ilhota pancreática se mantiveram semelhantes em todos os grupos. Nesse contexto, nota-se que os animais possuem uma secreção de insulina normal, o que os mantém normoglicêmicos. Porém, em condições de sobrecarga de glicose, os grupos OVX não apresentam eficiência na função insulínica, seja por não aumentar a secreção de insulina ou por resistência à insulina, passando a uma situação de hiperglicemia. As alterações no metabolismo glicídico promovidas pela ovariectomia são caracterizadas por hiperglicemia, intolerância à glicose, hiperinsulinemia e resistência à insulina (ROSANO *et al*, 2003; LIU *et al*, 2004; MACOTELA *et al*, 2009). Destaca-se nas ratas OVX C, maior efeito negativo sobre a glicemia, estando esta resposta associada à interação dos dois fatores, a longa exposição ao ácido oléico presente no óleo de canola e a deficiência estrogênica.

A deficiência estrogênica está associada a alterações desfavoráveis no perfil lipídico, com aumento nas concentrações séricas de triglicerídeos, colesterol total e LDL-c e declínio de HDL-c (BITTNER, 2001; ROSANO *et al*, 2003; LEITE *et al*, 2009). No presente estudo, a ovariectomia foi responsável pelo aumento da concentração plasmática de colesterol total no

grupo OVX S. Por outro lado, o óleo de canola atuou como fator protetor no grupo OVX C, por ser uma importante fonte de ômega-3 e apresentar elevada proporção de ômega-9, quando comparado ao óleo de soja (61% *vs.* 23%, respectivamente). Já foi estabelecido que dieta enriquecida com ômega-3 é benéfica para a redução sérica de colesterol, triglicerídeos e manutenção do HDL-c (LIEN *et al*, 2001; MORI *et al*, 2003). Assim como, o ômega-9 tem um importante papel na redução do colesterol sérico e manutenção de HDL-c e triglicerídeo (SMITH *et al*, 2003). Dessa forma, sugere-se que a dieta contendo óleo de canola apresenta um efeito protetor em relação ao perfil lipídico, prevenindo as alterações lipídicas promovidas pela deficiência estrogênica.

Em situação de deficiência estrogênica ocorrem alterações no metabolismo hepático, com diminuição da oxidação de ácidos graxos que favorecem o acúmulo de triglicerídeos e levam ao quadro de esteatose hepática (CAMPOS-SHIMADA *et al*, 2015; PARKOSADZE *et al*, 2012). O grupo OVX C apresentou esta resposta padrão, com aumento do conteúdo intra-hepático de triglicerídeo e presença de gotículas lipídicas no parênquima hepático. Em contrapartida, o grupo OVX S não apresentou alterações hepáticas. As alterações hepáticas só foram observadas nos animais alimentados com dieta contendo óleo de canola (Sham C e OVX C), destacando que nos animais Sham C essas alterações foram relacionadas apenas à morfologia, com presença de esteatose hepática. A dieta contendo óleo de canola promove alterações hepáticas e quando associada com a deficiência estrogênica exacerba essas alterações.

O modelo de ovariectomia em ratas é amplamente empregado como um modelo experimental de osteoporose, sendo considerado excelente por transmitir as principais características da deficiência do estrogênio no esqueleto, levando ao aumento da perda óssea, característica de osteopenia e osteoporose (PRIEMEL *et al*, 2002; LI *et al*, 2003). Embora ratos apresentem uma postura quadrúpede, diferindo da postura bípede de humanos, as semelhanças da arquitetura da vértebra e do fêmur entre eles sugerem que ratos podem ser utilizados na caracterização das alterações ósseas associadas à idade ou fatores hormonais (LI *et al*, 2003).

A técnica de densitometria é bastante utilizada na análise da composição corporal e da estrutura óssea em estudos de osteoporose, sendo o DXA considerado “padrão ouro” em estudos clínicos (IJUIN *et al*, 2002; BACON *et al*, 2004; GUPTA *et al*, 2012) e também utilizado com sucesso em modelos animais (LUKASKI *et al*, 2001; GLICKMAN *et al*, 2004; TSUJIO *et al*, 2009; COSTA *et al*, 2015).

Embora a análise da composição corporal, pelo DXA, não tenha evidenciado quaisquer diferença nos indicadores ósseos entre os grupos, a estratégia para avaliar a peça óssea isoladamente, fêmur e vértebra lombar, evidencia alterações pontuais, tendo em vista as diferenças regionais quanto à proporção de osso trabecular e cortical (SIROIS, CHEUNG & WARD, 2003; RAHMAN *et al*, 2009; COSTA *et al*, 2012; COSTA *et al*, 2015). Dessa forma, as diferenças entre OVX e Sham se destacaram na análise isolada das peças ósseas, ressaltando menor densidade mineral óssea em osso cortical e trabecular nos grupos OVX. Apesar da significativa redução da densidade mineral óssea nos grupos OVX, sugerindo mais reabsorção óssea, não foram observadas alterações em cálcio e fósforo plasmáticos. Na literatura é descrito que na deficiência de esteróides sexuais há hipocalcemia devido à redução da absorção intestinal de cálcio, sendo considerado um evento momentâneo. O cálcio, por ser o principal regulador da paratireóide, em baixa concentração promove aumento da secreção de PTH, que aumenta a reabsorção óssea para restabelecer a normocalcemia. Logo, a hipocalcemia da castração é observada no início da deficiência dos hormônios sexuais, sendo prontamente compensada (SERAKIDES *et al*, 2000; RIBEIRO *et al*, 2003). Dessa forma, explica-se a semelhança dos valores plasmáticos de cálcio observado entre os grupos experimentais. Assim como o cálcio, as concentrações plasmáticas de fósforo foram similares entre os grupos, corroborando com relatos na literatura que não observaram alteração na fosfatemia em deficiência de esteróides sexuais (VÉRAS, 2005).

Complementando o estudo das peças ósseas, foram realizadas análises radiológicas, por tomografia computadorizada, em regiões específicas do fêmur e da vértebra lombar, com o intuito de obter uma avaliação mais sensível dos compartimentos ósseos. A análise da cabeça do fêmur foi determinada por ser um local de osso cortical, além de ser uma região com maior risco de fraturas. Enquanto, na vértebra lombar foi selecionada a região do corpo vertebral, local predominantemente constituído por osso trabecular (ADAMI *et al*, 2009; MARCU *et al*, 2011; COSTA *et al*, 2011; COSTA *et al*, 2015). Assim, através de tomografia computadorizada foi evidenciada a diminuição da radiodensidade na cabeça do fêmur e no corpo vertebral nos grupos OVX.

Em geral, os indicadores da integridade óssea foram menores nos grupos OVX, como radiodensidade da cabeça do fêmur e do corpo vertebral, densidade mineral óssea do fêmur e da quarta vértebra lombar, e, somente no grupo OVX S, menor massa do fêmur. O ácido linoléico é um precursor do ácido araquidônico, o qual estimula a produção de PGE_2 que em excesso promove perda da massa óssea e contribui para a patogênese da osteoporose pós-

menopausa (YUN & LEE, 2004; ONO *et al*, 2005). Assim, esta pode ser a justificativa para a menor massa de fêmur identificada no grupo OVX S.

A redução da densidade mineral óssea em mulheres na menopausa, assim como em modelos experimentais de ovariectomia vem sendo bastante descrito (IJUIN *et al*, 2002; POULSEN *et al*, 2007; SHIGUEMOTO *et al*, 2007; GUPTA *et al*, 2012). O fenômeno está relacionado com a perda do efeito protetor do estrogênio que leva ao desequilíbrio entre formação e reabsorção óssea, favorecendo a perda óssea, reduzindo a força e rigidez do osso e aumentando o risco de fraturas (LI *et al*, 2003; KARSENTY *et al*, 2012; OURY *et al*, 2012). O uso exclusivo de dietas enriquecidas com ácidos graxos poliinsaturados – ômega-3, ômega-9 ou com baixa relação ômega-6/ômega-3 – vem sendo aplicado para prevenir a perda óssea, porém, os resultados são contraditórios. Enquanto alguns estudos relatam efeitos positivos (WATKINS *et al*, 2006; GRIEL *et al*, 2007; RAHMAN *et al*, 2009), outros descrevem que as dietas suplementadas com ômega-3 ou com ômega-9 não são capazes de reverter ou de prevenir os efeitos deletérios da deficiência estrogênica sobre a estrutura óssea (LUCAS *et al*, 2002; DODIN *et al*, 2005; SACCO *et al*, 2009; AZEMATI *et al*, 2012). No entanto, o efeito protetor foi apenas observado quando dietas suplementadas com ômega-3 são associadas à terapia de reposição hormonal, com baixas doses de estrogênio (SACCO *et al*, 2009). No presente estudo, o óleo de canola não foi eficaz para prevenir os efeitos deletérios da deficiência estrogênica, já que o grupo OVX C apresenta perda óssea. Resultados semelhantes foram descritos em um estudo realizado com mulheres Iranianas, pós-menopausa e apresentando osteoporose, nas quais o óleo de canola não apresentou efeitos sobre a estrutura óssea (AZEMATI *et al*, 2012).

A manipulação nutricional no período pós-desmame promoveu alterações metabólicas durante o período de desenvolvimento que, no entanto, não permaneceram nos animais adultos. Os animais do grupo canola apresentaram, aos 60 dias de vida, alterações promovidas por uma intervenção nutricional, destacando que esta é uma fase crítica para o desenvolvimento do animal. A manutenção do estímulo promoveu uma adaptação estrutural e metabólica aos 90 dias de vida. Tal homeostasia metabólica se perdeu com o estado de deficiência estrogênica. Assim, aos 180 dias de vida, alterações metabólicas foram proporcionadas, em grande parte, pela deficiência estrogênica, e o tipo de ácido graxo presente na dieta não foi mais o fator diferencial. Em compensação, a associação da deficiência estrogênica com a alimentação contendo óleo de canola, exacerbou os efeitos negativos sobre o metabolismo.

CONCLUSÃO

A dieta contendo óleo de canola não foi benéfica para a estrutura óssea, nem promovendo maior pico de massa óssea na maturidade sexual, nem prevenindo a perda óssea causada pela deficiência estrogênica. Adicionalmente, foi deletéria para o metabolismo glicídico e promoveu danos hepáticos, nas ratas jovens e, quando associada à deficiência estrogênica exacerbou as alterações glicídicas e hepáticas.

REFERÊNCIAS

ADAMI S; BERTOLDO F; BRANDI ML; CEPOLLARO C; FILIPPONI 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. Guidelines for the diagnosis, prevention and treatment of osteoporosis.*Reumatismo.* 2009; 61(4): 260-284.

ADAMOPOULOS IE; DANKS L; ITONAGA I; LOCKLIN RM; SABOKBAR A; FERGUSON DJ; ATHANASOU NA. Stimulation of osteoclast formation by inflammatory synovial fluid.*Virchows Archiv*. 2006; 449: 69–77.

ÁGUILA MB; LOUREIRO CC; PINHEIRO AR; MANDARIM-DE-LACERDA CA. Metabolismo Lipídico de Ratos Alimentados com Diferentes Tipos de Lipídios. *Arq Bras Cardiol.* 2002; 78(1): 25-31.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução nº 40, de 21 de março de 2001. Rotulagem Nutricional Obrigatória de Alimentos e Bebidas Embalados. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, mar. 2001. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 04 abr. 2016.

_____. Informe técnico nº 23, de 17 de abril de 2007. Esclarecimento sobre as avaliações de segurança do ácido linoléico conjugado (CLA). *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, abr. 2007. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 04 abr. 2016.

ALDRIGHI JM; ALDRIGHI CMS; ALDRIGHI APS. Alterações sistêmicas no climatério. Rev Bras Med. 2002; 59(4): 15-21.

ALMADA-FILHO CM; CENDOROGLO MS. Fisiologia do envelhecimento humano. In: AIRES MM.*Fisiologia.*4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. cap. 79: 1270-1279.

ARABI A; GARNERO P; PORCHER R; PELISSIER C; BENHAMOU CL; ROUX C. Changes in body composition during post-menopausal hormone therapy: a 2 year prospective study. *Hum Reprod.* 2003; 18(8): 1747-52.

ARAUJO LFB; GROZOVSKY R; PEREIRA MJS; CARVALHO JJ; VAISMAN M; CARVALHO DP. Expressions of Vascular Endothelial Growth Factor and Nitric Oxide Synthase III in the Thyroid Gland of Ovariectomized Rats Are Upregulated by Estrogen and Selective Estrogen Receptor Modulators. *Thyroid*. 2010; 20(1): 85-92

ARMADA L; NOGUEIRA CRR; NEVES UL; SOUZA OS; DETOGNE JP; ARMADA-DIAS L; MOREIRA RM, NASCIMENTO-SABA CCA. Mandible analysis in sex steroid-deficient rats.*Oral Dis.* 2006; 12: 181-186.

ASSARIANL; GEARY N. Modulation of appetite by gonadal steroid hormones. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2006; 361(1471): 1251-1263.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INSDUSTRIAS DOS OLEOS VEGETAIS (ABIOVE). Estatística Mensal do Complexo Soja - Dezembro de 2014. Disponível em: <http://www.abiove.org.br/site/index.php?page=estatistica&area=NC0yLTE>. Acesso em: 25 jan. 2015.

AZAIN MJ; HAUSMAN DB; SISK MB; FLATT WP; JEWELL DE. Dietary conjugated linoleic acid reduces rat adipose tissue cell size rather than cell number. *J Nutr*. 2000; 130(6): 1548-1554.

AZEMATI M; SHAKERHOSSEINI R; HEKMATDOS A; ALAVI-MAJD H; HEDAYATI M; HOUSHIARRAD A; HOSSEINI M; TAHERIAN ME; NOROOZI MF; RASHIDI M; AMRAIE A. Comparison of the effects of canola oil versus sunflower oil on the biochemical markers of bone metabolism in osteoporosis. *J Res Med Sci*. 2012; 17(12): 1137-1143.

BACON L; STERN JS; KEIM NL; VAN LOAM MD. Low bone mass in premenopausal chronic dieting obese woman. *Eur J Clin Nutr.* 2004; 58(6): 966-971.

BARHMAM JB; EDENS MB; FONTEH AN; JOHNSON MM; EASTER L; CHILTON FH.Addition of eicosapentaenoic acid to γ-linoleic acid-suplemented diets prevents serum arachidonic acid accumulation in humans. *J Nutr*. 2000; 130: 1925-1931.

BARRAL D; BARROS AC; ARAÚJO RPC. Vitamina D: uma abordagem molecular. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr*. 2007; 7(3): 309-315.

BEZERRA MC; CARVALHO JF; PROKOPOWITSCH AS; PEREIRA RM. RANK, RANKL and osteoprotegerin in arthritic bone loss. *Braz J Med Biol Res* 2005; 38: 161-170.

BITTNER V. Treatment of dyslipidemia in pre- and postmenopausal women with and without known atherosclerotic cardiovascular disease.*Curr Cardiol Rep.* 2001; 3(5): 401-407.

BRASIL. Portal da Saúde. *Prevenção à osteoporose deve começar na infância*. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/saude-em-dia/mais-sobre-saude-em-dia>. Acesso em: 21 ago. 2016.

BROUGHTON KS; JOHNSON CS; PACE BK; LIEBMAN M; KLEPPINGER KM. Reduced asthma symptoms with n-3 fatty acid ingestion are related to 5-series leukotriene production. *Am J Clin Nutr*. 1997; 65(4): 1011-1017.

BROWNING JD; HORTON JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest*. 2004; 114: 147–152.

BURGER HG; HALE GE; DENNERSTEIN L; ROBERTSON DM. Cycle and hormone changes during perimenopause: the key role of ovarian function. *Menopause*. 2009; 15(4): 603-612.

CADORE EL; BRENTANO MA; KRUEL LFM. Efeitos da atividade física na densidade mineral óssea e na remodelação do tecido ósseo. *Rev Bras Med Esporte*.2005; 11(6): 373-379.

CAMPOS-SHIMADA LB; SANTOS MA; GILGLIONI EH; HERMOSO DAM; SALGUEIRO-PAGADIGORRIA CL. *Tibolona reverte a esteatose hepática em ratas ovariectomizadas*. In: CONGRESSO CIENTÍFICO DA REGIÃO CENTRO-OCIDENTAL DO PARANÁ, VI, 2015, Campo Mourão – PR. *Anais do VI CONCCEPAR*. Campo Mourão: Grupo Integrado, 2015. p.142.

CANOLA COUNCIL OF CANADA. What is Canola?. Embrapa Trigo, 1999. Disponível em: <http://*www.cnpt.embrapa.br*>. Acesso em: 16 abr. 2016.

CAVE M; DEACIUC I; MENDEZ C; SONG Z; JOSHI-BARVE S; BARVE S; MCCLAIN C. Nonalcoholic fatty liver disease: predisposing factors and the role of nutrition. *J Nutr Biochem*. 2007; 18: 184–195.

CAO JJ; GREGOIRE BR; GAO H. High-fat diet decreases cancellous bone mass but has no effect on cortical bone mass in the tibia in mice. *Bone.* 2009; 44: 1097-1104.

CHAVES GV; SOUZA DS; PEREIRA SE; SABOYA CJ; PERES WAF. Associação entre doença hepática gordurosa não alcoólica e marcadores de lesão/função hepática com componentes da síndrome metabólica em indivíduos obesos classe III. *Rev Assoc Med Bras.* 2012; 58(3): 288-293.

CLARKE BL; KHOSLA S. Physiology of bone loss. *Radiol Clin North Am*. 2010; 48(3): 483-495.

COBAYASHI F, LOPES LA, TADDEI JAA. Bone mineral density in overweight and obese adolescents.*J Pediatr*.2005; 81: 337-342.

COMPSTON J. Bone Quality: What is it and how is it measured? *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2006; 50(4): 579-585.

CONNOR WE. Importance of n-3 fatty acids in health and disease.*Am J Clin Nutr*. 2000; 71: 171-175.

CORAZZA AV. Os efeitos biomoduladores da fototerapia e do treinamento resistido no tecido muscular e ósseo de ratas ovariectomizadas. 2012. 62f.*Tese* –Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2012.

CORWIN RL. Effects of dietary fats on bone health in advanced age. *Prostaglandins, Leukot Essen Fatty Acids.* 2003; 68:379-386.

COSTA CAS; CARLOS AS; DOS SANTOS AS; MONTEIRO AMV; MOURA EG; NASCIMENTO-SABA CCA. Abdominal adiposity, insulin and bone quality in Young male rats fed a high-fat diet containing soybean or canola oil. *Clinics*. 2011; 66(10): 1811-1816.

COSTA CAS; CARLOS AS; GONZALEZ GP;REIS RP; RIBEIRO MS; DOS SANTOS AS; MONTEIRO AMV; MOURA EG; NASCIMENTO-SABA CCA. Diet containing low n-6/n-3 polyunsaturated fatty acids ratio, provided by canola oil, alters body composition and bone quality in young rats. *Eur J Nutr*. 2012;51(2):191-198.

COSTA CAS; CARLOS AS;DE SOUSA DOS SANTOS A; MOURA EG; NASCIMENTO-SABA CCA. High-fat diet containing soybean or canola oilaffect differently pancreas function of young male rats. *Horm Metab Res*. 2013; 45(9): 652-654.

COSTA CAS; SANTOS AS; CARLOS AS; GONZALEZ GPL; GASPAR-REIS RP; CARNEIRO C; ALVES SS; ALBUQUERQUE KP; SILVA PCA; RIBEIRO DC; BOAVENTURA GT; MOURA EG; NASCIMENTO-SABA CCA. Impact of a high-fat diet containing canola or soybean oil on body development and bone parameters in adult male rats. *Nutr Hosp*. 2015; 31(5): 2147-2153.

CROCKETT JC; MELLIS DJ; SCOTT DI; HELFRICH MH. New knowledge on critical osteoclast formation and activation pathways from study of rare genetic diseases of osteoclasts: focus on the RANK/RANKL axis. *Osteoporos Int*. 2011; 22: 1–20.

DAHLMAN-WRIGHT K; CAVAILLES V; SUZANNE AF; JORDAN VC; KATZENELLEENBOGEN JA; KORACH KS; MAGGI A; MURAMATSU M; PARKER MG; GUSTAFSSON JA. International Union of Pharmacology: LXIV Estrogen Receptors. *Pharmacol Rev*. 2006; 58: 773-781.

DECKELBAUM RJ; WORGALL TS; SEO T. N-3 fatty acids and gene expression.Obesity Epidemic.*Am J Clin Nutr*. 2008; 83(l):1520S-1505S.

DEROO BJ; KORACH KS.Estrogen receptors and human disease.*J Clin Invest*. 2006; 116(3): 561-570.

DODIN S; LEMAY A; JACQUES H; LEGARE F; FOREST JC; MASSE B. The effects of flaxseed dietary supplement on lipid profile, bone mineral density, and symptoms in menopausal women: a randomized, doubleblind, wheat germ placebo-controlled clinical trial. *J Clin Endocrinol Metab.*2005; 90: 1390-1397.

DOHERTY TJ. Aging and Sarcopenia. *J Appl Physiol*. 2003; 95: 1717-1727.

DORFMAN SE; WANG S; VEGA-LÓPEZ S; JAUHIAINEN M; LICHTENSTEIN AH. Dietary fatty acids and cholesterol differentially modulate HDL cholesterol metabolism in Golden-Syrian hamsters. *J Nutr*. 2005; 135:492-498.

ERIKSEN EF; LANGDAHL B; VESTERBY A; RUNGBY J; KASSEM M**.** Hormone replacement therapy prevents osteoclastic hyperactivity: a histomorphometric study in early postmenopausal women. *J Bone Miner Res.* 1999; 14:1217–1221.

FARQUHARSON C; STAINES K. The skeleton: no bones about it. *J Endocrinol*.2011; 211: 107–108.

FATORRE AD; CAPANNOLO M; RUCCI N. Bone and bone marrow: the same organ. *Arch Biochem Biophys.*2010; 503: 24-28.

FISHBECK KL; RASMUSSEN KM. Effect of repeated cycles on maternal nutritional status, lactational performance and litter growth in ad libitum-fed and chronically food-restricted rat.*J Nutr.* 1987; 117: 1967-1975.

FRANCI CR; ANSELMO-FRANCI JA. Gônadas. In: AIRES MM.*Fisiologia.*4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. cap.71: 1120-1138.

FRANCO L. Teor lipídico da dieta, lipídios séricos e peso corporal em ratos exercitados. *Rev. Nutr*. 2009; 22(3): 359-366.

FREITAS EV; PY L; NÉRI AL; CANÇADO FAX; GORZONI ML; ROCHA SM. Tratado de Geriatria e Gerontologia, Guanabara-Koogan, 2002.

FUJIWARA K; MAEKAWA F; YADA T. Oleic acid interacts with GPR40 to induce Ca^{2+} signaling in rat islet β-cells: mediation by PLC and L-type Ca^{2+} channel and link to insulin release. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005; 289: E670-E677.

GEARY N. The estrogenic inhibition of eating. In: STICKERS E; WOODS SC. *Neurobiology of food and fluid intake.* 2 ed. New York: Kluwer Academic Publishing, 2004. p.305-343.

GENUTH SM. Reprodução feminina. In: BERNE & LEVY. *Fundamentos de Fisiologia*. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. cap.51:724-744.

GIL AC. Métodos e técnicas de pesquisa social. 3. ed. São Paulo: Atlas, 1991. 207 p.

GIOIELLILA. Óleos e gorduras vegetais: composição e tecnologia. *Rev bras farmacogn.* 1996; 5 (2): 211-232.

GLICKMAN SG; MARN CS; SUPIANO MA; DENGEL DR. Validity and reliability of dual-energy x-ray absorptiometry for the assessment of abdominal adiposity. *J Appl Physiol*. 2004; 97: 509-514.

GREEN KH; WONG SCF; WEILER HA. The effect of dietary n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids on femur mineral density and biomarkers of bone metabolism in healthy diabetic and dietary-restricted growing rats.*Protaglandins LeukotEssenFatty Acids.* 2004; 71: 121-130.

GRIEL AE; KRIS-ETHERTON PM; HILPERT KF; ZHAO G; WEST SG; CORWIN RL. An increase in dietary n-3 fatty acids decreases a marker of bone resorption in humans. *Nutr J.* 2007; 6: 2-9.

GUNTUR AR; ROSEN CJ. The skeleton: a multi-functional complex organ. New insights into osteoblasts and their role in bone formation: the central role of PI3Kinase. *J Endocrinol*.2011; 211: 123–130.

GUPTA R;AL-SAEED O; AZIZIEH F;ALBUSAIRI A; GUPTA P; MOHAMMED A. Evaluation of Bone Mineral Density in Postmenopausal Women in Kuwait. *JClinDensitom.* 2012: 15(2): 211-216.

HADJI P; GOTTSCHALK M; ZILLER V; KALDER M; JACKISCH C; WAGNER U. Bone mass and the risk of breast cancer: the influence of cumulative exposure to oestrogen and reproductive correlates. Results of the Marburg breast cancer and osteoporosis trial (MABOT). *Maturitas.*2007; 56: 312-321.

HEREDIA FP;LARQUE E; PORTILLO MP; CANTERAS M; ZAMORA S; GARAULET M.Age-related changes in fatty acids from different adipose depots in rat and their association with adiposity and insulin. *Nutrition*.2008; 24: 1013-1022.

HOLUB BJ. Clinical nutrition: 4.Omega-3 fatty acid in cardiovascular care. *Can Med Ass J.* 2002; 106(5): 608-615.

HSU SC; HUANG CJ. Reduced fat mass in rats fed a high oleic acid-rich safflower oil diet is associated with changes in expression of hepatic PPARα and adipose SREBP-1c-regulated genes. *J Nutr*.2006;136: 1779-1785.

HUANG KE; XU L; I NN; JAISAMRARN U. The asian menopause survey: knowledge, perceptions hormone treatment and sexual function. *Maturitas*. 2010: 65: 276-283.

HUGHES DE; DAI A; TIFFEE JC; LI HH; MUNDY GR; BOYCE BF. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-β. Nature Med. 1996; 2: 1132–1136.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICAS (IBGE). Censo 2012. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/tabuadevida/2014>. Acesso em: 20 abr. 2016.

IJUIN M; DOUCHI T; MATSUO T; YAMAMOTO S; UTO H; NAGATA Y. Difference in the effects of body composition on bone mineral density between pre- and postmenopausal women. *Maturitas.* 2002: 43: 239-244.

IKEMOTO S; TAKAHASHI M; TSUNODA N; MARUYAMA K; ITAKURA H; EZAKI O. High-fat diet-induced hyperglycemia and obesity in mice: differential effects of dietary oils. *Metabolism.* 1996; 45(12): 1539-46.

INZERILLO AM; ZAIDI M; HUANG CL. Calcitonin: the other thyroid hormone. *Thyroid*.2002; 12: 791–798.

JAMES ML; CLELAND LG. Dietary n-3 fatty acids and therapy for rheumatoid arthritis.*Semin Arthritis Rheum*. 1997; 27(2): 85-97.

KARSENTY G.The mutual dependence between bone and gonads.*J Endocrinol*.2012; 213: 107–114.

KHOSLA S; RIGGS BL. Pathophysiology of age-related bone loss and osteoporosis. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2005;34:1015–1030.

KIM EM; STEEL KL; CHANG YK.A influência do processamento sobre a retenção de ácidos graxos ômega-3 adicionados ao pão de forma. *Braz J Food Technol*. 2005; 8(4): 268-276.

KONTOGIANNI MD; MELISTAS L; YANNAKOULIA M; MALAGARIS I; PANAGIOTAKOS DB; YIANNAKOURIS N. Association between dietary patterns and indices of bone mass in a sample of Mediterranean women.*Nutrition*. 2009; 25(2): 165-171.

KORSE C; BONFRER JM; VAN BEURDEN M; VERHEIJEN RH; ROOKUS MA. Estradiol and testosterone levels are lower after oophorectomy than after natural menopause. *Tumor Biol*. 2009; 30(1): 37-42.

KOUSTENI S; BELLIDO T; PLOTKIN LI; O'BRIEN CA; BODENNER DL; HAN L; HAN K; DIGREGORIO GB; KATZENELLENBOGEN JA; KATZENELLENBOGEN BS; ROBERSON PK; WEINSTEIN RS; JILKA RL; MANOLAGAS SC.Non-genotropic, sex non-specific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell.* 2001; 104: 719–730.

KRAHE C. Perimenopausa, massa óssea e o risco de fraturas. *Femina.* 2003; 31(4): 327-331.

KRUGER MC;COETZEE M; HAAG M; WEILER H.Long-chain polyunsaturated fatty acids: selected mechanisms of action on bone. *Prog Lipid Res.* 2010; 49: 438-449.

KRUGER MC; SCHOLLUM LM. Is docosahexaenoic acid more effective than eicosapentaenoic acid for increasing calcium bioavailability. *Prostaglandin Leukot Essent Fatty Acid*. 2005; 73: 327–334.

LAKATOS EM; MARCONI MA. Fundamentos de metodologia científica. São Paulo: Atlas, 1991. 270 p.

LARSSON K; QUINN PJ. Physical Properties: Structural and Physical Characteristics. In: The Lipid Handbook. London: Chapman and Hall; 1994: 401-465.

LAZARETTI-CASTRO M; BIANCO AC. Fisiologia do Metabolismo Osteomineral. In: AIRES MM. *Fisiologia.*4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. cap.76: 1199-1224.

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.* 2009; 34(6): 1079-1086.

LEVY-COSTA RB; SICHIERI R; PONTES NS; MONTEIRO CA. Disponibilidade domiciliar de alimentos no Brasil: Distribuição e evolução (1974-2003). *Rev Saud Pub*. 2005; 39(4):530-540.

LEWIS JE; HILDITCH JR; WONG CJ.Further psychometric property development of the Menopause-Specific Quality of Life questionnaire and development of modified version MENQOL-Intervention questionnaire. *Maturitas.*2005; 50: 209-221.

LI CY; JEE WS; CHEN JL; MO A; SETTERBERG RB; SU M; TIAN XY; LING YF; YAO W. Estrogen and "exercise" have a synergistic effect in preventing bone loss in the lumbar vertebra and femoral neck of the ovariectomized rat. *Calcif Tissue Int*. 2003; 72(1): 42-49.

LIEN EL;BOYLE FG; WRENN JM; PERRY RW; THOMPSON CA; BORZELLECA JF.Comparison of AIN-76A and AIN-93G diets: a 13-week study in rats. *Food Chem Toxicol* 2001; 39(4): 385-392.

LIMA FB; SERTIÉ RAL. Sistema reprodutor feminino. In: CURI R; PROCÓPIO J. *Fisiologia Básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. p 806-828.
LIU ML; XU X; RANG WQ; LI YJ; SONG HP. Influence of ovariectomy and 17beta-estradiol treatment on insulin sensitivity, lipid metabolism and post-ischemic cardiac function. *Int J Cardiol.* 2004; 97(3): 485-493.

LUCAS EA; WILD RD; HAMMOND LJ; KHALIL DA; JUMA S; DAGGY BP; STOECKER BJ; ARJMANDI BH. Flaxseed improves lipid profile without altering biomarkers of bone metabolism in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.*2002; 87(4): 1527-1532.

LUCIA VD; FITZPATRICK-WONG SC; WEILER HA. Dietary arachidonic acid suppresses bone turnover in contrast to low dosage exogenous prostaglandin E2 that elevates bone formation in the piglet. *Prostaglandin Leukot Essent Fatty Acid.*2003; 68: 407–413.

LUKASKI HC; HALL CB; MARCHELLO MJ; SIDERS WA. Validation of dual x-ray absorptiometry for body-composition assessment of rats exposed to dietary stressors. *Nutrition.*2001; 17:607-613.

MA H; CHUNG MH; LU Y; NISHIHARA T; HATTORI M. Estrogenic effects of the herbal formula, menoprogen, in ovariectomized rats. *Biol Pharm Bull*. 2010; 33(3): 455-460.

MACKIE EJ; TATARCZUCH L; MIRAMS M. The skeleton: a multi-functionalcomplex organ. The growth plate chondrocyte and endochondralossification.*J Endocrinol*.2011; 211: 109–121.

MACOTELA Y; BOUCHER J; TRAN TT; KAHN CR. Sex and depot differences in adipocyte insulin sensitivity and glucose metabolism.*Diabetes*.2009; 58: 803–812.

MAEDA K; TAKAHASHI N; KOBAYASHI Y. Roles of Wnt signals in bone resorption during physiological and pathological states.*J Mol Med.* 2013; 91: 15-23.

MANOLAGAS SC; KOUSTENI S; JILKA RL.Sex Steroids and Bone.*Recent Prog Horm Res.* 2002; 57: 385-409.

MARCONDES FK; BIANCHI FJ; TANNO AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol*. 2002; 62(4A): 609-614.

MARCU FL; BOGDAN FL; MUTIU G; LAZAR L.The histopathological study of osteoporosis.*Rom J Morphol Embryol*. 2011; 52: 321-325.

MARTIN CA; ALMEIDA VV; RUIZ MR; VISENTAINER JEL; MATSHUSHITA M; SOUZA NE; VISENTAINER JV. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. *Rev Nutr*. 2006; 19(6): 761-770.

MASSIERA F; SAINT-MARC P; SEYDOUX J; MURATA T; KOBAYASHI T; NARUMIYA S; GUESNET P; AMRI EZ; NEGREL R; AILHAUD G.Arachidonic acid and prostacyclin signaling promote adipose tissue development: a human health concern? *J Lipid Res.* 2003; 44(2): 271-279.

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.* 1985; 28(7):412-9.

MCDONALD BE. Canola oil: Nutritional properties. Canada: Canola Council of Canada, 2005. Disponível em: <http://www.canola-council.org/pdf/nutritionalprop.pdf>. Acesso: 28 maio 2012.

MELLIS DJ; ITZSTEIN C; HELFRICH MH; CROCKETT JC. The skeleton: a multi-functional complex organ. The role of key signalling pathways in osteoclasto differentiation and in bone resorption.*J Endocrinol*.2011; 211: 131–143.

MIELKE JG; NICOLITCH K; AVELLANEDA V; EARLAM K; AHUJA T; MEALING G; MESSIER C. Longitudinal study of the effects of a high-fat diet on glucose regulation, hippocampal function, and cerebral insulin sensitivity in C57BL/6 mice. *Behav Brain Res*. 2006; 175: 374-382.

MILLER PD; BARAN DT, BILEZIKIAN JP, GREENSPAN SL; LINDSAY R; RIGGS BL; WATTS NB. Practical clinical application of biochemical markers of bone turnover: Consensus of an expert panel. *J Clin Densitom.* 1999; 2(3): 323-342.

MILLER PD; HOCHBERG MC; WEHREN LE; ROSS PD; WASNICH RD. How useful are measures of BMD and bone turnover? *Curr Med Res Opin.* 2005; 21(4): 545-554.

MORAES AM; MONTALVÃO C. Ergonomia: conceitos e aplicações. Rio de Janeiro: 2 AB, 1998. 119 p.

MORI TA; WOODMAN RJ; BURKE V; PUDDEY IB; CROFT KD; BEILIN LJ. Effect of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on oxidative stress and inflammatory markers in treated-hypertensive type 2 diabetic subjects. *Free Radic Biol Med.* 2003; 35(7): 772-781.

MORLEY JE; THOMAS DR; WILSON MMG. Cachexia: pathophysiology and clinical relevance. *Am J Clin Nutr.* 2006; 83: 735–743.

MOURÃO DM; MONTEIRO JBR; COSTA NMB; STRINGHETA PC; MINIM VPR; DIAS CMGC. Ácido linoléico conjugado e perda de peso. *Rev Nutr*. 2005; 18(3): 391-399.

NORTH AMERICAN MENOPAUSE SOCIETY (NAMS). The 2012 hormone therapy position statement of: The North American Menopause Society. *Menopause.* 2012; 19(3): 257-271.

NOAKES M; CLIFTON PM. Oil blends containing partially hydrogenated or interesterified fats: differential effects on plasma lipids. *Am J Clin Nutr*.1998; 68: 242-247.

OKAMOTO Y; TANAKA S; HAGA Y. Enhanced GLUT2 gene expression in an oleic acid-induced in vitro fatty liver model. *Hepatol Res.* 2002; 23(2): 138-144.

OKUBO H; SASAKI S; HORIGUCHI H; OGUMA E; MIYAMOTO K; HOSOI Y; KIM MK; KAYAMA F.Dietary patterns associated with bone mineral density in premenopausal japanese farm women. *Am JClin Nutr*. 2006; 83(5): 1185-1192.

ONO K; KANEKO H; CHOUDHARY S; PILBEAM CC; LORENZO JA; AKATSU T; KUGAI N; RAISZ LG. Biphasic effect of prostaglandin E2 on osteoclast formation in spleen cell cultures: role of the EP2 receptor. *J Bone Miner Res.* 2005; 20: 23–29.

ORSATTI FL; NAHAS EAP; NAHAS-NETO J; MAESTÁ N; TARDIVO AP; DIAS R. Redução na massa muscular de mulheres na pós-menopausa: efeito do treinamento hipertrófico. *Femina.* 2006; 34(12): 815-821.

OURY F. A crosstalk between bone and gonads. *Ann N Y Acad Sci.* 2012; 1260: 1–7.

PARK Y; STORKSON JM; ALBRIGHT KJ; LIU W; PARIZA MW. Evidence that the trans-10,cis-12 isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice. *Lipids*.1999; 34(3): 235-241.

PARKOSADZE G; SULAKVELIDZE M; MIZANDARI M; RATIANI L; SANIKIDZE T. Some aspects of pathogenesis of non alcoholic fatty liver disease in post menopausal women. *Georgian Med News*. 2012; 208-209: 46-51.

PAULA FJA; ROSEN CJ. Obesity, diabetes mellitus and last but not least, osteoporosis. *Arq Bras Endocrinol Metab.*2010; 54: 150-157.

PEIXOTO-SILVA N; CONCEIÇÃO EPS; CARVALHO JC; LIMA NS; NOGUEIRA-NETO JF; OLIVEIRA E; MOURA EG; LISBOA PC.Does bromocriptine play a role in decreasing oxidative stress for early weaned programmed obesity?.*Life Sci.* 2014; 95(1): 14-21.

POULSEN RC; FIRTH EC; ROGERS CW; MOUGHAN PJ; KRUGER MC. Specific effects of γ-linolenic, eicosapentaenoic, and docosahexaenoic ethyl esters on bone post-ovariectomy in rats. *Calcif Tissue Int.* 2007; 81: 459-471.

POUTANEN M. Understanding the diversity of sex steroid action. *J Endocrinol*.2012; 212: 1–2.

PRADO IN; LAGE LV; SCAPINELLO C. Variações em metabólitos no plasma e hormônios no soro sanguíneo de coelhas alimentadas com farelo de canola em substituição gradual ao farelo de soja. *Acta Sci*. 2001; 23(4): 1033-1038.

PRIEMEL M; SCHILLING AF; HABERLAND M; POGODA P; RUEGER JM; AMLING M. Osteopenic mice: animal models of the aging skeleton. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2002; 2(3): 212-218.

PROSSNITZ ER; BARTON M.The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease.*Nat Rev Endocrinol.* 2011; 7(12): 715-726.

PRZYBYLSKI R. Canola oil: Physical and chemical properties. Canada: Canola Council of Canada, 1999. Disponível em: <http://fr.canolacouncil.org/media/515239/canola_oil_physical_chemical_properties.pdf>. Acesso: 8 fev. 2014.

RAHMAN MM; BHATTACHARYA A; BANU J;KANG JX; FERNANDES G. Endogenous n-3 fatty acids protect ovariectomy induced bone loss by attenuating osteoclastogenesis. *J Cell Mol Med.* 2009; 13(8B):1833–1844.

RAUCH E; MIDDELMANN B; CAGNOLI M; KELLER KM; SCHÖNAU E. Comparison of total alkaline phosphatase and three assays for bone-specific alkaline phosphatase in childhood and adolescence.*Acta Paediatr.* 1997; 86(6): 583-587.

REEVES PG. Componentes of the AIN-93 diets as improvement in the AIN-76 diet. *J Nutr*. 1997; 127:838S-841S.

RÊGO TS; ASH LS; PESSOA L; FEIJÓ MBS; LEITE J; SANTOS AS; COSTA CAS; BOAVENTURA GT. The intake of yam (*Dioscorea bulbifera Linn*) attenuated the hyperglycemia and the bone fragility in female diabetic rats. *Nutr Hosp.* 2014; 29(2): 370-375.

RHIE YJ; LEE KH; CHUNG SC; KIM HS; KIM DH.Effects of body composition, leptin, and adiponectina on bone mineral density in prepubertal girls.*J Korean Med Sci.* 2010; 25: 1187-1190.

RIBEIRO AFC; SERAKIDES R; NUNES VA; SILVA CM; OCARINO NM. A osteoporose e os distúrbios endócrinos da tireóide e das gônadas. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2003:47(3): 228-236.

RICCARDIA G; GIACCOB R; RIVELLESE AA. Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. *Clin Nutr*. 2003; 23:447-456.

RICCHI M; ODOARDI MR; CARULLI L; ANZIVINO C; BALLESTRI S; PINETTI A; FANTONI LI; MARRA F; BERTOLOTTI M; BANNI S; LONARDO A; CARULLI N; LORIA P. Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009; 24: 830–840.

RIMOLDI G; CHRISTOFFEL J; SEIDLOVA-WUTTKE D; JARRY H; WUTTKE W. Effects of chronic genistein treatment in mammary gland, uterus, and vagina.*Environ Health Perspect*. 2007; 115(1): 62-68.

RINALDI A. Hormone therapy for the ageing. Despite the negative results of recent trials, hormone replacement therapy retains enticing promises for the elderly. *EMBO Rep*. 2004; 5(10): 938–941.

ROBINSON RS; PUSHPAKUMARA PGA; CHENG Z; PETERS AR; ABAYASEKARA DRE; WATHES DC. Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on ovarian and uterine function in lactating dairy cows. *Reproduction*. 2002; 124: 119-131.

ROSANO GMC; VITALE C; SILVESTRI A; FINI M. Metabolic and vascular effect of progestins in post-menopausal women implications for cardioprotection.*Maturitas.* 2003; 46S1:S17-S19.

RUXTON C;REED S; SIMPSON M; MILLINGTON K.The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. *JHumNutrDiet.*2007; 20(3): 275-285.

SACCO SM; JIANG JMY; REZA-LOPEZ S; MA DWL; THOMPSON LU; WARD WE. Flaxseed combined with low-dose estrogen therapy preserves bone tissue in ovariectomized rats. *Menopause.* 2009; 16(3): 545-554.

SAENGSIRISUWAN V; PONGSEEDA S; PRASANNARONG M; VICHAIWONG K; TOSKULKAO C. Modulation of insulin resistance in ovariectomized rats by endurance exercise training and estrogen replacement. *Metabolism*. 2009; 58(1): 38-47.

SALARI P; REZAIE A; LARIJANI B; ABDOLLAHI M.A systematic review of the impact of n-3 fatty acids in bone health and osteoporosis.*Med Sci Monit.* 2008; 14: RA37–RA44.

SANGIOVANNI JP; CHEW EY.The role of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids in heath and disease of the retina.*Progr Retin Eye Res*. 2005; 24(1): 87-138.

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.* 2011; 15(4): 1478-1481.

SANTOS-ARAUJO C; LEITE-MOREIRA A. *Metabolismo ósseo e equilíbrio fosfocálcico*. Porto: Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 2007. 53 f. Notas de aula.

SANTOS BF. Criação e manejo de ratos. In: ANDRADE A; PINTO AC; OLIVEIRA RS (orgs). *Animais de laboratório: criação e experimentação*. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2002. cap.15: 119-122.

SCHAFFER JE. Fatty acid transport: the roads taken. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002; 282(2): 239-246.

SCIENTIFIC REVIEW COMMITTEE (SRC). Nutrition recommendations. Ottawa: Canadian Government Publishing Centre, Supply and Services Canada, 1990.

SERAKIDES R; NUNES VA; NASCIMENTO EF; SILVA CM; RIBEIRO AFC. Relação tireóide-gônadas e níveis plasmáticos de fósforo, cálcio e fosfatase alcalina em ratas. *Arq Bras Med Vet Zoot.* 2000; 52: 579-585.

SHIFREN JL; MARGERY LSG. The North American Menopause Society Recommendations for Clinical Care of Midlife Women. *Menopause*. 2014; 21(10): 1038-1062.

SHIGUEMOTO GE; ROSSI EA; BALDISSERA V; GOUVEIA CH; VARGAS GMFV; PEREZ SEA.Isoflavone-supplemented soy yoghurt associated with resistive physical exercise increase bone mineral density of ovariectomized rats. *Maturitas.* 2007; 57:261–270.

SILVA TAA; FRISOLI JUNIOR A; PINHEIRO MM; SZEJNFELD VL. Sarcopenia associada ao envelhecimento: aspectos etiológicos e opções terapêuticas. *Rev Bras Reumatol.* 2006; 46(6): 391-397.

SIQUEIRA TV. O ciclo da soja: desempenho da cultura entre 1961 e 2003. *BNDES Setorial*. 2004; 20: 127-222. Disponível em: <http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/bnset/set2003_2.pdf>. Acesso em: 12 fev. 2015.

SIROIS I; CHEUNG AM; WARD WE. Biomechanical bone strength and bone mass in young male and female rats fed a fish oil diet. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.*2003; 68: 415-421.

SMITH RD; KELLY CNM; FIELDING BA; HAUTON D; SILVA KDRR; NYDAHL MC; MILLER GJ; WILLIAMS CM. Long-term monounsaturated fatty acid diets reduce platelet aggregation in healthy young subjects. *Br J Nutr.* 2003; 90(3):597-606.

SOOT T; JURIMAE T; JURIMAE J; GAPEYEVA H; PAASUKE M. Relationship between leg bone mineral values and muscle strength in women with different physical activity. *J Bone Miner Metab.* 2005; 23(5): 401-406.

SPRITZER PM; REIS FM; FRANCI CR; ANSELMO JA. *Fisiologia*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p.1051- 1069.

STORLIEN LH; KRIKETOS AD; CALVERT GD; BAUR LA; JENKINS AB. Fatty acids, triglycerides and syndromes of insulin resistance. *ProstaglandinsLeukot Essent Fatty Acids*. 1997;57(4-5):379-385.

TAKEUCHI H; SUZUKI N; TADA M; HE P. Accelerative effect of olive oil on liver glycogen synthesis in rats subjected to water-immersion restraint stress. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2001; 65(7): 1489-1494.

TSUJIO M; MIZOROGI T; KITAMURA I; MAEDA Y; NISHIJIMA K; KUWAHARA S; OHNO T; NIIDA S; NAGAYA M; SAITO R; TANAKA S. Bone mineral analysis through dual energy x-ray absorptiometry in laboratory animals. *J Vet Med Sci*. 2009; 71:1493-1497.

TURNER RC; HOLMAN RR; MATTHEWS D; HOCKADAY TD; PETO J. Insulin deficiency and insulin resistance interaction in diabetes: estimation of their relative contribution by feedback analysis from basal plasma insulin and glucose concentrations. *Metabolism.* 1979; 28(11):1086-96.

VÉRAS WB. Efeitos de diferentes terapias de reposição hormonal sobre a pressão arterial e balanço mineral ósseo de ratas castradas. 2005. 55f. *Dissertação* – Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo, 2005.

VILLENA JA; KRALLI A. ERRα: a metabolic function for the oldest orphan. *Trends Endocrinol Metab*. 2008; 8: 269-276.

VISENTAINER JV;CARVALHO PO; IKEGAKI M; PARK YK. Concentração de ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) em peixes marinhos da costa brasileira. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2000; 20(1): 1-10.

VOLPI E; NAZEMI R; FUJITA S. Muscle tissue changes with aging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2004; 7: 405–410.
WAHRBURGU. What are the health effects of fat? *Eur J Nutr*. 2004; 46(6): 123-128.

WATHES DC; ABAYASEKARA DRE; AITKEN RJ. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. *Biol Reprod*. 2002. 77: 190-201.

WATKINS BA; LI Y; ALLEN KGD; HOFFMAN WE; SEIFERT MF. Dietary ratio of (n-6)/(n-3) polyunsaturated fatty acids alters the fatty acid composition of bone compartments and biomarkers of bone formation in rats. *J Nutr* 2000; 130: 2274–2284.

WATKINS BA; LI Y; SEIFERT MF. Nutraceutical fatty acids as biochemical and molecular modulators of skeletal biology. *J Am CollNutr*. 2001; 20(5): 410- 416.

WATKINS BA; LI Y; LIPPMAN HE; FENG S. Modulatory effect of omega-3 polyunsaturated fatty acids on osteoblast function and bone metabolism. *Prostaglandins LeukotEssent Fatty Acids*. 2003; 68: 387–398.

WATKINS BA; LI Y; SEIFERT MF. Dietary ratio of n-6/n-3 PUFAs and docosahexaenoic acid: actions on bone mineral and serum biomarkers in ovariectomized rats. *J Nutr Biochem*. 2006; 17: 282-289.

WEHRLI FW. Structural and functional assessment of trabecular and cortical bone by micro magnetic resonance imaging. *J Magn Reson Imaging.* 2007:25: 390-409.

WEILER HA. Dietary supplementation of arachidonic acid is associated with higher whole body weight and bone mineral density in growing pigs. *Pediatr Res*. 2000; 47: 692–697.

WEILER HA; FITZPATRICK-WONG SC. Modulation of essential (n-6):(n-3) fatty acid ratios alters fatty acid status but not bone mass in piglets.*J Nutr.* 2002; 132: 2667–2672.

WEISS LA, BARRET-CONNOR E, VON MUHLEN D. Ratio of n-6 to n-3 fatty acids and bone mineral density in older adults: the rancho bernardo study. *Am J Clin Nutr*. 2005; 81: 934-938.

WIREN KM. Androgens and bone growth: it's location, location, location. *Curr Opin Pharmacol.* 2005; 5: 626-632.

WOLFF RB; GOMES RCT; VERNA C; CRISTOFANI-MAIORAL GCC; RAMPAZO TC; SIMÕES RS; BARACAT EC; SOARES-JÚNIOR JM. Aspectos moleculares de esteróides sexuais sobre a cartilagem e os ossos. *Rev Assoc Med Bras.* 2012; 58(4): 493-497.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Joint Consultation: fats and oils in human nutrition. *Nutr Rev*. 1995; 53(7): 202-205.

WU HT; CHEN W; CHENG KC; KU PM; YEH CH; CHENG JT. Oleic acid activates peroxisome proliferator-activated receptor δ to compensate insulin resistance in steatotic cells. *J Nutr Biochem*. 2012; 23(10): 1264-1270.

YUN AJ; LEE PY. Maladaptation of the link between inflammation and bone turnover may be a key determinant of osteoporosis. *Med Hypotheses.* 2004; 63: 532–537.

ZACHUT M; ARIELI A; LEHRER H; ARGOV N; MOALLEM U. Dietary unsaturated fatty acids influence preovulatory follicle characteristics in dairy cows. *Reproduction.* 2008. 135: 683–692.

ZERON Y; SKLAN D; ARAV A. Effect of polyunsaturated fatty acid supplementation on biophysical parameters and chilling sensitivity of ewe oocytes. *Mol Reprod Dev*. 2002. 61(2): 271-278.

ZEVENBERGEN H;DE BREE A; ZEELENBERG M; LAITINEN K; VAN DUIJN G; FLÖTER E. Foods with a high fat quality are essential for healthy diets. *AnnNutrMetab*. 2009; 54: 5-24.

ZILLIKENS MC; UITTERLINDEN AG; VAN LEEUWEN JPTM; BERENDS AL; HENNEMAN P; VAN DIJK KW;OOSTRA BA; VAN DUIJN CM; POLS HA; RIVADENEIRA F. The role of body mass index, insulin, and adiponectin in the relation between fat distribution and bone mineral density. *Calcif Tissue Int.* 2010; 86: 116-125.